

界面活性 TEMPO 誘導体を利用した不均一系重合

(岡山大院環境) ○大浦浩平、久保田潤、小野 努

【1. 緒言】

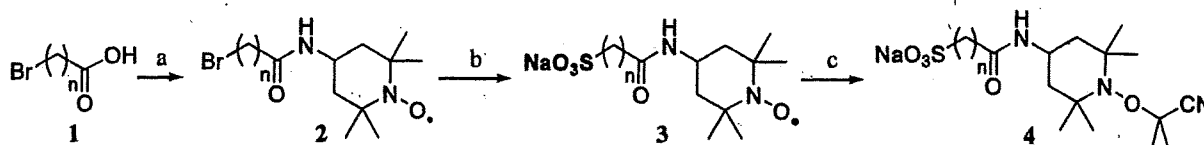
乳化重合やミニエマルション重合などの不均一系重合 [1, 2] により得られる高分子微粒子は、その表面に高分子鎖をグラフトすることで物理的及び化学的特性の付与が可能である。その方法のひとつとして、表面にニトロキンド誘導体のひとつである 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-N-Oxyl (TEMPO) を有する粒子を調製後、表面修飾する方法が考えられる。粒子表面に TEMPO を存在させるには、微粒子調製時に TEMPO が油水界面に吸着し、界面で重合が進行する必要がある。そうすることで、粒子表面の官能基に TEMPO を修飾するという既存の 2 ステップの方法に比べ、1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

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

【2. 実験】

2.1 界面活性 TEMPO 誘導体の合成 (Scheme 1)

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



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

2.2 界面張力測定

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

2.3 不均一系重合

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

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

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

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

【3. 結果と考察】

3.1 界面張力測定

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

3.2 不均一系重合

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

【参考文献】

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

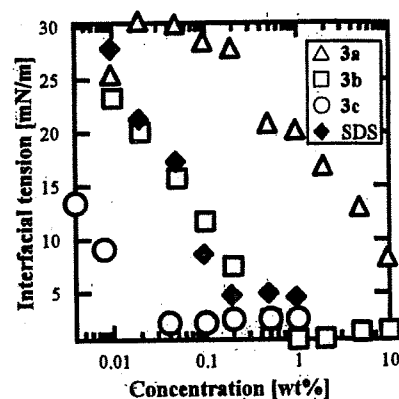


Fig. 1. Interfacial tension between toluene and water containing TEMPO derivatives

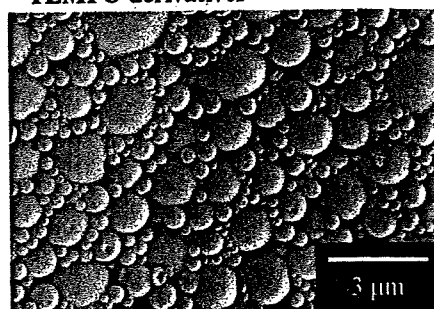


Fig. 2. SEM image of polystyrene particles [4c (1.6 mg), water (8.0 g), styrene (228 mg), hexadecane (12 mg); temperature (125 °C); pressure (0.4 MPa); time (24 h); homogenization at 10,000 rpm was carried out for 1.5 min. before polymerization]

水溶性高分子による相分離を利用した複合エマルションの調製

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

1. 緒言

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

2. 実験

2.1. 高分子水溶液組成が内部構造に与える影響

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

2.2. 複合液滴の単分散化及び外水相厚みの制御

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

3. 結果及び考察

3.1. 高分子水溶液組成が内部構造に与える影響

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

な W/W/O 型複合エマルションが得られた。

3.2. 複合液滴の単分散化及び外水相厚みの制御

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

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

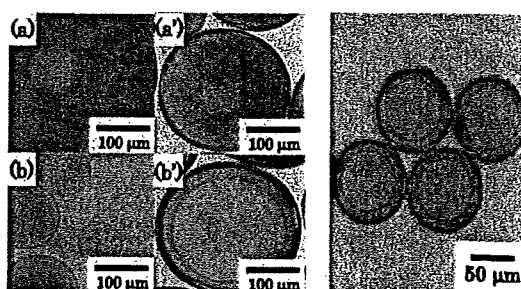


Fig. 1 Optical micrographs of W/W emulsion (a, b) and W/W/O emulsion (a', b') using an agitator: (a, a') 22.5 wt% PEO, 7.5 wt% Dex, (b, b') 7.5 wt% PEO, 22.5 wt% Dex

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

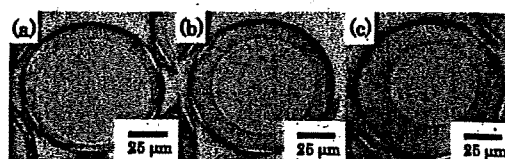


Fig. 3 Optical micrographs of W/W/O emulsion prepared by a microreactor: (a) 6.6 wt% PEO, 12.1 wt% Dex, (b) 7.7 wt% PEO, 9.7 wt% Dex, (c) 9.0 wt% PEO, 7.0 wt% Dex

引用文献

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

*Tel&Fax: 086-251-8908

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

ポルフィリン内封ナノ粒子の調製と光線力学的治療への応用

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

1. 緒言

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

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

2. 実験

2.1) PLE の合成

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

2.2) ポルフィリン内封ナノ粒子の調製

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

2.3) ポルフィリン内封ナノ粒子の感光性評価

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

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

3. 実験結果及び考察

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

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

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

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

Table 1 Characteristics of PLE

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

MeO-PEO: $M_w = 4,400$

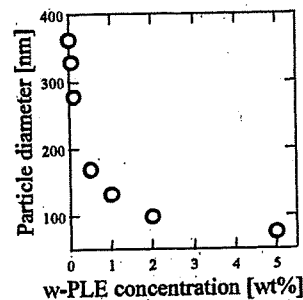


Fig. 1 Effect of w-PLE concentration on the particle diameter of nanoparticles without porphyrin

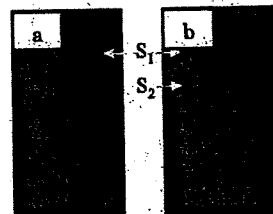


Fig. 2 Photographs of TLC plate under UV light. (a) before irradiation, (b) after irradiation

【参考文献】

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

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

ドキシソルピシン内封 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ピシン (DOX) に対して耐性を示す P-gp 高発現株 (C26/DOX) を樹立し、それにより作成した固形がんモデルマウスにおける 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の評価した結果、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を評価した。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 聡城郎
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の評価した。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.

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, (岡山大院環) (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 エマルジョンを調製した。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 °C) 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 °C 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。

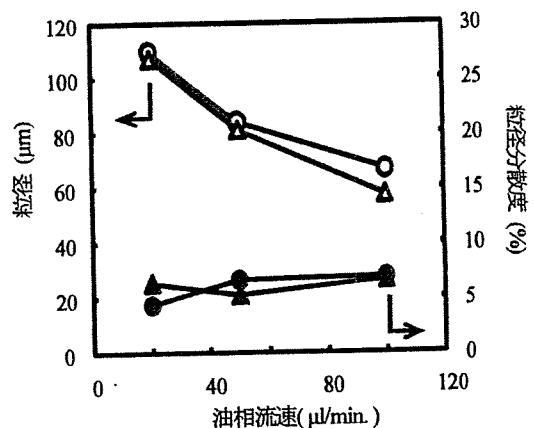


図 1 マイクロリアクターで調製した大腸菌内包アガロースゲル粒子の粒径および粒径分散度におよぼす油相流速の影響(○, ●; 大腸菌内包アガロースゲル粒子, △, ▲; アガロースゲル粒子)

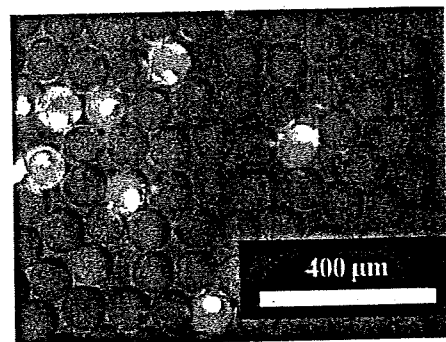


図 2 48 時間培養後 (25 °C) の大腸菌内包アガロースゲル粒子の蛍光顕微鏡写真

*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マイクロスフェアの調製とその形態制御

(岡山大環境理工) ○渡邊 貴一・(岡山大院環) (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 エマルシ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

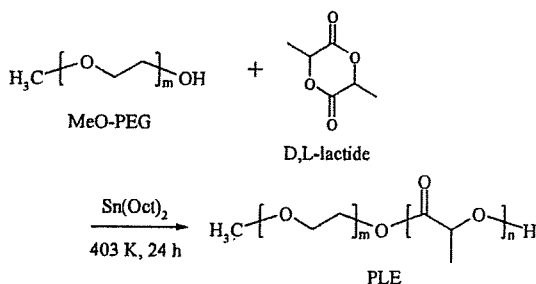


Fig. 1. Synthetic scheme of PLE.

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、 $^1\text{H NMR}$ 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 エマルションを調製した。得られた W/O エマルションを、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 エマルションを調製した。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 $^1\text{H NMR}$ 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 エマルシ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 エマルシ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 エマルシ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 エマルションの合一が、液中乾燥中に進行したことを示唆している。

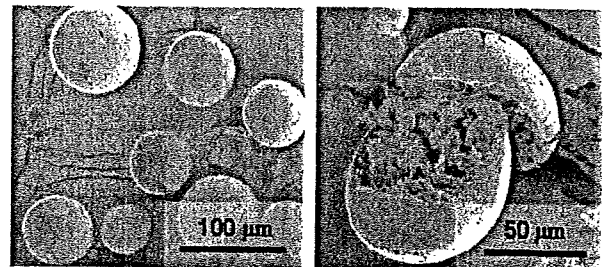


Fig. 2. SEM images of PLE microspheres prepared by solvent evaporation method.

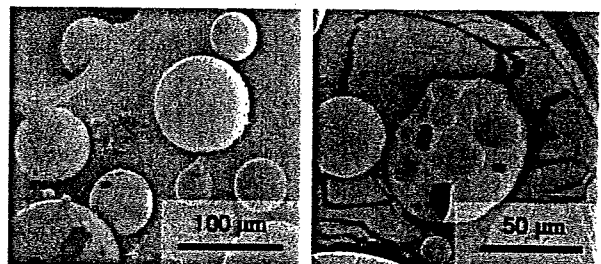


Fig. 3. SEM images of PLA microspheres prepared by solvent evaporation method.

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

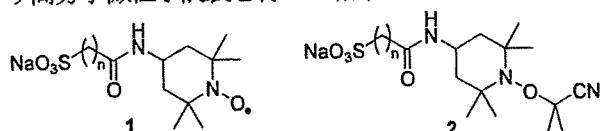
界面活性 TEMPO 誘導体を用いた不均一系重合による高分子微粒子調製

(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。

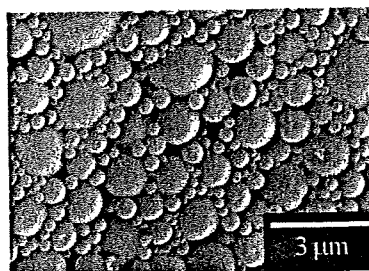


Fig. 1. SEM image of polystyrene particles

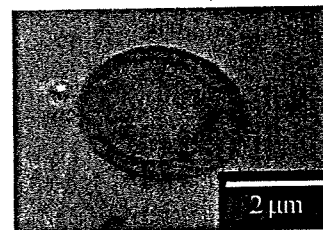


Fig. 2. TEM image of ultrathin section of polystyrene particle

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: tono@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 環境学研究所 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ミクロスフェア

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業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^[1]。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 エマルジ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 W₁/O エマルジョンを調製した。得られた W₁/O エマルジョンを水溶性 PEG-PLA (w-PEG-PLA) を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液に注ぎ、W₁/O/W₂ エマルジョンを調製した。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。

3. 実験結果および考察

Fig. 1, 2 にそれぞれ W₁/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だと思われる。

Fig. 1 より、W₁/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 $M_n = 4,000$

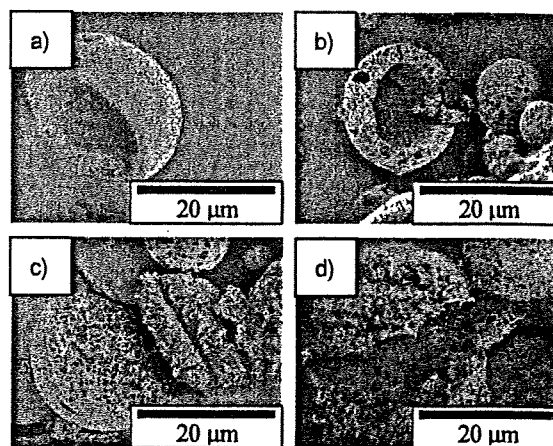


Fig. 1 SEM images of PEG-PLA microspheres [W₁/O (v/v) = a) 0/8, b) 0.1/8, c) 0.3/8, d) 1/8].

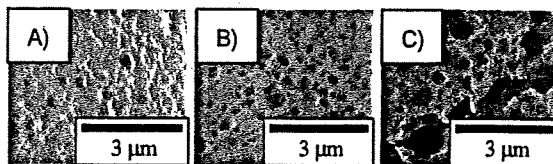


Fig. 2 SEM images of surface morphology of PEG-PLA microspheres prepared at different temperature [A) 20, B) 30, and C) 50 °C].

<参考文献>

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

* TEL/FAX: 086-251-8908

E-mail: tonono@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。

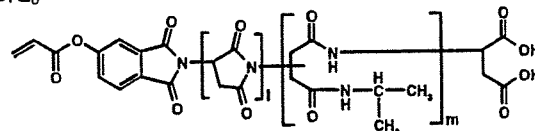


Fig. 1 Chemical structure of API-terminated IPA-PSI

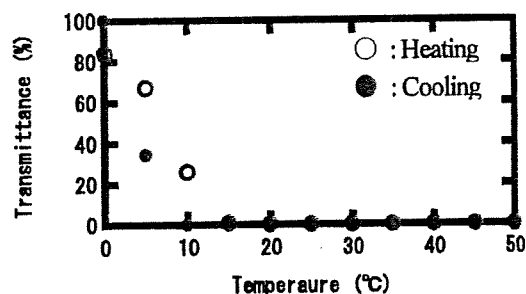


Fig. 2 Effect of temperature on the transmittance of API-terminated IPA-PSI aqueous solution

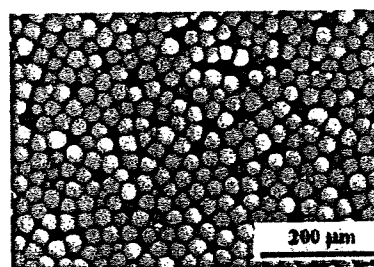


Fig. 3 SEM image of the particles prepared with API-terminated IPA-PSI

*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、二重円筒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-FMC 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、クリーニング後、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-FMC 化を行った。M-FMC 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 Glycerol 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、二重円筒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。

二重円筒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。

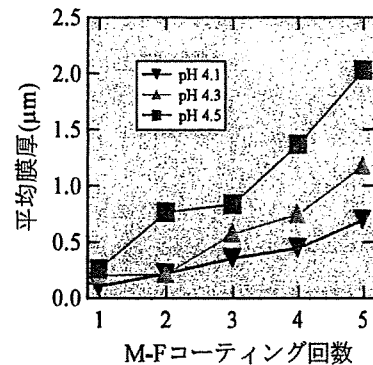


Fig.1 各 pH 条件下におけるカプセル膜厚におよぼす M-F コーティング回数の影響

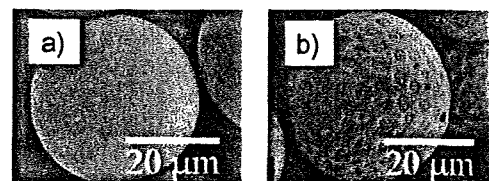


Fig.2 pH 4.5(a)と pH 4.7(b)で調製したカプセル膜表面の SEM 写真

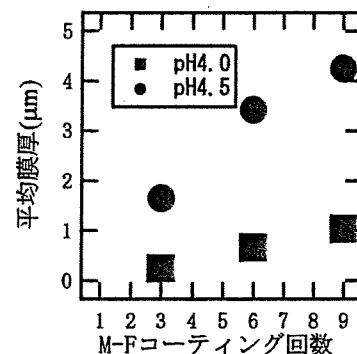


Fig.3 サブミリカプセルのカプセル膜厚におよぼす M-F コーティング回数の影響

*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、マイクロリ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。以上のことから、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