

P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシソルピシン内封PEG修飾リポソームによる
*in vivo*抗腫瘍効果とその機構解析

○大河原 賢一、運 敬太、檜垣 和孝、木村 聰城郎
(岡山大院・医歯薬)

【目的】抗がん剤による長期的ながん化学療法において、がん細胞が薬剤に対する耐性を獲得し、その有効性が徐々に低下することが臨床的にも認められ、がん治療における重大な問題となっている。種々提唱されている耐性化メカニズムの中でも、薬剤排出トランスポーターであるP-糖タンパク質 (P-gp) のがん細胞上での発現誘導が、がん治療上での耐性獲得における主要な要因と考えられている。このP-gpの発現誘導により耐性化したがん細胞に対する耐性克服を目的として多くのアプローチが試みられているが、依然として十分な効果が認められるには至っていない。そこで本研究では、マウス結腸がん由来がん細胞Colon-26 (C26/control) を用いて、抗がん剤ドキシソルピシン (DOX) に対して耐性を示すP-gp高発現株 (C26/DOX) を樹立し、それにより作成した固形がんモデルマウスにおける耐性克服を目的として、種々の検討を行った。

【実験方法・結果・考察】実験に用いるP-gp高発現株C26/DOXは、DOXを添加した条件下でC26/controlを長期的に培養し、その添加濃度を段階的に増加することにより樹立した。C26/DOXのDOXに対する*in vitro*感受性をMTTアッセイにより評価した結果、C26/DOXに対するDOXのIC₅₀値は、C26/controlと比較して約250倍高い値を示し、C26/DOXがDOXに対して高い耐性を獲得していることが明らかになった。次にDOX添加後に細胞の蛍光顕微鏡観察を行った結果、C26/DOXの細胞内DOX量は、C26/controlと比較して顕著に低いことが明らかとなった。またC26/DOXでは、P-gp発現量がC26/controlと比較して顕著に高いことが示され、さらにC26/DOXにおいては、P-gp阻害剤であるベラパミル共存下で、DOXに対する感受性の著しい増大が認められたことから、C26/DOXのDOXに対する低い感受性には、細胞膜上に高発現したP-gpによるDOXの細胞外への排出が強く関与していることが明らかとなった。次に、樹立したC26/DOXにより作成した固形がんモデルマウスを用いて、DOX内封PEG修飾リポソームによる*in vivo*抗腫瘍効果を評価したところ、*in vitro*での結果とは異なり、C26/control固形がんモデルマウスと同程度の高い*in vivo*抗腫瘍効果が認められた。一方で、DOX内封PEG修飾リポソーム投与後に腫瘍組織内で誘発されるアポトーシスの程度が、C26/DOX固形がんモデルマウスではC26/control固形がんモデルマウスと比較して顕著に低いことが明らかとなり、C26/DOX固形がんモデルマウスにおいて認められた*in vivo*抗腫瘍効果に、DOXのがん細胞への直接作用以外の機構が関与している可能性が考えられた。そこで、腫瘍組織内の血管内皮細胞に対するDOXの殺細胞効果の関与を考え、まず血管内皮細胞のモデルとして汎用されるヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (HUVEC) のDOXに対する*in vitro*感受性を評価した。その結果、HUVECのDOXに対する感受性は、C26/controlとほぼ同程度に高いことが明らかとなった。さらに腫瘍組織内の血管内皮細胞とアポトーシスを起こしている細胞の蛍光二重染色を行ったところ、C26/DOX固形がんモデルマウスの腫瘍組織内においては、血管内皮細胞とアポトーシスを起こしている細胞に分布の一致が認められる特徴的な箇所が高い割合で認められた。これらの結果は、C26/DOX固形がんモデルマウスにおいて認められた高い*in vivo*抗腫瘍効果に、腫瘍組織内に到達したDOXによる腫瘍組織内血管内皮細胞に対する殺細胞効果、及びそれに伴う血管新生の阻害作用が関与していることを強く示唆するものである。

血管新生阻害薬のエマルジョン製剤化とその抗腫瘍効果の評価

大河原 賢一、運 敬太、中尾 隆明、檜垣 和孝、木村 聡城郎

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

現在、がん化学療法における全く新しい作用機序を有した新規治療薬として、抗血管新生薬が注目を集めている。本研究では、血管新生阻害作用を有する化合物として SU5416 (1,3-dihydro-3-[(3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylene]-2H-indol-2-one) を選択し、種々の検討を行った。まず SU5416 水溶液の *in vitro* 細胞増殖抑制効果を評価したところ、血管内皮細胞の増殖を顕著に抑制する一方で、がん細胞の増殖には影響を与えないことが示され、その作用の血管内皮細胞選択性が示された。そこで EPR 効果による腫瘍組織へのパッシブターゲティングが期待できる製剤として、SU5416 を内封した PEG 修飾エマルジョン製剤を調製し、その静脈内投与後の *in vivo* 抗腫瘍効果を固形がんモデルマウスにおいて評価したところ、コントロール群と比較して顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められた。

Formulation and evaluation of PEGylated niosomes for targeted drug delivery

Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikuro Kimura

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences,

Division of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Japan

Niosomes are defined as non-ionic surfactant (NIS)-based vesicles and are formed from the self assembly of non-ionic amphiphiles in aqueous media. In this study, we prepared various PEGylated niosomes composed of NIS (Brij 72, Span 20 or Tween 60), cholesterol, dicetyl phosphate and PEG2000-DSPE, and evaluated their biodistribution characteristics after intravenous administration into rats. It was confirmed that all of the niosomes prepared stably incorporated calcein. In addition, in-vivo study demonstrated that PEGylation dramatically increased the AUC values of the niosomes composed of Brij or Span. On the other hand, the same treatment did not significantly affect the AUC value of niosome composed of Tween. We are now investigating the hepatic disposition characteristics of these niosomes.

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF NOVEL NANOPARTICLE FORMULATION OF PACLITAXEL

Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura
Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

Paclitaxel (PTX) is a powerful chemotherapeutic agent against wide range of cancers. Because of its poor water solubility, PTX is dissolved in the mixture of ethanol and Cremophor EL (1:1, v/v) for its clinical use. However, this formulation is associated with a number of pharmacological and pharmacokinetic concerns including the occurrence of serious hypersensitivity reactions in cancer patients. To overcome these problems, we examined o/w emulsion and liposome as a candidate of PTX nanocarrier. Emulsion was composed of egg phosphatidylcholine (EPC), Tween 80 and the mixture of triglycerides as surfactant, co-surfactant and oil component, respectively. Liposome was prepared with hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and cholesterol. To improve in-vivo behavior of these nanoparticles, PEGylation was also conducted. Moreover, to separately evaluate the in-vivo disposition characteristics of nanocarrier itself and the drug included, we used nanoparticles labeled with ^3H -cholesteryl hexadecylether (^3H -CHE) containing ^{14}C -PTX. Although PEGylation significantly prolonged the blood circulation time of these nanoparticles after intravenous injection, AUC of PEG liposome was much larger than that of PEG emulsion. In addition, PEG liposome was found to be more stably incorporating PTX in the in-vivo situation while a rapid release of PTX from PEG emulsion was observed. On the other hand, in-vitro MTT assay indicated that cytotoxicity of PEG liposomal PTX was less potent than PTX formulated in PEG emulsion, reflecting the slower release of PTX from PEG liposome. These results suggest that PEG liposome would be a suitable nanocarrier for PTX. Now we are evaluating anti-tumor activity of PTX-loaded nanoparticles in a solid tumor-bearing mice model.

IMPROVEMENT OF IN-VIVO DISPOSITION CHARACTERISTICS AND ANTI-TUMOR ACTIVITY OF PEG LIPOSOMAL DOXORUBICIN BY rHSA CONJUGATION ONTO SURFACE OF LIPOSOME

Ryosuke Watari¹, Shuhei Nishiguchi¹, Ken-ichi Ogawara¹, Jun-ichi Yokoe², Kazutaka Higaki¹, Toshiya Kai², Makoto Sato² and Toshikuro Kimura¹

¹Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan and ²Pharmaceutical Research and Development Laboratory, Nipro Corporation, 3023 Noji-cho, Kusatsu, Shiga 525-0055, Japan

In a series of our previous studies, we have demonstrated that conjugation of recombinant human serum albumin (rHSA) onto the surface of polyethylene glycol (PEG) liposome prolonged the blood circulation time after intravenous administration in rats. Among various conjugation methods we have applied for rHSA conjugation, the modified-SPDP method provided the rHSA-conjugated PEG (rHSA/PEG) liposome showing the highest AUC. Since AUC is one of the most important driving forces for the better tumor targeting of liposomal drug based on enhanced permeability and retention (EPR) effect, we selected the modified-SPDP method to prepare rHSA/PEG liposome for further investigations. In the present study, we evaluated the in-vivo disposition characteristics and anti-tumor activity of rHSA/PEG liposomal doxorubicin (DOX) in solid tumor-bearing mice. It was shown that rHSA/PEG liposome exhibited longer blood circulation time, lower affinity to reticuloendothelial system (RES) and higher disposition into tumor tissue than PEG liposome. These pharmacokinetic advantages obtained by rHSA conjugation were also observed for liposomal DOX. Correspondingly, rHSA/PEG liposomal DOX exhibited higher anti-tumor activity than PEG liposomal DOX. These results clearly indicate that rHSA conjugation onto the surface of PEG liposome would be a useful approach to increase the effectiveness of PEG liposomal DOX.

第18回日本光線力学学会学術講演会

The 18th Annual Meeting of the Japan Photodynamic Association

プログラム・抄録集

会 期 2008年6月14日(土)・15日(日)

会 場 テレビアホール(名古屋市)

大会長 松本 義也(愛知医科大学皮膚科学講座)

事務局長 渡辺 大輔



PDTの標準化に向けて



6 早期照射による光増感物質 PAD-S31 の低用量化の検討

○岡本 芳晴¹、田邊 茂之²、柄 武志¹、南 三郎¹、中島 進³、仲江 良則⁴、坂田 功⁴

¹鳥取大学、²帯広畜産大学、³森山メモリアル病院、⁴光ケミカル研究所

PAD-S31 は4つのピロリン環を有するクローリン誘導体であり、動物用光増感剤として開発中の物質である。近年、光増感剤投与後、早期に光照射することにより従来よりも低用量で抗腫瘍性を発揮することが他の光増感剤で報告されてきた。この早期照射は新生血管をターゲットとしたものであり、腫瘍組織内の新生血管をシャットダウンさせることにより抗腫瘍性を発揮させることを期待したものである。今回、PAD-S31 においても早期照射による抗腫瘍性の有無およびそれに伴う低用量化の可能性について検討した。

材料および方法：腫瘍モデルとして Colon26 をマウス皮下に移植し、腫瘍直径が8mm に達した時点で実験に供した。1) 早期照射による抗腫瘍性の検討：PAD-S31 を1-10 mg/kg 担癌マウスの血管内に投与後、15分、1時間、3時間後に組織内照射 PDT を実施した。照射条件は、670 nm の半導体レーザー（浜松ホトニクス）を用いて150 mW/cm、150J/cm とした。照射後14日間、経時的に腫瘍の大きさを計測した。効果判定は、次の4段階に分類した；CR（完全消失）、PR（50%以上体積減少）、SD（50%未満の体積増減）、AD（50%以上の体積増加）。また血清中および腫瘍組織中の PAD-S31 濃度を蛍光分光光度計を用いて測定した。2) 早期照射後の腫瘍の組織学的分析：PAD-S31 を2 mg/kg 担癌マウスの血管内に投与後、15分または3時間後に組織内照射 PDT を実施した。PDT 実施後、6時間目に蛍光物質である Hoechst33342 (Sigma) を血管内投与し、すぐに動物を安楽殺した。常法に従って腫瘍組織を摘出後、凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡で観察した。

結果：1) 早期照射による抗腫瘍性の検討：PAD-S31 を10 mg/kg 投与後3時間目に照射した群（10mg/kg-3h 群）では、4例中CR 2例、PR 1例、SD 1例だった。5 mg/kg-3h 群では一時的に腫瘍は生長が抑制されたが、最終的には全例 AD となった。5 mg/kg-1h 群では、4例中CR およびPR が各1例、AD 2例だった。2 mg/kg-3h 群では全例 AD だった。2 mg/kg-1h 群では、CR 1例のみだったが、2 mg/kg-15min 群では、全例 CR だった。1 mg/kg-15min 群ではPR 1例で残りは AD だった。

血清中の PAD-S31 濃度は投与後15分で最も高濃度で、投与後1時間目には15分時の約1/3まで減少した ($p < 0.01$)。一方、腫瘍組織中の PAD-S31 濃度は投与後3時間目まで漸次上昇する傾向にあった ($p > 0.05$)。

2) 早期照射後の腫瘍の組織学的分析：PAD-S31 投与後3時間目に PDT を実施した群では、腫瘍組織内全域に蛍光物質が観察された。一方、PAD-S31 投与後15分目に PDT を実施した群では、腫瘍組織内に蛍光物質は観察されなかった。

考察：今回の結果より、PAD-S31 を用いた早期照射は十分な抗腫瘍性を発揮し、投与量を約1/10に減少させることが可能であった。またその作用機序は腫瘍組織内の新生血管をシャットダウンすることに起因することが示唆された。

PREPARATION OF POLYMERIC PARTICLES WITH POLY(ASPARTIC ACID) HAIRY CHAINS

K. Tomita, T. Ono

Department of Material and Energy Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-Naka, Okayama, Okayama, 700-8530, Japan (tono@cc.okayama-u.ac.jp)

The aim of this work is to develop a method for preparing hairy particles which is capable of introducing functional groups. Dispersion copolymerization of hydrophobic monomer and macromonomer is a one-pot process for preparing hairy particles. Therefore, we synthesized macromonomer based on sodium polyaspartate (PAspNa) as a reactive stabilizer for preparation of hairy particles. Poly(succinimide) (PSI), a precursor of PAspNa, can react with amino compounds to introduce functional groups in the side chain. Thus, dispersion copolymerization using the PAspNa macromonomer is promising for development of the functional hairy layer on the particle surface.

PSI derivatives with a hydroxyphthalimide end group were synthesized by thermal polycondensation of L-aspartic acid and 4-hydroxyphthalic acid. PAspNa macromonomers were obtained by a reaction of the PSI derivatives and acryloyl chloride, and hydrolysis by sodium hydroxide solution. By the dispersion copolymerization of styrene and PAspNa macromonomer in a mixture of ethanol and water, sub-micron sized polymeric particles were prepared. Figure 1 shows the transmission electron microscopy (TEM) image of ultrathin cross section of the particles prepared with PAspNa macromonomer which is stained by osmium tetroxide and phosphotungstic acid. It showed that the resultant particles were covered with a PAspNa layer. Hydrodynamic diameter of the particles was investigated by dynamic light scattering method. Hydrodynamic diameter of the particles decreased with increasing electrolyte concentration. This result supports PAspNa chains on the particle surface are extending into water. When the PAspNa macromonomer with high molecular weight was used for preparation of the particles, the change in hydrodynamic diameter was larger.

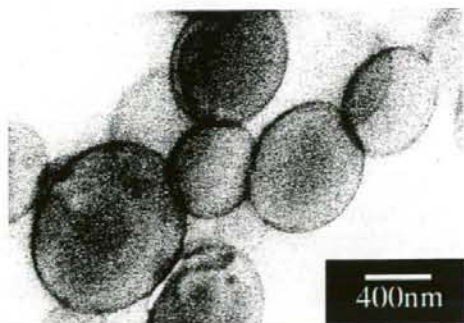


Fig. 1 TEM image of ultrathin cross section of the particles with a PAspNa hairy layer. PAspNa was stained by osmium tetroxide and phosphotungstic acid.

DESIGN OF POLYMERIC DISPERSION STABILIZER FOR PREPARATION OF MONODISPERSE POLYLACTIDE MICROSPHERES

M. Muranaka and T. Ono*

*Department of Material and Energy Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka Okayama, 700-8530, Japan *e-mail : tono@cc.okayama-u.ac.jp*

Poly(dodecyl methacrylate)-*co*-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PDMA-*co*-PHEMA), copolymers with dodecyl and hydroxy groups, were synthesized to use as a stabilizer for the dispersion polymerization of D,L-lactide (DLLA). The dispersion polymerization was carried out in xylene/heptane (1:2 in v/v) mixture solution at 368 K using PDMA-*co*-PHEMA and 2-ethylhexanoate as a catalyst. As a result, in the case with 1.25 mol% of HEMA, monodisperse PDLLA microspheres were obtained (particle diameter = 4.5 μm , coefficient of variation, $CV = 4.89\%$). Dynamic light scattering measurement showed that the presence of micellar aggregates for PDMA-*co*-PHEMA in the initial stage was one of the affecting factors to the polydispersity of the PDLLA microspheres prepared by dispersion polymerization. Furthermore, we investigated the time course of monomer conversion, particle diameter and CV to clarify the optimal molecular structure of PDMA-*co*-PHEMA for the preparation of monodisperse PDLLA microspheres. In the case with 1.25 mol% of HEMA, the monomer conversion and the particle diameter were increased with polymerization time, and the CV was decreased. In contrast, in the case with 2.30 mol% of HEMA, the monomer conversion and the particle diameter were increased with polymerization time, but the CV was not decreased, indicating that polydisperse PDLLA microspheres were prepared. In general, it is necessary for decreasing CV to sufficiently capture monomers into the particle in the growth stage. From the results obtained in this study, we found that the degree of monomer capturing depended on the adsorption of dispersion stabilizers. Consequently, the HEMA content, initiator of polymerization of D,L-lactide, in PDMA-*co*-PHEMA plays an important role for preparation monodisperse PDLLA microspheres.

マクロモノマー分散共重合による単分散ヘア粒子の調製

(岡山大院環) ○富田 恵介・小野 努

緒言

マクロモノマーを用いた分散共重合はワンポットで表面に高分子鎖を持つヘア粒子の調製が可能な手法として知られている。本研究室ではポリアスパラギン酸ナトリウム(PAspNa)を主鎖に持つマクロモノマーを合成し、微粒子調製への応用を行ってきた。PAspNaは機能的修飾が容易であるため、得られる微粒子のヘア鎖の性質・特性の制御が期待できる。今回は、鎖長の異なるマクロモノマーとスチレンとの分散共重合を行い、得られた微粒子の粒径や表面ヘア構造の評価を行った。

実験

本実験に用いたPAspNaマクロモノマーの構造をFig. 1に示す。開始剤(2,2'-アゾビスイソブチロニトリル)、モノマー(スチレン)、PAspNaマクロモノマーをエタノール-水の混合溶媒(エタノール/水=3/2)に溶解させた。この溶液を反応器内に入れ、窒素置換後、343 Kで6時間重合反応を行った。

粒径および粒径分布は走査型電子顕微鏡(SEM)により求めた。得られた微粒子の超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡(TEM)観察を行った。

結果と考察

エタノール-水混合溶媒中におけるPAspNaマクロモノマーとスチレンとの分散共重合の結果、サブミクロンサイズの微粒子が得られた。Fig. 2に重合度414のPAspNaマクロモノマーを用いて得られた微粒子のSEM画像を示す。図から明らかなように、単分散な粒径分布を持った微粒子が得られた。マクロモノマー濃度の増加、マクロモノマー鎖長の減少に伴い、粒径分布は多分散化した。これはマクロモノマー数の増加に伴い、重合途中の新粒子形成が促進されたためと推察される。

リンタングステン酸および四酸化オスmium処理を行った微粒子の超薄切片のTEM画像をFig. 3に示す。このように、微粒子表面にPAspNa鎖由来の黒い輪郭が確認された。このことからスチレンと共重合したPAspNaマクロモノマーが微粒子表面に集積していることが確認された。

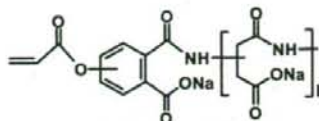


Fig. 1 Chemical structure of PAspNa macromonomer.

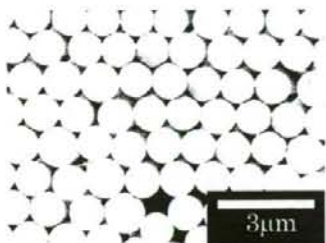


Fig. 2 SEM image of the particles by dispersion copolymerization of styrene and PAspNa macromonomer. [PAspNa macromonomer]= 2.22×10^{-4} g/ml.

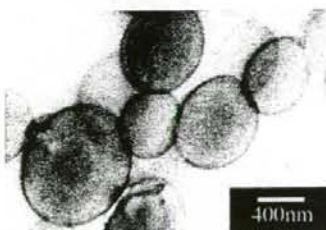


Fig. 3 TEM image of ultrathin cross section of the particles with a PAspNa hairy layer. [PAspNa macromonomer]= 2.22×10^{-3} g/ml. PAspNa was stained by osmium tetroxide and phosphotungstic acid.

Monodisperse hairy particles by dispersion copolymerization with macromonomer

K. TOMITA, T. ONO (Okayama Univ., tonoo@cc.okayama-u.ac.jp)

Dispersion copolymerization of hydrophobic monomer and hydrophilic macromonomer is suitable for preparing polymeric particles with a hairy layer. We synthesized macromonomers derived from sodium polyaspartate (PAspNa) and applied them as a reactive stabilizer in dispersion polymerization. PAspNa can react with amino compounds to introduce functional groups into the side chain. Thus, dispersion copolymerization using PAspNa macromonomer is promising for development of the functional hairy layer on particle surface. Dispersion copolymerization of styrene and PAspNa macromonomer in a mixture of ethanol and water was carried out. Monodisperse polymeric particles were obtained at a low concentration of macromonomer with high polymerization degree. Particle diameter distribution increased with increasing macromonomer concentration and decreasing polymerization degree of macromonomer. The existence of hairy layer of PAspNa chains was clarified by the transmission electron microscopy (TEM) images of ultrathin cross sections of particles.

分散重合における単分散ポリラクチドマイクロスフェアの粒径制御

(岡山大院環) ○村中 誠・小野 努

【緒言】近年、バイオマス由来の環境調和型高分子材料であるポリラクチドは合成や成形から分解に至るまで幅広く研究されている。このような状況下において、本研究では、重合開始基である水酸基を有する poly(dodecyl methacrylate)-co-poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PDMA-co-PHEMA) を安定剤として用いた D,L-ラクチドの分散重合により単分散ポリ(D,L-ラクチド) (PDLLA) ミクロスフェアの調製に成功した[1]。本講演では、単分散 PDLLA ミクロスフェアの粒径制御において重要な因子である PDMA-co-PHEMA の分子構造が粒径に与える影響について報告する。

【実験】PDMA-co-PHEMAの合成は、開始剤として過酸化ベンゾイル、溶媒としてトルエンを用いてDMAとHEMAの重合を358 Kで3 h行った。また、PDLLA ミクロスフェアの調製は、触媒として2-エチルヘキサン酸スズ(II)、溶媒としてキシレン/ヘプタン(1/2, v/v)を用いてD,L-ラクチドの重合を368 Kで3 h行った。

【結果と考察】Fig. 1は、PDMA-co-PHEMA (HEMA 導入率 $F_{\text{HEMA}} = 0.9\%$)を用いて得られたPDLLA ミクロスフェアの走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真を示す。Fig. 1に見られるように、粒径の揃った単分散PDLLA ミクロスフェアの調製に成功した(粒径 $dp = 4.9\ \mu\text{m}$ 、変動係数 $CV = 5.7\%$)。Fig. 2は、PDLLA ミクロスフェアの粒径に与えるPDMA-co-PHEMA濃度と F_{HEMA} の影響について示す。Fig. 2より、PDMA-co-PHEMA濃度と F_{HEMA} の増加に伴い粒径は減少した。これは、PDMA-co-PHEMA濃度と F_{HEMA} の増加により粒子間の凝集が抑制され、より小さな安定粒子を形成したためであると考えられる。これらの結果から、PDMA-co-PHEMA濃度と F_{HEMA} を変化させることで、単分散性を維持したまま1.3~5.8 μm の範囲で粒径を制御できることが分かった。

[1] 村中ら、第56回高分子討論会予稿集、P46 (2007)

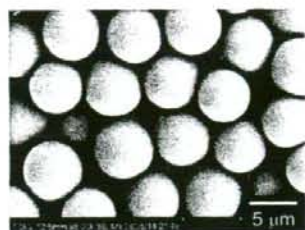


Fig. 1 SEM image of PDLLA microspheres prepared by dispersion polymerization; [PDMA-co-PHEMA] = 1 g/l.

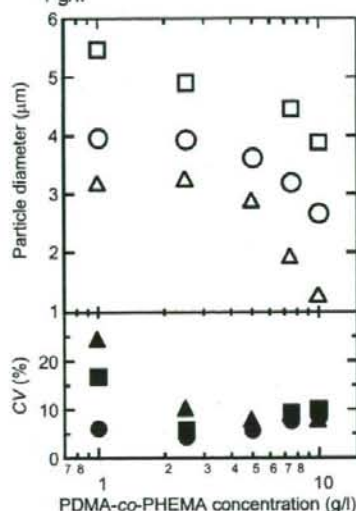


Fig. 2 Effect of PDMA-co-PHEMA concentration and F_{HEMA} on the particle diameter of PDLLA microspheres; (□, ■) $F_{\text{HEMA}} = 0.9\%$, (○, ●) $F_{\text{HEMA}} = 1.3\%$, (△, ▲) $F_{\text{HEMA}} = 2.3\%$.

Particle size control of monodisperse PDLLA microspheres in dispersion polymerization

M. MURANAKA, T. ONO (Okayama Univ., tonoo@cc.okayama-u.ac.jp)

We prepared monodisperse poly(D,L-lactide) (PDLLA) microspheres by dispersion polymerization of D,L-lactide. The polymerization with PDMA-co-PHEMA synthesized as a polymeric stabilizer was carried out in xylene/heptane (1:2 in v/v) solution at 368 K for 3 h. PDMA-co-PHEMA has hydroxyl groups as an initiation groups for anionic dispersion polymerization. As a result, monodisperse PDLLA microspheres in 1.3 ~ 5.8 μm size range were prepared by changing of PDMA-co-PHEMA concentration, molecular weight and HEMA content in PDMA-co-PHEMA. The particle diameter decreased with increasing them. The reduction of the particle diameter contributes to protect the aggregation of particles by adsorption of the graft polymeric stabilizer. In conclusion, we found that PDMA-co-PHEMA concentration, molecular weight and HEMA content in PDMA-co-PHEMA strongly depended on the particle diameter of monodisperse PDLLA microspheres.

水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製

(岡山大院環) ○ (学) 安川 政宏・(神戸大工) (正) 神尾 英治・(岡山大院環) (正) 小野 努*

1. 緒言

水性二相系は二種類の高分子、または高分子と塩の添加によって水が二相に分離した系である。近年、水性二相系を水-水の分散系 (water-in-water emulsion) として捉え、この分散系を用いる検討が注目されている¹⁾。従来の複合エマルション系とは異なる、水溶液のみで形成されたオイルフリーのエマルションであり、また機能性高分子を用いることで各相に架橋構造や反応性官能基を導入することができるというメリットを有している。本研究では、水性二相を形成する高分子水溶液を、油中に分散させることによって複合エマルションの調製を試みた。

2. 実験

2-1) 攪拌翼を用いた複合エマルション調製

ポリエチレンオキシド (PEO) (M_w 4,000) 水溶液とデキストラン (Dex) (M_w 40,000) 水溶液を混合し水性二相系を調製した。その際、PEO rich 相を染色するために Reactive Blue を添加した。ホモジナイザー (12000 rpm, 1 min) を用いて水性二相系を攪拌することで W/W エマルションを調製した。このエマルション液滴をソルビタンモノオレエート (Span80) を溶解させたヘキサデカン (HD) 溶液中に滴下し、ディスクタービン型攪拌翼 (400 rpm, 5 min) を用いて攪拌することで、複合エマルションを得た。得られた複合エマルションは光学顕微鏡で観察した。

2-2) マイクロリアクターを用いた複合エマルション調製

水相として PEO 水溶液と Dex 水溶液の混合溶液、油相として Span80 を溶解させた HD 溶液を用いた。シリンジから送液された水相を Y 字型基盤のマイクロリアクターでせん断することにより、複合エマルションを得た。なお、水相流速は $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 、油相流速は $50 \mu\text{l}/\text{min}$ とした。得られた複合エマルションは光学顕微鏡で観察した。

3. 実験結果及び考察

Fig. 1 に水性二相系の W/W エマルションとその水性二相系を油相に分散させることによって得られた W/W/O エマルション (複合エマルション) の光学顕微鏡写真を示す。PEO rich 相は Reactive Blue により濃い緑色を呈する。22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex の条件で調製された W/W エマルションでは PEO rich 相が連続相になるのに対し、7.5 wt% PEO, 22.5 wt% Dex の場合

では PEO rich 相が分散相になることがわかった。

それに対して、同様の高分子組成で調製した W/W/O エマルションでは、PEO rich 相が常に Dex rich 相の外側を覆うことがわかった。また液滴内部の W/W 系は次第に相分離を起こし、結果として単核の複合エマルションが形成された。

Fig. 2 にマイクロリアクターを用いて調製した W/W/O エマルションの光学顕微鏡写真を示す。得られた複合エマルションの平均粒径は $96.4 \mu\text{m}$ で変動係数 (CV) 値は 4.4 %、内水相 (Dex rich 相) の液滴径の CV は 6.6 %であった。このように、マイクロリアクターを用いることでエマルション径および内水相の液滴径の単分散な単核 W/W/O エマルションを得ることに成功した。

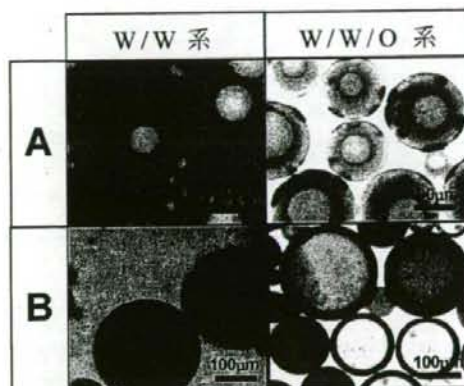


Fig. 1 Optical microscopic images of multiple emulsion using an agitator. (A) 22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex. (B) 7.5 wt% PEO, 22.5 wt% Dex.

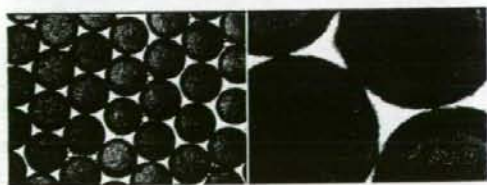


Fig. 2 Optical microscopic images of multiple emulsion prepared by a microreactor. 7.5 wt% PEO, 10 wt% Dex.

1) Albert T. Poortinga, *Langmuir*, 24, 1644-1647 (2008)

*TEL&FAX:086-251-8908

e-mail:tono@cc.okayama-u.ac.jp

光線力学的治療に有効なポルフィリン内封ナノ粒子の開発

(岡山大学院) ○ (学) 廣田 健・(学) 村中 誠・(正) 小野 努*・(光ケミカル研) 阪田 功

1. 緒言 光線力学的治療は光増感剤を利用した局所的なガンの化学治療の一種である。しかしながら、ポルフィリン等の光増感剤の多くは疎水性が高いために、腫瘍近傍への送達が非常に困難となっている。そこで、この疎水性の高い光増感剤を安定に内封でき、高い血中滞留性と腫瘍への高い蓄積性を持つドラッグキャリアの開発が必要とされている。

そこで本研究では、生分解性を持つポリ乳酸 (PLA) と生体適合性を持つポリエチレンオキシド (PEO) のジブロック共重合体 (PLE) から構成されるナノ粒子に着目した。PLE は PEO セグメントの作用により、ドラッグキャリアの血中滞留性の向上が期待される。また、100 nm 程度の粒径を有するナノ粒子を調製することで、EPR 効果などにより腫瘍へ高い蓄積性が期待できる。本講演では、溶媒置換法によるポルフィリン内封 PLE ナノ粒子の微細化と照射による一重項酸素の発現について報告する。

2. 実験

2.1) PLE の合成 PLE の合成は、末端にメトキシ基を導入した PEO (MeO-PEO) を開始剤とする、D, L-ラクチドの開環重合によって行った。合成した PLE の重量平均分子量 (M_w) と分子量分布 (M_w/M_n) をゲル浸透クロマトグラフィーにより測定した。また、MeO-PEO と合成した PLE の M_w を用いて親水・親油バランス (HLB) を算出した (Table 1)。

2.2) ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子の調製 PLE-B とポルフィリンを溶解させた酢酸エチル溶液を油相、PLE-A を溶解させた水溶液を水相とし、超音波照射により O/W エマルジョンを調製した。得られた O/W エマルジョン溶液を多量の超純水を用いて希釈し、油相の酢酸エチルを水相中に完全に溶解させることで、粒子を調製した^[1]。調製した粒子は動的分散法により平均粒径を測定した。

2.3) ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子の感光性評価 調製したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を dansyl-L-methionine を溶解させたリン酸緩衝液に分散させた。この分散液にハロゲンランプを用いて照射し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることでポルフィリン内封 PLE ナノ粒子からの一重項酸素の発現を確認した。

3. 実験結果及び考察

Fig. 1 はポルフィリンを内封していない PLE ナノ粒子の粒径へ及ぼす PLE-A 濃度の影響について示す。この結果より、PLE-A 濃度の増加に伴い、得られる PLE

ナノ粒子の粒径を大きく低下させることに成功した。つまり、PLE-A は酢酸エチルと水間の界面張力を下げる界面活性剤として働いていることを示唆している。また、PLE-A 濃度が 5 wt% の時、75 nm 程度の極めて小さい PLE ナノ粒子を調製できた。さらに、光増感剤であるポルフィリンを用いた場合においても、同じ調製条件下で 100 nm 以下のポルフィリン内封 PLE ナノ粒子の調製が可能であった。

Fig. 2 はポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を分散させたリン酸緩衝液への照射実験の結果を示す。Fig. 2 より、照射前には dansyl-L-methionine 由来のスポット (S_1) のみ観察された (Fig. 2a)。一方、照射後は一重項酸素の生成を示す dansyl-L-methionine sulfoxide 由来の新たなスポット (S_2) が発現した (Fig. 2b)。この結果から、溶媒置換法により調製したポルフィリン内封 PLE ナノ粒子は十分な感光性を示すことが明らかになった。

Table 1 Characteristics of PLE

Sample	M_w	M_w/M_n	HLB
PLE-A	5,234	1.07	16.63
PLE-B	32,872	1.32	2.65

MeO-PEO M_n = 4,352

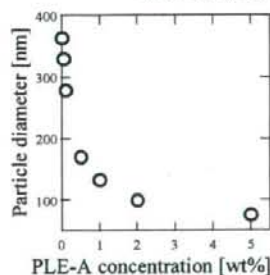


Fig. 1 Effect of PLE-A concentration on the particle diameter of PLE nanoparticles without porphyrin.

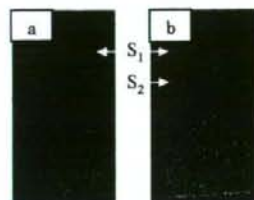


Fig. 2 Photographs of TLC plate under UV light: (a) before irradiation, (b) after irradiation

【参考文献】

[1] A. Vila et al., *J. Controlled Release*, **98**, 231-244 (2004)

*TEL/FAX: 086-251-8908

E-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp

水性二相系を利用した W/W/O エマルションの調製

(岡大院環) ○安川政宏, (神戸大院工) 神尾英治, (岡大院環) 小野 努

【緒言】

複合エマルションは農業・化粧品・食品などの様々な分野で盛んに研究されており、water-in-oil-in-water (W/O/W) エマルションや oil-in-water-in-oil (O/W/O) エマルションがある。また非相溶性高分子溶液を混合した系を用いることで O/O/W エマルションや W/W/O エマルションといった複合エマルションや、またその系を用いた複合粒子調製が報告されている[1, 2]。報告例としては O/O/W エマルションを用いた例が多く、非相溶性親水性高分子溶液を用いた W/W/O エマルションに関する報告例はほぼない。そこで本研究室では、二種類の非相溶性親水性高分子溶液を混合することによって得られる水性二相系の知見を生かし、油中に分散させることによって W/W/O エマルションを調製し、系の単分散化や外水相の厚みの制御を試みたので報告する。

【実験】

1) 攪拌翼を用いた複合エマルション調製

ポリエチレンオキシド (PEO) (M_w 4,000) 水溶液とデキストラン (Dex) (M_w 40,000) 水溶液を混合し水性二相系を調製した。その際、PEO rich 相を染色するために Reactive Blue 180 (RB180) を添加した。ホモジナイザー (12,000 rpm, 1 min) を用いて水性二相系を攪拌することで W/W エマルションを調製した。このエマルション液滴を 3 wt% のソルビタンモノオレエート (Span80) を溶解させたヘキサデカン (HD) 溶液中に滴下し、ディスクタービン型攪拌翼 (400 rpm, 5 min) を用いて攪拌することで、複合エマルションを得た。得られた複合エマルションは光学顕微鏡で観察した。

2) マイクロリアクターを用いた複合エマルション調製

水相として PEO 水溶液と Dex 水溶液の混合溶液、油相として 3 wt% の Span80 を溶解させた HD 溶液を用いた。シリンジから送液された水相を Y 字型基盤のマイクロリアクターでせん断することにより、複合エマルションを得た (Fig. 1)。マイクロ流路基盤はガラス製

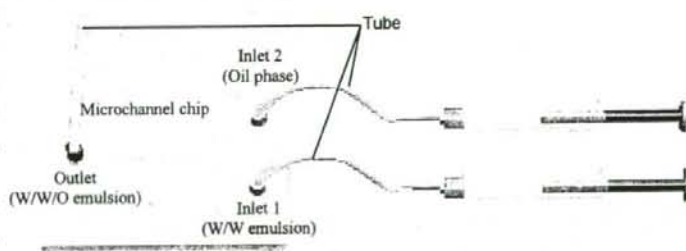


Fig. 1 Schematic illustration of experimental equipment.

で、1 wt% Octadecyltrimethoxysilane 溶液で表面疎水化処理を施したものを用いた。なお、水相流速は $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 、油相流速は $50 \mu\text{l}/\text{min}$ とした。Outlet に取り付けられたチューブ (108 mm) 先端を 0 s とし、得られた複合エマルションの内部構造の経時変化を光学顕微鏡で観察した。また高分子組成を変更し、水性二相のそれぞれの体積を変更することで複合エマルションの外水相の厚みの制御を行った。

【結果と考察】

1) 攪拌翼を用いた複合エマルション調製

Fig. 2 に水性二相系の W/W エマルションとその水性二相系を油相に分散させることによる Preparation of W/W/O emulsion using aqueous two phase system, M. Yasukawa, E. Kamio and T. Ono*, Graduate School of Environmental Science, Okayama University

*TEL/FAX: 086-251-8908, E-mail: tonono@cc.okayama-u.ac.jp

って得られた W/W/O エマルジョン (複合エマルジョン) の光学顕微鏡写真を示す。PEO rich 相は RB180 により濃い緑色を呈する。22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex の条件で調製された W/W エマルジョンでは PEO rich 相が連続相になるのに対し、7.5 wt% PEO, 22.5wt% Dex の場合では PEO rich 相が分散相になることがわかった。

それに対して、同様の高分子組成で調製した W/W/O エマルジョンでは、PEO rich 相が常に Dex rich 相の外側を覆うことがわかった。また液滴内部の W/W 系は次第に合一し、結果として単核の複合エマルジョンが形成された。PEO rich 相が常に外側を覆う原因としては PEO が弱い界面活性を有しているため、界面エネルギー的に安定になるためだと考えられる[3, 4]。

2) マイクロリアクターを用いた複合エマルジョン調製

Fig. 3 にマイクロリアクターを用いて調製した W/W/O エマルジョンの光学顕微鏡写真を示す。得られた複合エマルジョンの平均液滴径は 96.4 μm で変動係数 (CV) は 4.4 %、内水相 (Dex rich 相) の平均液滴径は 66.9 μm 、CV は 6.6 % であった。このように、マイクロリアクターを用いることでエマルジョン径および内水相の液滴径の単分散な W/W/O エマルジョンを得ることに成功した。内水相の液滴径も単分散になったのは、W/W エマルジョン調製時の高分子濃度をできるだけ低くすることにより、水性二相間の界面張力や密度差が小さくなったため、W/W 系が細かく均一に分散したまま油中に分散したためである。

Fig. 4 に外水相の厚みの制御を試みた W/W/O エマルジョンの光学顕微鏡写真を示す。水性二相系はタイラインに沿った組成に分離し、またそれぞれの体積比はタイラインの長さの比に依存するため、Fig. 3 で調製された単分散な W/W/O エマルジョン調製時に用いた W/W 系の高分子濃度を、タイライン上で振ることで W/W 系の体積を変更した。結果として、単分散性を維持したまま外水相の厚みの制御が可能であることが示唆された。

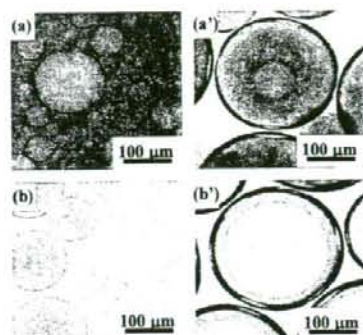


Fig. 2 Optical micrographs of W/W emulsion (a, b) and of multiple emulsion (a', b') using an agitator: (a, a') 22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex, (b, b') 7.5 wt% PEO, 22.5 wt% Dex

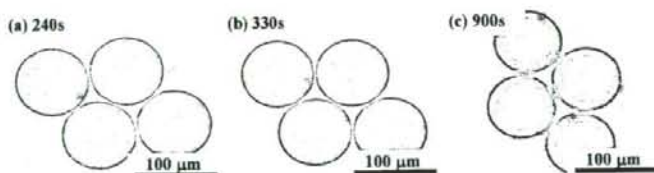


Fig. 3 Optical micrographs of multiple emulsion at (a)240, (b)330 and (c)900s prepared by a microreactor. 7.7 wt% PEO, 9.7 wt% Dex

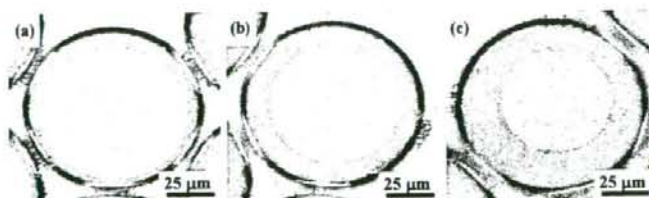


Fig. 4 Optical micrographs of multiple emulsion which controlled middle phase thickness: (a) 6.6 wt% PEO, 12.1 wt% Dex, (b) 7.7 wt% PEO, 9.7 wt% Dex, (c) 9.0 wt% PEO, 7.0 wt% Dex

【参考文献】

- [1] T. H. Lee, J. Wang, C. Wang, *J. Control. Release*, **83**, 437 (2002) [2] K. J. Pekarek, J. S. Jacob, E. Mathiowitz, *Nature*, **367**, 258 (1994) [3] S. Y. Hobbs, et al. *POLYMER*, **29**, 1598 (1988) [4] M. W. Kim, *Colloids and Surfaces*, **128**, 145 (1997)

界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合

(岡山大学院環境) ○大浦浩平、久保田潤、小野 努

【1. 緒言】

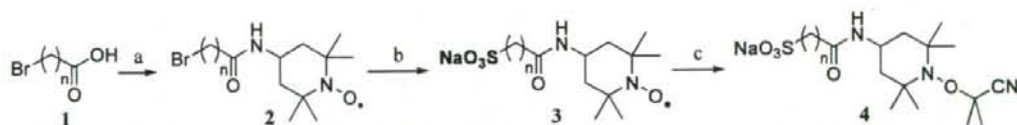
乳化重合やミニエマルジョン重合などの不均一系重合 [1, 2] により得られる高分子微粒子は、その表面に高分子鎖をグラフトすることで物理的及び化学的特性の付与が可能である。その方法のひとつとして、表面にニトロキッド誘導体のひとつである 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-Oxyl (TEMPO) を有する粒子を調製後、表面修飾する方法が考えられる。粒子表面に TEMPO を存在させるには、微粒子調製時に TEMPO が油水界面に吸着し、界面で重合が進行する必要がある。そうすることで、粒子表面の官能基に TEMPO を修飾するという既存の 2 ステップの方法に比べ、1 ステップでの調製が可能になる。

本研究では、不均一系重合を目的とした界面活性能を有する TEMPO 誘導体の合成と油水界面での制御ラジカル重合システムの構築、得られた高分子微粒子表面の機能化を目指す。本発表では、界面活性能を有する TEMPO 誘導体の合成とそれらを不均一系重合に応用した結果について報告する。

【2. 実験】

2.1 界面活性 TEMPO 誘導体の合成 (Scheme 1)

化合物 1 を DCC (*N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimide)・DMAP (*N,N*-Dimethylaminopyridine) 存在下、4-Amino-TEMPO と反応させて 2 を合成した [3]。水溶性 TEMPO 誘導体 3 は、化合物 2 を Na_2SO_3 と反応させることにより合成した [4]。続いて化合物 3 に AIBN を反応させてアルコキシアミン 4 を合成した。



Scheme 1. Synthesis of interface-active TEMPO derivatives ($n = 5, 10, 15$) [a] 4-Amino-TEMPO, DCC, DMAP, CHCl_3 , rt, 18 h: **2a** ($n = 5$: 84%), **2b** ($n = 10$: 79%), **2c** ($n = 15$: 78%); [b] Na_2SO_3 , EtOH/ $\text{H}_2\text{O} = 3/1$, reflux, 24 h: **3a** ($n = 5$: 85%), **3b** ($n = 10$: 60%), **3c** ($n = 15$: 49%); [c] AIBN, EtOH, 80 °C, 6h: **4a** ($n = 5$: 89%), **4b** ($n = 10$, 90%), **4c** ($n = 15$: 87%)]

2.2 界面張力測定

合成した水溶性 TEMPO 誘導体 3 の各種濃度の水溶液を用いて、トルエンに対する界面張力をペンダントドロップ法により室温下測定した。その結果より、臨界ミセル濃度 (CMC) を決定し、界面活性能を評価した。

2.3 不均一系重合

最も強い界面活性を示した 3c のアルコキシアミン 4c を用いて不均一系重合を行った。0.02 wt% 4c 水溶液 (8.0 g) 及び 5 wt% ヘキサデカン含有スチレン溶液 (240 mg) を耐圧

Heterogeneous Polymerization using Interface-Active TEMPO Derivatives, K. Oura, J. Kubota, and T. Ono*, Graduate School of Environmental Science, Okayama University

*TEL/FAX: 086-251-8908, E-mail:tono@cc.okayama-u.ac.jp

反応器に秤量し、ホモジナイザー (10,000 rpm, 1.5 min.) により O/W エマルジョンを調製した。これらを 0.4 MPa 窒素雰囲気下 125 °C で 24 時間重合を行った。重合終了後は反応器を氷浴させることにより重合を停止させた。調製した粒子の分析は、動的光散乱法を用いたゼータサイザー測定により粒径・粒径分布を、SEM 観察により粒子形状を、ゼータ電位計により調製された粒子表面のゼータ電位を測定した。

【3. 結果と考察】

3.1 界面張力測定

Fig. 1 より、合成した全ての水溶性 TEMPO 誘導体は界面活性を有し、疎水部の増加に伴い界面活性が強くなっていることが確認された。3a については、今回測定した範囲で CMC を確認することはできなかったが、3b 及び 3c については CMC [3b (0.92 wt%), 3c (0.024 wt%)] を確認した。特に 3c では、代表的なアニオン性界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (SDS) よりも低い界面張力と CMC (0.024 wt%) を示したことから、SDS よりも高い界面活性を有する TEMPO 誘導体を合成できた。

3.2 不均一系重合

Fig. 2 より、粒子調製に成功していることが確認された。しかし、調製された粒子は数百 nm の小粒子及び数 μm の大粒子の混合物で非常に多分散であった。数百 nm の小粒子については、従来の乳化重合で調製される粒子の大きさであるためにミセル内核形成あるいは均相核形成由来の粒子であると考えられる。数 μm の大粒子については、重合前の液滴の大きさに近いために液滴界面で重合が進行し、調製された液滴由来の粒子であると考えられる。以上のことから本系の粒子形成機構を考察すると、重合前の系には 4c により安定化された液滴及び 4c により形成されたミセルと水相中に溶解している 4c が存在している。重合中には、液滴界面の 4c はその場で重合が進行し液滴由来の粒子を形成する。ミセルや均相中の 4c には水中拡散によりモノマーが供給され重合が進行し核形成が起こる。粒子の形成機構が 2 種類存在するため、最終的に調製された粒子は多分散となる。また粒子表面のゼータ電位を測定したところ、-27.2 mV という負電荷を示した。これは本実験系の不均一系重合に用いている界面活性 TEMPO 誘導体 4c のスルホン酸基に由来する負電荷である。粒子表面ゼータ電位の結果より、油水界面に吸着した界面活性 TEMPO 誘導体から重合が進行していることが示唆され、粒子表面に界面活性 TEMPO 誘導体が固定化されていることが明らかとなった。

【参考文献】

- [1] Marestin, C., et al. *Macromolecules* **1998**, *31*, 4041.
- [2] Zetterlund, P. B., et al. *Macromol. Rapid Commun.* **2005**, *26*, 955.
- [3] Kubota, J., et al. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8975.
- [4] Mitsudo, K. et al. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8994.

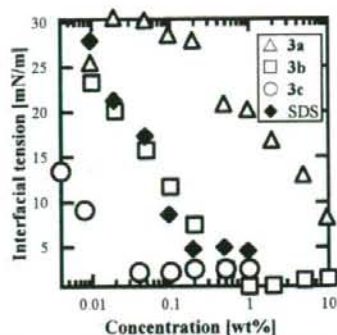


Fig. 1. Interfacial tension between toluene and water containing TEMPO derivatives

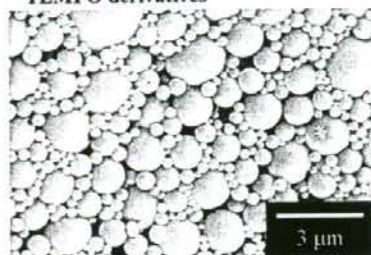


Fig. 2. SEM image of polystyrene particles [4c (1.6 mg), water (8.0 g), styrene (228 mg), hexadecane (12 mg); temperature (125 °C); pressure (0.4 MPa); time (24 h); homogenization at 10,000 rpm was carried out for 1.5 min. before polymerization]

水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルジョンの調製

(岡山大学院) ○(学) 安川 政宏, (正) 小野 努*, (正) 木村 幸敏, (神戸大院工) (正) 神尾 英治

1. 緒言

近年、単核の water-in-oil-in-water(W/O/W)エマルジョンのような複合エマルジョン(double emulsion)の開発が注目を集めている[1]。これに対して、本研究室では、二種類の高分子水溶液を混合することによって W/W エマルジョンを調製し、更に油中に分散させることによって W/W/O 型の複合エマルジョンの調製に成功した。本講演では、マイクロリアクターを用いた単分散な W/W/O エマルジョンの調製と、高分子水溶液の組成による外水相厚みの制御について報告する。

2. 実験

2.1. 高分子水溶液組成が内部構造に与える影響

ポリエチレンオキシド(PEO)(M_w :4,000)水溶液とデキストラン(Dex)(M_w :40,000)水溶液を混合し、ホモジナイザー(12,000 rpm, 1 min)を用いて攪拌することで W/W エマルジョンを調製した。その際、PEO rich 相を染色するため Reactive Blue180(RB180)を添加した。得られた W/W エマルジョン溶液を、ソルビタンモノオレエート(Span80)を溶解させたヘキサデカン(HD)溶液に滴下し、ディスクタービン型攪拌翼(400 rpm, 5 min)を用いて攪拌することで複合エマルジョンを得た。得られた複合エマルジョンは光学顕微鏡で観察した。

2.2. 複合液滴の単分散化及び外水相厚みの制御

水相として PEO 水溶液と Dex 水溶液の混合溶液、油相として Span80 を溶解させた HD 溶液を用いた。シリンジから送液された水相を、疎水化処理を施した Y 字型基盤のマイクロリアクター内で油相によりせん断することで複合エマルジョンを得た。なお水相流速は 5 μ l/min、油相流速は 50 μ l/min とした。得られた複合エマルジョンは光学顕微鏡で観察した。

3. 結果及び考察

3.1. 高分子水溶液組成が内部構造に与える影響

Fig. 1 に W/W エマルジョンとその W/W エマルジョンを油中に分散させることによって得られた W/W/O エマルジョンの光学顕微鏡写真を示す。PEO rich 相は分配した RB180 のため、濃い青色を呈する。W/W エマルジョンでは体積が多い相が連続相になるのに対し、W/W/O エマルジョンでは常に PEO rich 相が外側を覆うことがわかった。W/W/O 系では界面エネルギー的に安定な平衡配置をとるためだと考えられる。また、得られた複合エマルジョンは液滴内部で W/W エマルジョンが次第に合一し、結果として単核

な W/W/O 型複合エマルジョンが得られた。

3.2. 複合液滴の単分散化及び外水相厚みの制御

Fig. 2 にマイクロリアクターを用いて調製した W/W/O エマルジョンの光学顕微鏡写真を示す。得られた複合エマルジョン液滴の平均粒径は 97 μ m で変動係数(CV)は 4.4 %、内水相(Dex rich 相)の平均液滴径は 67 μ m、CV は 6.6 %であった。このようにマイクロリアクターを用いることでエマルジョン径および内水相の液滴径の揃った W/W/O エマルジョンを得ることに成功した。内水相の液滴径も単分散になった原因は、W/W エマルジョン調製時の高分子濃度をできるだけ低くすることにより、W/W 間の界面張力や密度差が小さくなったため、W/W 系が細かく均一に分散したまま油中に分散したためだと考えられる。

Fig. 3 に外水相の厚みの制御を行った W/W/O エマルジョンの光学顕微鏡写真を示す。高分子水溶液組成を変更することで単分散性を維持したまま外水相の厚みを制御できることが示された。

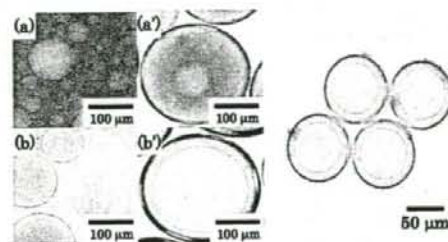


Fig. 1 Optical micrographs of W/W emulsion (a, b) and W/W/O emulsion (a', b') using an agitator:(a, a') 22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex, (b, b') 7.5 wt% PEO, 22.5 wt% Dex

Fig. 2 Optical micrograph of W/W/O emulsion prepared by a microreactor.

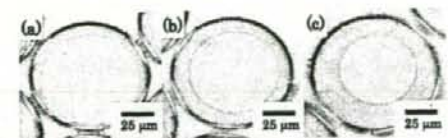


Fig. 3 Optical micrographs of W/W/O emulsion prepared by a microreactor:(a) 6.6 wt% PEO, 12.1 wt% Dex, (b) 7.7 wt% PEO, 9.7 wt% Dex, (c) 9.0 wt% PEO, 7.0 wt% Dex

引用文献

[1] A.S. Utada et al., *Science* **308**, 537 (2005).

*Tel&Fax: 086-251-8908

e-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp

ポルフィリン内封ナノ粒子の調製と光線力学的治療への応用

(岡山大学院) ○ (学) 廣田健・(学) 村中誠・(正) 小野努*・(正) 木村幸敬
(岡山大学院医歯薬) 白石太朗・大河原賢一・楢垣和孝・木村聰太郎

1. 緒言

光線力学的治療は光増感剤を利用した局所的なガンの化学治療の一種である。しかしながら、ポルフィリン等の光増感剤の多くは疎水性が高いために、腫瘍近傍への送達が非常に困難となっている。そこで、この疎水性の高い光増感剤を安定に内封でき、高い血中滞留性と腫瘍への高い蓄積性を持つドラッグキャリアの開発が必要とされている。

本研究では、生分解性を持つポリ乳酸 (PLA) と生体適合性を持つポリエチレンオキシド (PEO) のジブロック共重合体 (PLE) から構成されるナノ粒子に着目した。PLE は PEO セグメントの作用により、ドラッグキャリアの血中滞留性の向上が期待される。また、100 nm 程度の粒径を有するナノ粒子を調製することで、EPR 効果などにより腫瘍近傍への高い蓄積性が期待できる。本発表では、溶媒置換法によるポルフィリン内封ナノ粒子の微細化と照射による一重項酸素発現の確認および *in vitro* での殺細胞性の評価について報告する。

2. 実験

2.1) PLE の合成

PLE の合成は、末端にメトキシ基を導入した PEO (MeO-PEO) を開始剤とする、D, L-ラクチドの開環重合によって行った。合成した PLE の重量平均分子量 (M_w) と分子量分布 (M_w/M_n) をゲル浸透クロマトグラフィーにより測定した。また、MeO-PEO と合成した PLE の M_n を用いて親疎水バランス (HLB) を算出した (Table 1)。

2.2) ポルフィリン内封ナノ粒子の調製

o-PLE とポルフィリンを溶解させた酢酸エチル溶液を油相、w-PLE を溶解させた水溶液を水相とし、超音波照射により O/W エマルジョンを調製した。得られた O/W エマルジョン溶液を多量の超純水を用いて希釈し、油相の酢酸エチルを水相中に完全に溶解させることで、粒子を調製した[1]。調製した粒子は動的光散乱法により平均粒径を測定した。

2.3) ポルフィリン内封ナノ粒子の感光性評価

調製したポルフィリン内封ナノ粒子を Dansyl-L-methionine を溶解させたリン酸緩衝液に分散させた。この分散液に照射し、薄層クロマトグラフィー (TLC) を用いることでポルフィリン内封ナノ粒子からの一重項酸素の発現を確認した。

2.4) *in vitro* での殺細胞性の評価 調製したポルフィリン内封ナノ粒子を添加した Colon 26 (C26) 細胞に照射し、MTT assay により殺細胞効果を評価した。

3. 実験結果及び考察

Fig. 1 はポルフィリンを内封していないナノ粒子の粒径へ及ぼす w-PLE 濃度の影響について示

す。この結果より、w-PLE 濃度の増加に伴い、得られるナノ粒子の粒径を大きく低下させることに成功した。つまり、w-PLE は酢酸エチル-水間の界面張力を下げる界面活性剤として働いていることを示唆している。また、w-PLE 濃度が 5 wt% の時、75 nm 程度の極めて小さいナノ粒子を調製できた。さらに、光増感剤であるポルフィリンを用いた場合においても、同じ調製条件下で 100 nm 以下のポルフィリン内封ナノ粒子の調製が可能であった。

Fig. 2 はポルフィリン内封ナノ粒子を分散させたリン酸緩衝液への照射実験の結果を示す。照射前は Dansyl-L-methionine 由来のスポット (S_1) のみ観察された (Fig. 2a)。一方、照射後は一重項酸素の生成を示す Dansyl-L-methionine sulfoxide 由来の新たなスポット (S_2) が発現した (Fig. 2b)。この結果から、溶媒置換法により調製したポルフィリン内封ナノ粒子は十分な一重項酸素を放出していることが明らかになった。

ポルフィリン内封ナノ粒子を含む C26 細胞培養液への照射により、細胞生存率が大幅に減少した。この結果より、本ナノ粒子は光線力学的治療に有効なキャリアであることが示唆された。

Table 1 Characteristics of PLE

Sample	M_w	M_w/M_n	HLB
w-PLE	5,200	1.07	16.63
o-PLE	32,900	1.32	2.65

MeO-PEO $M_n = 4,400$

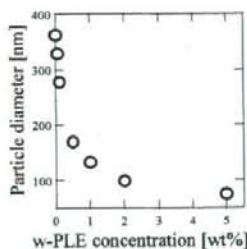


Fig. 1 Effect of w-PLE concentration on the particle diameter of nanoparticles without porphyrin

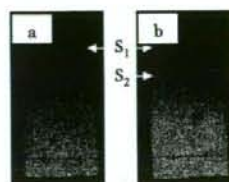


Fig. 2 Photographs of TLC plate under UV light: (a) before irradiation, (b) after irradiation

【参考文献】

[1] A. Vila *et al.*, *J. Control. Release*, **98**, 231-244 (2004)

* TEL/FAX: 086-251-8908

E-mail: tonoo@cc.okayama-u.ac.jp

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2008年9月4日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105386 A1

- (51) 国際特許分類:
 C07C 229/60 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
 A61K 31/196 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
 A61K 31/44 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
 A61K 31/505 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
 A61K 45/00 (2006.01) C07C 311/08 (2006.01)
 A61P 3/02 (2006.01) C07D 213/74 (2006.01)
 A61P 17/00 (2006.01) C07D 213/80 (2006.01)
 A61P 19/08 (2006.01) C07D 239/42 (2006.01)
 A61P 29/00 (2006.01)

- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/053240
 (22) 国際出願日: 2008年2月26日 (26.02.2008)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

- (30) 優先権データ:
 特願2007-048059 2007年2月27日 (27.02.2007) JP
 特願2007-246591 2007年9月25日 (25.09.2007) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加来田 博貴 (KAKUTA, Hiroki) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 佐々木 健二 (SASAKI, Kenji) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津

島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 高松 佳代 (TAKAMATSU, Kayo) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 高野 教史 (TAKANO, Atsushi) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 薬師寺 信匡 (YAKUSHIJI, Nobumasa) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 師橋 一徳 (MOROHASHI, Kazunori) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 森下 健一 (MORISHITA, Kenichi) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP).

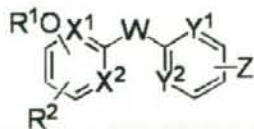
(74) 代理人: 庄司 隆, 外(SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 秋場ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: REXINOID COMPOUND HAVING ALKOXY GROUP

(54) 発明の名称: アルコキシ基を有するレキシノイド化合物



(57) Abstract: Disclosed is a compound represented by the general formula shown below, which can bind to a retinoid X receptor (RXR) (which is one of nuclear receptors) to exhibit an agonistic or antagonistic activity on the receptor. wherein R¹ is selected from the group consisting of an alkyl group, an alkenyl group, an alkynyl group and an aryl group; R² is selected from the group consisting of an alkoxy group, an alkyl group, an alkenyl group, an alkynyl group and an aryl group; W represents NR³ or CR³; R³ is selected from a hydrogen, an alkyl group, an alkenyl group, an alkynyl group and an aryl group; X¹ and Y¹ are independently selected from CH and N; X² and Y² are independently selected from CH, CR⁴ and N; R⁴ is selected from an alkyl group, an alkenyl group, an alkynyl group, an alkoxy group, a halogen, a nitro group and an amino group; and Z is selected from a carboxylic acid, a carboxylate ester and a hydroxamic acid which is bound directly or via an alkyl group, an alkenyl group or an alkynyl group.

(57) 要約: 本発明は、核内受容体の一つであるレチノイドX受容体 (RXR) に対し結合し、その作用もしくは拮抗作用を有する、下記の一般式で表される化合物を提供する。(式中、R¹はアルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基からなる群から選択される。R²はアルコキシ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基からなる群から選択される。Wは、NR³又はCR³であり、R³は水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基から選択される。X¹、Y¹は、CH若しくはNから選択される。X²、Y²は、CH、CR⁴、若しくはNから選択される。R⁴は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基及びアミノ基から選択される。Zは、直接、若しくはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基を介したカルボン酸、カルボン酸エステル、又はヒドロキサム酸から選択される。)

WO 2008/105386 A1