

多糖類と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル
反応による新規高分子医薬の開発に関する研究

土 井 直 樹

多糖類と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応による
新規高分子医薬の開発に関する研究

目 次

第 1 章 緒論	1
第 2 章 セルロース誘導体と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応 による新規高分子医薬の開発	7
第 1 節 緒言	7
第 2 節 ESR スペクトルの経時変化	9
第 3 節 分子量の経時変化	12
第 4 節 固相メカノケミカル反応の反応特性	13
第 5 節 生成高分子の分子量分布の制御	14
第 6 節 高分子プロドラッグの薬物放出特性	16
第 7 節 小括	18
第 3 章 デキストランとグリコーゲンに生成するメカノラジカルの構造と その反応特性	19
第 1 節 緒言	19
第 2 節 粉碎したデキストランとグリコーゲンに観測される ESR スペクトル	21
第 3 節 コンピューターシミュレーションによる ESR スペクトル 解析	23
第 4 節 粉碎によるデキストランの分子量変化	27
第 5 節 粉碎によるグリコーゲンの粒子径の変化	29
第 6 節 小括	30
第 4 章 デキストランまたはグリコーゲンと医薬品モノマーとの固相 メカノケミカル反応による新規高分子医薬の開発	31
第 1 節 緒言	31
第 2 節 ESR スペクトルの経時変化	33
第 3 節 分子量と粒子径の経時変化	37
第 4 節 固相メカノケミカル反応の反応特性	39
第 5 節 高分子プロドラッグの薬物放出特性	41
第 6 節 小括	43

第 5 章 総括	45
謝辞	50
実験の部	51
第 2 章に関する実験	51
第 3 章に関する実験	54
第 4 章に関する実験	55
引用文献	58
略号の説明	61

第 1 章 緒 論

薬物送達システム (DDS) は、薬物などの生理活性物質を「必要な時に、必要な場所に、必要な量だけ作用させる」という薬物治療の理想的な形態として、著しい発展を遂げてきている。DDS の要素技術としては、放出制御とターゲティングがあり、徐放性製剤、プロドラッグ、リポソーム、高分子医薬、高分子ミセルなど様々な種類の DDS が開発されている。なかでも、抗がん剤などの毒性の高い薬物を患部に選択的に送達することによって、効果に優れ、副作用の少ない治療の実現を目指す DDS は、ターゲティング型 DDS として、様々な研究が展開されている。

薬理活性を示す高分子である高分子医薬の研究は古くから行われており、現在まで活発な研究とその有効性に関して多くの報告例がある。¹⁻⁷⁾ 高分子医薬は作用発現の様式により一般に 2 つに分類される。1 つは高分子それ自身が薬理活性を発現するタイプであるが、その数は少なく、またその開発は極めて経験的である。⁷⁾ もう 1 つは、高分子それ自身は薬理活性を示さないが、高分子主鎖に結合した薬物が高分子主鎖から遊離した後に薬理活性を発現するタイプであり、大部分の高分子医薬は後者に属し、高分子プロドラッグとしてよく知られている。¹⁻⁶⁾ 1970 年代半ばにドイツの高分子科学者 H. Ringsdorf は、高分子プロドラッグの分子設計において要求される機能・特性に関して Fig. 1-1 に示すような特徴を提案している。⁸⁾ すなわち、1) 溶解性や電荷などの物理化学的

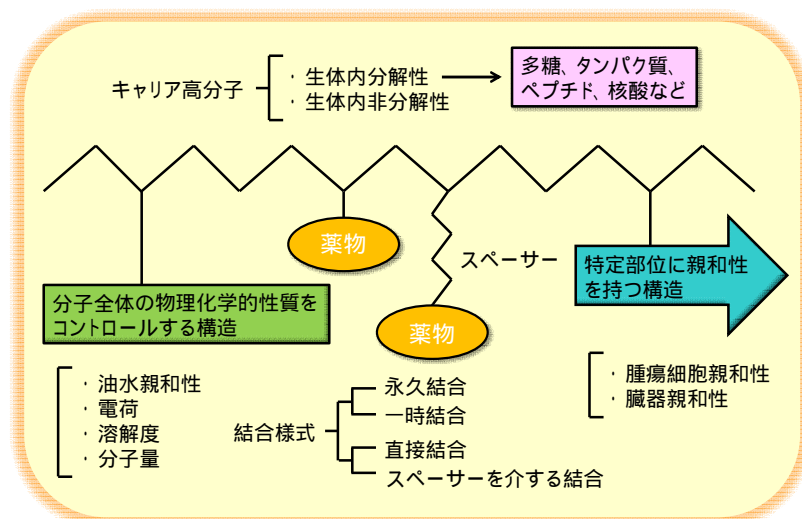


Fig. 1-1 Schematic structures of polymeric prodrugs proposed by H. Ringsdorf.⁸⁾

特性を制御すること、2) 生体にとって異物であるので生体の防御機構による攻撃を受けない構造であること (生体適合性)、3) 目的臓器や細胞に到達すること (ターゲティング能)、4) 必要とされる速さや時間において薬物を放出すること (放出制御)、5) 薬物放出後の高分子は体内で分解されるか、排出されること等が必要であるとされており、この設計概念は、基本的には現在においても広く受け入れられている。

高分子プロドラッグの一般的な合成法としては、高分子中の官能基を利用して高分子主鎖に薬物を直接結合させる方法と、薬物に重合可能な官能基を導入した後重合を行う 2 つの方法が知られている。³⁻⁷⁾ しかしながら、従来のこれらの方法は溶液反応であり、副反応の併発などのため分離・精製の後処理が必要であり、かつ、生成高分子中への溶媒などの残留の危惧が課題ともなっている。

一方、幾多の生化学、病理学および薬理学的研究の結果から、一般的に固形腫瘍では著しい血管透過性の亢進が起きていることに加え、リンパ系が未発達であることが見出された。このような腫瘍組織における特性より、正常血管から血管外へ漏出しにくい高分子物質やナノ粒子は、腫瘍血管から漏出しやすく、さらに漏出した高分子物質は、リンパ系が未発達なためその場に長く滞留することから、Passive Targeting が可能になることが示唆された。⁹⁾ この効果を“漏れやすさと保持” (EPR) 効果と言い、現在、この考え方は世界的に受け入れられている (Fig. 1-2)。EPR 効果を期待して、これまでに高分子プロドラッグ¹⁰⁾、ポリエチレングリコール (PEG) 修飾型リポソーム¹¹⁾、高分子ミセル^{12, 13)} 等が開発され、リポソーム製剤の一部は既に実用化され、高分子ミセルは臨床試験の最終段階 (第 Ⅲ 相試験中) にある。

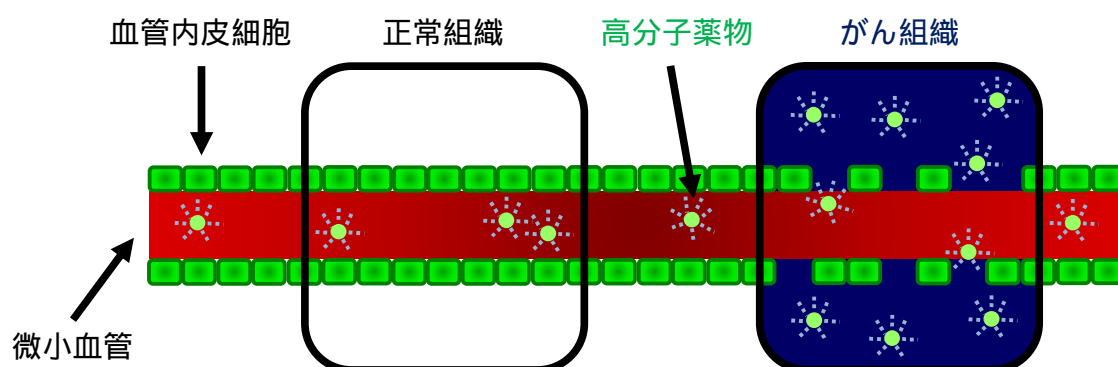


Fig. 1-2 Passive targeting to cancer tissues by EPR effect.

ところで、固体低分子化合物に粉碎、圧縮などの機械的エネルギーを加えると、固体低分子化合物の非晶化や相転位といった集合物性変化をすることはよく知られており、現在まで数多くの報告がある。¹⁴⁻¹⁷⁾ また、高分子化合物の領域においても、ガラス転移点 (T_g) 以下の温度において高分子に機械的なエネルギーを加えると、高分子主鎖の切断に伴うメカノラジカルが生成することは古くから知られている。¹⁸⁾ このように、機械的エネルギーにより引き起こされる化学反応を一般に“メカノケミカル反応”と呼び、高分子主鎖の切断を伴う反応は、“メカノリシス”とも呼ばれている。葛谷らは、種々の高分子のプラズマ照射誘起ラジカルの構造解析に関する相補的な知見を得る目的で、室温窒素雰囲気下、金属製容器を用いた高分子のメカノリシスを実施し、電子スピン共鳴 (ESR) スペクトル測定と ESR スペクトルシミュレーション解析を駆使することで、生成メカノラジカルの構造解析や詳細な動力的解析について先駆的な研究報告をしている。¹⁹⁻²¹⁾ 近年、笹井らは、安全性、機能性そして安価であることなどの利点を持ち、多くが医薬品添加物として認可されているセルロース誘導体のメカノリシスによる、種々の生成メカノラジカルの構造とその反応性について報告している。²²⁾ 例えば、セルロース誘導体の 1 つであるヒドロキシエチルセルロースを室温窒素雰囲気下にて粉碎すると、 β -1,4-グリコシド結合

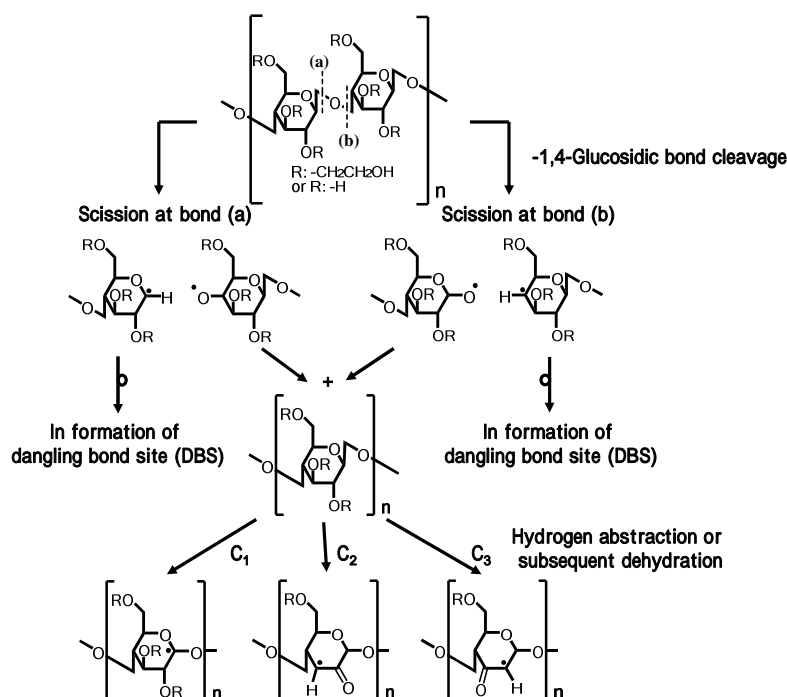


Fig. 1-3 Structures of discrete mechanoradicals and the reaction sequence for their formation in hydroxyethylcellulose.²²⁾

の切断が起こり、主鎖切断型ラジカルが生成する。その後、主鎖切断型ラジカルによる水素引き抜き反応またはその後の脱水反応により、主鎖型ラジカルおよび高度に架橋した部位に生じる明確な構造を持たない未結合手 (Dangling bond sites; DBS) が生成することを室温 ESR の結果を基に明らかにしている。(Fig. 1-3)

また葛谷らは、粉碎時における金属 (固体プラズマ) から医薬品化合物を含めた固体分子への固相一電子移動反応 (Solid-state single electron transfer; SSET) を世界に先駆けて実験的に証明しており、その知見を基に、SSET により開始されるビニルモノマーの固相重合であるメカノケミカル固相重合を利用した種々の高分子プロドラッグの構築について有益な研究成果を報告している。²³⁻³⁵⁾ メカノケミカル固相重合はラジカル開始剤を必要としない完全乾式法であり、生成高分子の分子量分布が狭いこと (単分散性)、また放射線誘起固相重合法と異なり薬物自身の分解の危惧も回避できることなどから、高分子プロドラッグの構築法として極めて有用な重合法であると考えられる。

一方、近藤らは高分子のメカノラジカルの生成特性に関する知見を基に、Polyacrylamide 等の合成高分子と固体医薬品モノマーとの混合物を、室温窒素雰囲気下にて非金属製容器を用いた粉碎処理を行うと、合成高分子の主鎖切断に伴うメカノラジカルと固体医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応が進行し、容易にブロック共重合体が生成することを見出している。³⁰⁾ (Fig. 1-4)

しかしながら、従来のプロトタイプの高分子プロドラッグはいずれも、生体内にて非分解性の高分子主鎖を有しており、メカノケミカル固相重合を利用した生分解性を持つ生成高分子の報告例は未だない。また、薬物担体としての使

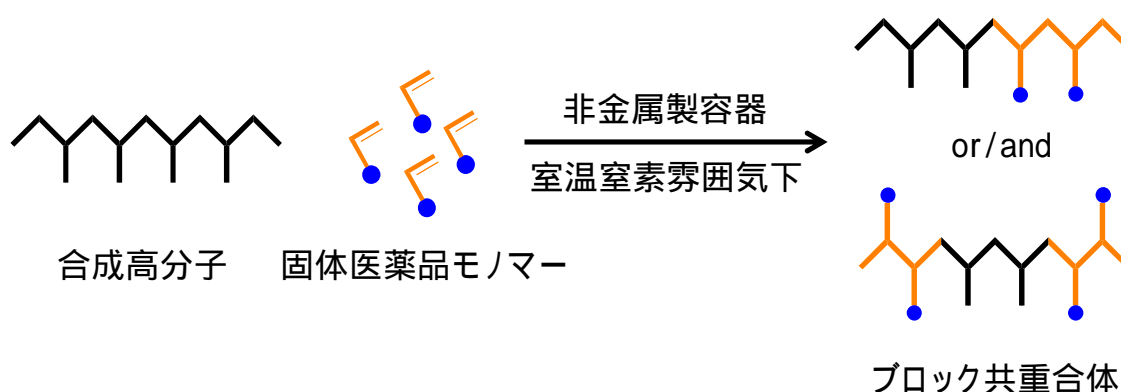


Fig. 1-4 Structures of block copolymers synthesized by mechanochemical solid-state copolymerization.

命を果たした後、体内に蓄積することなく消失する生分解性高分子は DDS の観点からも極めて重要な役割を担うことから、生分解性的高分子主鎖を持つ高分子医薬の開発の意義は大きい。

生分解性高分子のうち、高分子医薬の薬物キャリアとして研究・使用されてきた生分解性天然（半合成）高分子の一種が多糖類である。中でも α -グルコースがグリコシド結合で繋がった α -グルカンの一種であるデキストランやプルランは数多くの研究がなされている。^{36, 37)} 例えば、デキストランまたはプルランと疎水性高分子からなるブロック共重合体を利用して、薬物を封入した高分子ミセルやナノゲルの開発が行われている。³⁸⁾ さらに、これらの多糖に合成高分子をグラフト化したグラフト共重合体は、ブロック共重合体とは異なり、多糖の側鎖に疎水部を複数導入できその機能性に注目が集まっている。³⁹⁾ しかしながら、いずれの共重合体においても著者の知る限り、高分子プロドラッグとして利用されているものは未だ報告がない。

ところで、一般的に多糖と合成高分子からなるグラフト共重合体の多くは、多糖の主鎖にビニルモノマーをグラフト重合することで得られる。縮合反応により多糖の主鎖に合成高分子を直接グラフト化する方法では、高温かつ過酷な条件での液相反応であるため、多糖の主鎖の不均一な分解が懸念され、現在あまり利用されてはいない。⁴⁰⁾ 一方、ラジカル重合を利用した多糖の主鎖への合成高分子のグラフト化が広く利用されているものの、多糖の主鎖への重合開始部分となる官能基の導入が必要であるなどのため、化学処理を行う必要がある。

41)

かかる背景より、これまで多糖と合成高分子からなる高分子プロドラッグの開発に関する報告がないことに加え、多糖と合成高分子とのブロック共重合体やグラフト共重合体の合成では、反応条件による多糖の分解を含めた種々の課題があることに鑑み、より簡便な反応操作で効率よい共重合体の合成の可能性を期待し、本研究では多糖類と固体医薬品ビニルモノマーとの固相メカノケミカル反応を利用した新規な高分子プロドラッグの開発に関する研究に着手した。まず、多糖とビニルモノマーとの固相メカノケミカル反応に関する基礎的知見を得る目的で、上述したメカノラジカルの生成特性が明らかとなっているセルロース誘導体と、抗がん剤として使用される 5-Fluorouracil (5-FU) のメタクリル酸誘導体との固相メカノケミカル反応を実施することにより、新規な高分子プロドラッグを合成した。また、生成高分子について、物理化学的特性や薬物放出特性に関する検討を行った。(第 2 章)

次に、生分解性のある多糖を利用した新規な高分子プロドラッグの構築に向け、 α -1,6-グリコシド結合を主鎖に持つ直鎖構造であり、現在代用血漿として臨床にて利用されるデキストラン、ならびに α -1,4-グリコシド結合と α -1,6-グリコ

シド結合の多分岐鎖から成り、動物の貯蔵多糖として知られるグリコーゲンの室温におけるメカノリシスを行い、生成するメカノラジカルの構造とその反応性について検討を行った。(第 3 章)

そして、直鎖構造の生分解性を持つ多糖であるデキストランと 5-FU メタクリル酸誘導体との固相メカノケミカル反応を実施し、本反応の反応特性、生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性について検討を行った。さらに、ハイパーブランチポリマーであるグリコーゲンと 5-FU メタクリル酸誘導体との固相メカノケミカル反応についても同様に実施し、種々の高分子プロドラッグについて、物性の違いを評価した。(第 4 章)

以下、本研究により得られた知見を詳述する。

なお、本論文は以下の公表した論文の内容を含むものである。

- 1) “Development of Novel Polymeric Prodrugs Synthesized by Mechanochemical Solid-State Copolymerization of Hydroxyethylcellulose and Vinyl Monomers”
N. Doi, Y. Sasai, Y. Yamauchi, T. Adachi, M. Kuzuya and S. Kondo
Chem. Pharm. Bull., **63**, 992-997 (2015)

第 2 章 セルロース誘導体と医薬品モノマーとの固相メカノ ケミカル反応による新規高分子医薬の開発

第 1 節 緒 言

葛谷らは、これまでにセルロースおよびアミロースの室温におけるメカノリシスにより生成するメカノラジカルの構造とその反応性について、ESR スペクトル解析に基づいた研究成果を報告している。²¹⁾ そして、それらのメカノリシスにおいては、グリコシド結合の切断後、生成した主鎖切断型ラジカルが不安定であるため、生成と同時にグルコース環上の水素を引き抜き、その後の転移反応などにより生じるラジカル種が観測されることを明らかにしている。

また、笹井らは、既報のセルロースの結果を基に、種々のセルロース系多糖類に関するメカノラジカルの構造とその反応性について解明してきている。²²⁾ セルロース系多糖類の室温におけるメカノリシスにおいても、セルロースと同様にグリコシド結合の切断後、生成したメカノラジカルによる水素引き抜き反応が進行し、二次的に種々の主鎖型ラジカルが生成する。ところが、生成メカノラジカル種の熱的およびメカノケミカルの安定性の違いにより、観測される ESR スペクトルの外形は各セルロース系多糖類間で差異が認められ、このスペクトル外形の特徴は各々の側鎖官能基が強く関与していることが明らかとなっている。

本章では、これまで未検討であった、多糖と合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグを構築するため、既報のセルロース誘導体の室温におけるメカノリシスに関する知見を基に、セルロース系多糖類とビニルモノマーとの固相メカノケミカル反応について検討を行った。本研究では、モデル多糖としてヒドロキシエチルセルロース (HEC) ならびにモデル医薬品モノマーとして、既報の 1-Methacryloyl-oxymethyl-5-fluorouracil (MA-5-FU) を選択した。MA-5-FU を含む 5-FU の N-acyloxymethyl 誘導体は、加水分解により不安定な中間体を介し、5-FU を生成することは古くから知られており^{42, 43)}、本研究にて合成した高分子プロドラッグも加水分解により 5-FU を放出すると考えられる。HEC はその他のセルロース誘導体に比べ水溶性が高いだけでなく、一般的に分子量が大きいことから、高分子の主鎖切断に伴うメカノラジカルを多く生成することによりビニルモノマーとの反応が首尾よく進行すると考えられる。なお、本研究では数平均分子量 70,000 g/mol の HEC を使用しており、一般的に限界分子量 20,000 ~ 30,000 g/mol の生成高分子が得られる瑪瑙製容器 (振動周波数 30 Hz)

を用いた粉碎を実施することにより、HEC の 1 本鎖あたりに、最大 2 箇所の主鎖切断が生じ、その後の水素引き抜き反応が進行し種々の主鎖型ラジカルまたは DBS が生成すると考えられる。Fig. 2-1 は、HEC と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応の反応スキームを示したものである。

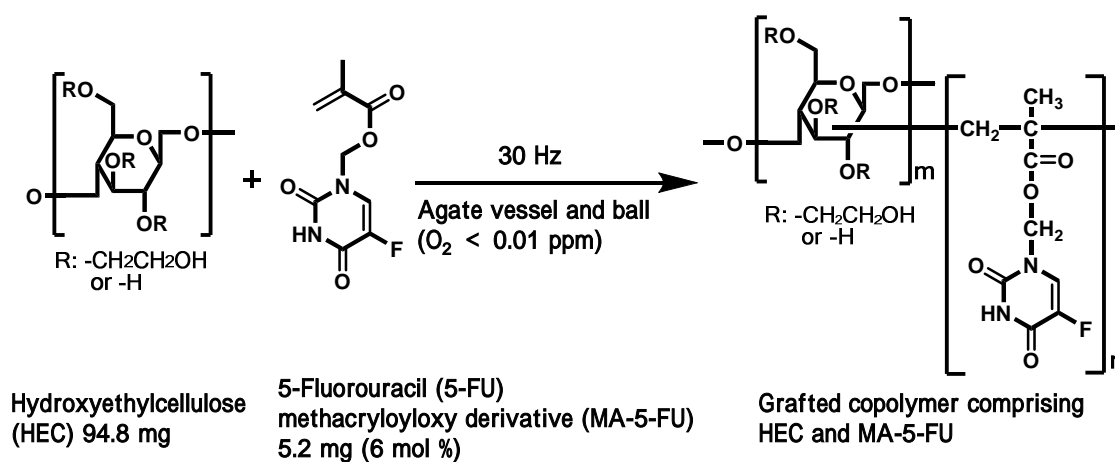


Fig. 2-1 Reaction scheme of polymeric prodrugs synthesis by mechanochemical solid-state copolymerization of HEC and MA-5-FU.

第 2 節

ESR スペクトルの経時変化

室温での粉砕処理による HEC のメカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル重合に関する知見を得るため、室温窒素雰囲気下（酸素濃度 < 0.01 ppm）、HEC と MA-5-FU（モノマー量として 6 mol %）との混合物の瑪瑙製容器を用いたボールミル粉砕（振動周波数 30 Hz）を実施し、粉砕試料を空気に曝すことなく、その ESR スペクトルを測定した。なお、粉砕容器のサイズ等、操作の詳細は実験の部に記載したとおりである。

Fig. 2-2 は、所定時間粉砕した固相メカノケミカル反応物（HEC-5-FU）の実測 ESR スペクトルを、比較の目的で HEC 単独で粉砕処理したもの（F-HEC）と共に示したものである。Fig. 2-2 から明らかなように、処理時間の短い HEC-5-FU と F-HEC において観測されるスペクトル外形には、それぞれ差異が認められた。また、HEC-5-FU のスペクトル外形は徐々にブロードな一重線へと変化したのに対して、F-HEC は粉砕時間によらず一重線のスペクトル外形を維持した。

近藤らはこれまでに、MA-5-FU が瑪瑙製容器を用いたボールミル粉砕では重合が進行しないが、ステンレス製容器を利用した場合、金属から固体分子への固相一電子移動反応が惹起され、逐次的な固相重合反応が進行することを報告している。²⁵⁾ MA-5-FU のメカノケミカル固相重合が進行する際、観測される特

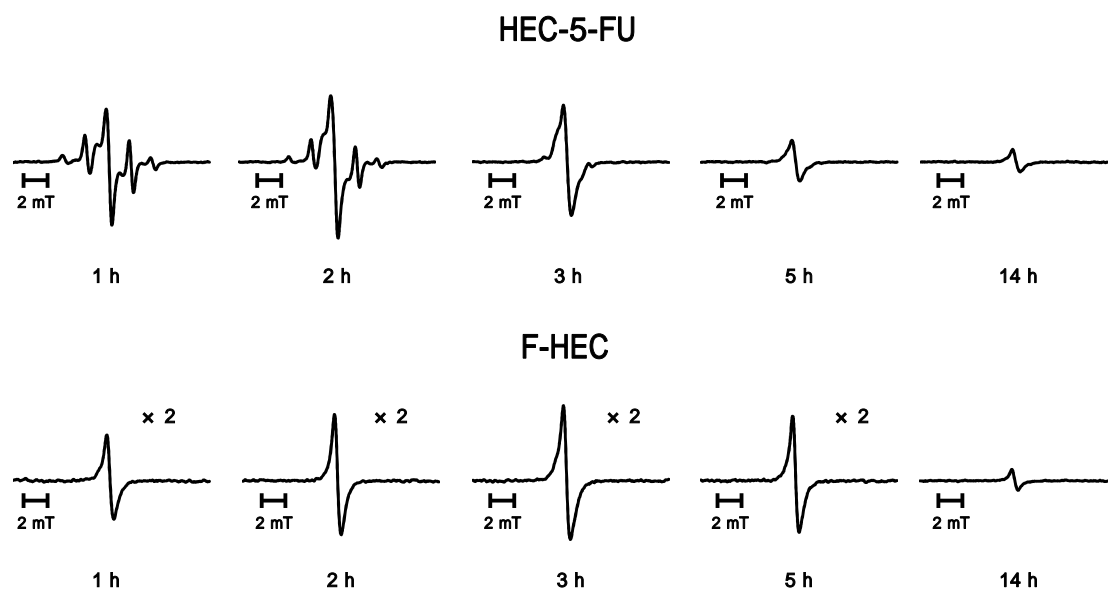


Fig. 2-2 Changes in HEC-5-FU and F-HEC ESR spectra with time.

微的な ESR スペクトルは、Fig. 2-3 に示す 5 本のメインピークと 4 本のショルダーピークからなる“9 本線スペクトル”であり、HEC-5-FU の 1 時間の反応における ESR スペクトルにおいても、同様のスペクトルが観測された。したがって、HEC のメカノリシスにより生成したメカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。また、HEC-5-FU と F-HEC 共に観測されたブロードな 1 重線は、既報のメカノリシス誘起多糖類ラジカルと同様、グリコシド結合の切断やピラノース環の開裂により形成された構造を含む多糖類の未結合手 (Dangling bond sites; DBS) 由来であると考えられる。

次にラジカル量の経時変化について検討を行った。Fig. 2-4 は、HEC-5-FU と F-HEC の経時的なラジカル量の変化について示したものである。HEC-5-FU と F-HEC のラジカル量の経時変化はともに極大値に達した後、ラジカル量が緩やかに減少するという類似した挙動を示したが、HEC-5-FU のラジカル量は F-HEC よりも高い値を示した。また、両者とも 14 時間の高速振動処理においてもメカノラジカルは消失しなかった。笹井らはこれまでに、ステンレス製容器を用いた HEC のボールミル粉碎 (振動周波数 60 Hz) を実施することで、15 分後にラジカル量は最大となり、その後速やかに減少することを報告している。しかしながら、本研究と同様に、2 時間の高速振動処理においてもメカノラジカルは完全に消失することはなかった。メカノケミカル処理により消失しない安定なメカノラジカルは、メカノケミカル反応過程において生成した高度に架橋した立体障害が大きい複雑な構造からなる DBS に由来すると考えられ、同様の知見はこれまでの多糖類のメカノリシスの解析においても明らかとなっている。

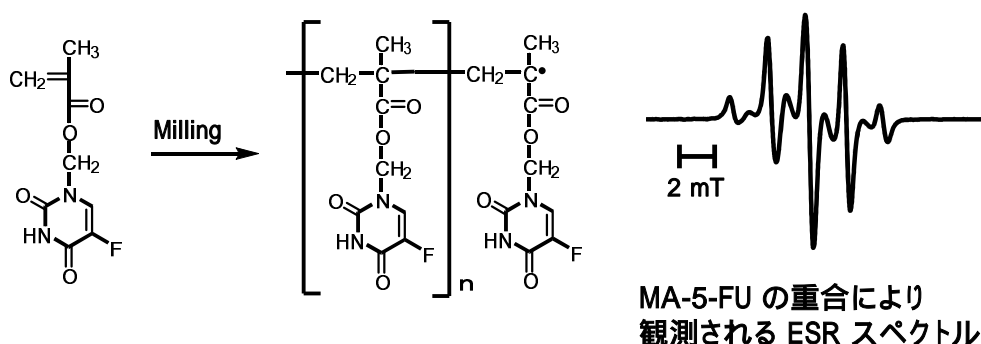


Fig. 2-3 ESR spectrum of mechanochemical polymerization of MA-5-FU using metallic vessel and ball.

また、高分子のメカノリシスでは、主鎖切断に伴うメカノラジカルの生成と、生成メカノラジカルの再結合あるいは不均化などによる失活反応が同時に進行しており、高分子量である粉砕初期においては前者の反応が優位に進行する。しかし、粉砕時間が長くなると分子量の低下のため高分子主鎖の切断が起こりにくくなり、後者の反応が優勢となり極大値を持つラジカル量変化を示したと考えられる。このような特徴は、例えば、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) など合成高分子においても認められる。²⁰⁾

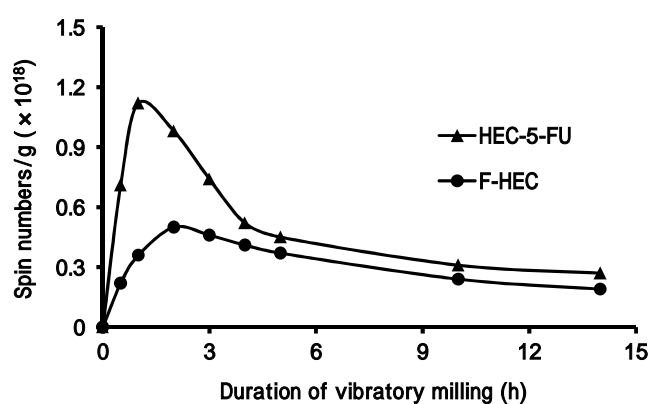


Fig. 2-4 Changes in HEC-5-FU() and F-HEC () radical concentration with time.

第 3 節 分子量の経時変化

メカノラジカルの生成は、高分子主鎖の切断を伴う¹⁹⁻²²⁾ことから、高分子の経時的な粉砕によるラジカル量の変化は、分子量変化と関連すると考えられる。Fig. 2-5 は、HEC-5-FU と F-HEC の粉砕による数平均分子量の経時変化を示したものである。

HEC-5-FU と F-HEC の数平均分子量の経時変化は、同様の挙動を示したことから、両者の系にてほぼ同量のメカノラジカルが生成していることが示唆された。したがって、Fig. 2-4 に示した両者の初期のラジカル濃度の違いは、生成メカノラジカルの安定性の差異に基づくと考えられる。すなわち、HEC-5-FU では、MA-5-FU の重合により安定な第 3 級ラジカルが生成しているのに対し、F-HEC では、主鎖切断後に生成するメカノラジカルの多くがより不安定な第 2 級ラジカルであるために、ラジカル同士の再結合反応や水素引き抜き反応といったその後の逐次的な反応の進行により、生成メカノラジカルが HEC-5-FU の場合と比べ消失しやすいと考えられる。

また、14 時間後の HEC-5-FU および F-HEC の生成高分子の、数平均分子量 (M_n) ならびに多分散度 ($H = M_w/M_n$) は、各々 M_n : 30,000 g/mol, H : 4.7、 M_n : 31,000 g/mol, H : 4.89 であったことから、両者の生成高分子は共に分子量分布が広いことが示された。

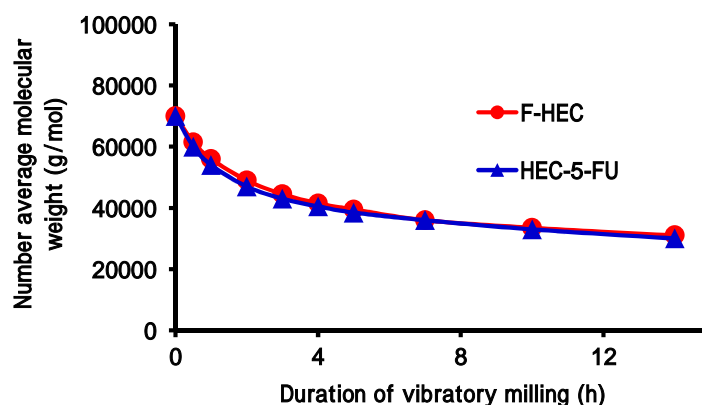


Fig. 2-5 Changes in HEC-5-FU () and F-HEC () number average molecular weight (M_n) with time.

第 4 節

固相メカノケミカル反応の反応特性

本反応の進行率に関する知見を得るため、反応物の核磁気共鳴スペクトル (^1H -NMR スペクトル) を測定し、MA-5-FU のオレフィンピークの積分値の減少率から、反応の進行率 (モノマー消失率) を求めた。(Fig. 2-6)

モノマー消失率は、指数関数的に増加し、4 時間の反応により 94% のモノマーが消失した。また、14 時間の反応によりモノマーは完全に消失した。HEC-5-FU 中の MA-5-FU は、反応初期に高分子の主鎖切断に伴う生成メカノラジカルと反応後、さらに MA-5-FU 間での重合反応が進行する。したがって、反応初期の第 3 級ラジカル量が上昇することから、モノマーの消失率とラジカル量は相関すると考えられる。事実、Fig. 2-4 に示すように、HEC-5-FU において大半の MA-5-FU が 4 時間後までに重合することから、それ以降の HEC-5-FU と F-HEC のラジカル量は類似している。また、HEC-5-FU のラジカル量の経時変化は、4 時間後までとそれ以降に生成する HEC の生成メカノラジカルの特徴の違いを反映していると考えられる。すなわち、4 時間までは多くのメカノラジカルが、MA-5-FU の重合に伴う安定な第 3 級ラジカルであるのに対し、4 時間後以降ではより不安定な第 2 級ラジカルであるため失活し易く DBS になることが明らかとなった。

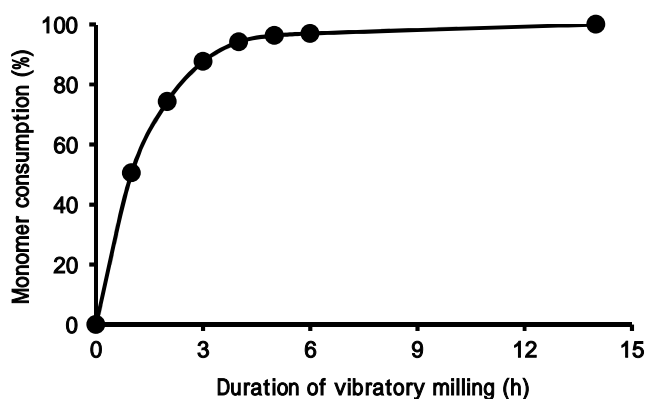


Fig. 2-6 Changes in consumption of HEC-5-FU monomer with time.

第 5 節

生成高分子の分子量分布の制御

第 3 節において、HEC-5-FU における 14 時間後の生成高分子は数平均分子量が 30,000 g/mol, 多分散度が 4.7 と分子量分布が広いことが明らかとなった。高分子は同一組成であっても、分子量が異なることにより溶解性をはじめとする物理化学的特性に差異が生じることはよく知られている。したがって、分子量分布の広い薬物キャリアを血中に投与した場合、体内分布のバラつきが懸念される。例えば、高分子の分子量が数千程度であると腎臓から速やかに体外へ排泄されるのに対し、分子量が数十万の高分子ならば腎臓からは排泄されにくく、両者の体内分布ならびに動態が大きく異なることが考えられる。⁴⁴⁾ したがって、生体への影響を考慮すると、薬物キャリアの分子量分布が狭い方が有効であると考えられる。そこで本節では、MA-5-FU の重合が完全に進行した HEC-5-FU (14 h) に、更に強い機械的なエネルギー (振動周波数 60 Hz、ステンレス製容器ならびにステンレス製ボールを用いた粉碎を実施) を加えることで、HEC-5-FU (14 h) の分子量分布の制御について検討した。

Fig. 2-7 は、HEC-5-FU (14 h) を粉碎した時の ESR スペクトルの経時変化であり、MA-5-FU の生長反応、またはその高分子の主鎖切断に基づく特徴的な 9 本線スペクトルは、いずれの時間においても観測されなかった。したがって、Fig. 2-7 に示す ESR スペクトルはいずれも、HEC-5-FU (14 h) を構成する HEC 部位の切断に基づくものであり、MA-5-FU の重合より生成した合成高分子のグラフト鎖は機械的な切断を受けないことが示唆された。



Fig. 2-7 Observed time-course ESR spectra of fractured polymers at 60 Hz.

また、Fig. 2-8 は HEC-5-FU (14 h) を粉碎した時の、ラジカル量と数平均分子量の経時変化を示したものである。30 分間の粉碎により、ラジカル量は最大となり、その後限界値に向かい低下する傾向が示された。この残存するラジカルは、DBS に基づくものと考えられる。一方、HEC-5-FU (14 h) の数平均分子量は粉碎により急激に低下していき、30 分間以降は分子量の減少は緩やかとなり、定常化する傾向を示した。この結果は、ラジカル量とよく相関しており、HEC-5-FU (14 h) の 60 分間の粉碎による生成高分子 (L-(HEC-5-FU)) (60 min) の数平均分子量と多分散度は各々 12,000 g/mol と 1.74 であった。以上の結果より、HEC-5-FU (14 h) に、より強い機械的なエネルギーを加えることで、合成高分子のグラフト鎖は切断を受けることなく、HEC 部位が特異的に切断され、さらに分子量分布の狭い高分子が得られることが明らかとなった。

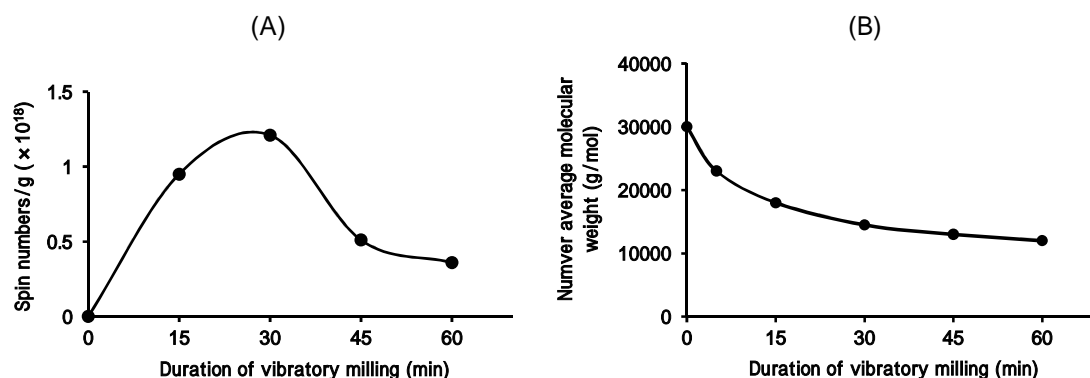


Fig. 2-8 Changes in (A) radical concentration and (B) number average molecular weight (Mn) of fractured polymers at 60 Hz with time.

第 6 節

高分子プロドラッグの薬物放出特性

Fig. 2-9 は、HEC と MA-5-FU (6 mol %) との固相メカノケミカル反応における 14 時間の反応物 (HEC-5-FU (14 h)) と、HEC-5-FU (14 h) を更に 60 分間粉砕することで得られた分子量分布の狭い高分子 (L-(HEC-5-FU) (60 min)) における、pH 7.4、37 のリン酸緩衝液中における薬物放出試験の結果を示したものである。放出された 5-FU 量は、265 nm の UV の吸光度より定量した。

Fig. 2-9 から明らかなように、HEC-5-FU (14 h) と L-(HEC-5-FU (60 min)) の薬物放出挙動はほぼ同じであり、いずれも 1 次反応速度式に従った徐放性を示した。また、24 時間までに約 30% の薬物放出が見られた後も緩やかな放出が観測された。親水部と疎水部からなる両親媒性高分子を水に溶解させると、一見溶解しているように見えるが、細かく見ると疎水部はミクロな自己組織領域をつくっており、組成に応じて様々な形態をとることが報告されている。⁴⁵⁾ すなわち、本実験においても、希薄水溶液中で本高分子プロドラッグを構成する HEC 鎖は、水への親和性が高いために高分子鎖が広がる一方、合成高分子鎖は疎水性相互作用により近接した疎水基の会合が生じることで水分子のアクセシビリティが低下し、薬物放出が緩やかになったものと考えられる。

Table 2-1 に両者の数平均分子量 (M_n) と多分散度 ($H = M_w/M_n$)、そして加水分解速度定数 (k_H) を示す。Table 2-1 から明らかなように、両者の M_n と H は異なるものの、 k_H はほぼ同じであり、本研究で構築した高分子プロドラッグの k_H は、本実験範囲内において、 M_n や H に影響しないことが示唆された。

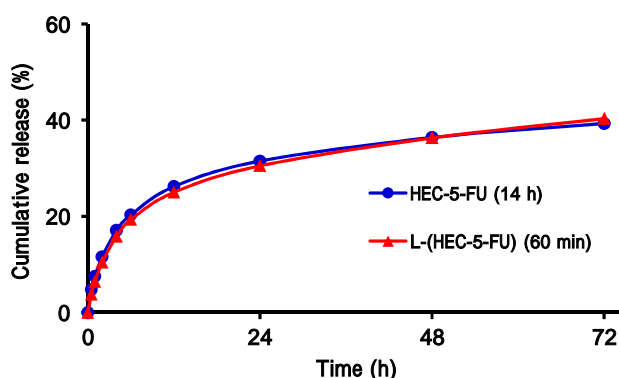


Fig. 2-9 Drug release with time from the polymeric prodrugs of HEC-5-FU.

Table 2-1 Number Average Molecular Weight, Polydispersity, and Hydrolysis Rate Constant of HEC-5-FU (14 h) and L-(HEC-5-FU) (60 min)

	Mn (g/mol)	Mw / Mn	Hydrolysis rate constant (h ⁻¹)
HEC-5-FU (14 h)	30000	4.7	2.12×10^{-3}
L-(HEC-5-FU) (60 min)	12000	1.74	2.24×10^{-3}

第 7 節 小 括

本章では、既報のセルロース誘導体のメカノリシスに関する知見を基に、HEC とビニルモノマーとの固相メカノケミカル反応を実施し、その反応特性や生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性について検討した。本研究により得られた知見を、以下にまとめる。

HEC と MA-5-FU からなる新規な高分子プロドラッグを、瑪瑙製容器ならびに瑪瑙製ボールを用いた固相メカノケミカル反応（振動周波数 30 Hz）により合成した。HEC-5-FU の 1 時間の反応における ESR スペクトルは、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合において観測される ESR スペクトルと類似のスペクトルであり、HEC のメカノリシスにより生成したメカノラジカルによる MA-5-FU のメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。また、ラジカル量の経時変化より、F-HEC よりも HEC-5-FU の方がより多くのラジカルが観測され、かつ分子量の経時変化ではほぼ同じ挙動であったことから、F-HEC と HEC-5-FU とのラジカル量の差異は、生成するラジカルの安定性に起因していることが示唆された。MA-5-FU の重合は定量的に進行し、14 時間で固体モノマーが完全に消失した。また、生成高分子に更に強い機械的なエネルギー（振動周波数 60 Hz、ステンレス製容器ならびにステンレス製ボールを使用した粉砕）を加えると、生成高分子を構成する HEC 部位が選択的に切断を受けることが示唆された。また、生成高分子の数平均分子量および多分散度は、瑪瑙製容器で得られた生成高分子（14 時間の反応物）が各々 30,000 g/mol, 4.70 であるのに対し、60 Hz の粉砕を 60 分間実施した生成高分子では各々 12,000 g/mol, 1.74 となり、分子量分布の制御が可能であることが示された。さらに、本実験においては、両者の生成高分子における加水分解速度定数は類似しており、本実験範囲内において加水分解速度定数は生成高分子の数平均分子量や多分散度の影響を受けないことを明らかにした。これらの結果は、固相メカノケミカル反応を利用した、多糖と合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグの構築における基礎的知見として大変有用であると考えられる。

第 3 章 デキストランとグリコーゲンに生成する メカノラジカルの構造とその反応特性

第 1 節 緒 言

薬物キャリアとして利用される高分子には、タンパク質（抗体やリポタンパク）、合成高分子や多糖類など様々な種類がある。多糖類のうち、 α -グルカンの多くは生体内にて緩やかに加水分解を受けやすく、さらに分子量や電荷の制御により血中滞留性を持たせることが可能である等の利点から、その薬物キャリアに関する幅広い研究が行われてきている。その一例として、高倉らは、 α -グルカンの 1 つであるデキストランに抗がん剤であるマイトマイシン C を担持させた、分子量の異なる種々の高分子プロドラッグを開発し、実際に *in vivo* において、分子量すなわち粒子サイズがその体内分布に影響することを見出している。⁴⁴⁾ デキストランは、*Leuconostoc mesenteroides* により生合成され、 α -D-グルコース分子の直鎖からなる多糖である。その構造の 95% は α -1,6-結合した直鎖のグルコースユニットにより構成され (Fig. 3-1)、僅かに、側鎖として α -1,3-結合したグルコースユニットも構造中に含む。⁴⁶⁻⁴⁸⁾

著者は、第 2 章において、セルロース誘導体の 1 つである HEC と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応を実施し、多糖と合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグの物理化学的特性ならびに薬物放出特性について明らかにした。しかしながら、セルロース誘導体は α -グルカンに比べ生体適合性や生分解性が低い（例えば、 β -1,3-グルカンを *in vivo* に投与するとサイトカイン産生を促す⁴⁹⁾）ことから、生体内における血栓形成や溶血等の誘発が懸念される）

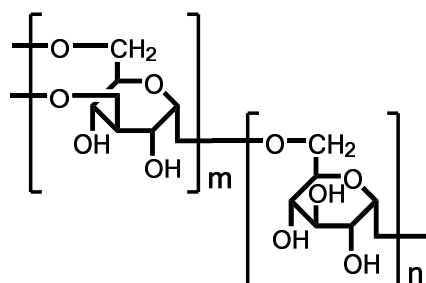


Fig. 3-1 Schematic structures of Dextran.

ことから、生体への影響を考慮すると多糖類の場合 α -グルカンの利用が DDS の観点からも望まれる。そこで、著者は、 β -グルカンを利用した固相メカノケミカル反応による新規高分子プロドラッグの合成を行うこととしたが、 β -グルカンの生成メカノラジカルと医薬品モノマーとのメカノケミカル重合による生成高分子の化学構造について明らかにするには、 β -グルカンの室温におけるメカノリシスによるメカノラジカルの構造やその反応特性について解明する必要がある。葛谷らはこれまでに、 α -1,4-グリコシド結合の直鎖構造を持つアミロースについて、その室温におけるメカノリシスに関する詳細な知見を得ている。²¹⁾ところが、アミロースは分子内の水素結合により螺旋構造を形成していることから、熱水でなければ溶解しない。そのため、血中に投与する薬物キャリアへの応用が困難であると考えられる。

そこで、著者は、臨床にて代用血漿として点滴に使用されている、 α -1,6-グリコシド結合の直鎖構造を持つデキストランについて、デキストランのメカノリシスによるメカノラジカルの生成特性ならびにその生成機構について、ESR スペクトルのシミュレーションを駆使した詳細な解析を実施した。さらに、 α -グルカンの構造的な違いによるメカノラジカルの生成特性についても明らかにするため、 α -1,4-グリコシド結合と α -1,6-グリコシド結合の多分岐鎖からなり動物の貯蔵多糖として知られるグリコーゲンについても同様に検討した。(Fig. 3-2)

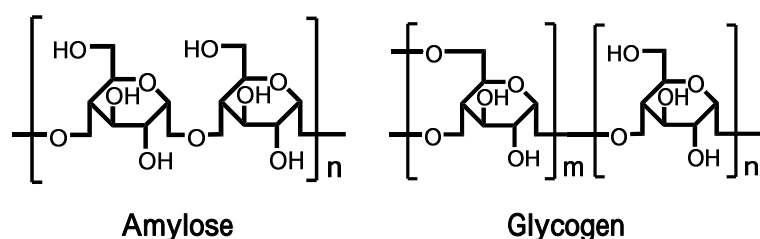


Fig. 3-2 Schematic structures of Amylose and Glycogen.

第 2 節

粉砕したデキストランとグリコーゲンに観測される ESR スペクトル

デキストラン (Dx) およびグリコーゲン (Gly) の室温におけるメカノラジカル生成特性に関する知見を得るため、室温窒素雰囲気下、ステンレス製容器を用いたボールミル粉砕 (振動周波数 60 Hz) を実施した。

Fig. 3-3 は、所定時間粉砕した Dx および Gly 粉末の実測 ESR スペクトルを示したものであり、比較のため既報のアミロースの結果も併せて示した。²¹⁾ なお、点線で示したスペクトルはシミュレーションにより再現されたものであり、観測スペクトルを良く再現していることが解る。

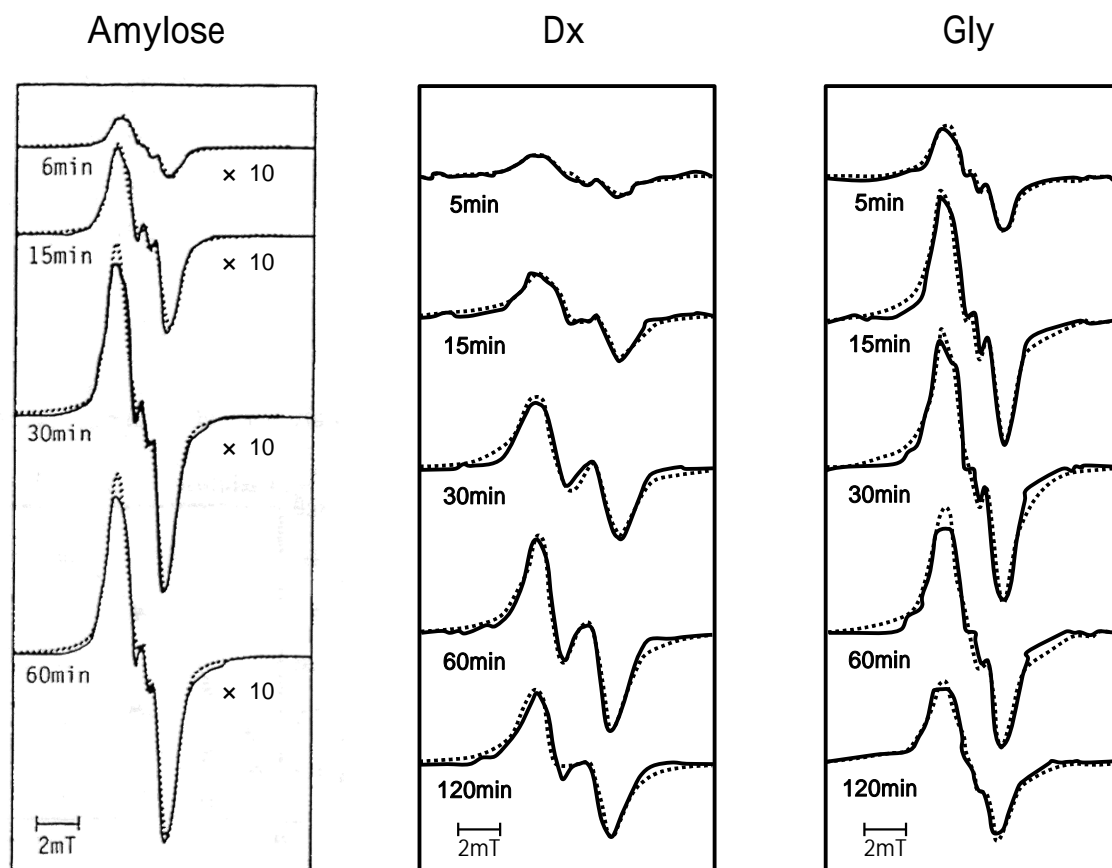


Fig. 3-3 Progressive changes in observed ESR spectra of fractured Amylose²¹⁾, Dx and Gly, together with the simulated spectra shown as dotted lines.

観測された ESR スペクトルは、化合物により差異が認められた。いずれの化合物も α -D-グルコースを構成単位とするものの、前節で述べたようにアミロースは α -1,4-結合で繋がった直鎖構造をしているのに対し、Dx は主鎖が α -1,6-結合で繋がった直鎖構造であり、側鎖としてグルコースユニットが数個、 α -1,3-結合で繋がった部分を持つ。Dx の側鎖部分は十分短いため（分子量 1,000 以下）、本実験条件でのメカノリシスでは側鎖の切断は起こらないと考えられる。したがって、 α -1,6-結合の切断に由来するメカノラジカルが生じ、その後アミロースの場合と同様により安定なラジカルに転移すると考えられる。一方、Gly は、 α -1,4-結合と α -1,6-結合が混在した高度に架橋した構造をとっていることから、両者の結合の開裂に由来したラジカルが関与すると推察される。したがって、Fig. 3-3 の ESR スペクトル外形の差異は、 α -1,4-結合あるいは α -1,6-結合の切断により生じたラジカルが、引き続き起こす転移反応の差異に起因する可能性が示唆された。(Fig. 3-4)

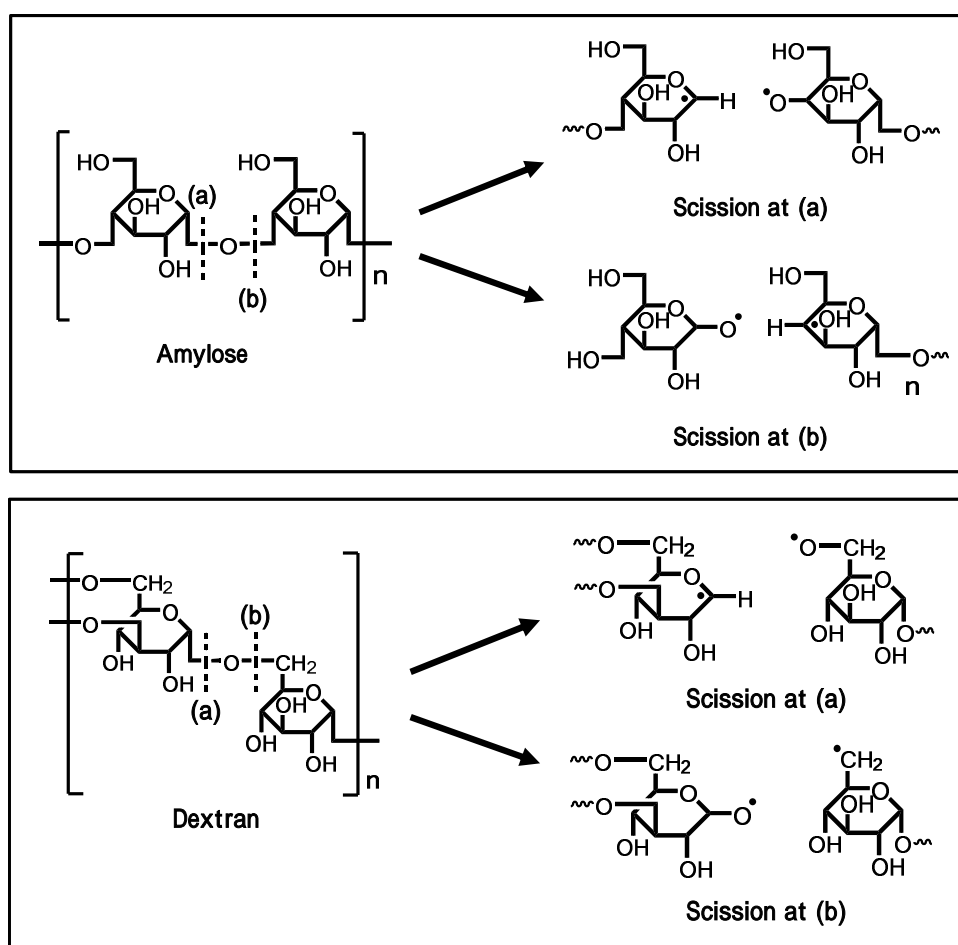


Fig. 3-4 Schematic representation of bond cleavage at α -1,4- and α -1,6-bond.

第 3 節 コンピューターシミュレーションによる ESR スペクトル解析

Dx および Gly のメカノラジカルのコンピューターシミュレーションによる ESR スペクトル解析の結果、両者のメカノラジカルの構成ラジカルはアミロースの構成ラジカルと同じであり、その比率を変えることにより再現可能であることが明らかとなった。すなわち、Dx および Gly のメカノラジカルを構成するラジカルは、アミロースと同じグルコースユニットの C_1 位の水素引き抜きにより生じたアルコキシアルキルラジカルに由来するほぼ等方性のダブルット () とブロードなシングレット () より構成されることを明らかにした。(Fig. 3-5) また、構成ラジカルの ESR スペクトルデータを Table 3-1 に示す。なお、シングレット () は、 α -1,4-あるいは α -1,6-グリコシド結合の開裂後、引き続き進行する複雑な反応に起因する、明確な構造を持たず複雑な構造をしたラジカルの混合物である DBS に由来するものである。

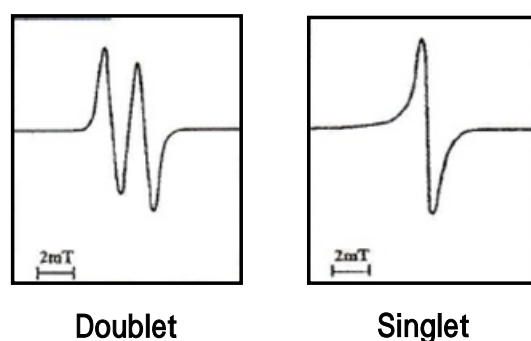


Fig. 3-5 Component spectra for the simulated ESR spectra.

Table 3-1 ESR Spectral Data for Component Radicals in Simulated Spectra of Amylose and Dx and Gly^a

g	2.0052	$\bar{g} = 2.0047$	$g_1 = 1.9999$
			$g_2 = 2.0067$
			$g_3 = 2.0074$
$A\beta(1)$	1.70		

^a Values of HSC are given in mT.

Fig. 3-6 は、ESR シミュレーション解析により求めた構成ラジカル量の経時変化を示したものであり、比較としてアミロースの結果も併せて示した。アミロースは粉碎処理によりラジカル量は単調増加をしており、60 分以降の粉碎においてもラジカル量が減少しないことを報告している。²¹⁾ また、Fig. 3-6 から明らかなように、アミロースにおいては粉碎時間によらず構成ラジカルの比率はほぼ同じであることが示された。一方、Dx および Gly の総ラジカル量について見ると、Dx においては約 60 分間で、Gly では、約 30 分間の粉碎時に最大となり、その後総ラジカル量は減少する傾向を示した。このようなラジカル量の変化は、生成したラジカルが再結合反応や不均化反応により失活していることを示している。笹井らは、セルロース系多糖類において側鎖官能基の存在によりメカノケミカル的に不安定なラジカルが多く生成するため、ラジカル量変化が極大値を示すことを報告している。²²⁾ したがって、分岐・架橋構造を有する Dx および Gly においても、分岐部位の存在によりメカノケミカル的に不安定なラジカルが多く生成し、失活反応が優位に進行することが示唆された。

Dx の構成ラジカルの割合は、粉碎時間によらずおおむね一定である傾向を示したのに対し、Gly においては構成ラジカルの安定性に大きな差異が認められた。すなわち、30 分間までの粉碎においては両ラジカルともに増加し、その後ラジカル量が減少するが、ダブレット (○) に由来するラジカルは 60 分以降も減少を続けるのに対し、シングレット (●) に由来するラジカルは 60 分以降は定常化する傾向を示した。このことは、Gly は高度に架橋した高分子であることから、メカノラジカルの転移反応等により生じた DBS がより安定化されることに起因すると考えられる。

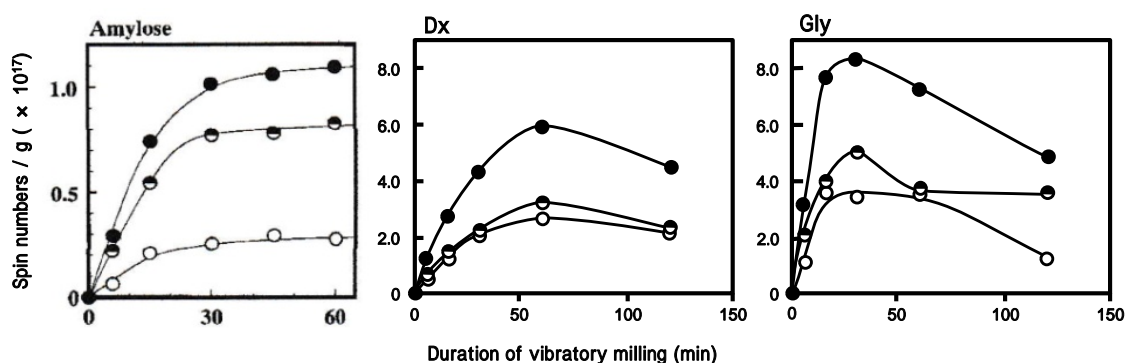


Fig. 3-6 Progressive changes in spectral intensities of component spectra corresponding to the simulated spectra of Amylose and Dx and Gly.

(○) total; (○) I; (●) II.

ところで、アミロースや Dx, Gly とセルロース誘導体とのラジカル生成特性の大きな違いは、 C_2 , C_3 位の水素引き抜きおよびその後の脱水反応により生成するアシルアルキルラジカルをセルロース誘導体は生成するが、アミロースや Dx, Gly は生成しない点である。アミロースの螺旋構造は、すべてのグルコース単位の C_2 と C_3 位のアキシャル水素が、その螺旋構造の内側と外側にそれぞれ位置している。したがって、 C_3 位のヒドロキシルアルキルラジカルの生成につながるアミロースの C_3 位の水素引き抜きは大きく抑制され、その反対に C_2 位の水素引き抜き反応が効率よく生起することを以前の報告にて明らかにしている。(C_4 位の水素引き抜きにより生成するメカノラジカルはいずれの多糖の場合も、メカノケミカル的に不安定であることから、室温 ESR 上では一切観測されない。) また、Dx では、Fig. 3-7 に示す^{50, 51)} ように、 C_2 位の水酸基は、2 残基隣のグルコースの C_4 位の水酸基との分子内水素結合により、脱水反応が容易に生じにくいため C_2 位のアシルアルキルラジカルの生成は抑制されと考えられる。そして、 C_3 位のアシルアルキルラジカルもまた、 C_2 C_4 位の水素結合の切断が生じにくく、かつ C_2 位のヒドロキシルアルキルラジカルの β 位 (C_3 位) のヒドロキシル基の水素原子が C-O 結合軸に対して、同じ β 位炭素に結合した水素原子と s-cis の位置関係であるため、 C_3 位の脱水は起こりにくいと考えられる。(Fig. 3-8) また、ランダムな多分岐鎖を持つ Gly もまた C_2 C_4 位の水素結合が生じており、以上のことは、以前に報告した *myo*-Inositol の水素引き抜きにより生成するヒドロキシルアルキルラジカルにおいて、その β 位ヒドロキシル基の水素原子が C-O 結合軸に対して、同じ β 位炭素に結合した水素原子と s-trans の位置関係であるとき、脱水が急激に加速するという事実からも支持される。⁵²⁾ (Rehybridization-induced effect, Fig. 3-9)

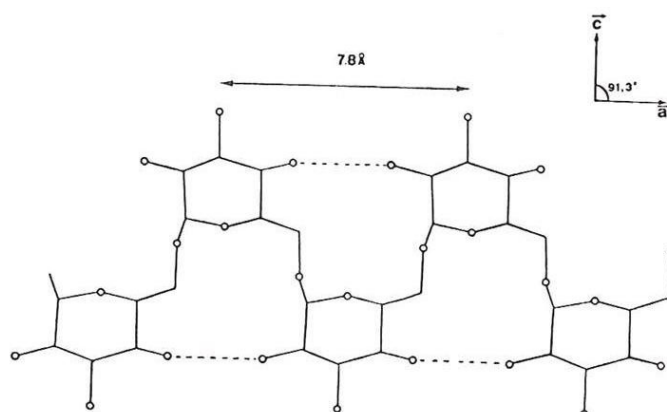


Fig. 3-7 Diagrammatic representation of hydrogen-bonding seen in Dx.^{50, 51)}

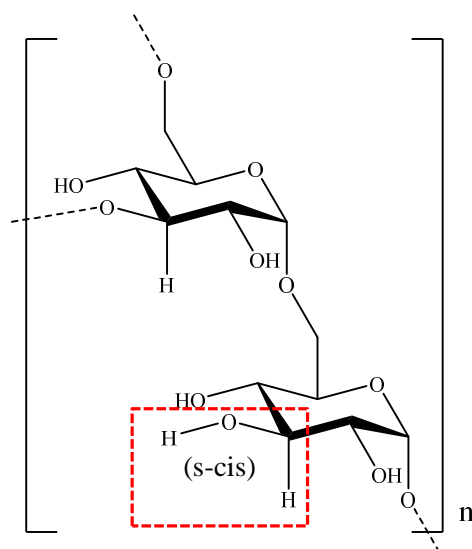


Fig. 3-8 Diagrammatic representation of the repeating unit of Dx.

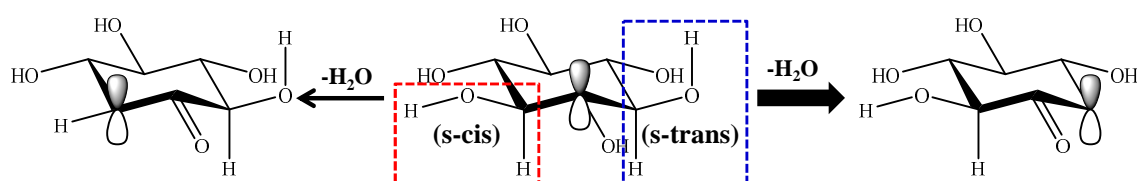


Fig. 3-9 Diagrammatic representation of rehybridization-induced effect of *myo*-Inositol.⁵²⁾

第 4 節

粉砕によるデキストランの分子量変化

既に述べたように、高分子のメカノリシスでは、高分子主鎖の切断によりメカノラジカルが生じる。したがって、メカノラジカル生成量と高分子の分子量とは密接な関係にあると考えられる。そこで、粉砕による Dx の分子量変化について検討を行った。分子量測定は、ゲル濾過クロマトグラム (GPC) 法を用いた。

Fig. 3-10 は、粉砕時間による Dx の分子量分布変化を示したものである。粉砕時間によらず、明確な複数のピークを示すことなく、ブロードな単一の分子量分布を示して変化していることから、高分子主鎖の切断がランダムに進行していることが示唆された。

重量平均分子量の経時変化の結果を Fig. 3-11 に示す。重量平均分子量は、指数関数的に減少しており、総ラジカル量が極大値を示した 60 分後以降では、分子量の減少も緩やかとなっており、Fig. 3-6 に示すラジカル量変化ともよく対応している。いくつかの高分子の粉砕において、次式で示されるように重量平均分子量が限界分子量 ($\bar{M}_{w\infty}$) に向かって指数関数的に減少していくことが知られている。^{53, 54)}

$$\bar{M}_{wt} = \bar{M}_{w\infty} + (\bar{M}_{w0} - \bar{M}_{w\infty}) e^{-kt} \quad \cdots (3-1)$$

ここで、 \bar{M}_{wt} はある時間 t における分子量、 \bar{M}_{w0} は $t=0$ における分子量、 k は系に依存した変数からなる比例定数である。

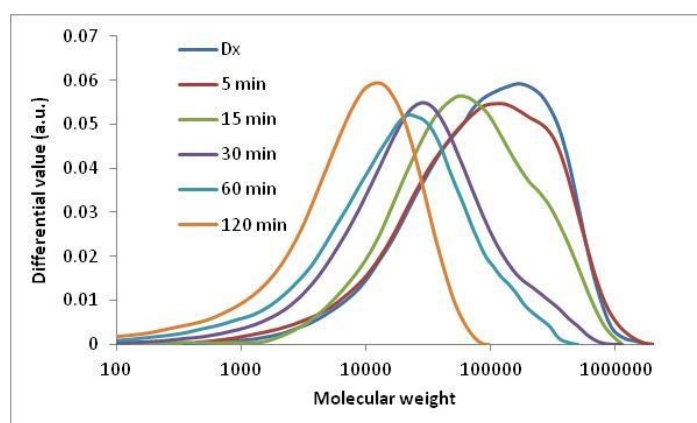


Fig. 3-10 Progressive changes in molecular weight distribution of Dx in the course of vibratory milling.

重量平均分子量変化について非線形最小二乗法によりカーブフィッティングを行ったところ、次式が得られた。

$$\bar{M}_{wt} = 11100 + 107000 \times e^{-0.0320 t} \quad (r = 0.9884)$$

したがって、Dx のメカノリシスにおいても他の高分子と同様に、式 (3-1) に従った分子量変化であることが明らかとなり、本実験条件における限界分子量は約 11,000 g/mol であることが示唆された。葛谷らはこれまでに、セルロースについて本実験と同様の条件にて 3 時間の粉砕を実施することにより、セルロースの重量平均分子量が 15,000 g/mol まで低下することを報告しており²¹⁾、Dx の場合とほぼ一致している。

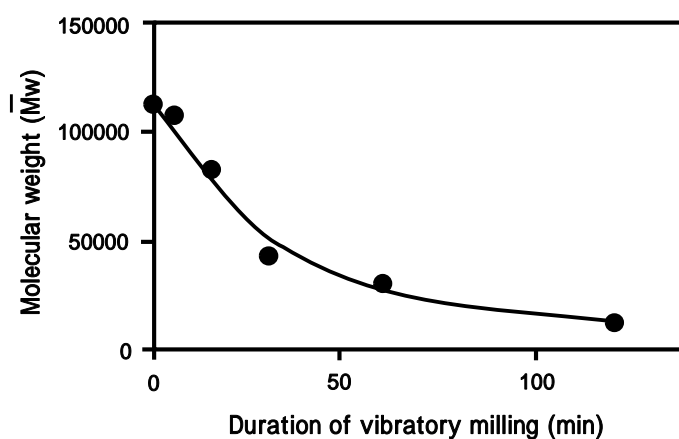


Fig. 3-11 Progressive changes in molecular weight of Dx in the course of vibratory milling.

第 5 節

粉碎によるグリコーゲンの粒子径の変化

ところで、Gly は架橋性高分子であることから、直鎖状高分子のように分子量という概念は適さなくなる。そこで、Gly の粒子径変化について検討を行うこととしたが、動的光散乱法 (Dynamic light scattering; DLS) を用いて直接粒子径を測定することは、10 nm 以下の粒子については現有の装置では測定が困難である。一方、GPC は高分子の分子量を測定することに適した方法であり、その測定原理は分子量既知の標準試料の溶液中での高分子の広がり、と未知試料の高分子の広がりを比較することにより分子量を求めるものである。高分子の広がりを表す指標の 1 つとして、流体力学的半径 (R_H) があり、DLS の測定により R_H を求めることが可能である。ある溶媒中で球形の形態をとる高分子では、 R_H が重量平均分子量の 0.5 乗に比例することが知られている。多糖類の 1 つであるプルランは、GPC の標準試料としてよく用いられており、プルランの R_H は重量平均分子量の 0.5 乗に比例することも報告されている。⁵⁵⁾ そこで、プルランを標準試料とした GPC の検量線を作成し、同条件で粉碎処理した Gly の測定を行い、その分子量から R_H を求め、粒子径変化について評価した。

Fig. 3-12 は、粉碎した Gly の粒子径の経時変化を示したものである。30 分後までは粒子径が急速に減少するのに対し、30 分後以降ではその変化は緩やかとなった。この結果は、上述のラジカル量変化において、30 分間の処理で総ラジカル量が最大値に達することとよく対応していると考えられる。

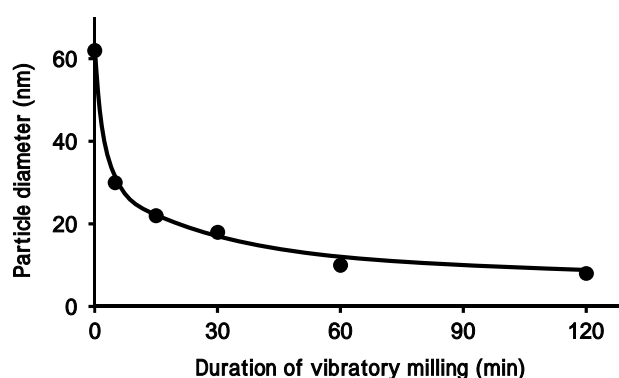


Fig. 3-12 Progressive changes in particle diameter of Gly in the course of vibratory milling.

第 6 節 小 括

本章においては、 α -グルカンである Dx および Gly を用い、 α -グルカンのメカノリシスにおける、メカノラジカル生成および物理化学的特性に関する基礎的知見を得るため種々の検討を行った。本章において得られた知見を以下にまとめる。

Dx および Gly の室温におけるメカノリシスを実施したところ、観測された ESR スペクトルは、化合物により差異が認められた。Dx および Gly のメカノラジカルのコンピューターシミュレーションによる ESR スペクトル解析の結果、両者のメカノラジカルの構成ラジカルはアミロースの構成ラジカルと一致しており、その比率を変えることにより再現可能であることが明らかとなった。さらに、Dx および Gly においては、分岐部位の存在によりメカノケミカル的に不安定なラジカルが多く生成し、アミロースと比較し、失活反応が優位に進行することが示唆された。また、Gly は高度に架橋した高分子であることから、メカノラジカルの転移反応等により生じた DBS が、より安定化されるため残存することが示唆された。Dx の分子量変化ならびに Gly の粒子径変化と各々のラジカル量変化とは、よく対応していることが明らかとなった。

以上、Dx と Gly のメカノリシスによる生成メカノラジカルの構造とそのメカノケミカル反応の特性について明らかにした。かかる知見は、生分解性のある多糖から生成するメカノラジカルの反応を利用した、新規な高分子医薬の構築のための有益な設計指針となるものと考えられる。

第 4 章 デキストランまたはグリコーゲンと医薬品モノマーとの 固相メカノケミカル反応による新規高分子医薬の開発

第 1 節 緒 言

著者は、第 3 章において、Dx および Gly の室温におけるメカノリシスにより生成するメカノラジカルは、アミロースの室温におけるメカノリシスにて生成するメカノラジカルの構成ラジカルと一致しており、その比率を変えることにより再現可能であることを明らかにした。すなわち、C₁ 位の水素引き抜きにより生成するダブルットに由来するラジカルと DBS に基づくブロードなシングレットに由来するラジカルより構成されていることを見出した。

本章においては、生分解性を持つ多糖を利用した新規な高分子プロドラッグを構築するため、前章により得られた知見を基に、Dx または Gly と医薬品モノマーである MA-5-FU との固相メカノケミカル反応を実施した。また、本固相メカノケミカル反応の動力学的反応解析（ラジカル量変化、モノマー消失率変化）を行うとともに、生成高分子特性ならびに薬物放出特性について詳細に検討を行った。Fig. 4-1, 4-2 は、Dx または Gly と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応の反応スキームを示したものである。

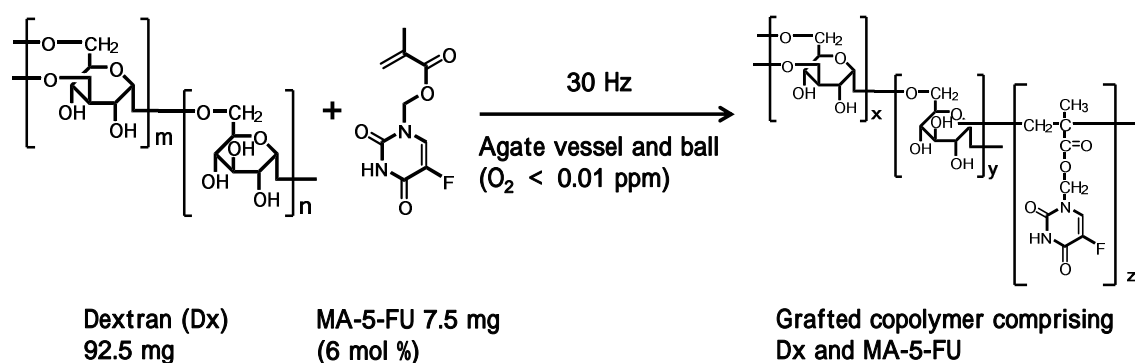


Fig. 4-1 Reaction scheme of polymeric prodrugs synthesis by mechanochemical solid-state copolymerization of Dx and MA-5-FU.

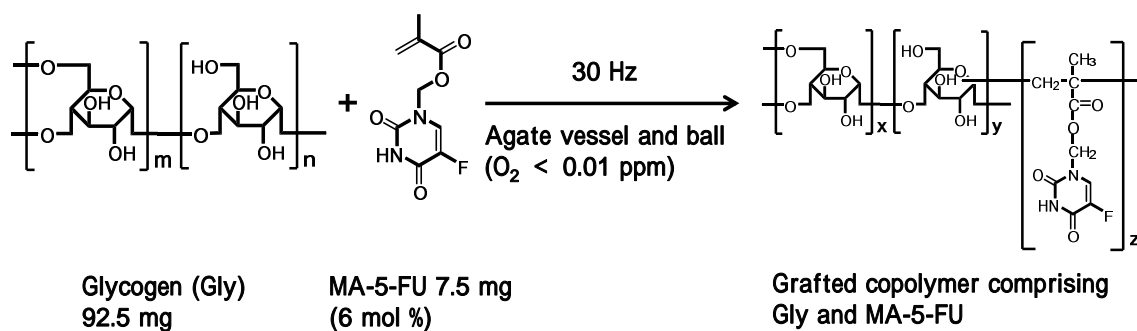


Fig. 4-2 Reaction scheme of polymeric prodrugs synthesis by mechanochemical solid-state copolymerization of Gly and MA-5-FU.

第 2 節

ESR スペクトルの経時変化

Dx と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応 (Dx-5-FU) は、瑪瑙製容器および瑪瑙製ボールを用いたボールミル粉碎 (振動周波数 30 Hz) により種々の時間実施し、反応物を得た。また、比較対象として Dx 単独の粉碎 (Fractured Dextran (F-Dx)) についても同様に行い、粉碎物を得た。Fig. 4-3 は、Dx-5-FU と F-Dx の ESR スペクトルの経時変化を示したものである。Dx-5-FU と F-Dx の 2 時間後のスペクトルは、明らかに異なることが Fig. 4-3 から見て取れる。また、Dx-5-FU のスペクトルパターンは、いずれも MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴う特徴的な 9 本線から徐々にブロードな 1 重線へと変化した。F-Dx のスペクトルパターンには大きな変化はなく、強度が処理時間に伴い増大する傾向を示した。

第 2 章で詳述した通り、9 本線スペクトルは、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合において観測されるラジカルであり、2 時間後の Dx-5-FU のスペクトルより MA-5-FU のメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。

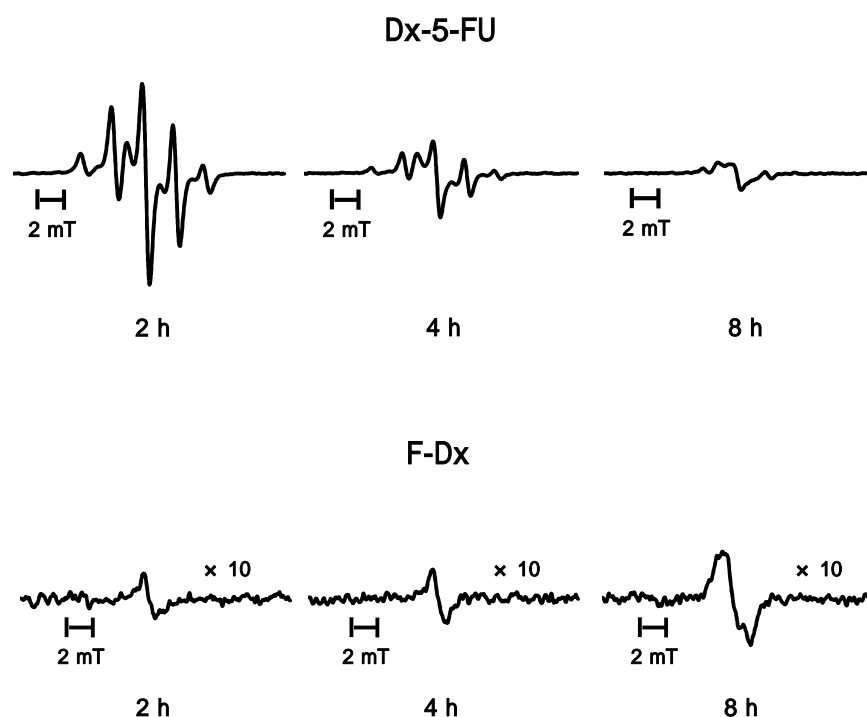


Fig. 4-3 Progressive changes in ESR spectra in the course of vibratory milling of Dx-5-FU and F-Dx.

Gly と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応についても、同様に固相メカノケミカル反応 (Gly-5-FU) ならびに Gly 単独での粉砕 (Fractured Glycogen (F-Gly)) を実施し、各々の反応物と粉砕物を得た。Fig. 4-4 は Gly-5-FU と F-Gly の ESR スペクトルの経時変化を示したものである。Dx の場合と同様に、Gly-5-FU については MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴う特徴的なスペクトルが観測されたことから、反応初期より Gly のメカノリシスに伴う生成メカノラジカルと MA-5-FU との反応が進行していることが示唆された。

Fig. 4-5 に Dx-5-FU と F-Dx のラジカル量の経時変化を示す。いずれの時間においても Dx-5-FU のラジカル量は F-Dx の場合よりも大きな値を示したが、8 時間後以降はほぼ同じ値を示した。また、Dx-5-FU では 2 時間の反応においてラジカル量が最大値を示し、その後定常化する傾向を示した。したがって、HEC の場合と同様に、Dx-5-FU では反応初期に Dx の生成メカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル固相重合が進行することで安定な第 3 級ラジカルが生成し、最大値に達した後は、第 3 級ラジカルによる Dx の水素引き抜き反応が進行することで、結果としてラジカル量の低下が生じたと考えられる。

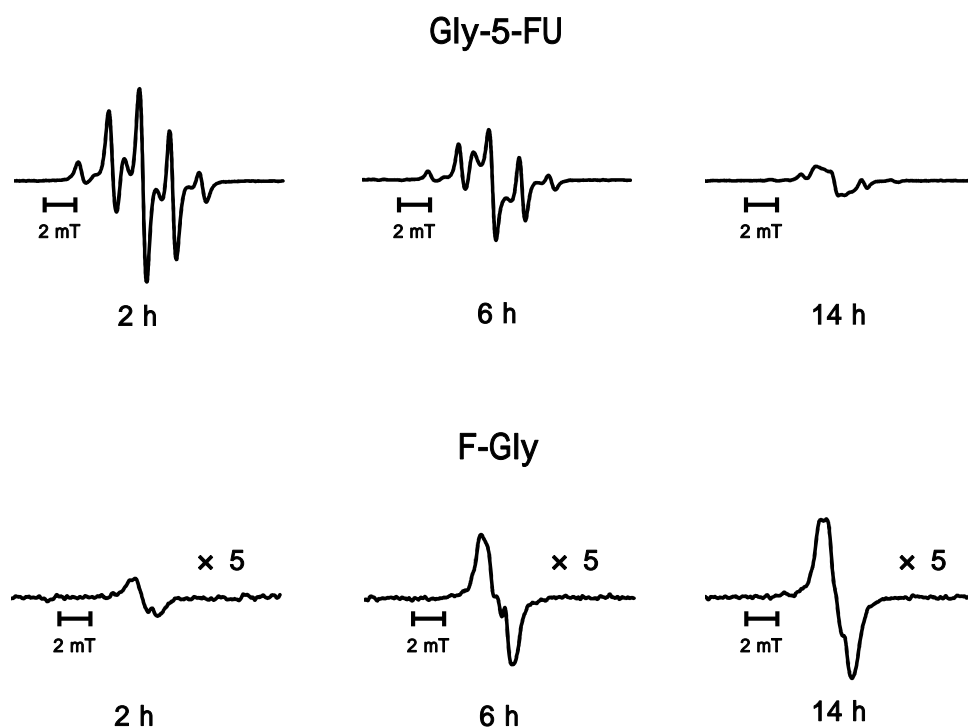


Fig. 4-4 Progressive changes in ESR spectra in the course of vibratory milling of Gly-5-FU and F-Gly.

また、Fig. 4-6 は、Gly-5-FU と F-Gly のラジカル量の経時変化について示したものである。Dx の結果と同様に、Gly-5-FU の経時的なラジカル量は F-Gly の場合よりも大きな値を示し、14 時間後には類似した値を示した。また、ラジカル量の最大値は 2 時間のときであり、その後定常化する傾向を示した。このラジカル量の低下についても、Dx において考察した通りである。

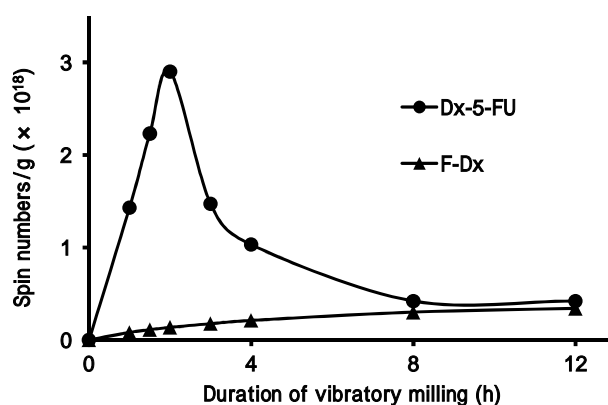


Fig. 4-5 Progressive changes in radical concentration in the course of Dx-5-FU (○) and F-Dx (△).

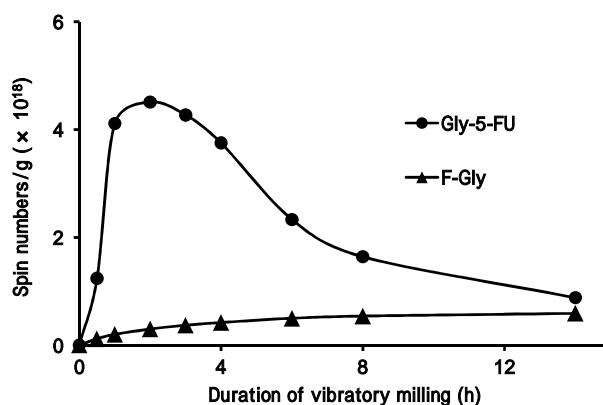


Fig. 4-6 Progressive changes in radical concentration in the course of Gly-5-FU (○) and F-Gly (△).

以上の結果と、第 2 章で詳述した HEC を使用した MA-5-FU との固相メカノケミカル反応 (HEC-5-FU) の場合を比較すると、自由度の高い側鎖官能基を持つ HEC においては、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合が進行した後、第 3 級ラジカルは速やかに HEC の側鎖官能基から水素を引き抜き、それに伴う不安定なラジカルが主に DBS になるものと考えられる。一方、側鎖官能基を持たない Dx や Gly は、高分子内または高分子間における水素結合網を形成しており、さらには自由度の高い側鎖官能基を持たないため、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴い生成したメカノラジカルの水素引き抜き等の逐次反応が遅いと考えられる。したがって、HEC-5-FU の場合は Dx や Gly の場合と比べ、MA-5-FU 由来の 9 本線スペクトルの減少が速やかであり、かつ、ESR スペクトル外形が一重線へと移行していることから支持される。

一方、F-Dx ならびに F-Gly のラジカル量の経時変化では、本実験範囲内においては粉碎時間に伴いラジカル濃度は緩やかに増加し続けた。この結果、本実験条件では瑪瑙製容器ならびに振動周波数が 30 Hz と、第 3 章で使用したステンレス製容器ならびに振動周波数 60 Hz に比べ機械的なエネルギーが小さいことから、Dx ならびに Gly の主鎖切断とその後の水素引き抜き反応や再結合反応といった逐次反応が、共に緩やかに進行するため、60 Hz の粉碎時におけるラジカル濃度の上昇後に低下する挙動が 30 Hz の粉碎時には見られなかったと考えられる。また、30 Hz の粉碎時には、本章では実施していない 14 時間以上の粉碎により、ラジカル量が低下する可能性があると考えられる。

第 3 節 分子量と粒子径の経時変化

メカノラジカルは高分子主鎖の切断に伴い生成することから、メカノリシスによるラジカル量は高分子の分子量と密接な関係にあると考えられる。Fig. 4-7 は、Dx-5-FU と F-Dx の数平均分子量の経時変化について示したものである。

Dx-5-FU と F-Dx の数平均分子量の経時変化は、互いに類似していることが Fig. 4-7 から明らかであり、Dx-5-FU と F-Dx について、実際のメカノラジカルの生成量が同程度であることが示唆された。したがって、Fig. 4-5 に示した両者のラジカル量の経時変化の差異は、各々の生成メカノラジカルの熱的およびメカノケミカル的な安定性に起因すると考えられる。Dx-5-FU において、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴う生成メカノラジカルは、熱的に安定な第 3 級ラジカルであるため、室温の ESR の測定により容易に観測される。一方、F-Dx では、第 3 章にて明らかにした通り、熱的安定性に劣る第 2 級ラジカルであるため、その後の Dx の水素引き抜き反応や再結合反応等により消失しやすいと考えられる。

12 時間後の Dx-5-FU における生成高分子は、数平均分子量ならびに多分散度が、各々 23,400 g/mol, 5.62 であった。また、12 時間後の F-Dx は、各々 23,100 g/mol, 5.47 であった。このことから、生成高分子は分子量分布がやや広いことが示されたが、生体内への投与を考慮すると、最低限の分子量（数万以上）が

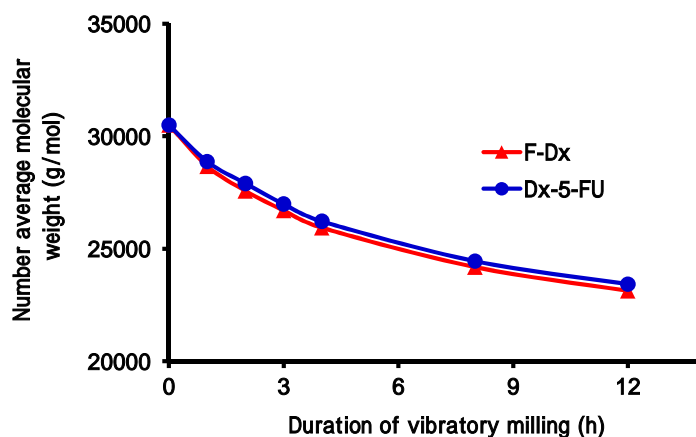


Fig. 4-7 Progressive changes in number average molecular weight (Mn) in the course of Dx-5-FU () and F-Dx ().

確保されていなければ、目的とするがん組織への到達前に腎排泄を受けることが懸念されるため、本章では粉碎による分子量分布の制御は行わないこととした。

また、第 3 章の第 5 節で詳述した通り、Gly は架橋性高分子であることから、直鎖状高分子のように分子量という概念は適さないため、Gly の粒子径変化について検討した。

Fig. 4-8 は、Gly-5-FU ならびに F-Gly の粒子径の経時変化について示したものである。経時的な粉碎により、両者は類似した粒子径の低下を示したことから、類似したメカニズムで Gly の機械的な切断が生じていることが示唆された。また、14 時間後の Gly-5-FU ならびに F-Gly の生成高分子は、ともに 20 nm の微粒子であることが明らかとなった。

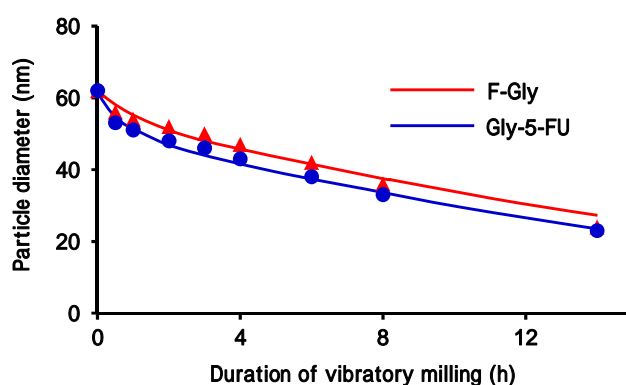


Fig. 4-8 Progressive changes in particle diameter of Gly-5-FU () and F-Gly () in the course of vibratory milling.

第 4 節

固相メカノケミカル反応の反応特性

Fig. 4-9 は、Dx-5-FU ならびに Gly-5-FU のモノマー消失率の経時変化について示したものである。モノマー消失率は、 $^1\text{H-NMR}$ を測定することで、Dx-5-FU ならびに Gly-5-FU 中の MA-5-FU のオレフィンピークの積分値の減少率から算出した。

モノマーの消失速度は、指数関数的な挙動を示すことが明らかとなった (Fig. 4-9)。MA-5-FU 7.5 mg (モノマー量として 6 mol %) における Dx-5-FU では、モノマー消失率は 2 時間で 88% まで進行し、8 時間でモノマーは完全に消失した。また、MA-5-FU 3.8 mg (モノマー量として 3 mol %) における Dx-5-FU についても調べると、両者のモノマー消失率の経時変化には有意な違いは認められなかった。

一方、Gly-5-FU については、Dx-5-FU よりもさらに速いモノマー消失が見られ、6 時間で固体モノマーは完全に消費された。これは、Fig. 4-5, 4-6 から明らかのように、Gly は Dx に比べメカノリシス過程においてより多くのメカノラジカルを生成することから、よりモノマーとの反応が進行するためと考えられる。

ところで、MA-5-FU は高分子の主鎖切断に伴うメカノラジカルと反応することで、熱的に安定な第 3 級ラジカルを生成し、容易に ESR にて観測されることから、MA-5-FU の消失率の経時変化はラジカル量変化と密接な関係にあると

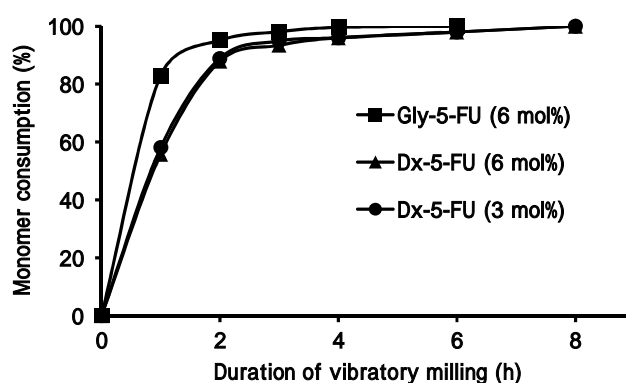


Fig. 4-9 Progressive changes in monomer consumption in the course of Gly-5-FU (6 mol%) (■) Dx-5-FU (6 mol%) (▲) and Dx-5-FU (3 mol%) (●).

考えられる。すなわち、Fig. 4-9 において、Dx-5-FU 中の MA-5-FU は 8 時間後までに消失しているために、それ以降は生成した第 3 級ラジカルによる水素引き抜き反応を中心とした逐次反応が優先的に進行し、結果的にラジカルが消失していくと考えられることから、ラジカル量は 8 時間後以降 F-Dx の値に近づくことを意味する。そこで、実際に Fig. 4-5 を見てみると、前述の通り Dx-5-FU のラジカル量は F-Dx と類似していることから、固相メカノケミカル反応におけるモノマー消失率とラジカル量との間に密接な関係があることが解る。

なお、Gly-5-FU のラジカル量については、モノマーが完全消費した 6 時間後以降も F-Gly のラジカル量と明確な差があるが、これは第 3 章の第 3 節で詳述した通り、Gly の経時的な粉砕による DBS の安定化に基づくと考えられる。しかしながら、14 時間の粉砕により両者のラジカル量は同程度であることから、Gly-5-FU 中に生成する第 3 級ラジカルは最終的に消失すると考えられる。

第 5 節

高分子プロドラッグの薬物放出特性

Fig. 4-10 は、Dx-5-FU (3 ~ 5 mol %) の 8 時間の反応により得られた高分子プロドラッグからの薬物放出試験の結果を示したものである。薬物放出試験は、pH 7.4、 37 ± 0.5 °C のリン酸緩衝液中にてパドル法を用いて実施し、放出された 5-FU 量は、265 nm の UV 吸収により評価した。

また、Table 4-1 は各々の高分子プロドラッグの数平均分子量と多分散度、ならびに加水分解速度定数について示したものである。薬物放出挙動は、いずれも 1 次反応速度式に良好に従い ($r = 0.9983 \sim 0.9991$)、12 時間で 100% の薬物放出が認められた。Table 4-1 から明らかなように、本実験で使用したモノマー量 (3 ~ 5 mol %) からなる高分子プロドラッグでは、薬物放出に顕著な差は認められなかった。なお、モノマー量 6 mol % 以上からなる高分子プロドラッグは、実施した薬物放出試験の条件下では、完全に水に溶解しなかった。

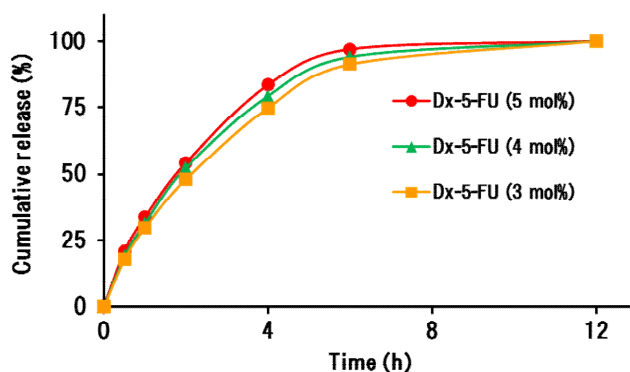


Fig. 4-10 Nature of drug release from the resulting polymeric prodrugs of Dx-5-FU.

Table 4-1 Number Average Molecular Weight, Polydispersity, and Hydrolysis Rate Constant of Dx-5-FU.

	Mn (g/mol)	Mw/Mn	Hydrolysis rate constant ($\times 10^{-1}$) (h^{-1})
Dx-5-FU (5 mol%) (8 h)	24000	5.1	4.31
Dx-5-FU (4 mol%) (8 h)	24000	5.1	3.94
Dx-5-FU (3 mol%) (8 h)	23300	5.2	3.53

Fig. 4-11 は Gly-5-FU (1 ~ 1.5 mol %) の 6 時間の反応により得られた高分子プロドラッグからの薬物放出試験の結果を示したものである。また、Table 4-2 は各々の高分子プロドラッグの粒子径ならびに加水分解速度定数を示したものである。Gly を用いた高分子プロドラッグは、5 時間までは 1 次反応速度式に従った薬物放出 ($r = 0.9996 \sim 0.9997$) を示したが、それ以降は薬物放出速度が緩やかとなり、Fig. 4-11 の点線に示すような 1 次反応速度式からは大きく離れる結果となった。その理由としては、Gly は架橋性高分子であるため Gly 表面近傍にある合成高分子鎖は、Dx の場合と同様に 1 次反応速度式に従い加水分解が進行するが、Gly 粒子内部にある合成高分子鎖では、水分子のアクセシビリティが低下することで、5 時間以降の薬物放出速度が緩やかになったものと考えられる。なお、モノマー量 2 mol % 以上からなる高分子プロドラッグは、実施した薬物放出試験の条件下では、完全に水に溶解しなかった。

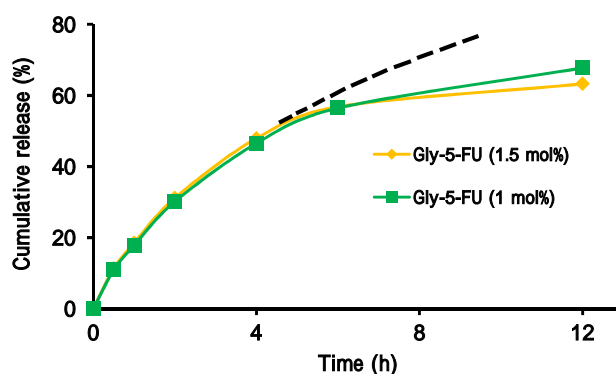


Fig. 4-11 Nature of drug release from the resulting polymeric prodrugs of Gly-5-FU.

Table 4-2 Particle Diameter and Hydrolysis Rate Constant of Gly-5-FU.

	Particle diameter (nm)	Hydrolysis rate constant ($\times 10^{-1}$) (h^{-1})
Gly-5-FU (1.5 mol%) (6 h)	39	3.4
Gly-5-FU (1 mol%) (6 h)	39	2.84

第 6 節 小 括

本章では、生分解性を持つ高分子プロドラッグの構築に向け、モデル多糖として Dx ならびに Gly を用い、Dx または Gly と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応により、生分解性を持つ多糖と合成高分子からなる新規なハイブリッドタイプの高分子プロドラッグの構築に関する検討を行った。本研究により得られた知見は、以下の通りである。

Dx と MA-5-FU (3 ~ 6 mol %) からなる新規な高分子プロドラッグを、瑪瑙製容器ならびに瑪瑙製ボールによる固相メカノケミカル反応 (振動周波数 30 Hz) により合成した。2 時間粉碎後の ESR スペクトルにおいて、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合において観測される ESR スペクトルパターンが観測されたことより、Dx のメカノリシスにより生成したメカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。また、ラジカル量の経時変化の検討より、F-Dx よりも Dx-5-FU の方がより多くのラジカルが観測され、かつ分子量の経時変化ではほぼ同じ挙動であったことから、第 2 章で詳述した HEC の場合と同様に、両者のラジカル量変化の差異は生成するラジカルの安定性に起因していることが示唆された。MA-5-FU の重合は、いずれのモノマー量においても定量的に進行し、8 時間で固体モノマーが完全に消失した。また、Dx-5-FU のモノマー量の違いによる反応性の差異は本実験範囲内では有意差は認められなかった。また、Dx-5-FU において 8 時間の反応により得られた異なるモノマー量 (3 ~ 5 mol %) の高分子プロドラッグは、いずれも数平均分子量が 23,000 g/mol、多分散度が 5.0 程度の物性を示し、加水分解速度定数もまた類似しており、1 次反応速度式に従った薬物放出が見られた。

また、Gly についても同様に、MA-5-FU との固相メカノケミカル反応を実施し、多分岐鎖を持つ新規な高分子プロドラッグを合成した。ESR スペクトルならびにラジカル量の経時変化については、いずれも Dx の場合と比べ高い強度および値を示しており、Gly が Dx に比べメカノリシスにより、より多くのメカノラジカルを生成することが明らかとなった。したがって、モノマーの消失速度についても、Dx の場合よりも固体モノマーの消失が速く、6 時間で固体モノマーは完全に消失した。また、Gly-5-FU において 6 時間の反応により得られた異なるモノマー量 (1 ~ 1.5 mol %) の高分子プロドラッグは、いずれも粒子径が 40 nm 程度であり、薬物放出試験では 5 時間までは 1 次反応速度式に従った薬物放出を示したが、その後の薬物放出速度は 1 次反応速度式よりも遅くなり、多分岐鎖を持つ Gly の粒子内部に存在する合成高分子鎖への水分子のアクセスビリティの低下が示唆された。

本研究は、生分解性を持つ多糖と、薬物を担持させた合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグが、固相メカノケミカル反応により完全ドライプロセスにて簡便に合成可能であることを示しており、生分解性のある高分子プロドラッグの構築法として大変有用であると考えられる。

第 5 章 総 括

一般に、高分子のメカノリシスより生成するメカノラジカルは、化学的に不安定な状態にあり種々の反応を惹起するが、その物理化学的特性を十分理解することにより、物質創製の立役者になりうる大変有用な活性化学種として利用できる。事実、著者の研究グループでは、かねてより多糖類や合成高分子といった各種高分子のメカノリシスにより生成するメカノラジカルの詳細かつ系統的な ESR スペクトル解析を世界に先駆けて報告してきている。さらに、その基礎的知見を基に、合成高分子のメカノリシスにより生成するメカノラジカルとビニルモノマーとの固相メカノケミカル反応により、ブロック共重合体の理論的設計を含む高分子プロドラッグの応用研究を展開してきている。一方、生分解性を持つ多糖に合成高分子をグラフト化したグラフト共重合体は、多糖の側鎖に疎水部を複数導入できることから、その機能性に近年注目が集まっている。しかしながら、既存の縮合反応やラジカル重合を利用した多糖の主鎖に合成高分子を直接または重合開始部となる官能基を導入しグラフト化する方法では、いずれも液相反応であるため溶媒の分離・精製が必要である。さらに、著者の知る限り、多糖に合成高分子をグラフト化したグラフト共重合体のうち、高分子プロドラッグとして利用されているものは未だ報告がない。

かかる背景より、著者は、これまでの一連の研究により室温におけるメカノリシスによるメカノラジカルの生成特性が明らかとなっているセルロース誘導体を利用した、医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応を実施し、本反応の反応特性や生成高分子の物理化学的特性、薬物放出特性について検討を行った。さらに、薬物担体としての使命を果たした後、体内に蓄積することなく消失する生分解性を持つ高分子プロドラッグを構築するため、現在臨床にて代用血漿として使用される、 α -1,6-グリコシド結合を主鎖に持つデキストラン (Dx) と、動物の貯蔵多糖として知られる α -1,4-ならびに α -1,6-グリコシド結合の多分岐鎖を持つグリコーゲン (Gly) を選択し、各々の室温におけるメカノリシスにより生成するメカノラジカルの構造やその反応特性について検討を行った。また、生分解性を持つ多糖の生成メカノラジカルを利用した新しい医薬学的応用として、Dx または Gly と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応を実施し、生分解性を持つ多糖と薬物を担持させた合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグの構築について検討を行った。以下に本研究により得られた知見を要約する。

1. セルロース誘導体と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応を利用した新規高分子医薬の開発

既報のセルロース誘導体のメカノリシスに関する知見を基に、モデル多糖としてヒドロキシエチルセルロース (HEC) のメカノラジカル反応性を利用し、医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応を実施し、その反応特性や生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性について検討した。

HEC と MA-5-FU からなる新規な高分子プロドラッグを、瑪瑙製容器ならびに瑪瑙製ボールを利用した固相メカノケミカル反応 (振動周波数 30 Hz) により合成した。反応初期の ESR スペクトルにおいて、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合により観測される ESR スペクトルと同様のスペクトルが観測されたことから、HEC のメカノリシスにより生成したメカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。また、ラジカル量の経時変化の検討より、HEC 単独の粉碎物に比べ反応物では多くのラジカルが観測され、両者の分子量の経時変化における挙動は類似していたことから、両者の ESR の強度ならびにラジカル量の差は、メカノラジカルの安定性に起因していることが明らかとなった。そして、MA-5-FU の重合は定量的に進行し、14 時間で医薬品モノマーは完全に消失した。さらに、14 時間の生成高分子に更に強い機械的エネルギー (振動周波数 60 Hz、ステンレス製容器ならびにステンレス製ボールを用いた粉碎を実施) を加えることにより、HEC と MA-5-FU のグラフト共重合体中の HEC 部位が、選択的に切断を受けることが示唆された。14 時間の生成高分子の数平均分子量 (M_n) ならびに多分散度 ($H = M_w/M_n$) は、 M_n : 30,000 g/mol, H : 4.70 であり、60 Hz の粉碎を 60 分間実施することで M_n : 12,000 g/mol, H : 1.74 まで低下したことから、粉碎により本高分子プロドラッグの分子量分布の制御が可能であることが示された。本高分子プロドラッグの薬物放出試験では、分子量分布の異なる 2 種の高分子プロドラッグの加水分解速度定数は類似しており、本実験範囲内においては、加水分解速度定数は高分子プロドラッグの分子量や多分散度の影響を受けないことを明らかにした。

以上、セルロース誘導体に生成するメカノラジカルを利用した医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応の反応特性および生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性について明らかにした。かかる知見は、固相メカノケミカル反応を利用した、多糖と合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグの構築における基礎的知見として大変有用であると考えられる。

2. デキストラン (Dx) とグリコーゲン (Gly) に生成するメカノラジカルの構造とその反応特性

多糖類のうち、 α -グルカンの 1 つであり α -1,6-グリコシド結合の直鎖構造を持つ Dx は、生体内にて緩やかに加水分解を受けやすく、さらに生体に無毒性であることから、その薬物キャリアに関する幅広い研究が行われてきている。これまでに著者の研究グループにおいて、室温におけるメカノリシスにより生成するメカノラジカルの構造とその反応特性について解明されている α -1, 4-グリコシド結合の直鎖構造を持つアミロースの知見を基に、Dx ならびに α -1, 4-グリコシド結合と α -1,6-グリコシド結合の多分岐鎖からなる Gly の室温におけるメカノリシスを実施した。さらに ESR スペクトル解析を用いた Dx および Gly に生成するメカノラジカルの構造とその反応特性について検討を行った。

Dx および Gly の室温におけるメカノリシスを実施したところ、観測された ESR スペクトルは、化合物により差異が認められた。Dx および Gly のメカノラジカルのコンピューターシミュレーションによる ESR スペクトル解析の結果、両者のメカノラジカルの構成ラジカルはアミロースの構成ラジカルと一致しており、その比率を変えることにより再現可能であることが明らかとなった。さらに、Dx および Gly においては、分岐部位の存在によりメカノケミカル的に不安定なラジカルが多く生成し、アミロースと比較し、失活反応が優位に進行することが示唆された。また、Gly にて生成するメカノラジカルの転移反応等により生じた DBS は、Gly の多分岐鎖に基づく架橋構造により安定化されることが示唆された。さらにラジカル量の経時変化の検討より、Dx においては 60 分間、Gly では 30 分間の粉碎時に総ラジカル量が極大値を示した後、メカノラジカルの失活反応の進行により総ラジカル量が減少する挙動は、両者の分子重量変化または粒子径変化と、よく対応していることが示唆された。

以上、Dx と Gly のメカノリシスによる生成メカノラジカルの構造とそのメカノケミカル反応特性について明らかにした。かかる知見は、生分解性のある多糖から生成するメカノラジカルの反応を利用した、新規な高分子医薬構築のための有益な設計指針となるものである。生分解性を持つ多糖の粉碎により生成するメカノラジカルの反応を利用した完全ドライプロセスでの高分子医薬の合成は、著者の知る限りこれまでに報告はなく、薬学的にも大変興味深いものと言える。

3. デキストランまたはグリコーゲンと医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応による新規高分子医薬の開発

上述の知見を基に、メカノラジカルの生成特性について明らかにした Dx と Gly を用い、医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応による新規な高分子医薬の合成および、生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性について検討を行った。

まず、Dx と MA-5-FU (3 ~ 6 mol %) からなる新規な高分子プロドラッグを、瑪瑙製容器ならびに瑪瑙製ボールを利用した固相メカノケミカル反応 (振動周波数 30 Hz) により合成した。2 時間の反応における ESR スペクトルにおいて、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴い観測される ESR スペクトルと同様のスペクトルが観測されたことより、Dx のメカノリシスにより生成したメカノラジカルと MA-5-FU とのメカノケミカル固相重合の進行が示唆された。また、ラジカル量の経時変化の検討より、Dx 単独の粉碎物よりも反応物の方がより多くのラジカルが観測されたことから、第 2 章で詳述した HEC の場合と同様に、生成するラジカルの安定性に起因していることが示唆された。MA-5-FU の重合は、いずれのモノマー量においても定量的に進行し、8 時間で医薬品モノマーは完全に消失した。また、8 時間の反応により得られた異なるモノマー量の高分子プロドラッグは、数平均分子量や多分散度だけでなく加水分解速度定数についても類似していることが明らかとなった。

また、Gly についても同様に、MA-5-FU との固相メカノケミカル反応を実施し、多分岐鎖を持つ新規な高分子プロドラッグを合成した。ESR スペクトルならびにラジカル量の経時変化については、いずれも Dx の場合と比べ高い強度および値を示しており、Gly が Dx に比べメカノリシスにより、より多くのメカノラジカルを生成することが明らかとなった。したがって、モノマーの消失速度についても、Dx の場合よりも医薬品モノマーの消失が速く、6 時間で固体モノマーは完全に消失した。しかしながら、ラジカル量とモノマー消失率は密接な関係があるにも関わらず、Dx と Gly の反応物におけるラジカル量は、HEC の反応物のラジカル量の経時変化における挙動とは異なり、大半のモノマーの消失後も緩やかな減少を示し、最終的に各々の単独の粉碎物と同様の値を示した。このような結果は、Dx と Gly が高分子内または高分子間における水素結合網を形成していることに加え、自由度の高い側鎖官能基を持たないため、MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴い生成したメカノラジカルの失活反応が、自由度の高い側鎖官能基を持つ HEC の反応物と比べ遅くなっていることに基づくことが明らかとなった。したがって、反応物中の MA-5-FU のメカノケミカル固相重合に伴い生成する第 3 級ラジカルは、多糖類のピラノース環上の水素結合に参与している水素原子よりも自由度の高い側鎖官能基の水素原子の引

き抜きの反応性が高く、それに伴い生成する不安定なラジカルが DBS の形成に働くと考えられる。

また、Gly と MA-5-FU との 6 時間の固相メカノケミカル反応により得られた異なるモノマー量 (1 ~ 1.5 mol %) の高分子プロドラッグは、いずれも粒子径が 40 nm 程度の微粒子であり、薬物放出試験では 5 時間までは 1 次反応速度式に従った薬物放出を示したが、その後の薬物放出速度は 1 次反応速度よりも遅くなることから、多分岐鎖を持つ Gly の粒子内部に存在する合成高分子鎖への水分子のアクセシビリティが低下していることが示唆された。

以上、Dx または Gly と医薬品モノマーとの固相メカノケミカル反応により、生分解性を持つ多糖と合成高分子からなる新規な高分子プロドラッグの合成法を確立するとともに、生成高分子の物理化学的特性ならびに薬物放出特性についても明らかにした。近年、ナノ物質を薬物キャリアとして用いるナノ DDS 医薬品に関する研究、実用化は目覚ましい発展を遂げており、様々な薬物キャリアの開発やその製剤化プロセスが報告されているが、高分子医薬の合成法は未だ溶液中での反応がメインであり、反応後の後処理が必須である。しかしながら、本研究は、完全ドライプロセスである固相メカノケミカル反応により、生分解性を持つ多糖と合成高分子からなる高分子プロドラッグを簡便に合成可能であることから、生分解性のある高分子医薬の構築法として大変有用であると考えられる。

謝 辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学薬物送達学大講座薬品物理化学研究室 恩師近藤伸一教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、御指導御鞭撻を賜りました岐阜薬科大学医療薬剤学大講座臨床薬剤学研究室 足立哲夫教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の御支援を賜りました中部学院大学人間福祉学部 葛谷昌之教授に深謝致します。

本研究の実施、論文作成に御助言、御助力を賜りました岐阜薬科大学薬品物理化学研究室 笹井泰志准教授に深謝致します。

本研究に関して種々御尽力頂きました松山大学薬品物理化学研究室 山内行玄准教授、岐阜薬科大学薬品物理化学研究室 澤間由香助教、嘱託職員吉田ひふ美氏に感謝致します。

最後に、本研究遂行にあたり、実験の補助等、種々御協力頂きました岐阜薬科大学薬品物理化学研究室内の諸氏に感謝致します。

実験の部

第 2 章に関する実験

2 - 1. 試料

HEC (Tokyo Kasei Co., Ltd.)、Dx (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) は、200 メッシュ通過 235 メッシュ上に残った試料を 70 ℃、10 時間以上減圧乾燥したものを使用した。また、Gly (from Oyster, Nacalai Tesque Co., Ltd.) は、冷蔵保存から室温に戻し、そのまま用いた。

2 - 2. 1-Methacryloyl-oxymethyl-5-fluorouracil (MA-5-FU) の合成

MA-5-FU は以下の方法にて合成し、200 mesh 篩過したものを使用した。

Formaline (1.0 mL) に 5-fluorouracil (500 mg, 3.8 mmol) を加え、70 ℃で 60 分間撹拌した。反応液を減圧留去した後、残渣を蒸留 acetnitrile (50 mL) に溶かし、triethylamine (1.03 mL, 7.4 mmol) を加えた後、氷浴に浸した。その後、acetnitrile (20 mL) に希釈させた methacryloyl chloride (368 μ L, 3.8 mmol) を滴下し、室温で撹拌した。反応液を自然ろ過し、ろ液を減圧留去した後、残渣を chloroform (100 mL) に溶かし、中性になるまで水洗した。その後、chloroform 相に硫酸マグネシウムを入れて乾燥させ、自然ろ過後、ろ液を減圧留去した。そして、残渣を dichloromethane と n-hexane の 1 : 1 の混液より再結晶し白色針状結晶の MA-5-FU (0.61g, 収率 70.0%) が得られた。mp; 116-117 ℃、IR (KBr); 3200 (N-H), 3075 (-CH=CF), 1720 (-OC=O), 1680 cm^{-1} (C=O)、 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6); 1.96 (s, 3H, CH_3), 5.74 (s, 3H, $-\text{CH}_2-$ and $=\text{CH}-$), 6.24 (s, 1H, $=\text{CH}-$), 7.70 (d, $J = 5.5$ Hz, 1H, $-\text{CH}=\text{CF}-$), 9.51 (s, 1H, $-\text{CONH}$)

2 - 3. 固相メカノケミカル反応ならびに生成高分子の粉碎方法 (Fig. I)

窒素雰囲気下での粉碎は、高真空グローブボックス (Samplatec Corp.) 内を高純度窒素で満たし、ガス精製器 (Supelco, Inc.) により残存酸素、水分を除去した無酸素条件下、室温において実施した。グローブボックス内の酸素濃度は酸素分析計 (LC750/PC-120、Toray Engineering Co., Ltd.) によりモニターし、常時 0.01 ppm 以下とした。

固相メカノケミカル反応は、HEC 94.8 mg と MA-5-FU 5.2 mg (モノマー量として 6 mol %) を瑪瑙製容器 (内径 14 mm、長さ 65 mm) 内に瑪瑙製ボール (直径 6 mm、重さ 190 mg) と共に入れ、振動ボールミル粉碎装置 (Type MM 200、Retsch Co., Ltd.) を用い、振動周波数 30 Hz にて実施した。メカノリシス後、反応物はグローブボックス内にて ESR チューブに移し密封後、グローブボックス

内から出し室温にて ESR 測定を行った。また、比較対象として HEC 100 mg についても同様に行った。

さらに、HEC と MA-5-FU の 14 時間の固相メカノケミカル反応による生成高分子 (HEC-5-FU (14 h)) について、一度大気に曝した試料を、室温窒素雰囲気下におけるメカノリシスを実施した。メカノリシスは、HEC-5-FU (14 h) 100 mg をステンレス製カプセル (内径 7.8 mm、長さ 24 mm) 内にステンレス製ボール (直径 6.0 mm、重さ 890 mg) と共に入れ、振動ボールミル粉砕装置 (Shofu Co., Ltd.) を用い、振動周波数 60 Hz にて行った。メカノリシス後、粉砕物はグローブボックス内にて ESR チューブに移し密封後、グローブボックス内から出し、室温にて ESR 測定を行った。

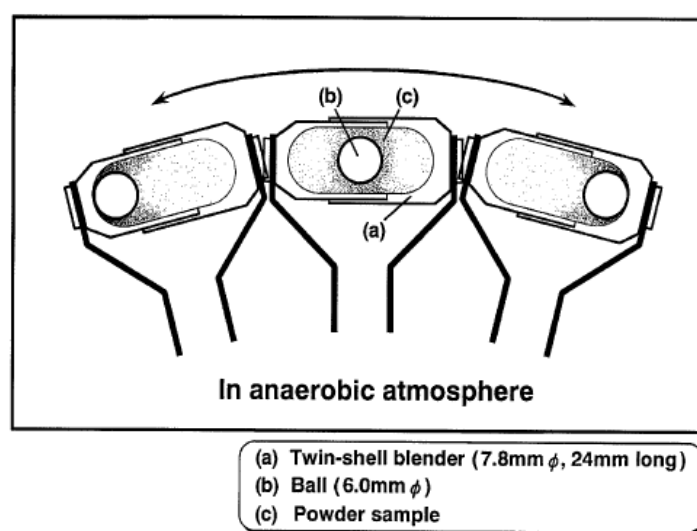


Fig. I Schematic representation for vibratory ball milling.

2 - 4. ^1H -NMR スペクトル

^1H -NMR 測定は、ラジカルをクエンチするため一度大気に曝した試料を Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) に溶解させ、FT-NMR 分光器 (ECA500、JEOL) により測定した。なお、内標準物質としては、Tetramethylsilane (TMS) を用いた。

2 - 5. ESR スペクトル測定法

ESR スペクトル測定は、X バンド、磁場変調 100 kHz にて ESR 分光器 (JES-RE1X、JEOL) により測定した。本論文中、スペクトル図の横軸は磁場強度、縦軸は ESR 信号強度を表す。ESR ではそれぞれの磁場位置での吸収の傾きに比例した信号が得られるため、結果的には一次微分型信号となる。スペクトル強度は、一次微分型のスペクトルの 2 回積分を行い、積分波形の面積より求め、ラジカル濃度 (Spin numbers/g) は、同様に測定した濃度既知の標準物質 (2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) を混和した PMMA) のスペクトル強度より得られた検量線を用いて、スペクトルから算出した。なお、マイクロ波出力は、飽和現象が起こらない範囲でかつ最大出力を満たす条件として 0.01 mW を選択した。

2 - 6. 分子量測定方法

HEC と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応による生成高分子 (HEC-5-FU)、そして HEC の粉碎物 (F-HEC) の分子量は、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) (送液ポンプ ; PU 610 HPLC Pump、示差屈折計 ; RI 504R refractive index detector、カラムオーブン ; Model 556 LC column oven (いずれも GL Sciences, Inc.)) により以下の条件にて測定した。また、校正曲線に標準物質として pullulan (Mp = 5,900, 9,600, 21,100, 47,100, 109,000, 200,000, 344,000, 708,000 g/mol) を用いた。

GPC カラム ; Shodex GF-1G 7B および Shodex GF-7M HQ (共に Showa Denko K. K.)、溶離液 ; 0.05% LiBr 含有 DMSO 溶液、流速 ; 0.4 mL/min、カラム温度 ; 60

2 - 7. 薬物放出試験法

5-FU 10.1 mg を含有した HEC-5-FU (14 h) からの薬物放出試験は、以下の条件下、日本薬局方第 16 改正に準じたパドル法により実施し、所定時間に試験液 5.0 mL をサンプリングし 265 nm における強度から、薬物放出量を測定した。なお、水溶性である HEC-5-FU (14 h) は、pH 7.4 リン酸緩衝液 100 mL に溶解させ透析チューブ (Spectra/Por[®] 1、Spectrum Laboratories, Inc.; molecular weight cut-off 6,000 ~ 8,000 g/mol) に封入後、試験液へと移した。

試験液：pH 7.4 リン酸緩衝液 800 mL

攪拌速度：100 rpm

温度：37 ± 0.5

第 3 章に関する実験

3 - 1. 試料

Dx (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) は、200 メッシュ通過 235 メッシュ上に残った試料を 70 、10 時間以上減圧乾燥したものを使用した。また、Gly (from Oyster, Nacalai Tesque Co., Ltd.) は、冷蔵保存から室温に戻し、そのまま用いた。

3 - 2. メカノリシスの方法

2 - 3 の方法に準じて、Dx または Gly 100 mg を上記と同様の無酸素条件下に調整したグローブボックス内にて、ステンレス製容器 (内径 7.8 mm、長さ 24 mm) 内にステンレス製ボール (直径 6 mm、重さ 890 mg) と共に入れ、振動ボールミル粉碎装置 (Shofu Co., Ltd.) を用い、振動周波数 60 Hz にて経時的に粉碎処理した。その後、上記と同様に ESR スペクトルを測定した。

3 - 3. ESR スペクトル測定法

ESR スペクトル測定は、2 - 5 の方法に準じて、ESR スペクトル測定は、X バンド、磁場変調 100 kHz にて ESR 分光器 (JES-RE1X、JEOL) により測定した。本論文中、スペクトル図の横軸は磁場強度、縦軸は ESR 信号強度を表す。ESR ではそれぞれの磁場位置での吸収の傾きに比例した信号が得られるため、結果的には一次微分型信号となる。スペクトル強度は、一次微分型のスペクトルの 2 回積分を行い、積分波形の面積より求め、ラジカル濃度 (Spin numbers/g) は、同様に測定した濃度既知の標準物質 (2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) を混和した PMMA) のスペクトル強度より得られた検量線を用いて、スペクトルから算出した。なお、マイクロ波出力は、飽和現象が起こらない範囲でかつ最大出力を満たす条件として 0.01 mW を選択した。

3 - 4. ESR スペクトルのシミュレーション

ESR スペクトルのシミュレーションは、JES-RE1X にて測定したスペクトルデータをデジタルデータとし、葛谷らの研究グループにおいて作製されたシミュレーションプログラムを用い DELL Inspiron 545S 型パーソナルコンピュータ

ーを用いて実施した。シミュレーションスペクトルはガウス関数、またはローレンツ関数を発生させ、デジタル化した観測スペクトルと分光学的パラメーター (g 値、半値幅 (HV)、超微細結合定数 (HSC)、相対強度) を必要に応じて g 値や α 水素超微細構造の異方性を考慮して、成分ラジカルの数だけ繰り返し加算して、最終的に非線形最小二乗法により最適化することにより求めた。

3 - 5. 分子量測定方法

Dx の粉碎物の分子量は、2 - 6 の方法に準じて、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) (送液ポンプ ; PU 610 HPLC Pump、示差屈折計 ; RI 504R refractive index detector、カラムオーブン ; Model 556 LC column oven (いずれも GL Sciences, Inc.)) により以下の条件にて測定した。また、校正曲線に標準物質として pullulan (Mp = 5,900, 9,600, 21,100, 47,100, 109,000, 200,000, 344,000, 708,000 g/mol) を用いた。

GPC カラム ; Shodex GF-1G 7B および Shodex GF-7M HQ (共に Showa Denko K. K.)、溶離液 ; 0.05% LiBr 含有 DMSO 溶液、流速 ; 0.4 mL/min、カラム温度 ; 60

3 - 6. 粒子径の測定方法

Gly の粉碎物の粒子径は、動的光散乱 (DLS) (測定装置 ; DLS-5500G、Otsuka Electronics, レーザー ; He/Ne) により測定した。散乱角度は 90° に設定し、流体力学半径について、Stokes-Einstein 式に従い求めた。また、数平均粒子径ならびに重量平均粒子径についても、Marquardt の計算を用いた Histogram 法により決定した。

第 4 章に関する実験

4 - 1. 試料

Dx および Gly は第 3 章と同じく、Dx (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd.) は、200 メッシュ通過 235 メッシュ上に残った試料を 70 、10 時間以上減圧乾燥したものを使用した。また、Gly (from Oyster, Nacalai Tesque Co., Ltd.) は、冷蔵保存から室温に戻し、そのまま用いた。MA-5-FU は第 2 章と同じものを使用した。

4 - 2. 固相メカノケミカル反応法

2 - 3 の方法に準じて、Dx または Gly 92.5 mg と MA-5-FU 7.5 mg (モノマー量として 6 mol %) を瑪瑙製容器 (内径 14 mm、長さ 65 mm) 内に瑪瑙製ボ

ール (直径 6 mm、重さ 190 mg) と共に入れ、振動ボールミル粉碎装置 (Type MM 200、 Retsch Co., Ltd.) を用い、振動周波数 30 Hz にて実施した。メカノリシス後、反応物はグローブボックス内にて ESR チューブに移し密封後、グローブボックス内から出し室温にて ESR 測定を行った。また、比較対象として Dx および Gly 100 mg についても同様に行った。

4 - 3. ^1H -NMR スペクトル

^1H -NMR 測定は、2 - 4 の方法に準じて、 ^1H -NMR 測定は、ラジカルをクエンチするため一度大気に曝した試料を Dimethyl sulfoxide- d_6 (DMSO- d_6) に溶解させ、FT-NMR 分光器 (ECA500、 JEOL) により測定した。なお、内標準物質としては、Tetramethylsilane (TMS) を用いた。

4 - 4. ESR スペクトル測定法

ESR スペクトル測定は、2 - 5 の方法に準じて、ESR スペクトル測定は、X バンド、磁場変調 100 kHz にて ESR 分光器 (JES-RE1X、 JEOL) により測定した。本論文中、スペクトル図の横軸は磁場強度、縦軸は ESR 信号強度を表す。ESR ではそれぞれの磁場位置での吸収の傾きに比例した信号が得られるため、結果的には一次微分型信号となる。スペクトル強度は、一次微分型のスペクトルの 2 回積分を行い、積分波形の面積より求め、ラジカル濃度 (Spin numbers/g) は、同様に測定した濃度既知の標準物質 (2,2-diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) を混和した PMMA) のスペクトル強度より得られた検量線を用いて、スペクトルから算出した。なお、マイクロ波出力は、飽和現象が起こらない範囲でかつ最大出力を満たす条件として 0.01 mW を選択した。

4 - 5. 分子量測定方法

Dx と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応による生成高分子 (Dx-5-FU)、そして Dx の粉碎物 (F-Dx) の分子量は、2 - 6 の方法に準じて、ゲル濾過クロマトグラフィー (GPC) (送液ポンプ; PU 610 HPLC Pump、示差屈折計; RI 504R refractive index detector、カラムオーブン; Model 556 LC column oven (いずれも GL Sciences, Inc.)) により以下の条件にて測定した。また、校正曲線に標準物質として pullulan ($M_p = 5,900, 9,600, 21,100, 47,100, 109,000, 200,000, 344,000, 708,000$ g/mol) を用いた。

GPC カラム; Shodex GF-1G 7B および Shodex GF-7M HQ (共に Showa Denko K. K.)、溶離液; 0.05% LiBr 含有 DMSO 溶液、流速; 0.4 mL/min、カラム温度; 60

4 - 6. 粒子径の測定方法

Gly と MA-5-FU との固相メカノケミカル反応による生成高分子 (Gly-5-FU)、そして Gly の粉碎物 (F-Gly) の粒子径は、3 - 6 の方法に準じて、動的光散乱 (DLS) (測定装置; DLS-5500G、Otsuka Electronics, レーザー; He/Ne) により測定した。散乱角度は 90 ° に設定し、流体力学半径について、Stokes-Einstein 式に従い求めた。また、数平均粒子径ならびに重量平均粒子径についても、Marquardt の計算を用いた Histogram 法により決定した。

4 - 7. 薬物放出試験法

5-FU 10.1 mg を含有した Dx-5-FU (8 h) および Gly-5-FU (6 h) からの薬物放出試験は、2 - 7 の方法に準じて、以下の条件下、日本薬局方第 16 改正に準じたパドル法により実施し、所定時間に試験液 5.0 mL をサンプリングし 265 nm における強度から、薬物放出量を測定した。なお、水溶性である Dx-5-FU (8 h) および Gly-5-FU (6 h) は、pH 7.4 リン酸緩衝液 100 mL に溶解させ透析チューブ (Spectra/Por® 4、Spectrum Laboratories, Inc.; molecular weight cut-off 12,000 ~ 14,000 g/mol) に封入後、試験液へと移した。

試験液：pH 7.4 リン酸緩衝液 800 mL

攪拌速度：100 rpm

温度：37 ± 0.5

引用文献

- 1) 竹本喜一, 砂本順三, 明石 満・編: 高分子と医療. 三田出版会, (1989)
- 2) Bundgaard H., ed. : Design of prodrugs., Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, (1985)
- 3) Scheler W., Synthetic polymers in biology and medicine. , *Macromol., Chem. Macromol. Symp.*, **12**, 1-34 (1987)
- 4) Kalal J., Synthetic polymers today and in the future of pharmacy. *Macromol., Chem. Macromol. Symp.*, **12**, 259-279 (1987)
- 5) Joshi H. N., Recent advances in drug delivery systems, Polymeric prodrugs. *Pharm. Technol.*, **12**, 118, 120-130 (1988)
- 6) Pierre T. S., Chiellini E., Biodegradability of synthetic polymers used for medical and pharmaceutical applications, Part 1, Principles of hydrolysis mechanisms., *J. Bioact. Compat. Polym.*, **1**, 467-497 (1986)
- 7) 杉山一男: 高分子とくすり. 近畿大学工学部研究報告 17, 193-223 (1983)
- 8) Ringsdorf H., *J. Polym. Sci. Polym. Sympo.*, **51**, 135-153 (1975)
- 9) Matsumura Y., et al, *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986)
- 10) Putnam D., et al, *Adv. Polym. Sci.*, **122**, 55-123 (1995)
- 11) Gabizon A., et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 6949-6953 (1988)
- 12) Yokoyama M., et al, *Cancer Res.*, **50**, 1693-1700 (1990)
- 13) Kataoka K., et al, *J. Control Release*, **24**, 119-132 (1993)
- 14) Gaffet et al E., *J. Less-Common Metals*, **157**, 201-222 (1990)
- 15) Sun L. et al, *Appl. Phys. Lett.*, Vol. 76, **20**, 2874-2876 (2000)
- 16) Kieran J. C. et al, *J. Pharm. Sci.*, Vol. 91, **21**, 492-507 (2002)
- 17) Varghese S. et al, *Solid State Communications*, **125**, 111-115 (2003)
- 18) Haward R. N., In Amorphous Materials, Papers of the International Conference on Physics and Non-Crystalline solids, 3rd ed., Douglas R. W., Ellis G., Eds, *J. Wiley*, London, 513-521 (1972)
- 19) Kuzuya M., Kondo S., Noguchi A., *Macromolecules*, **24**, 4047-4053 (1991)
- 20) Kuzuya M., Kondo S., Noguchi A., Noda N., *J. Polym. Sci. B*, **30**, 97-103 (1992)
- 21) Kuzuya M., Yamauchi Y., Kondo S., *J. Phys. Chem. B*, **103**, 8051-8059 (1999)
- 22) Sasai Y., Yamauchi Y., Kondo S., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **52** (3), 339-344 (2004)
- 23) Kuzuya M., Kondo S., *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 3018-3022 (1991)
- 24) Kuzuya M., Kondo S., Murase K., *J. Phys. Chem.*, **97**, 7800-7802 (1993)
- 25) Kondo S., Kuzuya M., *DDS*, **9**, 315-323 (1994)

- 26) Kondo S., Murase K., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 768-773 (1994)
- 27) Kondo S., Hosaka S., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 669-673 (1994)
- 28) Kondo S., Kuzuya M., *Curr. Trends Polym. Sci.*, **3**, 1-23 (1998)
- 29) Kondo S., Hosaka S., Hatakeyama I., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **46**, 1918-1923 (1998)
- 30) Kondo S., Hatakeyama I., Hosaka S., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 1882-1885 (2000)
- 31) Kondo S., *Yakugaku Zasshi*, **120**, 1337-1346 (2000)
- 32) Kondo S., Sasai Y., Kuzuya M., Furukawa S., *Chem. Pharm. Bull.*, **50**, 1434-1438 (2002)
- 33) Kondo S., Sasai Y., Hosaka S., Ishikawa T., Kuzuya M., *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **42**, 4161-4167 (2004)
- 34) Kondo S., Shichijyou D., Sasai Y., Yamauchi Y., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **53**, 863-865 (2005)
- 35) Kondo S., Mori H., Sasai Y., Kuzuya M., *Chem. Pharm. Bull.*, **55**, 389-392 (2007)
- 36) Hamidi M., Azadi A., Rafiei P., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 1638-1649 (2008)
- 37) van Dijk-Wolthuis W. N. E., Hoogeboom J. A. M., van Steenberg M. J., Tsang S. K. Y., Hennink W. E., *Macromol.*, **30**, 4639-4645 (1997)
- 38) Dhaneshwar S. S., Kandpal M., Gairola N., Kadam S. S., *Indian J. Pharm. Sci.*, **68**, 705-714 (2006)
- 39) Mahdavinia G. R., Zohuriaan-Mehr M. J., Pourjavani A., *Polym. Adv. Tech.*, **15**, 173-180 (2004)
- 40) Zohuriaan-Mehr M. J., *Iranian J. Polym.*, **14**, 235-265 (2005)
- 41) Maiti S., Ranjit S., Sa B., *Int. J. Pharm. Tech. Res.*, **2**, 1350-1358 (2010)
- 42) Johansen M., Bundgaard H., Falch E., *Int. J. Pharm.*, **13**, 89-98 (1982)
- 43) Buur A., Bundgaard H., Falch E., *Int. J. Pharm.*, **24**, 43-60 (1985)
- 44) Takakura Y., Hashida M., Macromolecular carrier systems for targeted drug delivery, pharmacokinetic considerations on biodistributions., *Pharm. Res.*, **13**, 820-831 (1996)
- 45) 森島洋太郎：日本油化学会誌, **45**, 935 (1996)
- 46) Dimler R. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 6568 (1955)
- 47) Rankin J. C., Jeanes A., *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 4435 (1954)
- 48) VanCleve J. W. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4435 (1956)
- 49) Mohit S. V., Frank X. G., 1,3-β-Glucans : Drug Delivery and Pharmacology, *The Complex World of Polysaccharides*, **21**, 555-572 (2012)

- 50) Sarkar A., Perez S., A Database of Polysachharide 3D strutures, France,
http://polysac3db.cermav.cnrs.fr/discover_dextran.html
- 51) Guizard C., Chanzy H., Sarko A., The molecular and crystal structure of dextrans: a combined electron and X-ray diffraction study. II. A low temperature, hydrated polymorph., *J. Mol. Biol.*, **183**(3), 397-408 (1985)
- 52) Kuzuya M., Noda N., Kondo S., Washino K., Noguchi A., *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6505 (1992)
- 53) Harrington R. E., Zimm B. H., *J. Phys. Chem.*, **69**, 161-175 (1965)
- 54) Kanamura K., *Kolloid-Z. Z. Polym.*, **209**, 151-162 (1966)
- 55) A. Rolland-Sabate, M. G. Mendez-Montealvo, P. Colonna, V. Planchot, *Biomacromolecules*, **9**, 1719-1730 (2008)

略語表

DBS:	Dangling bond sites
DDS:	Drug delivery system
DLS:	Dynamic light scattering
DMSO:	Dimethyl sulfoxide
DPPH:	Diphenylpicrylhydrazyl
Dx:	Dextran
Dx-5-FU:	Mechanochemical solid-state copolymerization of Dx and MA-5-FU
EPR:	Enhanced permeation and retention
ESR:	Electron spin resonance
F-Dx:	Fractured Dx
F-Gly:	Fractured Gly
F-HEC:	Fractured HEC
5-FU:	5-Fluorouracil
Gly:	Glycogen
Gly-5-FU:	Mechanochemical solid-state copolymerization of Gly and MA-5-FU
GPC:	Gel permeation chromatography
H:	Polydispersity
HEC:	Hydroxyethylcellulose
HEC-5-FU:	Mechanochemical solid-state copolymerization of HEC and MA-5-FU
k_H :	Hydrolysis rate constant
L-(HEC-5-FU):	HEC-5-FU (14 h) possessing lower molecular weight
MA-5-FU:	1-Methacryloyl-oxymethyl-5-fluorouracil
Mn:	Number average molecular weight
Mw:	Weight average molecular weight
$^1\text{H-NMR}$:	Proton nuclear magnetic resonance
PEG:	Polyethylene glycol
PMMA:	Polymethyl methacrylate
R_H :	Hydrodynamic radius
SSET:	Solid-state single electron transfer
TMS:	Tetramethylsilane
Tg:	Glass Transition temperature