

これはポルフィリン含有 PLE ナノ粒子中の PLE の割合を減少させたことによるポルフィリン含有率の向上であり、ドラッグキャリアの生産効率としては低下してしまうものでもある。今後は、これまで得られた PLE ナノ粒子中へのポルフィリン包括機構の知見に基づき、有機溶媒やジブロックコポリマー組成などを改良することで、ドラッグキャリアとしての生産効率を低下させずにポルフィリン含有率を向上させる方法について検討する必要があると考えられる。

一重項酸素発現の確認

PLE ナノ粒子中に内封された光増感剤であるポルフィリンが、外部からの光照射によって光増感作用を示し、酸素分子から一重項酸素を生成し、ナノ粒子外部へ一重項酸素が放出されているかを確認する。PDT における抗腫瘍効果は、この一重項酸素が細胞へダメージを与えることが原因とされており、ナノ粒子中の光増感剤が十分に機能するかどうかを *in vitro* で確認することは非常に重要なことである。

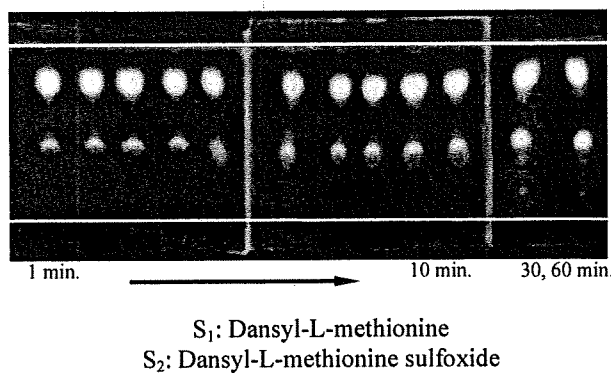


Figure 10. ポルフィリン含有 PLE ナノ粒子を用いた Dansyl-L-methionine の酸化作用

本研究では、一重項酸素を感知して分

子内の吸収スペクトルを変化させることのできる Dansyl-L-methionine の酸化作用を用いて薄層クロマトグラフィー (TLC) による評価を行った (Figure 10)

光照射時間とともに Dansyl-L-methionine sulfoxide (S₂) のスポットが大きくなっていることが分かる。これにより、PLE ナノ粒子に内封されたポルフィリンから一重項酸素が生成し、ナノ粒子外にある基質がそれを受け取ることが可能なことが示唆された。このことは、ポルフィリンは PLE ナノ粒子内に内封されたままでも、光照射によって抗腫瘍効果を示すことを期待させるものであり、今後の *in vitro*, *in vivo* 実験において有望な結果であるといえる。

D. 考察

本事業当初から、リポソーム、ナノエマルジョン、ナノ粒子と様々な薬物キャリアについて検討を行ってきたが、簡便な操作で薬物を高効率で内封し、生体内においても高い滞留性と安定性に富んだポリエチレングリコール-ポリ乳酸系 (PLE) ナノ粒子が PDT 用薬物運搬体として最も有望であることが明らかとなった。

特に、その PLE ナノ粒子の調製因子について詳細な検討を行うことによって、光増感剤の高含有率の PLE ナノ粒子調製に成功した。水溶性 PLE は界面活性剤として働くことによって PLE ナノ粒子の粒径を小さくすることが可能であり、超音波照射強度もまた、溶液中の剪断力を高めることによって、より微細な液滴分散液を調製できることを示している。

また、油性 PLE はナノ粒子骨格を担っていることから、ポルフィリン含有量を向上させたい場合には、油性 PLE の低減によって含有率を 10% 以上にまで上

げることができる。

ポルフィリン内封率については、使用するポルフィリン量が多いと、ポルフィリン自体の凝集物を生成し、その結果、内封率が低下してしまうが、これは溶媒である酢酸エチルへの溶解量に起因するものであって、ポルフィリン量を制御することによって高い内封率も実現可能である。

このように、静脈注射に適用可能な100 nm程度の光増感剤内封ナノ粒子を任意で調製でき、ナノ粒子調製プロセスの設計が大きく前進した。

E. 結論

機能性ポルフィリンを高効率で含有可能なナノキャリア設計に関する操作因子について明らかにした。また、100 nm以下で調製されたPLE ナノ粒子に内封されたポルフィリンから一重項酸素が生成され、溶液中に放出されていることを実験的に明らかにすることに成功した。さらに、同ナノ粒子は分担研究者である大河原によってcolon26細胞を用いた*in vitro*実験系および*in vivo*実験系において効率的な殺細胞効果が確認されている。

さらに、本製剤は脂溶性化合物の高効率封入と腫瘍組織への蓄積性の改善を同時に達成するものであり、PDTとは異なる作用機序を有する抗がん剤であるパクリタキセルもまた、ナノ運搬体内に内封できることが実験的に示されている。

本技術は生産効率としても優れており、今後のPDTにおける有望な薬物キャリアとして展開できるものと期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka, ATX-S10 (Na)-photodynamic therapy

inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes, *J. Dermatological Sci.*, 49, 174-177 (2008)

2) K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki, Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 466, 1726-1733 (2008)

3) E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa "Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces" *Langmuir*, 24(23), 13287-13298 (2008)

4) T. Nakashima, T. Ono "Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization" *Colloid Polym. Sci.*, 286, 1587-1592 (2008)

5) K. Tomita, T. Ono "Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene" *Colloid Polym. Sci.*, 287, 109-113 (2009)

6) M. Muranaka, T. Ono "Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups" *Macromol. Rapid Commun.*, 30, 152-156 (2009)

7) S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida, Release

behavior from hydrogen-bonded polymer gel prepared by pressurization, J. Applied Polym. Sci., in press

8) K. Tomita, T. Ono, Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 1. Synthesis of Macromonomer and Dispersion Copolymerization of Styrene, J. Polym. Sci. A, 47, 762-770 (2009)

9) M. Muranaka, H. Yoshizawa, T. Ono, Design of polylactide grafted copolymeric stabilizer for dispersion polymerization of D,L-lactide, Colloid Polym. Sci., 287, 525-532 (2009)

10) K. Tomita, T. Ono, Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 2. Control of Particle Diameter and Diameter Distribution in Dispersion Copolymerization, J. Polym. Sci. A, 47, 2281-2288 (2009)

11) M. Muranaka, T. Ono, Role of Dispersion Stabilizer with Hydroxy Groups in Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres, J. Polym. Sci., 47 5230-5240 (2009)

12) F. Tanimoto, Y. Kitamura, T. Ono, H. Yoshizawa, A versatile biodegradable polymer with a thermo-reversible/irreversible transition, ACS Appl. Mater. Interf., 2, 606-610 (2010)

13) M. Muranaka, K. Hirota, T. Ono, PEG-PLA nanoparticles prepared by

emulsion solvent diffusion using oil-soluble and water-soluble PEG-PLA, Mater. Lett., 64, 969-971 (2010)

14) 小野努, 大河原賢一, ポリ乳酸系ナノ粒子の調製と光線力学的治療への応用, ケミカルエンジニアリング, 55, 63-69 (2010)

15) T. Harada, T. Kanda, K. Suzumori, T. Ono, S. Iwabuchi, K. Ito, K. Ogawara, K. Higaki, An emulsion generating microchannel device oscillated by 2.25MHz ultrasonic vibrator, Japan J. Appl. Phys., in press

2. 学会発表

1) 岡本芳晴, 田邊茂之, 柄武志, 南三郎, 中島進, 仲江良則, 阪田功, 早期照射による光増感物質 PAD-S31 の低用量化の検討, 第18回日本光線力学学会学術講演会, 名古屋, 2008年6月14-15日

2) K. Tomita, T. Ono, Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008年7月20-24日

3) M. Muranaka, T. Ono, Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres, 48th Microsymposium of Prague Meetings on macromolecules, Prague, Czech Republic, 2008年7月20-24日

4) 富田恵介, 小野努, 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,

別添3

第 61 回コロイドおよび界面化学討論会，
福岡，2008 年 9 月 7-9 日

5) 村中誠，小野努，分散重合における
単分散ポリラクチドミクロスフェアの粒
径制御，第 61 回コロイドおよび界面化学
討論会，福岡，2008 年 9 月 7-9 日

6) 安川政宏，神尾英治，小野努，水性
二相系を利用した W/W/O エマルションの
調製，化学工学会第 40 回秋季大会講演要
旨集，仙台，2008 年 9 月 24-26 日

7) 廣田健，村中誠，小野努，阪田功，
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，化学工学会第 40 回秋
季大会講演要旨集，仙台，2008 年 9 月
24-26 日

8) 安川政宏，神尾英治，小野努，水性
二相系を利用した W/W/O エマルションの
調製，第 15 回高分子ミクロスフェア討論
会講演要旨集，神戸，2008 年 11 月 12-14
日

9) 大浦浩平，久保田潤，小野努，界面活
性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系
重合，第 15 回高分子ミクロスフェア討
論会講演要旨集，神戸，2008 年 11 月
12-14 日

10) 安川政宏，小野努，木村幸敬，神尾
英治，水溶性高分子による相分離を利用
した複合エマルションの調製，高分子材
料のための俯瞰的シンポジウム，京都，
2009 年 1 月 13-14 日

11) 廣田健，村中誠，小野努，木村幸敬，
白石太朗，大河原賢一，檜垣和孝，木村
聰城郎，ポルフィリン内封ナノ粒子の開
発と光線力学的治療への応用，高分子材

料のための俯瞰的シンポジウム，京都，
2009 年 1 月 13-14 日

12) 鷺尾直紀，小野努，木村幸敬，単分
散ゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動，第
11 回化学工学会学生発表会【岡山大会(西
日本地区)】，岡山，2009 年 3 月 7 日

13) 渡邊貴一，小野努，木村幸敬，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，第 11 回化学工学会
学生発表会【岡山大会(西日本地区)】，岡
山，2009 年 3 月 7 日

14) 大浦浩平，久保田潤，小野努，木村
幸敬，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，化
学工学会第 74 年会，横浜，2009 年 3 月
18-20 日

15) 小野努，廣田健，木村幸敬，白石太
朗，大河原賢一，檜垣和孝，阪田功，光
線力学的治療に有効な光増感剤内封ナノ
粒子の開発，第 19 回日本光線力学学会学
術講演会，横浜，2009 年 7 月 4 日

16) T. Ono, K. Hirota, T. Shiraishi, K.
Ogawara, K. Higaki, I. Sakata,
Preparation of nanoparticles
containing photosensitizer with
diblock copolymer, Particles 2009,
Berlin, 2009 年 7 月 11-14 日

17) 渡邊貴一，小野努，木村幸敬，ポリ
乳酸系ジブロックコポリマーを用いた多
孔質ミクロスフェアの調製とその構造制
御，化学工学会 第 41 回秋季大会，広島，
2009 年 9 月 16-18 日

18) 土井堯，富田恵介，小野努，木村幸
敬，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, 化学工学会 第 41 回秋季大会, 広島, 2009 年 9 月 16-18 日

19) 吉田圭志, 神尾英治, 小野努, 木村幸敬, 単分散な架橋メラミンサブミリカプセルの調製と膜厚制御に関する検討, 化学工学会 第 41 回秋季大会, 広島, 2009 年 9 月 16-18 日

20) 鷲尾直紀, 小野努, 木村幸敬, 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, 第 61 回日本生物工学会大会, 名古屋, 2009 年 9 月 23-25 日

21) 平田征丈, 小野努, 木村幸敬, 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, 第 2 回化学工学 3 支部合同北九州大会, 北九州, 2009 年 10 月 30-31 日

22) 岸佑磨, 小野努, 木村幸敬, 生分解性高分子界面活性剤を用いた有機溶媒中への DNA 抽出, 第 2 回化学工学 3 支部合同北九州大会, 北九州, 2009 年 10 月 30-31 日

23) 岩渕草太郎, 久野優子, 久保田潤, 小野努, 木村幸敬, 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, 第 18 回ポリマー材料フォーラム, 千葉, 2009 年 11 月 26-27 日

24) 渡邊貴一, 村中誠, 小野努, 木村幸敬, 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, 第 18 回ポリマー材料フォーラム, 千葉, 2009 年 11 月 26-27 日

25) 平田征丈, 大浦浩平, 小野努, 木村

幸敬, 界面制御ラジカル重合を活用した高分子微粒子の調製, 材料化学システム工学討論会 2009, 東京, 2009 年 12 月 6-7 日

26) 渡邊貴一, 村中誠, 小野努, 木村幸敬, 液中乾燥法によるポリ乳酸系多孔質ミクロスフェアの調製と構造制御に関する検討, 材料化学システム工学討論会 2009, 東京, 2009 年 12 月 6-7 日

27) 小野努, 廣田健, 木村幸敬, 白石太朗, 大河原賢一, 光線力学的治療に有効なポリ乳酸系ナノ粒子の開発, 材料化学システム工学討論会 2009, 東京, 2009 年 12 月 6-7 日

28) 加藤貴士, 小野努, 木村幸敬, 液中乾燥法によるポリコハク酸イミドをコアとしたコアシェル粒子の調製, 第 12 回化学工学会学生発表会【福岡大会(西日本地区)】, 福岡, 2010 年 3 月 6 日

29) 伊東一行, 安川政宏, 小野努, 木村幸敬, マイクロ流路を利用した単分散複合エマルション調製における制御因子の検討, 化学工学会第 75 年会, 鹿児島, 2010 年 3 月 18-20 日

30) 渡邊貴一, 小野努, 木村幸敬, 溶媒拡散法による単分散 PLA ミクロスフェアの調製, 化学工学会第 75 年会, 鹿児島, 2010 年 3 月 18-20 日

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案特許 なし
3. その他 なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
S. Nagayama, K. Ogawara, K. Minato, Y. Fukuoka, Y. Takakura, M. Hashida, K. Higaki, T. Kimura	Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor.	Int. J. Pharm.	329	192-198	2007
K. Furumoto, J. Yokoe, K. Ogawara, S. Amano, M. Takaguchi, K. Higaki, T. Kai and T. Kimura	Effect of coupling of albumin onto surface of PEG liposome on its in-vivo disposition.	Int. J. Pharm.,	329	110-116	2007
S. Nagayama, K. Ogawara, Y. Fukuoka, K. Higaki and T. Kimura	Time-dependent changes in opsonin amount associated on nanoparticles alter their hepatic uptake characteristics.	Int. J. Pharm.	342	215-221	2007
S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida	Pressure-induced molecular assembly of hydrogen-bonded polymers.	J. Polym. Sci. Part B: Polym. Phys.	46	743-750	2008
K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, H. I. Ali, E. Akaho, A. Tai, K. Sasaki, H. Kakuta.	Reduction of Lipophilicity at the Lipophilic Domain of RXR Agonists Enables Production of Subtype Preference: RXR α -Preferential Agonist Possessing a Sulfonamide Moiety.	ChemMedChem.	14	454-460	2008
E. Kamio, A. Kato, S. Yonemura, T. Ono, H. Yoshizawa	Preparation of monodisperse crosslinked polymelamine microcapsules by phase separation method	Colloid Polymer Science	286	787-793	2008

別添4

K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morohashi, K. Morishita, N. Matsuura, M. Makishima, A. Tai, K. Sasaki, H. Kakuta.	The First Potent Sub type-Selective Retin oid X Receptor (RXR) Agonist Possessing a 3-Isopropoxy-4-isopr opylphenylamino Moiety, NEt-3IP (RXR β / β -dual agonist)	ChemMedChem.	3	780-787	2008
J. Yokoe, S. Sakuragi, K. Yamamoto, T. Teragaki, K. Ogawara, K. Higaki, N. Katayama, T. Kai, M. Sato and T. Kimura	Albumin-conjugated PEG liposome enhances tumor distribution of liposomal doxorubicin in rats	Int. J. Pharm.	353	28-34	2008
K. Ogawara, K. Un, K. Minato, K. Tanaka, K. Higaki and T. Kimura	Determinants for in-vivo anti-tumor effects of PEG liposomal doxorubicin: Importance of vascular permeability within tumors	Int. J. Pharm.,	359	234-240	2008
T. Shehata, K. Ogawara, K. Higaki and T. Kimura	Prolongation of residence time of liposome by surface modification with mixture of hydrophilic polymers	Int. J. Pharm.	359	272-279	2008
H. Takahashi, A. Ishida-Yamamoto, S. Nakajima, I. Sakata, H. Iizuka	ATX-S10(Na)-photodyn amic therapy inhibits cytokine secretion and proliferation of lymphocytes	J. Dematologica l Sci.	49	174-177	2008
K. Takeda, T. Kunisada, S. Miyazawa, Y. Nakae, T. Ozaki	Photodynamic therapy with ATX-S10-Na(II) Inhibits synovial sarcoma cell growth	Clin. Orthop. Relat. Res.	466	1726-1733	2008
E. Kamio, S. Yonemura, T. Ono, and H. Yoshizawa	Microcapsules with Macroholes Prepared by the Competitive Adsorption of Surfactants on Emulsion Droplet Surfaces	Langmuir	24	13287-1329 8	2008

別添4

T. Nakashima, T. Ono	Effects of Dispersion Stabilizer and Reaction Solvent on Forming Monodisperse Polystyrene Microspheres by Dispersion Polymerization	Colloid Polym. Sci.	286	1587-1592	2008
K. Tomita, T. Ono	Synthesis of polyaspartate macromonomer having a vinyl end group and application to dispersion copolymerization of styrene	Colloid Polym. Sci.	287	109-113	2009
M. Muranaka, T. Ono	Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres by Dispersion Polymerization Using a Polymeric Stabilizer with Hydroxyl Groups	Macromol. Rapid Commun.	30	152-156	2009
S. Mutsuo, K. Yamamoto, T. Furuzono, T. Kimura, T. Ono, A. Kishida	Release behavior from hydrogen-bonded polymer gel prepared by pressurization	J. Applied Polym. Sci.			in press
K. Ogawara, K. Un, K. Tanaka, K. Higaki, T. Kimura	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 Release	133	4-10	2009
K. Tomita, T. Ono	Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 1. Synthesis of Macromonomer and Dispersion Copolymerization of Styrene	J. Polym. Sci. A	47	762-770	2009

別添 4

M. Muranaka, H. Yoshizawa, T. Ono	Design of polylactide grafted copolymeric stabilizer for dispersion polymerization of D, L-lactide	Colloid Polym. Sci.	287	525-532	2009
K. Tomita, T. Ono	Heterogeneous Polymerization with Polyaspartate Macromonomer Having Vinyl Pendant Groups. 2. Control of Particle Diameter and Diameter Distribution in Dispersion Copolymerization	J. Polym. Sci. A	47	2281-2288	2009
M. Muranaka, T. Ono	Role of Dispersion Stabilizer with Hydroxy Groups in Preparation of Monodisperse Polylactide Microspheres	J. Polym. Sci. A	47	5230-5240	2009
F. Tanimoto, Y. Kitamura, T. Ono, H. Yoshizawa	A versatile biodegradable polymer with a thermo-reversible/irreversible transition	ACS Appl. Mater. Interf.	2	606-610	2010
M. Muranaka, K. Hirota, T. Ono	PEG-PLA nanoparticles prepared by emulsion solvent diffusion using oil-soluble and water-soluble PEG-PLA	Mater. Lett.	64	969-971	2010
小野努, 大河原賢一	ポリ乳酸系ナノ粒子の調製と光線力学的治療への応用	ケミカルエンジニアリング	55	63-69	2010
T. Harada, T. Kanda, K. Suzumori, T. Ono, S. Iwabuchi, K. Ito, K. Ogawara, K. Higaki	An emulsion generating microchannel device oscillated by 2.25MHz ultrasonic vibrator	Japan J. Appl. Phys.			in press
Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Hepatic disposition characteristics of Liposomes Coated with Mixture of Hydrophilic Polymers.	日本薬剤学会第22年会要旨集			2007

別添4

運 敬太, 大河原賢一, 西川元也, 高倉喜信, 檜垣和孝, 木村聰城郎	P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキソルビシン内封PEG修飾リポソームのin vivo抗腫瘍効果に関する検討	第23回日本DDS学会要旨集			2007
渡 亮輔, 寺垣拓哉, 大河原賢一, 横江淳一, 甲斐俊哉, 檜垣和孝, 木村聰城郎	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	第23回日本DDS学会要旨集			2007
村中誠, 小野努	水酸基を有する高分子安定剤を用いたアニオン分散重合による単分散ポリ(D,L-乳酸)マイクロスフェアの調製	第56回高分子学会要旨集		3Z10	2007
Ken-ichi Ogawara, Susumu Nagayama, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Time-Dependent Changes in Opsonin Amount Associated on Nanoparticles Alter Their Hepatic Uptake Characteristics.	Proceedings of 8th International ISSX Meeting			2007
Keita Un, Takaaki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Makiya Nishikawa, Yoshinobu Takakura, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	In Vivo Anti-Tumor Effects of PEG-Modified Liposomal Doxorubicin on P-Glycoprotein Over-Expressing Tumor-Bearing Mice.	Proceedings of 8th International ISSX Meeting			2007
J. Kubota, A. Kato, T. Ono	Phase inversion temperature (PIT) method utilized preparation of O/W nano-emulsion by microreactor system	Proceedings of 2007 AIChE annual meeting		332p	2007
富田恵介, 小野努	ポリアスパラギン酸ナトリウムを主鎖に持つマクロモノマーを用いた高分子微粒子の調製	2007年日本化学会西日本大会予稿集		1PB-75	2007

別添4

加来田博貴、高松佳代、高野敦史、薬師寺信匡、森下健一、師橋一徳、大澤史宜、原田隼、藤井周司、鄭曉霞、松浦信康、槇島誠、Hamed Ismail Ali、赤穂榮一、永澤秀子、杉本幸雄、田井章博、佐々木健二	RXR α / β 選択的アゴニストNEt-3IPの開発と生理活性	第18回日本レチノイド研究会要旨集			2007
高松佳代、高野敦史、薬師寺信匡、森下健一、大澤史宜、藤井周司、松浦信康、槇島誠、Hamed Ismail Ali、赤穂榮一、田井章博、佐々木健二、加来田博貴	RXRアゴニスト脂溶性部位の脂溶性低減によるRXRサブタイプ指向性の創出 —リンカー部位にスルホンアミド基を有する—	第26回メディシナルケミストリーシンポジウム要旨集			2007
高松佳代、高野敦史、薬師寺信匡、森下健一、師橋一徳、大澤史宜、藤井周司、松浦信康、槇島誠、田井章博、佐々木健二、加来田博貴	高活性RXR α / β 選択的アゴニストNEt-3IPの開発 —脂溶性部位にアルコキシ基を有する—	第26回メディシナルケミストリーシンポジウム要旨集			2007
高野敦史、原田隼、鄭曉霞、薬師寺信匡、森下健一、大澤史宜、藤井周司、杉本幸雄、田井章博、槇島誠、永澤秀子、佐々木健二、加来田博貴	XR α / β デュアルアゴニストNEt-3IPの抗炎症及び抗がん作用の検証	第26回メディシナルケミストリーシンポジウム要旨集			2007
富田恵介、小野努	末端にビニル基を導入した縮合系マクロモノマーの合成と微粒子調製への応用	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集		16	2007
村中誠、小野努	単分散ポリ乳酸ミクロスフェアの調製における高分子分散剤の分子設計	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集		27	2007
宇留嶋創、小野努	無乳化共重合による単分散機能性微粒子の調製	第10回化学工学会学生発表会要旨集		L22	2008

別添 4

大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 田中秀雄	界面活性能を有するTEMPPO誘導体の合成及び不均相重合への応用	化学工学会第73年会講演要旨集		P108	2008
久野優子, 久保田潤, 小野努	転相温度乳化法を適用したミニエマルション重合による高分子ナノ粒子の調製	化学工学会第73年会講演要旨集		P118	2008
杉田直輝, 谷元史明, 小野努	主鎖末端に疎水基を導入した温度応答性ポリアスパラギン酸誘導体の会合特性	化学工学会第73年会講演要旨集		P121	2008
高松佳代, 高野敦史, 薬師寺信匡, 師橋一徳, 森下健一, 大澤史宜, 藤井周司, 松浦信康, 槇島 誠, 永澤秀子, 杉本幸雄, 田井章博, 佐々木健二, 加来田博貴	RXR α / β デュアルアゴニストNEt-3IPの開発と生理活性評価	第128回日本薬学会要旨集			2008
大河原賢一, 運敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎	P-糖タンパク質高発現がん細胞に対するドキシソルビシン内封PEG修飾リポソームのin vivo抗腫瘍効果とその機構解析	第23回日本薬剤学会要旨集			2008
大河原賢一, 運敬太, 中尾隆明, 檜垣和孝, 木村聰城郎	血管新生阻害薬のエマルション製剤化とその抗腫瘍効果の評価	第24回日本DDS学会要旨集			2008
Tamer Shehata, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Formulation and evaluation of PEGylated niosomes for targeted drug delivery	第24回日本DDS学会要旨集			2008
Yuta Yoshizawa, Yusuke Kono, Yoshiko Fukuoka, Ken-ichi Ogawara, Kazutaka Higaki and Toshikiro Kimura	Development and evaluation of novel nanoparticle formulation of paclitaxel	第23回日本薬物動態学会要旨集			2008

別添 4

Ryosuke Watari, Shuhei Nishiguchi, Ken-ichi Ogawara, Jun-ichi Yokoe, Kazutaka Higaki, Toshiya Kai, Makoto Sato and Toshikiro Kimura	Improvement of in-vivo disposition characteristics and anti-tumor activity of PEG liposomal doxorubicin by rHSA conjugation onto surface of liposome	第23回日本薬 物動態学会要 旨集			2008
岡本芳晴, 田邊茂 之, 柄武志, 南三 郎, 中島進, 仲江 良則, 阪田功	早期照射による光増感 物質PAD-S31の低用量 化の検討	第18回日本光 線力学学会学 術講演会			2008
K. Tomita, T. Ono	Preparation of polymeric particles with poly(aspartic acid) hairy chains	Proceedings of Microsymposi um of Prague Meetings on macromolecul es			2008
M. Muranaka, T. Ono	Design of polymeric dispersion stabilizer for preparation of monodisperse polylactide microspheres	Proceedings of Microsymposi um of Prague Meetings on macromolecul es			2008
富田恵介, 小野 努	マクロモノマー分散共 重合による単分散へア 粒子の調製	第61回コロイ ドおよび界面 化学討論会要 旨集			2008
村中誠, 小野努	分散重合における単分 散ポリラクチドミクロ スフェアの粒径制御	第61回コロイ ドおよび界面 化学討論会要 旨集			2008
安川政宏, 神尾 英治, 小野努,	水性二相系を利用した W/W/Oエマルションの 調製	化学工学会第 40回秋季大会 講演要旨集			2008
廣田健, 村中誠, 小野努, 阪田功	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	化学工学会第 40回秋季大会 講演要旨集			2008
安川政宏, 神尾 英治, 小野努	水性二相系を利用した W/W/Oエマルションの 調製	第15回高分子 ミクロスフェア 討論会講演 要旨集			2008
大浦浩平, 久保 田潤, 小野努	界面活性 TEMPO 誘導 体を利用した不均一系 重合	第 15 回高分 子ミクロスフ ェア討論会講 演要旨集			2008

別添4

安川政宏, 小野努, 木村幸敬, 神尾英治	水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルションの調製	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集			2008
廣田健, 村中誠, 小野努, 木村幸敬, 白石太朗, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎	ポルフィリン内封ナノ粒子の開発と光線力学的治療への応用	高分子材料のための俯瞰的シンポジウム要旨集			2008
大河原賢一, 運敬太, 檜垣和孝, 木村聰城郎	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	第2回国際シンポジウム「第2回高度医療都市を創出する未来技術国際シンポジウム創薬パイライン: 抗がん剤・抗感染症薬の合成と評価系」			2009
大河原 賢一, Tamer Shehata, 檜垣 和孝, 木村 聰城郎	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	日本薬剤学会第24年会			2009
吉澤雄太, 河野裕允, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎	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	第25回日本DDS学会			2009
西口修平, 渡亮輔, 大河原賢一, 檜垣和孝, 木村聰城郎	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	第25回日本DDS学会			2009
Shigeki Abe, Keita Un, Taka-aki Nakao, Ken-ichi Ogawara, Toshikiro Kimura, Kazutaka Higaki,	Anti-tumor effect of angiogenesis inhibitor SU5416 formulated in PEGylated emulsion	第24回日本薬物動態学会年会			2009
白石太朗, 大河原賢一, 木村聰城郎, 檜垣和孝, 小野努, 木村幸敬	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	第130回日本薬学会			2010

別添 4

鷺尾直紀, 小野努, 木村幸敬	単分散ゲル粒子内での大腸菌の増殖挙動	第11回化学工学会 学生発表会【岡山大会（西日本地区）】, 研究発表講演要旨集			2009
渡邊貴一, 小野努, 木村幸敬	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	第11回化学工学会 学生発表会【岡山大会（西日本地区）】, 研究発表講演要旨集			2009
大浦浩平, 久保田潤, 小野努, 木村幸敬	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	化学工学会第74年会講演要旨集			2009
小野努, 廣田健, 木村幸敬, 白石太朗, 大河原賢一, 檜垣和孝, 阪田功	光線力学的治療に有効な光増感剤内封ナノ粒子の開発	第19回日本光線力学学会学術講演会要旨集			2009
T. Ono, K. Hirota, T. Shiraishi, K. Ogawara, K. Higaki, I. Sakata	Preparation of nanoparticles containing photosensitizer with diblock copolymer	Particles 2009 Proceedings			2009
渡邊貴一, 小野努, 木村幸敬	ポリ乳酸系ジブロックコポリマーを用いた多孔質ミクロスフェアの調製とその構造制御	化学工学会第41回秋季大会要旨集			2009
土井堯, 富田恵介, 小野努, 木村幸敬	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	化学工学会第41回秋季大会要旨集			2009
吉田圭志, 神尾英治, 小野努, 木村幸敬	単分散な架橋メラミンサブミリカプセルの調製と膜厚制御に関する検討	化学工学会第41回秋季大会要旨集			2009
鷺尾直紀, 小野努, 木村幸敬	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	第61回日本生物工学会大会講演要旨集			2009
平田征丈, 小野努, 木村幸敬	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	第2回化学工学3支部合同北九州大会要旨集			2009

別添4

岸佑磨, 小野努, 木村幸敬	生分解性高分子界面活性剤を用いた有機溶媒中へのDNA抽出	第2回化学工学3支部合同北九州大会要旨集			2009
岩渕草太郎, 久野優子, 久保田潤, 小野努, 木村幸敬	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	第18回ポリマー材料フォーラム講演予稿集			2009
渡邊貴一, 村中誠, 小野努, 木村幸敬	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	第18回ポリマー材料フォーラム講演予稿集			2009
平田征丈, 大浦浩平, 小野努, 木村幸敬	界面制御ラジカル重合を活用した高分子微粒子の調製	材料化学システム工学討論会2009			2009
渡邊貴一, 村中誠, 小野努, 木村幸敬	液中乾燥法によるポリ乳酸系多孔質ミクロスフェアの調製と構造制御に関する検討	材料化学システム工学討論会2009			2009
小野努, 廣田健, 木村幸敬, 白石太郎, 大河原賢一	光線力学的治療に有効なポリ乳酸系ナノ粒子の開発	材料化学システム工学討論会2009			2009
加藤貴士, 小野努, 木村幸敬	液中乾燥法によるポリコハク酸イミドをコアとしたコアシェル粒子の調製	第12回化学工学会 学生発表会 【岡山大会 (西日本地区)】, 研究発表講演要旨集			2010
伊東一行, 安川政宏, 小野努, 木村幸敬	マイクロ流路を利用した単分散複合エマルション調製における制御因子の検討	化学工学会 第75年会要旨集			2010
渡邊貴一, 小野努, 木村幸敬	溶媒拡散法による単分散PLAミクロスフェアの調製	化学工学会 第75年会要旨集			2010
阪田功ら	皮膚疾患治療剤	特願 2008-118187			2008
H. Kakuta, K. Sasaki, K. Takamatsu, A. Takano, N. Yakushiji, K. Morohashi, K. Morishita	Rexinoid compound having alkoxy group	PCT/JP2008/5 3240			2008



Pharmaceutical Nanotechnology

Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor

Susumu Nagayama^a, Ken-ichi Ogawara^a, Keiko Minato^a, Yoshiko Fukuoka^a,
Yoshinobu Takakura^b, Mitsuru Hashida^b, Kazutaka Higaki^a, Toshikiro Kimura^{a,*}

^a Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

^b Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8501, Japan

Received 11 May 2006; received in revised form 1 August 2006; accepted 23 August 2006

Available online 30 August 2006

Abstract

We tried to evaluate the possible involvement of fetuin in the scavenger receptors (SRs)-mediated hepatic uptake of polystyrene nanospheres with the size of 50 nm (NS-50), which has surface negative charge (zeta potential = -21.8 ± 2.3 mV). The liver perfusion studies in rats revealed that the hepatic uptake of NS-50 pre-coated with fetuin (NS-50-fetuin) was significantly inhibited by poly inosinic acid (poly I), a typical inhibitor of SRs, whereas that of plain NS-50 or NS-50 pre-coated with BSA (NS-50-BSA) was not. The uptake of NS-50-fetuin by cultured Kupffer cells was also significantly inhibited by poly I, and anti-class A scavenger receptors (SR-A) antibody, suggesting that fetuin on NS-50 mediated the recognition and internalization of NS-50 by Kupffer cells and at least SR-A would be responsible for the uptake. Taken that Western blot analysis confirmed that fetuin certainly adsorbed on the surface of NS-50 after the incubation of NS-50 with serum, the results obtained in the present study indicate that fetuin would be one of the serum proteins that were substantially involved in the hepatic uptake of NS-50 via SRs.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Polystyrene nanosphere; Fetuin; Scavenger receptors; Hepatic uptake; Receptor-mediated phagocytosis

1. Introduction

Scavenger receptors (SRs), which were first reported by Brown and Goldstein (Goldstein et al., 1979), are a family of cell surface glycoproteins that are able to bind and internalize modified lipoproteins such as oxidized and acetylated low density lipoproteins (Greaves et al., 1998). In the past 20 years, SRs have been found to be able not only to recognize endogenous molecules such as collagen (McKeown et al., 1994) and altered-self such as apoptotic cells (Peiser and Gordon, 2001), but also to bind, internalize and degrade exogenous pathogen such as bacteria (Peiser et al., 2000). In addition, it was reported that these receptors play an important role to remove a variety of negatively charged substances such as dextran sulfate (Takakura et al., 1994), formaldehyde-treated albumin (Jansen et al., 1991) and liposomes containing negatively charged phospholipids (Rigotti et al., 1995).

Until now, it has been considered that the hepatic uptake of the negatively charged compounds including particles, e.g., phosphatidylserine-containing liposomes, via SRs is through the direct recognition of their negative charge (Kobzik, 1995). However, our previous study indicated that in addition to the surface negative charge, some serum proteins associated on the surface also play an important role in the SRs-mediated hepatic uptake of polystyrene nanospheres with the size of 50 nm (NS-50) which had surface negative charge (Furumoto et al., 2004). Therefore, it is important to identify serum proteins that are involved in the SRs-mediated hepatic uptake of negatively charged particles.

Fetuin and its human homologue (α_2 -HS-glycoprotein) are acidic negative acute-phase glycoproteins (Lebreton et al., 1979; Green et al., 1988; Naseem et al., 2003). The normal serum level in adults is 0.3–0.6 mg/ml and falls significantly (30–50%) during injury and infection (Wang et al., 1998). Hepatocytes are the principal cell source of circulating fetuin (Dziegielewska et al., 1996). Although the biological roles of fetuin are not fully understood, there is accumulating knowledge on the function of this protein and it has been reported that fetuin strongly enhances phagocytosis of bacteria, DNA and apoptotic cells by peripheral

* Corresponding author. Tel.: +81 86 251 7948; fax: +81 86 251 7926.
E-mail address: kimura@pharm.okayama-u.ac.jp (T. Kimura).

blood cells such as monocytes, macrophages and dendritic cells (DC) (Lewis and Andre, 1980, 1981; Thiele et al., 2003).

In this study, therefore, we focused on fetuin and tried to evaluate its possible involvement in the SRs-mediated hepatic uptake of NS-50 in rats.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly inosinic acid (poly I), poly cytidylic acid (poly C) and bovine fetuin were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). Bovine serum albumin (BSA) was purchased from Iwai Chemical Company (Tokyo, Japan). Goat anti-rat/mouse class A scavenger receptor (SR-A) antibody (A-20), goat anti-rat villin antibody (C-19) and goat anti-rat/mouse fetuin antibody (F-20) were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA). All other chemicals were of the finest reagent grade available.

2.2. Nanospheres

Monodispersed, non-ionized polystyrene nanospheres (NS-50) covalently linked with fluorescein isothiocyanate, 50 nm in diameter, were used as received (Polysciences, Warrington, PA, USA). For pre-coating of NS-50 with fetuin or BSA, the suspension of NS-50 was incubated with an initial concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$ fetuin or BSA (NS-50:protein = 5:1, w/w) at 37 °C for 5 min in Krebs-Ringer bicarbonate (KRB) buffer (pH 7.4). The amount of coated fetuin (234.8 \pm 47.3 $\mu\text{g/mg}$ NS-50) or BSA (198.9 \pm 29.1 $\mu\text{g/mg}$ NS-50) was constant for at least 1 h in KRB solution (pH 7.4) at 37 °C, except for the uptake experiments described in Fig. 4 where various amounts of fetuin are present in the medium. Zeta-potential was determined in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) by an electrophoretic light scattering spectrometer (ELS-6000, Otsuka Electronics, Osaka, Japan) and obtained values were -21.8 ± 2.3 , -26.6 ± 1.3 and -7.6 ± 1.6 mV for NS-50, NS-50 pre-coated with fetuin and NS-50 pre-coated with BSA, respectively.

2.3. Animals

Male Wistar rats (Japan SLC, Hamamatsu, Japan), maintained at 25 °C and 55% of humidity, were allowed to free access to standard laboratory chow (Clea Japan, Tokyo) and water prior to the experiments. Rats weighing 220–240 g were randomly assigned to each experimental group. Our investigations were performed after approval by our local ethical committee at Okayama University and in accordance with "Interdisciplinary Principles and Guidelines of the Use of Animals in Research".

2.4. Western blot analysis

After nanospheres were incubated in KRB buffer containing rat serum (5%, v/v, pH 7.4) for 20 min at 37 °C, nanospheres were separated by ultra centrifugation using a Beckman Optima XL-90 (Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA) at

40,000 \times g for 15 min at 4 °C. After solubilizing with 10% SDS solution, the resulting protein solution was subjected to SDS-PAGE using 12.5% polyacrylamide gel (Ready Gel, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and blotted onto cellulose nitrate membranes (Advantec, Tokyo). For the detection of fetuin, goat anti-rat/mouse fetuin antibody (F-20) and the peroxidase-linked anti-goat IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) were used at 1:1000 or 1:5000 dilution in blocking buffer, respectively. The protein band was visualized with the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK).

2.5. In vivo disposition experiments

In vivo disposition experiments were examined according to the method reported previously (Furumoto et al., 2004). In brief, rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (20 mg/kg). At 5 min after injection of poly I or poly C (10 mg/kg), NS-50-fetuin (12.5 mg/kg) was injected from a femoral vein. Blood samples (0.2 ml) were withdrawn from the jugular vein at fixed time periods. At 1 h after the intravenous injection of NS-50-fetuin, liver, spleen, lung and kidney were excised, rinsed with saline, and weighed. Blood concentrations of NS-50-fetuin (C_b) versus time curves were analyzed by Eq. (1) using the non-linear least-square regression program MULTI (Yamaoka et al., 1981):

$$C_b = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t} \quad (1)$$

The area under the blood concentration–time curve from 0 to time t (AUC_0^t) was calculated by Eq. (2):

$$AUC_0^t = \int_0^t C_b dt \quad (2)$$

Total body clearance (CL_{total}) and tissue uptake clearance (CL_{tissue}) were calculated by Eqs. (3) and (4), respectively:

$$CL_{\text{total}} = \frac{\text{dose}}{AUC_0^t} \quad (t = \infty) \quad (3)$$

$$CL_{\text{tissue}} = \frac{X_{\text{tissue}}^t}{AUC_0^t} \quad (t = 60 \text{ min}) \quad (4)$$

where X_{tissue}^t represents the amount of NS-50-fetuin in a tissue at time t .

2.6. Liver perfusion experiments

Liver perfusion was carried out with KRB buffer (pH 7.4) following the recirculating perfusion procedure as reported previously (Furumoto et al., 2002). Nanospheres, an initial concentration of 50 $\mu\text{g/ml}$, were recirculated in the isolated liver preparation at a flow rate of 13.0 ml/min. In our preliminary experiments, the viability of the liver was checked by the glutamic–oxaloacetic transaminase (GOT) activity in the outflow, confirming that the viability of liver was maintained throughout the perfusion study. The perfusion was performed for 50 min and the perfusate concentration of nanospheres in

the reservoir was fluorometrically determined (excitation maximum 458 nm, emission maximum 540 nm) (RF-540 Fluorescent Spectrometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) until 50 min. Hepatic clearance (CL_h) was calculated according to the following equation:

$$CL_h = \frac{X_{\text{liver}}^t}{AUC_0^t} \quad (t = 50 \text{ min}) \quad (5)$$

where X_{liver}^t and AUC_0^t mean the amount of nanospheres in the liver at time t and the area under the concentration of nanospheres in the perfusate versus time curve from 0 to time t , respectively. X_{liver}^t was estimated by subtracting the remaining amount of nanospheres in the reservoir from the total amount of dose. AUC_0^t was calculated according to the trapezoidal rule.

Pre-treatment of the perfused liver with trypsin was performed by following the method reported by Furumoto et al. (2002). The effect of poly I, an inhibitor of SRs (Peiser and Gordon, 2001), or poly C, a negative control (Peiser and Gordon, 2001), was examined according to the method previously reported (Furumoto et al., 2002).

2.7. Cell isolation and culture

Rat hepatocytes and Kupffer cells were isolated after collagenase perfusion following the conventional procedures (Knook and Sleyster, 1976). Then, the freshly isolated hepatocytes were cultured in collagen-coated 24-well plates (ASAHI Techno Glass, Tokyo) in Williams E medium (Sigma, USA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), insulin (10^{-7} M), dexamethazone (10^{-7} M), penicillin G (100 U/ml), streptomycin (100 μ g/ml) and gentamycin (50 μ g/ml). The isolated hepatocytes were maintained in a humidified 5% $CO_2/95\%$ air atmosphere at 37 °C. The medium was refreshed after 6 h and thereafter every 24 h. Experiments with isolated hepatocytes were performed on the third day after isolation of the cells. Kupffer cells were grown in 24-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS, penicillin G (100 U/ml) and streptomycin (100 μ g/ml). After the incubation for 2 h at 37 °C and 5% $CO_2/95\%$ air atmosphere, the medium was refreshed and then cultured at 37 °C and 5% $CO_2/95\%$ air atmosphere for 48 h before experiments.

2.8. Uptake experiments

After washing cultured rat hepatocytes and Kupffer cells with FBS-free medium, uptake studies were started by adding nanospheres (100 μ g/ml) suspended with phosphate buffered saline (PBS) (pH 7.4) to the cells. In the case of trypsin pre-treatment study, Kupffer cells and hepatocytes were incubated for 30 min at 37 °C with PBS containing 1 and 10 μ g/ml trypsin, respectively, before the addition of nanospheres. In the case of poly I- or anti-SR-A antibody-treatment study, poly I (50 μ g/ml), anti-SR-A antibody (1 μ g/ml) or anti-villin antibody (1 μ g/ml) as a negative control was simultaneously added to Kupffer cells together with nanospheres. The incubation with nanospheres for the uptake was performed at 37 °C for 6 or 1 h for hepatocytes

or Kupffer cells, respectively. Then, the cells were washed with PBS.

2.9. Determination of blood, tissue and cell concentrations of particles

Concentrations of NS-50-fetuin were determined by following the method described in our previous report (Furumoto et al., 2002).

In the case of tissue and blood, tissue or blood samples were homogenized with the equivalent volume of distilled water and then frozen, thawed and mechanically shaken. This procedure was repeated three times to completely solubilize cells. In the case of the measuring the amount of NS-50-fetuin in hepatocytes and Kupffer cells, cells washed with PBS were first solubilized with 10% SDS solution for 12 h.

Then, solubilized samples were lyophilized over 36 h, and the resulting dried samples were re-suspended in accurately measured volume of chloroform and mechanically shaken for 18 h. After the resulting suspension was filtered through a 0.22 μ m solvent-resistant membrane filter (Millex HV Milopore, Bedford, MA, USA), the fluorescence of the filtrate (excitation wavelength 458 nm, emission wavelength 540 nm) was fluorometrically determined (RF-540 Fluorescent Spectrometer). The extraction of nanospheres into chloroform from the cells was almost complete in the presence of biological substances, but the standard curve was prepared to more precisely estimate their amounts in the biological specimen. The squared correlation coefficient for each standard curve was over 0.995.

2.10. Statistical analysis

Results are expressed as the mean \pm S.D. Analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical significance of differences among groups. Statistical significance was evaluated by using Student's *t*-test or Dunnett's test for the single or multiple comparisons of experimental groups, respectively.

3. Results

To confirm the adsorption of fetuin on the surface of NS-50 in the blood circulation, Western blot analysis was performed for proteins adsorbed on NS-50 after incubation with rat serum. After incubation with rat serum, a variety of serum proteins adsorbed onto the surface of NS-50 (Fig. 1A), but fetuin was certainly one of the serum proteins associated on the surface of NS-50 (Fig. 1B).

To investigate the role of surface associated fetuin on the hepatic disposition characteristics of NS-50, we prepared NS-50 pre-coated with fetuin (NS-50-fetuin) and evaluated whether scavenger receptor-mediated uptake is involved in the hepatic disposition of NS-50-fetuin in vivo. Fig. 2 shows the effect of pre-injection of poly inosinic acid (poly I), an inhibitor of SRs, or poly cytidylic acid (poly C), used as a negative control, on the in vivo disposition of NS-50-fetuin after intravenous administration into rats. Pharmacokinetic parameters are summarized in Table 1. Pre-injection of poly I significantly increased the

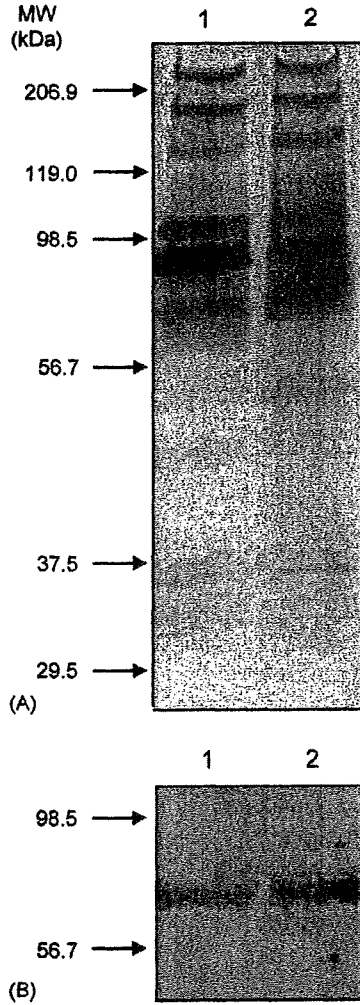


Fig. 1. Silver-stained SDS-PAGE of rat serum proteins adsorbed on the surface of NS-50 (A) and identification of fetuin by Western blot analysis (B). Lane 1, rat serum (loaded proteins A, 1 µg; B, 3 µg); lane 2, NS-50 pre-incubated with rat serum (A, 1 µg; B, 10 µg).

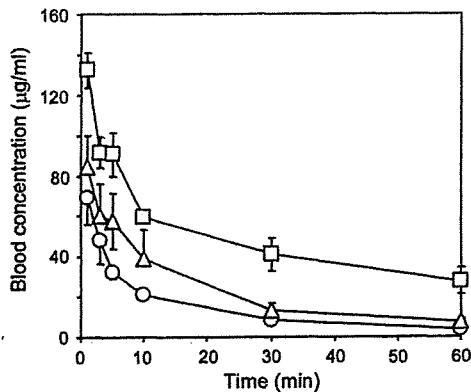


Fig. 2. Blood concentration–time profile of NS-50-fetuin after intravenous administration into rats at a dose of 12.5 mg/kg with or without pre-injection of poly I or poly C. Poly I or poly C was pre-injected at a dose of 10 mg/kg at 5 min before the injection of NS-50-fetuin. Results are expressed as the mean with a bar showing the S.D. ($n=3-6$). Keys: (○) control; (□) pre-injection of poly I; (△) pre-injection of poly C.

Table 1

Pharmacokinetic parameters of NS-50-fetuin after intravenous administration with pre-injection of poly I or poly C

Parameter	NS-50-fetuin	+ Poly I	+ Poly C
AUC ₀ [∞] (µg/ml min)	964 (271)	5346** (1325)	1656 (270)
CL _{total} (ml/min)	3.04 (0.52)	0.49** (0.12)	1.54** (0.26)
V _d (ml)	26.0 (3.56)	16.6 (2.00)	23.0 (6.63)
CL _{liver} (ml/min)	0.81 (0.14)	0.24** (0.04)	0.76 (0.08)
CL _{spleen} (ml/min)	0.042 (0.012)	0.056 (0.008)	0.021* (0.002)
CL _{lung} (ml/min)	0.020 (0.030)	0.002 (0.002)	0.002 (0.004)
CL _{kidney} (ml/min)	0.040 (0.056)	0.000 (0.000)	0.001 (0.001)

Results are expressed as the mean with S.D. values in parentheses ($n=3-6$). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, compared with NS-50-fetuin.

AUC value and decreased the hepatic clearance value of NS-50-fetuin. This was not the case for the pre-injection of poly C where both AUC and hepatic clearance did not significantly change. These results indicate that SRs would be involved in the hepatic disposition of NS-50-fetuin in vivo. However, it is difficult to exclude out the possibility that other serum proteins associated on the NS-50-fetuin are involved in SRs-mediated hepatic uptake in the in vivo situation. We, therefore, performed liver perfusion experiments to more directly assess the possible involvement of SRs-mediated endocytosis in the hepatic uptake of NS-50-fetuin (Fig. 3). The hepatic clearance of NS-50-fetuin significantly reduced to 54% of the control by pre-treatment with poly I, but not with poly C. This was not the case for NS-50 or NS-50 pre-coated with BSA (NS-50-BSA) where poly I did not significantly influence their hepatic disposition. In addition, the pre-treatment of the liver with trypsin significantly reduced the hepatic clearance of NS-50-fetuin to 67% of the control, supporting the hepatic disposition of NS-50-fetuin via a receptor-mediated endocytosis.

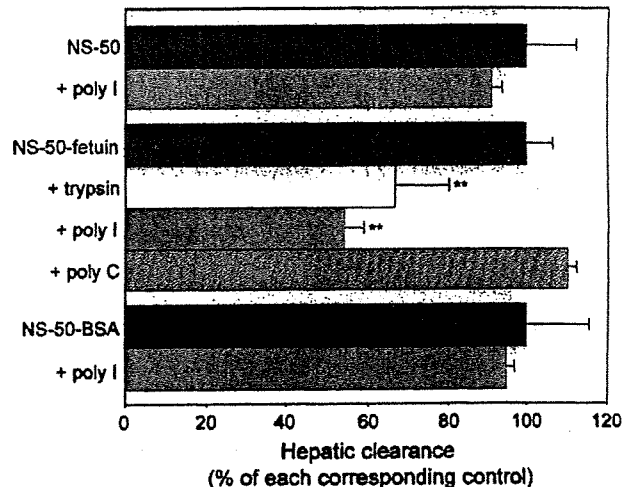


Fig. 3. Involvement of SRs in the hepatic uptake of NS-50-fetuin in the liver perfusion experiments. The prepared isolated liver was perfused with KRB buffer containing 25 µg/ml poly I or poly C before starting the perfusion of NS-50 or NS-50 pre-coated with fetuin or BSA. Results are expressed as the mean with a bar showing the S.D. ($n=3$). ** $p < 0.01$, compared with corresponding control. The values of hepatic clearance for control were 5.77 ± 0.71 , 2.15 ± 0.14 and 2.61 ± 0.41 ml/min for NS-50, NS-50-fetuin and NS-50-BSA, respectively.