

Fig. 3. The effect of HLB of oil-soluble PEG-PLA (5.3 wt.%) on the diameter of PEG-PLA nanoparticles; open key: in the absence of PEG₄-PLA₁, closed key: in the presence of PEG₄-PLA₁ (0.1 wt.%).

soluble PEG-PLA and PEG₄-PLA₁ competitively adsorb onto the oil-water interface. The capability of PEG₄-PLA₁ was more excellent than that of oil-soluble PEG-PLA due to large mobility of PEG₄-PLA₁ which has low molecular weight.

4. Conclusions

In summary, PEG-PLA nanoparticles were prepared with oil-soluble PEG-PLA through oil-in-water emulsion solvent diffusion method in the presence of water-soluble PEG-PLA as a surfactant. The nanoparticles with a size range of 75–360 nm were obtained by

altering the water-soluble PEG-PLA concentration. In addition, the particles diameter decreased with increasing HLB of oil-soluble PEG-PLA in the absence of water-soluble PEG-PLA, whereas the particle diameter was constant in the presence of water-soluble PEG-PLA. Therefore, it was found that the oil-soluble PEG-PLA also acted as a surfactant and that water-soluble PEG-PLA showed more excellent capability for a surface-active reagent than oil-soluble one and facilitated the formation of PEG-PLA nanoparticles less than 100 nm in diameter. Consequently, this preparation technique would provide a wide range of applications such as drug delivery system.

References

- [1] Gong X, Milic T, Xu C, Batteas JD, Drain CM. *J Am Chem Soc* 2002;124:14290–1.
- [2] Harada A, Kataoka K. *J Am Chem Soc* 1999;121:9241–2.
- [3] Yuasa M, Oyaizu K, Murata H, Sahara Y, Hatsugai T, Ogata A. *J Oleo Sci* 2007;56: 87–93.
- [4] Thirumala G, Trevo R, Touraj E, Martin CG, Snjezana S, Lisbeth I, Stanley SD. *Int J Pharm* 2000;199:95–110.
- [5] Riley T, Stolnik S, Heald CR, Xiong CD, Garnett MC, Illum L, Davis SS, Purkiss SC, Barlow RJ, Gellert PR. *Langmuir* 2001;17:3168–74.
- [6] Ren J, Hong HY, Ren TB, Teng XR. *Mater Lett* 2005;59:2655–8.
- [7] Perez C, Sanchez A, Putnam D, Ting D, Langer R, Alonso MJ. *J Control Release* 2001;75:211–24.
- [8] Vila A, Gill H, McCallion O, Alonso MJ. *J Control Release* 2004;98:231–44.
- [9] Sant S, Nadeau V, Hildgen P. *J Control Release* 2005;107:203–14.
- [10] Jo YS, Kim MC, Kim DK, Kim CJ, Jeong YK, Kim KJ, Muhammed M. *Nanotechnology* 2004;15:1186–94.
- [11] Rosa GD, Iommelli R, Rotonda MIL, Miro A, Quaglia F. *J Control Release* 2000;69: 283–95.
- [12] Yang YY, Wan JP, Chung TS, Pallathadka PK, Ng S, Heller J. *J Control Release* 2001;75:115–28.
- [13] Maeda H, Wu J, Sawa T, Matsumura Y, Hori K. *J Control Release* 2000;65:271–84.
- [14] Zhu KJ, Xiangzhou L, Shilin Y. *J Appl Polym Sci* 1990;39:1–9.

ポリ乳酸系ナノ粒子の調製と 光線力学的治療への応用

小野 努^{*1}・大河原 賢一^{*2}

Tsutomu Ono・Ken-ichi Ogarawa

■ *1 岡山大学大学院環境学研究科 准教授 博士(工学) *2 医歯薬総合研究科 准教授 博士(薬学) ■

1. はじめに

光線力学的治療(PDT)は、通常の抗癌剤を用いた化学療法とは異なり、外部から腫瘍近傍にのみ光を照射することで、局所的な抗癌効果を期待する低侵襲性治療のひとつである。日本でも1994年に早期の肺癌、食道癌、胃癌、子宮頸部癌に対して厚生労働省(当時は厚生省)の認可を受け、1996年には保険採用されている。PDTは腫瘍を選択的に壊死させることが可能なことから、安全性に優れ、外科手術を必要としない患者のクオリティオブライフ(Quality of life, QOL)にも考慮した低侵襲性の抗癌治療法あり、今後の普及が強く期待される治療法である。

しかしながら、今日十分に普及できていない原因として、治療に必要なレーザーが大型で高価だったことや早期癌のみの適応だったことに加え、他に目立った副作用がないなかで唯一といえる副作用が光過敏症であり、それが意外に大きな問題であったことが原因だと考えられている¹⁾。PDTで用いる薬物は一般にいう光増感剤である。光を感受して励起し、励起三重項状態から酸素へのエネルギー移動によって一重項酸素を生成し、その一重項酸素が細胞を壊死させていくというものである。そのため、静脈投与によって患部以外の細胞へ取り込まれた光感受性物質が自然光によっても作用することで光過敏症が生じるため、PDTを受けた患者は治療後に一定期間の暗室での生活を余儀なくされる。これまでに厚生労働省で認可されている光感受性物質には、Photofrin[®],

talaporfin sodium(Laserphyrin[®]), 加齢黄斑変性症(患者数約35万人)を対象としたVerteporfin(Visudyne[®])の3種類があり、第一世代のPhotofrin[®]は投与後に約4週間の遮光が必要であったが、第二世代のLaserphyrin[®]は3~7日間に短縮されているものの依然遮光期間が不可欠である。このように、患者のQOLを向上させるためには更なる副作用軽減が必要であり、PDT用薬物キャリアによるドラッグデリバリーの改善には大きな期待が込められている。

本研究では、そのような研究背景をもとにして、高分子ナノ粒子を薬物キャリアとしたPDTへの応用を研究目的としている(図1)。疎水性の高い光増感剤を高分子ナノ粒子に内封し、薬物内封ナノ粒子には高い血中滞留性を付与することで、長時間血液中を循環し、腫瘍近傍における未成熟血管壁から内部へ浸透して滞留するEPR効果(enhanced permeation and retention effect)²⁾を利用した薬物の集積を目指している。ここで、血中滞留時の薬物徐放が大きいと正常細胞への光増感剤の分布が広がり、上述のような光過敏症を誘発すると考えられるため、本研究のDDSに関するコンセプトは薬物を安定にナノ粒子中へ保ちつつ高い血中滞留性を確保し、高価なターゲティング素子を付与することなく、PDTの特性を活かした局所的低侵襲治療を実現することにある。医学系や薬学系研究者とは異なるケミカルエンジニアらしいアプローチによって材料調製プロセスを新たに構築し、PDTの臨床応用を目指したこれまでの研究成果を紹介する。

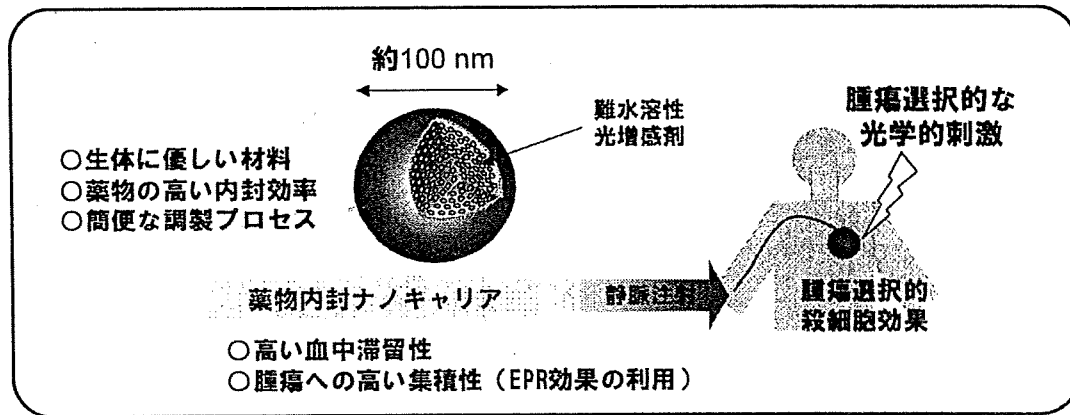


図1 薬物キャリアを利用した光線力学的治療 (Photodynamic Therapy, PDT) の概念図

2. 高分子治療

高分子治療とは、Polymer therapeutics という言葉を日本語に置き換えたものであるが、全ての場合で高分子そのものが病気を治すわけではないことから内容を的確に表現しているとは言い難い。ただ、少なからず高分子が治療効果を大きく改善することに貢献してきたことは紛れもない事実であろう。Polymer therapeutics は、1980年代に Ringsdorf や Duncan によって提唱された言葉であり²⁻⁴⁾、より広義な意味を持つ造語である“nanomedicine”として使われることもある。高分子にはさまざまなユニットを組み込むことができることから、生体内において効果的に薬物を機能させる高分子とのコンジュゲートがデザイン可能である(図2)。高分子を積極的に薬物とリンクさせ、化学的治療効果の改善に利用されてからはまだ30年余りであるが、その間薬物の高分子化、高分子-薬物コンジュゲート、高分子-タンパク質コンジュゲート、高分子-核酸コンジュゲートなど、さまざまな形態で高分子が利用され、溶解性

の制御や生体内での安定性の向上などを実現し、最近の報告では十数種類の製品が既に市場へ流通し、同程度の数が臨床試験中にある⁵⁾。

一方、高分子と薬物を共有結合的にリンクさせなくても、薬物を内封した高分子材料を調製できれば、ドラッグデリバリー担体として利用できる。この際、高分子材料開発における高分子の分子構造デザインは、薬物の内封挙動と密接に関係しており、高分子会合体および高分子微粒子の内部にいかにして薬物を内封するかを目的として微粒子調製プロセスを検討していくことが、最終的な高分子製剤の有効性の鍵を握ると考えられる。なかでも“高分子ミセル”は、東京大学の片岡らの研究グループによって開発された国産の技術であり、そのうちNK105はパクリタキセルを内封するDDS製剤として国内にて第II相試験が行われている最中である⁶⁾。高分子ミセルは、ブロック共重合体の Self-assembly によって得られる50nm以下の会合体であり、高分子ミセル構造形成のドライビングフォースである疎水性相互作用を利用して、ミセル内部に難水溶性の薬物を内封するこ

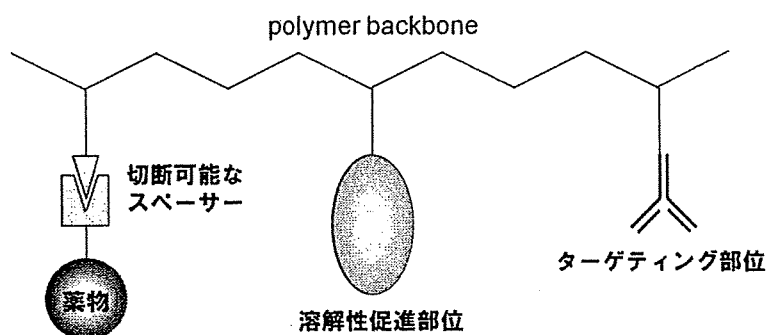


図2 Ringsdorf の提唱する高分子-薬物コンジュゲートのモデル²⁾

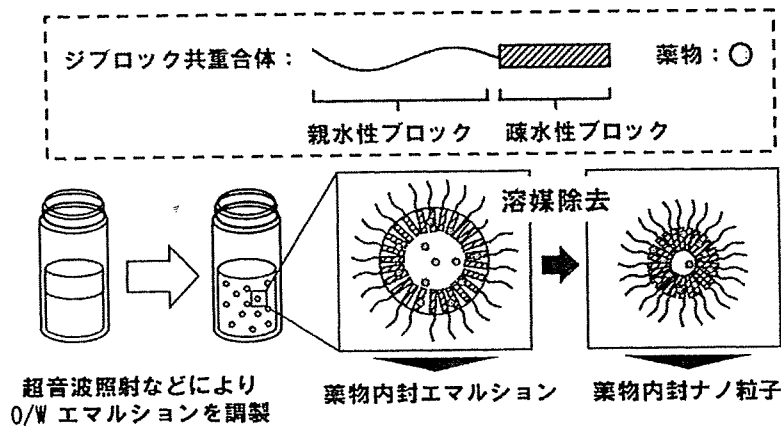


図3 溶媒拡散法によるジブロック共重合体を用いたナノ粒子調製法

とが可能になる。最近では、デンドリマーのコア部分に薬物を内封したナノスケールの薬物キャリア⁷⁾や光増感剤自体をデンドリマー化してアニオン性を付与し、カチオン性を有するジブロック共重合体でポリイオンコンプレックス(PIC)ミセルを形成した PDT への応用も検討されている⁸⁾。

3. 溶媒拡散法による PEG-PLA ナノ粒子

さまざまなポリマー製剤が開発されるなか、われわれは溶媒拡散法によるナノ粒子調製を行っている。本手法は、まず oil-in-water (O/W) エマルジョンを調製し、ジブロック共重合体の片方のユニットが溶解する有機溶媒を系中から除去することによって溶解性の乏しいユニット部分の析出を促し、結果として固体のコアを持ち、溶媒へ溶解性の高い高分子鎖を表面に持つナノ粒子が調製できる(図3)。

生体内への投与を考慮し、ナノ粒子を構成する成分として、抗原性を示さず生体適合性の高いポリエチレングリコール(PEG)鎖と生分解性高分子であるポリ乳酸(PLA)鎖のジブロック共重合体(PEG-PLA)を用いることとした(図4)。PEG ユニットは水に易溶であるが、PLA ユニットは水

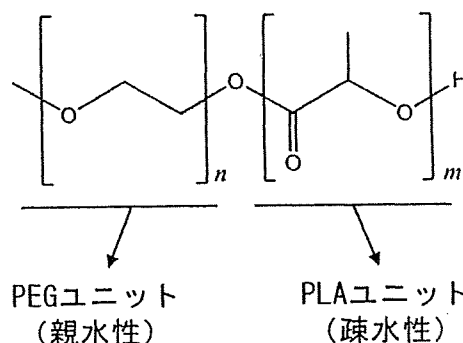


図4 PEG-PLA ジブロック共重合体の分子構造

に不溶であり、そのブロック共重合体 PEG-PLA は両ユニットの組成によって親水性か疎水性が決まる。本研究では、表1のような PLA 鎖長の異なる水溶性 PEG-PLA と油溶性 PEG-PLA の二種類を合成し、ナノ粒子調製を行った。さらに溶媒拡散法では、酢酸エチルを油相として用いることで、PEG-PLA によるエマルジョンの安定化が期待できる。なぜなら、酢酸エチルに対しては PLA ユニットが易溶であるのに対して PEG ユニットは不溶であるため、ジブロック共重合体は水-酢酸エチル界面へ配向しやすい状況を生み出している。

なお、本研究で用いている PEG と PLA はいずれも広く用いられている知名度の高い高分子であ

表1 用いた PEG-PLA ジブロック共重合体の組成

Sample No.	MeOPEG <i>M_w</i>	PEG-PLA <i>M_w</i>	PLA <i>M_w</i>	PEG-PLA <i>M_w/M_n</i>	PLA/PEG	HLB 値	溶解性
o-PEG-PLA	5,000	42,000	37,000	1.30	7.81	2.27	油溶性
w-PEG-PLA	5,000	6,000	1,000	1.05	0.29	15.55	水溶性

り、そのブロック共重合体もまた数多くの研究が行われている。当然、生体への安全性に優れていることから、ドラッグデリバリー担体としても数多くの研究が行われている⁹⁻¹³⁾。特に、疎水性抗癌物質であるパクリタキセル(Paclitaxel)を内封した PEG-b-PLA ミセル(Genexol-PM)は、現在乳癌や肺癌を対象として Phase II 試験が行われている^{6,14)}。ほとんどの場合、PEG-PLA を用いた薬物内封体は高分子ミセルとして調製されており、ブロック共重合体中の PLA/PEG 比が比較的 1 に近いものがよく用いられている。これは、高分子ミセルが水媒体中で調製されるため、ポリマー自体の水溶性と有機溶媒の除去に伴う自己会合体形成に必要な親-疎水性バランスを考慮したものであるといえる。それゆえ、本研究のコンセプトに基づき、薬物キャリアを設計するためには高分子ミセル構造よりも安定に薬物を内封させることを目的として PLA ユニットの増やし、油性 PEG-PLA を有機溶媒に添加して固化させることで、PEG を表面に持ち PLA をマトリックスとした PEG-PLA ナノ粒子の調製を行ってきた。粒子化した内部に薬物を内封することで、副作用の原因となる血中滞留時の薬物徐放は抑えられ、さらに担体への高効率な薬物内封が可能な調製プロセスの構築が期待される。

一般に高分子ミセルの調製方法としては、有機溶媒の減圧留去(液中乾燥)法、透析、キャスト法などが用いられる。いずれの手法においても薬物を溶解させている有機溶媒を除去することで、薬物を内封した高分子ミセルの形成を行う。この有機溶媒としてよく用いられているジクロロメタンは生体に対しても有害であり、薬剤として調製する際には僅かな残留もない調製法が求められる。本実験で用いている酢酸エチルもまた同様に溶媒拡散法によって除去を行うが、医薬品添加物規格、食品添加物公定書にも認められた比較的安全性の高い有機溶媒である。酢酸エチルはまた、水にも若干溶解することから、大量の水による希釈操作のみで常温で簡単に有機溶媒除去が可能な溶媒拡散法に適した有機溶媒といえる。

まず、酢酸エチル相に所定量の油性 PEG-PLA を溶解させ、超音波照射を行って O/W エマルジョン液滴を調製したところ、超音波出力の増

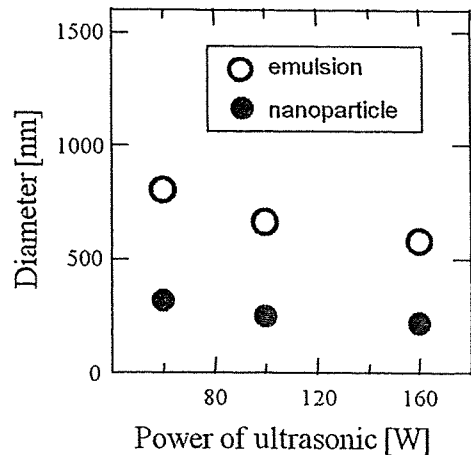


図5 粒径におよぼす超音波出力の影響

加とともに得られる液滴が若干小さくなることが分かった(図5)。溶媒拡散法によって最終的に得られたナノ粒子は、調製された液滴径を反映して平均径も減少するが、超音波出力を高くしても 220 nm 程度が限界であり、EPR 効果を期待するには粒径が大きすぎる。従来の研究においても、同様に比較的 PLA/PEG 比の大きな PEG-PLA を用いた場合は 200 nm 以上の粒子しか得られておらず¹⁵⁾、静脈注入する抗癌剤としては更なる調製手法の改良が求められていた。

そこで、本研究では超音波照射で調製される液滴径を小さくすることを目的として界面活性剤の導入を検討し、製剤調製時に余計な試薬の混入を防ぐために、界面活性剤としての役割を担う水性 PEG-PLA を合成した。そして、ナノ粒子マトリックス成分として重要な油性 PEG-PLA との同時使用を試みた。その結果、水性 PEG-PLA との併用によって超音波照射によるエマルジョン液滴径は大きく低下し、100 nm 以下のナノ粒子を得ることに成功した(図6)。図7のように走査型電子顕微鏡(SEM)の写真からも、100 nm 以下のナノ粒子が得られていることが示されている。得られたナノ粒子組成を ¹H-NMR によって測定したところ、ナノ粒子を純水で洗浄することで、水性 PEG-PLA はほとんどナノ粒子内には残らないことが確認された。また、実際に光増感剤であるフォトプロトポルフィリンIXジメチルエステル¹⁶⁾を内封した際も、ほぼ同等のナノ粒子調製挙動を示すことを確認している。調製時の光増感剤濃度を増加させると、内封率も大きく低下したが、

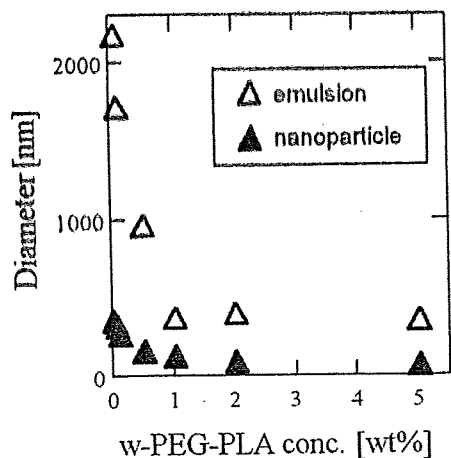


図6 粒径におよぼす水溶性 PEG-PLA(w-PEG-PLA)濃度の影響

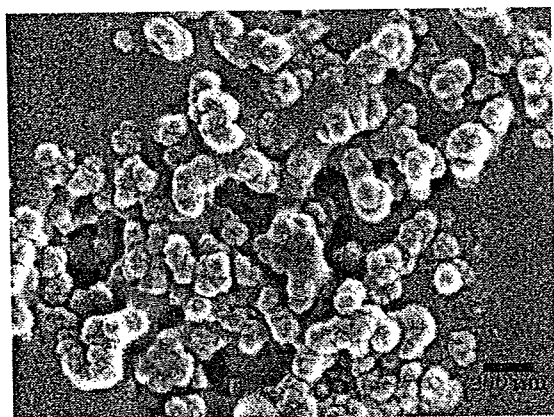


図7 PEG-PLA を用いて調製したナノ粒子の SEM 写真

これは光増感剤の酢酸エチルへの溶解度によるものであり、飽和溶解度以下の濃度であればほぼ100%の薬物内封効率を達成することができる。

このように、溶媒拡散法によって簡便で高効率な薬物内封ナノ粒子調製を実現することができたことから、PDTにおける薬物キャリアとしての性能を評価するために *in vitro* (生体外) 実験および *in vivo* (生体内) 実験を行った。

4. 光線力学的治療への応用

マウス結腸癌由来細胞(C26細胞)を播種した細胞培養ディッシュ上に、本ナノ粒子分散水溶液を添加し、一定時間培養後、培地交換して光照射を行った。光照射装置は市販の光源ランプに500 nm以下の光を遮断するフィルターを装着したものをを用い、赤色光の照射を実施した。このときの細胞生存率をMTT assayにより行ったところ、光増感剤の最終濃度が約50 nMでも光照射によ

りほぼ全ての細胞が死滅することが分かった。また、細胞のナノ粒子への曝露時間の増加に伴い細胞生存率も低下することから、ナノ粒子から細胞へ光増感剤の物質移動が起こっていることが示唆された。

次に、本ナノ粒子の体内での薬物動態を調査するために、³H 標識ナノ粒子を調製し、C26細胞をマウス背部皮下に移植して腫瘍体積が約500 mm³に達した時点で³H 標識ナノ粒子を尾から静脈注射した。その結果、血液中での滞留性の指標となるAUC(% of dose/mL·hr)値を算出すると、2070と非常に高い値を得た。一般的なリポソーム製剤よりも高い値であり、24時間後でも3割以上の薬物が体内循環していることが分かった。このときの各臓器への移行も定量した結果、5~10時間までに一時的に肺や脾臓に集積するもののその後低下したのに対して、図8から分かるように、腫瘍への蓄積は25時間後まで着実に増加を続けており、EPR効果による薬物集積が機能していることが確かめられた。また、図8から筋肉への集積がほとんどないことが示唆されており、これは光過敏症などの副作用抑制を大きく期待させる結果であるといえる。

さらに、C26細胞担癌モデルマウスを作製して、担癌マウスへのPDT効果を実証した。腫瘍体積が100 mm³に達した時点で、3 mg/kgとなるように光増感剤内封ナノ粒子水溶液を静脈投与した。図9には、その後の腫瘍サイズの増加を示す。その結果、参照実験群と比較しても単回照射群で腫瘍

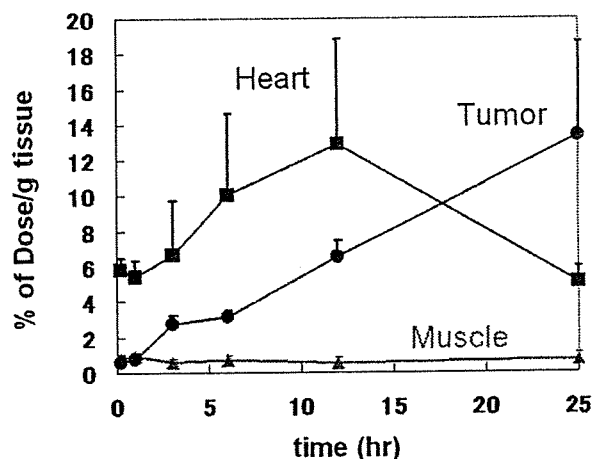


図8 ³H 標識ナノ粒子を用いた担癌マウスに対する静脈内投与後の各臓器への移行

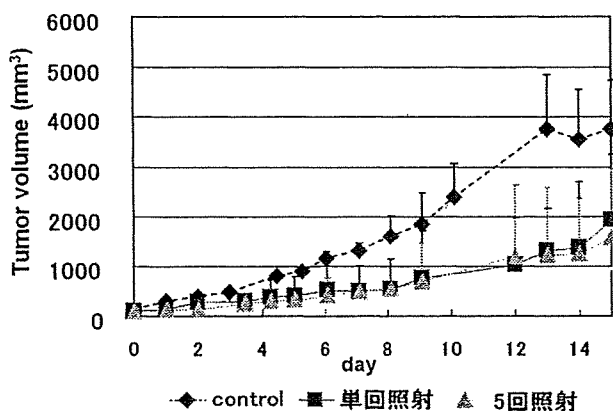


図9 担癌マウスへの PDT 結果 (Control: ナノ粒子の代替として PBS 投与, 単回照射群: 投与 12 時間後に赤色光 (>500 nm) を腫瘍局所に 5 分間照射, 5 回照射群: 投与 6, 12, 24, 36, 48 時間後に同様の光照射)

抑制効果を有意に示していることがわかる。この間、マウスの体重変化はほとんどなく、PDT による腫瘍の増殖抑制が達成されたことが *in vivo* 実験で示された。図 8 の結果と合わせて、本研究で目指す高い血中滞留性を保ち薬物徐放を抑えたナノ粒子は、PDT のためのドラッグキャリアとして極めて有効であるといえる。

5. おわりに

溶媒拡散法を用いたナノ粒子調製において、水溶性 PEG-PLA と油溶性 PEG-PLA を合わせて使用することで、エマルション液滴の微小化を達成した結果、EPR 効果の期待できる 100 nm 以下のポリ乳酸系ナノ粒子を調製することに成功した。本手法は、ほぼ 100% に近い内封率で疎水性薬物をナノ粒子内に内封することが可能であり、有害な物質がほとんど残留しない PEG-PLA と薬物のみで構成された生体適合性ナノ粒子を常温、低エネルギーで調製できる簡便な方法である。光増感剤を内封したポリ乳酸系ナノ粒子は、colon26 細胞を用いた *in vitro* (生体外) 実験において、極めて薬物濃度が低い条件でも光照射による殺細胞効果を示し、PDT における有効性を示すことができた。さらに、担癌マウスを用いた *in vivo* (生体内) 実験においては、血中での高い滞留性を示し、PDT による腫瘍増殖抑制を明らかにすることができた。本ナノ粒子調製法においては、光増感剤以外の疎水性薬物を同時に封入することも可能なため、他の作用機序を有する難水溶性抗癌剤との

多剤併用治療にも有効であると期待される。現在は、この有望な薬物ナノキャリアを活用して抗腫瘍効果を向上させることを目指すと同時に、本手法を用いた薬剤調製デバイスの開発も検討中である。また、本研究で用いたポルフィリン内封ナノ粒子は、製剤調製時の安全性に関する問題点をほとんど有さず、PDT による治療効果も期待できる基礎的知見を得ていることから、今後は臨床応用に向けた取り組みを進めていきたいと考えている。

最後に、本研究は厚生労働科研費医療機器開発推進研究事業：ナノメディシン研究の助成を得て推進できましたことに感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたり多大な協力を頂いた株式会社アスコルバイオ研究所顧問 阪田功様 (旧榑光ケミカル研究所常務取締役)、当研究室の廣田健君、渡邊貴一君、自然科学研究科特任助教 村中誠君、医歯薬総合研究科 白石太朗君にこの場を借りて厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 奥仲哲弥, 「PDT 適応拡大への課題」, 第19 回日本光線化学学会学術講演会抄録集, p.18
- 2) Y. Matsumura, H. Maeda, A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy : Mechanism of Tumoritropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs, *Cancer Res.*, **46**, 6387-6392 (1986)
- 3) L. Gros, H. Ringsdorf, H. Schupp, *Angew. Chem. Int. Ed.* **20**, 305-325 (1981)
- 4) R. Duncan, The dawnning era of polymer therapeutics, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2**, 347 (2003)
- 5) M.J. Vicent, H. Ringsdorf, R. Duncan, Polymer therapeutics : Clinical applications and challenges for development, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **61**, 1117-1120 (2009)
- 6) 加藤 健, バクリタキセル内包ミセル NK105 の臨床試験の状況, *Drug Delivery System*, **24-1**, 28-34 (2009)
- 7) E.R. Gillies, J.M.J. Frechet, Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery, *Drug Discovery Today*, **10**, 35-43 (2005)
- 8) N. Nishiyama, Y. Nakagishi, Y. Morimoto, P.-S. Lai, K. Miyazaki, K. Urano, S. Horie, M. Kumagai, S. Fukushima, Y. Cheng, W.-D. Jang, M. Kikuchi, K. Kataoka, Enhanced photodynamic cancer treatment by supramolecular nanocarriers charged with dendrimer phthalocyanine, *J. Controlled Release*, **133**, 245-251 (2009)
- 9) L. Yang, X. Wu, F. Liu, Y. Duan, S. Li, Novel biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol) micelles prepared by direct dissolution method for controlled delivery of anticancer drugs, *Pharm. Res.*, **26**, 2332-2342 (2009)
- 10) P. Jie, S.S. Venkatraman, F. Min, B.Y.C. Freddy, G.L. Huat, Micelle-like nanoparticles of star-branched PEO-PLA copolymers

- as chemotherapeutic carrier, *J. Controlled Release*, **110**, 20-33 (2005)
- 11) L. Chen, Z. Xie, J. Hu, X. Chen, X. Jing, Enantiomeric PLA-PEG block copolymers and their stereocomplex micelles used as rifampin delivery, *J. Nanopart. Res.*, **9**, 777-785 (2007)
- 12) X. Wang, Y. Wang, X. Chen, J. Wang, X. Zhang, Q. Zhang, NGR-modified micelles enhance their interaction with CD13-overexpressing tumor and endothelial cells, *J. Controlled Release*, **139**, 56-62 (2009)
- 13) L. Liu, C. Li, X. Li, Z. Yuan, Y. An, B. He, Biodegradable polylactide/poly(ethylene glycol)/polylactide triblock copolymer micelles as anticancer drug carriers, *J. Appl. Polym. Sci.*, **80**, 1976 (2001)
- 14) T.-Y. Kim, D.-W. Kim, J.-Y. Chung, S.G. Shin, S.-C. Kim, D.S. Heo, N.K. Kim, Y.-J. Bang, Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies, *Clinical Cancer Res.*, **10**, 3708 (2004)
- 15) R. Gref, P. Quellec, A. Sanchez, P. Calvo, E. Dellacherie, M.J. Alonso, Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **51**, 111-118 (2001)
- 16) 特願 2008-118187

An emulsion generating microchannel device oscillated by 2.25MHz ultrasonic vibrator

Takuya Harada¹, Takefumi Kanda¹, Koichi Suzumori¹, Tsutomu Ono², Sotaro Iwabuchi², Kazuyuki Ito², Ken-ichi Ogawara³ and Kazutaka Higaki³

¹Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, Okayama, JAPAN

²Graduate School of Environmental Science, Okayama University, Okayama, JAPAN

³Graduate School of Medicine Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama, JAPAN

In this study, an emulsion generating device by an ultrasonic vibration and a microchannel has been used to obtain emulsions. The process to generate emulsion consists of Y-type microchannel and ultrasonic device. Once micro meter size emulsions were generated by Y-type microchannel, after that, micro emulsions are sonicated by the ultrasonic vibration and the microchannel to obtain emulsions. Though the diameter of emulsions was 30 μ m by using Y-type microchannel, sonicated emulsions' diameter was about 200nm. In addition, as the applied voltage increased, sonicated emulsions became smaller and distribution became sharper.

Keywords : emulsion, sonication, ultrasonic vibration, microchannel, emulsification

1. Introduction

An emulsification is an important technique and used in many fields such as cosmetics, food production and medical science. Especially, monodisperse emulsion is very useful because it improves the quality and stabilities of products and facilitates the control of properties 1).

A lot of emulsification techniques have been studied 2). For example, a high pressure homogenization 3, 4), a membrane emulsification 5, 6), a microchannel emulsification 7, 8) and a PIT (Phase Inversion Temperature) method 9, 10).

Some devices used an ultrasonic vibration to generate emulsions 11-15). These devices use a cavitation effect to generate emulsions. The cavitation effect is occurred when a liquid is irradiated by ultrasonic, the pressure amplitude of the applied sound source reaches a certain minimum threshold and some micro bubbles in the water are collapsed 13, 14). The formation of cavitation is growth and subsequent collapse of microbubbles caused by the pressure fluctuations of the acoustic wave 11). Cavitation collapse generates intense local heating, high pressure and liquid jet stream 13). By these functions, emulsions are generated.

From some references, ultrasonic emulsification has certain trends 11-15).

1. As the irradiation power increases, the dispersed phase droplet size decreases.
2. As the residence time increases, the dispersed phase droplet size decreases
3. As the concentration of the dispersed phase increases, the require irradiation power increases to reduce the dispersed phase droplet size.

In fact, the irradiation power, the residence time and the

concentration of the dispersed phase influence the dispersed phase droplet size and the quality (stability) of emulsion.

A simple way to generate emulsions by ultrasonic is by immersion of a transducer horn into the solution and using cavitation. However, as this driving frequency is around 20 kHz, noise is made loudly. Furthermore, as this process is batch process, contamination of the emulsions can't be avoided. In addition, entire devices become large because transducer horn is large.

We have studied generation of emulsions by a torsional Langevin-type transducer and a micropore plate 16). However, it is difficult to generate nano size emulsions because emulsions' diameter is depend on micropore diameter.

The aim of this study is to fabricate an emulsion generating device using an ultrasonic vibration and a microchannel. By integrating the ultrasonic device and the microchannel, the small device and a flow process will be realized. In addition, contamination of the emulsions can be avoided.

2. Structure and material

2.1 Emulsion generating system

The process to generate emulsion consists of Y-type microchannel and ultrasonic device. Schema of the emulsion generating system is shown in Fig. 1. Once oil and water are supplied by syringe pumps to Y-type microchannel, micro emulsions are generated because of the fluid shear force caused by two flow rate difference 9). After that, micro emulsions are sonicated by an ultrasonic vibration and a microchannel to obtain emulsions.

By using this method, the flow process can be conducted and contamination of the emulsions can be avoided. Furthermore, as it is possible to integrate the Y-type

microchannel and ultrasonic device, small emulsification device can be fabricated.

Figure 2 shows the photographs of the Y-type microchannel. The Y-type microchannel is four-layer structure and consists of two stainless steel block, a thin Y-microchannel and a glass substrate. The thin Y-microchannel is sandwiched in between the stainless steel and the glass substrate. The Y-type microchannel is made of stainless steel. Figure 3 indicates the each microchannel width of the Y-type microchannel. The water phase, the oil phase and the emulsion phase microchannel width are 141 μ m, 104 μ m and 137 μ m, respectively. The Y-type microchannel is 35 mm long, 60 mm wide and 21 mm thick.

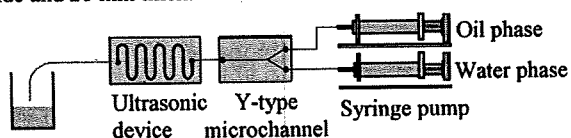


Fig. 1 Schema of the emulsion generating system

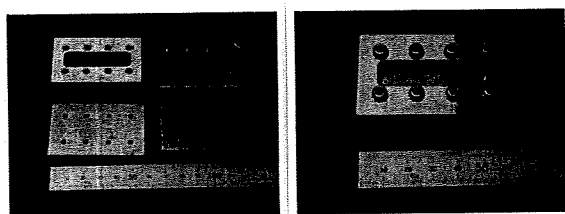


Fig. 2 Photographs of the Y-type microchannel

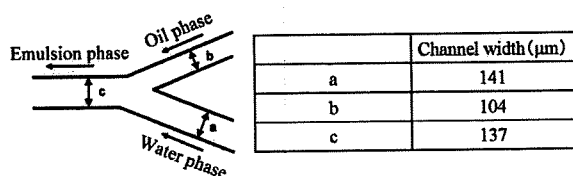


Fig. 3 Y-type microchannel's width

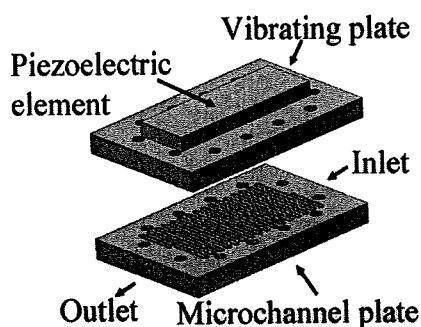


Fig. 4 Schematic view of ultrasonic device

The ultrasonic device consists of two plates. One is microchannel plate and the other is vibrating plate on which a piezoelectric element is bonded. The lead zirconate titanate (PZT) is used as piezoelectric element (Fuji Ceramics Co.,

Japan). These plates are made of stainless steel. These plates are clamped when they are used. Figure 4 shows schematic view of the ultrasonic device.

The cross-sectional view and the top view of the microchannel are indicated in Fig. 5. The microchannel is 0.711mm wide and 0.35mm deep. Total length of the microchannel is 24 times of the top view in Fig. 4. The centerline of the microchannel is 1630.6mm and the volume of the microchannel is 342.4mm³. The plate is 50mm long, 80mm wide and 5mm thick. The piezoelectric element is 20mm long, 60mm wide and 5mm thick. Photographs of the fabricated ultrasonic device are shown in Fig. 6.

2.2 Materials

Table I shows the materials used for generating emulsion in this study. The materials used were aqueous glycerol solution as water phase, tricaproin, tricaprylin, Tween 80 and egg yolk lecithin as oil phase (7). Tween 80 and egg yolk lecithin were used as a surfactant. These surfactants change the interfacial tension and make it easy to generate emulsions.

Table I Materials.

Water phase	Aqueous glycerol solution
Oil phase	Tricaproin, Tricaprylin, Tween 80, Egg yolk lecithin

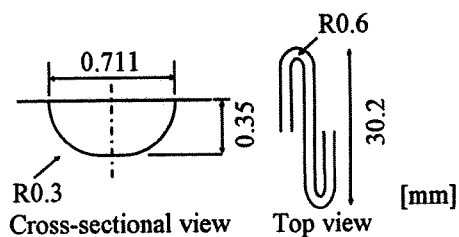


Fig. 5 Cross-sectional view (left) and top view (right) of the microchannel

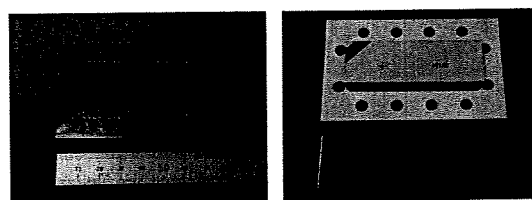


Fig. 6 Photographs of ultrasonic device: Microchannel plate (left) Vibrating plate (left)

3. Experimental results

3.1 FEM analysis

To confirm the vibrational mode and the resonance frequency of the vibrating plate, finite element method (FEM)

analysis was conducted by ANSYS. The analytical result is shown in Fig. 7. As shown in Fig. 7, thickness vibration was generated and the resonance frequency was about 2.3MHz.

In addition, two-dimensional acoustic analysis was conducted to obtain the pressure distribution. The acoustic analytical result is shown in Fig. 8. Fig. 8 shows one of microchannel's acoustic analytical results of pressure distribution. The ultrasonic irradiation direction was from bottom to up in Fig. 8. From Fig. 8, pressure distribution was corresponding to the half length of the acoustic wave.

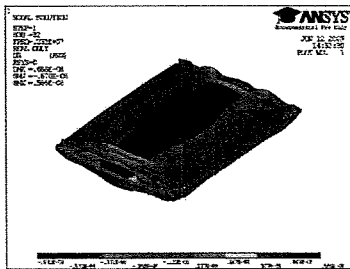


Fig. 7 A vibrational mode of the vibrating plate by FEM:
Frequency was about 2.3MHz

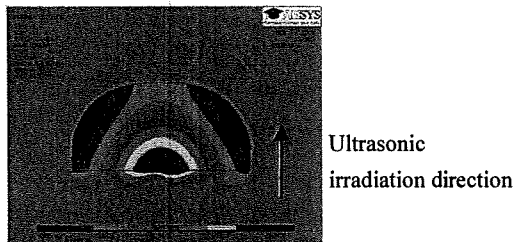


Fig. 8 Pressure distribution in the microchannel in section by FEM

3.2 Evaluation of device performance

The relationship between the applied voltage and current was measured and the result is shown in Fig. 9. From the Fig. 9, the power consumption were 13.5, 31.2, 46.5W, when the applied voltage were 50V_{p-p}, 80V_{p-p}, 100V_{p-p}, respectively.

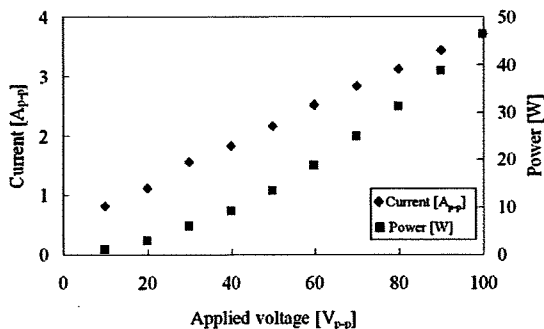


Fig. 9 Relationship between the applied voltage and electric current and power

The vibrational amplitude was measured by using a laser Doppler vibrometer. The vibrating plate was clamped at both ends when the vibrational amplitude was measured. Figure 10 shows the schematic view of measurement area. The center of the plate was x origin and y origin and dots in Fig. 10 were measurement points. The vibrational amplitude was measured from the center to side to side at 5mm intervals to 20mm in x direction and up and down at 5mm intervals in y direction.

The relationship between the distance and the amplitude was shown in Fig. 11. From this result, vibration had slight variability on the sides of plate. This reason is considered that piezoelectric element and vibrating plate were not bonded uniformly. Therefore, there was a slight variability on the sides of plate.

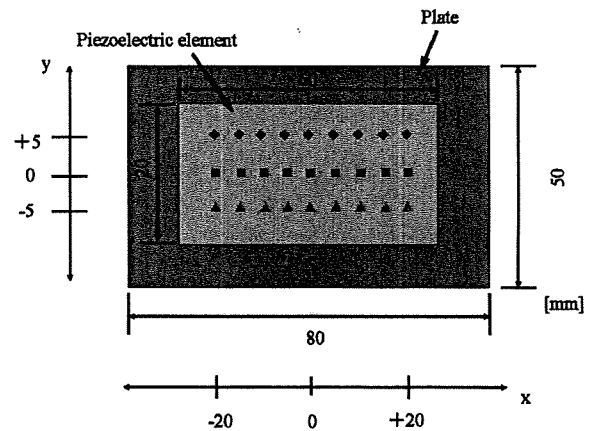


Fig. 10 Schematic view of measurement area

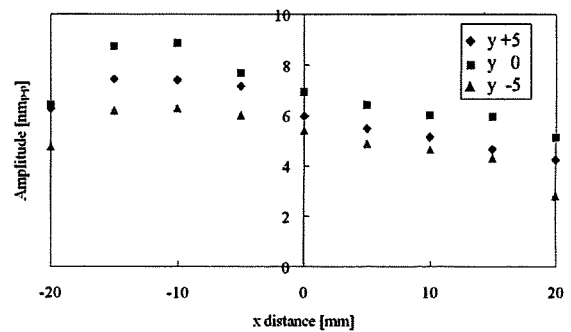


Fig. 11 Relationship between the distance and the amplitude

The temperature character of the ultrasonic device was measured. The experimental condition was that the applied voltage was 100V_{p-p} and driving frequency was 2.25MHz. The result was shown in Fig. 12. As shown in Fig. 12, the temperature was in thermal equilibrium in 15 minutes. The temperature was 90 degrees. This temperature increase caused by the ultrasonic device driving didn't effect generation of emulsion greatly.

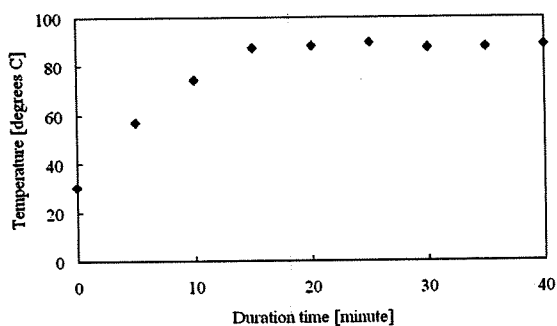


Fig. 12 Relationship between the duration time and the temperature

3.3 Emulsion generation

Firstly, the generation of emulsion by Y-type microchannel was conducted. The flow rate of the water phase and the oil phase were 100 μ l/min and 1 μ l/min, respectively. Figure 13 shows the optical microscope photographs of generated emulsions by Y-type microchannel. According to Fig. 13, polydisperse emulsions were generated. Most diameters of the generated emulsions were about less than 50 μ m.

Table 2 shows the flow rate of the water phase and oil phase, applied voltage and driving frequency. The flow rate of the water phase and oil phase and driving frequency were constant value 100 μ l/min, 1 μ l/min, 2.25MHz, respectively. Applied voltage was changed 50V_{p-p}, 80V_{p-p} and 100V_{p-p}, respectively. Figure 14 shows optical microscope photographs of the generated emulsions sonicated by ultrasonic device when applied voltages were 50V_{p-p}, 80V_{p-p} and 100V_{p-p}, respectively. From the comparison of Fig. 13 and Fig. 14, emulsions became so small that it is difficult to observe emulsions by optical microscope. Figure 15 indicates the distribution of the emulsion diameter measured by the dynamic light scattering (DLS) when applied voltage were 50V_{p-p}, 80V_{p-p}, and 100V_{p-p}, respectively. From Fig. 15, as the applied voltage increased, the peak wide around 200nm became sharper and the distribution around 6 μ m reduced. This result means that the ultrasonic irradiation intensity was important factor and as the ultrasonic irradiation intensity increased, generated emulsion became small and distribution became sharp. This result corresponded to the references.

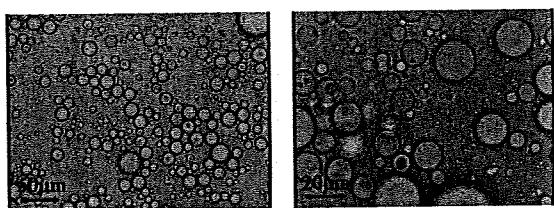


Fig. 13 Optical microscope photographs of generated emulsions by Y-type microchannel: The flow rate of the water

phase and the oil phase were 100 μ l/min and 1 μ l/min.

Table 2 Flow rate, applied voltage and driving frequency.

	A	B	C
Water phase [μ l/min]	100	100	100
Oil phase [μ l/min]	1	1	1
Applied Voltage [V _{p-p}]	50	80	100
Power [W]	13.5	31.2	46.5
Driving frequency [MHz]	2.25		

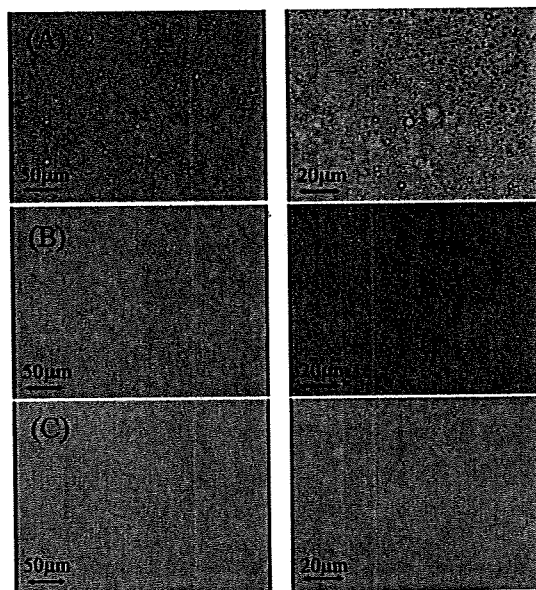


Fig. 14 Optical microscope photographs of generated emulsions by ultrasonic device: Upper (A) condition, middle (B) condition, under (C) condition

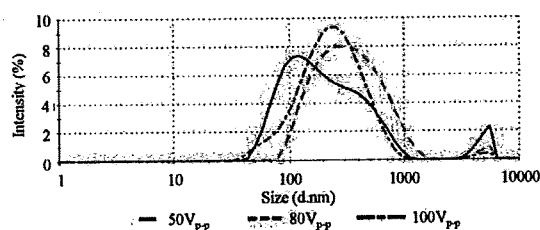


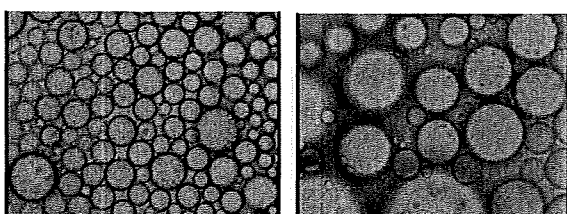
Fig. 15 Relationship between emulsion diameter and intensity measured by DLS when applied voltage was changed

Furthermore, the generation of emulsion by changing the flow rate of water and oil phase was conducted. This experiment's aim was to investigate the emulsion generation by the difference of the residence time. Table 3 shows the residence time, when the water and oil phase flow rates were 100-1 μ l/min, 200-2 μ l/min, and 50-0.5 μ l/min. The applied voltage and driving frequency were constant value 100V_{p-p} and 2.25MHz, respectively. Optical microscope photographs of

generated emulsions by Y-type microchannel were shown in Fig. 16 when the flow rate of the water phase and the oil phase were 50 -0.5 μ l/min and 200-2 μ l/min, respectively. From Fig. 16, as the water and oil flow rate decreased, generated emulsion became larger. Figure 17 shows the optical microscope photographs of generated emulsions by ultrasonic device when the flow rate of the water phase and the oil phase were 50-0.5 μ l/min and 200-2 μ l/min, respectively. As is the case when the flow rate of the water phase and the oil phase were 100 μ l/min and 1 μ l/min, sonicated emulsions were too small. Figure 18 shows the distribution of the emulsion diameter measured by DLS when water and oil phase flow rate was 100-1 μ l/min, 200-2 μ l/min, and 50-0.5 μ l/min, respectively. According to Fig. 18, the difference of residence time had little effect on the emulsion diameter. This reason is considered that concentration of the oil phase was so low. Therefore, change of the residence time didn't influence the emulsion's diameter greatly.

Table 3 Flow rate, residence time, applied voltage and driving frequency.

	C	D	E
Water phase [μ l/min]	100	50	200
Oil phase [μ l/min]	1	0.5	2
Residence time [min]	3.4	1.4	6.8
Applied voltage [V_{p-p}]	100		
Driving frequency [MHz]	2.25		



(仮)

Fig. 16 Optical microscope photographs of generated emulsions by Y-type microchannel. Upper: (D) condition flow rate, under: (E) condition flow rate.

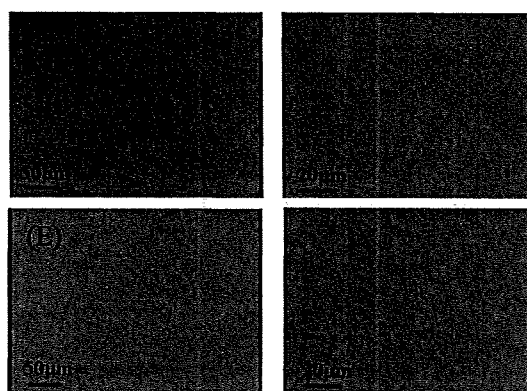


Fig. 17 Optical microscope photographs of generated emulsions by ultrasonic device. Upper: (D) condition, under: (F) condition.

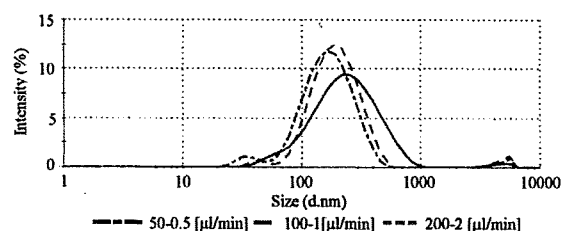


Fig. 18 Relationship between emulsion diameter and intensity measured by DLS when flow rate was changed

In addition, the experiment of changing oil phase concentration was conducted. The applied voltage and the water phase flow rate were constant value, 100 V_{p-p} and 100 μ l/min, respectively. The oil phase flow rate was changed 2, 5, 10 μ l/min. Figure 19 shows the distribution of the emulsion diameter measured by DLS when water and oil phase flow rate was 100-2 μ l/min, 100-5 μ l/min and 100-10 μ l/min respectively. As shown in Fig. 19, as the concentration of the oil phase increased, sonicated emulsions became larger. This reason is considered that the require irradiation intensity to generate small emulsions was increased as the concentration of the oil phase increased. This experiment also corresponded to the references.

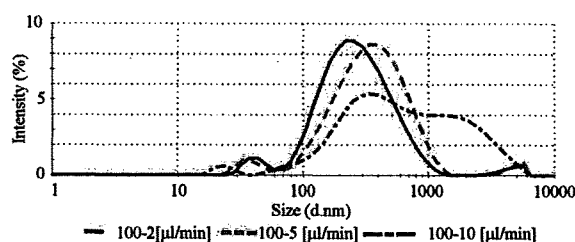


Fig. 19 Relationship between emulsion diameter and intensity measured by DLS when concentration of the oil phase was changed

4. Conclusion

In this paper, the generation of emulsion was conducted by the ultrasonic device and the microchannel. By integrating the ultrasonic device and the microchannel, the small device and a flow process were realized. In addition, contamination of the emulsions was able to be avoided.

As the applied voltage increased, sonicated emulsion became smaller and distribution became sharper. When the applied voltage was $100V_{p-p}$, sonicated emulsions' average diameter was about 200nm. However, as the concentration of the oil phase increased, sonicated emulsions became large.

In the future, to realize emulsion generation when the concentration of the oil phase is high, microchannel's cross-section would be changed. In addition, microchannel and ultrasonic device would be laminated to be smaller type.

Acknowledgement

The authors would like to thank Mr. Norihisa Senou of Industrial Technology Center of Okayama Prefecture for valuable advice and his assistance with fabrication of microchannel.

References

1. D.J. McClements, "Food emulsions: principles, practice and techniques", CRC Press, Boca Raton, FL, 1999.
2. F. L. Calderon, V. Schmitt and J. Bibette: *Emulsion Science* (Springer, New York, 2007) 2nd ed., p.5.
3. Juliane Flourey, Anne Desrumaux and Jérémie Lardières: *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 1 (2000), 127-134.
4. M.C. Puppo, V. Beaumal, N. Chapleau, F. Speronia, M. de Lamballerie, M.C. Añón and M. Anton: *Food Hydrocolloids*. 22 (2008), 1079-1089
5. T. Nakashima, M. Shimizu, M. Kukizaki: *Advanced Drug Delivery Reviews*, 45 (2000), 47-56.
6. G. T. Vladislavjević, Helmar Schubert: *Journal of Membrane Science*, 225 (2003), 15-23
7. I. Kobayashi, S. Mukataka, M. Nakajima: *Journal of Colloid and Interface Science*, 279 (2004), 277-280.
8. M. Yamada, S. Doi, H. Maenaka, M. Yasuda, M. Seki: *Journal of Colloid and Interface Science*, 321 (2008), 401-407.
9. J. Kubota, A. Kato and T. Ono: *AIChE Annual Meeting*. 2007, 332p.
10. S. Ee, X. Duan, J. Liew, Q. D. Nguyen: *Chemical Engineering Journal*, 140 (2008), 626-631.
11. T. S. H. Leong, T. J. Wooster, S. E. Kentish and M. A. shokkumar: *Ultrasonic Sonochemistry*. 16 (2009), 721.
12. S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle and B. Gander: *Ultrasonic Sonochemistry*. 13 (2006) 76.
13. T. Hielscher and H. GmbH: *Proc. European Nano Systems*. 2005, p.138.
14. S. G. Gaikwad, A. B. Pandit: *Ultrasonics Sonochemistry*. 15 (2008) 554-563.
15. S. Freitas, G. Hielscher, H. P. Merkle and B. Gander: *Ultrasonics Sonochemistry*. 13 (2006) 76-85.
16. T. Harada, N. Ishikawa, T. Kanda, K. Suzumori, Y. Yamada and K. Sotowa: *Sensors and Actuators A*, 155 (2009) 168-174.
17. Y. Fukuoka, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura: 21st

ドキシソルビシン内封 PEG 修飾リポソームの P-糖タンパク質高発現がん細胞に対する *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
岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 薬学系

【目的】

近年、抗がん剤開発の進展により、多種多様な抗がん剤が臨床において用いられているが、抗がん剤特有の重篤な副作用により、多くの場合は低用量、且つ長期的な投与を余儀なくされている。しかしながら、その長期的な投与により、がん細胞が抗がん剤に対する耐性を獲得し、薬物の有効性が徐々に低下することが臨床的にもしばしば認められ、がん化学療法における重大な問題となっている。現在多くの耐性化メカニズムが提唱されているが、その中でも抗がん剤の長期暴露により、薬剤排出トランスポーターである P-糖タンパク質 (P-gp) ががん細胞上に発現誘導されることが、がん治療上での耐性獲得における主要な要因の一つと考えられている。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、P-gp 阻害剤と抗がん剤の併用、微粒子性担体の利用による P-gp を介した細胞外排出の回避、P-gp をコードする MDR1 遺伝子の発現抑制など、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) を用いて、抗がん剤ドキシソルビシン (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 *in vivo* 抗腫瘍効果を指標として、その耐性克服を目指し種々の検討を行った。

【実験方法ならびに結果 1】

C26/DOX の DOX に対する *in-vitro* 感受性の評価

実験に用いる P-gp 高発現株 C26/DOX は、未処理の C26 (C26/control) に対し、DOX を添加した条件で長期的に培養し、その添加濃度を段階的に増加していく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 に対する耐性を獲得していることが明らかになった。

In-vitro における DOX 耐性化機序の検討

DOX 添加後の蛍光顕微鏡観察の結果、C26/DOX の細胞内 DOX 量が C26/control と比較して顕著に低いことが明らかとなった。またウエスタンブロット法による解析の結果、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た。さらに、C26/DOX において P-gp 阻害剤であるベラパミルの併用により、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 に対する感受性の低下には、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。

In-vivo 抗腫瘍効果の評価

まず、DOX 水溶液の静脈内投与を行ったところ、C26/control 及び C26/DOX 固形がんモデルマウスに対して in-vivo 抗腫瘍効果は認められず、その一方で DOX による毒性作用として、顕著な体重減少が認められた。そこで次に、全身性の副作用を軽減し、且つ腫瘍組織内への DOX の蓄積性を高めることを目的として、固形腫瘍において広く認められる Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR 効果) を期待できる polyethylene glycol (PEG) 修飾リポソームに DOX を内封した、DOX 内封 PEG 修飾リポソーム (PL-DOX) を調製し、検討に用いた。C26/control 及び C26/DOX 固形がんモデルマウスに PL-DOX を静脈内投与したところ、in-vitro での結果とは異なり、C26/DOX 固形がんモデルマウスにおいても C26/control 固形がんモデルマウスと同程度の高い腫瘍増殖抑制効果及び生存日数の延長効果が認められることが明らかとなった。

C26/DOX 固形がんモデルマウスにおける in-vivo 抗腫瘍効果の発現メカニズムの解析

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 抗腫瘍効果の背後に存在する効果発現メカニズムの解析を試みた。まず、 $[^3\text{H}]$ -cholesteryl hexadecyl ether で脂質二重膜を放射標識した PEG 修飾リポソームの体内動態特性の評価、並びに血管内皮細胞のマーカー分子である CD31 の免疫組織化学染色により腫瘍組織内血管分布性の評価を行った結果、両固形がんモデルマウス間で PEG 修飾リポソームの腫瘍組織内への蓄積性、及び腫瘍組織内の血管分布性に差は認められなかった。次に TUNEL 染色法により腫瘍組織内で誘発されるアポトーシスの程度を両固形がんモデルマウスにおいて検討した結果、C26/DOX 固形がんモデルマウスの腫瘍組織内で誘発されるアポトーシスの程度が、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った。このことは、C26/DOX において認められた高い 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を示唆するものであった。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 MTT アッセイにより検討した。その結果、HUVEC に対する DOX の IC_{50} 値は、C26/control に対する値とほぼ同等であり、HUVEC が DOX に対して高い感受性を示す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、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 の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示唆するものである。

参考文献

(1) Ogawara, K. Un K., Tanaka K., Higaki K. and Kimura T., In Vivo Anti-Tumor Effect of PEG Liposomal Doxorubicin (DOX) in DOX-Resistant Tumor-Bearing Mice: Involvement of Cytotoxic Effect on Vascular Endothelial Cells. *J. Controlled Rel.*, 133, 4-10 (2009).

ドキシソルビシン内封ニオソームの体内動態特性および抗腫瘍効果の評価

○大河原 賢一、Tamer Shehata、檜垣 和孝、木村 聡城郎

(岡山大院・医歯薬)

ニオソームは、非イオン性界面活性剤により構成された二重膜に被われた閉鎖小胞であり、リポソームと同様の構造的な特徴を有する分子集合体であることから、様々な物理化学的特性を有する薬物を内部に封入できると考えられ、薬物キャリアーとしての応用が期待されている。そこで本研究では、異なった HLB 値を有する 3 種類の非イオン性界面活性剤 (Brij 72, Span 20 or Tween 60) を用いて各種ニオソームを調製し、それらの物理化学的特性、ならびに体内動態特性に関して多面的な評価を加えた。さらに抗がん剤ドキシソルビシン (DOX) を内封した DOX 内封ニオソームを調製し、それらの抗腫瘍活性についても評価した。これらの評価に際し、ニオソーム表面をポリエチレングリコール (PEG) により修飾した PEG 修飾体も調製し、併せて検討を行った。各種ニオソームをラットに静脈内投与した際の体内動態を評価したところ、Brij 72 あるいは Span 20 ニオソームにおいては、投与後速やかな血漿中からの消失が認められたのに対し、これらのニオソーム表面を PEG により修飾することにより、血中滞留性が顕著に増大することが明らかとなった。一方、Tween 60 ニオソームでは PEG 修飾の有無による体内動態への影響は認められなかった。さらに DOX を内封した各種ニオソームを固形がんモデルマウスに静脈内投与し、DOX の血漿中濃度推移ならびに組織分布特性を評価した結果、Brij 72 あるいは Span 20 ニオソームにおいては、PEG 修飾により DOX の血中滞留性のみならず腫瘍組織への移行量も有意に増大することが明らかとなった。また DOX 内封ニオソーム静脈内単回投与後の抗腫瘍効果を評価した結果、PEG 修飾を施した Brij 72 あるいは Span 20 ニオソームにおいて、顕著な腫瘍増殖抑制効果が認められ、その効果は非修飾のものと比較しても高いものであった。

第 25 回 DDS 学会発表要旨

パクリタキセル含有新規微粒子製剤の体内動態特性及び抗腫瘍効果の評価

○吉澤 雄太、河野 裕允、大河原 賢一、檜垣 和孝、木村 聰城郎
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

今回我々は、難水溶性抗がん剤パクリタキセル (PTX) の抱える臨床上の問題点を改善し得る製剤として、エマルション製剤及びリポソーム製剤に着目し、正常ラット及び固形がんモデルマウスにおける、これら PTX 含有微粒子製剤静脈内投与後の体内動態特性ならびに抗腫瘍効果の評価した。また、EPR 効果によるパッシブターゲティングを目的として、それぞれの PEG 修飾体も同様に調製した。種々の検討の結果、エマルション製剤の場合、PEG 修飾の有無に関わらず、PTX は投与後速やかにエマルションから放出されているのに対して、リポソーム製剤は、血中において PTX を比較的安定に保持していることが示唆された。また、リポソーム表面を PEG 修飾することにより、リポソーム自身ならびに内封 PTX の血中滞留性が顕著に上昇し、それに伴い、より多くの PTX を腫瘍組織へ送達でき、最も高い腫瘍増殖抑制効果と延命効果を示すことが明らかとなった。(400 字)

ドキシソルビシン内封アルブミン修飾 PEG リポソームの体内動態特性とその抗腫瘍効果の評価

西口 修平、渡 亮輔、大河原 賢一、檜垣 和孝、木村 聰城郎
岡山大学大学院 医歯薬学総合研究科

我々はこれまでにポリエチレングリコール (PEG) 修飾リポソームの表面にアルブミンを化学的に導入することで、その血中滞留性の増大が可能であることを明らかにしてきた。今回は、過去に検討を行ったアルブミンの結合方法の中で、最も高い血中滞留性を示した Modified SPDP 法を選択し、本結合方法により調製したアルブミン修飾 PEG リポソームにドキシソルビシンを内封し、その体内動態特性ならびに抗腫瘍効果を評価した。その結果、PEG リポソーム表面にアルブミンを化学的に導入することにより、リポソーム表面への C3 や IgG といった代表的なオプソニンの吸着が抑制され、静脈内投与後のリポソームならびにドキシソルビシンの血中滞留性、腫瘍組織への移行量が増大することが明らかとなった。さらに、アルブミン修飾 PEG リポソームが、コントロール PEG リポソームと比較して、有意に高い腫瘍増殖抑制効果を示すことが明らかとなった。
(401 文字)

ANTI-TUMOR EFFECT OF ANGIOGENESIS INHIBITOR SU5416 FORMULATED IN PEGYLATED EMULSION

Shigeki Abe, Keita Un, Taka-aki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Toshikiro Kimura, Kazutaka Higaki

Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University 1-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8530, Japan

[Purpose] Angiogenesis, the sprouting of capillaries from pre-existing ones, is essential for the sustained growth of solid tumors, which makes tumor angiogenic blood vessels a key target for potential therapeutic intervention. In this study, we selected SU5416, a hydrophobic molecule with potent tyrosine kinase inhibitory activity toward VEGF-R2 known to play a major role in tumor angiogenesis, and formulated it into O/W PEGylated emulsion (SU5416-PE).

[Method] In-vitro activity of SU5416 in Colon-26 carcinoma cells (C26) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) was evaluated by MTT assay. In-vivo disposition characteristics of naked and PEGylated emulsions after intravenous injection were assessed in normal rats. In-vivo anti-tumor activity of intravenously injected SU5416-PE was evaluated in C26 tumor-bearing mice.

[Results and discussion] MTT assay revealed that SU5416 selectively inhibited the proliferation of HUVEC and did not show such an inhibitory effect in several types of tumor cells including C26. In normal rats, PEGylation significantly prolonged the blood circulating time of emulsion. Furthermore, multiple injection of SU5416-PE significantly inhibited the tumor growth and significantly prolonged the survival time of C26 tumor-bearing mice.

[Conclusion] SU5416-PE passively delivered into tumor tissues would inhibit the angiogenesis in tumor tissue, leading to the efficient in-vivo anti-tumor activity. These findings indicate the potency of targeting of anti-angiogenic drugs such as SU5416 to vascular endothelial cells for the development of efficient cancer chemotherapy. Now, we are investigating whether SU5416-PE can exert similar in-vivo anti-tumor effect in other solid tumor-bearing mice model.