

ポルフィリン封入ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体ナノ粒子の体内動態特性と PDT による抗腫瘍効果の評価

白石太朗¹⁾、大河原賢一¹⁾、木村聰城郎¹⁾、檜垣和孝¹⁾、小野努²⁾、木村幸敬²⁾

(1) 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬学系、(2) 岡山大学大学院環境学研究科

【目的】Photo Dynamic Therapy (PDT) を利用したがん治療は、ポルフィリン等の感光剤を投与後、腫瘍組織選択的に印加する光刺激により局所的に生じる一重項酸素が、がん細胞に対して殺細胞効果を発揮することに基づくものである。したがって PDT を利用したがん治療の成否は、感光剤をいかに効率よく腫瘍組織へ送達するかにかかっている。そこで我々は、脂溶性のポルフィリン誘導体を内封したポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体からなるナノ粒子 (PLA-PEG ナノ粒子) を調製し、本製剤の *in vitro* 殺細胞効果、*in vivo* 体内動態特性および *in vivo* 抗腫瘍効果に関して多面的な評価を加えた。

【方法】*In vitro* 殺細胞効果は、がん細胞に調製した PLA-PEG ナノ粒子製剤を添加し、一定時間後に光照射を行い、24 時間後の細胞生存率を評価することにより行った。また本製剤の体内動態特性は、製剤にトレーサーとして添加した³H-コレステロール誘導体の放射活性を測定することにより評価し、*in vivo* 抗腫瘍効果は、固形がんモデルマウスを用いて評価した。

【結果・考察】*In vitro* 条件下、本製剤をがん細胞に添加し、一定時間後に光照射を行うことで、種々のがん細胞においてポルフィリン濃度依存的な殺細胞効果が認められた。一方、本製剤添加直後に光照射を行った場合には顕著な殺細胞効果は認められず、殺細胞効果の発現には、ポルフィリンの製剤からの放出と、その後の細胞内移行が必要であることが示唆された。また、固形がんモデルマウスに静脈内投与したところ、非常に高い血中滞留性を示し、経時的に腫瘍組織へと移行することが明らかとなった。さらに投与後、一定時間の後に腫瘍組織に対して局所的な光照射を行うことにより、腫瘍増殖の有意な抑制が観察された。

ポルフィリン封入ポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体ナノ粒子の体内動態特性と PDT による抗腫瘍効果の評価

単分散ゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動

(岡山大環) ○鷲尾 直紀, (岡山大環) (正) 小野 努*, (正) 木村 幸敬

1. 緒言

近年、遺伝子工学の発展により大腸菌を宿主細胞としたタンパク質の生産や開発が進められている。最近では、食品や医療、農業、化学工業分野およびバイオ燃料などの環境改善技術に有効な機能性タンパク質(酵素)の創出が注目を集めている。このような新規酵素を開発する手法のひとつとして、進化分子工学的手法を用いた高活性変異タンパク質の開発が行われている。しかし、特定の変異タンパク質を生産する大腸菌を単離するには、時間と労力を必要とし多数の変異タンパク質についてスクリーニングするのは極めて困難である。そこで本研究では、大腸菌培養を有機溶媒中の単分散ゲル粒子内で行うことで、大腸菌間の相互作用を防ぎ大腸菌のゲル粒子への区画化を目指している。

本講演では、マイクロリアクターによる単分散大腸菌内包アガロースゲル粒子の調製とそのアガロースゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動について報告する。

2. 実験方法

2.1. 大腸菌内包アガロースゲル粒子の調製

タンパク質発現量の測定および増殖挙動の確認のため緑色蛍光タンパク質 (GFP) をコードした遺伝子で形質転換させた大腸菌を用いた。ゲル粒子調製には、疎水化処理を施したT字型のガラスマイクロ流路を使用した。水相には、LB 培地などを含む大腸菌懸濁液を加えたアガロース溶液を用いた。大腸菌懸濁液は液体培地で希釈することで所定濃度に調製した。油相には、界面活性剤を溶解させたデカン溶液を使用してW/O エマルションを調製した。得られた液滴は氷冷し、ゲル化させゲル粒子を得た。

2.2. ゲル粒子での大腸菌培養と GFP 発現

調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子を各温度で培養後スライドガラス上に採り、氷冷して増殖を抑え、蛍光顕微鏡によって GFP による蛍光を観察した。

3. 結果と考察

マイクロリアクターで調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子の粒径および粒径分散度におよぼす油相流速の影響を図1に示す。ゲル粒子調製の結果、マイクロリアクターを用いることで、10%以下の粒径分散度をもつ単分散ゲル粒子の調製に成功した。ゲル粒子が得られる油相流速範囲では、大腸菌内包の有無に関わらず粒径のほぼ等しいゲル粒子が得られた。

48時間培養後(25℃)の大腸菌内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真を図2に示す。ゲル粒子あたり大腸菌が1、2個内包される様に調製した場合、通

常の培養温度よりも低い温度である25℃で培養を行うことで大腸菌タンパク質発現が確認された。また、隣り合うゲル粒子の蛍光強度の違いから大腸菌の相互作用の抑制に成功し、ゲル粒子内の大腸菌コロニーに由来する蛍光強度から内包された大腸菌数は、ほぼ1個であることを確認した。以上のことから、アガロースゲル粒子内に区画化した大腸菌が通常の培養と同様に増殖することを確認した。

なお、アガロースゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動については紙面の都合上、本講演にて報告する。

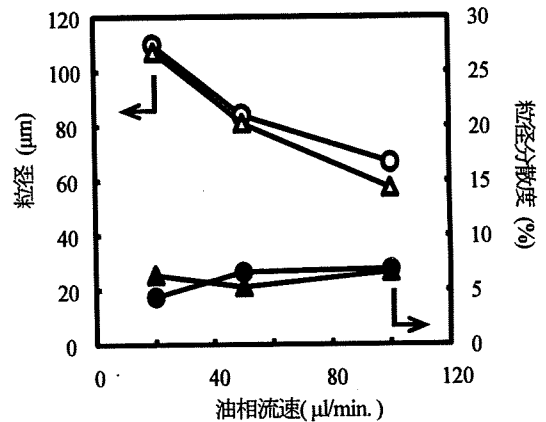


図1 マイクロリアクターで調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子の粒径および粒径分散度におよぼす油相流速の影響(○, ●; 大腸菌内包アガロースゲル粒子, △, ▲; アガロースゲル粒子)

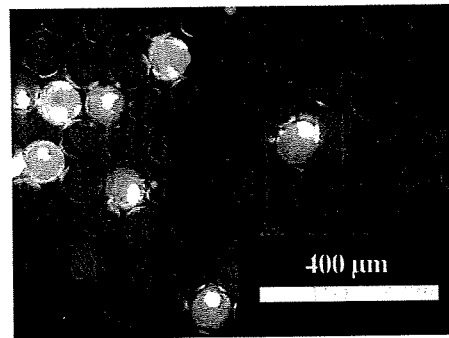


図2 48時間培養後(25℃)の大腸菌内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真

*Tel&Fax: 086-251-8908
E-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp

液中乾燥法によるポリ乳酸ミクロスフェアの調製とその形態制御

(岡山大学環境理工) ○渡邊 貴一・(岡山大学院環) (正)小野 努・(正)木村 幸敬

1. 緒言

ポリ乳酸 (PLA) 系高分子は、生分解性高分子材料として注目されている。その中でも、PLA とポリエチレングリコール (PEG) との共重合体である PLA-*b*-PEG (PLE) は、生体親和性にも優れており、薬物輸送担体としての利用が期待されている。近年、PLE をマトリックスとして利用した微粒子調製に関する研究は、数多く報告されている。しかしながら、その大半は、廃棄規制の厳しいハロゲン系溶媒を油相として使用しているため、工業的な利用には適していない。

本研究では、ノンハロゲン系溶媒である酢酸エチルを用いた微粒子調製を目的とし、合成した油溶性および水溶性 PLE を界面活性剤として用いて調製した W/O/W エマルジョンの液中乾燥法により、PLE ミクロスフェアを調製した。本講演では、調製した PLE ミクロスフェアの内部構造制御について報告する。

2. 実験方法

2.1 PLE の合成

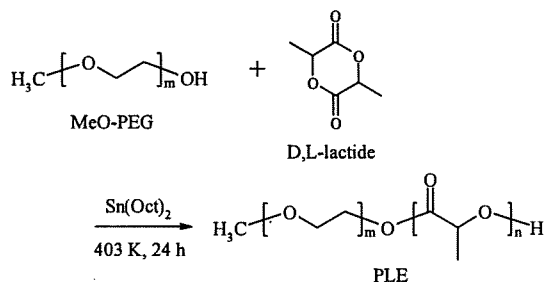


Fig. 1. Synthetic scheme of PLE.

PLE は、methoxy poly(ethylene glycol) (MeO-PEG, $M_n = 4,000$) を開始剤とする D,L-lactide の開環重合により合成した。得られた高分子の重量平均分子量(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、高分子の分子構造は、¹H NMR 測定により同定した。

2.2 PLE および PLA ミクロスフェアの調製

超純水を内水相、油溶性 PLE あるいは PLA を溶解させた酢酸エチル溶液を油相とし、ホモジナイザーにより W/O エマルジョンを調製した。得られた W/O エマルジョンを、水溶性 PLE を溶解させた飽和酢酸エチル水溶液に注ぎ、W/O/W エマルジョンを調製した。50 °C、減圧下で液中乾燥を 4 時間行い、油相溶媒を除去することで、PLE ミクロスフェアを調製した。その後、遠心分離により生成物を回収し、3 回の洗浄を行った。洗浄後に PLE ミクロスフェア分散液を 1 昼夜凍結乾燥し、冷暗保存した。

3. 結果と考察

3.1 PLE の合成

PLE の ¹H NMR 測定より、3.7 ppm 付近に PEG セグメントのエトキシ基に起因するピーク、1.5 ppm および 5.2 ppm 付近に PLA セグメントのメチル基とメチン基に起因するピークを確認した。以上の結果から、得られた高分子が PLE であることを同定した。

3.2 PLE および PLA ミクロスフェアの調製

Fig. 2 には、W/O/W エマルジョンの液中乾燥法により調製された PLE ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 2 より、孔径の小さな多核 PLE ミクロスフェアの調製に成功した。この結果は、油溶性 PLE の界面活性能が高いため、ホモジナイザーによって調製された W/O エマルジョンが液中乾燥中にほとんど合一することなく、固化したことを示唆している。

Fig. 3 には、W/O/W エマルジョンの液中乾燥法により調製された PLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 3 より、孔径の大きな多核 PLA ミクロスフェアが得られた。この結果は、PLA が界面活性能を持たないために、ホモジナイザーによって調製された W/O エマルジョンの合一が、液中乾燥中に進行したことを示唆している。

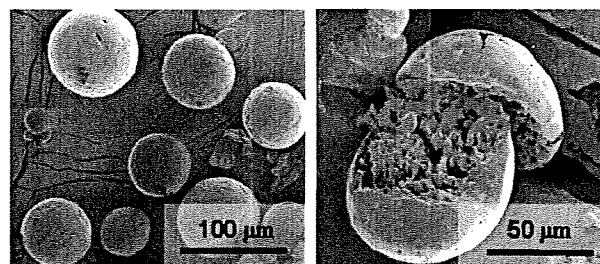


Fig. 2. SEM images of PLE microspheres prepared by solvent evaporation method.

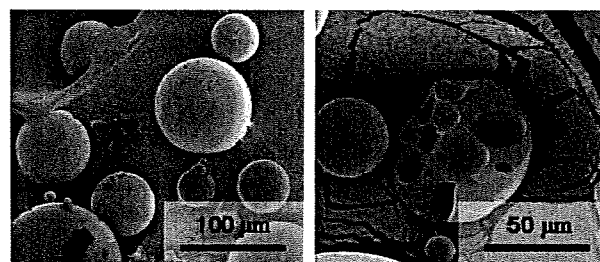


Fig. 3. SEM images of PLA microspheres prepared by solvent evaporation method.

*Tel&Fax: 086-251-8908

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

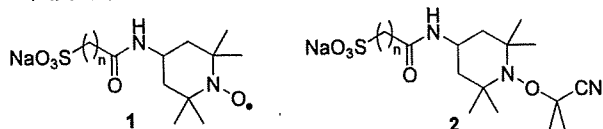
界面活性 TEMPO 誘導体を用いた不均一系重合による高分子微粒子調製

(岡山大院環)○(学)大浦浩平・(正)久保田潤・(正)小野努・(正)木村幸敬

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 [1, 2]。その方法のひとつとして、ニトロキンド誘導体である TEMPO (2,2,6,6-Tetramethyl piperidine-N-oxyl) を表面に有する粒子を調製後、表面からグラフト重合を行う方法が考えられる。粒子表面に TEMPO を効率的に配置させるために、本研究では粒子表面の官能基に TEMPO を修飾するという 2 段階プロセスではなく、1 段階での調製が可能な界面活性 TEMPO 誘導体を用いた微粒子調製を提案している。この際、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と期待される。

本研究では、既に各種界面活性 TEMPO 誘導体 **1** 及びそのアルコキシアミン **2** (Scheme 1) を合成している [3, 4, 5]。そこで本研究では、これらを用いて油水界面での制御ラジカル重合システムの構築及び得られた高分子微粒子の表面機能化を目指す。本発表では、界面活性 TEMPO 誘導体を用いた不均一系重合により高分子微粒子調製を行った結果について報告する。



Scheme 1. Interface-active TEMPO derivatives ($n = 5, 10, 15$)
[1a ($n = 5$), 1b ($n = 10$), 1c ($n = 15$), 2a ($n = 5$), 2b ($n = 10$), 2c ($n = 15$)]

2. 実験

不均一系重合 最も強い界面活性を示した **1c** のアルコキシアミン **2c** を用いて不均一系重合を行った。0.02 wt% **2c** 水溶液 (4.0 g) 及び 5 wt% ヘキサデカン含有スチレン溶液 (120 mg) を耐圧反応器に秤量し、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。これを 0.4 MPa 窒素雰囲気下 125 °C で 24 時間重合した。反応器を氷浴させることにより重合を停止させ、粒子をエタノールで洗浄し、超遠心分離 (80,000 rpm, 20 min.) により回収した。その後、回収された粒子について各種分析を行った。

3. 結果と考察

Fig. 1 に調製された高分子微粒子の SEM 観察結果を示す。これより、マイクロ～サブミクロンサイズの高分子微粒子が調製できることが確認された。しかし、調製された粒子は数百 nm の小粒子と数 μm の大粒子が混在しており、非常に多分散な粒径分布であった。この原因として、以下のことが考えられる。重合開始

剤及び界面活性剤である **2c** は、重合前の系中には液滴表面、ミセル及び均相中に存在している。重合中は、液滴界面重合が進行するとともに、水中拡散によりモノマーが供給され従来の乳化重合であるミセル内核形成あるいは均相核形成も起こるものと思われる。液滴界面重合により液滴由来である数 μm の大粒子が調製され、従来の乳化重合により数百 nm の小粒子が調製されると予想される。このように複数の粒子形成機構が存在するために、粒径分布の多峰化・多分散化が起こるものと推察される。Fig. 2 に高分子微粒子の超薄切片の TEM 観察結果を示す。粒子内部が中空構造をしていることから、本実験系では液滴界面で重合が進行していることが示唆された。また粒子表面のゼータ電位は -42.9 mV であり、界面活性 TEMPO 誘導体 **2c** のスルホン酸基に由来する負の値を示した。このことは、粒子表面に界面活性 TEMPO 誘導体が存在していることを示す。

4. 結言

粒子の中空構造、粒子表面の界面活性 TEMPO 誘導体由来の負電荷の存在から、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、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示された。

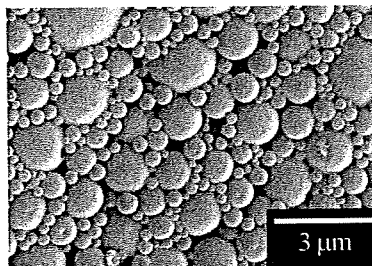


Fig. 1. SEM image of polystyrene particles

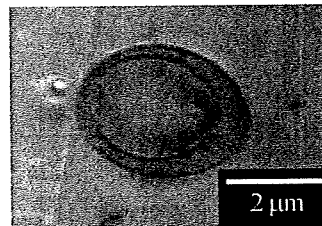


Fig. 2. TEM image of ultrathin section of polystyrene particle

<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] 大浦ら, *化学工学学会第 73 年会要旨集* **2008**, P108. [4] Kubota, J., et al. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 8975. [5] Mitsudo, K., et al. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8994.

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

10 光線力学的治療に有効な光増感剤内封ナノ粒子の開発

○小野 努¹ 廣田 健¹ 木村 幸敬¹ 白石 太朗²大河原 賢一² 檜垣 和孝² 阪田 功³¹岡山大学大学院 環境学研究科 ²岡山大学大学院 医歯薬総合研究科³グリーンゴールドバイオシステム株式会社

光線力学的治療において、光増感剤の腫瘍近傍への効果的な送達が可能となれば、光過敏症などの副作用を抑制することが期待される。そこで、生体適合性ポリマーを用いて光増感剤を高効率に内封した 100 nm 以下のナノ粒子調製法を開発し、このドラッグキャリアを用いた PDT の有効性について検討を行ってきた。本講演では、高い血中滞留性と EPR 効果を利用した腫瘍近傍への光増感剤の集積を達成できるナノ粒子の設計と調製されたナノ粒子を用いた *in vitro* 系での殺細胞効果について報告する。

材料および方法：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サライド (PEO) のジブロック共重合体 (PLE) を各種合成して、溶媒拡散法によってポルフィリン内封ナノ粒子を調製した。光増感剤としてのポルフィリン誘導体は (株) 光ケミカル研究所より提供して頂いた。油溶性 PLE (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とし、水溶性 PLE (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水で希釈することで酢酸エチルを除去して PLE ナノ粒子を調製した。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。

ポルフィリン内封ナノ粒子は Dansyl-L-methionine を溶解させたリン酸緩衝液に分散させて可視光を照射し、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。

また、腫瘍の *in vitro* 評価モデルとして Colon 26 (C26) 細胞を用いた。調製したポルフィリン内封ナノ粒子を C26 培養培地に添加して培養後、培地交換ののち光照射して、MTT assay により殺細胞効果を評価した。

結果：PLE ナノ粒子の粒径へ及ぼす w-PLE 濃度の影響について検討した結果、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が明らかとなった。5 wt% の w-PLE を用いた場合には平均粒径が約 75 nm の極めて小さなナノ粒子を調製することができた。

また、TLC の結果から光照射による Dansyl-L-methionine sulfoxide の生成が確認され、光増感剤がナノ粒子に内封されていても溶液中へ一重項酸素が放出されることが分かった。

さらに、ポルフィリン内封 PLE ナノ粒子を含む C26 細胞培養液への光照射により、細胞生存率が大幅に減少することが明らかとなった。殺細胞効果を示すのに必要な最終ポルフィリン濃度は約 50 nM と推算され、本ナノ粒子をドラッグキャリアとして用いた光線力学的治療が有効であることが示唆された。

考察：本研究では、w-PLE を用いてナノ粒子の粒径を低下させ、100 nm 以下のポルフィリン内封ナノ粒子の調製を達成した。このとき、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と考えられる。また、光増感剤は PLE ナノ粒子内に内封された状態においても、一重項酸素の生成を示すことが確かめられた。このように、光増感剤をナノ粒子に内封して腫瘍近傍へデリバリーすることによって、副作用の低減や投与量の低減が可能となり、患者の QOL を高めた PDT への発展が大いに期待できる。

Abstracts

Poster Session 2- Contributed Paper

50 DEVELOPMENT OF NANOPARTICLES CONTAINING PHOTSENSITIZER WITH DIBLOCK COPOLYMER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

Tsutomu Ono*, Ken Hirota*, Taro Shiraishi**, Ken-ichi Ogawara**, Kazutaka Higaki**, and Isao Sakata†, *Division of Sustainability of Resources, Graduate School of Environmental Science, Okayama University; **Division of Pharmaceutical Sciences, Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University; †Green Gold BioSystem Inc., 3-1-1 Tsushima-naka, Okayama 700-8350, Japan; tono@cc.okayama-u.ac.jp

Photodynamic therapy (PDT) requires the efficient delivery of photosensitizers to the tumor neighbourhood. General features of tumors include leaky blood vessels and ineffective lymphatic drainage. Therefore, nanocarriers containing hydrophobic photosensitizers access and accumulate in the tumors through the enhanced permeability and retention (EPR) effect. In this article, we developed biocompatible nanoparticles containing water-insoluble porphyrin derivatives by a solvent diffusion method using diblock copolymer. It is known that the nanoparticles with diameters <150 nm are more useful for EPR effect. By the combination of water- and oil-soluble poly(ethyleneglycol)-poly(lactic acid) (PEG-PLA) copolymers, PEG-coated PLA nanospheres with less than 100 nm in diameter were obtained. Furthermore, hydrophobic porphyrin was completely encapsulated in the particles. Singlet oxygen was released from the porphyrin-encapsulating nanoparticles by light irradiation, whereas porphyrin embedded in PEG-PLA nanoparticles did not diffuse in water. In addition, we found that colon-26 tumor cells were killed by visible light irradiation *in vitro* in the presence of 50 nM porphyrin embedded in PEG-PLA nanoparticles. Since this nanoparticle was easily prepared with only nontoxic copolymer and drug, it would be a promising nanocarrier for PDT.

Poster Session 2 – Contributed Paper

51 APTAMER EMBEDDED POLYACRYLAMIDE NANOPARTICLES USED AS NANOSENSORS FOR METABOLITE DETECTION IN VIVO

Veli Cengiz Ozalp, Lise Junker Nielsen and Lars Folke Olsen, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Southern Denmark, Campusvej 55, Odense 5230, Denmark; cengiz@bmb.sdu.dk;

Metabolite sensing is an important tool in understanding cell metabolism. Optical nanosensors are especially interesting since they allow real-time monitoring of metabolite concentrations to facilitate our understanding of the dynamics of cell metabolic activities. We developed an optical sensor based on aptamer recognition confined in polyacrylamide nanoparticles to measure adenosine nucleotide content inside cells. Aptamers are biorecognition elements selected through an evolutionary procedure from a combinatorial nucleic acid library. There has been numerous applications in sensor field based on aptamers since the invention of the selection method. The main attraction of aptamers as biorecognition units comes from artificial selection procedure allowing to obtain an aptamer for any desired target. *In vivo* applications of aptamers reported in the literature include targeting specific proteins in subcellular compartments for therapeutic

ポリ乳酸系ジブロックコポリマーを用いた多孔質マイクロスフェアの調製とその構造制御

(岡山大院環) ○ (学) 渡邊 貴一・(正) 村中 誠・(正) 小野 努*・(正) 木村 幸敬

1. 緒言

ポリ乳酸 (PLA) 系高分子は、生分解性高分子材料として注目されている。その中でも、PLA とポリエチレングリコール (PEG) の共重合体 (PEG-PLA) は安全で、生体親和性にも優れており、薬物輸送担体や環境低負荷な農薬材料としての利用が期待できる。近年、PEG-PLA をマトリックスとして利用したマイクロスフェア調製に関する研究は、数多く報告されている^[1]。しかしながら、マイクロスフェアの構造制御を行っている研究はほとんどない。マイクロスフェアの構造は薬物の徐放挙動に大きく影響するため、構造を制御することは重要である。

そこで本研究では、合成した油溶性および水溶性 PEG-PLA を界面活性剤として用いた W/O/W エマルションの液中乾燥法により、PEG-PLA ミクロスフェアを調製し、その構造制御を目的としている。本講演では、調製した PEG-PLA ミクロスフェアの表面多孔性および内部構造制御について報告する。

2. 実験

2.1) PEG-PLA の合成 末端にメトキシ基を有する PEG (MeO-PEG) を開始剤として D, L-ラクチドの開環重合により、PEG-PLA を合成した。合成した PEG-PLA の分子量分布 (M_w/M_n) をゲル浸透クロマトグラフィーにより測定し、数平均分子量から親水-親油バランス (HLB) を算出した (Table 1)。

2.2) PEG-PLA ミクロスフェアの調製と評価 超純水を内水相、油溶性 PEG-PLA (o-PEG-PLA) を溶解させた酢酸エチル溶液を油相とし、ホモジナイザーにより W_1/O エマルションを調製した。得られた W_1/O エマルションを水溶性 PEG-PLA (w-PEG-PLA) を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液に注ぎ、 $W_1/O/W_2$ エマルションを調製した。液中乾燥によって、油相溶媒を除去することで、PEG-PLA ミクロスフェアを調製した。その後、遠心分離により生成物を回収し、3回の洗浄を行った。洗浄後に PEG-PLA ミクロスフェア分散液を1昼夜凍結乾燥し、冷暗保存した。得られたマイクロスフェアの形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

3. 実験結果および考察

Fig. 1, 2 にそれぞれ W_1/O 体積比を変えて調製した PEG-PLA ミクロスフェア、液中乾燥時の温度を変えて調製した PEG-PLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。

Fig. 1, 2 より、得られた PEG-PLA ミクロスフェアは

いずれも多孔質であった。これは PEG 鎖を介して、油相中で水の移動が起こったためと思われる。

Fig. 1 より、 W_1/O 体積比の増加に伴い、得られる PEG-PLA ミクロスフェアの内部構造が単核中空構造から多核構造に変化することが確認された。

Fig. 2 より、液中乾燥時の温度増加に伴い、得られる PEG-PLA ミクロスフェアの表面多孔性が増大していることが確認された。これは、温度増加による酢酸エチルの蒸発速度および高分子の運動性の増加に起因していると思われる。

Table 1 Characteristics of PEG-PLA

No.	M_n^*		M_w/M_n	HLB
	PEG-PLA	PLA		
o-PEG-PLA	8,000	4,000	1.08	10.0
w-PEG-PLA	4,400	400	1.05	18.2

*¹H NMR measurement, MeO-PEG $M_n=4,000$

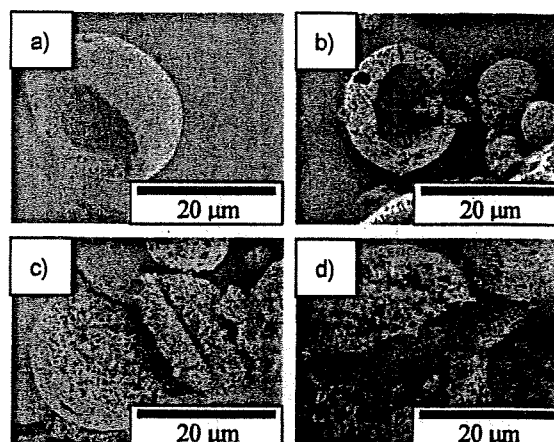


Fig. 1 SEM images of PEG-PLA microspheres [W_1/O (v/v) = a) 0/8, b) 0.1/8, c) 0.3/8, d) 1/8].

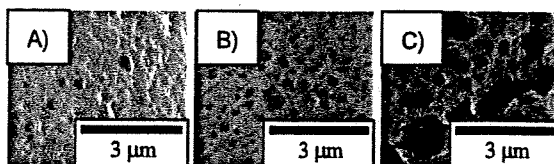


Fig. 2 SEM images of surface morphology of PEG-PLA microspheres prepared at different temperature [A) 20, B) 30, and C) 50 °C].

<参考文献>

[1] Q. Wei et al., *J. Colloid Interf. Sci.*, **323**, 267-273 (2008)

* TEL/FAX: 086-251-8908

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

ポリコハク酸イミド誘導体マクロモノマーを用いた 分散共重合による温度応答性ヘア粒子の調製

(岡山大院環) ○ (学) 土井 堯・(学) 富田 恵介・(正) 小野 努*・(正) 木村 幸敬

1. 緒言

温度変化により微粒子表面の高分子鎖が収縮する温度応答性ヘア粒子は、目的物質の取り込みや放出の制御が可能となるため、ドラックデリバリー担体や抽出剤としての利用が期待できる。

そこで、本研究では生分解性高分子であるポリコハク酸イミド (PSI) 誘導体マクロモノマーを用いた温度応答性ヘア粒子調製に着目した。PSI の主鎖のイミド環はアミン化合物と容易に反応することから、温度応答性をマクロモノマーに付与できる。このようなマクロモノマーを用いた分散共重合により温度応答性ヘア粒子が1段階で調製できる。本講演では、温度応答性ヘア粒子の調製条件に関する検討および調製したヘア粒子の温度応答性に関して報告する。

2. 実験

2.1 温度応答性マクロモノマーの合成と評価

温度応答性 PSI 誘導体マクロモノマーは以下の手順で合成した。まず、L-アスパラギン酸と4-ヒドロキシフタル酸のバルク重縮合により、ヒドロキシフタルイミド基 (HPI) を末端導入した PSI 誘導体 (HPI-terminated PSI) を合成した。次に、イソプロピルアミン (IPA) を反応させて側鎖に温度応答性官能基を導入した PSI 誘導体 (HPI-terminated IPA-PSI) を得た。さらに、アクリロイルクロリドを反応させビニル基を末端導入した API-terminated IPA-PSI (Fig. 1) を合成した。¹H-NMR 測定より、化学構造の同定、側鎖および末端導入率を算出した。分子量はゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) より測定した。得られたポリマーの溶液中での相転移挙動は吸光光度計を用いた温度変化による透過率測定から検討した。本実験では、透過率が減少し始めた温度を下限臨界共溶温度 (LCST) と定義した。

2.2 マクロモノマー法による温度応答性ヘア粒子の調製と評価

API-terminated IPA-PSI、モノマーであるスチレンと開始剤である2,2'-アゾビスイソブチロニトリルをメタノール-水混合溶液に溶解させて分散共重合を行った。重合完了後、微粒子を遠心分離し、超純水に分散させて走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察し、平均粒径、変動係数 (CV) を測定した。

2.3 調製したヘア粒子の温度応答性評価

動的光散乱法によって微粒子の流体力学的径を算出した。なお、温度変化における流体力学的径挙動より微粒子の温度応答性について評価した。

3. 実験結果及び考察

¹H-NMR および GPC 測定より、IPA 側鎖導入率が79.4%、重量平均分子量が19,300である API-terminated IPA-PSI の合成を確認した。Fig. 2 より LCST は2.8°C であり、可逆相転移挙動を示すことが分かった。

Fig. 3 の SEM 画像より、平均粒径が274 nm, CV が14.3%の多分散な微粒子が得られた。また、温度応答性評価から温度上昇に伴い LCST を境に微粒子の流体力学的径が減少することが分かった。この場合の LCST は HPI-terminated IPA-PSI 由来のものと同様の温度であった。これは、API-terminated IPA-PSI の末端ビニル基にスチレンが連鎖したものがポリスチレン微粒子に吸着したことによると考えられる。以上のことより、API-terminated IPA-PSI を用いた分散共重合により温度応答性ヘア粒子の調製が可能であることが示唆された。

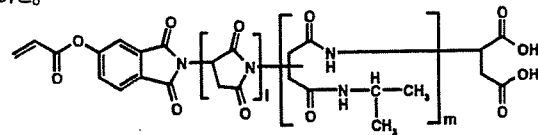


Fig. 1 Chemical structure of API-terminated IPA-PSI

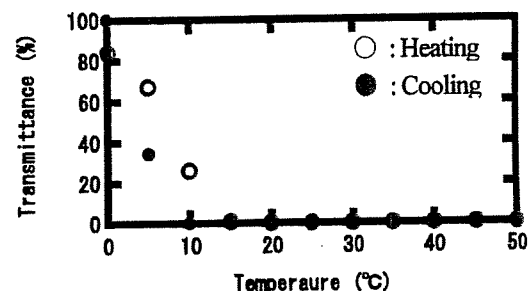


Fig. 2 Effect of temperature on the transmittance of API-terminated IPA-PSI aqueous solution

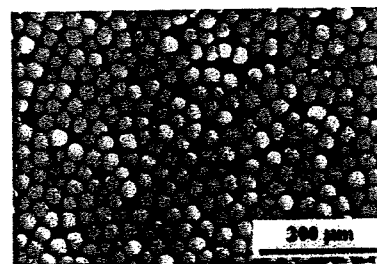


Fig. 3 SEM image of the particles prepared with API-terminated IPA-PSI

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

単分散な架橋メラミンサブミリカプセルの調製と膜圧制御に関する検討

(岡山大院環) ○(学)吉田 圭志・(正)小野 努*・(正)木村 幸敬・(神大院工)(正)神尾 英治

1. 緒言

マイクロカプセルとは粒径がミリ～ナノメートルの球形の容器の総称である。これらのうち、サブミリメートル (0.1mm～) 以上のカプセルは小さい粒径のものに比べて高い膜強度が求められ、報告されている研究例も少ない。そこで、壊れにくいサブミリカプセルの調製法を確立できれば食品や薬物担体などへの応用が期待できる。さらにこれらの応用において、単分散なマイクロカプセルは徐放制御の点で有用であると考えられる。本研究では、二重円管式マイクロリアクターを用いて単分散な架橋尿素カプセルを調製し、それをさらにメラミン樹脂で繰り返しコーティングすることによって膜厚を増加させ、膜強度の向上を試みた。

サブミリカプセルの調製に先立ち、SPG 膜乳化法で調製したマイクロスケールの O/W エマルションをホルマリン共存下で架橋メラミンマイクロカプセル (M-FMC) 化を行い、連続相 pH が膜厚へ与える影響についても検討した。

2. 実験

2.1 SPG 調製 O/W エマルションの M-F MC 化 分散相に Oil blue N で着色した IsoperG、連続相に 1 wt% SDS 水溶液を用いて SPG 膜乳化を行い、O/W エマルションを調製し、クリーミング後、2.5 wt% poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride) (以下 poly(E-MA)) 水溶液に添加し、400 rpm, 60°C で 30 分間 M-F MC 化を行った。M-F MC 調製時の連続相 pH および繰り返しコーティング回数による膜厚の増加を SEM により観察した。

2.2 マイクロリアクターで調製した O/W エマルションの M-F サブミリカプセル化 分散相に Oil blue N で着色した Glyceryl trioctanoate、連続相に 3.3 wt% poly(E-MA) 水溶液に尿素プレポリマーを加えたものを用い、二重円管式マイクロリアクターを用いて O/W エマルション化し、そのまま架橋尿素カプセル化した。デカンテーション後、架橋尿素カプセルを 2.5 wt% poly(E-MA) 水溶液に投入し、メラミンプレポリマーを添加した。2.1 と同様、連続相の pH および繰り返しコーティングによる膜厚の増加を SEM により観察した。

3. 結果および考察

11.4 μm 孔の SPG 膜により調製した粒径 40.7 μm, CV 9.6% の単分散な O/W エマルションエマルションを用いて M-F MC 化した。Fig.1 に M-F MC 化時の連続相

pH および繰り返しコーティングによる膜厚の変化を示す。この結果より、高 pH 条件下および M-F コーティング回数の増加とともに膜厚が増加しているのが分かる。しかし、pH 4.7 以上では Fig.2 のように表面が凸凹になり、壊れたカプセルが多く見られた。

二重円管式マイクロリアクターを用いたサブミリカプセル化においては、粒径 0.34 mm, CV=6.8% の単分散な尿素樹脂カプセルが得られた。それらを M-F MC 化したところ、pH 4.0, 4.5 では先ほどの結果同様、高 pH 条件下と繰り返し操作により膜厚の増加が見られた。

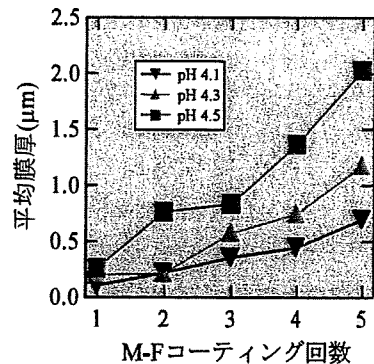


Fig.1 各 pH 条件下におけるカプセル膜厚におよぼす M-F コーティング回数の影響

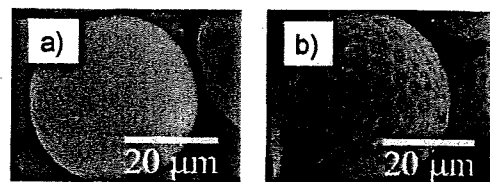


Fig.2 pH 4.5(a)と pH 4.7(b)で調製したカプセル膜表面の SEM 写真

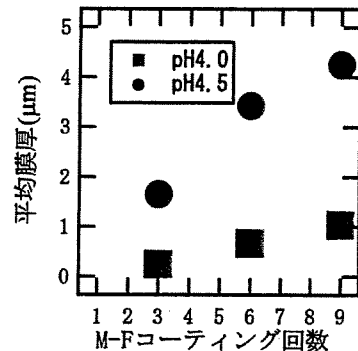


Fig.3 サブミリカプセルのカプセル膜厚におよぼす M-F コーティング回数の影響

*TEL&FAX: 086-251-8908

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

ハイスループットスクリーニングを目的とした単分散ゲル粒子内での大腸菌培養

○鷲尾 直紀, 小野 努, 木村 幸敬

(岡大院・環・資源循環)

【背景・目的】目的とする酵素遺伝子に対してランダム変異を入れ遺伝子ライブラリーの作成を行い、その中で高活性な機能を有する酵素の遺伝子情報を得ることで新規な酵素の創出を行うことができる。その際に、宿主細胞間の相互作用を抑制することができれば、更なる高度なセレクション法を構築することができる。そこで本研究では、有機溶媒中においてゲル粒子毎に隔離された大腸菌を培養することで、ハイスループットなスクリーニングの開発を目的としている。

【実験方法・結果】タンパク質発現の観察のために、緑色蛍光タンパク質の変異体である EGFP をコードした遺伝子で形質転換した大腸菌を用いた。ゲル粒子調製には、疎水化処理を施した T 字型のガラスマイクロ流路を使用した。水相には、培地、アガロース溶液などを含む大腸菌懸濁液を、油相には界面活性剤を溶解させたデカン溶液を用いた。得られた液滴は、氷冷することでゲル粒子を調製した。調製したゲル粒子は、デカン溶液中での培養後、EGFP の発現を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、マイクロアクターを用いることで、粒径の揃ったアガロースゲル粒子が調製された。ゲル粒子のサイズは、約 80 μm であり、理論的には調製時間約 20 分で 3.73×10^5 個のライブラリーの作成が可能である。培養温度 25°C において培養後強い蛍光が観察され、ゲル粒子内でのコロニー形成が確認された。また、ゲル粒子中に形成したコロニーの数から 1 個のゲル粒子に内包された大腸菌は、ほぼ 1 個であることが示唆された。以上ことから、単分散ゲル粒子をハイスループットスクリーニングツールとして用いることができる可能性が示唆された。

Development of high-throughput screening by culture in monodisperse gel particles

○Naoki WASHIO, Tsutomu ONO, Yukitaka KIMURA

(Dept. Mater. Energy Sci., Grad. Sch. Environ. Sci., Okayama Univ.)

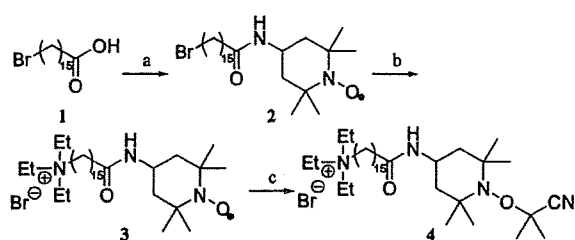
Keywords Microfluidics, Microreactor, E.coli, selection, monodisperse agarose gel particle

界面活性 TEMPO 誘導体を用いた中空構造をもつ高分子微粒子の調製

(岡山大院環)○(学)平田征丈・(正)小野努*・(正)木村幸敬

1. 緒言

高分子微粒子は大きな比表面積を有し、微粒子表面の機能が大きく発揮されることから、微粒子表面への機能付与や目的物質を内包できるカプセル形状により、固定化酵素やバイオリアクターへの応用も期待できる。本研究室では、ラジカルの保護基として用いられる 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) を用いた不均一系重合に着目してきた。TEMPO は、ビニルモノマーと反応しない安定なラジカルである N-O \cdot 構造を有し、炭素ラジカルと素早く反応し、低温で安定なアルコキシアミンを生成するという特徴を有する。そこで、TEMPO に疎水部および親水部を導入した界面活性剤を合成し、さらに重合開始基を付与することで界面活性剤ならびに重合開始剤としての機能を有するアルコキシアミンを開発した¹⁾。不均一系重合において、界面活性 TEMPO 誘導体は油水界面に吸着し、アルコキシアミンの解離と形成を繰り返すことにより油水界面に成長ラジカルを保ちつつ重合を進行させることができる。これまでにアニオン性界面活性 TEMPO 誘導体が粒子表面に固定化された高分子微粒子の調製に成功している¹⁾。本発表では、カチオン性界面活性 TEMPO 誘導体 4 を合成し (Scheme 1)、4 を用いた不均一系重合により高分子微粒子の調製を行い、微粒子構造に与える影響について報告する。



Scheme 1. Synthesis of a cationic TEMPO derivative²⁾.

[a) 4-Amino-TEMPO, DCC, DMAP, CHCl₃, rt, 18 h, 67%; b) Et₃N, EtOH, reflux, 24h, 98%; c) AIBN, EtOH, 70°C, 6 h, 89%]

2. 実験

水相にカチオン性界面活性 TEMPO 誘導体 4 を含む水溶液、油相にはスチレンとヘキサデカンの混合物を用い、ホモジナイザーにより O/W エマルジョンを調製後、耐圧反応器内 0.4 MPa 窒素雰囲気下 125°C で 24 時間重合した。氷浴にて重合を停止させた後、粒子は超純水で洗浄を行い、超遠心分離により回収した。

3. 結果と考察

調製された粒子の SEM 観察結果 (Fig. 1) および粒径測定結果より、数百 nm の小粒子及び数 μ m の大粒子が調製されていることが確認された。この結果はアニオン性界面活性 TEMPO 誘導体を用いた系とほぼ同様であった。そのため、本系においても液滴界面重合および均相核形成が起こっていると考えられる。洗浄後の粒子のゼータ電位測定を行ったところ、46.3 mV という正電荷を示した。これはカチオン性界面活性 TEMPO 誘導体のトリエチルアミノ基に由来する正電荷であり、微粒子表面に TEMPO 誘導体が存在していることが示唆された。つまり、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た結果、粒子表面にカチオン性界面活性 TEMPO 誘導体が固定化された微粒子の調製に成功したといえる。また、SEM 観察結果から微粒子に穴が開いていることが確認され、これは液滴界面重合が進行するために、界面に高分子鎖が集中したポリスチレン液滴が調製され、減圧乾燥を行い、未反応のスチレンおよびヘキサデカンを除去する過程で穴が開いたものであると考えられる。これにより、液滴界面重合によって調製された微粒子は中空構造をとっていると考えられ、本手法は中空構造をもつ高分子微粒子調製法として有用であると考えられる。

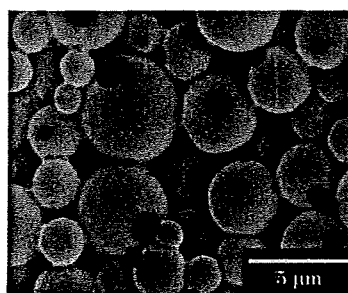


Fig.1. SEM image of microspheres prepared with a cationic TEMPO derivative.

参考文献

- 1) 大浦ら, 化学工学会第 74 年会 (2009)
- 2) J. Kubota, et al. *Tetrahedron Lett.* 46, 8975 (2005)

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

1. 緒言

近年、細胞内に遺伝子を導入して病気の源となる遺伝子の発現を抑えることで疾患を治療する遺伝子治療の研究が活発に行われている。遺伝子治療では、遺伝子 (DNA) を保護し、細胞内へと送達する安全な人工ベクター (vector) の開発が成功の鍵を握っている。

高分子や界面活性剤を用いた DNA の複合化が盛んに研究されており、本研究質では、DNA の逆ミセル抽出¹⁾を利用した高効率な DNA 複合化法の開発を目指している。しかしながら、従来用いられている DNA 抽出剤は生態適合性が低いため、本研究では DNA 抽出が可能な生態適合性の高い界面活性剤の開発を目的としている。

そこで我々は、生分解性高分子であり、側鎖への機能性付与が容易なポリアスパラギン酸 (PAsp) に着目した。本研究ではカチオン性 PAsp 誘導体の合成を行い、DNA の抽出および有機溶媒中での会合挙動の評価について報告する。

2. 実験

まず、L-アスパラギン酸を熱重合することによりポリコハク酸イミド ($M_w = 9.1 \times 10^3$: PSt standard) を合成した。次いで、その側鎖に *N,N*-ジメチル-1,3-プロパンジアミン (DMPA) を約 30%、残りの側鎖部分(約 70%) にオレイルアミン (OA) を導入した PAsp 誘導体 (DMPA-OA-PAsp) の合成を行った。さらに、DMPA-OA-PAsp とヨードメタンを反応させ、DMPA のアミノ基を4級アミン化した TMPA-OA-PAsp (Figure 1) の合成を行った。

合成を行った TMPA-OA-PAsp をヘキサン/1-ブタノール (19:1, v/v) の混合溶媒に 1 w/v% になるように溶解させ、10 mg/mL DNA 水溶液と混合した。混合した溶液は、300 rpm で4時間振盪させ、振盪後分離している上下の2層をそれぞれ分取した。分取した溶液のうち下層の水溶液は、吸光度測定を行い DNA 抽出の可否を確認した。油相側の溶液については、動的光散乱法を用いた粒径測定およびカールフィッシャー水分計による水分量測定を行った。

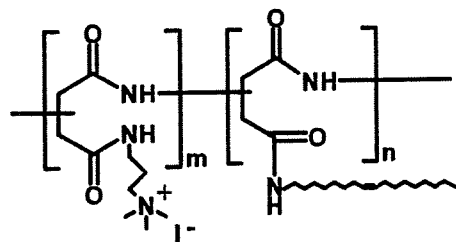


Figure 1. Structure of TMPA-OA-PAsp.

3. 実験結果および考察

DNA 抽出操作前後での水溶液の吸光度を測定した結果、吸光スペクトルには変化が見られなかった。このため、合成した TMPA-OA-PAsp では、DNA 抽出を行っていないことがわかった。これは、DNA の抽出に必要なカチオン性の不足のほか、TMPA-OA-PAsp の立体構造が DNA との相互作用を阻害していることが原因として考えられる。

Figure 2 には、油相の粒径測定結果を示した。抽出操作前は、約 10 nm の粒径をもつ会合体が形成されており、抽出操作後には粒径が約 30 nm に増加することが明らかとなった。この粒径の増加は、油中に水分を取り込んだことにより、大きな逆ミセルを形成したためだと考えられる。

実際に、抽出操作前後での油相中の水分量測定を行った結果、抽出前の水分量が 2.7 mg/mL であったのに対し、抽出後の水分量は 34.6 mg/mL となった。つまり、抽出操作を行うことで約 30 mg/mL の水を油中に抽出していることがわかった。TMPA-OA-PAsp は、疎水部だけではなく、親水部も備えた両親媒性の高分子界面活性剤であるため、このように多くの水を油中に抽出できたと考えられる。

これらのことから、TMPA-OA-PAsp は振盪操作によって油相中に水を取り込むことが可能な高分子逆ミセルを形成していることが示唆された。

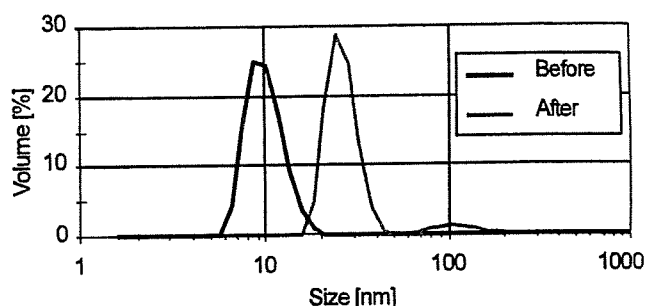


Figure 2. Size distribution of reverse micelles of before and after extraction.

参考文献

[1] M. Goto et al., *J. Chem. Eng. Jap.*, **32**, 123 (1999)

* TEL&FAX:086-251-8908

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

転相温度乳化法を利用した単分散ナノスフェア調製プロセスの開発

岡山大院環 ○岩渕草太郎・久野優子・久保田潤・小野努*・木村幸敬

<緒言>

ミニエマルジョン重合はナノサイズの高分子微粒子調製に有利な手法として期待されている。しかし、重合反応場となるナノエマルジョンの調製には高圧ホモジナイザーや超音波発生器を用いた系への高いエネルギー投入が必要である。そこで我々は激しい攪拌を必要としない転相温度乳化法に着目した。ポリオキシエチレン型非イオン性界面活性剤を含む油水分散系では、転相温度付近での油-水界面張力低下を利用することで、わずかなせん断力でナノエマルジョンを調製できる。また、本研究室ではマイクロリアクターを用いた転相温度乳化にも成功している[1]。本発表では、マイクロリアクターと転相温度乳化法を組み合わせた乳化システムを利用して新たなナノスフェア調製プロセスについて報告する。

<実験>

Fig.1 に実験装置図を示す。流路は Y 字型分岐部を有するマイクロ流路（連続相幅：131 μm 、分散相幅：103 μm 、合流後流路幅：133 μm （全て実測値））を用いた。連続相に超純水、分散相にモノマーとして Styrene、ハイドロフォブとして Hexadecane、界面活性剤として Polyoxyethylene (10) Nonylphenyl ether、開始剤として ADVN を用い、連続相流速 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 、分散相流速 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ にて乳化を行った。

調製したエマルジョンを窒素雰囲気下で 50 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間重合を行った。得られた粒子は SEM 観察を行った。また、重合前後で濃厚系粒径アナライザー（FPAR）にて粒径測定、多分散度指数を測定した。

<結果・考察>

Fig.2 に得られた粒子の SEM 画像を示す。重合後の粒径は 90 nm、多分散度指数は 10.7 % と比較的単分散であった。これらの結果より、マイクロリアクターを用いた転相温度乳化によって得られるナノエマルジョン中でミニエマルジョン重合を進行させることによって、新たなナノスフェア調製プロセスの可能性が示唆された。

<参考文献>

[1] 久保田潤 化学工学会第 38 回秋季大会 予稿集 p.116

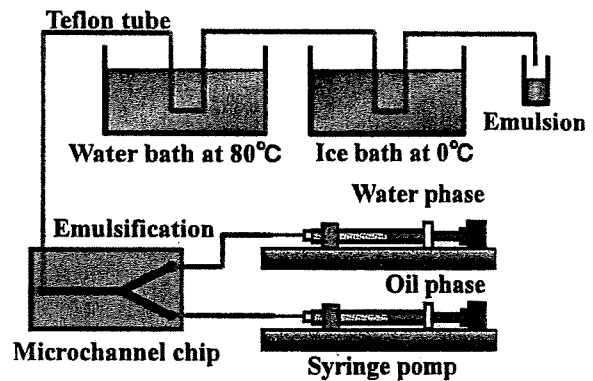


Fig. 1 Schematic illustration of the experimental equipment



Fig. 2 SEM image of prepared nanospheres.

Development of monodisperse nanosphere preparation utilizing a phase inversion temperature method in a microfluidic device.

Sotaro IWABUCHI, yuko HISANO, Jun KUBOTA, Tsutomu ONO*, and Yukitaka KIMURA (Graduate School of Environmental Science, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan.)

*Tel/ Fax: +81-86-251-8908, E-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp

ポリ乳酸系ジブロック共重合体を用いた多孔質微粒子の調製とその構造制御

岡山大学院環 〇渡邊貴一, 岡山大院自 村中誠, 岡山大院環 小野努・木村幸敬

<緒言>

ポリ乳酸 (PLA) 系高分子は、生分解性高分子材料として注目されている。その中でも、PLA とポリエチレングリコール (PEG) の共重合体 (PEG-PLA) は環境や人体に対して安全で、生体親和性にも優れており、薬物輸送担体や環境低負荷な農薬材料としての利用が期待できる。近年、PEG-PLA をマトリックスとして利用したミクロスフェア調製に関する研究は、数多く報告されている。しかしながら、ミクロスフェアの構造制御を行っている研究はほとんどない。ミクロスフェア内封物の徐放挙動はミクロスフェアの構造に大きく影響を受けるため、ミクロスフェアの構造を制御することは重要である。そこで本研究では、合成した油溶性および水溶性 PEG-PLA を界面活性剤として用いた W/O/W エマルションの液中乾燥法によって調製した PEG-PLA ミクロスフェアの構造制御について報告する。

<実験>

2.1) PEG-PLA の合成 末端にメトキシ基を有する PEG (MeO-PEG) を開始剤として D, L-ラクチドの開環重合により、PEG-PLA を合成した。合成した PEG-PLA の分子量分布 (M_w/M_n) をゲル浸透クロマトグラフィにより測定し、数平均分子量から親水-親油バランス (HLB) を算出した (Table 1)。

Table 1 Characteristics of PEG-PLA

Sample	M_n^*		M_w/M_n	HLB
	PEG-PLA	PLA		
o-PEG-PLA	8,000	4,000	1.08	10.0
w-PEG-PLA	4,400	400	1.05	18.2

* ^1H NMR measurement, MeO-PEG $M_n = 4,000$

2.2) PEG-PLA ミクロスフェアの調製と評価 超純水を内水相、油溶性 PEG-PLA (o-PEG-PLA) を溶解させた酢酸エチル溶液を油相とし、ホモジナイザーにより W_1/O エマルションを調製した。得られた W_1/O エマルションを水溶性 PEG-PLA (w-PEG-PLA) を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液に注ぎ、 $W_1/O/W_2$ エマルションを調製した。液中乾燥によって、油相溶媒を除去することで、PEG-PLA ミクロスフェアを調製した。その後、遠心分離により生成物を回収し、3 回の洗浄を行った。洗浄後に PEG-PLA ミクロスフェア分散液を 1 昼夜凍結乾燥し、冷暗保存した。得られたミクロスフェアの形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

<結果・考察>

Fig. 1 に W_1/O 体積比を変えて調製した PEG-PLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 1 より、得られた PEG-PLA ミクロスフェアの表面はいずれも多孔質であった。これは液中乾燥中に PEG 鎖を介して、油相中で水の移動が起こったためだと思われる。また、 W_1/O 体積比の増加に伴い、得られる PEG-PLA ミクロスフェアの内部構造が単核中空構造から多核中空構造に変化する傾向がみられた。

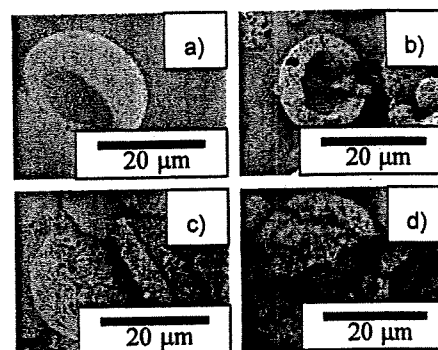


Fig. 1 SEM images of PEG-PLA microspheres [W_1/O (v/v) = a) 0/8, b) 0.1/8, c) 0.3/8, d) 1/8].

Preparation and Morphology Control of Porous PEG-PLA Microspheres

Takaichi WATANABE¹, Makoto MURANAKA², Tsutomu ONO^{1*}, and Yukitaka KIMURA¹
(¹Graduate School of Environmental Science, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, JAPAN ²Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1, Tsushima-naka, Okayama 700-8530, JAPAN)

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

界面制御ラジカル重合を活用した高分子微粒子の調製

(岡山大院環)○(学)平田征丈・大浦浩平・(正)小野努*・(正)木村幸敬

1. 緒言

高分子微粒子は大きな比表面積を有し、微粒子表面の機能が大きく発揮されることから微粒子の表面修飾やカプセル化により目的物質を内包できることから様々な研究がなされている。

本研究室では、ラジカルの保護基として用いられている 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-*N*-oxyl (TEMPO) に着目し、重合開始剤ならびに界面活性剤としての機能を有する界面活性 TEMPO 誘導体 (Fig. 1) を合成した^{1, 2, 3, 4)}。本発表ではこれらを不均一系重合に用い、界面制御ラジカル重合を活用して高分子微粒子調製を行った結果を報告する。なお、本手法では調製された高分子微粒子表面に TEMPO 誘導体が固定化されるため、それを開始点とした修飾による機能化も期待できる。

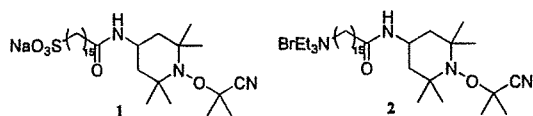


Fig. 1 Interface-active TEMPO derivatives with an anionic (1) and a cationic (2) head group

2. 実験

水相に界面活性 TEMPO 誘導体 1 あるいは 2 を含む水溶液、油相にはスチレンとヘキサデカンの混合物を用い、ホモジナイザーにより O/W エマルションを調製後、耐圧反応器内 0.4 MPa 窒素雰囲気下 125°C で 24 時間重合を行った。氷浴にて重合を停止させた後、粒子をエタノールで洗浄を行い、超遠心分離により回収した。その後、回収された粒子について各種分析を行った。

3. 結果および考察

調製された粒子の SEM 観察結果 (Fig. 2) より、数百 nm の小粒子及び数 μm の大粒子が調製されていることが確認された。この結果は界面活性 TEMPO 誘導体 1 および 2 を用いた系においてほぼ同様であり、液滴

界面重合ならびに均相核形成が起こっていると考えられる。また、界面活性 TEMPO 誘導体 1 よりも界面活性 TEMPO 誘導体 2の方が界面活性が低いため、重合中に液滴の合一が起こりやすく、大粒径のものが多くなったと推察される。さらに、粒子表面のゼータ電位を測定したところ、界面活性 TEMPO 誘導体 1 を用いて調製した微粒子は -42.9 mV というスルホン酸基に由来する負電荷を示したのに対し、界面活性 TEMPO 誘導体 2 を用いた場合は +46.3 mV というトリエチルアミノ基由来の正電荷が確認された。このことから、油水界面に吸着した界面活性 TEMPO 誘導体を起点に重合反応が進行していることが示唆され、界面制御ラジカル重合によって微粒子表面に TEMPO 誘導体が固定化された高分子微粒子の調製に成功したといえる。

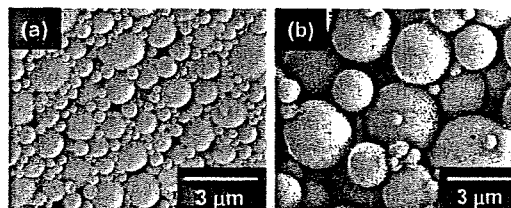


Fig. 2 SEM images of microspheres prepared with an anionic (a) and a cationic (b) TEMPO derivative

参考文献

- 1) 大浦ら, 化学工学会第 73 年会要旨集, P.108 (2008)
- 2) Kubota, J., et al. *Tetrahedron Lett.* 46, 8975 (2005)
- 3) Mitsudo, K., et al. *Tetrahedron Lett.* 48, 8994 (2007)
- 4) 平田ら, 第 2 回化学工学 3 支部合同北九州大会要旨集, P.54 (2009)

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

液中乾燥法によるポリ乳酸系多孔質マイクロスフェアの調製と構造制御に関する検討

(岡山大院環) ○ (学) 渡邊貴一・(正) 村中誠・(正) 小野努*・(正) 木村幸敬

緒言

ポリ乳酸 (PLA) 系高分子は、生分解性高分子材料として注目されている。その中でも PLA とポリエチレングリコール (PEG) の共重合体 (PEG-PLA) は、生体適合性にも優れており、薬物輸送担体や化粧品への応用が期待されている。さらに、PEG-PLA は両親媒性であるため、界面活性剤としても使用できる。近年、PEG-PLA をマトリックスとする薬物内包マイクロスフェア調製に関する研究は、数多く報告されているが[1]、PEG-PLA マイクロスフェアの表面および内部構造制御を行った研究はほとんど報告されていない。

そこで本研究では、合成した油溶性および水溶性 PEG-PLA を界面活性剤として用いた W/O/W エマルションの液中乾燥法により、PEG-PLA マイクロスフェアを調製し、その構造制御を行った。本発表では、調製した PEG-PLA マイクロスフェアの表面多孔性および内部構造制御について報告する。

実験

PEG-PLA の合成 片末端にメトキシ基を有する PEG (MeO-PEG) を開始剤に用いた DL-lactide の開環重合により、PEG-PLA を合成した。¹H NMR および GPC 測定から、PEG-PLA の合成を確認した。

PEG-PLA マイクロスフェアの調製と評価 超純水を内水相 (W₁)、油溶性 PEG-PLA を溶解させた酢酸エチル溶液を油相 (O) とし、ホモジナイザーにより W₁/O エマルションを調製した。得られた W₁/O エマルションを水溶性 PEG-PLA を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液 (W₂) に注ぎ、W₁/O/W₂ エマルションを調製した。液中乾燥法によって油相溶媒を除去することで、PEG-PLA マイクロスフェア

を調製した。その後、遠心分離により生成物を回収し、3 回の洗浄を行った。洗浄後に PEG-PLA マイクロスフェア分散液を一昼夜凍結乾燥し、冷暗保存した。得られたマイクロスフェアの形態は走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。

結果および考察

Fig. 1 に W₁/O 体積比を変えて調製した PEG-PLA マイクロスフェアの SEM 写真を示す。得られた PEG-PLA マイクロスフェアはいずれも表面が多孔質であった。これはマイクロスフェアが析出するまでに、PEG 鎖を介して、油相中で水の移動が起こったためだと思われる。また、W₁/O 体積比の増加に伴い、得られる PEG-PLA マイクロスフェアの内部構造が単核中空構造から多核構造に変化することを見出した。

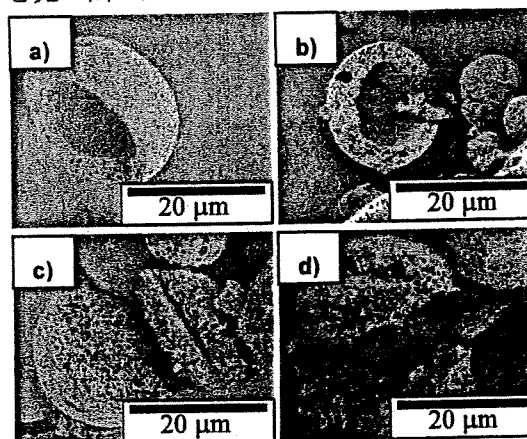


Fig. 1 SEM images of cross-sectional view of PEG-PLA microspheres [W₁/O (v/v) = a) 0/8, b) 0.1/8, c) 0.3/8, d) 1/8].

<参考文献>

- [1] Q. Wei *et al.*, *J. Colloid Interf. Sci.*, **323**, 267-273 (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リ乳酸系ナノ粒子の開発

(岡山大院環¹・岡山大院医歯薬総合²) ○(正) 小野努^{1*}・廣田健¹・
(正) 木村幸敬¹・白石太朗²・大河原賢一²

【緒言】

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。PDT で用いる薬物は一般に言う光増感剤であり、光を受容して励起し、生成した一重項酸素が細胞を壊死させていく。しかしながら、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、唯一の副作用ともいえる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生活を余儀なくされる。そのため、PDT 用薬物キャリアを用いたドラッグデリバリーによって、副作用を軽減させることで患者の QOL の向上をもたらすことが期待される。

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 への応用を目的としている。

【実験】

疎水性の高いポルフィリンを光増感剤として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) を利用した薬物の集積を目指す。それ故、生体適合性に優れた高い血中滞留性を示す 100 nm 以下のナノ粒子調製を設計する。

ナノ粒子を構成する成分としては、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。本研究では、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、溶媒拡散法によってポルフィリン内封ナノ粒子調製を行った。

【結果および考察】

水溶性 PEG-PLA を用いた溶媒拡散法によって 100 nm 以下のナノ粒子調製が得られた (Fig.1)。油相として用いた酢酸エチルへ溶解したポルフィリンは、極めて高い内封率でナノ粒子に包括することができ、水溶液中で一重項酸素の生成も確認できた。

また、マウス結腸癌由来細胞 (C26 細胞) を用いた PDT の *in vitro* および *in vivo* 実験を実施したところ、約 50 nM のポルフィリン濃度でも照射によりほぼ全ての細胞が死滅した。C26 担癌ラットおよびマウスを用いた *in vivo* 実験においても、AUC (% of dose/mL·hr) 値は 2070 と非常に高い血中滞留性を示し、PDT による有意な腫瘍抑制効果が確認された。このように、本手法は簡便な操作で疎水性薬物を高効率で内封するナノ粒子を調製でき、PDT に対しても有効な薬物キャリアであることが示唆された。

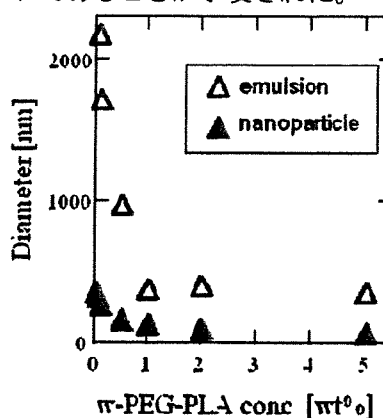


Fig.1 Effect of water-soluble PEG-PLA concentration on the diameter of nanoparticles.

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

液中乾燥法によるポリコハク酸イミド(PSI)をコアとしたコアシェル粒子の調製

(岡山大環)○ 加藤貴士, (岡山大環) (正) 小野努*, (正) 木村幸敬

1. 緒言

コアシェル構造を持つ高分子ミクロスフェアは様々な活性成分をコア部に包括し、更にシェル部の厚みを変えることで活性成分の放出速度を制御することができるため、農薬、医薬品、食品、化粧品など様々な分野で応用研究されている。

当研究室では生分解性高分子であるポリコハク酸イミド(PSI)に着目し、液中乾燥法によってPSIの微粒子調製が可能であることを示してきた。PSIは求核試薬によってイミド環の開環反応に伴い容易に機能性側鎖を導入できる特徴を有している。そこで、本研究では任意の側鎖導入を施したPSI誘導体とPSIの混合系を用いて生分解性コアシェル粒子の調製を目指す。PSIをベースとした本コアシェル粒子は側鎖導入が可能な反応性部位を多く含んでおり、コアシェル粒子調製後、さらにコアやシェルへ機能性を付与することが可能であり、よりインテリジェントなコアシェル粒子の開発へと展開できる。本講演では、PSIに長鎖アルキル基を側鎖導入したPSI誘導体をシェルとしてPSIをコアとするコアシェル粒子の調製について報告する。

2. 実験方法

2.1 ドデシルアミン側鎖導入PSIの合成

L-アスパラギン酸の熱重縮合によりPSIを合成した($M_w=7,700$)。続いて側鎖にドデシルアミン(DDA)を20, 40, 60%の割合で導入したPSI(DDA-PSI)を合成し $^1\text{H-NMR}$ により構造の同定を行った。

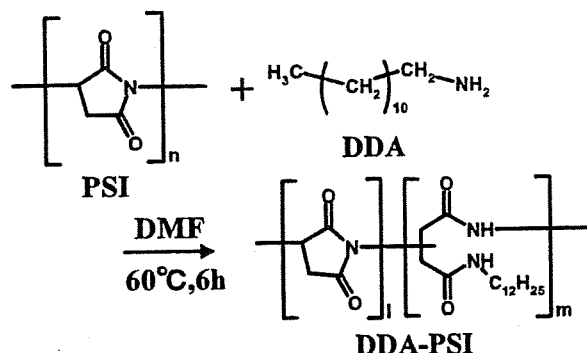


Fig.1 Synthetic scheme of DDA-PSI

2.2 液中乾燥法によるコアシェル粒子調製

連続相として界面活性剤であるレシチンを含有し

た流動パラフィン、分散相としてPSIおよびDDA-PSI含有DMF溶液を調製した。その後、分散相を連続相に加えて攪拌により、O/Oエマルションを調製した。40°C、減圧下で液中乾燥を7時間行い、分散相溶媒を除去することでPSIミクロスフェアを調製した。その後、遠心分離により生成物を回収、洗浄後一晚凍結乾燥した。調製された粒子はSEMを用いて観察を行った。

3. 結果と考察

3.1 DDA-PSIの合成

$^1\text{H-NMR}$ 測定より0.85 ppm付近にDDAのメチル基由来のピーク、5.2 ppm付近にPSIのメチン基由来のピーク、4.5 ppm付近にイミド環の開環によるピークを確認した。以上のことから、合成した高分子がDDA-PSIであると同定した。

3.2 液中乾燥法によるコアシェル粒子調製

Fig.2に示したSEM写真より、DDA₆₀-PSI₄₀を用いて調製した微粒子はコアシェル構造をとっていることが確認された。一方でDDA₂₀-PSI₈₀およびDDA₄₀-PSI₆₀では微粒子の調製は確認できたが、内部のコアシェル構造は確認できなかった。このようにDDA-PSIの側鎖導入率が得られた粒子の内部構造に影響していることから、分散相の溶媒除去段階で液滴の相分離が起こっていると考えられる。さらに、DDA₆₀-PSI₄₀を用いた系について界面張力に基づく拡張係数理論を用いたコアシェル構造の検討を行った。その結果、調製された粒子の構造はPSIがコアでDDA-PSIがシェルであることが示唆された。

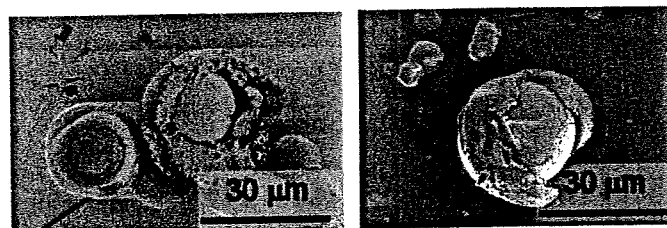


Fig.2 SEM images of particle prepared by solvent evaporation method with PSI and DDA₆₀-PSI₄₀.

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

(岡山大学院)O(学)伊東一行・(学)安川政宏・(正)小野努*・(正)木村幸敬

1. 緒言

マイクロ流路分岐を用いた液滴生成法は、単分散液滴を連続的に生成でき、流量変化により液滴サイズの制御を容易に行えるといった特徴を持つ[1]。そこでマイクロ流路基板を連結させ、単分散複合エマルションを調製した。今回は流量変化により内部と外部の液滴サイズおよび内包液滴数の制御を試みた結果について報告する。

2. 実験

2-1) W_1/O エマルションの調製 Reactive Blue 160 を所定量加えた超純水を水相とし、Lecithin と Solsperse 17000 をそれぞれ所定量加えた Isopar G を油相とした。疎水化処理を施した金属製 Y 字型マイクロ流路に水相と油相を送液して W_1/O エマルションを調製した。さらに水相と油相流量を変化させて調製した W_1/O エマルションを光学顕微鏡で観察した。

2-2) $W_1/O/W_2$ エマルションの調製 連続的に乳化を行うために、疎水化処理した金属製 Y 字型マイクロ流路にテフロンチューブを通して未処理のガラス製 Y 字型マイクロ流路を連結した。Fig. 1 に実験装置の概略図を示す。ガラス製マイクロ流路においては、 W_1/O エマルション溶液と所定濃度のドデシル硫酸ナトリウム水溶液を送液して $W_1/O/W_2$ エマルションを調製した。内水相(W_1)流量は $5 \mu\text{l}/\text{min}$ 、油相(O)流量は $10 \mu\text{l}/\text{min}$ に固定し、外水相(W_2)流量を変化させて調製した $W_1/O/W_2$ エマルションを光学顕微鏡で観察した。

3. 結果および考察

3-1) W_1/O エマルションの調製における流量変化の影響 疎水化したマイクロ流路に送液する水相と油相の流量を変化させ、調製されるエマルションの粒径と変動係数 (CV) 値に与える影響を検討した。その実験結果を Fig. 2 に示す。油相流量の増加に伴って、調製される液滴の粒径は減少することが確認された。これは水相へのせん断力が増加したため、エマルション粒径が小さくなったものと考えられる。さらに単分散性の指標である CV 値が 10% 以下であることから単分散エマルションの調製が確認できた。

3-2) $W_1/O/W_2$ エマルションの調製における流量変化の影響 外水相流量を $50 \mu\text{l}/\text{min}$ にしたところ 1-2 個の内水滴を含んだ直径 $130 \mu\text{m}$ の $W_1/O/W_2$ 液滴が得られた (Fig. 3-a)。また、外水相流量を $125 \mu\text{l}/\text{min}$ にしたところ、1 個の内水滴を含む直径 $96 \mu\text{m}$ の $W_1/O/W_2$ 液滴が得られた (Fig.

3-b)。これらの結果から、外水相流量変化により調製される $W_1/O/W_2$ 液滴のサイズと内包液滴数を制御できることが明らかとなった。

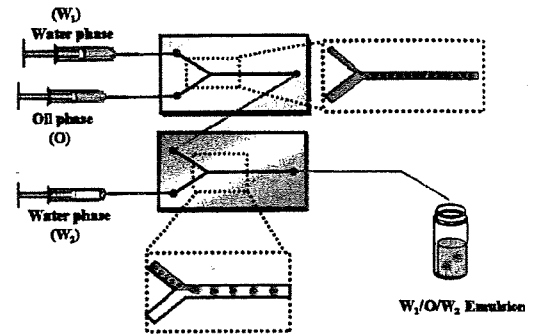


Fig. 1 Schematic illustration of a $W_1/O/W_2$ emulsion preparation device.

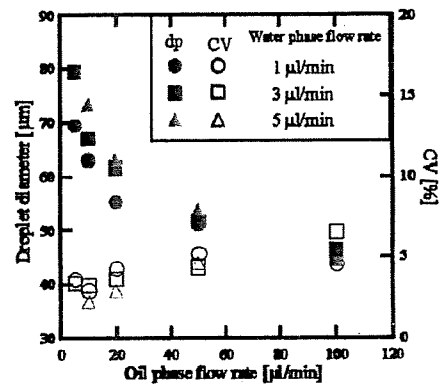


Fig. 2 Effect of flow rate on the droplet diameter and coefficients of variation of W_1/O droplets.

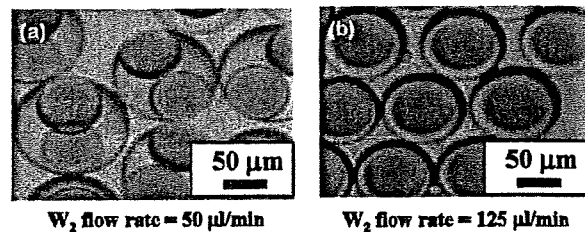


Fig. 3 Images of optical microscopes of $W_1/O/W_2$ droplets: W_2 flow rate = (a) $50 \mu\text{l}/\text{min}$, (b) $125 \mu\text{l}/\text{min}$.

【引用文献】

[1] Thorsen *et al.*, *Phys. Rev. Lett.*, **86**(18), 4163-4166 (2001)

*Tel&Fax: 086-251-8908
e-mail: tono@cc.okayama-u.ac.jp

溶媒拡散法による単分散 PLA ミクロスフェアの調製

(岡山大学院環)○(学)渡邊貴一・(正)小野努・(正)木村幸敬

1. 緒言 ポリ乳酸 (PLA) は、生分解性高分子材料として注目されており、成形から分解まで幅広く研究されている。そのなかで PLA ミクロスフェアの調製は主に乳化後の液中乾燥法により行われてきた。しかしながら、ホモジナイザー、攪拌翼などの機械的乳化法が用いられてきたため、単分散な PLA ミクロスフェアを得ることが困難であった。

そこで、本研究ではマイクロ流路分岐乳化法と溶媒拡散法に着目した。マイクロ流路を用いた乳化により、単分散な oil-in-water (O/W) エマルションを調製できる。さらに得られたエマルション溶液を水により希釈し、高分子を析出させることによって、単分散な PLA ミクロスフェアを簡便に調製できる。粒径の単分散化は微粒子材料の機能性向上に繋がる重要な要素技術である。

本講演では、合成した PLA とポリエチレングリコールの共重合体 (PEG-PLA) を界面活性剤として用いた O/W エマルション溶媒拡散法による単分散 PLA ミクロスフェアの調製について報告する。

2. 実験

2.1) PLA および PEG-PLA の合成 開始剤としてラウリルアルコール、メトキシ基を有する PEG (MeO-PEG) を用いた D,L-lactide の開環重合により、PLA と PEG-PLA をそれぞれ合成した。

2.1) PLA ミクロスフェアの調製と評価 PLA を溶解させた酢酸エチル溶液を油相 (O 相)、界面活性剤として水溶性の PEG-PLA を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液を水相 (W 相) として用いた。シリンジから送液された油相を、Y 字型基板のマイクロ流体デバイス内で水相により剪断することで単分散 O/W エマルションを調製した。調製された O/W エマルション溶液は、テフロンチューブを介して多量の超純水中に注がれた。油相の酢酸エチルが超純水中へ拡散することで、PLA ミクロスフェアを調製した。調製された O/W エマルション、PLA ミクロスフェアはそれぞれ光学顕微鏡、走査型電子顕微鏡 (SEM) によって観察した。

3. 結果および考察 Fig. 1 には分散相 (O 相) の流速を 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ に固定した状態で、連続相 (W 相) の流速を変えて調製した PLA ミクロスフェアの SEM 写真を示す。Fig. 2 には連続相流速が PLA ミクロスフェアの粒径と変動係数 (CV) に及ぼす影響について示す。

Fig. 1 より、連続相の流速に因らず、表面の滑らかな単分散 PLA ミクロスフェアの調製に成功した。

Fig. 2 より、連続相流速の増加に伴って得られる PLA

ミクロスフェアの粒径は減少した。これは、連続相流速の増加によって、O/W エマルション調製時の連続相による剪断力が増加したことが原因であると考えられる。また、CV 値は連続相流速にほとんど影響せず、いずれの場合も約 5% で、単分散であった。

以上の結果から、マイクロ流体デバイスを用いた単分散なエマルション調製と溶媒拡散法を組み合わせることで、単分散な PLA ミクロスフェアを調製することに成功した。また、エマルション調製時に連続相流速を変えることで、単分散性を維持したまま PLA ミクロスフェアの粒径を制御できることが示された。

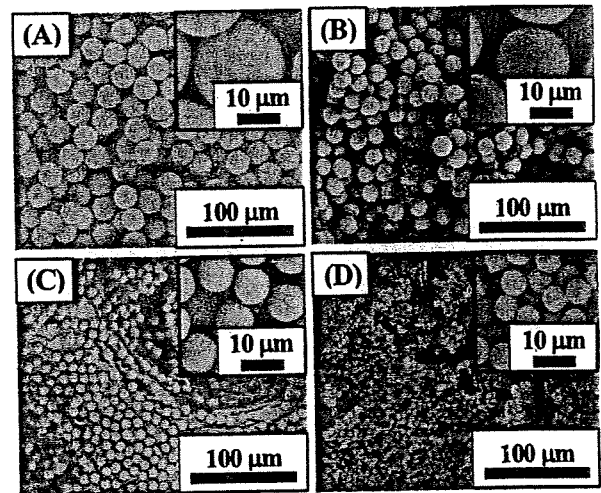


Fig. 1 SEM images of PLA microspheres prepared by changing continuous phase flow rate ((A) 10, (B) 20, (C) 50, (D) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$).

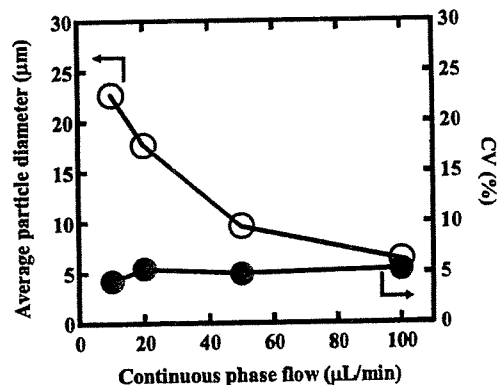


Fig. 2 The effect of continuous phase flow rate on the diameter and the coefficient of variation (CV) of PLA microspheres (○: average particle diameter, ●: CV).

*TEL/FAX: 086-251-8908

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