

表面脱アセチル化キチンナノファイバーの医薬への応用

田渕 良

**Application of surfaced-deacetylated chitin nanofibers to medical and
pharmaceutical fields**

Ryo Tabuchi

March, 2018

Application of surfaced-deacetylated chitin nanofibers to medical and pharmaceutical fields

Ryo Tabuchi

Chitin, a linear polymer composed of β (1-4)-N-acetyl-D-glucosamine unit, has been proposed for use as a functional material in medical and pharmaceutical fields, because of its biocompatibility, biodegradability, the absence of toxicity, adsorption properties and free radical scavenging activities. Recently, surface-deacetylated chitin nanofibers (SDACNFs) were prepared by Ifuku *et al.*, by partial deacetylation of the amide groups on the surface of the chitin nanofibers. SDACNFs have various physiological activities such as lipid absorption inhibitory and wound healing effects etc. However, our knowledge on medical uses of SDACNFs is currently limited. Therefore, we investigated the application of SDACNFs to medical and pharmaceutical fields.

1) Renoprotective and antioxidant activity of SDACNFs in nephrectomized rats

In this study, we described that SDACNFs are more effective in decreasing renal injury and oxidative stress than deacetylated chitin powder (DAC) in 5/6 nephrectomized rats. An oral administration of low doses of SDACNFs over a 4 week period resulted in significant decreases in serum indoxyl sulfate, creatinine and urea nitrogen levels, compared with a similar treatment with DAC or AST-120. The SDACNFs treatment also resulted in an increase in antioxidant potential, compared with that for DAC or AST-120. Immunohistochemical analyses also demonstrated that SDACNFs treated nephrectomized rats showed a decrease in the amount of accumulated 8-OHdG compared with the non-treated group. In *in vitro* studies, the interaction of SDACNFs with a uremic toxin, indole molecule, was much higher than that for DAC. These results suggested that the ingestion of SDACNFs results in a significant reduction in the levels of pro-oxidants, such as uremic toxins, in the gastrointestinal tract, thereby inhibiting the subsequent development of oxidative stress in the systemic circulation.

2) Application of SDACNFs sponges for the wound healing

Beschitin[®] is a commercially available chitin-containing wound dressing and widely used in clinical fields. In this study, we described that SDACNFs sponges are more effective in wound healing of model rats than Beschitin[®]. The wound areas of the excision rats were significantly decreased by the application of SDACNFs sponge groups, compared with those of the non-treated or Beschitin[®] group, on days 4, 8, 10, 12 and 14. In histopathological studies, the complete skin generation including re-epithelium was observed only in SDACNFs sponge groups, whereas the re-epithelium generation was not adequate in

the non-treated and Beschitin® groups. SDACNFs sponges had a higher water-absorbing property than Beschitin®, which may contribute to the more effective wound healing. The results indicated that SDACNFs sponges were superior to Beschitin® in the wound healing effect.

3) SDACNFs reinforced with sulfobutyl ether β -cyclodextrin gel containing prednisolone as potential therapy for inflammatory bowel disease

SDACNFs reinforced with a sulfobutyl ether β -cyclodextrin (SBE- β -CyD) gel were developed to obtain a controlled release carrier of prednisolone (PD) for the treatment of colitis. PD was released slowly from the gel at both pH 1.2 and 6.8. The *in vitro* slow release of PD from the SDACNFs/SBE- β -CyD gel was reflected in the *in vivo* absorption of the drug after oral administration to rats. These results suggested that a simple gel composed of a mixture of SDACNFs and SBE- β -CyD has the potential for use in the controlled release of PD. We also evaluated the therapeutic effects of the SDACNFs/SBE- β -CyD gel containing PD on dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis model mice. The administration of the SDACNFs/SBE- β -CyD gel at intervals of 3 days from the beginning of the DSS treatment resulted in a significant improvement, not only in colitis symptoms but also histopathological changes in colon tissue. In addition, the therapeutic effects of the SDACNFs/SBE- β -CyD gel on colitis can be attributed to decreased levels of neutrophil infiltration and the development of oxidative stress. These efficacy profiles of the SDACNFs/SBE- β -CyD gel containing PD suggested that it has the potential for use in the treatment of, not only colitis, but also a variety of other disorders associated with inflammation and oxidative injuries.

The prophylaxis or therapy associated with combined uses of drugs with SDACNFs will give a new strategy for antioxidant treatments in several types of diseases including renal failure, because the antioxidant effect of SDACNFs is unique and differs from that of other conventional antioxidants. Further, SDACNFs/SBE- β -CyD gels are useful for preparing homogeneous high-content gels capable of carrying poorly water-soluble drugs. In conclusion, SDACNFs or their derivatives could be used for several clinical applications because of their safety and multifunction.

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文および未投稿のデータを基礎とするものである。

- 1) Biomaterials based on freeze dried surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with sulfobutyl ether β -cyclodextrin gel in wound dressing applications
International Journal of Pharmaceutics, **511**, 1080-1087 (2016)
Ryo Tabuchi, Kazuo Azuma, Ryotaro Izumi, Tsubasa Tanou, Yoshiharu Okamoto, Tomone Nagae, Daisuke Iohara, Kaneto Uekama, Masaki Otagiri, Fumitoshi Hirayama, Shinsuke Ifuku, Makoto Anraku

- 2) An oral absorbent, surface-deacetylated chitin nano-fiber ameliorates renal injury and oxidative stress in 5/6 nephrectomized rats
Carbohydrate Polymers, **161**, 21-25 (2017)
Makoto Anraku, Ryo Tabuchi, Shinsuke Ifuku, Tomone Nagae, Daisuke Iohara, Hisao Tomida, Kaneto Uekama, Toru Maruyama, Shigeyuki Miyamura, Fumitoshi Hirayama, Masaki Otagiri

- 3) Surface-deacetylated chitin nanofibers reinforced with a sulfobutyl ether β -cyclodextrin gel loaded with prednisolone as potential therapy for inflammatory bowel disease
Carbohydrate Polymers, **174**, 1087-1094 (2017)
Ryo Tabuchi, Makoto Anraku, Takako Ishiguro, Shinsuke Ifuku, Daisuke Iohara, Kaneto Uekama, Shoko Okazaki, Keizo Takeshita, Masaki Otagiri, Fumitoshi Hirayama

本論文で使用した主な略語一覧表

AUC	血中濃度曲線下面積	Area under the blood concentration-time curve
BA	生物学的利用能	Bioavailability
BUN	尿素窒素	Blood urea nitrogen
CRF	慢性腎不全	Chronic renal failure
CNFs	キチンナノファイバー	Chitin nanofibers
DAC	脱アセチル化キチン	Deacetylated chitin
DSS	デキストラン硫酸ナトリウム	Dextran sulfate sodium
DM- β -CyD	ジメチル- β -シクロデキストリン	Dimethyl- β -cyclodextrin
HB- β -CyD	ヒドロキシブチル- β -シクロデキストリン	Hydroxybutyl- β -cyclodextrin
Hb	ヘモグロビン	Hemoglobin
HP- β -CyD	ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin
IS	インドキシル硫酸	Indoxyl sulfate
MRI	磁気共鳴画像法	Magnetic resonance imaging
MPO	ミエロペルオキシダーゼ	Myeloperoxidase
MRT	平均滞留時間	Mean retention time
SDACNFs	表面脱アセチル化キチンナノファイバー	Surface-deacetylated chitin nanofibers
SBE- β -CyD	スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン	Sulfobutyl ether- β -cyclodextrin
PAO	血漿抗酸化能	Plasma antioxidant potential
PAS 染色	過ヨウ素酸シッフ染色	Periodic acid Schiff stain
PD	プレドニゾロン	Prednisolone
RBC	赤血球	Red blood cell
PLT	血小板	Platelet
WBC	白血球	White blood cell
8-OHdG		8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

目次

第1章 緒言	1
第2章 5/6 腎臓摘出ラットにおける SDACNFs の腎不全進行および酸化ストレスの抑制に関する検討	6
第1節 序	6
第2節 慢性腎不全に対する SDACNFs の有用性評価	8
第1項 <i>In vitro</i> における SDACNFs のインドール吸着能評価	8
第2項 SDACNFs の腎保護および抗酸化効果	9
第3項 SDACNFs を投与したラットの腎組織の観察	11
第3節 考察	13
第4節 小括	15
第3章 SDACNFs スポンジの創傷治療に関する検討	16
第1節 序	16
第2節 SDACNFs スポンジの有用性評価	17
第1項 SDACNFs スポンジの調製と表面観察	17
第2項 SDACNFs スポンジの吸水性評価	18
第3項 SDACNFs スポンジの創傷治療効果	20
第3節 考察	22
第4節 小括	24
第4章 プレドニゾロン (PD) 含有 SDACNFs/スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン (SBE- β -CyD) ゲル (PD 含有ゲル) の DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療に関する検討	25
第1節 序	25
第2節 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルの調製	26
第1項 SDACNFs/各種 CyD ゲルの調製	26
第2項 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルの物性評価	27
第3節 PD 含有 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルの有用性評価	29
第1項 PD 含有ゲルの調製とゲルの強度およびゲルからの PD の放出評価	29

第2項 PD含有ゲルのPD体内動態と消化管内滞留性評価	31
第4節 PD含有ゲルのDSS誘発潰瘍性大腸炎治療効果	34
第1項 DAIスコアによるDSS誘発潰瘍性大腸炎治療の評価	34
第2項 大腸組織および大腸MPO活性によるDSS誘発潰瘍性大腸炎治療の評価	35
第3項 血球成分および脾臓重量によるDSS誘発潰瘍性大腸炎治療の評価	37
第5節 考察	38
第6節 小括	41
第5章 総括	42
実験の部	45
参考文献	55
謝辞	62

第1章 緒言

近年、地球温暖化などの環境問題から再生資源であるバイオマスが注目を集めており、中でも地球上に最も多く存在するとされるセルロース、キチンおよびキトサンが特に注目されている。セルロースは、グルコースが直鎖状に共有結合した構造をしており、植物の細胞壁の主な構成成分である。このセルロースは衣類や紙などの生活用品だけでなく、セルロースの水酸基にさまざまな化学修飾を行い、増粘剤や医薬品の軟膏基剤などとして幅広く利用されている。これに対し、キチンはカニやエビなどの殻に多く含まれ、N-アセチルグルコサミンが直鎖状に共有結合した構造を有する。このキチンをアルカリ処理で脱アセチル化したものをキトサンという (Fig. 1)。キチンおよびキトサンは、通常、産業廃棄物として処分されるカニやエビの殻から抽出されるため、それらの活用は資源の有効活用につながる。さらに、キトサンはセルロースとは異なり、分子内にアミノ基を有するため、抗菌活性¹⁻³⁾、抗炎症効果⁴⁻⁶⁾、抗酸化効果⁷⁻⁹⁾、脂質吸着効果^{10,11)}、腎保護効果^{12,13)}、創傷治癒促進効果^{4,14,15)}などを有することが報告されている。

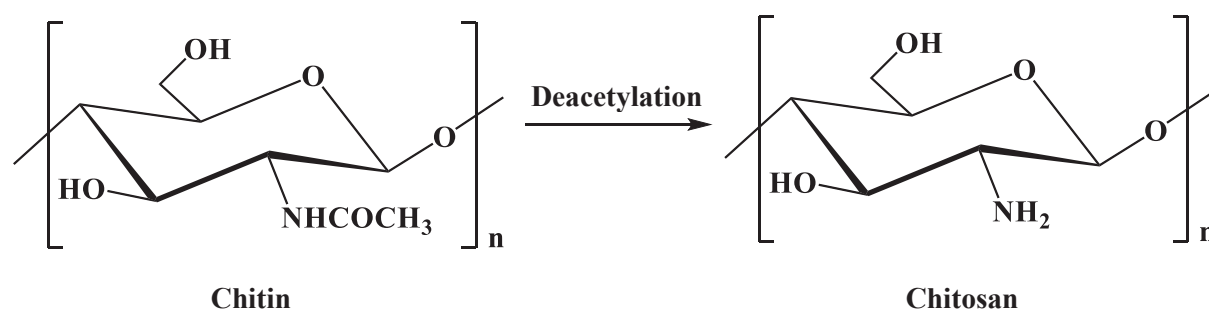


Fig. 1. Structures of chitin (left) and chitosan (right).

例えば、Camacho らは、キトサンの持つ抗菌活性は殺菌性よりも静菌性であり、そのメカニズムとして、① 生物の細胞増殖に必要な鉄、銅、亜鉛などの細胞外微量金属に対するキトサンのキレート効果 ② 細胞内の DNA とキトサンの静電相互作用によるタンパク質合成阻害効果 ③ 正に帯電したキトサンと負に帯電した細胞膜の静電相互作用による細胞膜障害効果によることを報告している³⁾。また、キトサンの抗炎症効果について、Yoon らは、

LPS 刺激によりマクロファージから産生される炎症性サイトカインである TNF- α や IL-6 の産生をキトサンが抑制することを報告している⁵⁾。さらに、Chou らは、LPS 刺激によりマクロファージから産生抑制される炎症抑制サイトカインである IL-10 の産生をキトサンが促進することを報告している⁶⁾。一方、Okamoto らは、キトサンが、創傷面の炎症を抑制し、コラーゲン合成を促進することで創傷治癒促進効果を示すことを報告している¹⁴⁻¹⁶⁾。この抗炎症効果のメカニズムとして、上述した各種炎症性サイトカインの産生抑制に起因すると考えられる。さらに、キトサンはマクロファージからの TGF- β の産生を促進することで、間接的に線維芽細胞を活性化しコラーゲン合成を促進すること¹⁷⁾ やコラーゲン合成に關与する酵素の一つであるプロリンヒドロキシラーゼの活性を高めることでコラーゲン合成を促進することが報告されている¹⁵⁾。

当研究室では、キトサンの抗酸化効果について人工ラジカル種である DPPH ラジカルおよび ABTS ラジカルを用いて検討し⁷⁻⁹⁾、その抗酸化効果は、ビタミン C (VC) には及ばないものの、低分子のキトサンほど高く、VC > キトサン >> グルコサミン >> N-アセチルグルコサミンの順であることを報告した。また、キトサンのラジカル消去にはアミノ基の存在が重要であることが示唆された。さらに、キトサンは *in vitro* だけでなく *in vivo* でも抗酸化効果を発揮することを種々の動物モデルや透析患者において明らかにした¹⁸⁾。キトサンが生体内で抗酸化効果を示すメカニズムとして、低分子キトサン (分子量 3 kDa 以下) の場合は、消化管から吸収されて全身循環により直接的な抗酸化効果を示し、一方、消化管から吸収されにくい高分子キトサン (分子量 3 kDa 以上) の場合は、消化管内で酸化促進物質である脂質や尿毒症物質を吸着・排出する間接的な抗酸化効果によるものと推定した¹⁹⁾。また、当研究室では、キトサンが消化管内で胆汁酸をはじめとした脂質を吸着・排出することで血中コレステロール値を低下させ、その脂質吸着効果は高分子キトサンの方が大きいことを報告した^{10,11)}。さらに、消化管内において、尿毒症物質の一つであるインドキシル硫酸 (Indoxyl sulfate, IS) の前駆体であるインドールを吸着・排出することで腎保護効果を示すことを報告した^{12,13)}。このようにキトサンは、優れた生理活性を持ち、生体適合性も高いことから創傷

被覆材や健康食品として市販されている。

最近、分子間水素結合により強固に結晶化しているセルロースやキチンをナノファイバー化する技術が確立された。セルロースナノファイバーは、鉄鋼の 1/5 の軽さで、その 5 倍以上の強度であり、線熱膨張係数はガラスの 1/50 以下と優れた物性を有している²⁰⁾。さらに、その直径は可視光波長の 1/10 以下であることから、透明樹脂の補強材²¹⁾ など多くの分野での利用が期待されている。しかし、セルロースナノファイバーを調製する際、均一なナノ線維を得るためにファイバー化を複数回行うと結晶化度の低下が引き起こされ、強度などの低下につながる^{22,23)}。そのため、効率的なセルロースナノファイバー調製法が模索され、その中に、TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical) を用いて 6 位水酸基をカルボキシル化し、その静電的反発を利用して、結晶化度を維持した均一なナノファイバーの調製法がある^{24,25)}。このように、均一なセルロースナノファイバーの調製には前処理が必要である。これに対して、Ifuku らはキチンに少量の酸を添加し、グラインダー処理することで均一なナノ線維 (直径 10-20 nm) を調製する技術を確立した²⁶⁾。このキチンナノファイバー (chitin nanofibers, CNFs) は、セルロースナノファイバーと同様に高強度、低熱膨張性を示すため、樹脂の補強材として有効利用が期待されている²⁷⁾。さらに、CNFs は、ナノファイバー化により水への分散性や比表面積が増大するため、ナノファイバー化していないキチンおよびキトサンよりも高い生理活性を持つ。事実、Azuma らは、CNFs をデキストラン硫酸ナトリウム (dextran sulfate sodium, DSS) 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに応用した結果、ナノファイバー化していないキチン粉末よりも優れた大腸炎抑制効果を示すことを報告している²⁸⁾。さらに、最近 Ifuku らは CNFs の表面のみを脱アセチル化 (約 20%) し、アミノ基の静電的反発力により、分散性をより向上させた直径 10-20 nm の表面脱アセチル化キチンナノファイバー (surface-deacetylated chitin nanofibers, SDACNFs) の調製技術を確立した (Fig. 2)²⁹⁾。

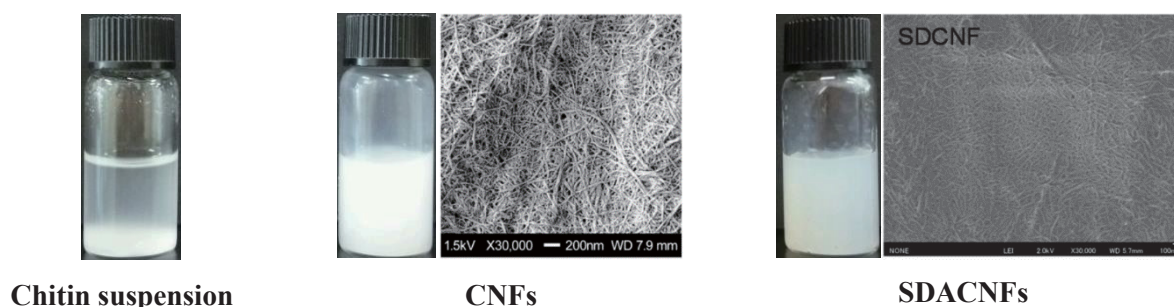


Fig. 2. Appearance of CNFs and SDACNFs.

CNFs : S. Ifuku, *Molecules*, 19, 18367-18380 (2014).

SDACNFs : M. Egusa *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 26202–26210 (2015).

この分散性の向上した SDACNFs は CNFs よりも創傷治癒促進効果⁴⁾、抗菌効果¹⁾、抗がん剤誘発胃腸障害抑制効果³⁰⁾、脂質吸収抑制効果³¹⁾が向上することが報告されている。例えば、Izumi らは、SDACNFs が創傷面の炎症を抑制し、コラーゲン合成を促進することで創傷治癒促進効果を示し、この効果は脱アセチル化度の低い CNFs よりも高いことを報告している⁴⁾。また、Egusa らは、SDACNFs が脱アセチル化度の低い CNFs と比較して高い抗真菌活性を持つことを報告している¹⁾。ナノファイバーにおける抗菌活性メカニズムは、十分には解明されていないが、上述したようなメカニズムがナノファイバーでも起こると推察される。さらに、Koizumi らは、SDACNFs が、抗がん剤である 5-フルオロウラシル (5-FU) により誘発される胃腸障害に対して予防効果を示すことを報告している³⁰⁾。5-FU は胃がん、肝臓がん、乳がん等に幅広く用いられる抗がん剤であるが、副作用として胃腸障害を誘発するため、これが患者の QOL (quality of life) の低下につながる。SDACNFs は、5-FU 投与により腸管内で増加する炎症の指標である ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 陽性細胞数やアポトーシスのマーカーであるカスパーゼ-3 陽性細胞数を減らすことにより、胃腸障害を抑制する。Azuma らは、SDACNFs が高コレステロール食により上昇する血中コレステロールやトリグリセリドの上昇を抑制することを報告している³¹⁾。この効果は、アミノ基を有していないセルロースナノファイバーやナノファイバー化していないキトサンよりも高いことから、コレステロール吸着にはアミノ基の存在とナノファイバー化による分散性の向上および表面積の増大が重要であることが推察される。

上述したように、SDACNFs はナノファイバー化により分散性や表面積が増大し、さらに、CNFs よりもナノファイバー表面に存在するアミノ基が多いことから、静電的相互作用を利用したさまざまな応用が期待される新規素材である。しかしながら、医薬分野への応用例は少ない。

本研究では、SDACNFs の医薬分野へのさらなる応用を目的として検討を行った。第 2 章では、慢性腎不全における尿毒症物質の一つである IS に着目し、IS の前駆体であるインドールの SDACNFs への吸着および 5/6 腎臓摘出ラットにおける SDACNFs の腎保護効果について腎不全治療薬である AST-120 (クレメジン®) およびナノファイバー化していない脱アセチル化キチン (deacetylated chitin, DAC) と比較検討した。第 3 章では、SDACNFs を凍結乾燥してスポンジ状に加工し、この SDACNFs スポンジのラット創傷モデルにおける創傷治癒促進効果について検討した。第 4 章では、カチオン性高分子である SDACNFs を水酸化ナトリウムで中和すると高強度のゲルが調製可能であるという報告に着目した³²⁾。しかし、水酸化ナトリウムは強アルカリ性であるため生体への適応は困難である。そこで、注射剤の添加剤としての使用実績があり、難水溶性薬物溶解作用や薬物安定化作用などを有するアニオン性シクロデキストリン (CyD)^{33,34)} 誘導体であるスルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン (SBE- β -CyD) に着目し、高強度の SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルを調製した³⁵⁾。さらに、CyD の持つ難水溶性薬物溶解作用を利用して、モデル薬物プレドニゾン (PD) を封入したゲルを調製し、*in vitro* および *in vivo* でのゲルからの PD 放出および DSS 誘発潰瘍性大腸炎への治療効果に関する検討を行った。

以下に本研究で得られた知見を詳述する。

第2章 5/6 腎臓摘出ラットにおける SDACNFs の腎不全進行および酸化ストレスの抑制に関する検討

第1節 序

腎不全は、糸球体や尿細管が障害を受けることで腎臓機能が低下する病態であり、急速に腎臓機能が低下する急性腎不全 (Acute renal failure, ARF) と長い年月をかけて徐々に腎臓機能が低下する慢性腎不全 (Chronic renal failure, CRF) に分類される³⁶⁻³⁸⁾。後者の原因疾患には、糖尿病性腎症や慢性腎炎など多くのものが挙げられ、末期の腎不全として、透析医療あるいは腎移植が挙げられる。我が国の透析患者数は年々増加し、約30万人 (厚生労働省調べ、2014年) に達し、医療費増大の面からも重大な問題となっている³⁸⁾。そのため、保存期腎不全を適切に管理し、透析への移行を減らすような予防的医療が、患者の QOL の向上だけでなく、医療経済的な観点からも切望されている。

腎不全進行の詳細なメカニズムは十分には解明されていないが、その一つとして尿毒症物質である IS の排泄障害による生体内への蓄積が挙げられる^{39,40)}。IS は食事のタンパク質の代謝物と考えられており、消化管から前駆物質のインドールが吸収された後、肝臓で硫酸抱合を受けて生成される。血中では大部分がアルブミンと結合した状態で存在しており、代謝を受けずに主に腎臓から排泄される。そのため、腎機能の低下により血中に高濃度に蓄積するようになり、透析患者では血中濃度が正常時の100倍近くまで増加することもある^{13,41,42)}。この IS の蓄積は尿細管上皮細胞においてフリーラジカルの産生亢進を誘発し、さらに血管内の酸化ストレス亢進にも関与することが報告されている³⁹⁾。したがって、消化管内でインドールを吸着し、糞中に排出することが腎不全進行および酸化ストレスを軽減させる重要な治療方針の一つと考えられている (Fig. 3)。

クレメジン®は尿毒症物質の中でも、IS を始めとするインドール骨格を有する有機アニオンに対して優れた吸着能を示す⁴³⁾。投与されたクレメジン®は消化管内でこれら尿毒症物質あるいはその前駆体を吸着したまま糞中に排出し、体内での蓄積を抑制するというユニー

クな機序により薬理効果を発揮する⁴⁴⁾。しかし、医薬品であるクレメジン®は医療保険適応上の問題で、腎不全の症状がなければ使用することができないこと、また、その主成分は薬用炭であるため、コンプライアンス不良の問題が危惧されている。

これまでに、当研究室では慢性腎不全モデルラットを用いてキトサンの抗酸化及び腎保護効果について検討した結果、キトサン投与により腎機能パラメータである尿中アルブミン、血中 IS 及び血清クレアチニン濃度は有意に減少し、腎不全の進行を抑制することを確認している¹²⁾。さらに最近、透析中の患者 11 例を対象として、キトサン摂取に伴う腎障害の進行度及び酸化ストレスの変動について調査した結果、キトサン摂取前と比較して有意な血清リン及び血中 IS の低下を観察した¹³⁾。一方で透析患者におけるキトサン摂取による便秘などの副作用、さらには摂取終了後の血中 IS 濃度の再上昇が確認され、継続的なキトサン摂取による腎不全進行抑制のためには、少量で効率的に長期間摂取できるキトサンの剤形および摂取法の改善が必要不可欠である。

本章では、キチンおよびキトサンをナノファイバー化し、表面積および分散性が向上することで、腎保護効果の向上が期待できるのではないかと考え、SDACNFs の *in vitro* における IS 前駆体インドールの吸着に加え、5/6 腎臓摘出ラットにおける腎保護効果について *in vivo* における検討を行った。

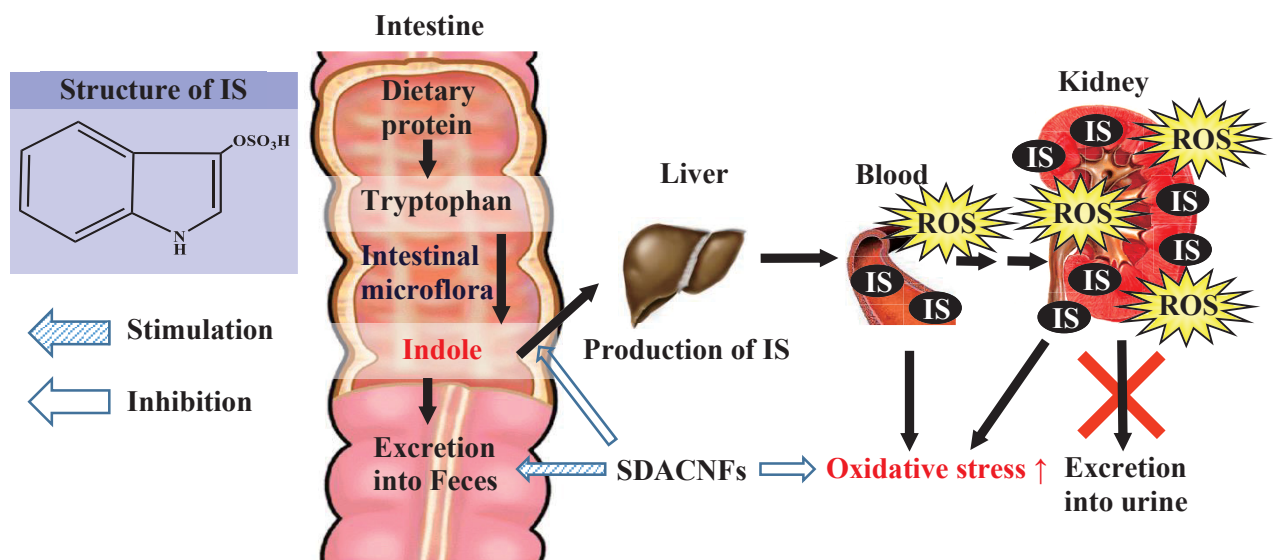


Fig. 3. Proposed mechanism for the renal protective and antioxidative effect by SDACNFs.

ROS : Reactive oxygen species

第2節 慢性腎不全に対する SDACNFs の有用性評価

第1項 *In vitro* における SDACNFs のインドール吸着能評価

In vitro における SDACNFs のインドール吸着能について、ナノファイバーに解砕する前の原料である DAC、脱アセチル化処理を行っていない CNFs、および AST-120 と比較検討した。

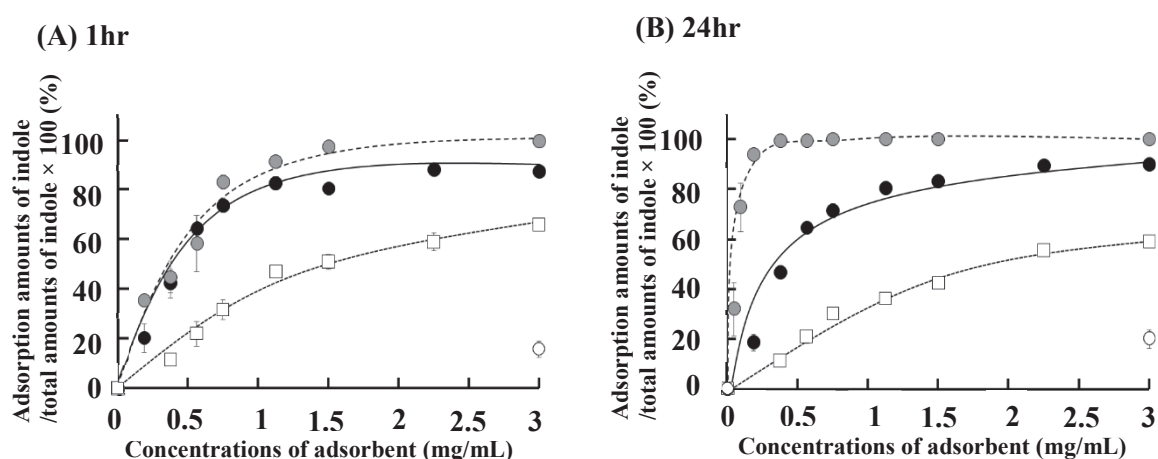


Fig. 4. Adsorption ability of SDACNFs, DAC, AST-120 and CNFs against indole after 1hr (A) and 24hr (B). Results are shown for SDACNFs (black circle), DAC (white circle), AST-120 (gray circle), CNFs (white square).

SDACNFs、DAC、CNFs、AST-120 の1時間および24時間後のインドール吸着を比較した結果、SDACNFs のインドール吸着は濃度依存的に増大し、ナノファイバー化していない DAC および脱アセチル化度が1%程度の CNFs よりも優れた吸着能を示した (Fig. 4)。

Table 1. Adsorption parameters determined from Langumuir adsorption isotherms.

	1 hr		24 hr	
	K (10^3 L/g)	q_m (mg/g)	K (10^3 L/g)	q_m (mg/g)
SDACNFs	0.8 ± 0.4	22.5 ± 6.4	0.8 ± 0.5	23.3 ± 4.6
AST-120	0.7 ± 0.2	23.1 ± 2.9	7.3 ± 3.0	97.7 ± 21.2
CNFs	0.3 ± 0.1	6.7 ± 1.5	0.3 ± 0.03	6.2 ± 0.2
DAC	0.2 ± 0.01	2.3 ± 0.2	0.2 ± 0.05	2.4 ± 0.2

K : Equilibrium constant, q_m : Maximum absorption amount of indole

Langmuir の吸着等温式から平衡定数 (K) および最大吸着量 (q_m) を算出した結果 (実験の部: インドール吸着能評価参照)、SDACNFs の 24 時間後におけるインドール最大吸着量は、AST-120 の 1/4 程度であるが、CNFs や DAC に比べて 4~10 倍大きいことがわかる。また、SDACNFs の K 値および q_m 値 は 1 時間後と 24 時間後で変化しないことから、吸着は AST-120 と比較して速いことが示唆された (Table 1)。以上の結果より、効率的なインドールの吸着にはナノファイバー化による表面積の増大とアミノ基の存在が重要であることが示唆された。

第 2 項 SDACNFs の腎保護および抗酸化効果

SDACNFs による腎保護効果を検討するため、5/6 腎臓摘出術を施行したラットにより検討した。4 週間の予備飼育後、SDACNFs、DAC、AST-120 をそれぞれ 40 mg/kg/day で経口投与し、0 週および 4 週間後に採血し、各種評価を行った。投与 4 週後における生化学パラメータである尿素窒素 (blood urea nitrogen, BUN)、クレアチニン (creatinine)、無機リン (inorganic phosphorus, P)、IS 濃度の変動を測定した結果、SDACNFs 及び AST-120 投与群において、非投与群と比較して、腎障害抑制の傾向が観察された。特に SDACNFs 投与群では、すべての腎障害パラメータにおいて有意な低下が観察された (Table 2)。次に、投与 4 週後における抗酸化パラメータの変動を PAO (Plasma antioxidant potential) により評価した結果、SDACNFs 投与群において、非投与群と比較して、抗酸化作用を維持する傾向が観察された (Fig. 5)。

Table 2. Serum biochemical parameters after administration of SDACNFs, DAC and AST-120 to the CRF rats.

		CRF	SDACNFs	DAC	AST-120
Body weight (g)	0 week	339.7 ± 14.4	364.0 ± 7.7	365.8 ± 9.9	338.3 ± 15.4
	4 week	394.0 ± 18.4	371.0 ± 15.9	382.0 ± 22.4	392.6 ± 9.8
Serum BUN (mg/dL)	0 week	70.1 ± 5.4	59.5 ± 6.2	68.0 ± 4.7	60.3 ± 3.0
	4 week	127.8 ± 22.5	55.2 ± 7.0 #	110.6 ± 28.6	87.9 ± 19.0
Serum creatinine (mg/dL)	0 week	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.7 ± 0.01
	4 week	1.9 ± 0.5	0.8 ± 0.1 #	1.5 ± 0.4	2.2 ± 0.3
Serum P (mg/dL)	0 week	6.7 ± 0.21	6.0 ± 0.41	6.1 ± 0.34	6.5 ± 0.29
	4 week	9.9 ± 2.15	5.3 ± 0.65 #	6.8 ± 1.51	6.1 ± 0.68
Serum IS (µM)	0 week	11.9 ± 1.4	9.2 ± 1.9 #	9.6 ± 1.7	12.6 ± 1.6
	4 week	26.5 ± 4.1	14.2 ± 2.5 #	20.1 ± 5.2	18.7 ± 1.9
Serum PAO (µM)	0 week	697.1 ± 63.6	617.4 ± 134	570.4 ± 51.6	690.39 ± 52.1
	4 week	500.6 ± 63.6	736.55 ± 99.9 #	553.99 ± 136	591.77 ± 56.8

Values are expressed as the mean ± SEM (n = 4-6 rats per group).

#*p* < 0.05, compared with CRF rats.

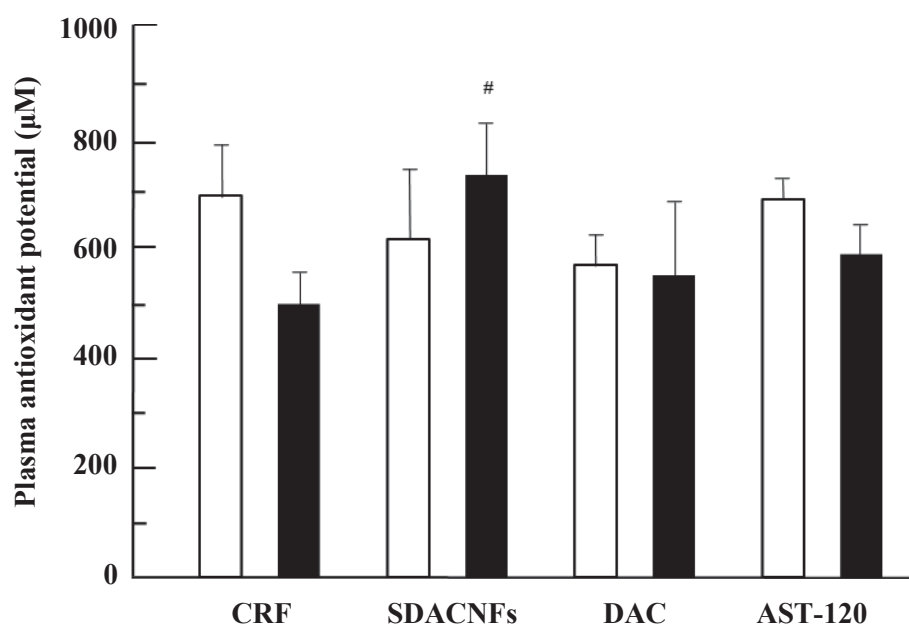


Fig. 5. Effects of SDACNFs, DAC and AST-120 treatments on indices of oxidative stress using plasma antioxidant potential (PAO).

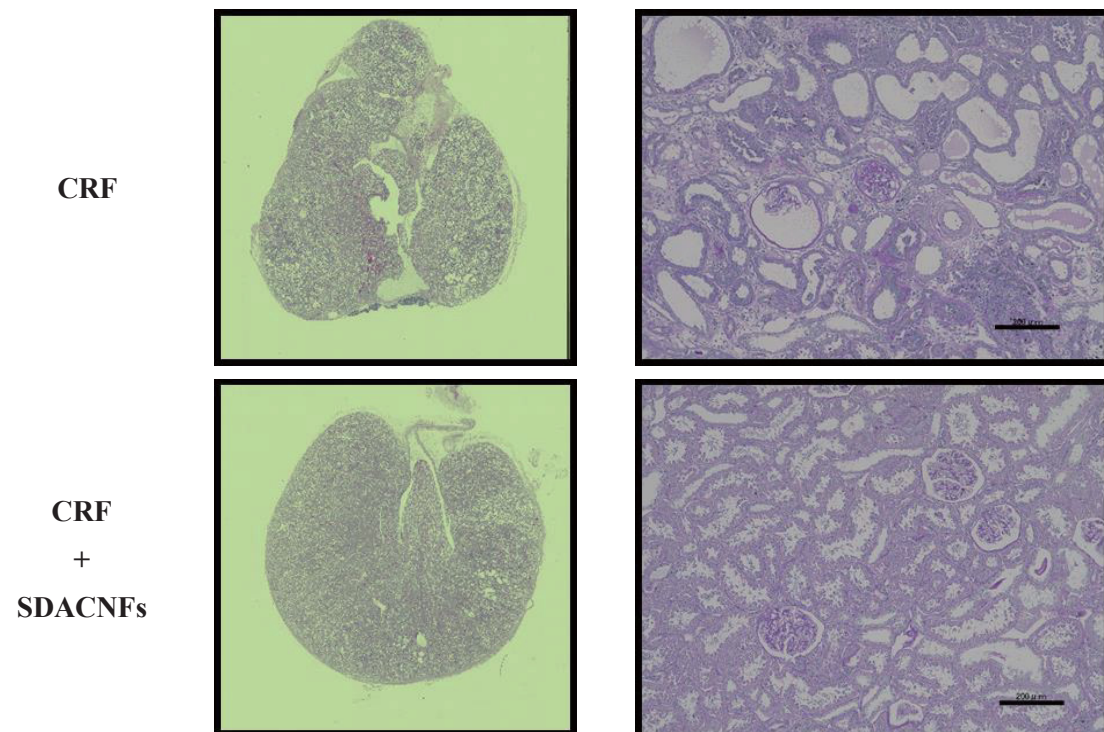
Results are shown for 0 (white) and 4 (black) weeks. Results are expressed as the mean ± SEM (n = 4-6 rats per group).

#*p* < 0.05, compared with CRF rats.

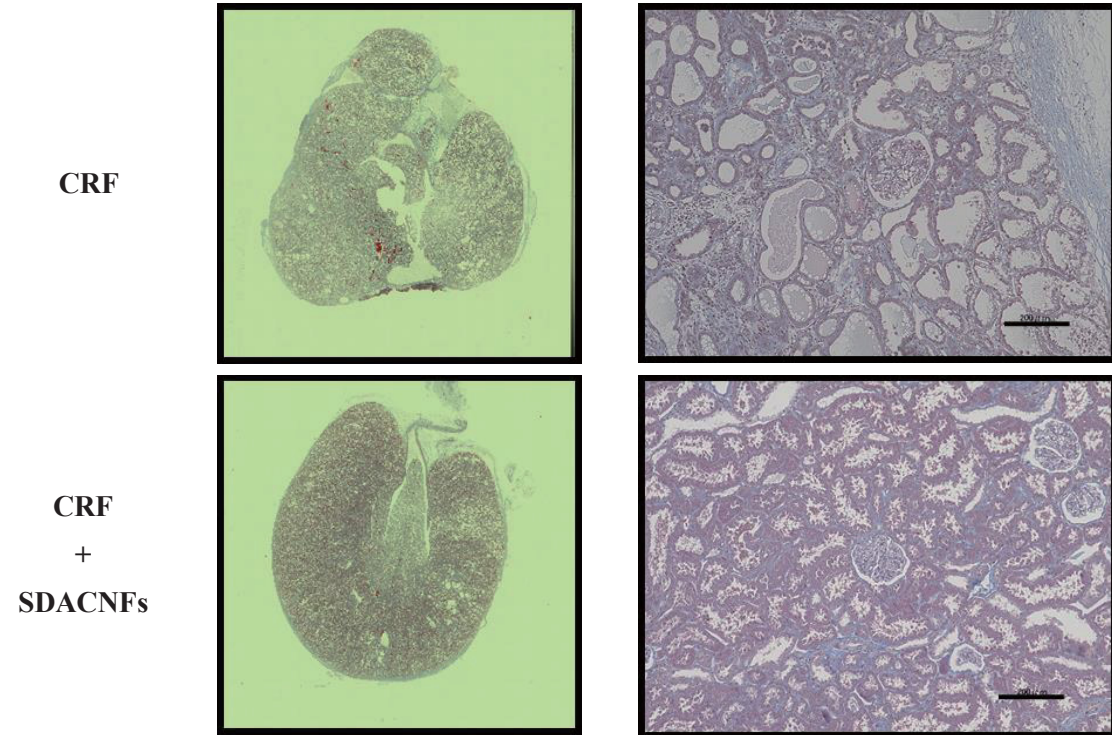
第3項 SDACNFs を投与したラットの腎組織の観察

試験開始4週後の腎臓を摘出後、PAS 染色 (Periodic acid Schiff stain)、Masson's trichrome 染色、8-OHdG 染色を行った。PAS 染色 (Fig. 6A) は糖タンパク質を染色する方法であり、基底膜がはっきりと染色されるため糸球体や尿細管の変化を観察するのに有用である。Masson's trichrome 染色 (Fig. 6B) は膠原繊維を染色する方法であり、組織の線維化を評価することができる。8-OHdG 染色 (Fig. 6C) は deoxyguanosine (dG) が酸化されて生じる 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) を染色するもので、酸化ストレスマーカーとして用いられている。PAS 染色および Masson's trichrome 染色の結果、SDACNFs を投与したラットの腎臓は、非投与のラットの腎臓と比較して、損傷が少なく、腎線維化も少ないことが示された。また、酸化ストレスの指標である 8-OHdG 染色の結果、酸化ストレスも軽減されており、優れた腎保護効果を示した。

(A) PAS



(B) Masson's trichrome



(C) 8-OHdG

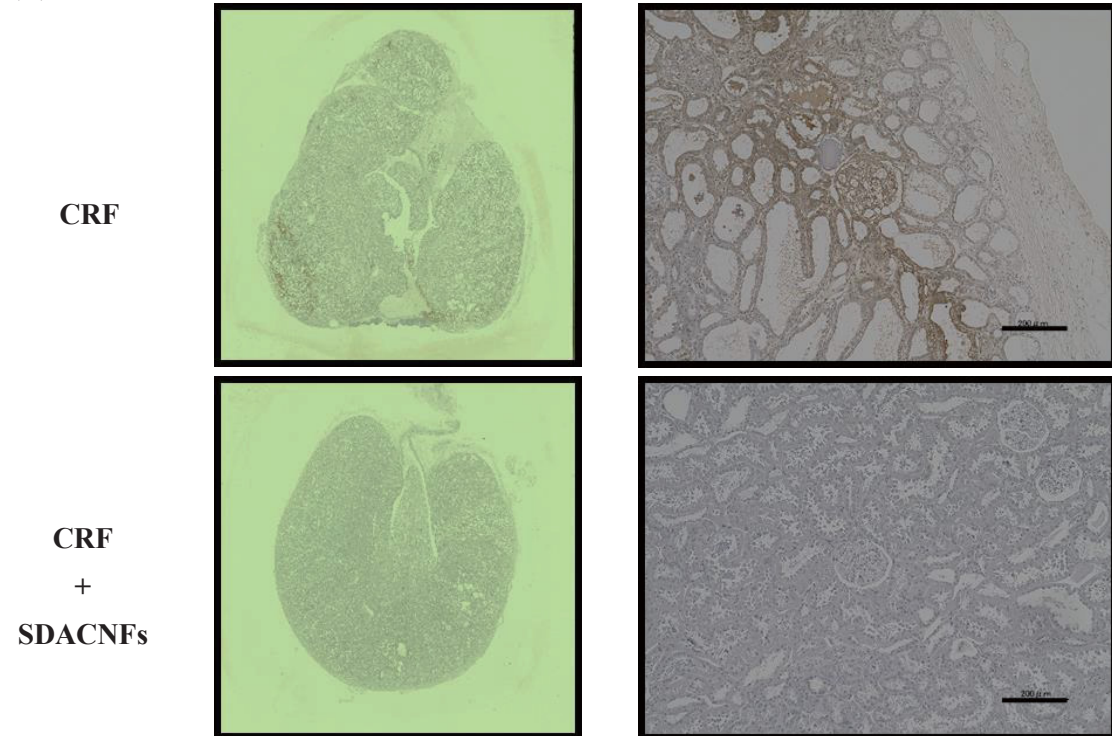


Fig. 6. Micrograph images for the renal tissue of CRF model rats after administration of SDACNFs. (A) Periodic acid–Schiff (PAS) staining, (B) Masson's trichrome staining, and (C) immunofluorescence staining of renal 8-OHdG (8-hydroxy-2'-deoxygenase) images. Non-treated CRF rats and SDACNFs-treated CRF rats were measured after 4 weeks of administration as described in materials and methods. Each scale bar indicates 200 µm.

第3節 考察

本章では、SDACNFs の CRF 進行に対する抑制効果を検討した。CRF は、腎臓より効率よく排泄される尿毒症物質が蓄積することで悪化する。この悪化を防ぐためには、尿毒症物質の原因となるものを吸収させないことが重要である。この尿毒症物質の一つに IS がある。IS は食事中に含まれるトリプトファンが腸内細菌により代謝されたインドールの肝代謝物である。したがって、消化管内において、インドールを吸収させず糞便中に排出させることが、CRF 悪化を防ぐために重要である。ナノファイバーは、通常のキチンおよびキトサンと比較して水への分散性が向上しており、表面積も大きいいため、効率的にインドールを吸着・排出できる可能性がある。そこで、SDACNFs のインドール吸着能を *in vitro* で評価したところ、ナノファイバーに解砕する前の原料である DAC および脱アセチル化度が 1%程度と低い CNFs と比較して優れたインドール吸着効果を示した。効率的なインドールの吸着には、ナノファイバー化による表面積の増大とアミノ基の存在が重要であることが示された (Fig. 4 and Table 1)。次に、5/6 腎臓摘出術を施行した CRF ラットに SDACNFs を毎日経口投与することによる腎保護効果を検討した。その結果、SDACNFs は DAC および AST-120 よりもクレアチニンをはじめとした各種血清パラメータ改善効果を示した (Table 2)。*In vitro* における SDACNFs のインドール吸着量は AST-120 よりも低いにも関わらず、*in vivo* では AST-120 よりも高い腎保護効果を示した。これは、インドールの吸着以外の効果があると考えられる。キチンおよびキトサンは、消化管内において尿毒症物質だけでなく、生体内酸化促進物質である低密度リポタンパク質 (Low-density lipoprotein, LDL) などの脂質成分を吸着・排出し、抗酸化効果を示すことを報告した^{7,10,11)}。SDACNFs にも脂質を吸着・排泄する効果が報告されている³¹⁾ ことから、同様のメカニズムで抗酸化効果を示したものと考えられる。事実、生体内抗酸化能を示す PAO は SDACNFs 投与群において増加し (Fig. 5)、また、8-OHdG 染色の結果からも腎組織における酸化ストレスの軽減が示唆された (Fig. 6C)。

現在、慢性腎不全をはじめ、多くの生活習慣病の危険因子として酸化ストレス^{45,46)} の負荷が注目され、酸化ストレスの抑制が病態進行の抑制や予防につながるものと期待されてい

る。本研究では、機能的食品であるキトサンの分散性を向上させた SDACNFs が血中脂質濃度や尿毒症物質である IS 濃度を減少させ、全身循環系において効率的に酸化ストレスを軽減することを見出した。SDACNFs のユニークな抗酸化作用は他の抗酸化剤であるレニン・アンギオテンシン系阻害剤や抗酸化ビタミンと異なることから、SDACNFs 単独あるいはこれらの薬剤との併用投与は、メタボリックシンドロームや腎不全をはじめとした生活習慣病における新規抗酸化治療戦略となる可能性が考えられる。また、SDACNFs は他の酸化ストレス関連疾患に対する予防あるいは早期治療にも有用であると考えられる。現在、クレメジン®は透析導入前の尿毒症症状出現時期に使用を開始し、適応上、透析の導入とともに治療を中止するという非常に短期間の使用に留められている⁴⁷⁾。しかし、今回 SDACNFs がクレメジン®と同様の尿毒素吸着作用を有し、また抗酸化剤としての可能性が示唆されたことから、酸化ストレスが出現する腎不全初期の段階から使用することで効果的な腎保護効果が期待できる (Fig.7)。これらの知見は、SDACNFs の脂質吸収抑制効果や腎保護効果に加えた多面的作用としての抗酸化効果を明らかにするのみならず、SDACNFs の医薬分野への応用に際し、有用な基礎データになるものと考えられる。

以上、本章では、CRF モデルラット用いて SDACNFs が優れた腎保護効果を示すことを実証した。

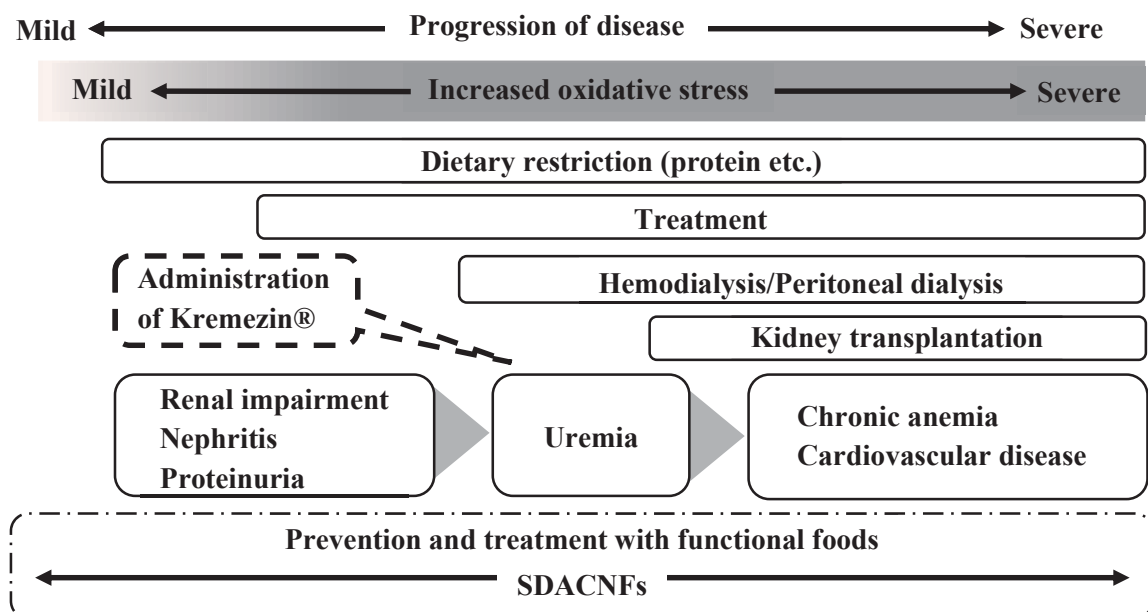


Fig. 7. Strategy to control renal failure progression.

第4節 小括

本章では、SDACNFs の医薬分野への応用を目的として、CRF の腎保護効果について検討した。以下に、得られた知見を小括する。

- 1) 尿毒症物質 IS の前駆物質であるインドールの吸着能を *in vitro* で評価したところ、SDACNFs の吸着能は、ナノファイバー化していない DAC および脱アセチル化度の低い CNFs よりも高いことが示された。
- 2) SDACNFs は、CRF により体内に蓄積する BUN、クレアチニン、無機リン、IS、PAO を改善し、この効果は臨床で使用されている AST-120 (クレメジン®) より高かった。
- 3) SDACNFs は生体内酸化ストレスを抑制することが示唆された。これは血清中の IS により引き起こされる酸化ストレスの軽減および SDACNFs の脂質吸収抑制効果に起因するものと推察された。
- 4) 腎臓組織の PAS 染色、Masson's trichrome 染色、8-OHdG 染色の結果から、SDACNFs は腎臓組織の損傷・線維化・酸化ストレスを軽減することが示された。

以上の結果より、SDACNFs はインドールを吸着・排出することで優れた腎保護効果を示すことが明らかになった。

第3章 SDACNFs スポンジの創傷治療に関する検討

第1節 序

生体は、外傷や外科的手術などにより損傷を受けると自己組織の修復が行われる。これまで創傷治療において最も重要なことは感染制御であり、創傷は消毒して乾燥させることが常識であったため、ガーゼなどによるドレッシングが行われてきた。しかし、近年は、創傷の乾燥は肉芽形成や再上皮化を妨げるということが一般化してきたため、創傷は湿潤させて治す「Moist wound healing (湿潤環境下療法)」が推奨されている⁴⁸⁾。実際に、臨床現場では吸水性の高いアルギン酸カルシウムやカルボキシメチルセルロースなどを使用した創傷ドレッシング剤が使用されている⁴⁹⁾。

一般に、創傷治癒過程は、血小板等による止血および白血球による細菌の除去などが行われる「出血・炎症期」、線維芽細胞の遊走増殖および血管新生・肉芽形成が起こる「増殖期」、皮膚が再生される「再構築期」に分類される^{50,51)} (Fig. 8)。

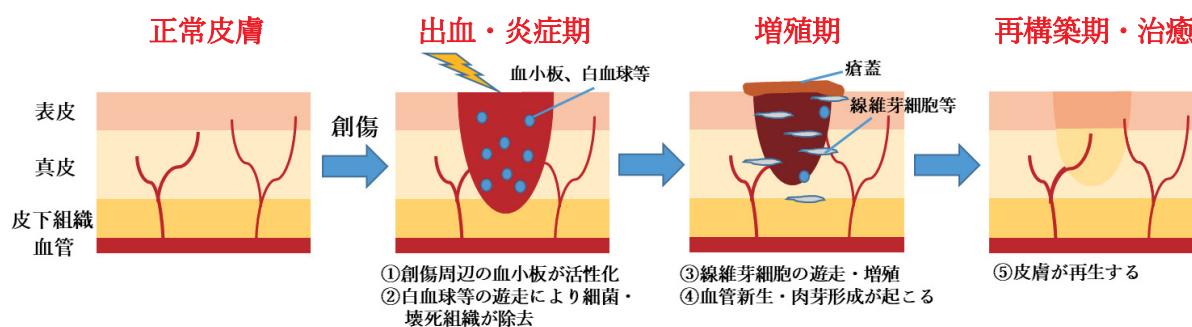


Fig. 8. The stages of the wound healing process.

創傷治癒を促進するためには、出血・炎症期を短縮し、増殖期への移行を早めることが重要である。キチンおよびキトサンは、出血・炎症期を短縮し、増殖期への移行を早めることで創傷治癒促進効果を示すことが報告されている^{4,16)}。実際に、キチンをスポンジ状に加工した創傷被覆材 (ベスキチン[®]) が開発され、医療現場でも使用されている。

本検討では、これまでに創傷治癒促進効果が報告されているキチンおよびキトサンをナノファイバー化した SDACNFs をスポンジ状に加工することで、さらなる創傷治癒促進効果

が期待できると考え、スポンジの *in vitro* 吸水特性を評価し、*in vivo* にてラット創傷モデルにおける創傷治癒促進効果を評価した。

第2節 SDACNFs スポンジの有用性評価

第1項 SDACNFs スポンジの調製と表面観察

SDACNFs スポンジの調製は、長方形の型に SDACNFs 3.5 g を入れ、凍結乾燥することで調製した (Fig. 9)。このスポンジを走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察したところ、ナノファイバー線維が複雑に絡み合った密なスポンジ状構造をしていることが示された。これに対し、市販の創傷被覆材であるベスキチン®は、太い線維が絡みあった粗いスポンジ状構造をしていた (Fig. 10)。DAC においても凍結乾燥によりスポンジの調製を試みたが、SDACNFs のようなスポンジへの加工は困難であった。

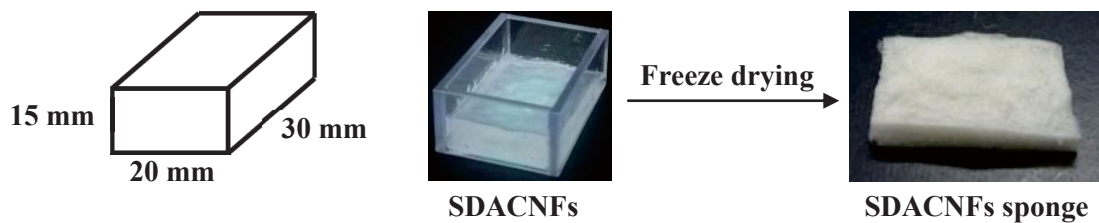


Fig. 9. Preparation of SDACNFs sponge.

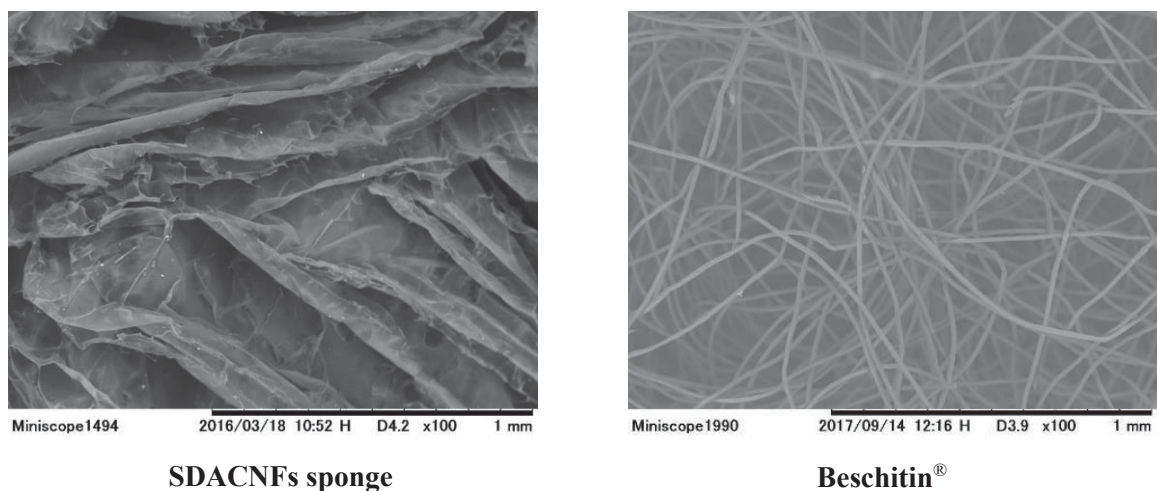


Fig. 10. SEM images of surface of SDACNFs sponge and Beschitin®.

第2項 SDACNFs スポンジの吸水性評価

創傷の湿潤環境下療法において、創傷面の滲出液を吸収・保持することが重要である。そこで、SDACNFs スポンジの吸水性について接触角および吸水量を測定し、ベスキチン®の場合と比較した。

接触角は、サンプル上に水を滴下後、水滴の角度を測定することでサンプルの濡れを評価するものである。その結果、SDACNFs スポンジの接触角は10秒間の間に86.4°から49.6°に変化し、非常に濡れやすい性質を持つことが示された (Fig. 11)。これに対して、ベスキチン®は、先ほどのSEM画像 (Fig. 10) からわかるように線維が非常に太く、隙間の多い粗いスポンジであったため、表面が濡れるというよりも隙間を水滴が通過する状態になり、接触角の正確な測定は困難であった (Data not shown)。

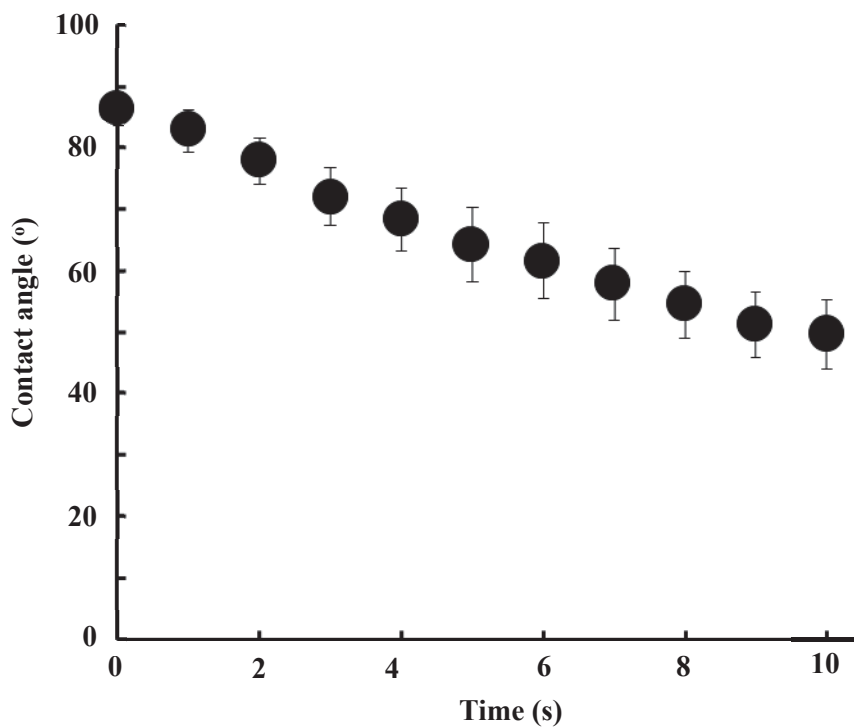


Fig. 11. Contact angular variation of SDACNFs sponge.

次に、SDACNFs スポンジおよびベスキチン®の吸水量を測定した。その結果、SDACNFs スポンジの吸水量は吸水前と比較して約 55 倍増大し (Fig. 12 A)、吸水後もスポンジの形状を維持していた (Fig. 12 B)。また、ベスキチン®と比較して約 3 倍近い吸水量を示した。これは、ナノファイバー化によりスポンジ構造が密になっていたことに起因すると考えられ、SDACNFs スポンジは優れた吸水性を示すことが明らかとなった。

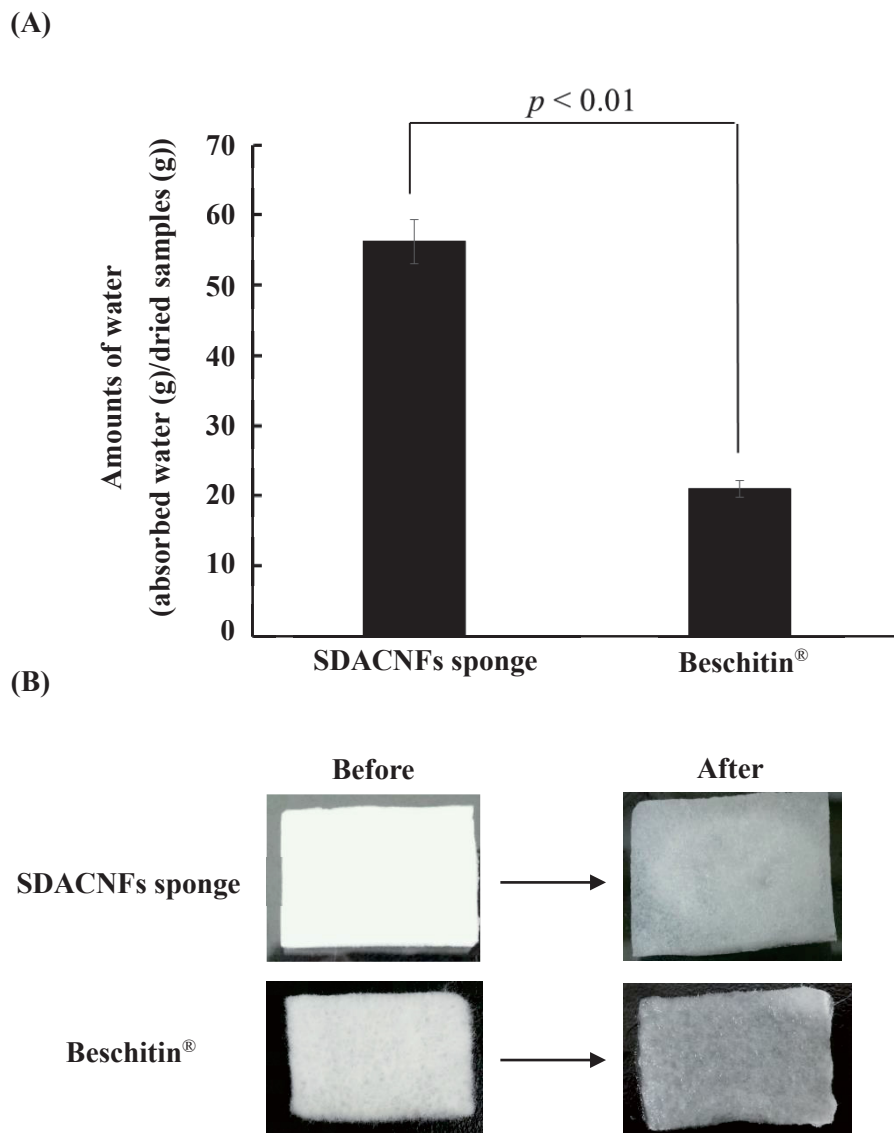


Fig. 12. Amounts of absorbed water and appearance of SDACNFs sponge and Beschitin® before and after immersion.

第3項 SDACNFs スポンジの創傷治療効果

前項で、SDACNFs スポンジは創傷面の水分を吸収・保持することで、創傷面を十分な湿润環境にできる可能性を示した。そこで、創傷モデルラットを用いて、SDACNFs スポンジの創傷治癒促進効果について検討した。

本項の実験スケジュールを Fig. 13 に示す。ラットの背部の表面を取り除き創傷面とし、創傷面へスポンジを適用後、テープで固定した。スポンジの交換は2日間隔で行った。

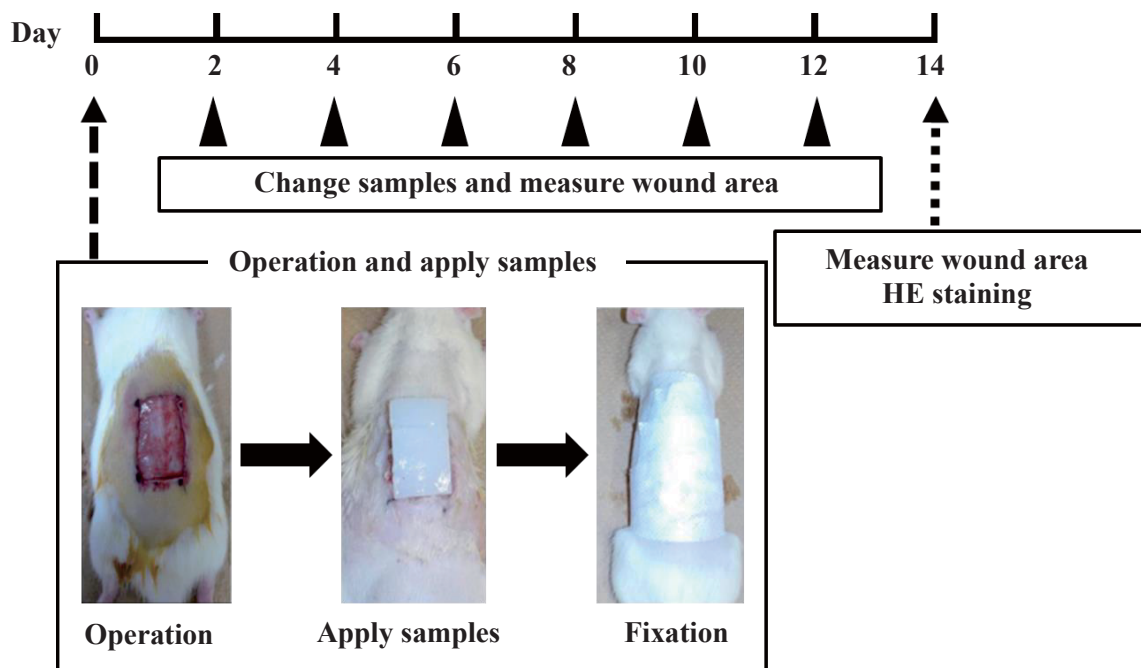
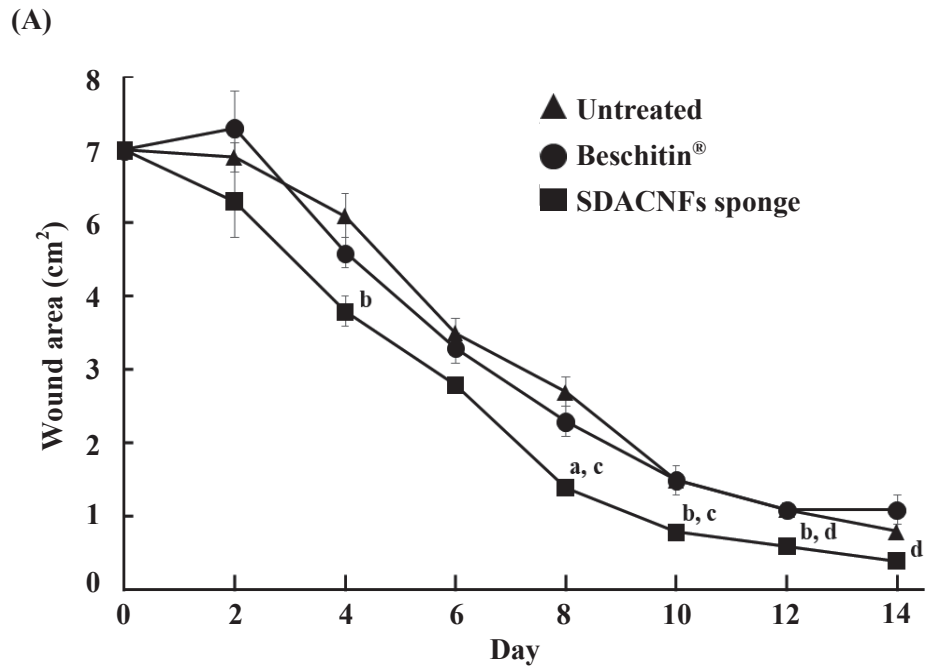


Fig. 13. Schematic study design of the excision wound model. The experimental procedures for the excision wound model are shown in a box.

Fig. 14 A に創傷面積の変化を示す。創傷面は時間経過とともにその周りから皮膚が再生し、創傷面積は縮小した。SDACNFs スポンジは、未治療およびベスキチン®と比較して、2日目より創傷面の縮小が観察され、その後も優れた創傷面積縮小効果が観察された。

次に Fig. 14 B に 14 日目における皮膚の HE 染色の結果を示す。未治療およびベスキチン®は、表皮との境目が不鮮明で皮膚の再上皮化が不十分であった。これに対し SDACNFs スポンジは、表皮との境目が鮮明で皮膚の再上皮化が十分に行われていることが示された。



(B)

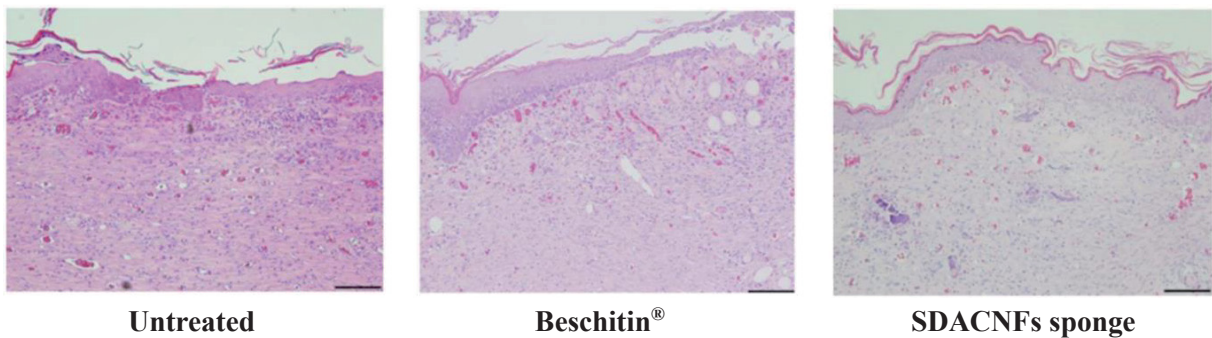


Fig. 14. Effects of SDACNFs sponge and Beschitin[®] on wound areas in the excision wound model. Data are presented as the mean \pm S.D. $n = 7-8$ in each group. Each letter indicates a significant difference as follows; a: $p < 0.01$ compare with the untreated group, b: $p < 0.05$ compared with the untreated group, c: $p < 0.01$ compared with the Beschitin[®] group, d: $p < 0.05$ compared with the Beschitin[®] group (A). Histopathological assessment of the effects of SDACNFs sponge and Beschitin[®] (B).

Each scale bar indicates 100 μm .

第3節 考察

SDACNFs を凍結乾燥して調製した SDACNFs スポンジは、ナノファイバーが密に絡み合った構造をしており (Fig. 10)、その吸水性は市販の創傷被覆材であるベスキチン®よりも約3倍高かった (Fig. 12)。これは、ナノファイバー化によりスポンジ構造が密になり、水分を保持しやすくなったことに起因するものと考えられる。この SDACNFs スポンジをラット背部皮膚を除去した創傷モデルラットに適用した結果、ベスキチン®よりも優れた創傷面積縮小効果を示した (Fig. 14 A)。さらに、皮膚組織の HE 染色においても皮膚の再上皮化が観察され、SDACNFs スポンジは優れた創傷皮膚促進効果を示した (Fig. 14 B)。

凍結乾燥していない SDACNFs による創傷治癒促進効果は、すでに Izumi らが報告⁴⁾しており、SDACNFs は、創傷治癒過程の「出血・炎症期」、「増殖期」、「再構築期」のうち「出血・炎症期」を短縮し、「増殖期」におけるコラーゲンなどの細胞外マトリクス合成を促進することで創傷治癒促進効果を示すことが報告されている。また、その効果は脱アセチル化度の高い SDACNFs の方が大きいことから、キトサンのアミノ基の関与が示唆されている。しかし、実際には組織免疫染色による免疫細胞の染色や膠原繊維の染色により創傷治癒促進効果を確認したのみで、ナノファイバーの創傷治癒に関する詳細なメカニズムは明らかにされていない。ナノファイバー化していないキチンやキトサンの効果として、Minami ら^{16,52)} は、創傷治癒過程の最初の段階である「出血・炎症期」に対する、① 血液凝固活性⁵³⁾、② 抗菌作用^{1,54)}、③ 白血球遊走活性⁵⁵⁻⁵⁹⁾、④ 補体活性化⁶⁰⁻⁶²⁾ が重要であることを報告している。

「出血・炎症期」における① 血液凝固活性は最初に起こる現象であり、キチンおよびキトサンは血小板を活性化することで血液凝固活性を示すことが確認されており、その効果はキトサンよりキチンの方が強いことが報告されている⁵³⁾。これは、キチンおよびキトサンは生体内で分解され⁶³⁾、分解速度は一般にキチンの方が速いことから⁵²⁾、キチンの分解物である N-アセチルグルコサミンの作用によるかもしれない。「出血・炎症期」における② 抗菌作用は、キチンおよびキトサンのアミノ基とマイナスチャージを有する細菌膜との相互作用により発揮されるため、菌種により異なるものの、アミノ基数の多いキトサンの方がキチンに比べて

一般に高いと言われている^{1-3,54)}。また、「出血・炎症期」における③ 白血球遊走活性も同時に起こり、創傷治癒に必要な生理活性物質（プロスタグランジンなど）の放出も促進すると言われている。特に、キトサン分解物であるグルコサミン 6 量体は、キトサンよりも遊走活性が高いことが報告されている¹⁵⁾。さらに「出血・炎症期」における④ 補体活性化作用は、キトサンの脱アセチル化度と正の相関があることが報告されている¹⁵⁾。次に、創傷治癒過程の「増殖期」に対するキチンおよびキトサンの効果として、細胞外マトリクスの合成促進⁶⁴⁾が挙げられる。線維芽細胞は肉芽形成時の重要な細胞であり、細胞外マトリクスの一つであるコラーゲン生成に関与する。しかし、キチン、キトサンおよびそのオリゴマーに線維芽細胞を直接刺激する活性はなく^{65,66)}、コラーゲン合成に関与する酵素であるプロリンヒドロキシラーゼを活性化する。興味深いことに、この活性は、脱アセチル化度と正の相関があることから、これらの活性には特にキトサンの持つアミノ基の関与が強く示唆されている。

以上の知見より、SDACNFs スポンジが、ベスキチン®と比較して優れた創傷治癒促進効果を示した理由が同様のメカニズムに起因するかは不明であるが、少なくとも脱アセチル化によるナノファイバー表面上のアミノ基の存在が創傷治癒促進効果の増強に寄与した可能性は十分に考えられる。さらに、SDACNFs スポンジの吸水性により創傷面の湿潤環境を保持したことも創傷治癒促進効果を示した一つの要因であると推定される。

第4節 小括

本章では、SDACNFs の医薬への応用を目的として、SDACNFs スポンジの創傷治癒促進効果について検討した。以下に、得られた知見を小括する。

- 1) SDACNFs を凍結乾燥することで、簡便に SDACNFs スポンジが調製可能であった。
- 2) SDACNFs スポンジは、ベスキチン®と比較して約3倍の吸水量を示した。
- 3) SDACNFs スポンジをラット創傷モデルへ応用した結果、ベスキチン®と比較して、短時間で創傷面積の縮小および表皮の再上皮化が観察された。

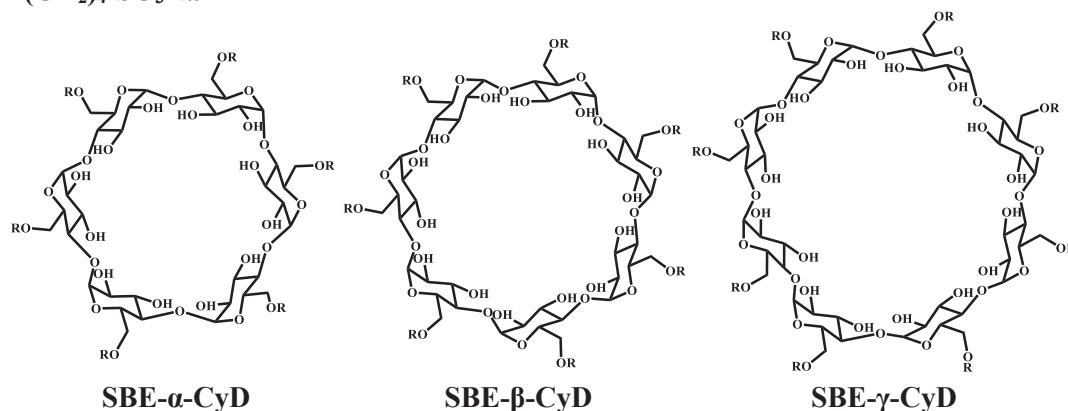
以上の結果より、SDACNFs スポンジは創傷被覆材として有用であることが明らかとなった。

第 4 章 プレドニゾロン (PD) 含有 SDACNFs/スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン (SBE- β -CyD) ゲル (PD 含有ゲル) の DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療に関する検討

第 1 節 序

潰瘍性大腸炎は、原因不明の慢性再燃性消化管炎症疾患であり、国の難病指定を受けている。我が国における患者数は約 14 万人 (厚生労働省調べ、2012 年) に達している。一般に、病変は直腸からはじまり連続的に口側に進展していくことが知られており、病変の部位により、全大腸炎型、左側大腸炎型、直腸炎型に分類される。その割合は、全大腸炎型 3 割、左側大腸炎型 4 割、直腸炎型 3 割といわれており、男女比はおよそ 1 対 1 で、発症年齢は 20 から 24 歳にピークがある⁶⁷⁾。現在、治療薬として、5-アミノサリチル酸、サラゾスルファピリジン、プレドニゾロン (PD)、シクロスポリン、タクロリムス、インフリキシマブなどの炎症を抑制する薬剤が使用されている⁶⁸⁾。その中でも PD は、軽症から重症の症例に対し、腸注、経口、静注で幅広く使用される薬剤であるが、長期にわたる連日大量投与が行われるため、その副作用である誘発感染症、続発性副腎皮質機能不全、糖尿病、クッシング症候群様症状などが問題となる。PD による治療効果を向上させるためには、難水溶性薬物である PD の水溶性を改善し、効率的に吸収させて総投与量を減らし、投与間隔を延長することが重要であるが、そのような製剤学的工夫がなされた製剤は見当たらない。そこで、著者は、PD の水溶性を改善するために薬物溶解作用や薬物安定化作用などを有する CyD^{33,34)} に着目し、その中でもアニオン性であり、注射剤の添加剤としても使用実績のある安全性の高い CyD 誘導体である SBE- β -CyD (Fig. 15)⁶⁹⁾ をカチオン性 SDACNFs の複合体化剤として用いて高強度のゲルを調製した³⁵⁾。そのゲルに PD を封入した PD 含有 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲル (PD 含有ゲル) を調製し、DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスを用いて治療効果を検討した。

R : -H or $-(\text{CH}_2)_4\text{-SO}_3\text{Na}$



	SBE- α -CyD	SBE- β -CyD	SBE- γ -CyD
Glucose number	6	7	8
D.S.	2.4	6.6	4.9
Mw	1352	2179	2071

D.S. : Degree of substitution, Mw : Molecular weight

Fig. 15. Structure of sulfobutyl ether-cyclodextrins.

第2節 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルの調製

第1項 SDACNFs/各種 CyD ゲルの調製

SDACNFs/CyD ゲルの調製は、SDACNFs に CyD 溶液を浸漬することで行った (Fig. 16)。



Fig. 16. Preparation of SDACNFs/cyclodextrins gel.

各種 CyDs を用いてゲル形成能を評価した結果、負電荷を持たない α -CyD、 β -CyD、 γ -CyD、ヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD)、ヒドロキシブチル- β -CyD (HB- β -CyD) およびジメチル- β -CyD (DM- β -CyD) ではゲル化が起こらなかった。一方、負電荷を持つ SBE- β -CyD ではゲル化が起こることから、SDACNFs のゲル化には負電荷を持つ官能基が必要であることが示された。さらに、ナノファイバー化していない DAC ではゲル化が起こらなかったこ

とから、このゲル化はナノファイバーに特有の現象であることが示された (Fig. 17)。



Fig. 17. Appearance of SDACNFs/cyclodextrins gel.

第2項 SDACNFs/SBE-CyD ゲルの物性評価

ゲル化が起こった SBE-β-CyD に着目して、SBE-α-CyD (SBE 基の置換度：2.4)、SBE-β-CyD (SBE 基の置換度：6.6)、SBE-γ-CyD (SBE 基の置換度：4.9) を用いて同様の方法で CyDs 濃度を変化させゲルを調製し、ゲル強度をレオメーターで評価した。CyDs 濃度を 1% に固定して調製したゲルの粘度は、各 CyDs の持つ負電荷 (Fig. 15) に依存して、SBE-α-CyD < SBE-γ-CyD < SBE-β-CyD の順に高い値を示した (Fig. 18 A)。さらに、1%、5% および 10% の濃度で調製した各ゲルのせん断速度 1 s^{-1} におけるせん断粘度を CyD 濃度に対してプロットした結果、SBE 基の置換度の最も高い SBE-β-CyD は低濃度で粘度が最大となった (Fig. 18 B)。そこで、以降の検討を SBE-β-CyD を用いて行った。

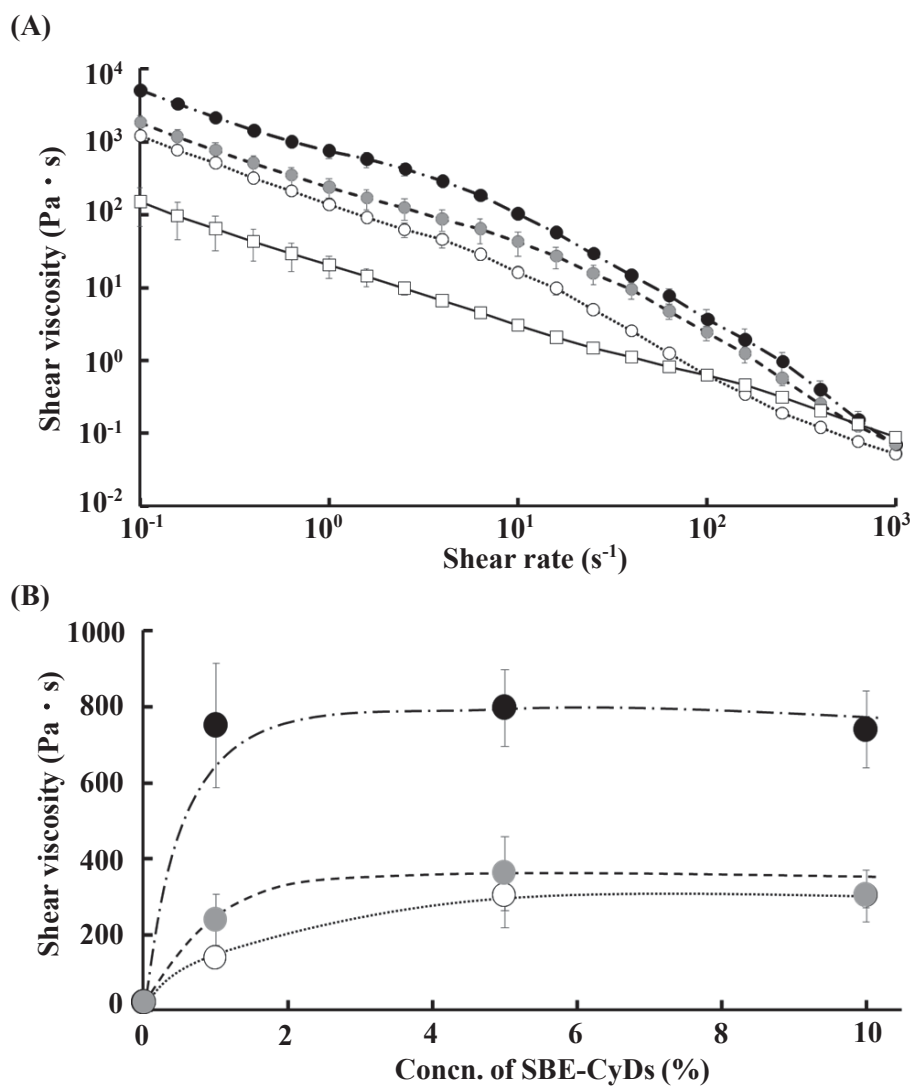


Fig. 18. Plots for the shear viscosity versus shear rate of SDACNFs/1 % SBE-CyDs gels (A). Effect of SBE-CyDs concentration on the shear viscosity of gels (B).

SDACNFs alone (white square), SDACNFs/SBE-α-CyD gel (white circle), SDACNFs/SBE-β-CyD gel (black circle), SDACNFs/SBE-γ-CyD gel (gray circle).

第3節 PD 含有 SDACNFs/SBE-β-CyD ゲルの有用性評価

第1項 PD 含有ゲルの調製とゲルの強度およびゲルからの PD の放出評価

SDACNFs/SBE-β-CyD ゲルへの PD 封入は、SDACNFs に PD/SBE-β-CyD 溶液を浸漬することで行った。PD 含有 SDACNFs/SBE-β-CyD ゲル (PD 含有ゲル) の強度は PD 封入前後で変化しなかった (Fig. 19)。

次に、PD 含有ゲルからの PD 放出を日本薬局方第1液 (pH1.2、胃液モデル) および第2液 (pH6.8、腸液モデル) で評価したところ、第1液および第2液ともに PD/SBE-β-CyD 溶液と比較して徐放性を示し、さらに、調製に用いた SBE-β-CyD 濃度依存的に PD の封入量が増大した (Fig.20)。その時の放出機構を解析した結果 (実験の部：溶出試験参照)、0次放出よりも Higuchi 式にフィットすることからゲルからの PD 放出はマトリクス型の放出を示すことが明らかとなった (Table. 3)。

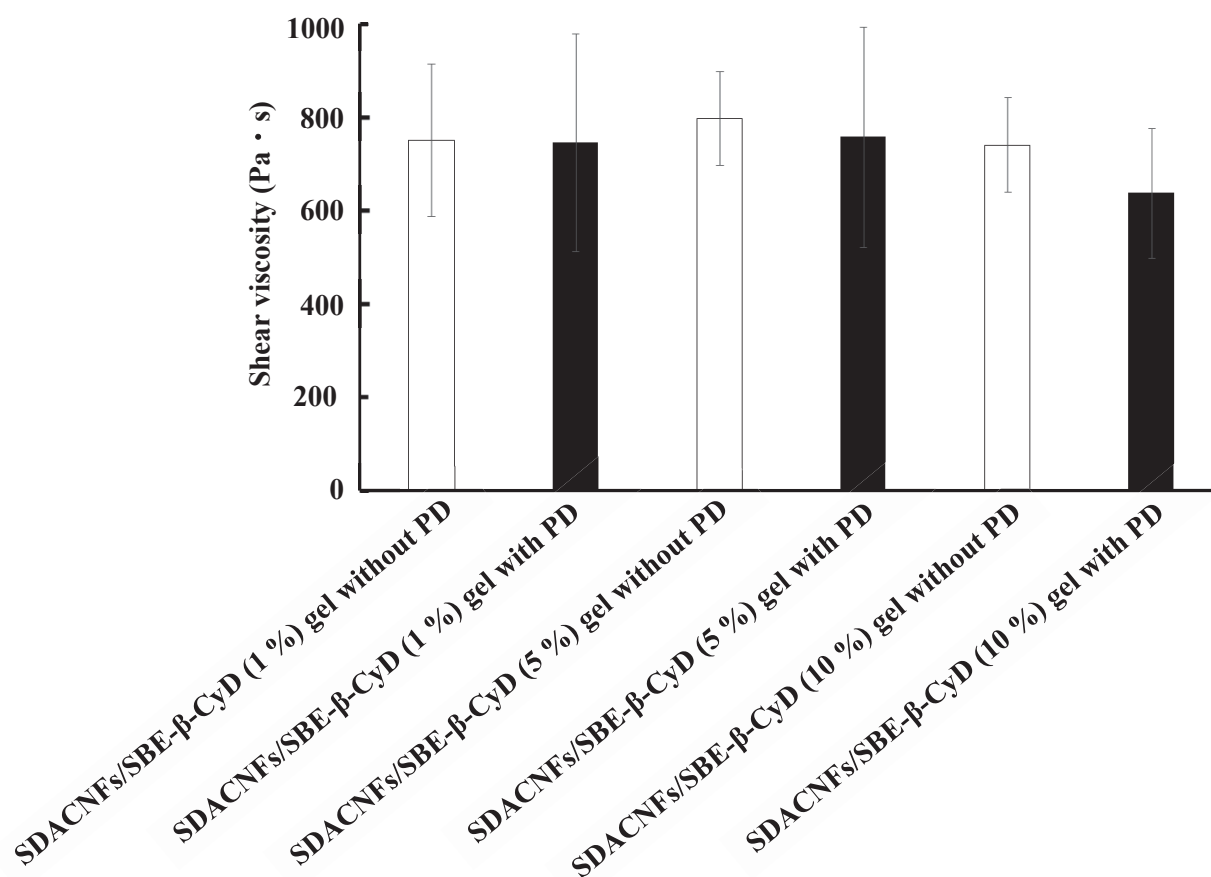


Fig. 19. Shear viscosity versus shear rate ($s^{-1} = 1$) of SDACNFs/SBE-CyDs gels with and without PD.

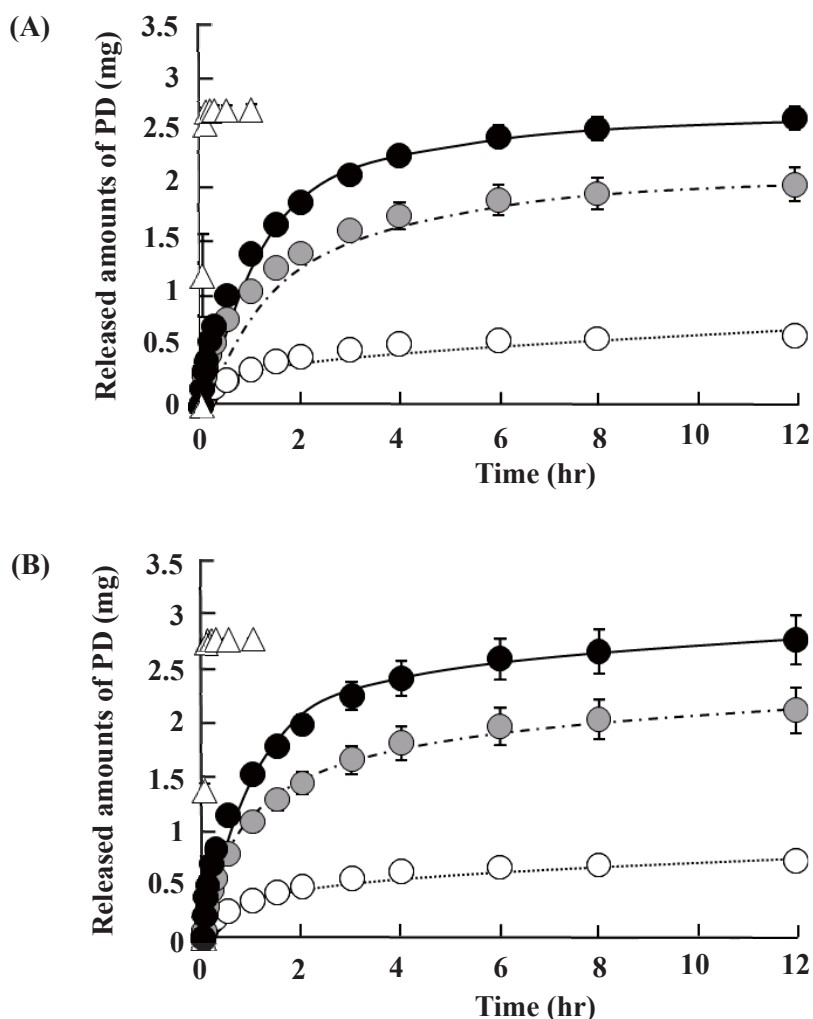


Fig. 20. Release profiles of PD/SBE-β-CyD solution (white triangles, PD content about 2.8 mg), PD/SDACNFs/SBE-β-CyD gel at SBE-CyD concentration of 1 (white circle, PD content about 0.62 mg), 5 (gray circle, PD content about 2.3 mg) and 10 % (black circle, PD content about 2.8 mg) in JP 1st fluid (A) and 2nd fluid (B) at 37 °C, measured by rotating basket method (50 rpm).

Each point represents the mean ± S.E. of 3-6 experiments.

Table 3. PD release mechanism from PD/SDACNFs/SBE-β-CyD gel.

pH	sample	Zero order		Higuchi	
		r ²	K ₀ (hr ⁻¹)	r ²	K ₀ (hr ^{-0.5})
1.2	SDACNFs/SBE-β-CyD (1 %)	0.714	28.6	0.992	42.0
	SDACNFs/SBE-β-CyD (5 %)	0.633	30.4	0.984	45.1
	SDACNFs/SBE-β-CyD (10 %)	0.682	31.2	0.990	46.1
6.8	SDACNFs/SBE-β-CyD (1 %)	0.727	28.7	0.994	42.1
	SDACNFs/SBE-β-CyD (5 %)	0.735	29.8	0.991	43.7
	SDACNFs/SBE-β-CyD (10 %)	0.616	31.9	0.980	47.4

K₀ : Release rate constant, r² : Correlation coefficient

第2項 PD含有ゲルのPD体内動態と消化管内滞留性評価

PD含有ゲルをラットに経口投与した結果、PD/SBE- β -CyD溶液と比較して、 T_{max} は約2倍に延長、AUCは約3倍に増大、MRTは約3倍に延長、BAは約4倍に増大した (Fig. 21 and Table 4)。

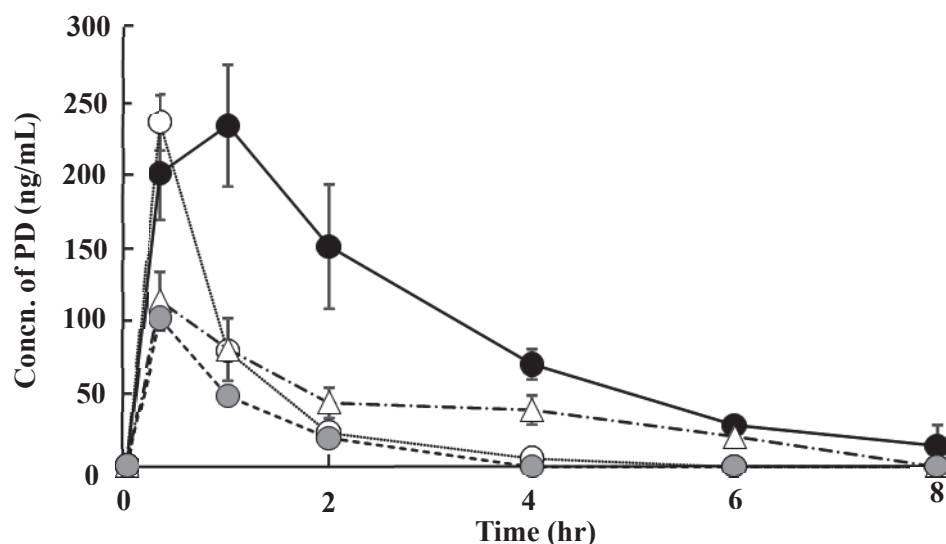


Fig. 21. Mean plasma pharmacokinetic profile of PD only (gray circle), PD/SBE- β -CyD solution (white circle), PD/SDACNFs mixture (white triangle) and PD/SDACNFs/SBE- β -CyD gel (black circle) in rats following an oral administration (8 mg/kg).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	$AUC_{(0-\infty)}$ (ng·hr/mL)	MRT (hr)	BA (%)
PD suspension	121 ± 21	0.37 ± 0.022	120 ± 14	0.96 ± 0.13	6.5 ± 0.74
PD/SDACNFs mixture	145 ± 23	0.77 ± 0.13 ^{a,d}	307 ± 85 ^b	2.6 ± 0.40 ^{a,c}	17 ± 4.6 ^b
PD/SBE- β -CyD solution	200 ± 15 ^{a,f}	0.42 ± 0.062	230 ± 36 ^a	0.98 ± 0.15	12 ± 1.9 ^a
PD/SDACNFs/SBE- β -CyD gel	268 ± 47 ^{a,f}	0.94 ± 0.068 ^{a,c}	757 ± 166 ^{a,c,f}	2.7 ± 0.66 ^{b,d}	41 ± 9.0 ^{a,c,f}

Table 4. Mean plasma pharmacokinetic profile for prednisolone in rats following an oral administration (8 mg/kg).

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

^a $p < 0.01$ for PD suspension, ^b $p < 0.05$ for PD suspension, ^c $p < 0.01$ for PD/SBE- β -CyD solution, ^d $p < 0.05$ for PD/SBE- β -CyD solution, ^e $p < 0.01$ for PD/SDACNFs mixture, ^f $p < 0.05$ for PD/SDACNFs mixture.

この PD 体内動態の改善は、SDACNFs のゲル化による PD の徐放化に加え、消化管内滞留性に起因すると考えられるため、次に PD の代わりに MRI 造影剤である Gd-DTPA 含有 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲル (Gd-DTPA 含有ゲル) を調製し、消化管内滞留性を MRI により評価した。Fig. 22 の白く囲った部分が胃から小腸へ続く消化管と考えられる。Gd-DTPA 単独では 60 分間で消化管内を移行したが、Gd-DTPA 含有ゲルでは同じ部位に留まっていることが観察された。

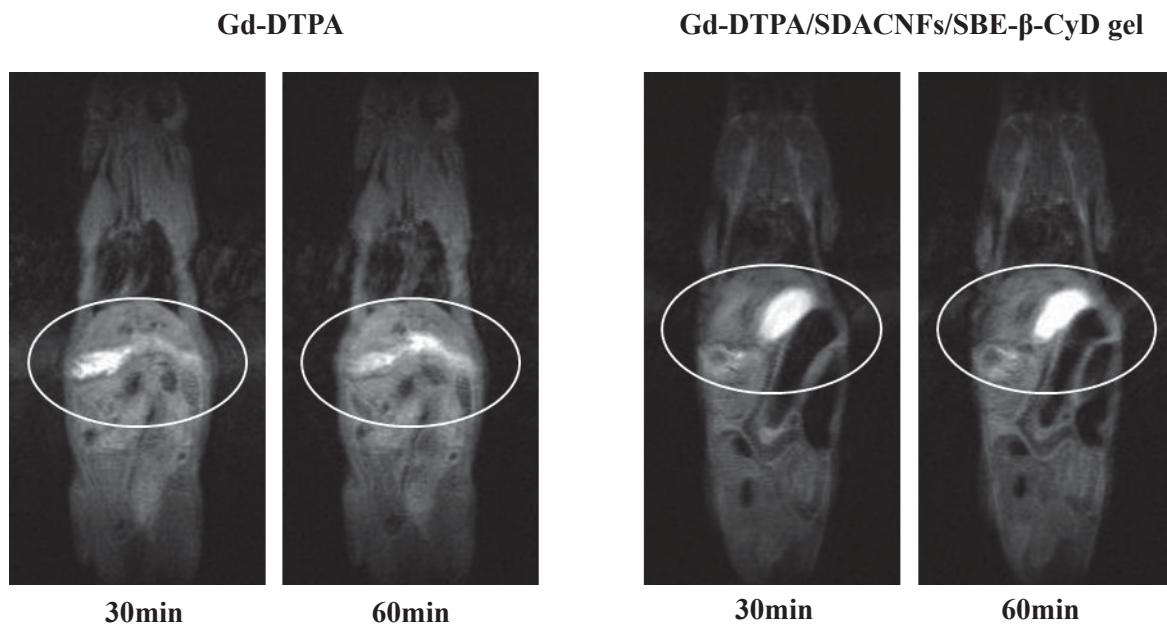


Fig. 22. MRI images of mice on 30 and 60 min after oral administration of either an aqueous solution of Gd-DTPA or Gd-DTPA/SDACNFs/SBE- β -CyD gel.

Circles indicate upper abdominal area including the stomach. Position of Gd-DTPA was represented brightly.

さらに、エバンスブルーを用いてラットにおける消化管滞留性を評価した (Fig. 23)。エバンスブルー溶液では、投与後 60 分間で小腸下部に到達しているのに対して、エバンスブルー含有 SDACNFs/SBE- β -CyD ゲル (エバンスブルー含有ゲル) では、投与後 60 分では胃に存在し、240 分後でも小腸下部に存在していることが観察された。

以上の結果より、PD 含有ゲルは、SDACNFs のゲル化による PD の徐放化に加え、消化管内滞留性が向上したことに起因することが明らかとなった。

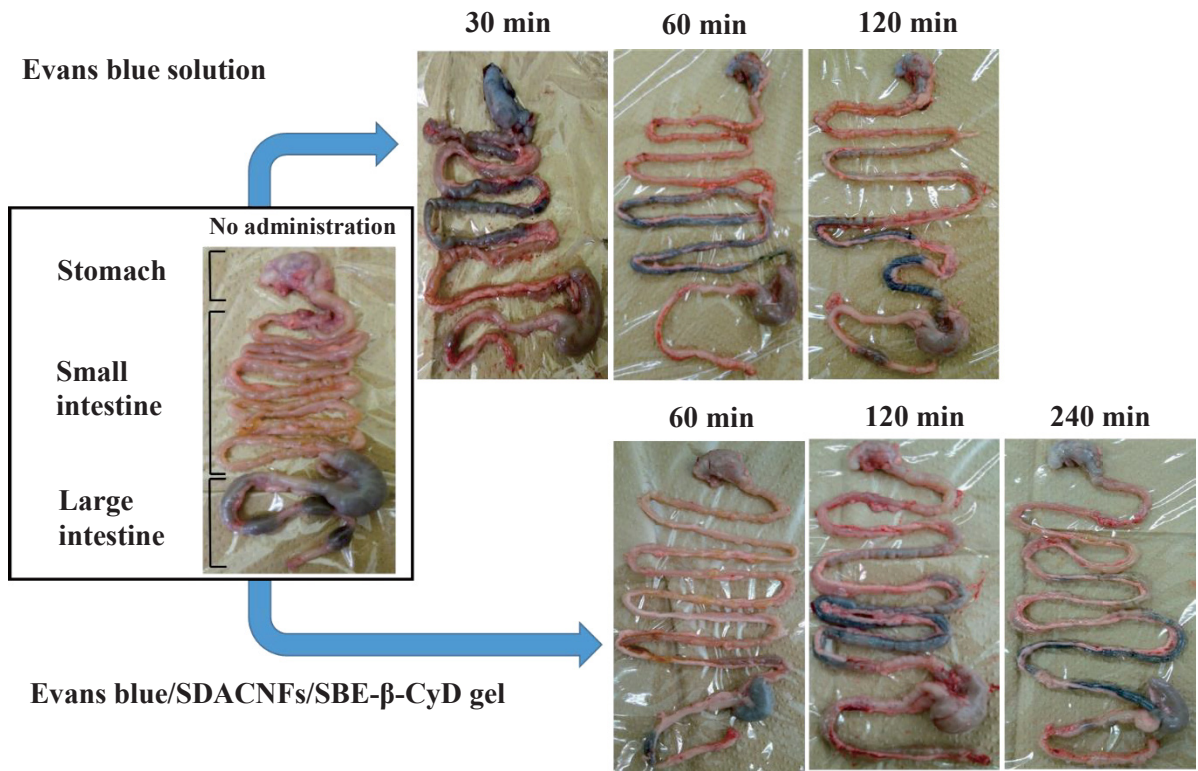
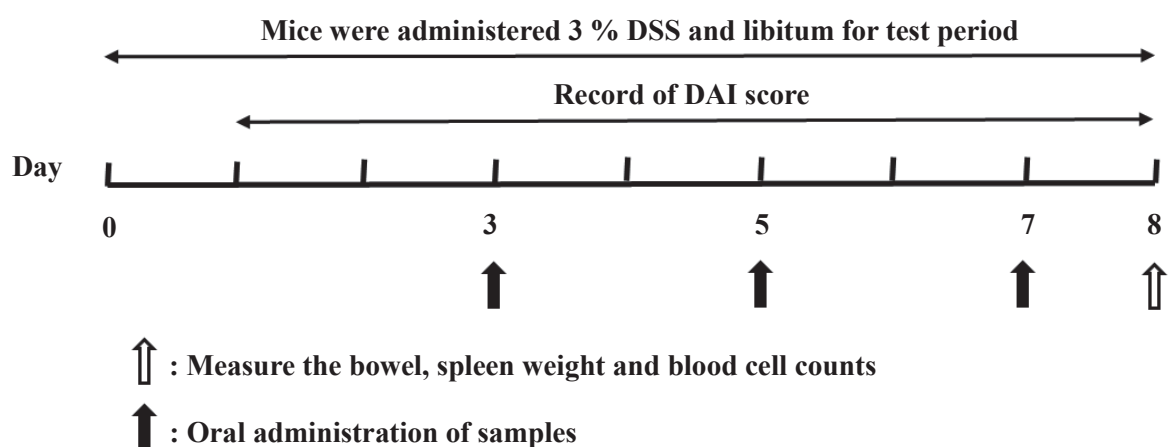


Fig. 23. Appearance of the digestive tract after oral administration of either an aqueous solution of Evans blue or Evans blue/SDACNFs/SBE-β-CyD gel.

第4節 PD含有ゲルのDSS誘発潰瘍性大腸炎治療効果

第1項 DAIスコアによるDSS誘発潰瘍性大腸炎治療の評価

潰瘍性大腸炎モデルの作成には、酢酸⁷⁰⁾、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS)⁷¹⁾ および DSS⁷²⁾ を用いる方法がある。DSS を用いる方法は、マウスに自由飲水させることで比較的簡単に潰瘍性大腸炎モデルマウスを作成することが可能である。実験スケジュールを Fig. 24 に示す。



Disease activity index (DAI)			
Score	Weight loss	Stool consistency	Occult blood
0	0 %	Normal	Negative
1	1-5 %		
2	5-10 %	Loose	Occult blood-positive
3	10-20 %		
4	> 20 %	Diarrhea	Gross bleeding

Fig. 24. Scheme of the study design of the DSS induced colitis model and DAI score.

病態の重症度評価は Disease activity index score (DAI スコア)^{73,74)} を用いて行った (Fig. 24)。DAI スコアは、体重の減少、軟便、血便の3項目のスコアの合計で評価される。DSSにより潰瘍性大腸炎を誘発されたマウスは、試験開始 2~3 日で軟便や血便の傾向が観察され

た。そこで、3 日より 2 日間隔で、PD 懸濁液、PD/SBE- β -CyD 溶液、PD/SDACNFs 混合物、PD 含有ゲルを経口投与した結果、PD 含有ゲル以外の投与群では、時間経過とともに大腸炎の症状が悪化し DAI スコアが上昇しているに対して、PD 含有ゲルはスコアの上昇を抑制した (Fig. 25)。

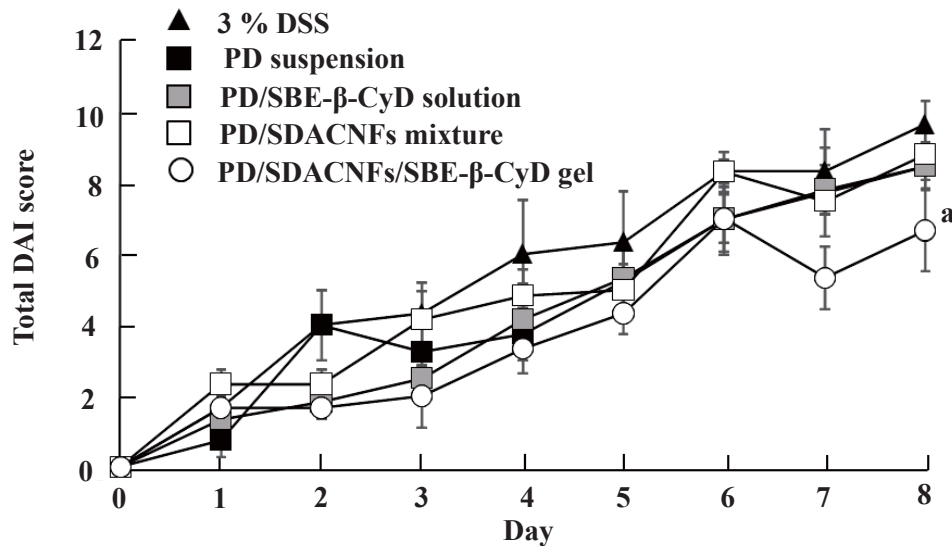


Fig. 25. Effects of PD samples clinical disease activity in DSS-induced colitis, assessed by DAI score. ^a $p < 0.05$ for 3 % DSS.

第 2 項 大腸組織および大腸 MPO 活性による DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療の評価

DAI スコアにより大腸炎治療効果が観察された 8 日目にマウスを屠殺し、大腸の委縮、大腸 MPO (ミエロペルオキシダーゼ) 活性、大腸組織の HE 染色を行った (Figs. 26-27)。その結果、DSS により誘発された炎症により、PD 含有ゲル以外の投与群では大腸が委縮しているのに対して、PD 含有ゲルでは大腸の委縮を抑制した。この結果を反映して、炎症マーカーの一つである大腸 MPO 活性の上昇は抑制された。さらに、大腸の HE 染色では、PD 含有ゲル以外の投与群では繊毛構造の乱れが観察されたのに対して、PD 含有ゲルではこれらを抑制していた。

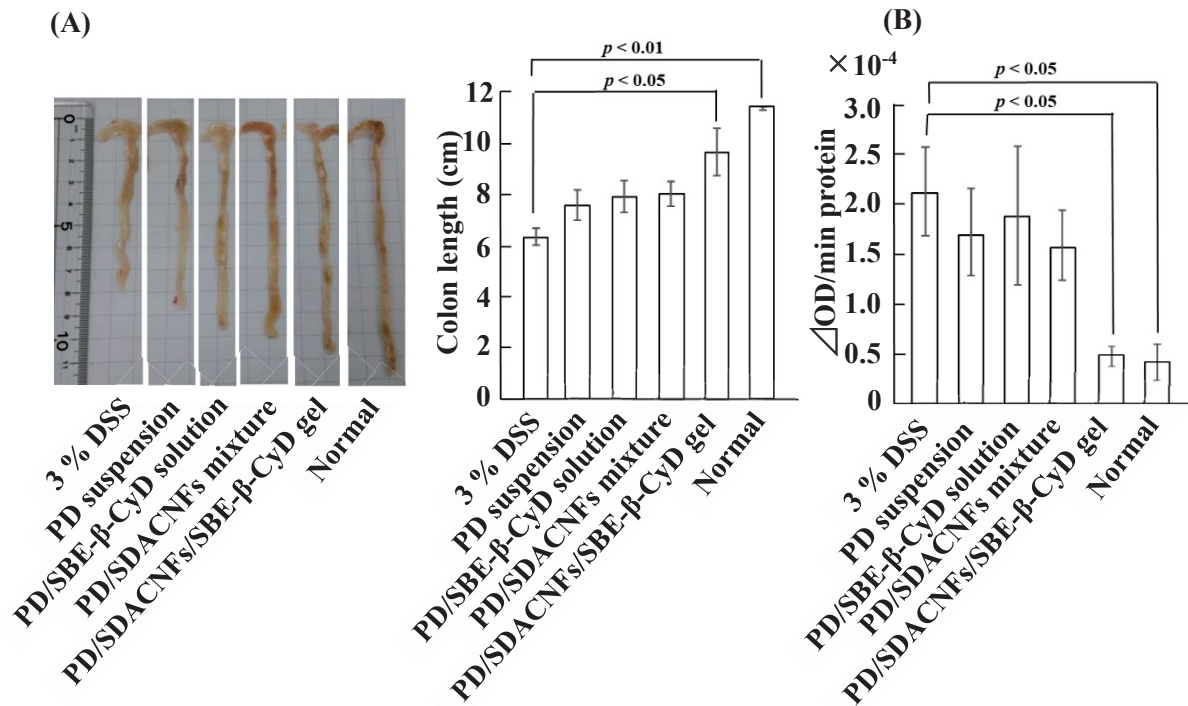


Fig. 26. Effects of PD samples clinical disease activity in DSS-induced colitis, assessed by colon length (A) and MPO activity (B).

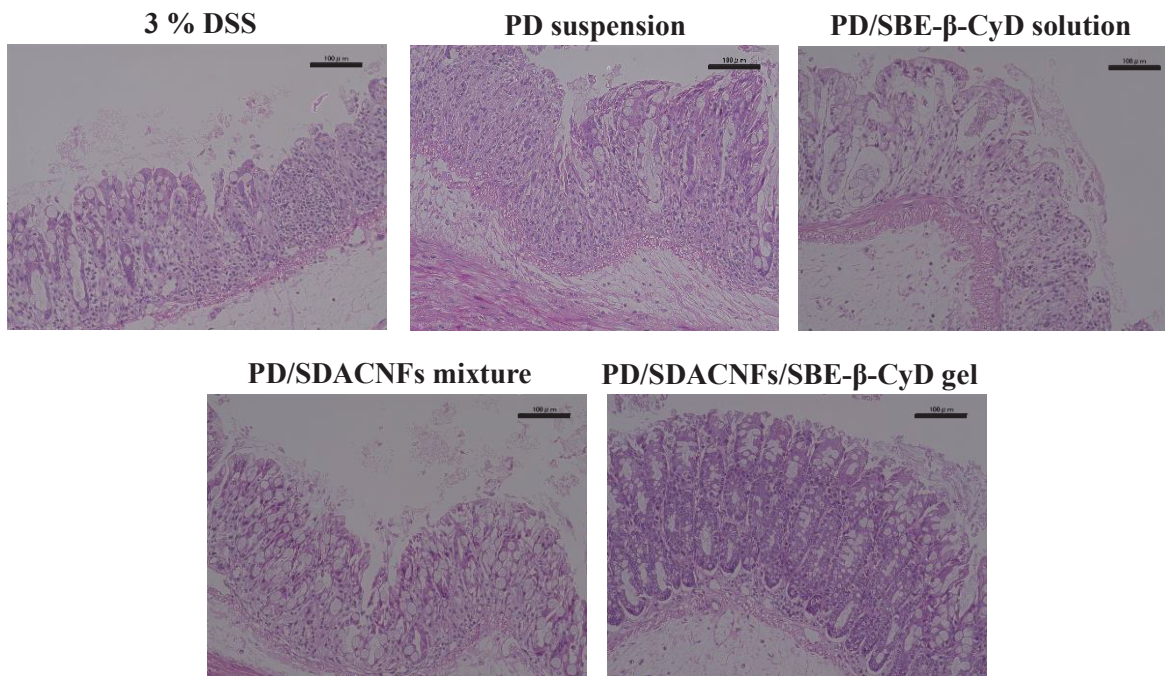


Fig. 27. Histopathological changes on day 8 in DSS-induced colitis.

Each scale bar indicates 100 μm .

第3項 血球成分および脾臓重量による DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療の評価

潰瘍性大腸炎が悪化した場合、大腸炎による出血や炎症に伴い変化する血球パラメータについて評価した (Table 5)。PD 含有ゲル以外の投与群では、大腸の炎症により白血球数 (WBC) は上昇、出血により赤血球数 (RBC) およびヘモグロビン (Hb) は低下、また、血小板数 (PLT) は上昇した。一方、PD 含有ゲル投与群ではこれらの悪化を抑制した。さらに、潰瘍性大腸炎では、Fig. 26 で観察された大腸 MPO 活性の増大に起因した酸化ストレスにより、血中のチオール含量が低下した。一方、PD 含有ゲルでは大腸 MPO 活性の増大が抑制されるため血中のチオール含量の低下を抑制した。

	WBC (10 ² /uL)	RBC (10 ⁴ /uL)	Hb (g/dL)	PLT (10 ⁴ /uL)	Thiol content (μM)
3 % DSS	173 ± 56	313 ± 19	5.9 ± 0.38	102 ± 8.5	80 ± 18
PD suspension	149 ± 47	307 ± 59	5.2 ± 0.7	84 ± 6.4	119 ± 8.0
PD/SBE-β-CyD solution	133 ± 57	324 ± 20	5.5 ± 0.82	83 ± 7.4	113 ± 26
PD/SDACNF mixture	129 ± 34	301 ± 85	5.5 ± 1.3	90 ± 1.8	98 ± 12
PD/SDACNFs/SBE-β-CyD gel	39 ± 5.1 ^{b,d,h}	561 ± 49 ^{a,c,e,h}	11 ± 0.58 ^{a,c,e,h}	54 ± 7.1 ^{b,d,g}	216 ± 5.9 ^{a,c,f,g}
Normal	35 ± 9.0 ^b	589 ± 44 ^{a,c,e,h}	10 ± 0.78 ^{a,d,f,g}	56 ± 6.4 ^{a,d,f,g}	233 ± 14 ^{a,c,e,g}

Table 5. Effects of PD samples clinical disease activity in DSS-induced colitis, assessed by white blood cell (WSC), red blood cell (RBC), Hemoglobin (Hb), plate (PLT).

^a*p* < 0.01 for 3 % DSS, ^b*p* < 0.05 for 3 % DSS, ^c*p* < 0.01 for PD suspension, ^d*p* < 0.05 for PD suspension, ^e*p* < 0.01 for PD/SBE-β-CyD solution, ^f*p* < 0.05 for PD/SBE-β-CyD solution, ^g*p* < 0.01 for PD/SDACNF mixture, ^h*p* < 0.05 for PD/SDACNF mixture.

DSS により引き起こされる炎症により肥大する脾臓⁷⁴⁾ の評価を行った (Table 6)。PD 含有ゲル以外の投与群では、脾臓の肥大を十分に抑制できていないのに対して、PD 含有ゲルでは健常群と同等のレベルまで脾臓の肥大を抑制した。また、健常群よりも脾臓が小さくなっていないことから、PD の AUC 増加による副作用は発現していないものと推察された。

	Spleen weight/body weight ($\times 10^{-3}$)
3 % DSS	9.4 \pm 1.4
PD suspension	6.8 \pm 0.28
PD/SBE-β-CyD solution	5.1 \pm 1.5
PD/SDACNFs mixture	6.2 \pm 1.1
PD/SDACNFs/SBE-β-CyD gel	4.1 \pm 0.11^b
Normal	3.8 \pm 0.16^a

Table 6. Effects of PD samples clinical disease activity in DSS-induced colitis, assessed by spleen weight/body weight.

^a $p < 0.01$ for 3 % DSS, ^b $p < 0.05$ for 3 % DSS.

第5節 考察

我が国における潰瘍性大腸炎の患者数は、年々増加傾向にあり、多くの場合は寛解するが、再発する場合も多く、大腸の炎症を抑制するために長期間の治療を行う必要がある。そのため少ない量の薬剤で効率的な治療をすること、さらに、我が国の近年の高齢化に伴い服用しやすい口腔内崩壊錠などの製剤学的な工夫も求められている。

本章では、SDACNFsの製剤素材としての応用を目的として検討を行った。まず、SDACNFsのファイバー表面に存在するカチオン性のアミノ基とアニオン性の水酸化ナトリウムを組みわせることで高強度のゲルが調製可能であるという報告³²⁾に着目した。しかし、水酸化ナトリウムは強アルカリ性であるため生体への適応は困難である。そこで、薬物溶解作用や薬物安定化作用を有するCyDの中でもアニオン性であるSBE- β -CyDに着目した。事実、負電荷を持つSBE- β -CyDは、水酸化ナトリウムと同様にゲル形成が可能であった(Figs. 16-17)。

SBE- β -CyDは、注射剤の添加剤として臨床での使用実績があるため安全性が高い。さらに、CyDに由来した難水溶性薬物溶解作用などの機能とアニオン性であることを利用して、研究段階ではあるもののキトサンとSBE- β -CyDを組み合わせた徐放錠⁷⁵⁾やナノ粒子化⁷⁶⁻⁷⁸⁾

が行われている。

次に、CyD の持つ難水溶性薬物溶解作用を利用して、PD を封入した PD 含有ゲルを調製した。PD 含有ゲルと PD 非含有ゲルの強度を比較した結果、PD の有無でゲル強度は変化しなかった (Fig. 19)。このことは CyD に包接状態で存在している PD が SDACNFs と SBE- β -CyD の相互作用を阻害していなことを示している。日本薬局方第 1 液および第 2 液におけるゲルからの PD 放出は、PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して徐放性を示し、その放出機構は Higuchi 式⁷⁹⁾ に従ったマトリクス型放出であった (Fig. 20 and Table 3)。PD 含有ゲルをラットへ経口投与し、PD の体内動態を評価したところ、PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して AUC、MRT および BA の増大が観察された (Fig. 21 and Table 4)。これは、ゲルからの PD の徐放性に加え、ゲル化による消化管内滞留性向上に起因することが MRI およびエバンスブルー実験より明らかとなった (Figs. 22-23)。事実、キトサンには粘膜付着性⁸⁰⁾ があるため、ナノファイバー化による分散性の向上と表面積の増大、さらにはゲル化により消化管内滞留性は増大につながったと推察される。

潰瘍性大腸炎の治療において PD は軽症から重症まで幅広く使われ、軽症や中等症では腸注や経口で、重症では静注での使用も行われる。したがって、PD の効率的な吸収と持続により、投与量と投与回数の減少が期待される。そこで、DSS 誘発潰瘍性モデルマウスに PD 含有ゲルを投与する際、CyD による PD の溶解性向上およびゲル化による消化管内滞留性向上による T_{max} 、AUC、MRT の増大を考慮し、2 日間隔で経口投与した。その結果、2 日間隔の投与にもかかわらず大腸の委縮、大腸の炎症を抑制し、さらに、潰瘍性大腸炎患者にみられる貧血⁸¹⁾ の改善も観察された (Figs. 25-27 and Table 5)。これは、ゲル中の PD が効率的に吸収・持続したためと考えられた。しかし、ステロイド製剤である PD の吸収増大に伴い副作用発現のリスクが考えられる。通常、PD による治療は、連日投与により効果を発揮するのに対して、今回の PD 含有ゲルは、2 日間隔の投与であるため、通常の治療よりも PD 投与による負荷は小さいものと推察される。事実、PD 含有ゲル投与による健常群以上の脾臓委縮は観察されなかった (Table 6)。さらに、PD の量を 1/5 にした PD 含有ゲルでも同様の大腸炎

治療効果を発揮したことを確認している (Data not shown)。従って、PD の投与量をさらに減らすことは可能であり、副作用発現のリスクは減少するものと考えられる。

ラットとヒトではプレドニゾロンの代謝に差があり、半減期はそれぞれ1時間、3.5時間と報告がある⁸²⁾。したがって、PD 含有ゲルをヒトに応用した場合 T_{max} が延長する可能性があり、さらなる投与間隔の延長・投与量の減少が期待される。また、ゲル製剤であるため高齢者にも服用しやすくコンプライアンスの向上が期待される。

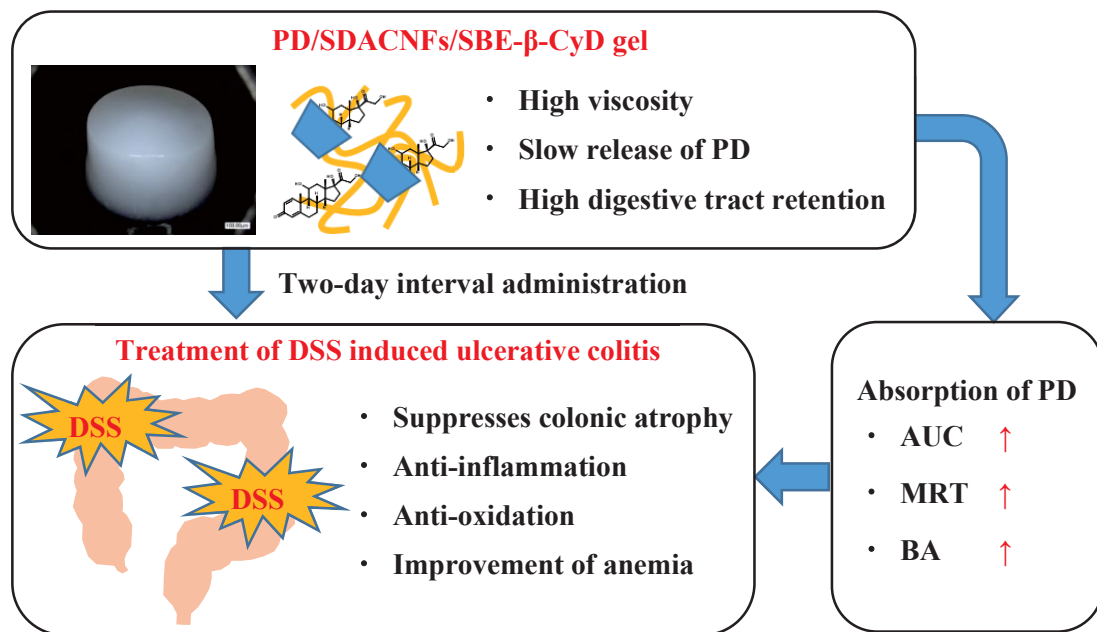


Fig. 28. Strategy to treat ulcerative colitis by SDACNFs/SBE-β-CyD gel.

第6節 小括

本章では SDACNFs の医薬への応用を目的として SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルの DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療効果について検討した。以下に、得られた知見を小括する。

- 1) SDACNFs は SBE- β -CyD と組み合わせることで簡便に高強度のゲルが調製可能であった。
- 2) PD 含有ゲルからの PD 放出は PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して徐放性を示し、Higuchi 式に従ったマトリクス型放出であった。
- 3) PD 含有ゲルをラットに経口投与した結果、PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して AUC の増大をはじめとした各種パラメータの改善が観察された。これは、PD の徐放化に加え、ゲル化による消化管内滞留性向上に起因するものと考えられた。
- 4) DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに PD 含有ゲルを経口投与した結果、未治療群と比較して大腸炎による大腸の委縮や大腸の絨毛構造の乱れの抑制をはじめとした大腸炎治療効果を示した。また、赤血球数減少による貧血の改善などの血球パラメータの改善も示した。

以上の結果より、PD 含有ゲルの消化管炎症性疾患における薬物担体としての有用性が期待された。

第5章 総括

キチンおよびキトサンは、地球上にセルロースに匹敵する量が存在するといわれている。このキチンおよびキトサンは、セルロースなどの他の天然高分子と異なり、抗菌活性¹⁻³⁾、抗炎症効果⁴⁻⁶⁾、抗酸化効果⁷⁻⁹⁾、脂質吸着効果^{10,11)}、腎保護効果^{12,13)}、創傷治癒促進効果^{4,14,15)}などさまざまな生理活性が報告されており、キトサンに含まれるアミノ基の存在が重要である。

近年、カニ由来のキチンを湿式粉碎することでナノファイバー化した CNFs が開発され、さらに、その表面のみを脱アセチル化した SDACNFs も開発された。SDACNFs は、ナノファイバー化により分散性や表面積が増大し、さらに、ファイバー表面にアミノ基が露出しているため、通常のキチンおよびキトサンよりも高い生理活性やアミノ基を利用した化学修飾・相互作用による機能の付加が期待されているが、その報告はまだ少ない現状にある。そこで、本研究では、SDACNFs の医薬分野への応用を目的として検討を行った。

まず、第2章では、SDACNFs の単独の効果を CRF モデルラット に応用し、その腎保護効果について、臨床で使用されている AST-120 (クレメジン®) と比較検討した。次に、第3章では、SDACNFs を凍結乾燥することでスポンジ状に加工し、その創傷治癒促進効果について、臨床で使用されているキチン由来創傷被覆材であるベスキチン®と比較検討した。第4章では、カチオン性の SDACNFs とアニオン性の SBE- β -CyD を組み合わせることで高強度のゲルを調製し、さらに、CyD の持つ難水溶性薬物溶解効果を利用して、難水溶性薬物の PD を含有した PD 含有ゲルを調製した。次に、この PD 含有ゲルを DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療へ応用した。以下に、本研究で得られた知見を総括する。

1) 5/6 腎臓摘出ラットにおける SDACNFs の腎不全進行および酸化ストレスの抑制に関する検討 (第2章)

腎不全は、食事に含まれるインドールが消化管より吸収後、肝臓にて IS に代謝され、

その IS が蓄積することでラジカルを引き起こし悪化する。そこで、SDACNFs の *in vitro* におけるインドール吸着能を評価した結果、脱アセチル化度の低い (約 1%) CNFs よりも高い吸着を示したことから、キチンおよびキトサンのインドール吸着には、アミノ基の存在が重要であることが示された。また、SDACNFs と同じ脱アセチル化度であり、湿式粉碎していないナノファイバー原料である DAC (脱アセチル化度 20 %) よりも優れた吸着効果を示した。これは、ナノファイバー化による分散性の向上および表面積の増大に起因すると考えられる。次に、5/6 腎臓摘出した CRF モデルラットに SDACNFs を 4 週間毎日経口投与した結果、SDACNFs は、市販の慢性腎不全治療薬である AST-120 (クレメジン®) よりもインドール吸着量が少ないにも関わらず、AST-120 よりも BUN、クレアチニン、無機リン、IS 濃度の上昇を抑制し、さらに、腎組織の損傷・酸化ストレスも抑制した。これは、SDACNFs のインドール吸着効果に加え、キチンおよびキトサンの持つ抗酸化効果、脂質吸着効果など由来するものではないかと考えられた。以上の結果より、SDACNFs は優れた腎保護効果を有することが明らかとなった。

2) SDACNFs スポンジの創傷治療に関する検討 (第 3 章)

現在、さまざまな創傷被覆材が開発され、臨床の現場で使用されている。その中にキチンをスポンジ状に加工した被覆材であるベスキチン®がある。そこで、SDACNFs を凍結乾燥することでスポンジ状に加工した SDACNFs スポンジの創傷治癒促進効果について検討した。まず、SDACNFs スポンジの表面を SEM で観察したところベスキチン®と比較して、密な構造をしていることが示された。次に、吸水性について検討した結果、SDACNFs スポンジはベスキチン®と比較して高い吸収性を示した。このことから、SDACNFs スポンジは創傷面の水分を吸収・保持することで創傷面を十分湿潤環境にできることが考えられた。そこで、ラットの背部の皮膚を取り除き創傷面とした創傷モデルラットに SDACNFs スポンジを適用し、創傷治癒促進効果について検討したところ、ベスキチン®と比較して早期より創傷面積の縮小が観察され、14 日後における皮膚の HE 染色の結果、十分な皮膚の再生が観察された。

以上の結果より、SDACNFs スポンジの創傷被覆材としての有用性が期待された。

3) プレドニゾロン (PD) 含有 SDACNFs/スルホブチルエーテル- β -シクロデキストリン (SBE- β -CyD) ゲル (PD 含有ゲル) の DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療に関する検討 (第4章)

SDACNFs の表面に存在するアミノ基に着目し、カチオン性の SDACNFs にアニオン性である SBE- β -CyD を組み合わせた結果、高強度のゲルが調製であった。また、そのゲル化はナノファイバーに特有の現象であった。次に、CyD の持つ薬物溶解作用を利用し、難水溶性薬物である PD をゲル内に封入した結果、調製に用いる SBE- β -CyD 濃度依存的に PD の封入量が増大し、そのゲルからの PD 放出は、PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して徐放性を示した。次に、この PD 含有ゲルをラットへ経口投与した結果、PD/SBE- β -CyD 溶液と比較して、AUC や MRT の増大が確認された。これは、SDACNFs のゲル化による消化管内滞留性向上に起因することを MRI およびエバンスブルーを用いた消化管観察により確認した。PD 含有ゲルを DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスに 2 日間隔で経口投与した結果、消化管内滞留性向上による PD の AUC 増大効果を反映して、赤血球数減少の抑制をはじめとした血球パラメータの改善、大腸炎による大腸の委縮や大腸の繊毛構造の乱れの抑制が観察された。以上の結果より、PD 含有ゲルの消化管炎症性疾患における薬物担体としての有用性が期待された。

以上述べてきたように、キチンをナノファイバー化し、表面を脱アセチル化することで、通常のキチン粉末では得られなかった特性を持つことが明らかとなった。SDACNFs は、SDACNFs 単独で腎保護効果を示し、凍結乾燥することで創傷治癒促進効果を示した。さらに、ナノファイバー表面に存在するアミノ基を利用した SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルは CyD による薬物溶解効果により、難水溶性薬物のゲル内の封入が可能であり、薬物担体としての有用性が期待された。今回得られた知見は、SDACNFs の持つ機能を利用した医薬品、薬物含有ゲル製剤などを開発する上での有用な基盤データになるものと考えられる。

実験の部

実験試料

キチン粉末は、甲陽ケミカルから購入した。水酸化ナトリウム、酢酸、過酸化水素、エバンスブルーは和光純薬から購入した。クレメジン細粒[®]は田辺三菱製薬から購入した。ベスキチン W-A[®]はニプロから購入した。イソフルラン吸入麻酔液はファイザーから購入した。 α -CyD、 β -CyD、 γ -CyD、HP- β -CyD、HB- β -CyD は日本食品化工から恵与されたものを使用した。DM- β -CyD、Hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB) はナカライテスクから購入した。SBE- α -CyD、SBE- β -CyD、SBE- γ -CyD は Ligand Pharmaceuticals 社から恵与されたものを使用した。マグネビスト静注[®] (Meglumine Gadopentetate, Gd-DTPA) はバイエル薬品から購入した。DSS (36-50kDa) は MP Biomedicals 社から購入した。Protein Quantification Kit-Wide Range、EDTA \cdot 2K (Ethylenediamine-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid, dipotassium salt, dihydrate) は同仁化学研究所から購入した。チオールステータス測定キットは日本ザイル日本老化制御研究所から購入した。o-Dianisidine dihydrochloride は Sigma-Aldrich から購入した。

統計解析

実験データは全て平均値 \pm 標準偏差もしくは標準誤差で示した。有意差検定は、Student の t-検定または Tukey-Kramer 法を用いて行った。危険値が 0.05 以下であるとき、統計学的に有意差があると評価した。

第 2 章に関する実験

1. SDACNFs の調製²⁹⁾

実験に使用した SDACNFs は、鳥取大学大学院工学研究科 伊福 伸介 准教授に提供していただいたものを使用した。以下に調製法を記す。

アルゴン雰囲気下、キチン粉末 30 g を 20 % 水酸化ナトリウム水溶液 3.0 L 中で 20

時間還流した。上清を取り除き、沈殿物を蒸留水と 0.5 % 酢酸水溶液で洗浄した。遠心分離により、水溶性生成物 (水酸化ナトリウム、酢酸ナトリウム、アルカリ処理により加水分化したキチン) を除去した。調製した脱アセチル化キチンを 4.0 L の酢酸水溶液に分散させ、グラインダー処理 (増幸産業製、MKCA6-3) をした。調製した SDACNFs の脱アセチル化度は 20 %、平均分子量は 60000 Da である。

2. 動物実験

CRF モデルラットとして、5/6 腎臓摘出 Wister 系雄性ラット (140-150 g) を日本エスエルシーより購入した。

上記のラットを非投与群、DAC 投与群、SDACNFs 投与群、AST-120 投与群に分類した。試験期間中 (4 週間)、飼料と水は自由摂取とし、各投与群には、各サンプルを 40 mg/kg/day でゾンデを用いて経口投与した。投与時刻は、17 時とした。

3. 血漿中 IS の定量

実験開始時 (0 週) と実験開始 4 週後にラット尾静脈から、ヘパリン存在下で採血を行った (約 2 mL)。採取した血液を遠心分離し、血漿サンプルを得た (約 1 mL)。血漿サンプルは分析時まで -80 °C で保管した。血漿中の IS は、Shimoishi らの報告⁴⁴⁾ に従い以下の HPLC により定量した。

・ IS 濃度測定

カラム	: Mightysil RP-18 (5 μ L) (関東化学)
ポンプ	: 日立 655 A-11 型
検出器	: 日立 L-7480 型蛍光検出器
移動相	: アセトニトリル : 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 4.5) (v/v) = 25:75
測定波長	: 蛍光モニター (励起波長/蛍光波長 = 280 nm/370 nm)

流速 : 1.0 mL/min

4. 血漿抗酸化能 (PAO) の評価

得られた血漿の抗酸化能を抗酸化能測定キット「PAO」(日研ザイル)の測定プロトコールに従い測定した。サンプル希釈液 390 μ L に対してラット血漿 10 μ L または標準物質として蒸留水で段階希釈した 2 mM の尿酸 10 μ L を加え攪拌した。マイクロプレートに 200 μ L/ウェル分注後、490 nm における吸光度を測定した。各ウェルに Cu^{2+} 試薬 50 μ L 分注し、室温で3分間インキュベートした。各ウェルの反応停止液を 50 μ L 分注後、490 nm における吸光度を測定した。反応前後の吸光度差から血漿サンプルの尿酸相当量 (mM) を算出し、2189 (尿酸 1 mM = 2189 μ mol/L (Cu 還元力)) を掛けて PAO とした。吸光度は TECAN 製 infinite M200 PRO を用いて測定した。

5. 腎臓組織学的観察

試験終了時のラットの腎臓の 10 % 中性緩衝ホルマリン水溶液で固定後、パラフィン包埋切片 (2.5 μ m) を作成し、PAS 染色 (Periodic acid Schiff stain)、Masson's trichrome 染色、8-OHdG 染色を行った。蛍光顕微鏡 (Keyence 製、BZ-X700) にて組織画像を取得した。

6. インドール吸着能評価

各濃度の吸着材を 16.7 μ mol/L インドール水溶液中で1時間または24時間インキュベートした。溶液のろ過を行い、ろ液中のインドール (吸収極大波長: 270 nm) を UV 検出器 (日立製、U-2800A spectrophotometer) で定量した。平衡定数および最大吸着量は、下記の Langmuir の吸着等温式を用いて算出した。

$$q = \frac{q_m KC}{1 + KC} \dots \dots (1)$$

q : 各吸着材に対するインドール吸着量 q_m : 各吸着材に対するインドール最大吸着量

K : 平衡定数 C : 非吸着インドール濃度

式 (1) の両辺を C で割り、逆数プロットを行った。その直線の傾きおよび切片から q_m および K を算出した。下記に SDACNFs の例を示す。

$$\frac{C}{q} = \frac{1}{q_m} C + \frac{1}{q_m K}$$

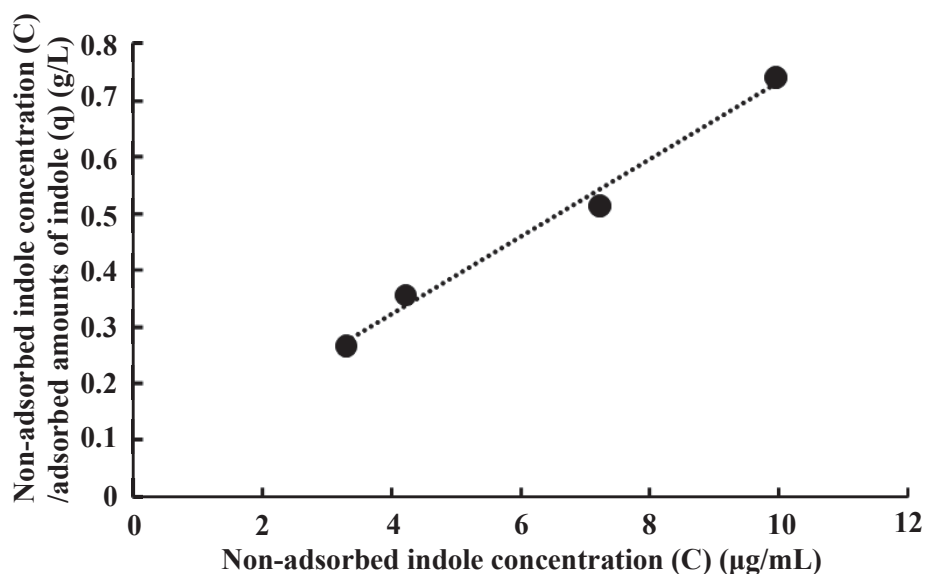


Fig. 29. Langmuir adsorption isotherm plot

第3章に関する実験

1. SDACNFs の調製

第2章と同様の方法で SDACNFs を調製した。

2. SDACNFs スポンジの調製

長方形の型 (横 20 mm、奥行き 30 mm、高さ 15 mm) に SDACNFs 3.5 g を加え、冷凍後、凍結乾燥 (EYELA 製、FDU-1200) を行った。

3. 動物実験⁸³⁾

日本クレアより購入した Wister ラット (6 週齢、雌性) の表皮を横 20 mm、縦 30 mm の大きさで取り除き創傷面とした。同サイズの被覆材 (ガーゼ、ベスキチン W-A[®]、SDACNFs

スポンジ) を創傷面に設置し、フィルムドレッシング剤 (テガダーム®) およびサージカルテープで固定した。被覆材の交換は2日間隔で行った。14日目に創傷面の周りの皮膚組織を採取した。

4. 皮膚組織学的観察

試験終了時のラットの皮膚組織を 10 % 中性緩衝ホルマリン水溶液で固定後、パラフィン包埋切片 (4 μm) を作成し、HE 染色を行った。蛍光顕微鏡にて組織画像を取得した。

5. 走査型電子顕微鏡による形態観察

日立製 TM-3000 を使用した。導電性両面テープにサンプルを固定し、真空排気後、加速電圧 15 kV で観察した。

6. 接触角測定

各サンプルを下記の条件に従い理研機械製 P-16B 手動ポンプで圧縮形成した

サンプル量 : 30 mg

圧力 : 20 MPa

圧縮時間 : 5 min

直径 : 10 mm

圧縮形成したサンプル上部よりシリンジ先端の水滴 (1 μL) をサンプル面に接触させ、1秒間隔で 10 秒間の接触角を協和界面科学製 DM-501 を用いて測定した。

7. 吸水量測定

各サンプルを 5 分間吸収させ、吸水前後の重量差から吸水量を算出した。

$$\text{吸水量} = \frac{\text{吸水後重量 (g)} - \text{吸水前重量 (g)}}{\text{吸水前重量 (g)}}$$

第4章に関する実験

1. SDACNFs の調製

第2章と同様の方法で SDACNFs を調製した。

2. SDACNFs/SBE- β -CyD ゲルおよび PD 含有ゲルの調製

直径 12 mm の円筒に SDACNFs 1 g を加え、その上から SBE- β -CyD 溶液 1 mL を 24 時間浸漬した。PD 含有ゲルも同様に、SDACNFs に対して PD/SBE- β -CyD 溶液を 24 時間浸漬することで行った。

3. 粘度測定

Anton Paar 社製 Physica MCR 101 を用いて測定した。粘度の測定にはコーンプレート CP50-1 を用いた。

・測定条件

せん断速度： 0.1 – 1000 s⁻¹

温度： 25 °C

4. 溶出試験

下記の条件に従い富山産業製 NTR-6100 DISSOLUTION TESTER および AUTO SAMPLER-W、島津製作所製 UV-1600 UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER を用いて行った。

試験方法：回転バスケット法

試験液：第16局 日本薬局方 第1液および第2液

試験液量：450 mL

回転数：50 rpm

温度：37 °C

測定波長：246 nm

溶出機構の解析は下記の式にしたがって行った⁷⁵⁾。

$$Q(\%) = K_0 \cdot t^n$$

Q：放出率、K₀：放出速度定数、t：時間

n = 1 の時：0 次放出にしたがう放出

$$Q(\%) = K_0 \cdot t$$

n = 0.5 の時：Higuchi 式にしたがう放出⁷⁹⁾

$$Q(\%) = K_0 \cdot t^{0.5}$$

各時間および各時間の 0.5 乗に対して放出率をプロットした。その直線の傾きから K₀ および r² を算出した。

5. PD 含有ゲル中の PD の体内動態試験

1 mL シリンジ内に SDACNFs 0.8 mL および PD/10 % SBE-β-CyD 溶液 0.2 mL を加え、ゲルを調製した。また、コントロールとして同じ用量で調製した PD 懸濁液、PD/SDACNFs 混合物、PD/SBE-β-CyD 溶液を用いた。九動より購入した SD ラット (7 週齢、雄性) を一晩絶食後、PD として 8 mg/kg になるように調製した各サンプルをゾンデにより経口投与後、ヘパリン処理したシリンジで経時的に採血 (約 200 μL) を行い、遠心分離後、血漿を回収した (約 100 μL)。血漿中の PD は Onishi ら⁸⁴⁾ の方法を参考にして HPLC により定量した。

・PD 濃度測定

検出器 : 日本分光製 JASCO UV-2075 plus

ポンプ : 日本分光製 JASCO PU-2089 plus

カラムオーブン : 日本分光製 JASCO 860-CO

オートサンプラー：日本分光製 JASCO AS-2055 plus

流速：1 mL/min

移動相：0.1 %トリフルオロ酢酸含有 26 % 2-プロパノール水溶液

オープン温度：40 °C

注入量：80 μ L

測定波長：246 nm

6. MRI による消化管内滞留性評価

1 mL シリンジ内に SDACNFs 0.2 mL および Gd-DTPA/ 10 % SBE- β -CyD 溶液 0.05 mL を加え、ゲルを調製した (Gd-DTPA として 0.5 mM 含有)。日本エスエルシーより購入した ddY マウス (4 週齢、雄性) にゲルまたは同濃度の Gd-DTPA を含有した水溶液を経口投与し、イソフルラン麻酔下、DS ファーマバイオメディカル製 MR VivoLVA 1.5T compact MRI system を用いて観察した。以下に測定条件を記す。

測定条件

T1-weighted multi-slice images were obtained with a fast spin-echo

sequence repetition time : 450 ms

echo time : 13 ms

number of excitations : 2

slice thickness : 2 mm

field of view : 30 mm \times 60 mm

image resolution : 128 \times 256

7. エバンスブルーによる消化管内滞留性評価

SDACNFs 0.8 mL に対してエバンスブルー 1 mg となるように混合し、10 % SBE- β -CyD 溶液 0.2 mL 加え、ゲルを調製した。日本エスエルシーより購入した SD ラット (7 週齢、雄

性)を一晩絶食後、ゲルまたは同濃度のエバンスブルー水溶液を経口投与し、各時間にラットを屠殺し、消化管を取り出した。

8. PD 含有ゲルによる DSS 誘発潰瘍性大腸炎治療効果

潰瘍性大腸炎モデルマウス⁷²⁾は、日本エスエルシーより購入した sea-ICR マウス (7 週齢、雄性) に 3% DSS 水溶液を毎日自由飲水させることで作成した。大腸炎症状が出始めた 3 日目より、「5. PD 含有ゲル中の PD の体内動態試験」に用いたサンプルの 1/5 スケールの PD 懸濁液、PD/SBE- β -CyD 溶液、PD/SDACNFs 混合物、PD/SDACNFs/SBE- β -CyD ゲル (PD 投与量として 10 mg/kg) を 2 日間隔で経口投与した。実験開始 8 日目にマウスを屠殺し、各評価を行った。

9. 大腸組織学的観察⁸⁵⁾

試験開始 8 日目の DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸を摘出し、ホルマリンで固定後、パラフィン包埋切片 (4 μ m) を作成し、HE 染色を行った。その後、蛍光顕微鏡 (Keyence 製、BZ-X700) にて組織画像を取得した。

10. 大腸ミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性測定⁸⁶⁾

試験開始 8 日目の DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスの大腸を摘出し、摘出した大腸に 0.5% HTAB/50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) を加え、ホモジナイザー (マイクロテック・ニチオン製、RHYSOTRON) でホモジナイズした。20 秒間の超音波処理後、液体窒素で瞬間冷凍処理し、室温での融解を 3 回行った。4 $^{\circ}$ C、10,000 g で 10 分間遠心後、上清を回収した。o-Dianisidine 塩酸塩 0.167 mg/mL (50 mM リン酸カリウム緩衝液) 200 μ L にサンプル 10 μ L および 50 mM リン酸カリウム緩衝液で希釈した 0.1% 過酸化水素水溶液を 10 μ L 加え、プレートリーダー (TECAN 製、infinite M200 PRO) で経時的に 460 nm における吸光度を測定した。また、サンプルのタンパク量は、Protein Quantification Kit-Wide Range を用いてプロトコールに従い測定した。タンパク量補正した時間あたりの吸光度変化 (Δ OD/min \cdot mg

protein) を MPO 活性とした。

11. 血球パラメータの測定

試験開始 8 日目の DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスから EDTA・2K 処理したシリンジで採血 (約 0.5 mL) を行い、血中の赤血球数、白血球数、血小板数は、日本光電製 MEK-6458 を用いて測定した。

12. 血中チオール含量測定

試験開始 8 日目の DSS 誘発潰瘍性大腸炎モデルマウスから EDTA・2K 処理したシリンジで採血 (約 0.5 mL) を行い、遠心分離後、血漿を回収した (約 200 μ L)。血中のチオール含量は、チオールステータス測定キットを用いてプロトコールに従い測定した。各ウェルにマウス血漿 20 μ L または calibrator 20 μ L を加え、Reaction buffer A 200 μ L を加えた。405 nm における吸光度を測定した。各ウェルに Reaction buffer B 20 μ L 加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分インキュベートした。405 nm における吸光度を測定し、反応前後の吸光度差 (Δ OD) から下記の式に従い血中チオール含量とした。吸光度は TECAN 製 infinite M200 PRO を用いて測定した。

$$\text{チオール含量 } (\mu\text{M}) = \frac{\Delta\text{OD} \times \text{concentration calibrator } (1000 \mu\text{M})}{\Delta\text{OD calibrator}}$$

参考文献

1. M. Egusa, R. Iwamoto, H. Izawa, M. Morimoto, H. Saimoto, H. Kaminaka and S. Ifuku, Characterization of chitosan nanofiber sheets for antifungal application, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 26202–26210 (2015).
2. F. Ding, H. Deng, Y. Du, X. Shi and Q. Wang, Emerging chitin and chitosan nanofibrous materials for biomedical applications, *Nanoscale*, **6**, 9477–9493 (2014).
3. A. P. Martínez-Camacho, M. O. Cortez-Rocha, M. M. Castillo-Ortega, A. Burgos-Hernández, J. M. Ezquerro-Brauer and M. Plascencia-Jatomea, Antimicrobial activity of chitosan nanofibers obtained by electrospinning, *Polym. Int.*, **60**, 1663–1669 (2011).
4. R. Izumi, S. Komada, K. Ochi, L. Karasawa, T. Osaki, Y. Murahata, T. Tsuka, T. Imagawa, N. Itoh, Y. Okamoto, H. Izawa, M. Morimoto, H. Saimoto, K. Azuma and S. Ifuku, Favorable effects of superficially deacetylated chitin nanofibrils on the wound healing process, *Carbohydr. Polym.*, **123**, 461–467 (2015).
5. H. Joong, M. E. Moon, H. Soon, S. Young and Y. Ho, Chitosan oligosaccharide (COS) inhibits LPS-induced inflammatory effects in RAW 264 . 7 macrophage cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **358**, 954–959 (2007).
6. T.-C. Chou, E. Fu and E.-C. Shen, Chitosan inhibits prostaglandin E2 formation and cyclooxygenase-2 induction in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 403–407 (2003).
7. M. Anraku, T. Fujii, N. Furutani, D. Kadowaki, T. Maruyama, M. Otagiri, J. M. Gebicki and H. Tomida, Antioxidant effects of a dietary supplement: Reduction of indices of oxidative stress in normal subjects by water-soluble chitosan, *Food Chem. Toxicol.*, **47**, 104–109 (2009).
8. M. Anraku, M. Kabashima, H. Namura, T. Maruyama, M. Otagiri, J. M. Gebicki, N. Furutani and H. Tomida, Antioxidant protection of human serum albumin by chitosan, *Int. J. Biol. Macromol.*, **43**, 159–164 (2008).
9. H. Tomida, T. Fujii, N. Furutani, A. Michihara, T. Yasufuku, K. Akasaki, T. Maruyama, M. Otagiri, J. M. Gebicki and M. Anraku, Antioxidant properties of some different molecular weight chitosans, *Carbohydr. Res.*, **344**, 1690–1696 (2009).
10. M. Anraku, A. Michihara, T. Yasufuku, K. Akasaki, D. Tsuchiya, H. Nishio, T. Maruyama, M. Otagiri, Y. Maezaki, Y. Kondo and H. Tomida, The antioxidative and antilipidemic effects of different molecular weight chitosans in metabolic syndrome model rats, *Biol. Pharm. Bull.*, **33**, 1994–1998 (2010).
11. M. Anraku, T. Fujii, Y. Kondo, E. Kojima, T. Hata, N. Tabuchi, D. Tsuchiya, T. Goromaru, H. Tsutsumi, D. Kadowaki, T. Maruyama, M. Otagiri and H. Tomida, Antioxidant properties of high molecular weight dietary chitosan *in vitro* and *in vivo*, *Carbohydr. Polym.*, **83**, 501–505

- (2011).
12. M. Anraku, H. Tomida, A. Michihara, D. Tsuchiya, D. Iohara, Y. Maezaki, K. Uekama, T. Maruyama, M. Otagiri and F. Hirayama, Antioxidant and renoprotective activity of chitosan in nephrectomized rats, *Carbohydr. Polym.*, **89**, 302–304 (2012).
 13. M. Anraku, M. Tanaka, A. Hiraga, K. Nagumo, T. Imafuku, Y. Maezaki, D. Iohara, K. Uekama, H. Watanabe, F. Hirayama, T. Maruyama and M. Otagiri, Effects of chitosan on oxidative stress and related factors in hemodialysis patients, *Carbohydr. Polym.*, **112**, 152–157 (2014).
 14. Y. Okamoto, K. Shibasaki, S. Minami, A. Matsushashi, S. Tanioka and Y. Shigemasa, Evaluation of chitin and chitosan on open wound healing in Dogs, *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 851–854 (1995).
 15. 一般社団法人日本キチン・キトサン学会編, キチン・キトサンの最新科学技術, 技報堂出版, 東京, 253–270 (2016).
 16. S. Minami, Y. Okamoto and Y. Shigemasa, Mechanism of wound healing acceleration by chitin and chitosan, *Jpn. J. Vet. Anesth. Surg.*, **30**, 1–14 (1999).
 17. H. Ueno, F. Nakamura, M. Murakami, M. Okumura, T. Kadosawa and T. Fujinaga, Evaluation effects of chitosan for the extracellular matrix production by fibroblasts and the growth factors production by macrophages, *Biomaterials*, **22**, 2125–2130 (2001).
 18. M. Anraku, Elucidation of the mechanism responsible for the oxidation of serum albumin and its application in treating oxidative stress-related diseases, *Yakugaku zasshi*, **134**, 973–979 (2014).
 19. H. Tomida and M. Anraku, Antioxidant activity of different molecular weight chitosans, *chitin and chitosan reserarch*, **16**, 51–58 (2010).
 20. H. Yano, Production of cellulose nanofibers and their applications, 日本ゴム協会誌, **85**, 376–381 (2012).
 21. K. Abe, S. Iwamoto and H. Yano, Obtaining cellulose nanofibers with a uniform width of 15 nm from wood, *Biomacromolecules*, **8**, 3276–3278 (2007).
 22. S. Iwamoto, K. Abe and H. Yano, The effect of hemicelluloses on wood pulp nanofibrillation and nanofiber network characteristics, *Biomacromolecules*, **9**, 1022–1026 (2008).
 23. S. Iwamoto, A. N. Nakagaito and H. Yano, Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites, *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.*, **89**, 461–466 (2007).
 24. A. Isogai, T. Saito and H. Fukuzumi, TEMPO-oxidized cellulose nanofibers, *Nanoscale*, **3**, 71–85 (2011).
 25. 一般社団法人日本キチン・キトサン学会編, キチン・キトサンの最新科学技術, 技報堂出版, 東京, 107–124 (2016).
 26. S. Ifuku and H. Saimoto, Chitin nanofibers: preparations, modifications, and applications,

- Nanoscale*, **4**, 3308–3318 (2012).
27. S. Ifuku, S. Morooka, A. Norio Nakagaito, M. Morimoto and H. Saimoto, Preparation and characterization of optically transparent chitin nanofiber/(meth)acrylic resin composites, *Green Chem.*, **13**, 1708–1711 (2011).
 28. K. Azuma, T. Osaki, S. Ifuku, H. Saimoto, T. Tsuka, T. Imagawa, Y. Okamoto and S. Minami, α -Chitin nanofibrils improve inflammatory and fibrosis responses in inflammatory bowel disease mice model, *Carbohydr. Polym.*, **90**, 197–200 (2012).
 29. S. Ifuku, Chitin and chitosan nanofibers: Preparation and chemical modifications, *Molecules*, **19**, 18367–18380 (2014).
 30. R. Koizumi, K. Azuma, H. Izawa, M. Morimoto, K. Ochi, T. Tsuka, T. Imagawa, T. Osaki, N. Ito, Y. Okamoto, H. Saimoto and S. Ifuku, Oral administration of surface-deacetylated chitin nanofibers and chitosan inhibit 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, (2017).
 31. K. Azuma, T. Nagae, T. Nagai, H. Izawa, M. Morimoto, Y. Murahata, T. Osaki, T. Tsuka, T. Imagawa, N. Ito, Y. Okamoto, H. Saimoto and S. Ifuku, Effects of surface-deacetylated chitin nanofibers in an experimental model of hypercholesterolemia, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 17445–17455 (2015).
 32. K. Abe, S. Ifuku, M. Kawata and H. Yano, Preparation of tough hydrogels based on β -chitin nanofibers via NaOH treatment, *Cellulose*, **21**, 535–540 (2014).
 33. K. Uekama, Novel approach of cyclodextrin-based pharmaceutical formulation, *Yakugaku Zasshi*, **132**, 85–105 (2012).
 34. K. Uekama, Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation, *Chem. Pharm. Bull.*, **52**, 900–915 (2004).
 35. M. Anraku, D. Iohara, A. Hiraga, K. Uekama, S. Ifuku, J. D. Pipkin and F. Hirayama, Formation of elastic gels from deacetylated chitin nanofibers reinforced with sulfobutyl ether β -cyclodextrin, *Chem. Lett.*, **44**, 285–287 (2015).
 36. 矢崎義雄, 乾賢一, 薬剤師・薬学生のための臨床医学, 文光堂, 東京, 838–853 (2005).
 37. 急性腎障害ガイドライン2016, 日腎会誌, **59**, 419–533 (2017).
 38. 日本腎臓病学会編, CKD診療ガイド2012, 東京医学社, 東京 (2012).
 39. H. Watanabe, Molecular mechanisms for uremic toxin-induced oxidative tissue damage via a cardiovascular-renal connection, *Yakugaku zasshi*, **133**, 889–895 (2013).
 40. F. Durantou, G. Cohen, R. De Smet, M. Rodriguez, J. Jankowski, R. Vanholder and A. Argiles, Normal and pathologic concentrations of uremic toxins, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **23**, 1258–1270 (2012).
 41. T. Niwa, T. Yazawa, K. Maeda, and H. Asada, Removal of indoxyl sulfate and furancarboxylic

- acid as protein-bound uremic toxins in patients with chronic renal failure by continuous ambulatory peritoneal dialysis, *透析会誌*, **23**, 83–87 (1990).
42. F. C. Barreto, D. V Barreto, S. Liabeuf, N. Meert, G. Glorieux, M. Temmar, G. Choukroun, R. Vanholder and Z. A. Massy, Serum indoxyl sulfate is associated with vascular disease and mortality in chronic kidney disease Patients, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, **4**, 1551–1558 (2009).
 43. T. Niwa, T. Yazawa, K. Maeda, M. Ise, M. Sugano, T. Kodama and Y. Uehara, Effect of oral sorbent, AST-120, on serum concentration of indoxyl sulfate in uremic rats, *日本腎臓学会誌*, **32**, 695–701 (1990).
 44. K. Shimoishi, M. Anraku, K. Kitamura, Y. Tasaki, K. Taguchi, M. Hashimoto, E. Fukunaga, T. Maruyama and M. Otagiri, An oral adsorbent, AST-120 protects against the progression of oxidative stress by reducing the accumulation of indoxyl sulfate in the systemic circulation in renal failure, *Pharm. Res.*, **24**, 1283–1289 (2007).
 45. A. Isogawa, M. Yamakado, M. Yano and T. Shiba, Serum superoxide dismutase activity correlates with the components of metabolic syndrome or carotid artery intima-media thickness, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **86**, 213–218 (2009).
 46. T. Kobayashi, Possible involvement of insulin and oxidative stress in vascular dysfunction of diabetic mellitus, *Yakugaku zasshi*, **128**, 1013–1021 (2008).
 47. クレメジン®, インタビューフォーム.
 48. 創傷・褥瘡・熱傷ガイドライン—1：創傷一般ガイドライン, *日皮会誌*, **127**, 1659–1687 (2017).
 49. 古田勝経, 早くきれいに褥瘡を治す「外用剤」の使い方, 照林社, 東京, 90–96 (2016).
 50. P. Martin, Wound Healing-Aiming for Perfect Skin Regeneration, *Science*, **276**, 75–81 (1997).
 51. T. Maeda, T. Yamamoto, T. Imamura and R. Tsuboi, Impaired wound healing in bleomycin-induced murine scleroderma: a new model of wound retardation, *Arch. Dermatol. Res.*, **308**, 87–94 (2016).
 52. Y. Okamoto, S. Minami and Y. Shigemasa, Chitin/chitosan and wound healing, *日本農芸化学会誌*, **78**, 847–850 (2004).
 53. Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa and S. Minami, Effects of chitin and chitosan on blood coagulation, *Carbohydr. Polym.*, **53**, 337–342 (2003).
 54. Y. Okamoto, T. Tomita, S. Minami, A. Matsushashi, N. Kumazawa, S. Tanioka and Y. Shigemasa, Effects of chitosan on experimental abscess with staphylococcus aureus in Dogs, *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 765–767 (1995).
 55. Y. Usami, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi, N. H. Kumazawa, S. Tanioka and S. Yoshihiro, Chitin and chitosan induce migration of bovine polymorphonuclear cells, *J. Vet. Med.*

- Sci.*, **56**, 761–762 (1994).
56. Y. Usami, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi, N. H. Kumazawa, S. Tanioka and Y. Shigemasa, Migration of canine neutrophils to chitin and chitosan, *J. Vet. Med. Sci.*, **56**, 1215–1216 (1994).
 57. Y. Usami, S. Minami, Y. Okamoto, A. Matsushashi and Y. Shigemasa, Influence of chain length of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine residues on direct and complement-mediated chemotactic activities for canine polymorphonuclear cells, *Carbohydr. Polym.*, **32**, 115–122 (1997).
 58. Y. Usami, Y. Okamoto, T. Takayama, S. Yoshihiro and S. Minami, Effect of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine oligomers on canine polymorphonuclear cells *in vitro*, *Carbohydr. Polym.*, **36**, 137–141 (1998).
 59. Y. Usami, Y. Okamoto, T. Takayama, Y. Shigemasa and S. Minami, Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2, *J. Biomed. Mater. Res.*, **42**, 517–522 (1998).
 60. S. Minami, H. Suzuki, Y. Okamoto, T. Fujinaga and Y. Shigemasa, Chitin and chitosan activate complement via the alternative pathway, *Carbohydr. Polym.*, **36**, 151–155 (1998).
 61. Y. Suzuki, M. Okamoto, M. Morimoto, H. Sashiwa, H. Saimoto, S. Tanioka, Y. Shigemasa and S. Minami, Influence of physico-chemical properties of chitin and chitosan on complement activation, *Carbohydr. Polym.*, **42**, 307–310 (2000).
 62. Y. Suzuki, K. Miyatake, Y. Okamoto, E. Muraki and S. Minami, Influence of the chain length of chitosan on complement activation, *Carbohydr. Polym.*, **54**, 465–469 (2003).
 63. H. Saimoto, Y. Takamori, M. Morimoto, H. Sashiwa, Y. Okamoto, S. Minami, A. Matsushashi and Y. Shigemasa, Biodegradation of chitin with enzymes and vital components, *Macromol. Symp.*, **120**, 11–18 (1997).
 64. K. Kojima, Y. Okamoto, K. Kojima, K. Miyatake, H. Fujise, Y. Shigemasa and S. Minami, Effects of chitin and chitosan on collagen synthesis in wound healing, *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 1595–1598 (2004).
 65. T. Mori, M. Okumura, M. Matsuura, K. Ueno, S. Tokura, Y. Okamoto, S. Minami and T. Fujinaga, Effects of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts *in vitro*, *Biomaterials*, **18**, 947–951 (1997).
 66. Y. Okamoto, M. Watanabe, K. Miyatake, M. Morimoto, Y. Shigemasa and S. Minami, Effects of chitin / chitosan and their oligomers / monomers on migrations of fibroblasts and vascular endothelium, *Biomaterials*, **23**, 1975–1979 (2002).
 67. 矢崎義雄, 乾賢一, 薬剤師・薬学生のための臨床医学, 文光堂, 東京, 458–462 (2005).
 68. 潰瘍性大腸炎・クローン病 診断基準・治療指針 (2017).
 69. D. R. Luke, N. D. Wood, K. E. Tomaszewski and B. Damle, Pharmacokinetics of

- sulfobutylether- β -cyclodextrin (SBECD) in subjects on hemodialysis, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **27**, 1207–1212 (2012).
70. 小島僚太郎, 浜本昇一, 森脇正彦, 岩館克治, 大脇達也, 新たな酢酸誘発潰瘍性大腸炎モデルの基礎的研究-ラット漿膜内酢酸注入潰瘍性大腸炎モデル-, *Folia Pharmacol. Jpn.*, **118**, 123–130 (2001).
 71. A. Yamamoto, Study on the colon specific delivery of prednisolone using chitosan capsules, *Yakugaku zasshi*, **127**, 621–30 (2007).
 72. Y. Araki, K. Mukaisyō, H. Sugihara, Y. Fujiyama and T. Hattori, Increased apoptosis and decreased proliferation of colonic epithelium in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice, *Oncol. Rep.*, **24**, 869–874 (2010).
 73. S. Wirtz, C. Neufert, B. Weigmann and M. F. Neurath, Chemically induced mouse models of intestinal inflammation, *Nat. Protoc.*, **2**, 541–546 (2007).
 74. J.-H. Choi, K.-S. Chung, B.-R. Jin, S.-Y. Cheon, A. Nugroho, S.-S. Roh and H.-J. An, Anti-inflammatory effects of an ethanol extract of *Aster glehni* via inhibition of NF- κ B activation in mice with DSS-induced colitis, *Food Funct.*, **8**, 2611–2620 (2017).
 75. M. Anraku, A. Hiraga, D. Iohara, J. D. Pipkin, K. Uekama and F. Hirayama, Slow-release of famotidine from tablets consisting of chitosan/sulfobutyl ether β -cyclodextrin composites, *Int. J. Pharm.*, **487**, 142–147 (2015).
 76. J. Wu, X. Bu, L. Dou, L. Fang and Q. Shen, Co-delivery of docetaxel and berbamine by chitosan/sulfobutylether-cyclodextrin nanoparticles for enhancing bioavailability and anticancer activities, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **11**, 1847–1857 (2015).
 77. A. A. Mahmoud, G. S. El-Feky, R. Kamel and G. E. A. Awad, Chitosan/sulfobutylether- β -cyclodextrin nanoparticles as a potential approach for ocular drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **413**, 229–236 (2011).
 78. Z. Fülöp, P. Saokham and T. Loftsson, Sulfobutylether- β -cyclodextrin/chitosan nano- and microparticles and their physicochemical characteristics, *Int. J. Pharm.*, **472**, 282–287 (2014).
 79. T. Higuchi, Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 1145–1149 (1963).
 80. I. Henriksen, K. L. Green, J. D. Smart, G. Smistad and J. Karlsen, Bioadhesion of hydrated chitosans: An *in vitro* and *in vivo* study, *Int. J. Pharm.*, **145**, 231–240 (1996).
 81. A. Wilson, E. Reyes and J. Ofman, Prevalence and outcomes of anemia in inflammatory bowel disease: A systematic review of the literature, *Am J Med*, **116**, 44–49 (2004).
 82. 食品安全委員会, 動物用医薬品評価書 プレドニゾロン (2016).
 83. N. Khanbanha, F. Atyabi, A. Taheri, F. Talaie, M. Mahbod and R. Dinarvand, Healing efficacy of an EGF impregnated triple gel based wound dressing: *In vitro* and *in vivo* studies, *Biomed Res.*

- Int.*, (2014).
84. H. Onishi, Y. Saito, M. Sasatsu and Y. MacHida, Kinetic analysis of *in vitro* and *in vivo* release of prednisolone from the conjugate of glycol-chitosan and succinyl-prednisolone, *Int. J. Pharm.*, **410**, 17–22 (2011).
 85. S. Nagao, K. Taguchi, Y. Miyazaki, T. Wakayama, V. T. G. Chuang, K. Yamasaki, H. Watanabe, H. Sakai, M. Otagiri and T. Maruyama, Evaluation of a new type of nano-sized carbon monoxide donor on treating mice with experimentally induced colitis, *J. Control. Release*, **234**, 49–58 (2016).
 86. M. Okayama, S. Hayashi, Y. Aoi, H. Nishio, S. Kato and K. Takeuchi, Aggravation by selective COX-1 and COX-2 inhibitors of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colon lesions in rats, *Dig. Dis. Sci.*, **52**, 2095–2103 (2007).

謝辞

本研究に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 製剤学研究室 平山 文俊 教授、安楽 誠 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際して有益なる御指導と御鞭撻を賜りました崇城大学薬学部 製剤学研究室 元教授 上釜 兼人 先生、庵原 大輔 講師に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行うに際し、多大なるご助力を賜りました崇城大学薬学部 薬物動態学研究室 小田切 優樹 教授、熊本大学薬学部 薬剤学分野 丸山 徹 教授に深く感謝の意を表します。

本論文の審査にあたり、有益な御助言と御校閲を賜りました崇城大学薬学部 原武 衛 教授、門脇 大介 教授に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、キチンナノファイバーならびに表面脱アセチル化キチンナノファイバーを提供していただきました鳥取大学大学院工学研究科 伊福 伸介 准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の動物実験に際し、ご協力頂きました鳥取大学農学部共同獣医学科 岡本 芳晴 教授、東 和生 助教に深く感謝の意を表します。

本研究の MRI 測定に際し、ご協力頂きました崇城大学薬学部 分析化学研究室 竹下 啓蔵 教授、岡崎 祥子 講師に深く感謝の意を表します。

本研究にご協力頂きました鳥取大学大学院工学研究科 泉 良太郎 修士、鳥取大学農学部 共同獣医学科 多納 翼 氏、崇城大学薬学部 製剤学研究室 大久保 尚徳 学士、後藤 美和 学士ならびに同薬学部 製剤学研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に博士課程までの研究活動を温かく見守って頂いた家族、友人にこの場を借りて感謝いたします。

平成 30 年 3 月
田淵 良