



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士 (医学)
報告番号	甲第1935号
学位記番号	第1365号
氏名	高島 裕之
授与年月日	令和5年3月24日
学位論文の題名	<p>Three-Dimensional Printing of an Apigenin-Loaded Mucoadhesive Film for Tailored Therapy to Oral Leukoplakia and the Chemopreventive Effect on a Rat Model of Oral Carcinogenesis (アピゲニン含有粘膜付着フィルムの3Dプリンタによる口腔白板症に対するオーダーメイド治療と口腔発がんモデルラットに対する化学的予防効果)</p> <p>Pharmaceutics, 14: 1575, 2022</p>
論文審査担当者	主査： 岩崎 真一 副査： 稲垣 宏, 樋渡 昭雄

論文内容の要旨

目的：口腔白板症は WHO によって口腔潜在的悪性疾患と定義されており、5 年で 1.2-14.5%、10 年で 2.4-29.0%の癌化率が報告されています。一般的には外科切除が選択されますが、切除後の口腔機能低下が懸念される場合や広範囲または多発している場合など、治療に難渋するケースがあります。薬剤治療においても一時的な効果は認めるが、再発や副作用が報告されています。そこで、過去に発癌予防効果の可能性について報告させていただいていたアピゲニン（フラボノイド）を用いた口腔白板症に対する新たな発癌予防薬剤の開発および *in vivo* での効果確認を目的に本研究を行いました。

方法：将来的に患者ごとのオーダーメイド薬剤作成を念頭に入れ、3D プリンタを用いた薬物開発を開始しました。基材には過去の報告をもとに、アピゲニン・ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）・カルボキシビニルポリマー（CARBOPOL® 907P）・ポリエチレングリコール（Poloxamer® 407）・水・エタノールを使用しました。まずは、基材に最も適した粘度を調査する目的に、水とエタノールの比率を変えた 5 種類の基材を準備しました。比率の異なるそれぞれの基材に対して粘度測定を行い、3D プリントを行うのに最も適した比率を決定しました。3D プリントは、空気圧で基材を押し出す半固形材料押し出し方式の 3D バイオプリンター（INCREDIBLE）を用いました。形状は、カットして病変部に貼り付けることを考慮して、20mm × 15mm × 1mm のフィルム形態をデザインしました。3D プリントしたのち、室温で 1 週間乾燥させることで完成としています。3D プリントにて製薬したフィルム製剤の物性と 4-ニトロキノリン 1-オキシド（4NQO）を用いて前癌病変を舌に作成したラットに適用した効果の調査を行いました。物性調査は重さや厚みに加え、示差走査熱量測定（DSC）・粉末 X 線回析測定（XRD）・薬物溶出試験を行いました。

ラットは、舌に前癌病変が生じたものを 12 匹準備し、舌にアピゲニン含有フィルムを週に 2 回貼り付けるフィルム群と何もしないコントロール群の 2 群（各 6 匹）に分け、調査を行っております。22 週で屠殺し、舌を摘出しました。屠殺後に舌を摘出し、病理組織学的検討を行いました。

結果：基材は粘度測定の結果をもとに、水とエタノールの比率が 1:1 のものを使用しました。3D プリントしたフィルムは厚み $39.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、重さ $159.7 \pm 11.5\text{mg}$ 、薬物量 $163.0 \pm 11.4 \mu\text{g}$ といった結果でした（ $n=5$ ）。DSC ではアピゲニン含有フィルムでは吸熱ピークなどの熱現象は認められませんでした。XRD においてもアピゲニン含有フィルムでは特徴的なピークを示しませんでした。これらの結果から、フィルム製剤が非晶質状態であることが示唆されました。人工唾液を用いた薬物溶出試験では、最終的には $82.9 \pm 8.1\%$ の薬物が溶出されていました。この結果から、フィルム製剤は口腔内の唾液を吸収して膨潤し、薬物を局所的にコントロールしながら放出することが確認されました。舌に前癌病変ができたラットを用いての調査では、肉眼的にも明らかにコントロール群の舌に腫瘍を認めました。HE 染色での評価は過去の文献を参考に、Normal、Hyperplasia、Dysplasia、Carcinoma に群分けを行っています。コントロール群では全てのラットが Carcinoma であったのに対し、フィルム群では Carcinoma は半数といった結果で、有意差が認められました。また、Ki-67、NF- κ B、8-OHdG による免疫染色も行いました。Nanozoomer および ImageJ を用いて染色領域の比較を行ったところ、染色面積は Ki-67 と 8-OHdG では有意差を認めましたが、NF- κ B では有意差は認められませんでした。

結論：口腔白板症に対して、3Dプリンタを用いて発癌予防効果が期待できるフィルム製剤を製薬しました。ラットの前期癌病変に対しては発癌を抑制する効果が示唆されました。より詳細なデータ収集やフィルム物性に改善の余地はありますが、口腔白板症に対する新たな予防もしくは治療法となりうると考えられます。将来的な臨床の現場では、3Dプリンタを用いることで、疾患の画像データなどをもとに、個人に合わせた形状や薬物量を調整することも可能であると考えられます。

論文審査の結果の要旨

【目的】 Leukoplakia などの口腔潜在的悪性疾患に対して発癌予防効果を有する新たな薬物治療法を開発すること。

【方法】 mRNA 成熟阻害活性を有する食品化合物であるアピゲニン（フラボノイド）を候補とし、これを口腔粘膜と長時間接触させるために、3D プリンタを用いて個々の患者の口腔形状にフィットするオーダーメイド型の徐放性外用貼付剤を開発することにした（当学薬学部薬物送達分野との共同研究）。粘度測定による基材検討を行ったのち、半固形材料押し出し方式 3D バイオプリンタを用いて 20mm×15mm×1mm のフィルム製剤を作製した。このフィルム製剤の重さや厚みを測定し、示差走査熱量測定（DSC）・粉末 X 線回折測定（XRD）・人工唾液による薬物溶出試験を行った。次にラット舌前癌病変モデルを用いて、本フィルム製剤を週に 2 回貼付したフィルム群と、何も貼付しない対照群（各 6 匹）の比較検討を行った。最終的にラットの舌は摘出し、免疫染色等を行って病理組織学的に検討を行った。

【結果】 粘度測定にて最適と判断されたインクを用いて 3D プリントしたフィルム製剤は厚み $39.3 \pm 2.7 \mu\text{m}$ 、重さ $159.7 \pm 11.5 \text{ mg}$ 、薬物量 $163.0 \pm 11.4 \mu\text{g}$ であった。DSC において吸熱ピークなどの熱現象は認められず、XRD においても特徴的なピークを示さなかったことから、フィルム製剤は非晶質状態であることが示唆された。薬物溶出試験では $82.9 \pm 8.1\%$ の薬物溶出を確認した。フィルム製剤は口腔内の唾液を吸収して膨潤し、貼付面のみに局所的に薬物を放出することが確認された。ラット舌前癌病変モデルでは肉眼的にも、また HE 標本においても明らかな違いを認め、フィルム群での発癌は対照群と比較すると半数に抑えられていた ($p < 0.05$)。Ki-67、NF- κ B、8-OHdG による免疫染色では、Image J を用いて染色エリアを数値化し SPSS を用いて比較したところ、NF- κ B では有意差を認めず、Ki-67 と 8-OHdG では有意差を認めた。

【結論】 今回開発したフィルム製剤はラット舌前癌病変モデルに対して発癌を抑制する効果が示された。より詳細なデータ収集やフィルム物性に改善の余地はあるが、口腔潜在的悪性疾患に対する新たな治療法になり得ると考えられた。

【審査の内容】

申請者からの約 20 分間のプレゼンテーション後、主査の岩崎教授から①HE 標本における発癌部位に関して ②統計学的解析方法について ③対照群の条件設定について ④癌化率が低い疾患に対して長期間薬剤を使用する意義について等、計 7 項目の質問がなされた。第一副査の稲垣教授からは①口腔白板症の定義に関して ②異型の有無による癌化率の差異や治療方針の違いについて ③口腔上皮性異形成の分類方法について ④抗腫瘍活性が強い物質を用いた理由等について等、計 12 項目の質問がなされた。第二副査の樋渡教授からは①アピゲニンの人体への副作用について ②フラボノイドの中でもアピゲニンを選んだ理由について ③製剤開発に 3D プリンタを用いた理由について ④将来的な展望について等、計 13 項目の質問がなされた。これらの質問に対して、一部返答に窮する場面も見られたが、概ね適切な回答が得られた。従って申請者は学位論文の内容を理解、把握しているとともに、専攻分野に関する知識を習得しているものと判断された。アピゲニンを用いた新規製剤開発を目的とした本研究結果は、口腔潜在的悪性疾患の発癌予防に寄与する可能性があり、臨床応用へと発展させるための基盤になり得ると評価された。

以上をもって本論文の筆頭著者は博士(医学)の称号を与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 岩崎 真一

副査 稲垣 宏

樋渡 昭雄