

機能性高分子を用いたアムホテリシン B の  
ナノ製剤化に関する研究

2023 年 3 月

番匠谷 研吾



## 目次

第1章 緒論	1
第2章 本論	
第1節 疎水化ヒアルロン酸からなるアムホテリシンB ナノヒドロゲル製剤	
2-1-1 序論	4
2-1-2 試薬	5
2-1-3 実験	6
2-1-4 結果	9
2-1-5 考察	14
第2節 スチレン-マレイン酸コポリマー結合型アムホテリシンB 製剤	
2-2-1 序論	16
2-2-2 試薬	17
2-2-3 実験	17
2-2-4 結果	23
2-2-5 考察	30
第3節 コレステロール修飾スチレン-マレイン酸コポリマーを用いたアムホテリシンB 搭載ナノ製剤	
2-3-1 序論	32
2-3-2 試薬	33
2-3-3 実験	33
2-3-4 結果	38
2-3-5 考察	47
第3章 総括	49
引用文献	50
謝辞	56
論文目録	57

## 略語一覽

AHA	C12-13 alkyl glyceryl hyaluronic acid
AmB	amphotericin B
BSA	bovine serum albumin
Cho	cholesterol
CMC	critical micelle concentrations
DDS	drug delivery system
DLS	dynamic light scattering
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's nutrient mixture F-12
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	dimethyl sulfoxide
DSC	differential scanning calorimetry
EDA	ethylenediamine
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate isomer-I
GPC	gel permeation chromatography
HA	hyaluronic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
LD <sub>50</sub>	lethal dose, 50%
MIC	minimum inhibitory concentration
PBS	phosphate-buffered saline
PNA	<i>N</i> -phenyl-1-naphthylamine
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDA	sabouraud dextrose agar
SEM	scanning electron microscope
SMA	styrene-maleic acid copolymer
SMA <sub>nh</sub>	styrene-maleic anhydride copolymer
XRD	X-ray diffraction
YM broth	yeast mold broth

## 第1章 緒論

真菌症の罹患者は世界中で毎年 10 億人以上といわれ、150 万人以上が死に至ることが知られている。真菌症の種類は、皮膚・粘膜感染から致死的な全身感染まで様々である[1]。低・中所得国においては、迅速で信頼できる診断ツールの欠如による診断の遅れや不正確さ、抗真菌薬の入手制限のため、真菌症による罹患率および死亡率は高い[2]。それにもかかわらず、真菌症は保健機関や研究助成機関からは軽視されたままである[3]。特に、真菌性角膜炎やマイセトーマなどの多くの cutaneous implantation mycoses は、熱帯または亜熱帯地域での流行に限定された病気であったが[4]、気候変動や人の移動などにより、真菌感染症の疫学は変化し[5,6]、先進国においても看過できない状況となっている。他方、深在性真菌症は、後天性免疫不全症候群、免疫抑制療法、癌、好中球減少症、腹膜透析など、さまざまな要因に起因して発症する[7]。また、コロナ禍の現代において、特に低・中所得国ではステロイドパルスなどによるムコール症が問題となっている[8]。

現在の世界保健機関必須医薬品モデル・リストには、抗真菌薬として、アムホテリシン B (amphotericin B, AmB) をはじめとしたポリエン系、代謝拮抗剤であるフルシトシン、クロトリマゾールをはじめとしたアゾール系、および微小管脱重合阻害剤であるグリセオフルピンが記載されている[9]。中でも、AmB は、1955 年に土壌放線菌である *Streptomyces nodosus* M4575 から分離され[10]、以後半世紀以上にわたり臨床で使用されている膜作用型の広域スペクトル抗真菌薬で、耐性菌が出現することは非常に稀であり、深在性真菌感染症治療のゴールドスタンダードであり続けている[11,12]。AmB は、疎水性のポリエンと親水性のポリオール域が共存する、カルボン酸とマイコサミンが結合した大環状ラクトンである (Figure 1)。AmB は biopharmaceutics classification system クラス IV の薬物として分類されている。つまり水溶性が低い薬物であることから、当初は水性懸濁液として静脈内投与されていた。本邦においては、デオキシコール酸を添加剤として加えた注射用 AmB 製剤である Fungizone<sup>®</sup>が 1962 年に承認されており、深在性真菌症患者を中心に主要な抗真菌薬の 1 つとして現在も使用されている。しかしながら、Fungizone<sup>®</sup>は腎毒性をはじめとした重篤な副作用を呈することから投与が困難となる場合がある。そこで、この点を改善すべく drug delivery system (DDS) が応用され、3 種類の脂質製剤が上市されている。本邦ではリポソ-

ム製剤である AmBisome<sup>®</sup>が 2006 年に承認された。AmBisome<sup>®</sup>をはじめとする脂質製剤は、Fungizone<sup>®</sup>と比較して副作用の発現頻度が低い。しかし、脂質製剤は非常に高価であるため、医療経済学的見地から改善が必要とされており、また、最も必要とされている低・中所得国においてその使用は制限されている[13]。これらの要因から、世界保健機関必須医薬品モデル・リストに含まれているにもかかわらず、真菌性疾患の死亡率が高い多くの国々において、AmB 製剤の利用は困難な状況である[2]。

このような状況の下、難水溶性薬物である AmB を可溶化するとともに、安価で、従来の Fungizone<sup>®</sup>よりも毒性が低く、同等以上に効果的な製剤の開発が望まれており、そのアプローチとして、機能性高分子を用いたナノ製剤化技術の応用が有望視されている。機能性高分子を利用したナノ製剤は、高分子ナノ粒子や高分子-薬物結合体など、さまざまなナノシステムに分類できる[14]。ミセルは高分子ナノ粒子の典型例であり、高分子ナノキャリアは、薬物を内包するように設計されている。高分子ナノキャリアとしては一般に、ポリラクチド、ポリラクチド-ポリグリコリド共重合体、ポリカプロラクトン、ポリアクリレートなどの合成ポリマーや、アルギン酸、ペクチン酸、キトサンなどの天然ポリマーが使用されている[15-19]。高分子ナノ粒子は、選択性、生分解性を付与できることから注目を集めている[20]。高分子-薬物結合体は、高分子ベースのナノ製剤のかなりの割合を占めている。薬物は物理的、化学的、または静電的手段を介して高分子に結合され、薬物は分解から保護され、製剤としての物理化学的特性や薬物動態の改善や変更が可能となる[14]。

本研究では、機能性高分子を用いて、表在性真菌症の 1 つである真菌性角膜炎への適応を目的とする AmB 製剤や、深在性真菌症に利用可能な AmB 製剤をそれぞれ調製し、その物性や薬効、毒性等を評価した。まず、真菌性角膜炎に対する治療薬として、角膜や結膜囊などの粘膜に対する付着性を有する機能性高分子であるヒアルロン酸 (hyaluronic acid, HA) に着目し、HA を疎水化した両親媒性高分子を用いた AmB 製剤を調製し、評価した (第 2 章第 1 節)。次に、深在性真菌症に対する治療薬として、アルブミン結合性を有することから高い血中滞留性が期待できる機能性高分子であるスチレン-マレイン酸コポリマー (styrene-maleic acid copolymer, SMA) に着目し、SMA と AmB との間において、共有結合および非共有結合性相互作用の 2 種類の結合様式からなる水溶性製剤をそれぞれ調製し、評価した (第 2 章第 2 節および第 3 節)。以下に本研究で得られた知見を詳述する。

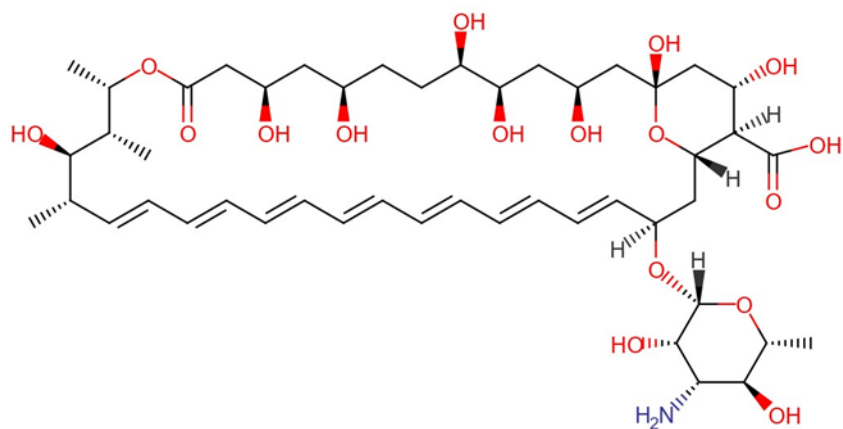


Figure 1. Chemical structure of amphotericin B.

## 第2章 本論

### 第1節 疎水化ヒアルロン酸からなるAmホテリシンB ナノヒドロゲル製剤

#### 2-1-1 序論

表在性真菌症の1つである真菌性角膜炎は、特に低・中所得国において、依然として失明の主な原因である[21,22]。現在利用されている真菌性角膜炎治療のファーストラインは、AmB のデオキシコール酸ミセル製剤である Fungizone<sup>®</sup>や、リポソーム製剤である AmBisome<sup>®</sup>の適応外使用である[23]。真菌性角膜炎に用いる Fungizone<sup>®</sup>点眼剤は、30～60 min ごとに投与するのが一般的である。また、デオキシコール酸ナトリウムによる眼の刺激や痛み、それに伴うコンプライアンスの低下といった欠点がある[23]。そのため、AmBisome<sup>®</sup>などの脂質製剤が利用されることがある。脂質製剤の利用は Fungizone<sup>®</sup>に認められる制限の克服が可能であるものの、コストが高いため、低・中所得国においては利用が限られている[24,25]。以上から、安価で低毒性である AmB 点眼製剤の開発が必要とされている。

ヒアルロン酸 (hyaluronic acid, HA) は、D-glucuronic acid と N-acetyl-D-glucosamine の二糖単位の繰り返しで構成される多糖類であり、生体適合性が高く、安価で入手が容易であることから、DDS において優れたキャリアとして利用されている[26–28]。また、HA は、角膜/結膜上皮細胞の細胞膜にアンカーされた膜結合型ムチンと水素結合等により相互作用することから、HA を用いた製剤は結膜嚢滞留時間が延長される[29,30]。以上から、HA は眼科用製剤のキャリアとして注目されている。一方、HA は親水性ポリマーであることから、AmB などの疎水性薬物のキャリアとしては不適である。

HA をはじめとした多糖類は、疎水化を受けることで、分子内および/または分子間疎水性相互作用により、水溶液中で自己凝集するナノヒドロゲルを形成することが知られている[31–33]。ナノヒドロゲルとは、直径 100 nm 未満のゲルのことであり、水分保持能が高く、ナノスケールの3次元ポリマーネットワーク内に薬物を組み込むことができる[34]。加えて、一般にナノ粒子は、粒子サイズが小さいことから、結膜嚢滞留時間を延長することができ、薬物の治療効果を高めることができる[35]。さらに、ナノ粒子に薬物を組み込むことで、薬物によって引き起こされる眼の刺激を軽減する可能性がある[36]。以上の利点を有すると思われる疎水化 HA は、点眼製剤のキャリアとして有用と考えられる。



本研究では、真菌性角膜炎の治療を目的とした点眼製剤として、疎水化ヒアルロン酸である C12-13 アルキルグリセリルヒアルロン酸 (Hyalorepair<sup>®</sup>, C12-13 alkyl glyceryl hyaluronic acid, AHA, Figure 2) を用いた AmB ナノヒドロゲル製剤 (AHA/AmB) を調製し、AmB 含有率や粒子サイズ、結晶構造、ムチンとの *in vitro* 相互作用、*in vitro* 抗真菌活性、および *in vitro* 毒性の評価を行った。

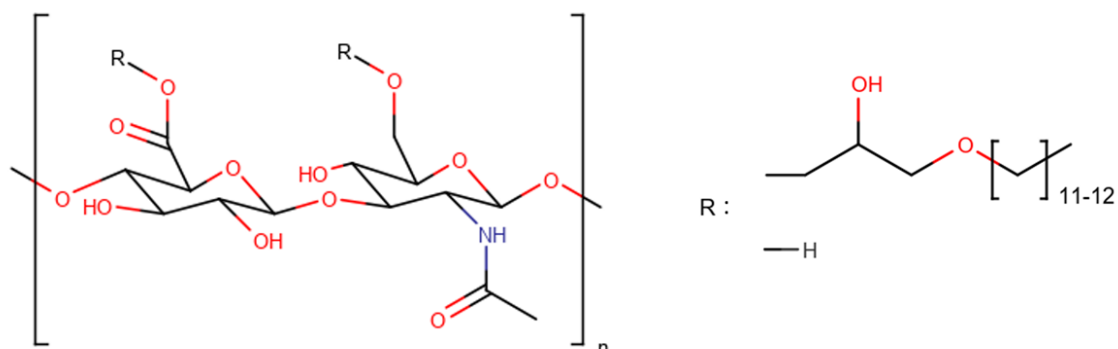


Figure 2. Chemical structure of alkyl glyceryl hyaluronic acid (AHA).

## 2-1-2 試薬

AHA は、キューピー社から供与された。AmB はケイマンケミカル社から購入した。ムチン (porcine stomach, Type II) はシグマアルドリッチ社から購入した。Yeast mold broth (YM broth) は、ベクトン・ディッキンソン社から購入した。Fungizone<sup>®</sup>はブリストル・マイヤーズスクイブ社から購入した。ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) はコスモ・バイオ社から購入した。Alamar Blue はバイオ・ラッド社から購入した。Dimethyl sulfoxide (DMSO), ダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム (Dulbecco's modified Eagle medium/Ham's nutrient mixture F-12, DMEM/F12), ペニシリン/ストレプトマイシン溶液, トリプシン/ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 溶液, およびその他の試薬と溶媒は富士フィルム和光純薬工業社から購入した。ヒト角膜上皮細胞株 HCE-T 細胞は、理研 BRC から入手した。4 週齢雄性成獣 ddY マウスは清水実験材料社から入手した。すべての動物には、餌と水を自由に摂取させた。福山大学研究倫理委員会の承認を受け (R 元-動物-1), 福山大学動物実験ガイドラインに準拠して実施した。

### 2-1-3 実験

#### (1) AHA/AmB ナノ粒子の調製

AHA 100 mg と AmB 40 mg をそれぞれ 20 mL の蒸留水および DMSO に溶解して混合後、再生セルロース透析膜 (Spectra/Por 1, 6-8kD, Repligen) を使って蒸留水に対して透析を行った。透析後、凍結乾燥し、AHA/AmB を得た。

#### (2) HPLC による AmB の定量

AmB 含有率は高速液体クロマトグラフィー (high performance liquid chromatography, HPLC) にて測定した。測定用カラムは TSKgel ODS80-Tm (4.6 mm × 150 mm, Tosoh) column を用いた。移動相は 5 mM EDTA (pH 7.8), メタノール, およびアセトニトリルを 2:4:1 (v/v/v) の割合で混合したものをを用いた。流速 1 mL/min, サンプル注入量は 20  $\mu$ L とした。検出には吸光光度計検出器 SPD-20A (Shimadzu) を用い、波長 405 nm で測定した。

#### (3) SEM による形態評価

粒子の形態を走査型電子顕微鏡 (scanning electron microscope, SEM) で観察した。AHA/AmB の希薄溶液を試料スタブに塗布し、乾燥させた。その後、サンプルをプラチナコーティングし、電界放出形走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM-7200F, JEOL) を使用して顕微鏡写真を撮影した。

#### (4) 粒子径の測定

4.0-mW He-Ne レーザー (633 nm) を搭載した Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) を用い、25°C で 1 mg/mL のサンプルを動的光散乱法 (dynamic light scattering, DLS) にて測定した。AHA については、10 mg/mL として測定した。

#### (5) XRD 測定および DSC による AmB 形態評価

サンプルの X 線回折 (X-ray diffraction, XRD) パターンは、Rigaku UltimaIV (Rigaku) を使用して 40 kV にて測定した。AmB, AHA, AHA/AmB の粉末をそれぞれガラス板上に広げて測定した。データは、2°/min のスキャン速度で  $2\theta$  が 5~30° の範囲で収集した。

示差走査熱量測定 (differential scanning calorimetry, DSC) 曲線は、DSC Q100 (TA Instruments)

を使用して得た。各サンプルをアルミナパンに密封し、窒素雰囲気下 50~245°C の範囲で、加熱速度 20°C/min, キャリアガス速度 50 mL/min にて測定した。

#### (6) 紫外可視分光光度測定

各種濃度の AHA/AmB, AHA, および AmB を蒸留水または DMSO に溶解し、分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) を使用して紫外可視吸収スペクトルを測定した。

#### (7) ムチン結合性評価

膜結合型ムチンと AHA/AmB の間の相互作用を評価するために、ニトロセルロース膜結合ムチンを使用した実験を実施した。1 cm<sup>2</sup>のニトロセルロース膜 (Merck) を、4%ムチン含有 0.05% polysorbate 80-0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 溶液 (pH = 8.0), または 0.05% polysorbate 80-0.05 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-NaOH 溶液 (pH = 8.0) で 30°C にて一晩インキュベートした。次に、これらの膜をリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS) で洗浄し、必要に応じて PBS で調製した 1 mg/mL AHA 溶液で 20 min インキュベートした。その後、膜を PBS で調製した 0.1 mg/mL AHA/AmB 溶液で 20 min インキュベートした。PBS で洗浄後、500 µL の DMSO にて膜ごと AmB を溶解し、この溶液の 416 nm の吸光度値を測定することにより AmB を定量した。AHA/AmB とインキュベートしなかった各膜をそれぞれの陰性対照として使用し、これらの吸光度値のそれぞれを減じて正味の AmB 結合量を算出した。

#### (8) *In vitro* 薬効

*In vitro* 薬効は最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration, MIC) にて評価した。MIC 測定は *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) BY4742 を用いて実施した[37]。試料と *S. cerevisiae* BY4742 を YM broth に添加し、28°C で 48 h 培養した後、660 nm の吸光度を測定した。吸光度が 0.03 以下を増殖抑制と判断した。

#### (9) *In vitro* 毒性

AmB の毒性スクリーニングはマウス赤血球溶血性の評価にて実施した[38,39]。4 週齢の雄性成獣 ddY マウスの後大静脈から血液を採取した。ヘパリン処理した全血を 2,000 rpm で 10 min 遠心分離し、上清と buffy coat を除去し、赤血球を得た。この赤血球を PBS にて洗浄

後、希釈した。適切な希釈倍率は、赤血球が水で完全に溶解した際の上清の 576 nm の吸光度が約 0.4 となるよう設定した。希釈した赤血球と試料を混合後、37°C で 30 min インキュベートした。氷冷後、10,000 rpm で 30 s 遠心分離し、非溶血赤血球を沈殿させ、上清を回収し、576 nm の吸光度を測定した。溶血率は、 $\text{溶血率} = (\text{Abs} - \text{Abs0}) / (\text{Abs100} - \text{Abs0}) \times 100$  の式で算出した。Abs, Abs0, Abs100 はそれぞれ試料, PBS, 水で処理した場合の吸光度値である。

HCE-T 細胞に対する細胞毒性は、Alamar Blue 染色を用いて評価した。細胞は 100-mm dish (サンプラテック) で培養し、10% FBS, 100 U/mL ペニシリン, 100 µg/mL ストレプトマイシン添加 DMEM/F12 を培地として、5% CO<sub>2</sub> にて 37°C で増殖させた。dish 内で約 80%-90% のコンフルエントに達した時点で、0.25% トリプシン/EDTA 溶液を用いて細胞を継代した。12-well plate (ベクトン・ディッキンソン) に  $1 \times 10^5$  cells/well となるよう播種して 18 h 培養後、サンプルを曝露した。曝露 24 h 後、Alamar Blue アッセイに供した。AHA/AmB はメンブレンフィルター (0.45 µm) に通し、サンプルとした。Alamar Blue で 2 h インキュベートし、プレートリーダー (Tecan Infinite 200 PRO, TECAN Japan) を用いて蛍光を測定した。

#### (10) 統計解析

データは平均値±標準偏差で表した。2 群間の差は Student の *t* 検定を用いて解析した。複数のグループ間の差は、ANOVA に続いて Tukey の多重比較検定を使用して分析した。P < 0.05 の値は統計的に有意とみなした。統計解析は R, Version 4.0.1 を用いて行った。

## 2-1-4 結果

### (1) AHA/AmB の物性

AHA/AmB 中の AmB 含有率を HPLC にて測定したところ、27.5 w/w%であった (Table 1)。AHA/AmB の形態は SEM にて評価した (Figure 3)。AHA/AmB は、乾燥状態で 100 nm 以下の球状に凝集していることが示された。AHA および AHA/AmB の水溶液中での直径を Zetasizer にて測定した結果、それぞれ  $14.9 \pm 3.4$  nm および  $31.5 \pm 1.1$  nm であった。

AmB の凝集状態は、紫外可視分光光度法、XRD、および DSC にて評価した。DMSO に溶解した AmB および AHA/AmB を紫外可視分光光度法にて測定した結果、372, 391, および 416 nm で強い吸収を示し、330 nm 付近ではこれらよりも弱い吸収を示した (Figure 4)。単量体の AmB は、これらの特徴を持つスペクトルを示すことが報告されている[40]。一方、水溶液中の AHA/AmB の吸光度スペクトルは、約 330 nm において強い吸収を示した (Figure 4)。疎水性環境で自己凝集する AmB は、約 330~350 nm で強い吸収を示すことが知られている[40,41]。Figure 5 には、AmB, AHA, および AHA/AmB の XRD パターンを示す。AmB 粉末の XRD パターンには、いくつかの回折角度でシャープなピークが認められ、結晶性が示された[42]。一方、AHA/AmB の XRD パターンでは、AmB の特徴的なピークが認められず、AmB がアモルファス状態であることが示された。AmB, AHA, および AHA/AmB の DSC 分析の結果を Figure 6 に示す。AmB 粉末のサーモグラムは、結晶性 AmB 由来である 108.0°C および 202.2°C で吸熱ピークを示した[43]。一方、AHA/AmB のサーモグラムではこれらの AmB に特徴的なピークは検出されず、175.0°C および 224.8°C 付近に新たなピークが認められた。

Table 1. Properties of AHA/AmB.

Sample	AmB content (w/w%)	Diameter (nm) †
AHA/AmB	27.5	$31.5 \pm 1.1$
Fungizone	44.2	-
AHA	-	$14.9 \pm 3.4$

† Diameter was measured by Zetasizer Nano ZS.

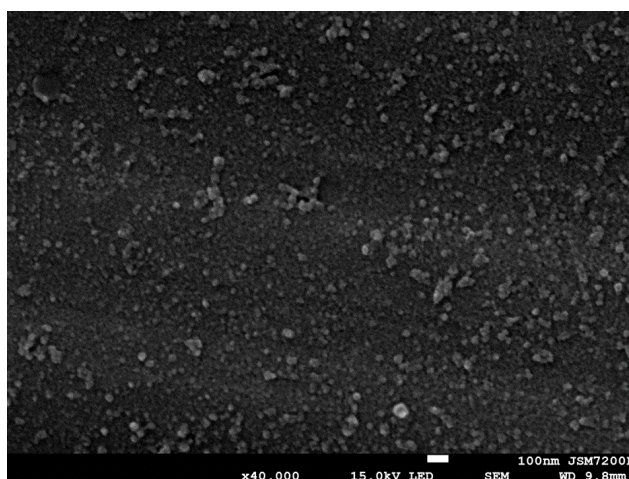


Figure 3. Scanning electron micrograph of AHA/AmB.

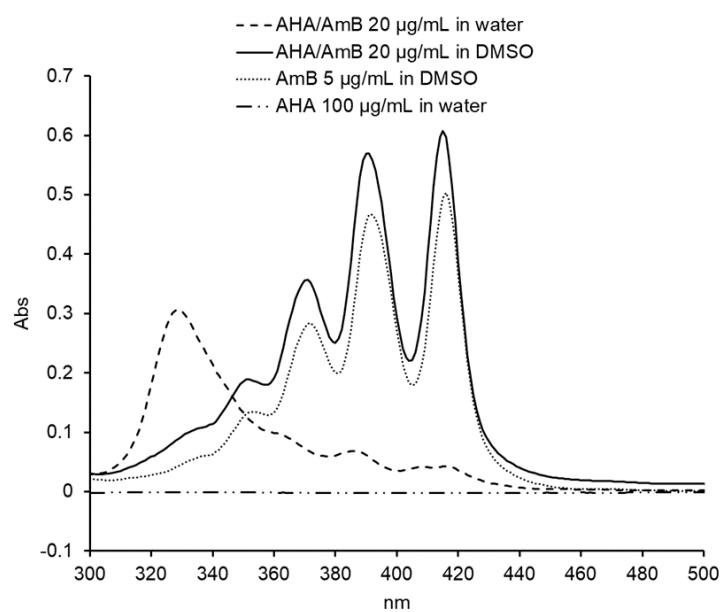


Figure 4. UV-vis absorption of AHA/AmB, AHA, and AmB. AHA/AmB was mixed in distilled water and DMSO at 20 µg/mL. AHA was mixed in water at 100 µg/mL; AmB was mixed in DMSO at 5 µg/mL.

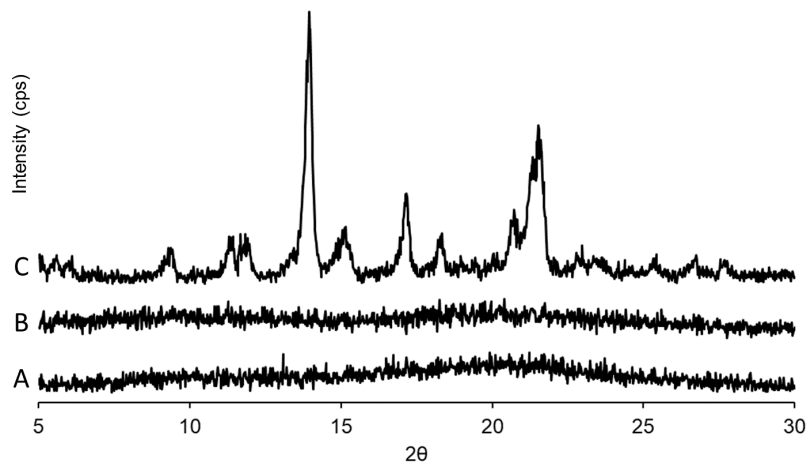


Figure 5. X-ray diffraction of (A) AHA/AmB, (B) AHA, and (C) AmB.

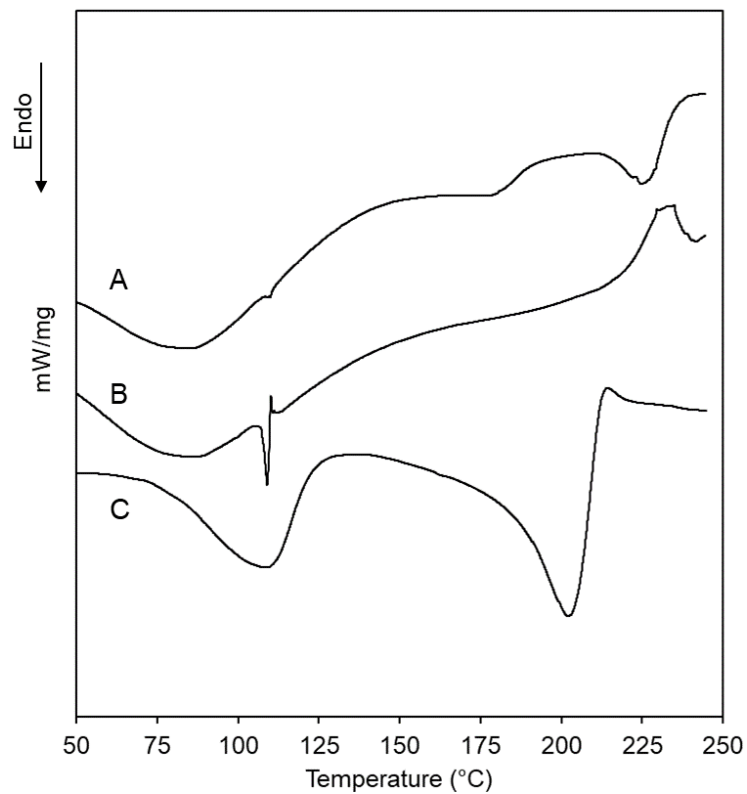


Figure 6. Differential scanning calorimetry patterns of (A) AHA/AmB, (B) AHA, and (C) AmB.

## (2) AHA/AmB の粘膜炎着性

AHA/AmB の結膜嚢滞留性を推測するために、角膜/結膜上皮細胞の細胞膜にアンカーされたムチンとの相互作用を、ニトロセルロース膜に結合したムチンを使用して疑似的に評価した (Figure 7)。ムチン処理した膜を AHA/AmB に曝露すると、 $1.15 \pm 0.17 \mu\text{g}$  の AmB が

結合した。AHA/AmB を曝露する前に AHA で前処理すると、AmB 結合量は  $0.79 \pm 0.05 \mu\text{g}$  となり、有意に減少した。polysorbate 80 のみで処理した膜に AHA/AmB を曝露した場合、AmB 結合量は  $0.04 \pm 0.04 \mu\text{g}$  であり、ほぼ認められなかった。

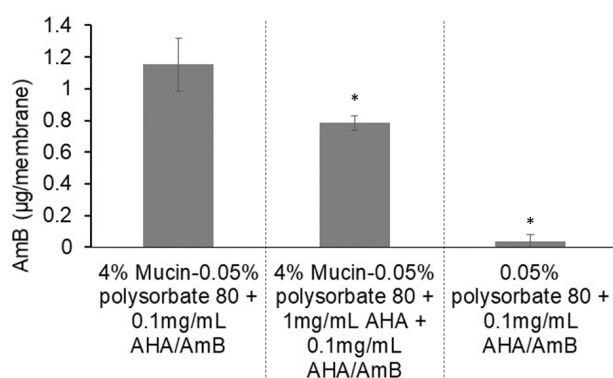


Figure 7. Adhesion of AHA/AmB to mucin-bound nitrocellulose membrane.

### (3) *In vitro* 薬効および毒性評価

*In vitro* 抗真菌活性は、*S. cerevisiae* を用いた MIC の測定にて評価した (Table 2)。AHA/AmB, AmB, Fungizone® の MIC はすべて  $0.39 \mu\text{g/mL AmB-equivalent}$  であった。また、AHA は  $100 \mu\text{g/mL}$  においても抗真菌活性を示さなかった。

*In vitro* 毒性として、まず、AmB の毒性スクリーニングとしてマウス赤血球溶血性を評価した (Figure 8)。50%溶血率 (C50) を示す AmB 濃度は、AmB および Fungizone® でそれぞれ  $4.9$  および  $5.2 \mu\text{g/mL AmB-equivalent}$  であった。AHA/AmB の C50 は  $136.0 \mu\text{g/mL AmB-equivalent}$  であり、AmB および Fungizone® と比較して溶血毒性が顕著に低減されていた。AHA の溶血毒性は、 $4,000 \mu\text{g/mL}$  まで認められなかった。

つぎに、角膜上皮細胞株である HCE-T 細胞を用いた *in vitro* での毒性を評価した (Figure 9)。 $10 \mu\text{g/mL AmB-equivalent}$  および  $30 \mu\text{g/mL AmB-equivalent}$  の濃度で Fungizone® を曝露した場合、細胞生存率はそれぞれ 76% および 54% であった。同様の条件で AHA/AmB を曝露した場合、細胞生存率はどちらも 87% であったことから、Fungizone® と比較して、AHA/AmB は有意に細胞毒性が改善されていることが明らかとなった。



Table 2. *In vitro* antifungal activity of AHA/AmB.

Sample	MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )
AHA/AmB	0.39†
AmB	0.39
Fungizone	0.39†
AHA	> 100

† AmB-equivalent.

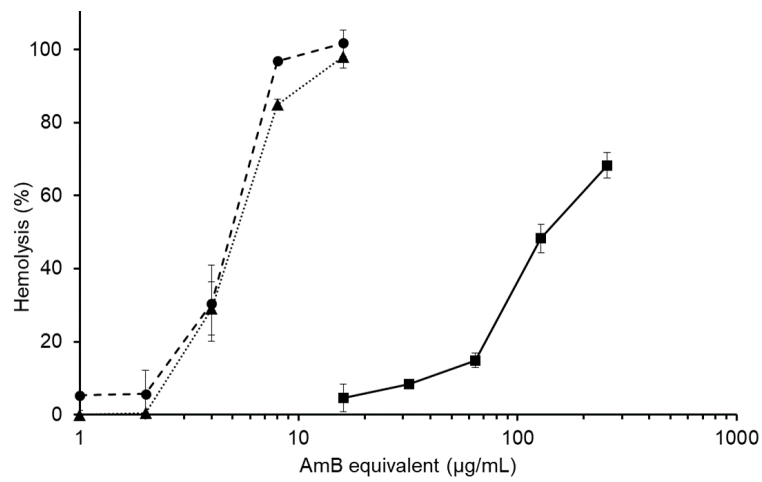


Figure 8. Hemolysis of mouse red blood cells in AHA/AmB (■), AmB (●), and Fungizone (▲).

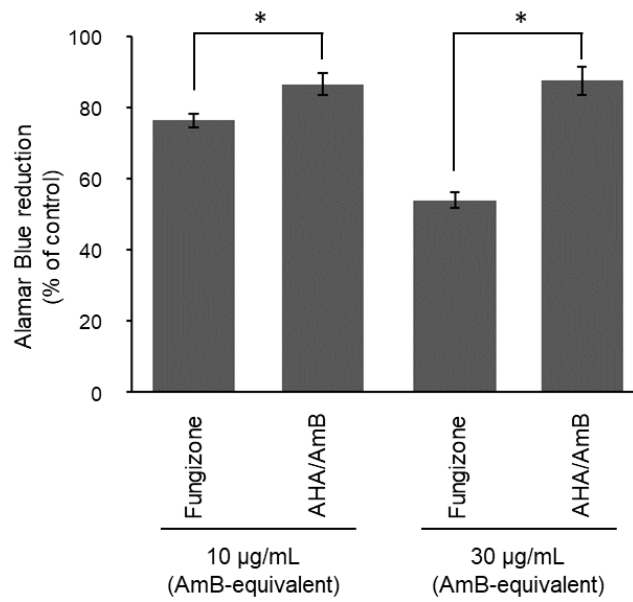


Figure 9. Cell injury to HCE-T cells induced by Fungizone and AHA/AmB, as assessed by the Alamar Blue. Significance of the difference was assessed by Student's *t*-test.

### 2-1-5 考察

本研究では、ムチンとの相互作用能を有する HA を疎水化した AHA を用い、AmB を内包した水溶性ナノヒドロゲル点眼製剤を開発した。その結果、AmB の結膜嚢滞留時間の延長が期待される結果が得られた。

調製した AHA/AmB は、HPLC や紫外可視吸収、DLS、SEM、XRD、および DSC 測定などのさまざまな手法にて評価した。SEM の結果から、いずれの粒子もナノサイズではあるものの、粒子径分布は広いことが明らかとなった。この要因として、AHA 分子の疎水基の修飾率は糖単位として平均で 5% であり各 AHA 分子において疎水基の修飾率や修飾の間隔は不均一と考えられる点や、一つのナノ粒子を形成する AHA 分子や AmB 分子の数は粒子間で不均一と考えられる点、などが挙げられる。ナノヒドロゲル中の AmB の結晶構造について、DSC および XRD により分析した。DSC 分析の結果、AmB のサーモグラムに認められた吸熱ピークは、AHA/AmB のサーモグラムでは認められず、新たな吸熱ピークが検出された。一般に、発熱ピークと吸熱ピークのシフトとして現れる薬物とポリマー双方の熱挙動の変化は薬物とポリマー間の相互作用に関連していることが報告されている[44,45]。つまり、AmB と AHA マトリックスの間に、何らかの相互作用が生じていると考えられる。XRD 分析の結果、AmB の XRD パターンではいくつかの散乱角  $2\theta$  で鋭いピークを示したことから、薬物が結晶化していることが明らかとなった。一方、AHA/AmB のパターンでは、AmB の XRD パターンで認められたような特徴的なピークを検出できなかった。DSC および XRD の結果から、AHA/AmB 中の AmB はアモルファス状態で存在することが明らかとなり、AHA/AmB から溶液中に放出される AmB 分子の溶解度が改善する可能性が示された。

AHA/AmB の結膜嚢滞留性を推測するために、ニトロセルロース膜に結合したムチンを使用して評価した結果、ムチン処理した膜に AHA/AmB を曝露すると AmB が結合し、この結合は AHA により阻害されることが示された。ニトロセルロース膜結合ムチンの構造と細胞膜にアンカーされたムチンの構造は必ずしも同じではない点に注意する必要があるものの、AHA/AmB が AHA を介して、膜結合型ムチンを模倣するムチンと相互作用することが示唆された。ムチンと相互作用する点眼製剤は、結膜嚢滞留時間を延長すると考えられている[29,30]。加えて、ナノサイズの製剤は、結膜嚢滞留時間を延長することも報告されている[35]。以上から、AHA/AmB は *in vivo* で角膜に保持されることが期待され、投与頻度の削減に繋がることも期待される。

AHA/AmB の *in vitro* 抗真菌活性を MIC にて評価したところ、AHA/AmB の薬効は Fungizone<sup>®</sup>および AmB と同等であった。また、AHA は薬効を有さないことが示された。AHA/AmB の *in vitro* 毒性は、マウス赤血球および HCE-T 細胞を用いた細胞毒性にて評価した。その結果、AHA/AmB の毒性は Fungizone<sup>®</sup>および AmB よりも低いものであった。また、AHA は毒性を有さないことが示された。 *In vitro* 抗真菌活性および毒性の結果から、AHA は薬効に悪影響を与えることなく毒性軽減にのみ寄与していることが示された。真菌細胞壁を構成するキチンに含まれるヒドロキシル基と HA のカルボキシル基との間でのイオン相互作用が報告されており[46]、AHA とキチンの間においてもこの相互作用が生じていると考えられ、AHA の抗真菌選択性の改善はこの相互作用による可能性が考えられる。

疎水化多糖は、薬物の可溶化、薬物送達制御、薬物動態改善など、多くの利点をもたらす。本研究では、AmB を疎水化多糖である AHA に搭載した水溶性ナノヒドロゲル点眼製剤を調製した。AHA を用いることで、粘膜付着性を有する水溶性ナノ粒子の調製が可能となり、AHA の点眼剤における潜在的なキャリアとしての有用性が示唆された。

## 第2節 スチレン-マレイン酸コポリマー結合型アムホテリシン B 製剤

### 2-2-1 序論

AmB は、深在性真菌感染症治療のゴールドスタンダードの1つである。長年にわたりデオキシコール酸の AmB ミセル製剤である Fungizone<sup>®</sup>が抗真菌療法的主流であったが、腎毒性や貧血症などの重篤な副作用により、Fungizone<sup>®</sup>の臨床的有用性は制限されている[47]。これらの AmB に関連する毒性を回避するために、いくつかの脂質ベースの送達システムが導入されている[48]。本邦において上市されているリポソームベースの AmB 製剤である AmBisome<sup>®</sup>は、毒性が非常に低いことから、大量投与が可能である。しかし、依然として残る腎毒性や、高い製造コストなど、解決すべき大きな課題がまだ残っており、代替の製剤の開発が望まれている[49-53]。

スチレン-マレイン酸コポリマー (styrene-maleic acid copolymer, SMA) は交互共重合体であり、耐久性がよく、安価であるため、接着剤やコーティング剤など様々な用途に使用されている[54-56]。また、SMA は催奇形性作用がなく、急性および慢性毒性も呈さない[57]。SMA は、スチレン-無水マレイン酸コポリマー (styrene-maleic anhydride copolymer, SMA<sub>anh</sub>) の加水分解によって容易に得ることができ、SMA<sub>anh</sub> の官能性酸無水物部分を異なる求核剤と反応させることによって容易に修飾することができる。最も重要な特徴は、SMA は本質的に両親媒性であり、またアルブミン結合性を有することから、難水溶性薬物の溶解性、安定性、薬物動態を向上させるために用いることができる点である。

当研究室ではこれまでに、水溶性を向上させるためのナノデリバリープラットフォームとして、疎水性相互作用による SMA やブチルエステル化 SMA と AmB からなるミセル化ナノ粒子の製剤 (SMA/AmB, But-SMA/AmB) を報告した[58]。しかし、これらの血中滞留性は Fungizone<sup>®</sup>と同様に低いものであり、これはミセルからの AmB 漏出が原因であった。一般に、薬物を搭載したミセルは血中滞留性が低いという問題点がある[59,60]。血液中には様々な内因性物質が存在するため、ミセル化ナノ粒子を血液中で安定的に循環させることは困難であると考えられている。一方、高分子と薬物が共有結合した高分子-薬物結合体は、薬物内包ミセルよりも高い血中滞留性を示すことが知られている[61]。感染部位は、急速な血管拡張や血管透過性の増加が起こっており、高分子ナノ粒子の高い血中滞留性に由来する enhanced permeation and retention effect (EPR 効果) を利用することにより、感染部位への

受動的ターゲティングを実現できる[62].

そこで本研究では, Fungizone®の全身投与における限界を克服すべく, 共有結合型製剤である SMA-AmB の合成を行った. SMA-AmB の物性としては, 薬物含有率, サイズ, アルブミン結合能, コンジュゲートからの AmB の放出率を評価した. また, 毒性, 抗真菌活性, 血中滞留性を評価した.

## 2-2-2 試薬

SMA<sub>nh</sub> (数平均分子量: ~1,600), AmB, ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) はシグマアルドリッチ社より購入した. Sabouraud dextrose agar (SDA) および YM broth は, ベクトン・ディッキンソン社から購入した. Fungizone®はブリストル・マイヤーズスクイブ社から入手した. Fluorescein isothiocyanate isomer-I (FITC) は同仁化学研究所より購入した. DMSO, *N,N*-dimethylformamide (DMF), triethylamine, ethylenediamine (EDA), およびその他の試薬と溶媒は富士フィルム和光純薬工業社から購入した. 4週齢雄性成獣 ddY マウスおよび7週齢雄性成獣 DBA/2N マウスは清水実験材料社から入手した. すべての動物には, 餌と水を自由に摂取させた. 福山大学研究倫理委員会の承認を受け (H30-動-7), 福山大学動物実験ガイドラインに準拠して実施した.

## 2-2-3 実験

### (1) SMA-AmB の合成

SMA<sub>nh</sub> 80 mg, AmB 160 mg, triethylamine 48  $\mu$ L を DMF 24 mL 中に溶解し, 室温, 暗所で1週間反応させた. 反応後, diethyl ether で析出させ, 遠心分離 (2,500 rpm, 30 min) して沈殿を回収した. この操作を3回繰り返して未反応の AmB と triethylamine を除去して精製後, デシケータ中で乾燥させた. こうして得られた生成物 (SMA<sub>nh</sub>-AmB) に 32 mL の 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>を加えて室温で 16 h 反応させることで, 未反応の無水マレイン酸基を加水分解した. その後, 再生セルロース透析膜 (Spectra/Por 1, 6-8kD, Repligen) を使って蒸留水に対して透析を行った. 透析後, 凍結乾燥し, SMA-AmB の粉体を得た (Figure 10).

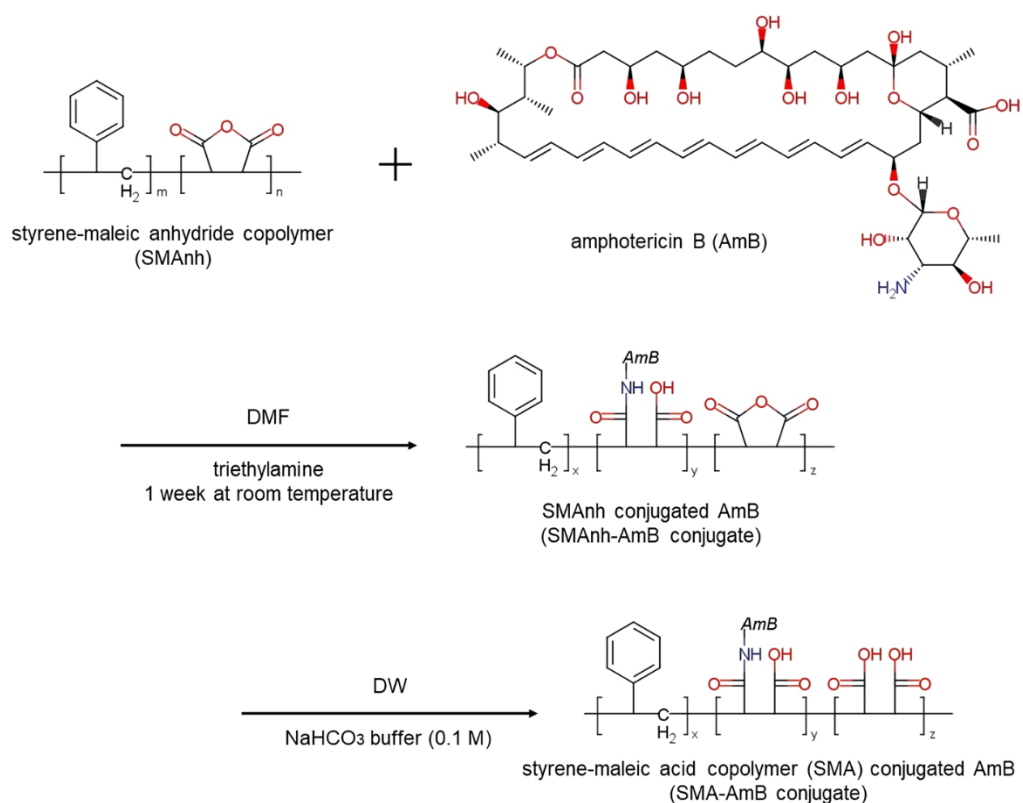


Figure 10. Synthesis of styrene-maleic acid copolymer (SMA)-conjugated amphotericin B (AmB) (SMA-AmB conjugate); chemical structures and the conjugation pathway are shown.

## (2) SMA の調製

SMAnh 100 mg を 10 mL の 0.1 M NaOH に攪拌しながら添加し、透明な溶液が得られるまで 60°C で加熱することにより、無水マレイン酸基を加水分解した。その後、0.1 M HCl で pH 7.0 まで中和し、蒸留水に対して透析を行った後、凍結乾燥することにより SMA の粉体を得た (Figure 11A)。

## (3) FITC 標識 SMA の合成

SMAnh と EDA を用いて、SMA-AmB と同じ方法で、SMA-EDA を合成した。50 倍以上のモル量の EDA を無水マレイン酸基と反応させた。得られた SMA-EDA 10 mg と FITC 3 mg を 6 mL の 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> に溶解し、室温、暗所で 24 h 反応させた。反応後、ゲル浸透クロマトグラフィー (Sephadex G-25 column; GE Healthcare Japan; φ = 10 mm, L = 300 mm) にて未反応の FITC を除去し、蒸留水に対して透析後、凍結乾燥させることで、FITC 標識 SMA (FITC-SMA) の粉体を得た (Figure 11B)。

#### (4) FITC 標識 SMA-AmB の合成

SMA<sub>anh</sub>-AmB, EDA, および FITC を用いて, FITC-SMA の合成と同じ方法で FITC 標識 SMA-AmB (FITC-SMA-AmB) を合成した. まず, SMA<sub>anh</sub>-AmB と EDA を用いて EDA-SMA-AmB を合成した. 50 倍以上のモル量の EDA を無水マレイン酸基と反応させた. 次に, EDA-SMA-AmB と FITC を用いて FITC-SMA-AmB を合成した (Figure 11C).

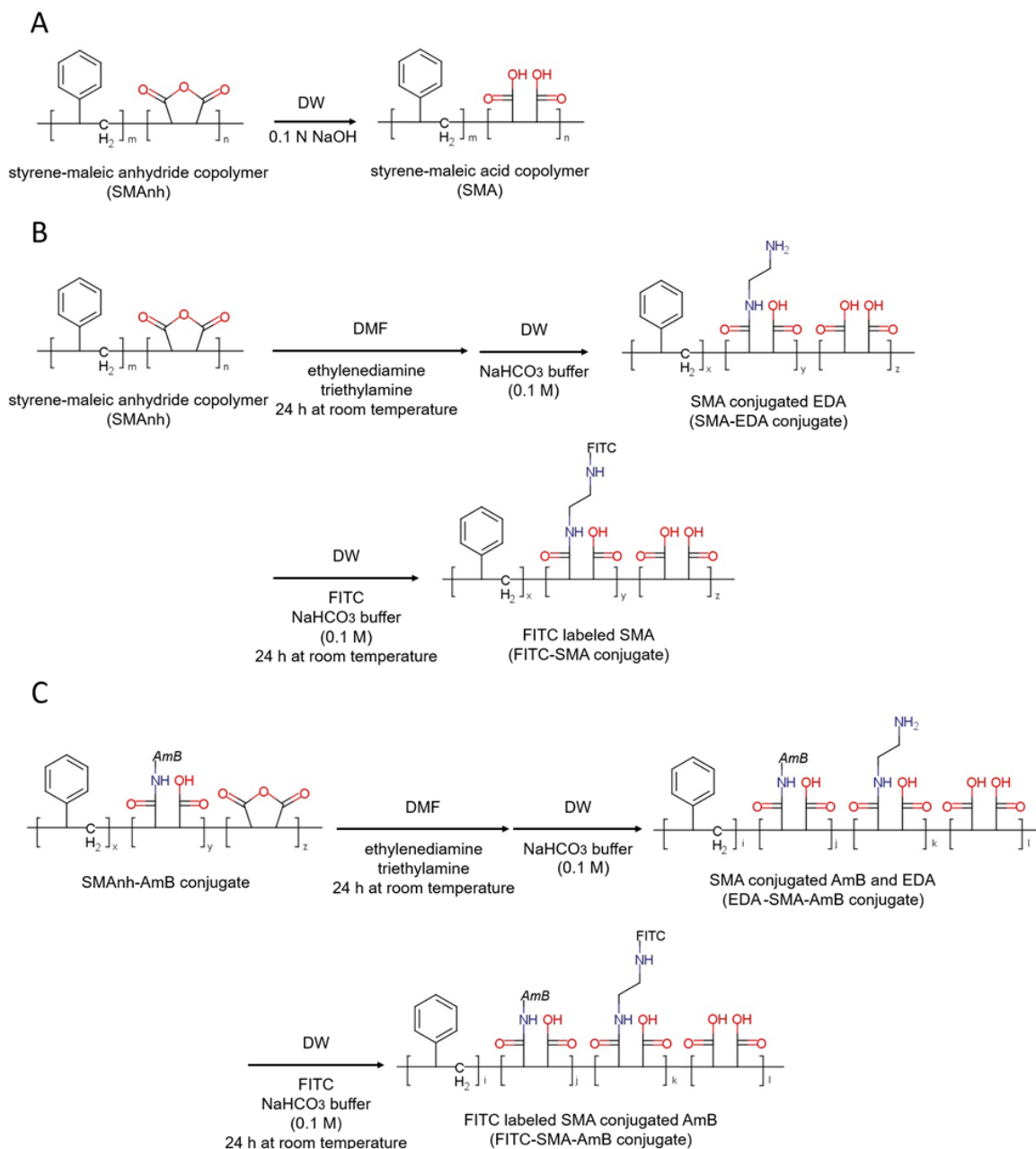


Figure 11. (A) Hydrolysis of styrene-maleic anhydride copolymer (SMA<sub>anh</sub>); (B) Synthesis of FITC-labeled SMA (FITC-SMA conjugate); (C) Synthesis of FITC-labeled SMA-conjugated AmB (FITC-SMA-AmB conjugate). Chemical structures and the conjugation pathway are shown.

(5) 紫外可視分光光度測定

サンプルは DMSO, または蒸留水に 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で溶解し, 分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) にて紫外可視吸収スペクトルを測定した.

(6) DLS による粒子径測定

4.0-mW He-Ne レーザー (633 nm) を搭載した Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) を用い, 25°C で 1 mg/mL のサンプルを DLS にて測定した.

(7) HPLC による AmB 測定

HPLC は, 波長可変 UV 検出器 (SPD-20A, Shimadzu) を搭載した HPLC システム (LC-10AD, Shimadzu) を用いて実施した. 検出波長は 405 nm, カラムは 4.6  $\times$  150 mm C18 逆相カラム (TSKgel ODS80-TM, Tosoh) を室温で使用した. 移動相は 5 mM EDTA (pH 7.8), メタノールおよびアセトニトリル (2:4:1 (v/v/v)) からなり, 流速は 1.0 mL/min であった. 注入量は 20  $\mu\text{L}$  であった.

(8) *In vitro* リリースアッセイ

SMA-AmB からの AmB の放出は, 37°C のクエン酸緩衝液 (0.1 M, pH 5.0) およびリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.0 および 9.0) 中で測定した. SMA-AmB の濃度は 1.0 mg/mL となるように各緩衝液にて調製した. 放出された AmB の量を上記の HPLC 法を用いて一定時間ごとに測定した.

(9) GPC によるアルブミン結合性評価

ゲル浸透クロマトグラフィー (gel permeation chromatography, GPC) は, Sephadex G-100 カラム ( $\phi=10$  mm, L=500 mm, GE Healthcare Japan) を使用して実施した. 移動相は 0.1 M  $\text{NaHCO}_3$  水溶液を用いた. サンプルとして, PBS に溶解した BSA と SMA-AmB を最終濃度 2 mg/mL で調製し, 各サンプル 0.2 mL をカラムにアプライした. 溶出液は 2 mL ごとにフラクションとして回収し, 280 nm および 367 nm での吸光度を測定した.



#### (10) 血中滞留性測定

4週齢の雄性成獣 ddY マウスに Fungizone<sup>®</sup> または FITC-SMA-AmB を 5% グルコースおよび PBS にそれぞれ溶解し、尾静脈からそれぞれ投与した。投与薬物量は 2 mg/kg AmB-equivalent とした。FITC-SMA-AmB 溶液は投与前にメンブレンフィルター (0.45 μm Millex<sup>®</sup>-LH フィルター, Merck Millipore) にて滅菌処理を施した。適切な時点でマウスを麻酔し、後大静脈から血液を採取した。血液を 10,000 rpm で 30 s 遠心分離し、血漿を採取した。

Fungizone<sup>®</sup> を投与したマウスから採取した血漿はメタノールで 100 倍希釈した。室温で 1 h 静置した後、3,000 rpm で 5 min 遠心分離を行った。各サンプルの上清を 8 mL 採取し、エバポレータでメタノールを除去した。残渣を移動相 400 μL に溶解し、メンブレンフィルター (0.45 μm) に通して、上記と同じ HPLC システムに注入した。移動相は、酢酸ナトリウム緩衝液 (10 mM, pH7.0) とアセトニトリル (6:4 (v/v)) の混合液とした。

FITC-SMA-AmB を投与したマウスから採取した血漿を 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> で 10 倍に希釈し、RF-510 (Shimadzu) にて蛍光強度を測定した (励起波長 490 nm, 蛍光波長 520 nm)。

#### (11) FITC-SMA-AmB の細胞内局在性

*S. cerevisiae* BY4742 を PBS に懸濁した溶液に FITC-SMA-AmB を添加し、4°C, 2 h 振盪した。PBS で 3 回洗浄後、PBS/グリセロール溶液 (1:3, v/v) で懸濁した。これらの細胞懸濁液をスライド上にマウントし、TCS-SPE DMI4000 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica) にて可視化し、FITC-SMA-AmB の局在を観察した (励起波長 488 nm, 蛍光波長 500~525 nm)。

#### (12) *In vitro* および *in vivo* 毒性

*In vitro* 毒性はマウス赤血球溶血性にて評価した[38,39]。4週齢の雄性成獣 ddY マウスの後大静脈から血液を採取した。ヘパリン処理した全血を 2,000 rpm で 10 min 遠心分離し、上清と buffy coat を除去し、赤血球を得た。この赤血球を PBS にて洗浄後、希釈した。適切な希釈倍率は、赤血球が水で完全に溶解した際の上清の 576 nm の紫外可視吸光度が約 0.4 となるよう設定した。希釈した赤血球と試料を混合後、37°C で 30 min インキュベートした。このとき、1% BSA となるよう試料を調製した。氷冷後、10,000 rpm で 30 s 遠心分離し、非溶血赤血球を沈殿させ、上清を回収し、576 nm の吸光度を測定した。溶血率は、溶血率 =  $(\text{Abs} - \text{Abs}_0) / (\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0) \times 100$  の式で算出した。Abs, Abs<sub>0</sub>, Abs<sub>100</sub> はそれぞれ試

料, PBS, 水で処理した場合の吸光度値である.

*In vivo* 毒性は静脈内投与による半数致死量 (lethal dose, 50%, LD<sub>50</sub>) の測定により決定した. SMA の LD<sub>50</sub> は, 限度試験により決定した. 投与前にメンブレンフィルター (0.45 μm) にて処理を行った. SMA-AmB および Fungizone® の LD<sub>50</sub> 値は, アップダウン法[63]を用いて推定した. 4 週齢の雄性成獣 ddY マウスに様々な用量の試料を尾静脈内へ注射した. SMA-AmB は投与前にメンブレンフィルター (0.45 μm) にて処理を行った. 初期濃度は, 過去の報告[64]から決定された Fungizone® の LD<sub>50</sub> の最良推定値と考えられた 5 mg/kg に設定した. 後続の動物には, 前の動物の生存率に応じて, より高い用量またはより低い用量を投与した. 生存している動物は, 投与後 14 日間, 遅発性の死亡を観察した. 投与は, 試験した 5 匹の連続した動物で 4 回の逆転が起こるまで, 24 h の一定時間間隔で継続した. アップダウン法で測定した結果から, LD<sub>50</sub> を最尤法にて算出した.

#### (13) *In vitro* および *in vivo* 抗真菌活性

*In vitro* 薬効は MIC にて評価した. MIC 測定は *S. cerevisiae* BY4742 を用いて実施した[37]. 試料と *S. cerevisiae* BY4742 を YM broth に添加し, 28°C で 48 h 培養した後, 660 nm の吸光度を測定した. 吸光度が 0.03 以下を増殖抑制と判断した.

*In vivo* 薬効は, *S. cerevisiae* BY4742 感染マウスを用いて, 腎臓, 肝臓および脾臓における菌数を測定することにより評価した. 7 週齢雄性成獣 DBA/2N マウス 16 匹に  $2 \times 10^7$  個の菌を 0.2 mL の PBS で尾静脈に接種し, 感染させた. 菌濃度は血球計数器を用いて計数した. 感染 30 min 後, 5% グルコースおよび PBS にそれぞれ溶解した Fungizone® および SMA-AmB を尾静脈から 0.1 mL 単回投与した. PBS 投与群を陰性対照とした. SMA-AmB 溶液および PBS は, 注入前にメンブレンフィルター (0.45 μm) にて処理した. 投与 48 h 後に標的臓器を無菌的に取り出し, PBS でホモジナイズし, 適切な希釈液 0.2 mL を SDA プレートに播種した. 生菌数は, 30°C で 72 h 培養後のコロニー形成単位 (CFU) 数として推定した.

#### (14) 統計解析

データは平均値±標準偏差で表した. 2 群間の差は Student の *t* 検定を用いて解析した. 複数のグループ間の差は, ANOVA に続いて Tukey の多重比較検定を使用して分析した.  $P < 0.05$  の値は統計的に有意とみなした. 統計解析は R, Version 3.4.1 を用いて行った.

## 2-2-4 結果

### (1) SMA-AmB の物性

AmB 含有率を DMSO 中における 416 nm での吸光度を用いて算出したところ, SMA-AmB および FITC-SMA-AmB の AmB 含有率は, それぞれ 39.1 w/w% および 41.8 w/w% であった (Figure 12, Table 3). つまり, SMA 1 分子に対して約 1 分子の AmB が結合していることが示された. SMA-AmB 中に含まれる未結合 AmB の存在量を HPLC にて測定したところ, 未結合 AmB の含有率は 0.6 w/w% であり, SMA-AmB 中の AmB は大部分が SMA に結合していることが示された. Figure 13 に示すように, SMA-AmB からの AmB の放出は 48 h 後に最大に達し, 放出率パーセントは, pH 5, 7, および 9 でそれぞれ 5.0, 3.8, および 1.6% であった.

AmB の凝集状態は, 紫外可視分光光度法にて評価した. DMSO に溶解した AmB および SMA-AmB を紫外可視分光光度法にて測定した結果, 372, 391, および 416 nm で強い吸収を示し, 353 nm ではこれらよりも弱い吸収を示した. 単量体の AmB は, これらの特徴を持つスペクトルを示すことが報告されている[40]. 一方, 水溶液中の SMA-AmB の吸光度スペクトルは, 約 350 nm において吸収を示した (Figure 12). 疎水性環境で自己凝集する AmB は, 約 330~350 nm で吸収が増加したスペクトルを示すことが知られている[40,41]. 以上から, SMA 鎖上の AmB は疎水性環境下で一部が自己凝集して存在していることが示された. SMA-AmB の DLS 分析の結果から, 直径が  $3.8 \pm 0.5$  nm であり, ナノ粒子として存在していることが示された (Table 3). Sephadex G-100 を使用した GPC の結果から, SMA-AmB の見かけのサイズは約 52 kDa であることが示された (Figure 14A, B, E).

Table 3. Properties of the conjugates.

Sample	Total AmB <sup>†</sup> (w/w%)	Free AmB <sup>‡</sup> (w/w%)	Diameter (nm)
SMA-AmB conjugate	39.1	0.6	$3.8 \pm 0.5$
SMA	-	-	$3.4 \pm 0.2$
FITC-SMA conjugate	-	-	$5.5 \pm 0.3$
FITC-SMA-AmB conjugate	41.8	1.5	$4.5 \pm 0.9$

<sup>†</sup> Total AmB was measured by UV-visible absorption spectra at 416 nm in DMSO.

<sup>‡</sup> Free AmB was measured by HPLC.

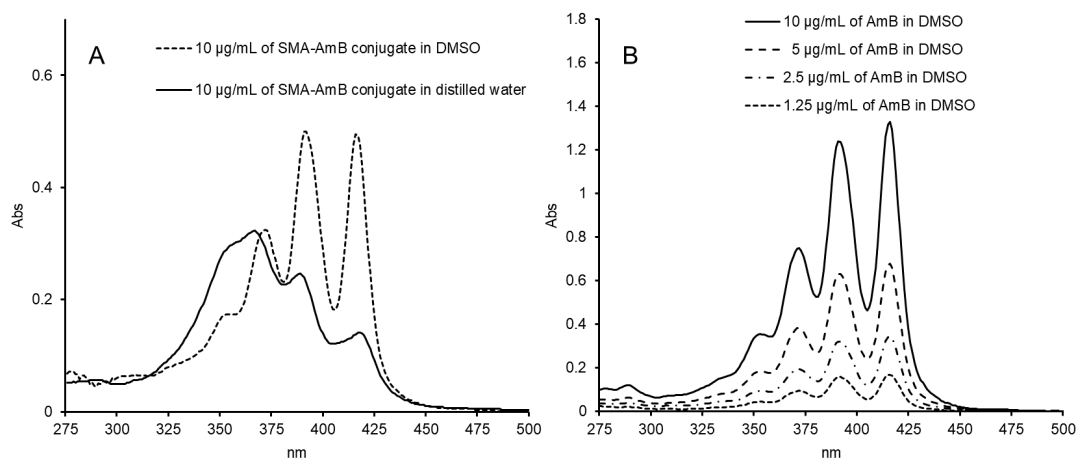


Figure 12. (A) UV-Vis absorption of SMA-AmB conjugate at 10 µg/mL in DMSO and distilled water; (B) UV-Vis absorption of AmB in DMSO at 10, 5.0, 2.5, and 1.25 µg/mL.

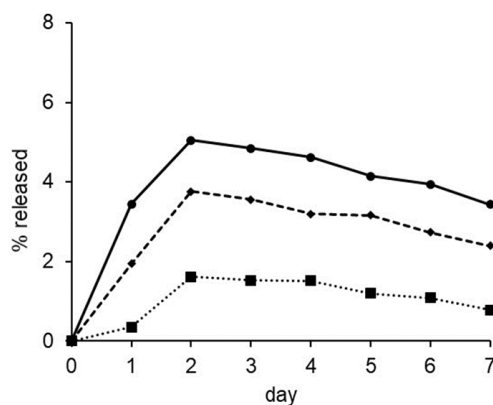


Figure 13. Effect of pH on the release of AmB from SMA-AmB conjugate. AmB release percent from SMA-AmB conjugate was determined in 0.1 M citrate buffer solution at pH 5 (●) and 0.1 M phosphate buffer solution at pH 7 (◆) or pH 9 (■).

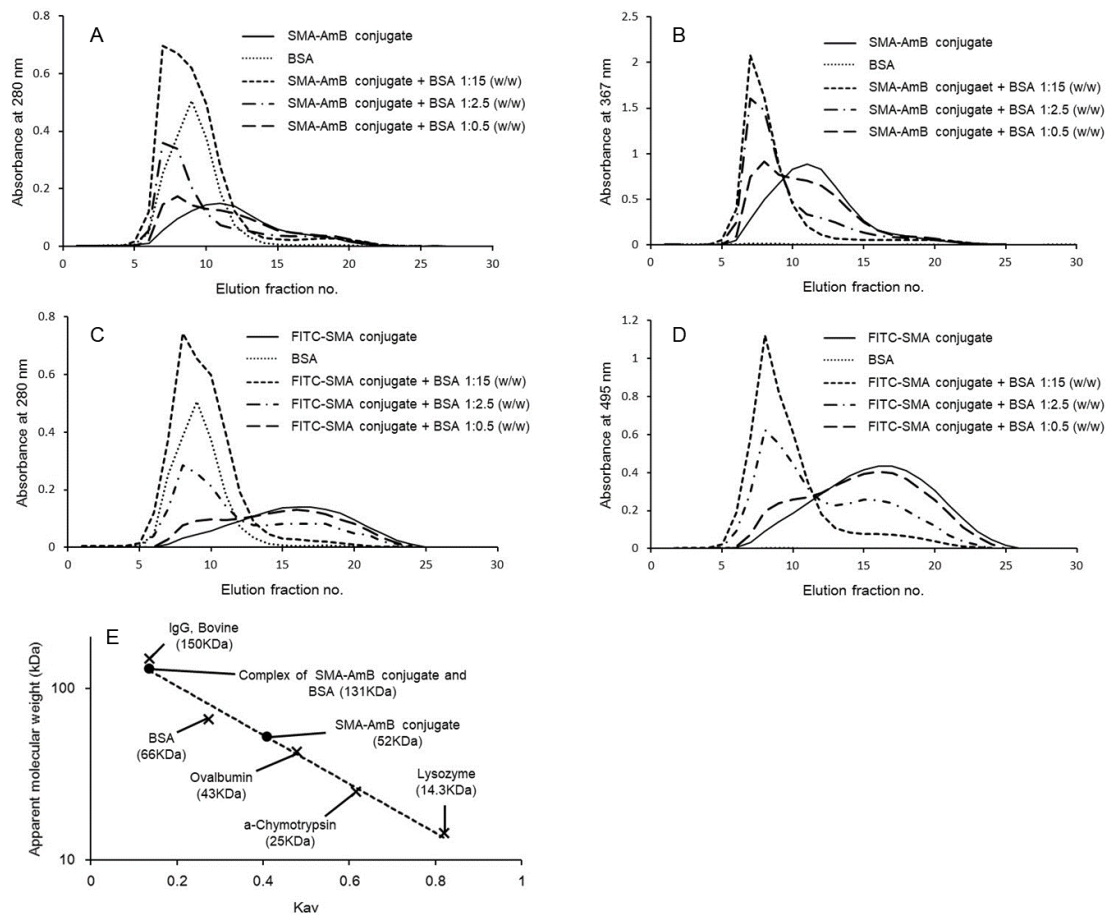


Figure 14. Size exclusion chromatography of SMA-AmB conjugate (A, B) and FITC-SMA conjugate (C, D) in the presence of different concentrations of BSA using Sephadex G-100. The apparent molecular weight of SMA-AmB conjugate in the presence or absence of BSA was calculated using the calibration curve based on the partition coefficient ( $K_{av}$ ) using molecular weight standard markers (E). The eluate was monitored at 280 nm for BSA and SMA (A, C, E), 367 nm for AmB (B), and 495 nm for FITC (D).

## (2) SMA-AmB のアルブミン結合性, 血中滞留性, 真菌局在

SMA-AmB の *in vitro* でのアルブミン結合能力についても GPC で評価したところ, AmB 由来の吸光度は, BSA の濃度依存的にフラクション 8 付近のピークが大きくなった. この結果から, SMA-AmB は BSA への濃度依存的な結合性が示された (Figure 14A, B). SMA-AmB とアルブミンからなる分子は, 約 131 kDa であった. また, FITC-SMA でも同様の結果が得られたことから, これらの分子は SMA 鎖を介してアルブミンと相互作用することが

明らかとなった (Figure 14C, D).

ddY マウス尾静注単回投与時における FITC-SMA-AmB の血中滞留性を Figure 15 に示す。Fungizone®投与後の AmB の血漿濃度と比較して、FITC-SMA-AmB 投与後の FITC-SMA-AmB の血漿濃度は、顕著に高いことが示された。

Figure 16 に真菌における FITC-SMA-AmB の局在を示す。FITC-SMA-AmB は真菌表面に局在していたが、FITC-SMA は真菌に結合しなかった。さらに、AmB の存在は真菌への FITC-SMA の結合性に影響を与えなかった。これらの結果から、SMA-AmB は AmB を介して真菌表面に結合していることが示された。

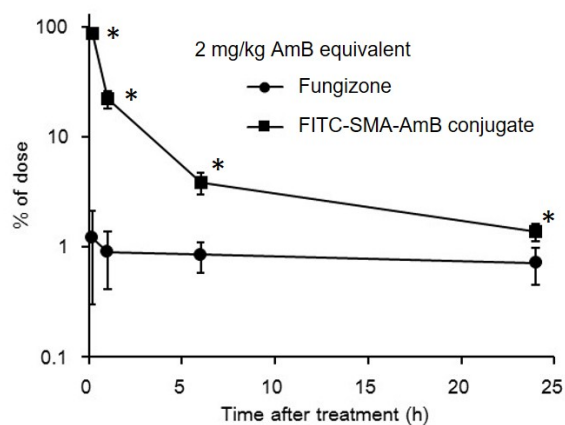


Figure 15. FITC-SMA-AmB conjugate and AmB levels in the blood after a single injection of Fungizone (●) or FITC-SMA-AmB conjugate (■) at an AmB-equivalent dose of 2 mg/kg in mice.

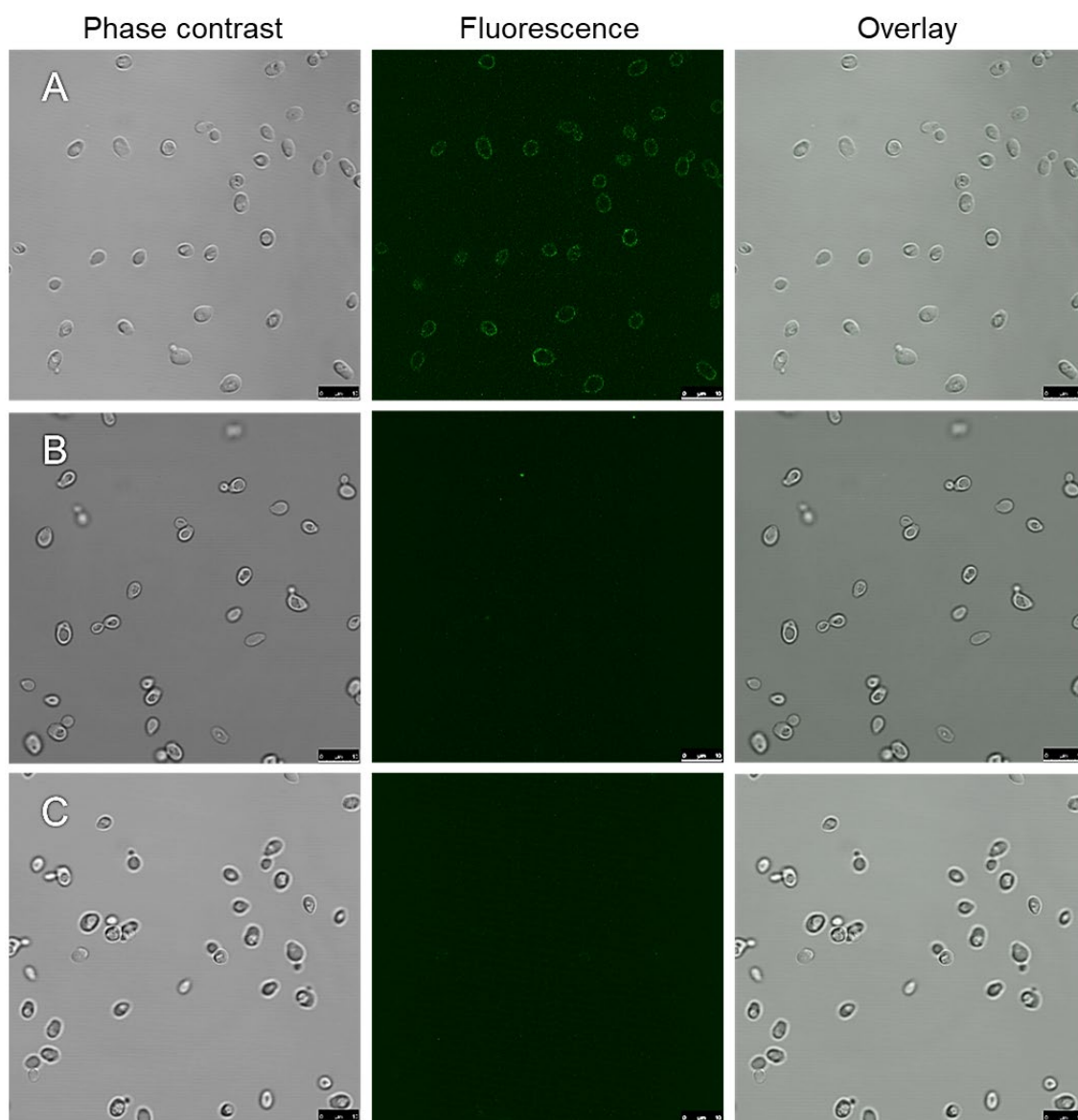


Figure 16. Fluorescence microscopy photos of *S. cerevisiae* treated with 1,000 µg/mL of FITC-SMA-AmB conjugate (A), 1,000 µg/mL of FITC-SMA conjugate (B), and 1,000 µg/mL of FITC-SMA conjugate with 10 µg/mL of AmB (C) for 2 h (the bar is 10 µm).

### (3) 毒性評価

*In vitro* 毒性として、赤血球溶血毒性を評価した (Figure 17)。C50 を示す AmB 濃度は、AmB および Fungizone® でそれぞれ 4.7 および 6.1 µg/mL AmB-equivalent であった。一方、SMA-AmB の溶血毒性は、128 µg/mL AmB-equivalent において溶血性をほぼ示さなかった。以上から、AmB および Fungizone® に比べて、SMA-AmB の毒性は顕著に低減されていた。

*In vivo* 毒性は、ddY マウス尾静注単回投与における LD<sub>50</sub>にて評価した (Table 4). Fungizone®の LD<sub>50</sub>は 5 mg/kg AmB-equivalent であり、既報の LD<sub>50</sub>と一致していた[64]. また、SMA-AmB の LD<sub>50</sub>は 50 mg/kg AmB-equivalent であり、*in vivo* 毒性は Fungizone®の 1/10 まで低減していた.

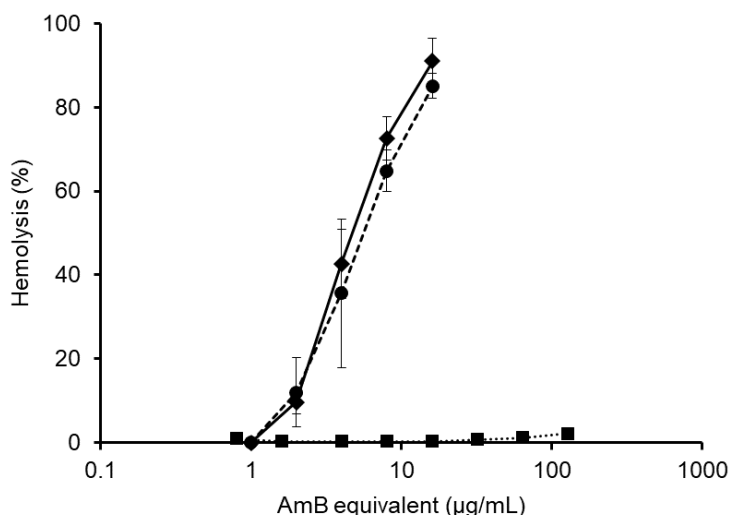


Figure 17. Hemolysis of mouse red blood cells in AmB (◆), Fungizone (●), and SMA-AmB conjugate (■).

Table 4. *In vivo* acute toxicity of SMA-AmB conjugate in ddY mice.

Sample	LD <sub>50</sub> † (mg/kg)	95% Confidence Interval† (mg/kg)
Fungizone	5	3.48–13.3
SMA-AmB conjugate	50	34.8–133

† AmB-equivalent.

#### (4) 薬効評価

*In vitro* 抗真菌活性は、*S. cerevisiae* を用いた MIC の測定にて評価した (Table 5). AmB, Fungizone®の MIC は 0.39 µg/mL AmB-equivalent であった. SMA-AmB の MIC は 1.20 µg/mL AmB-equivalent であった.

*S. cerevisiae* 感染マウスを用いて *in vivo* 抗真菌活性を測定した結果を Figure 18 に示す. SMA-AmB と Fungizone®の投与により、各臓器の CFU は有意に減少した. Fungizone® 0.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub>の 1/10) を投与した群と SMA-AmB 1.5 mg/kg AmB-equivalent



(LD<sub>50</sub>の約 1/30) を投与した群を比較すると、同等の抗真菌作用であることが示された。また、SMA-AmB 5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub>の 1/10) を投与した群は、Fungizone® 0.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub>の 1/10) 投与群に比べて肝臓および腎臓において有意に高い抗真菌活性が示された。

Table 5. *In vitro* antimicrobial activities of SMA-AmB conjugate.

Sample	MIC† (μg/mL)
AmB	0.39
Fungizone	0.39‡
SMA-AmB conjugate	1.20‡
SMA	> 10

† MIC, Minimum inhibitory concentration.

‡ AmB-equivalent.

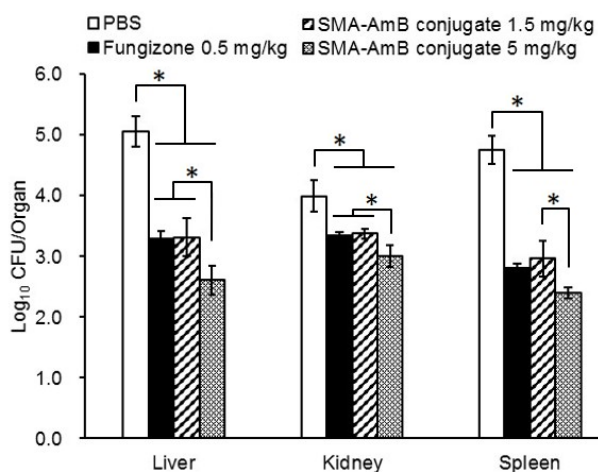


Figure 18. Yeast density (CFU/organ) in the livers, kidneys, and spleens of *S. cerevisiae* strain BY4742-infected DBA/2N mice 48 h after a single injection of PBS, Fungizone 0.5 mg/kg AmB-equivalent, SMA-AmB conjugate 1.5 mg/kg AmB-equivalent, or SMA-AmB conjugate 5 mg/kg AmB-equivalent.

## 2-2-5 考察

SMA は様々な難溶性薬物の水溶性を高めることが示されている。著者らの研究室ではこれまでに、SMA/AmB ミセルおよび But-SMA/AmB ミセルの開発を報告している[58]。しかし、これらのミセルを尾静注投与した場合でも、AmB の血中滞留性は Fungizone® と同程度であった。本研究では、AmB の血中滞留性改善を目的として、AmB を SMA に共有結合した SMA-AmB 製剤を開発した。

紫外可視分光光度法、DLS、および GPC の結果から、SMA 鎖上の AmB は SMA-AmB が形成するナノ粒子の疎水性環境で一部が自己凝集すること、また、SMA 鎖を介してアルブミンと相互作用することが明らかとなった。SMA はアニオン性化合物であり、かつ疎水性化合物であるが、これらの特性を有する化合物は直ちにアルブミンと結合する能力を有することが知られており、この能力は血中滞留性や生体適合性の向上において重要である[65,66]。サイズが 10~100 nm のナノ粒子は、細網内皮系への分布および腎クリアランスが減少するため、血中滞留性が向上することが知られている[67]。DLS 測定の結果から、SMA-AmB 単体では上述のサイズの範囲外であることが明らかとなったが、アルブミン複合体形成能を有する点から、SMA-AmB の血中滞留性は向上することが期待された。そこで、FITC でラベルした SMA-AmB を用いて、マウスにおける血中滞留性を測定した結果、FITC-SMA-AmB の血中滞留性は、Fungizone® を投与した場合よりも顕著に高かった。

*In vitro* 毒性評価として、SMA-AmB の溶血毒性を測定したところ、SMA-AmB の溶血毒性は AmB や Fungizone® と比較して顕著に低減した。一方、*in vitro* 抗真菌活性を MIC にて評価したところ、AmB や Fungizone® と比較して約 1/3 しか低下しなかった。マウスを用いた *in vivo* での検討においても、SMA-AmB の抗真菌活性は Fungizone® に比べて約 1/3 にしか低下せず、LD<sub>50</sub> は 1/10 にまで改善され、*in vitro* と同様の傾向が示された。これらの結果から、AmB を SMA に共有結合した SMA-AmB を用いることで、抗真菌剤の安全域が改善し真菌選択性が向上することが示された。

SMA-AmB は水溶液中で比較的安定であり、SMA-AmB からの AmB の放出性は最大でも 5.0% に過ぎないことから、SMA-AmB 分子自体が抗真菌活性を持っている可能性が示唆された。AmB は、真菌の細胞膜成分であるエルゴステロールに高い親和性を示し、細胞透過性を高めるチャンネルを形成して細胞質成分を漏出させ、真菌を死滅させる。加えて、AmB 表面吸着モデル[68]やステロールスポンジモデル[69]など、単にエルゴステロールと結合す

るだけで真菌を死滅させる作用機序も報告されている。蛍光顕微鏡観察の結果、SMA-AmB は真菌の細胞表面に局在していることが確認されたことから、SMA-AmB は、少なくとも AmB 表面吸着モデルやステロールスポンジモデルによる抗真菌活性を有していることが考えられる。

薬物の機能性高分子への共有結合は、薬物の可溶化、薬物送達制御、薬物動態改善など、多くの利点をもたらす。本研究において、難水溶性薬物である AmB を機能性高分子である SMA に共有結合することにより、これらの利点を享受した AmB ナノ製剤が調製可能となった。

### 第3節 コレステロール修飾スチレン-マレイン酸コポリマーを用いたAmB

#### ホテリシンB搭載ナノ製剤

##### 2-3-1 序論

AmBは、難水溶性の大環状ポリエーテル抗真菌剤であり、深在性真菌感染症治療のゴールドスタンダードである。AmBは細胞膜のステロールと相互作用して膜貫通チャンネルを形成し、一価のイオン漏出に由来する細胞死を引き起こす[70-72]。現在上市されているAmB製剤は、副作用やコストの面において更なる改善が必要である。このことから、毒性が低く費用効果の高いAmB製剤を開発することが重要である[47-53,73,74]。

SMAは生体適合性の高いポリマーでもあり、急性、慢性、催奇形性といった毒性は認められていない[57]。SMAは両親媒性ポリマーであることに加えて、アルブミン結合性を有することから、難水溶性薬物の溶解性、安定性、および薬物動態の改善に利用可能である。また、前駆体であるSMAnhの酸無水物基の高い反応性を利用することにより、さまざまな化合物の導入が可能である。SMAベースの製剤としては、前田らによって開発されたSMANCSがよく知られているところである[75]。

著者らの研究室ではこれまでに、SMAおよびブチルエステル化SMAを使用したAmBナノミセル製剤の開発を報告してきた[58]。これらのSMAを用いることによって、AmBを効果的に可溶化することができたものの、血中滞留性はFungizone®と同程度と、非常に低いものであった。

第2章第2節では、SMAにAmBを共有結合した製剤であるSMA-AmBを開発した。SMA-AmBは血中滞留性が顕著に向上していた。一方、薬効が低下していた点や、薬物に化学修飾を加えていることから新規化合物としての開発方式が適用される点が、デメリットとして挙げられる。

そこで本検討では、高い血中滞留性を有する、薬物に化学修飾を加えていない製剤の開発を目的とし、コレステロール(cholesterol, Cho)などのステロール類とAmBとの間に生じる非共有結合性の相互作用を利用した製剤の開発を着想した。コレステロール修飾SMA(Cho-SMA)を合成し、Cho-SMAを用いたAmBのナノミセル製剤(Cho-SMA/AmB)を調製した。この製剤について、AmB含有率や粒子サイズ、アルブミン結合能、生体内分布、毒性、抗真菌活性の評価を行った。

### 2-3-2 試薬

SMAnh (数平均分子量：～1,600) および BSA はシグマアルドリッチ社より購入した。AmB はケイマンケミカル社より購入した。Cho はナカライテスク社より購入した。Triethylamine, DMSO, DMF, その他の試薬・溶媒は富士フィルム和光純薬社から購入した。Fungizone®はブリストル・マイヤーズスクイブ社より購入した。SDA および YM broth は日本ベクトン・ディッキンソン社から購入した。4週齢雄性成獣 ddY マウスおよび7週齢雄性成獣 DBA/2N マウスは清水実験材料社から入手した。すべての動物には、餌と水を自由に摂取させた。福山大学研究倫理委員会の承認を受け (R 元-動物-1), 福山大学動物実験ガイドラインに準拠して実施した。

### 2-3-3 実験

#### (1) Cho-SMA の合成

Cho 100 mg, SMAnh 100 mg を DMF 5 mL で溶解し, triethylamine を 20  $\mu$ L 加え, 80°C で遮光して 1 週間反応させた。反応後, diethyl ether で析出させ, 遠心分離 (2,500 rpm, 30 min) して沈殿を回収した。この操作を 3 回繰り返して未反応の Cho と triethylamine を除去して精製後, デシケータ中で乾燥させた。こうして得られた生成物に 30 mL の 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> を加えて室温で 16 h 反応させることで, 未反応の無水マレイン酸基を加水分解した。その後, 再生セルロース透析膜 (Spectra/Por 1, 6-8kD, Repligen) を使って蒸留水に対して透析を行った。透析後, 凍結乾燥し, Cho-SMA を得た (Figure 19)。

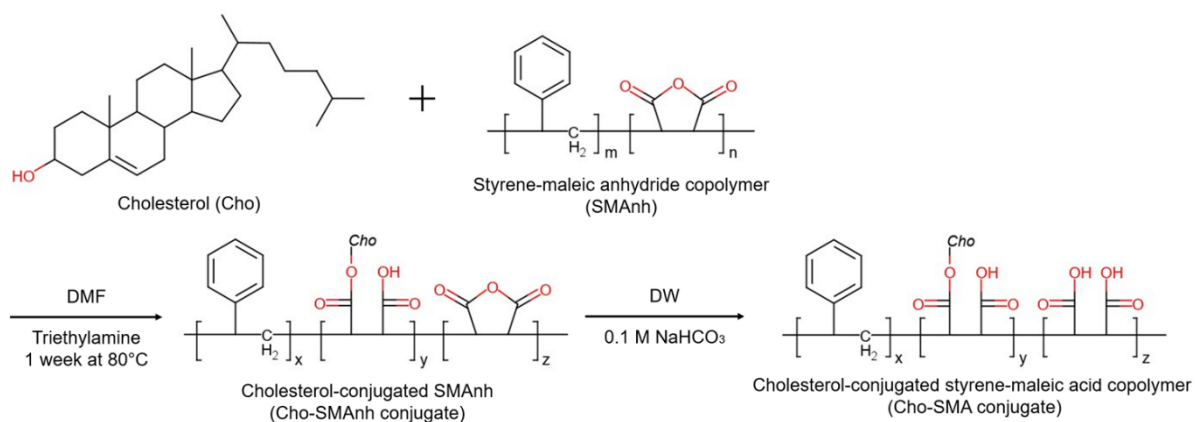


Figure 19. Chemical structures and conjugation pathway. Synthesis of cholesterol-conjugated styrene-maleic acid copolymer (Cho-SMA conjugate).

## (2) HPLC による Cho の定量

測定用カラムは TSKgel ODS80-Tm (4.6 mm×150 mm, Tosoh) column を用いた。移動相は蒸留水と 2-プロパノールを 1:9 (v/v) の割合で混合したものをを用いた。流速 0.6 mL/min, サンプル注入量は 20  $\mu$ L とした。検出には吸光光度計検出器 SPD-20A (Shimadzu) を用い、波長 210 nm で測定した。0.1 M NaOH : DMSO = 9:1 (v/v) の溶液によって Cho-SMA の濃度が 1.0 mg/mL となるよう調製し、85°C で加水分解したものをサンプルとした。

## (3) CMC の測定

Cho-SMA の臨界ミセル濃度 (critical micelle concentrations, CMC) は蛍光色素 *N*-phenyl-1-naphthylamine (PNA) を用いて測定した[31]。PNA のアセトン溶液 ( $1.0 \times 10^{-4}$  M) 20  $\mu$ L を試験管に取り、アセトンを揮発させて PNA の薄膜を作った。この試験管に、Cho-SMA 溶液または SMA 溶液 2 mL を加えた。これを 40°C で 1 h インキュベートし、室温まで冷却した後、励起光波長 340 nm で、蛍光波長 350~600 nm の範囲をスキャンした。蛍光スペクトルは分光光度計 (650-10S, Hitachi) にて測定した。

## (4) Cho-SMA/AmB ナノ粒子の調製

Cho-SMA 50 mg と AmB 20 mg をそれぞれ 5 mL の蒸留水および DMSO に溶解して混合後、再生セルロース透析膜 (Spectra/Por 1, 6-8kD, Repligen) を使って蒸留水に対して透析を行った。透析後、凍結乾燥し、Cho-SMA/AmB を得た。

## (5) HPLC による AmB の定量

測定用カラムは TSKgel ODS80-Tm (4.6 mm×150 mm, Tosoh) column を用いた。移動相は 5 mM EDTA (pH 7.8), メタノール, およびアセトニトリルを 2:4:1 (v/v/v) の割合で混合したものをを用いた。流速 1 mL/min, サンプル注入量は 20  $\mu$ L とした。検出には吸光光度計検出器 SPD-20A (Shimadzu) を用い、波長 405 nm で測定した。

## (6) SEM による形態評価

粒子の形態を SEM で観察した。Cho-SMA/AmB の希薄溶液を試料スタブに塗布し、乾燥させた。その後、サンプルを金コーティングし、走査型電子顕微鏡 (JEOL JSM-6510A, JEOL)

を使用して高真空モードで顕微鏡写真を撮影した。得られた画像は ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を用いてバイナリー化し、認識された粒子の面積から Cho-SMA/AmB のヘイウッド径を算出した。

#### (7) 粒子径の測定

4.0-mW He-Ne レーザー (633 nm) を搭載した Zetasizer Nano ZS (Malvern Instrument) を用い、25°C で 1 mg/mL のサンプルを DLS にて測定した。

#### (8) 紫外可視分光光度測定

Cho-SMA/AmB, Cho-SMA, および SMA を 50 µg/mL の蒸留水に溶解し、分光光度計 (UV-1800, Shimadzu) を使用して紫外可視吸収スペクトルを測定した。また、Cho-SMA/AmB および AmB をそれぞれ 50 µg/mL, 10 µg/mL として DMSO に溶解し、同様に測定した。

#### (9) XRD 測定および DSC による AmB 形態評価

XRD パターンは、Rigaku UltimaIV (Rigaku) を使用して 40 kV にて測定した。AmB の粉末および凍結乾燥した Cho-SMA と Cho-SMA/AmB をそれぞれガラス板上に広げて測定した。データは、2°/min のスキャン速度で 2θ が 5~30°の範囲で収集した。

DSC 曲線は、DSC Q100 (TA Instruments) を使用して得た。各サンプルをアルミナパンに密封し、窒素雰囲気下、25~250°C の範囲で、加熱速度 20°C/min, キャリアガス速度 50 mL/min にて測定した。

#### (10) GPC によるアルブミン結合性評価

GPC は、Sephadex G-100 カラム (φ=10 mm, L=500 mm, GE Healthcare Japan) を使用して実施した。移動相は 0.1 M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を用いた。サンプルとして、PBS に溶解した BSA と Cho-SMA/AmB を最終濃度 0.5 mg/mL で調製し、各サンプル 0.2 mL をカラムにアプライした。溶出液は 2 mL ごとにフラクションとして回収し、280 nm および 330 nm での吸光度を測定した。

#### (11) AmB の体内動態

実験には4週齢の雄性成獣 ddY マウスを用いた。PBS に溶解した Cho-SMA/AmB、もしくは5%グルコースに溶解した Fungizone<sup>®</sup>を尾静脈から投与した。Cho-SMA/AmB 溶液については、投与前にメンブレンフィルター (0.45 µm Millex<sup>®</sup>-LH フィルター, Merck Millipore) にて滅菌処理を施した。投与薬物量は 2 mg/kg AmB-equivalent とした。投与後 10 min, 1 h, 6 h 後に血液を採取し、同時に肝、腎、脾臓を採取した。これらをメタノール中でホモジナイズし、室温で 1 h 静置した後、5,000 rpm, 4°C で 10 min 遠心分離した。各サンプルの上清を 0.45 µm Millex<sup>®</sup>-LH フィルターでろ過後、前述の HPLC システムにて AmB を定量した。

#### (12) *In vitro* 毒性

*In vitro* 毒性はマウス赤血球溶血性にて評価した[38,39]。4週齢の雄性成獣 ddY マウスの後大静脈から血液を採取した。ヘパリン処理した全血を 2,000 rpm で 10 min 遠心分離し、上清と buffy coat を除去し、赤血球を得た。この赤血球を PBS にて洗浄後、希釈した。適切な希釈倍率は、赤血球が水で完全に溶解した際の上清の 576 nm の紫外可視吸光度が約 0.4 となるよう設定した。希釈した赤血球と試料を混合後、37°C で 30 min インキュベートした。このとき、1% BSA となるよう試料を調製した。氷冷後、10,000 rpm で 30 s 遠心分離し、非溶血赤血球を沈殿させ、上清を回収し、576 nm の吸光度を測定した。溶血率は、 $\text{溶血率} = (\text{Abs} - \text{Abs}_0) / (\text{Abs}_{100} - \text{Abs}_0) \times 100$  の式で算出した。Abs, Abs<sub>0</sub>, Abs<sub>100</sub> はそれぞれ試料, PBS, 水でそれぞれ処理した場合の吸光度値である。

#### (13) *In vivo* 毒性

*In vivo* 毒性は静脈内投与による LD<sub>50</sub>の測定により決定した。Cho-SMA の LD<sub>50</sub>は、限度試験により決定した。投与前にメンブレンフィルター (0.45 µm) にて処理を行った。Cho-SMA/AmB および Fungizone<sup>®</sup>の LD<sub>50</sub>値は、アップダウン法[63]を用いて推定した。4週齢の雄性成獣 ddY マウスに様々な用量の試料を尾静脈から注射した。Cho-SMA/AmB は投与前にメンブレンフィルター (0.45 µm) にて処理を行った。初期濃度は、過去の報告[64]から決定された Fungizone<sup>®</sup>の LD<sub>50</sub>の最良推定値と考えられた 5 mg/kg に設定した。後続の動物には、前の動物の生存率に応じて、より高い用量またはより低い用量を投与した。生存している動物は、投与後 14 日間、遅発性の死亡を観察した。投与は、試験した 5 匹の連続した動



物で 4 回の逆転が起こるまで、24 h の一定時間間隔で継続した。アップダウン法で測定した LD<sub>50</sub> は最尤法で算出した。

#### (14) *In vitro* 薬効

*In vitro* 薬効は MIC にて評価した。MIC 測定は *S. cerevisiae* BY4742 を用いて実施した[37]。試料と *S. cerevisiae* BY4742 を YM broth に添加し、28°C で 48 h 培養した後、660 nm の吸光度を測定した。吸光度が 0.03 以下を増殖抑制と判断した。

#### (15) *In vivo* 薬効

*In vivo* 薬効は、*S. cerevisiae* BY4742 感染マウスを用いて、腎臓、肝臓および脾臓における菌数を測定することにより評価した。7 週齢雄性成獣 DBA/2N マウス 16 匹に  $2 \times 10^7$  個の菌を 0.2 mL の PBS で尾静脈に接種し、感染させた。菌濃度は血球計数器を用いて計数した。感染 30 min 後、マウスに Fungizone® および Cho-SMA/AmB (5% グルコースおよび PBS にそれぞれ溶解) を尾静脈から 0.1 mL 単回投与した。PBS 投与群を陰性対照とした。Cho-SMA/AmB 溶液および PBS は、注入前にメンブレンフィルター (0.45  $\mu$ m) にて処理した。投与 48 h 後に標的臓器を無菌的に取り出し、PBS でホモジナイズし、適切な希釈液 0.2 mL を SDA プレートに播種した。生菌数は、30°C で 72 h 培養後の CFU 数として推定した。

#### (16) 統計解析

データは平均値 $\pm$ 標準偏差で表した。2 群間の差は Student の *t* 検定を用いて解析した。複数のグループ間の差は、ANOVA に続いて Tukey の多重比較検定を使用して分析した。P < 0.05 の値は統計的に有意とみなした。統計解析は R, Version 4.0.0 を用いて行った。

## 2-3-4 結果

### (1) Cho-SMA の物性

Cho-SMA の CMC は、疎水性環境中に移行すると蛍光強度が急激に増大する PNA を用いて測定した (Figure 20). 相対蛍光強度の急激な増加を示した濃度から CMC を推定したところ, SMA および Cho-SMA の推定 CMC はそれぞれ 2,000  $\mu\text{g/mL}$  および 220  $\mu\text{g/mL}$  であった. 強塩基にて Cho-SMA から切断された Cho を HPLC にて測定することにより Cho-SMA の Cho 修飾率を算出したところ, Cho-SMA 中に 30.5 w/w% の Cho が含まれており, SMA1 分子に対して約 1.5 分子の Cho が結合していることが示された.

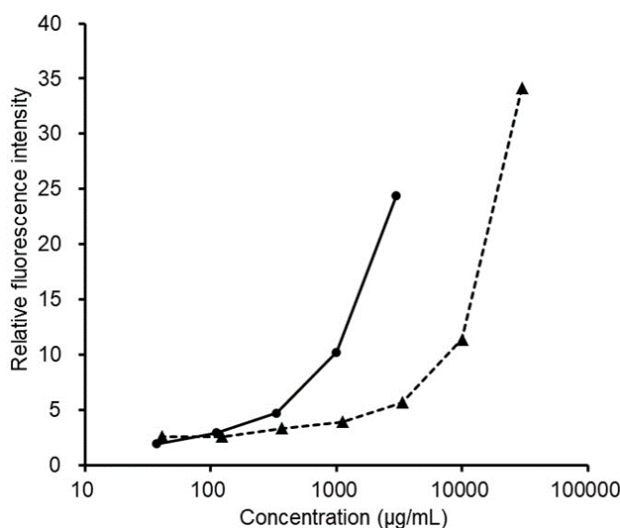


Figure 20. Relative fluorescence intensity of PNA as a function of the logarithm of the concentrations of Cho-SMA conjugate (●) and SMA (▲).

### (2) Cho-SMA/AmB の物性

Cho-SMA/AmB 中の AmB 含有率を HPLC にて測定したところ, 28.3 w/w% であった (Table 6). Cho-SMA/AmB の形態は SEM にて評価した (Figure 21). Cho-SMA/AmB は, 乾燥状態で約 100 nm の球状に凝集していることが示された. 得られた画像をバイナリー化した結果, 47 個の粒子が認識された. これらの粒子のヘイウッド直径の度数分布は Figure 22 に示すとおりであり, 平均直径は  $86.0 \pm 38.5$  nm と算出された.

Cho-SMA および Cho-SMA/AmB の水溶液中での直径を Zetasizer にて測定した結果, それぞれ  $7.5 \pm 3.3$  nm および  $14.5 \pm 5.5$  nm であった (Table 6).

AmB の凝集状態は、紫外可視分光光度法、XRD、および DSC にて評価した。DMSO に溶解した AmB および Cho-SMA/AmB を紫外可視分光光度法にて測定した結果、372, 391, および 416 nm で強い吸収を示し、353 nm ではこれらよりも弱い吸収を示した。単量体の AmB は、これらの特徴を持つスペクトルを示すことが報告されている[40]。一方、水溶液中の Cho-SMA/AmB の吸光度スペクトルは、約 330 nm において強い吸収を示した(Figure 23)。疎水性環境で自己凝集する AmB は、約 330~350 nm で強い吸収スペクトルを示すことが知られている[40,41]。

Figure 24 には、AmB, Cho-SMA, および Cho-SMA/AmB の XRD パターンを示す。AmB 粉末の XRD パターンには、いくつかの回折角度でシャープなピークが認められ、結晶性が示された[42]。一方、Cho-SMA/AmB の XRD パターンでは、AmB の特徴的なピークが認められず、AmB がアモルファス状態であることが示された。AmB, Cho-SMA, および Cho-SMA/AmB の DSC 分析の結果を Figure 25 に示す。AmB 粉末のサーモグラムは、結晶性 AmB 由来である 100.4°C および 202.3°C で吸熱ピークを示した[43]。一方、Cho-SMA/AmB のサーモグラムではこれらの AmB に特徴的なピークは検出されず、Cho-SMA/AmB に結晶相の AmB が存在しないことが示された。また、低温側に新たにピークが認められた。

Table 6. Properties of Cho-SMA conjugate and Cho-SMA/AmB.

Sample	AmB content † (w/w%)	Diameter (nm) ‡
Cho-SMA/AmB	28.3	14.5 ± 5.5
Cho-SMA conjugate	-	7.5 ± 3.3

† AmB content was measured by HPLC.

‡ Diameter was measured by DLS.

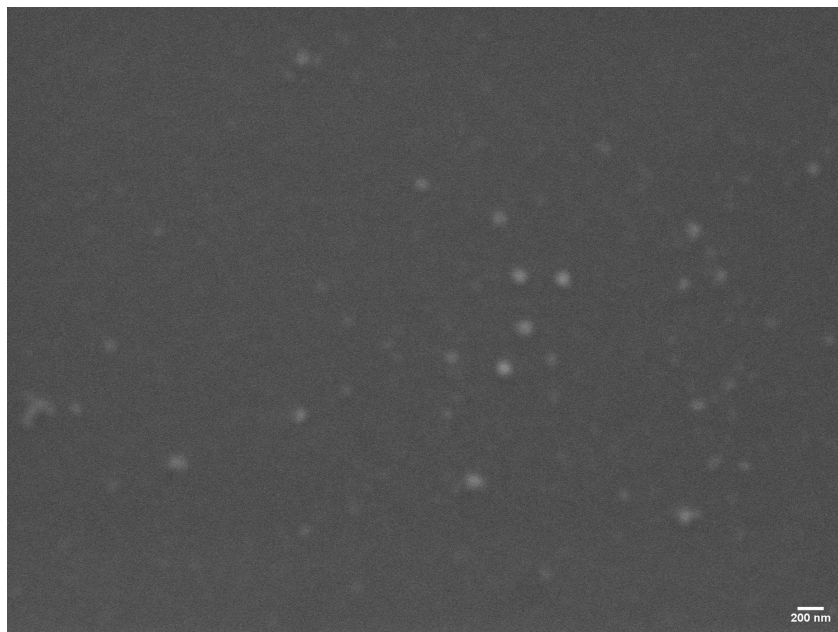


Figure 21. Scanning electron micrograph of Cho-SMA/AmB.

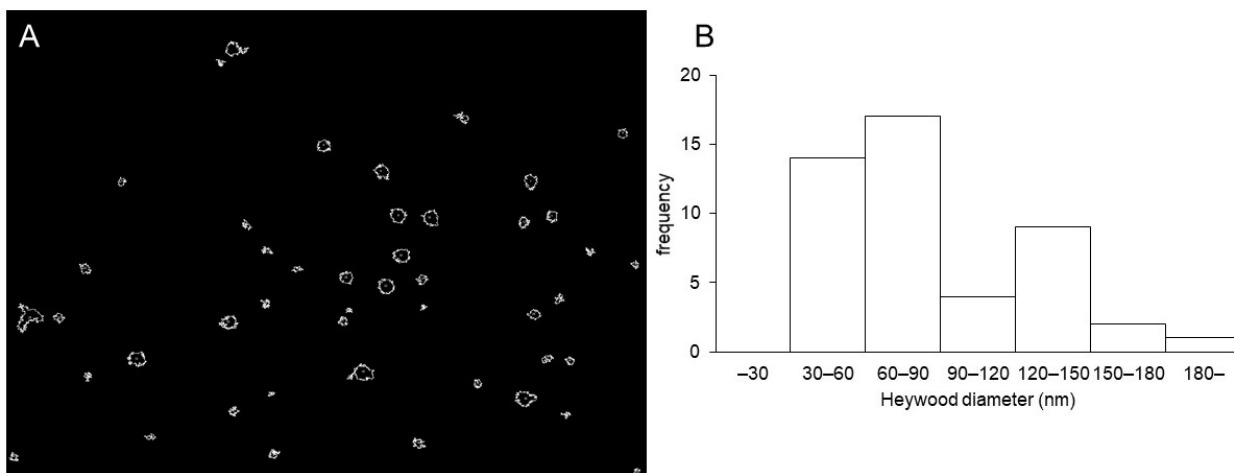


Figure 22. (A) Binarized image of the SEM image in Fig. 21 processed by ImageJ. (B) Frequency distribution histogram of Heywood diameters of Cho-SMA/AmB.

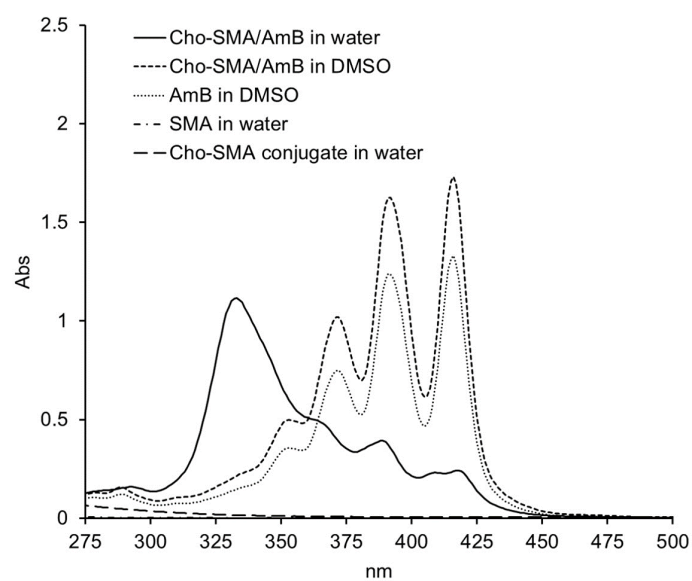


Figure 23. UV-vis absorption of Cho-SMA/AmB, Cho-SMA conjugate, SMA, and AmB. Cho-SMA/AmB were dissolved in water and DMSO at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Cho-SMA conjugate and SMA were dissolved in water at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; AmB was dissolved in DMSO at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

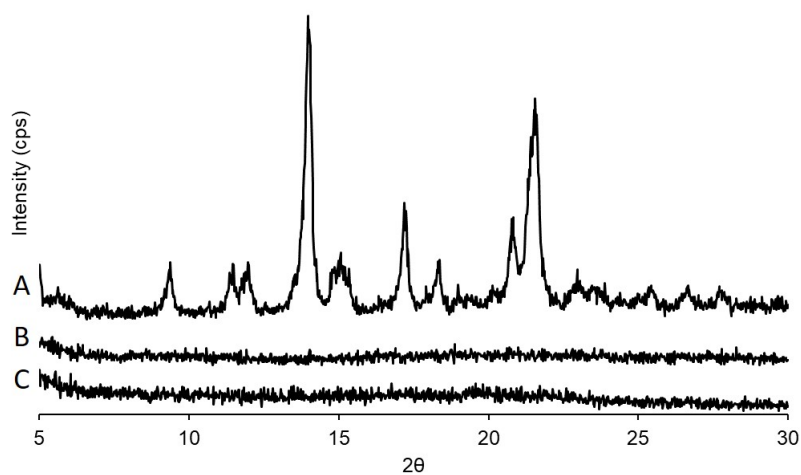


Figure 24. X-ray diffraction of (A) AmB, (B) Cho-SMA conjugate, and (C) Cho-SMA/AmB.

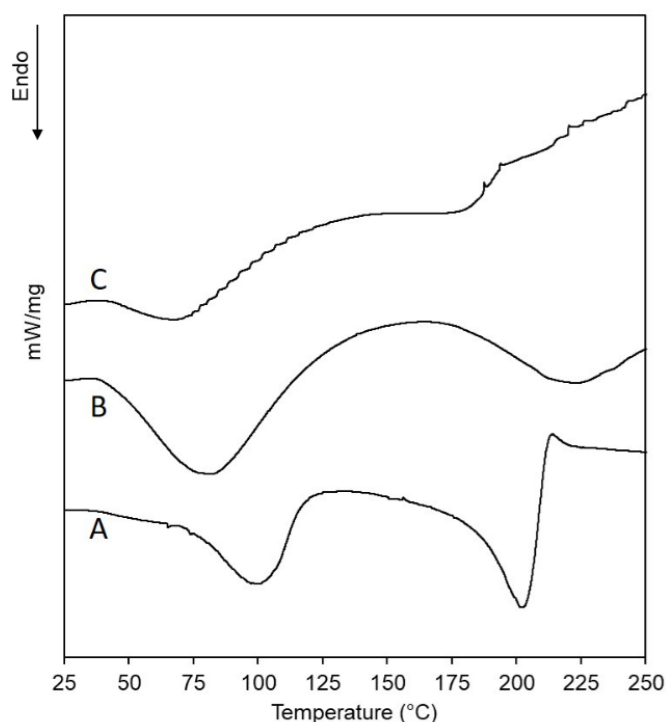


Figure 25. Differential scanning calorimetry patterns of (A) AmB, (B) Cho-SMA conjugate, and (C) Cho-SMA/AmB.

### (3) Cho-SMA/AmB のアルブミン結合性と体内動態

Cho-SMA/AmB の生体内での挙動を明らかにするために、まずアルブミンへの結合性を GPC にて検討した。Cho-SMA/AmB に対して BSA を 1:10 以上の比率で添加した場合には Cho-SMA/AmB の結合量はそれ以上は増加しなかったものの、1:10 までの比率で添加した場合には Cho-SMA/AmB の結合量は増加した (Figure 26)。AmB に対して BSA を添加した場合には、結合性は認められなかった。

ddY マウス尾静注単回投与時における Cho-SMA/AmB の体内動態を Figure 27 に示す。Cho-SMA/AmB 投与後の AmB の血漿濃度は、Fungizone®投与後の血漿濃度よりも高かった。また、Cho-SMA/AmB 投与後の AmB は肝臓に有意に多く分布し、腎臓への分布は Fungizone®よりも有意に少ないことが示された。

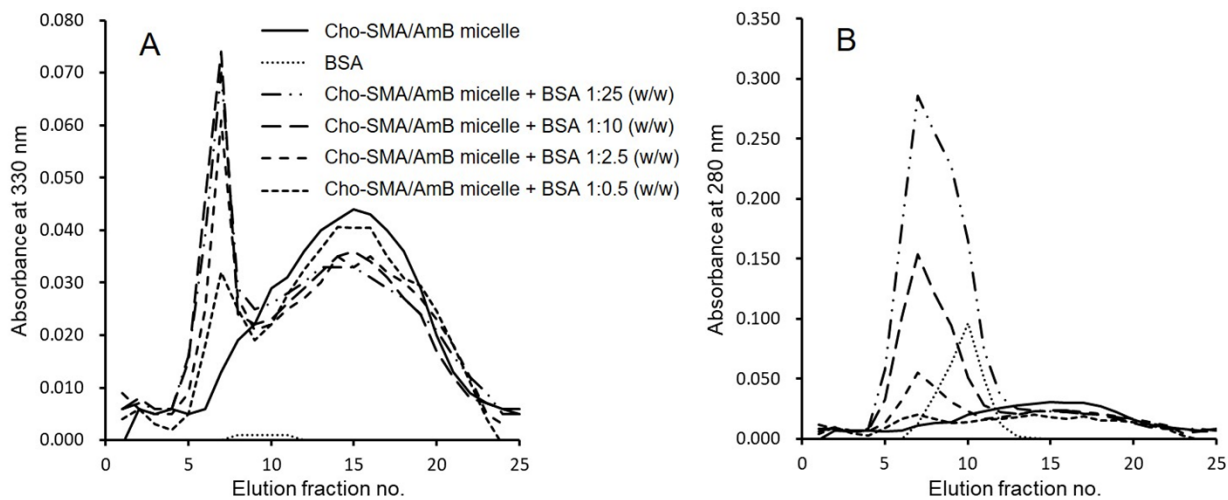


Figure 26. Size exclusion chromatography of Cho-SMA/AmB in the presence of different concentrations of BSA by using Sephadex G-100. Eluate was monitored at 330 nm for (A) AmB and at 280 nm for (B) both protein and Cho-SMA conjugate.

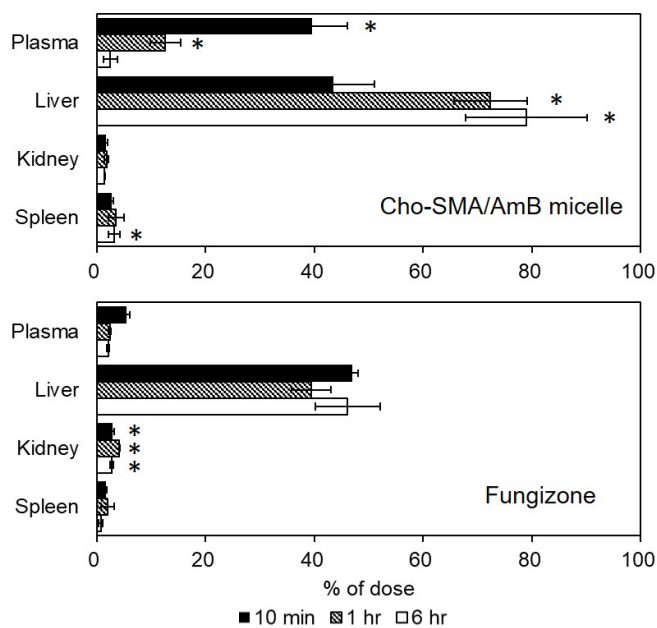


Figure 27. AmB levels in the blood and tissues after a single injection of Cho-SMA/AmB and Fungizone at an AmB-equivalent dose of 2 mg/kg in mice.

#### (4) 毒性評価

*In vitro* 毒性として、赤血球溶血毒性を評価した (Figure 28)。C50 を示す AmB 濃度は、AmB および Fungizone<sup>®</sup>でそれぞれ 4.7 および 6.0  $\mu\text{g/mL}$  AmB-equivalent であった。Cho-SMA/AmB の C50 は 34.8  $\mu\text{g/mL}$  AmB-equivalent であり、毒性は約 1/6 にまで更に低減されていた。Cho-SMA の溶血毒性は、3,000  $\mu\text{g/mL}$  までは認められなかった。

*In vivo* 毒性は、ddY マウス尾静注単回投与における LD<sub>50</sub>にて評価した (Table 7)。Cho-SMA の LD<sub>50</sub>は、500 mg/kg 以上であった。Fungizone<sup>®</sup>の LD<sub>50</sub>は 5 mg/kg AmB-equivalent であり、既報および第 2 章第 2 節の結果と一致していた[64]。また、Cho-SMA/AmB の LD<sub>50</sub>値は 15 mg/kg AmB-equivalent であり、*in vivo* 毒性は Fungizone<sup>®</sup>の約 1/3 まで低減していた。

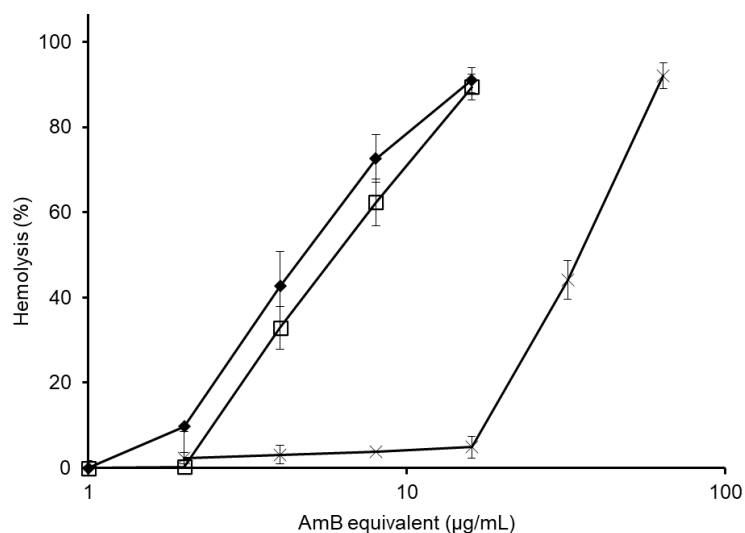


Figure 28. Hemolysis of mouse red blood cells in Cho-SMA/AmB ( $\times$ ), Fungizone ( $\square$ ), and AmB ( $\blacklozenge$ ).

Table 7. *In vivo* acute toxicity of Cho-SMA conjugate and Cho-SMA/AmB in ddY mice.

Sample	LD <sub>50</sub> (mg/kg)	95% Confidence Interval (mg/kg)
Fungizone	5 †	3.48–13.3 †
Cho-SMA/AmB	15 †	9.54–44.0 †
Cho-SMA conjugate	> 500	-

† AmB-equivalent.



(5) 薬効評価

*In vitro* 抗真菌活性は、*S. cerevisiae* を用いた MIC の測定にて評価した (Table 8)。Cho-SMA/AmB, SMA/AmB, AmB, Fungizone® の MIC はすべて 0.39 µg/mL AmB-equivalent であった。

*S. cerevisiae* 感染マウスを用いて *in vivo* 抗真菌活性を測定した結果を Figure 29 に示す。Cho-SMA/AmB と Fungizone® の投与により、各臓器の CFU は有意に減少した。Fungizone® 0.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub> の 1/10) を投与した群と Cho-SMA/AmB 0.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub> の 1/30) を投与した群を比較すると、同等の抗真菌作用であることが示された。また、Cho-SMA/AmB 1.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub> の 1/10) を投与した群は、Fungizone® 0.5 mg/kg AmB-equivalent (LD<sub>50</sub> の 1/10) 投与群に比べて各臓器で有意に高い抗真菌活性が示された。

Table 8. *In vitro* antifungal activity of Cho-SMA/AmB.

Sample	MIC † (µg/mL)
AmB	0.39
Fungizone	0.39‡
SMA/AmB	0.39‡
Cho-SMA/AmB	0.39‡
Cho-SMA conjugate	> 100

† MIC, Minimum inhibitory concentration.

‡ AmB-equivalent.

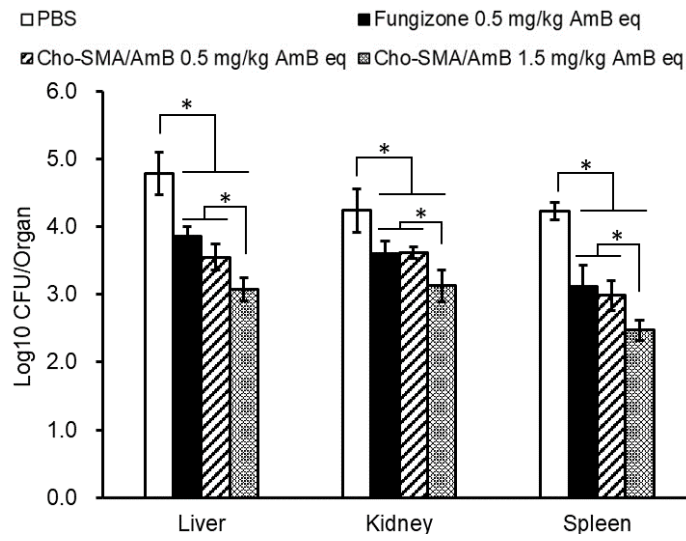


Figure 29. Yeast density (CFU/organ) in the livers, kidneys, and spleens of DBA/2N mice infected with *S. cerevisiae* strain BY4742 after a single injection of PBS, Fungizone 0.5 mg/kg AmB-equivalent, Cho-SMA/AmB 0.5 mg/kg AmB-equivalent, or Cho-SMA/AmB 1.5 mg/kg AmB-equivalent.

### 2-3-5 考察

本研究では、AmB の血中滞留性が改善された、薬物に化学修飾を加えていない製剤の開発を目的として、AmB と相互作用することが知られている Cho を SMA に共有結合した Cho-SMA を合成し、これを用いた AmB ナノ製剤を開発した。

Cho-SMA の CMC は PNA を用いた方法で測定した。CMC の濃度よりも高い濃度で調製された Cho-SMA 水溶液を使用することにより、AmB の水溶性が大幅に改善された製剤が得られた。Cho-SMA/AmB は PBS に対して 35.4 mg/mL (10.0 mg/mL AmB-equivalent) 以上の濃度で溶解することから、AmB 粉末よりもはるかに優れた水溶液への溶解度を有することが示された。

Cho-SMA と AmB の自己組織化によって形成された複合体である Cho-SMA/AmB は、HPLC や紫外可視吸収、DLS、SEM、XRD、および DSC 測定などのさまざまな手法にて評価した。Cho-SMA/AmB の AmB 含有率は 28.3 w/w% であり、これは調製時の AmB と Cho-SMA の重量比 (2:5) から想定される含有率とほぼ一致していた。SEM および DLS にて乾燥状態および水溶液中での粒子径をそれぞれ測定したところ、いずれにおいてもナノ粒子として存在していることが示された。SEM および DLS にて測定した粒子径との間で差が認められた。この粒子径の差は、測定条件の違いによるものと考えられる。真空中で観察される SEM で得られた粒子径よりも、水溶液中で行われる DLS 測定で得られた粒子径が、より生体内の条件を反映していると考えられる。紫外可視吸収、XRD、DSC および CMC 測定の結果から、Cho-SMA/AmB に含まれる AmB はナノ粒子の疎水性環境下においてアモルファス状態で自己凝集して存在していることが示され、ナノ粒子から放出される際の AmB の水への溶解性の改善が示唆された。加えて、Cho-SMA/AmB の DSC サーモグラムにおいて新たにピークが認められたことから、Cho-SMA と AmB は相互作用していることが示唆された。

GPC の結果から、Cho-SMA/AmB の一部は、Cho-SMA を介してアルブミンと複合体を形成し、大きな分子として振る舞うことが示された。サイズが 10~100 nm のナノ粒子は、細網内皮系への分布および腎クリアランスが減少するため、血中滞留性が向上することが知られている[67]。DLS 測定や SME 測定の結果から、Cho-SMA/AmB は上述のサイズの範囲内であることが示され、血中滞留性の向上が期待された。また、飽和するものの、アルブミン複合体形成能を有する点からも、Cho-SMA/AmB は血中滞留性が向上していることが期待

された。そこで、マウスにおける血中滞留性を測定した結果、Cho-SMA/AmB の尾静注投与による AmB の血中滞留性は、Fungizone®を投与した場合よりも顕著に高かった。また、Cho-SMA/AmB は、Fungizone®よりも有意に高い AmB 肝臓分布と有意に低い AmB 腎分布を示した。以上から、肝臓における真菌症において、Cho-SMA/AmB は Fungizone®よりも有用である可能性が示された。このほかに、第 2 章第 2 節で合成した SMA-AmB と比較すると、Cho-SMA/AmB の血中滞留性は低いことが示された。SMA-AmB と比較して Cho-SMA/AmB ではアルブミン結合性飽和が認められた点を考慮すると、SMA を用いたナノ粒子においては、血中滞留性改善に対してアルブミン結合性が大きく寄与している可能性がある。

AmB の重篤な毒性の 1 つとして、赤血球溶血が挙げられる。Cho-SMA/AmB の *in vitro* 溶血性を評価したところ、AmB および Fungizone®と比較して、約 1/6 にまで低下した。以上から、Cho-SMA は AmB を内包することにより溶血毒性を減少することが示された。また、*in vivo* 毒性として LD<sub>50</sub> を評価したところ、Cho-SMA/AmB の単回投与による急性毒性は 1/3 に減少していた。これは、溶血毒性の改善や腎臓への AmB 分布の減少による可能性がある。

Cho-SMA/AmB の *in vitro* および *in vivo* 抗真菌活性は、それぞれ MIC および真菌感染モデルマウスで評価した。AmB はステロール類に結合することが知られており、真菌細胞膜のエルゴステロールに結合することにより真菌細胞死を引き起こす。したがって、Cho-SMA 鎖の Cho が AmB の抗真菌活性に影響を与える可能性が考えられた。しかし、Cho-SMA/AmB の *in vitro* 抗真菌活性は、他の製剤と比較して抑制されていなかった。AmB は、Cho よりもエルゴステロールとの親和性が高いことも知られている[47]。このことから、Cho-SMA/AmB に含まれる AmB は Cho-SMA の Cho 部分よりも真菌細胞膜のエルゴステロールに選択的に結合し、他の製剤と同等の抗真菌活性を示した可能性が考えられる。

*In vivo* での検討結果から、Fungizone®に対する安全域の改善比は、Cho-SMA/AmB および SMA-AmB 共に約 3 倍であり、両製剤とも Fungizone®よりも治療上安全な製剤であることが示された。

高分子キャリアを用いた薬物の内包化は、薬物の可溶化、薬物送達制御、薬物動態改善など、多くの利点をもたらす。難水溶性医薬品と相互作用する物質を SMA に導入することにより、より血中滞留性の高い水溶性ナノミセル製剤が調製可能となった。相互作用物質で修飾された SMA の潜在的なキャリアとしての有用性が示唆された。

### 第3章 総括

AmB は表在性真菌症および深在性真菌症への治療薬として、新たな製剤の開発が望まれている。本論文では、機能性高分子を用いてこれらの真菌症に対する治療薬を新たに調製した。

第2章第1節では、表在性真菌症の1つである真菌性角膜炎を標的とし、粘膜付着性を有する HA を用いた水溶性ナノ点眼製剤の開発を試みた。他の多糖と同様に、疎水化を受けた HA である AHA はナノヒドロゲルと考えられるナノ粒子を形成した。このナノ粒子に AmB を搭載した製剤である AHA/AmB は、ムチンとの結合性を有し、治療域が改善された、水溶性の製剤であった。AHA/AmB は、真菌性角膜炎に対する点眼剤として、条件の適った製剤であると言える。

第2章第2節および第3節では、①様々な誘導体の合成が容易であり、②アルブミン結合性を有することから高い血中滞留性が期待でき、③その両親媒性から難溶性物質を搭載可能な合成高分子である SMA に着目した“SMA Chemistry”を AmB に対して展開した。当研究室ではこれまでに、SMA およびブチルエステル化 SMA に AmB を内包した水溶性ミセル製剤を開発したが、ミセルからの AmB 漏出に由来する低い血中滞留性が欠点として挙げられた。そこで、SMA と AmB との間において、共有結合と非共有結合性相互作用の2種類の結合様式からなる水溶性ナノ製剤をそれぞれ開発した。

共有結合からなる製剤である SMA-AmB は水溶液中でアルブミンと結合し、安定に存在することが示された。しかし、薬物自体に化学修飾を加えてつくられるものは規制上新規化合物としての開発方式が適用されるため DDS 開発においては敬遠されており、この点は SMA-AmB の欠点として挙げられる。一方、非共有結合性相互作用として AmB とステロールの高い親和性を利用した製剤である Cho-SMA/AmB は、アルブミン結合性が飽和していたものの、血中滞留性は Fungizone<sup>®</sup>との比較では顕著に改善した。また、規制上新規化合物としての開発方式は適応されないことから、SMA-AmB の欠点を克服した製剤であった。

本研究を通して、機能性高分子を用いた AmB ナノ製剤開発の一端が拓かれたと考える。今後、機能性高分子の更なる発展は、真菌症をはじめとした様々な疾患に対する薬物治療において、安全かつ効果的な製剤開発をより一層進展させるものと期待される。

## 引用文献

1. Bongomin, F.; Gago, S.; Oladele, R.O.; Denning, D.W. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *J. Fungi* **2017**, *3*, 57.
2. GAFFI. Global Action Fund for Fungal Infections. Fact Sheets. Available online: <https://gaffi.org/media/fact-sheets/> (accessed on Nov 14, 2022).
3. Rodrigues, M.L.; Albuquerque, P.C. Searching for a change: The need for increased support for public health and research on fungal diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006479.
4. Queiroz-Telles, F.; Fahal, A.H.; Falci, D.R.; Caceres, D.H.; Chiller, T.; Pasqualotto, A.C. Neglected endemic mycoses. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e367–e377.
5. Enoch, D.A.; Yang, H.; Aliyu, S.H.; Micallef, C. The changing epidemiology of invasive fungal infections. In *Human Fungal Pathogen Identification: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*; Humana Press Inc., 2017; Vol. 1508, pp. 17–65.
6. Friedman, D.Z.P.; Schwartz, I.S. Emerging fungal infections: New patients, new patterns, and new pathogens. *J. Fungi* **2019**, *5*, 67.
7. Kriengkauykiat, J.; Ito, J.I.; Dadwal, S.S. Epidemiology and treatment approaches in management of invasive fungal infections. *Clin. Epidemiol.* **2011**, *3*, 175–191.
8. Hoenigl, M.; Seidel, D.; Carvalho, A.; Rudramurthy, S.M.; Arastehfar, A.; Gangneux, J.P.; Nasir, N.; Bonifaz, A.; Araiza, J.; Klimko, N.; et al. The emergence of COVID-19 associated mucormycosis: a review of cases from 18 countries. *The Lancet Microbe* **2022**, *3*, e543–e552.
9. WHO Model Lists of Essential Medicines. Available online: <https://www.who.int/groups/expert-committee-on-selection-and-use-of-essential-medicines/essential-medicines-lists> (accessed on Nov 14, 2022).
10. Donovan, R.; Gold, W.; Pagano, J.F.; Stout, H.A. Amphotericins A and B. antifungal antibiotics produced by a streptomycete. 1. In vitro studies. *Antibiot. Annu.* **1955**, *3*, 579–586.
11. Carolus, H.; Pierson, S.; Lagrou, K.; Van Dijck, P. Amphotericin b and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. *J. Fungi* **2020**, *6*, 321.
12. Nett, J.E.; Andes, D.R. Antifungal Agents: Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **2016**, *30*, 51–83.
13. Ehrenfreund-Kleinman, T.; Golenser, J.; Domb, A.J. Conjugation of amino-containing drugs to polysaccharides by tosylation: Amphotericin B-arabinogalactan conjugates. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3049–3057.
14. Duncan, R.; Gaspar, R. Nanomedicine(s) under the microscope. *Mol. Pharm.* **2011**, *8*, 2101–2141.
15. Dang, Y.; Guan, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Mater. Med.* **2020**, *1*, 10–19.

16. Mandal, P.; Shunmugam, R. Polycaprolactone: a biodegradable polymer with its application in the field of self-assembly study. *J. Macromol. Sci. Part A* **2020**, *58*, 111–129.
17. Kurczewska, J. Recent Reports on Polysaccharide-Based Materials for Drug Delivery. *Polymers* **2022**, *14*, 4189.
18. Vlachopoulos, A.; Karlioti, G.; Balla, E.; Daniilidis, V.; Kalamas, T.; Stefanidou, M.; Bikiaris, N.D.; Christodoulou, E.; Koumentakou, I.; Karavas, E.; et al. Poly(Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 359.
19. Atanase, L.I. Micellar Drug Delivery Systems Based on Natural Biopolymers. *Polymers* **2021**, *13*, 477.
20. Zielinska, A.; Carreiró, F.; Oliveira, A.M.; Neves, A.; Pires, B.; Nagasamy Venkatesh, D.; Durazzo, A.; Lucarini, M.; Eder, P.; Silva, A.M.; et al. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules* **2020**, *25*, 3731.
21. Ansari, Z.; Miller, D.; Galor, A. Current Thoughts in Fungal Keratitis: Diagnosis and Treatment. *Curr. Fungal Infect. Rep.* **2013**, *7*, 209–218.
22. Gallis, H.A.; Drew, R.H.; Pickard, W.W. Amphotericin B: 30 Years of Clinical Experience. *Rev. Infect. Dis.* **1990**, *12*, 308–329.
23. Chhonker, Y.S.; Prasad, Y.D.; Chandasana, H.; Vishvkarma, A.; Mitra, K.; Shukla, P.K.; Bhatta, R.S. Amphotericin-B entrapped lecithin/chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *72*, 1451–1458.
24. Li, X.; Nie, S.F.; Kong, J.; Li, N.; Ju, C.Y.; Pan, W.S. A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.* **2008**, *363*, 177–182.
25. Morand, K.; Bartoletti, A.C.; Bochot, A.; Barratt, G.; Brandely, M.L.; Chast, F. Liposomal amphotericin B eye drops to treat fungal keratitis: Physico-chemical and formulation stability. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 150–153.
26. Lapčík, L.; Lapčík, L.; De Smedt, S.; Demeester, J.; Chabreček, P. Hyaluronan: Preparation, structure, properties, and applications. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 2663–2684.
27. Laurent, T.C.; Fraser, R.E. Hyaluronan. *FASEB J.* **1992**, *6*, 2397–2404.
28. Lee, S.Y.; Kang, M.S.; Jeong, W.Y.; Han, D.W.; Kim, K.S. Hyaluronic acid-based theranostic nanomedicines for targeted cancer therapy. *Cancers* **2020**, *12*, 940.
29. Bongiovi, F.; Fiorica, C.; Palumbo, F.S.; Di Prima, G.; Giammona, G.; Pitarresi, G. Imatinib-Loaded Micelles of Hyaluronic Acid Derivatives for Potential Treatment of Neovascular Ocular Diseases. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 5031–5045.
30. Ludwig, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2005**, *57*, 1595–1639.
31. Akiyoshi, K.; Deguchi, S.; Moriguchi, N.; Yamaguchi, S.; Sunamoto, J. Self-Aggregates of

- Hydrophobized Polysaccharides in Water. Formation and Characteristics of Nanoparticles. *Macromolecules* **1993**, *26*, 3062–3068.
32. Akiyoshi, K.; Kobayashi, S.; Shichibe, S.; Mix, D.; Baudys, M.; Kim, S.W.; Sunamoto, J. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. *J. Control. Release* **1998**, *54*, 313–320.
  33. Kaneo, Y.; Taguchi, K.; Tanaka, T.; Yamamoto, S. Nanoparticles of hydrophobized cluster dextrin as biodegradable drug carriers: Solubilization and encapsulation of amphotericin B. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2014**, *24*, 344–351.
  34. Tahara, Y.; Akiyoshi, K. Current advances in self-assembled nanogel delivery systems for immunotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2015**, *95*, 65–76.
  35. Sharma, A.; Taniguchi, J. Review: Emerging strategies for antimicrobial drug delivery to the ocular surface: Implications for infectious keratitis. *Ocul. Surf.* **2017**, *15*, 670–679.
  36. Soliman, G.M. Nanoparticles as safe and effective delivery systems of antifungal agents: Achievements and challenges. *Int. J. Pharm.* **2017**, *523*, 15–32.
  37. Haraguchi, H.; Kataoka, S.; Okamoto, S.; Hanafi, M.; Shibata, K. Antimicrobial triterpenes from *Ilex integra* and the mechanism of antifungal action. *Phytother. Res.* **1999**, *13*, 151–156.
  38. Charvalos, E.; Tzatzarakis, M.N.; Van Bambeke, F.; Tulkens, P.M.; Tsatsakis, A.M.; Tzanakakis, G.N.; Mingeot-Leclercq, M.P. Water-soluble amphotericin B-polyvinylpyrrolidone complexes with maintained antifungal activity against *Candida* spp. and *Aspergillus* spp. and reduced haemolytic and cytotoxic effects. *J. Antimicrob. Chemother.* **2006**, *57*, 236–244.
  39. Lavasanifar, A.; Samuel, J.; Kwon, G.S. Micelles self-assembled from poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl stearate L-aspartamide) by a solvent evaporation method: Effect on the solubilization and haemolytic activity of amphotericin B. *J. Control. Release* **2001**, *77*, 155–160.
  40. Adams, M.L.; Kwon, G.S. Relative aggregation state and hemolytic activity of amphotericin B encapsulated by poly(ethylene oxide)-block-poly(N-hexyl-L-aspartamide)-acyl conjugate micelles: Effects of acyl chain length. *J. Control. Release* **2003**, *87*, 23–32.
  41. Barwicz, J.; Christian, S.; Gruda, I. Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1992**, *36*, 2310–2315.
  42. Choi, K.C.; Bang, J.Y.; Kim, P. Il; Kim, C.; Song, C.E. Amphotericin B-incorporated polymeric micelles composed of poly(D,L-lactide-co-glycolide)/dextran graft copolymer. *Int. J. Pharm.* **2008**, *355*, 224–230.
  43. Zhou, Y.; Fang, Q.; Niu, B.; Wu, B.; Zhao, Y.; Quan, G.; Pan, X.; Wu, C. Comparative studies on amphotericin B nanosuspensions prepared by a high pressure homogenization method and an antisolvent precipitation method. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **2018**, *172*, 372–379.
  44. Borges, O.; Borchard, G.; Verhoef, J.C.; De Sousa, A.; Junginger, H.E. Preparation of coated nanoparticles for a new mucosal vaccine delivery system. *Int. J. Pharm.* **2005**, *299*, 155–166.



45. El-Houssiny, A.S.; Ward, A.A.; Mostafa, D.M.; Abd-El-Messieh, S.L.; Abdel-Nour, K.N.; Darwish, M.M.; Khalil, W.A. Drug-polymer interaction between glucosamine sulfate and alginate nanoparticles: FTIR, DSC and dielectric spectroscopy studies. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* **2016**, *7*, 025014.
46. Ashwinkumar, N.; Maya, S.; Jayakumar, R. Redox-responsive cystamine conjugated chitin-hyaluronic acid composite nanogels. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 49547–49555.
47. Laniado-Laborín, R.; Cabrales-Vargas, M.N. Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev. Iberoam. Micol.* **2009**, *26*, 223–227.
48. Herbrecht, R.; Natarajan-Amé, S.; Nivoix, Y.; Letscher-Bru, V. The lipid formulations of amphotericin B. *Expert Opin. Pharmacother.* **2003**, *4*, 1277–1287.
49. Adler-Moore, J.P.; Proffitt, R.T. Development, characterization, efficacy and mode of action of ambisome, a unilamellar liposomal formulation of amphotericin b. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 429–450.
50. Bruynesteyn, K.; Gant, V.; McKenzie, C.; Pagliuca, T.; Poynton, C.; Kumar, R.N.; Jansen, J.P. A cost-effectiveness analysis of caspofungin vs. liposomal amphotericin B for treatment of suspected fungal infections in the UK. *Eur. J. Haematol.* **2007**, *78*, 532–539.
51. Moen, M.D.; Lyseng-Williamson, K.A.; Scott, L.J. Liposomal amphotericin B: a review of its use as empirical therapy in febrile neutropenia and in the treatment of invasive fungal infections. *Drugs* **2009**, *69*, 361–392.
52. Toh, M.-R.; Chiu, G.N.C. Liposomes as sterile preparations and limitations of sterilisation techniques in liposomal manufacturing. *Asian J. Pharm. Sci.* **2013**, *8*, 88–95.
53. Tomii, Y. Lipid formulation as a drug carrier for drug delivery. *Curr. Pharm. Des.* **2002**, *8*, 467–474.
54. Ha, N.T.H. Determination of triad sequence distribution of copolymers of maleic anhydride and its derivatives with donor monomers by <sup>13</sup>C n.m.r. spectroscopy. *Polymer* **1999**, *40*, 1081–1086.
55. Ha, N.T.H.; Fujimori, K. Theoretical study of the copolymerization of styrene and maleic anhydride prepared in carbon tetrachloride and in N,N-dimethylformamide. *Acta Polym.* **1998**, *49*, 404–410.
56. Trivedi, B.C.; Culbertson, B.M. Alternating Addition Copolymerizations. In *Maleic Anhydride*; Springer US, 1982 ISBN 978-1-4757-0940-7.
57. Winek, C.L.; Burgun, J.J. Acute and Subacute Toxicology and Safety Evaluation of SMA 1440-H Resin. *Clin. Toxicol.* **1977**, *10*, 255–260.
58. Yamamoto, S.; Kaneo, Y.; Maeda, H. Styrene maleic acid anhydride copolymer (SMA) for the encapsulation of sparingly water-soluble drugs in nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2013**, *23*, 231–237.
59. Hasan, A.S.; Socha, M.; Lamprecht, A.; Ghazouani, F. El; Sapin, A.; Hoffman, M.; Maincent, P.;

- Ubrich, N. Effect of the microencapsulation of nanoparticles on the reduction of burst release. *Int. J. Pharm.* **2007**, *344*, 53–61.
60. Yeo, Y.; Park, K. Control of encapsulation efficiency and initial burst in polymeric microparticle systems. *Arch. Pharm. Res.* **2004**, *27*, 1–12.
61. Tsukigawa, K.; Liao, L.; Nakamura, H.; Fang, J.; Greish, K.; Otagiri, M.; Maeda, H. Synthesis and therapeutic effect of styrene-maleic acid copolymer-conjugated pirarubicin. *Cancer Sci.* **2015**, *106*, 270–278.
62. Rubey, K.M.; Brenner, J.S. Nanomedicine to fight infectious disease. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 113996.
63. Bruce, R.D. An up-and-down procedure for acute toxicity testing. *Toxicol. Sci.* **1985**, *5*, 151–157.
64. Larabi, M.; Pages, N.; Pons, F.; Appel, M.; Gulik, A.; Schlatter, J.; Bouvet, S.; Barratt, G. Study of the toxicity of a new lipid complex formulation of amphotericin B. *J. Antimicrob. Chemother.* **2004**, *53*, 81–88.
65. Inoue, M.; Ebashi, I.; Watanabe, N.; Morino, Y. Synthesis of a superoxide dismutase derivative that circulates bound to albumin and accumulates in tissues whose pH is decreased. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6619–6624.
66. Kobayashi, A.; Oda, T.; Maeda, H. Protein Binding of Macromolecular Anticancer Agent SMANCS: Characterization of Poly(styrene-co-maleic acid) Derivatives as an Albumin Binding Ligand. *J. Bioact. Compat. Polym.* **1988**, *3*, 319–333.
67. Zhang, Y.; Pan, J.; Xu, Q.; Li, H.; Wang, J.; Zhang, C.; Hong, G. Synthesis and in vitro experiments of carcinoma vascular endothelial targeting polymeric nano-micelles combining small particle size and supermagnetic sensitivity. *Int. J. Med. Sci.* **2018**, *15*, 498–506.
68. Mouri, R.; Konoki, K.; Matsumori, N.; Oishi, T.; Murata, M. Complex formation of amphotericin B in sterol-containing membranes as evidenced by surface plasmon resonance. *Biochemistry* **2008**, *47*, 7807–7815.
69. Anderson, T.M.; Clay, M.C.; Cioffi, A.G.; Diaz, K.A.; Hisao, G.S.; Tuttle, M.D.; Nieuwkoop, A.J.; Comellas, G.; Maryum, N.; Wang, S.; et al. Amphotericin forms an extramembranous and fungicidal sterol sponge. *Nat. Chem. Biol.* **2014**, *10*, 400–406.
70. Grela, E.; Wiczcór, M.; Luchowski, R.; Zielinska, J.; Barzycka, A.; Grudzinski, W.; Nowak, K.; Tarkowski, P.; Czub, J.; Gruszecki, W.I. Mechanism of Binding of Antifungal Antibiotic Amphotericin B to Lipid Membranes: An Insight from Combined Single-Membrane Imaging, Microspectroscopy, and Molecular Dynamics. *Mol. Pharm.* **2018**, *15*, 4202–4213.
71. Hartsel, S.C.; Hatch, C.; Ayenew, W. How does amphotericin B work?: Studies on model membrane systems. *J. Liposome Res.* **1993**, *3*, 377–408.
72. Resat, H.; Baginski, M. Ion passage pathways and thermodynamics of the amphotericin B membrane channel. *Eur. Biophys. J.* **2002**, *31*, 294–305.

73. Lanza, J.S.; Pomel, S.; Loiseau, P.M.; Frézard, F. Recent advances in amphotericin B delivery strategies for the treatment of leishmaniases. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2019**, *16*, 1063–1079.
74. Faustino, C.; Pinheiro, L. Lipid systems for the delivery of amphotericin B in antifungal therapy. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 29.
75. Maeda, H.; Ueda, M.; Morinaga, T.; Matsumoto, T. Conjugation of Poly(styrene-co-maleic acid) Derivatives to the Antitumor Protein Neocarzinostatin: Pronounced Improvements in Pharmacological Properties. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 455–461.

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切なる直接の御指導、御鞭撻を賜りました恩師 福山 大学薬物動態学研究室 田中 哲郎 教授、金尾 義治 名誉教授に深甚の謝意を表します。

本研究に際し、懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りましたバイオダイナミックス研究所 前田 浩 先生に深く感謝の意を表します。

本研究に際し、有益なる御指導と御助言を頂きました本学薬学部 井上 敦子 教授、町支 臣成 教授、重永 章 教授、竹田 修三 教授、佐藤 雄己 教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御協力と御援助を頂きました本学薬学部 大西 正俊 准教授、本学共同利用センター 稗田 雄三 講師に厚く御礼申し上げます。

研究活動に際し、多大なる御協力を頂きました本学薬学部薬物動態学研究室のみなさまに厚く御礼申し上げます。

最後に、ここまで支え、温かく見守ってくれた両親、家族、友人に深く感謝の意を表します。

## 論文目録

本研究は以下の学術論文のデータを基礎とするものである。

- 1) Synthesis and evaluation of styrene-maleic acid copolymer conjugated amphotericin B., *International Journal of Pharmaceutics*, 2019, **572**, 118719.  
Kengo Banshoya, Yoshiharu Kaneo, Tetsuro Tanaka, Shigechika Yamamoto, Hiroshi Maeda
- 2) Development of an amphotericin B micellar formulation using cholesterol-conjugated styrene-maleic acid copolymer for enhancement of blood circulation and antifungal selectivity., *International Journal of Pharmaceutics*, 2020, **589**, 119813.  
Kengo Banshoya, Yoshiharu Kaneo, Tetsuro Tanaka, Shigechika Yamamoto, Hiroshi Maeda
- 3) Amphotericin B nanohydrogel ocular formulation using alkyl glyceryl hyaluronic acid: Formulation, characterization, and *in vitro* evaluation, *International Journal of Pharmaceutics*, 2021, **610**, 121061.  
Kengo Banshoya, Chiaki Fujita, Yuka Hokimoto, Masatoshi Ohnishi, Atsuko Inoue, Tetsuro Tanaka, Yoshiharu Kaneo