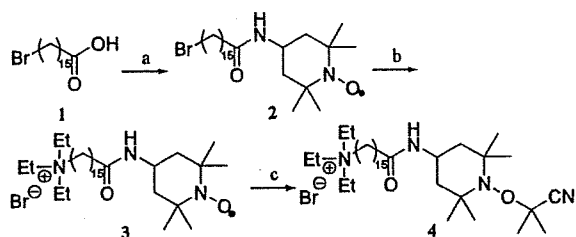


界面活性 TEMPO 誘導体を用いた中空構造をもつ高分子微粒子の調製

(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 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 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、これは液滴界面で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。

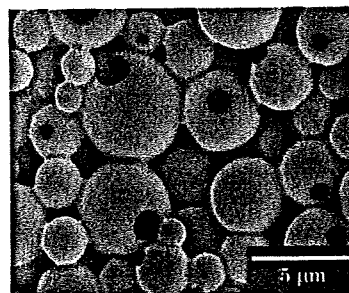


Fig.1. SEM image of microspheres prepared with a cationic TEMPO derivative.

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

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

(岡山大学院環)○(学)岸 佑磨・(正)小野 努*・(正)木村 幸敬

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縮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。

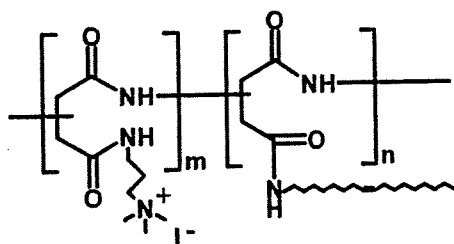


Figure 1. Structure of TMPA-OA-PAsp.

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に、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。

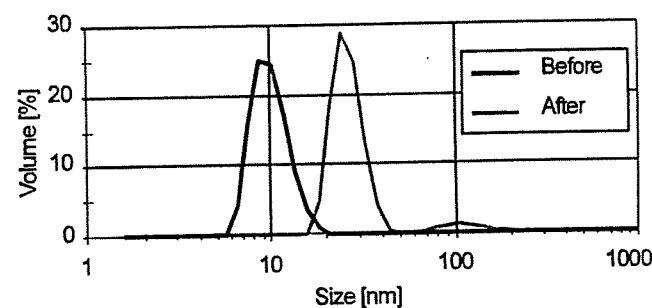


Figure 2. Size distribution of reverse micelles of before and after extraction.

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 ○岩淵草太郎・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、ハイドロフォーブとして Hexadecane、界面活性剤として Polyoxyethylene (10) Nonylphenyl ether、開始剤として ADVN を使い、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

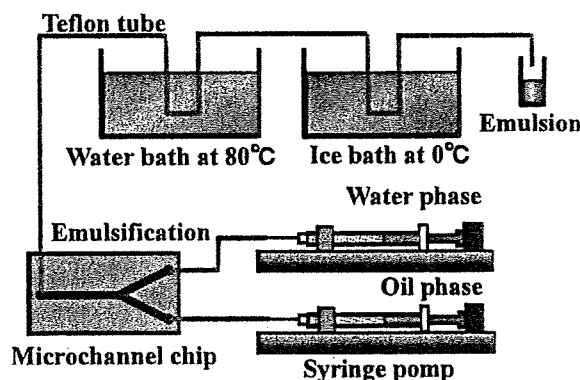


Fig. 1 Schematic illustration of the experimental equipment

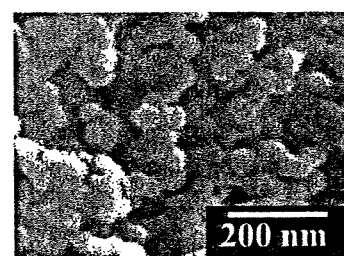


Fig. 2 SEM image of prepared nanospheres.

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

Sotaro IWABUCHI, yuko HISANO, Jun KUBOTA, Tsutomu ONO*, and Yuktaka 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

岡山大院環 ○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)。

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 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 (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 W₁/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、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中空構造に変化する傾向がみられた。

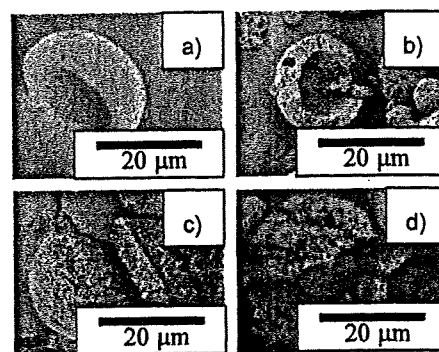


Fig. 1 SEM images of PEG-PLA microspheres [W₁/O (v/v) = a) 0/ 8, b) 0.1/ 8, c) 0.3/ 8, d) 1/ 8].

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-tetramethyl-piperidine-*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。

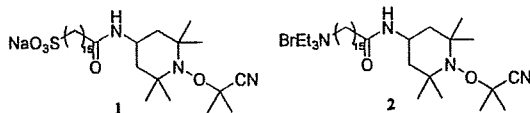


Fig. 1 Interface-active TEMPO derivatives with an anionic (1) and a cationic (2) head group

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。

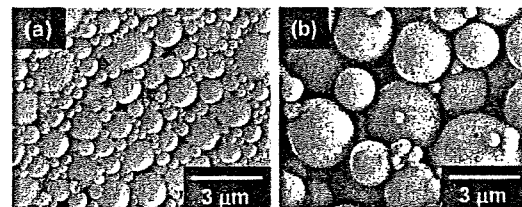


Fig. 2 SEM images of microspheres prepared with an anionic (a) and a cationic (b) TEMPO derivative

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 エマルジ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 D,L-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 を溶解させた酢酸エチル飽和水溶液 (W₂) に注ぎ、W₁/O/W₂ エマルジョンを調製した。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。

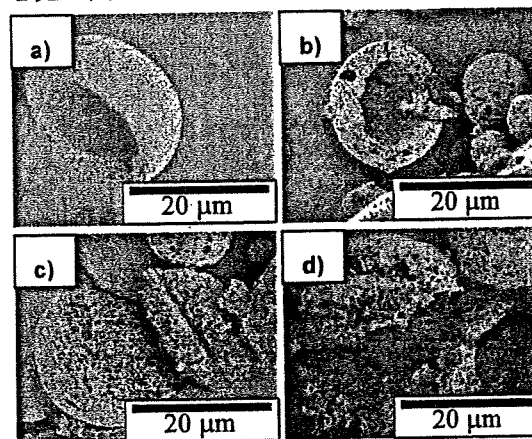


Fig. 1 SEM images of cross-sectional view of PEG-PLA microspheres [W₁/O (v/v) = a) 0/8, b) 0.1/8, c) 0.3/8, d) 1/8].

<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

【結言】

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、光を感受して励起し、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光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。

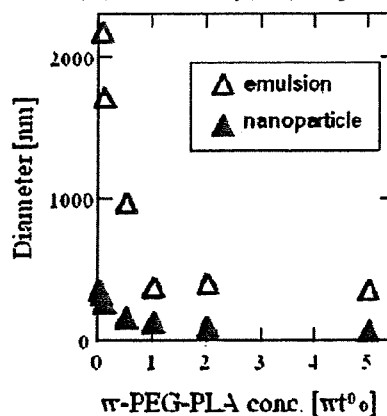


Fig.1 Effect of water-soluble PEG-PLA concentration on the diameter of nanoparticles.

*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。

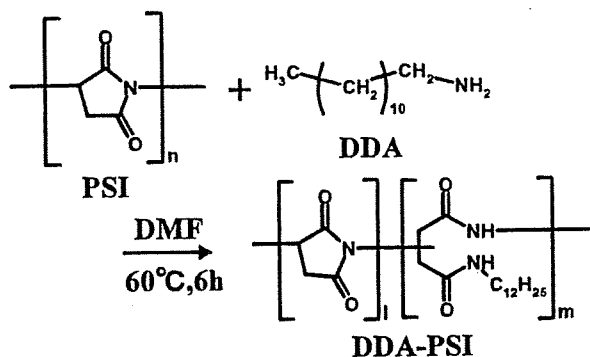


Fig.1 Synthetic scheme of DDA-PSI

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 エマルジョンを調製した。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、洗浄後一晩凍結乾燥した。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、 $\text{DDA}_{60}\text{-PSI}_{40}$ 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 $\text{DDA}_{20}\text{-PSI}_{80}$ および $\text{DDA}_{40}\text{-PSI}_{60}$ 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、 $\text{DDA}_{60}\text{-PSI}_{40}$ 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。

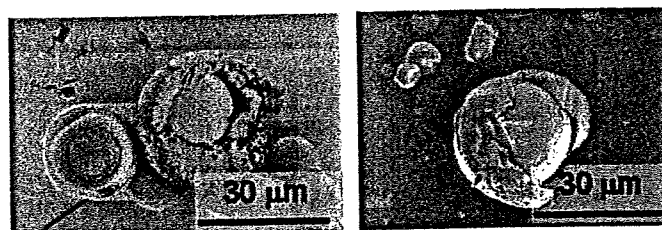


Fig.2 SEM images of particle prepared by solvent evaporation method with PSI and $\text{DDA}_{60}\text{-PSI}_{40}$.

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

(岡山大院環)○(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 Solsperser 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。

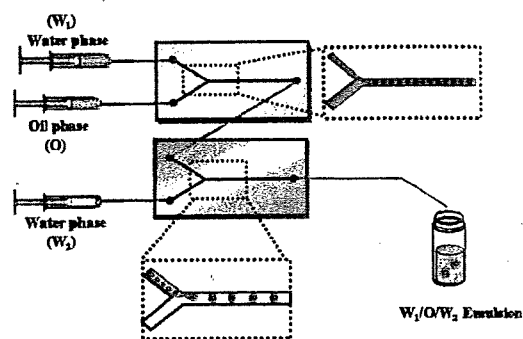


Fig. 1 Schematic illustration of a $W_1/O/W_2$ emulsion preparation device.

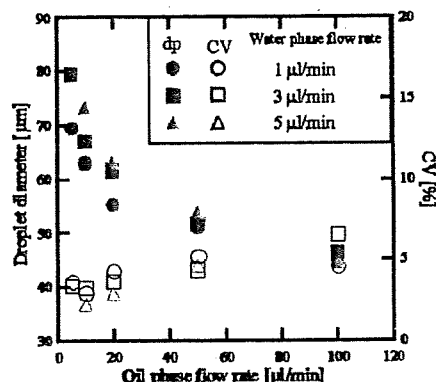


Fig. 2 Effect of flow rate on the droplet diameter and coefficients of variation of W_1/O droplets.

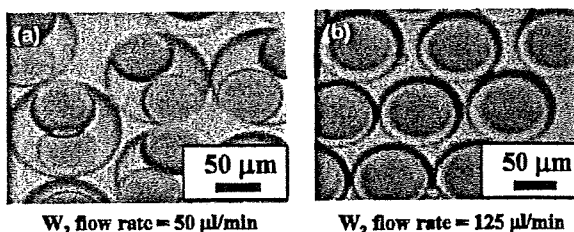


Fig. 3 Images of optical microscopes of $W_1/O/W_2$ droplets: W_2 flow rate = (a) $50 \mu\text{l}/\text{min}$, (b) $125 \mu\text{l}/\text{min}$.

【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。

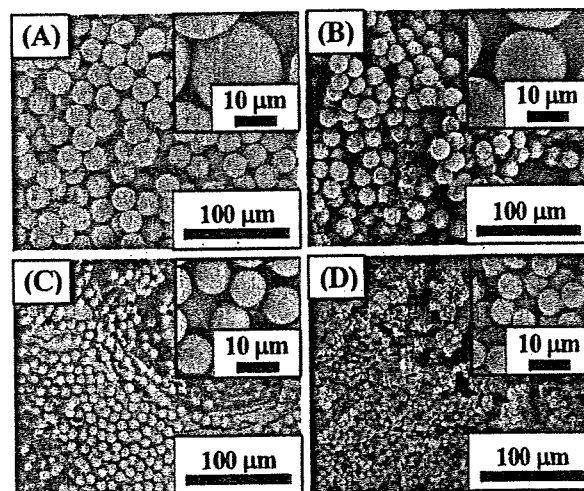


Fig. 1 SEM images of PLA microspheres prepared by changing continuous phase flow rate ((A) 10, (B) 20, (C) 50, (D) 100 $\mu\text{L}/\text{min}$).

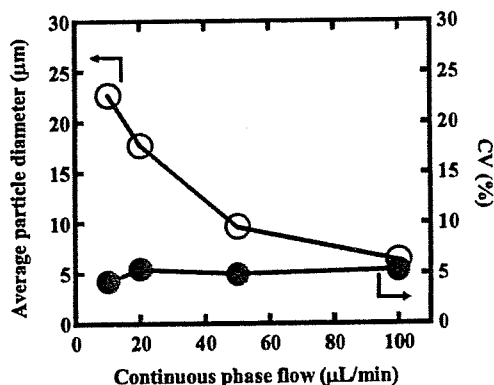


Fig. 2 The effect of continuous phase flow rate on the diameter and the coefficient of variation (CV) of PLA microspheres (○: average particle diameter, ●: CV).

*TEL/FAX: 086-251-8908

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

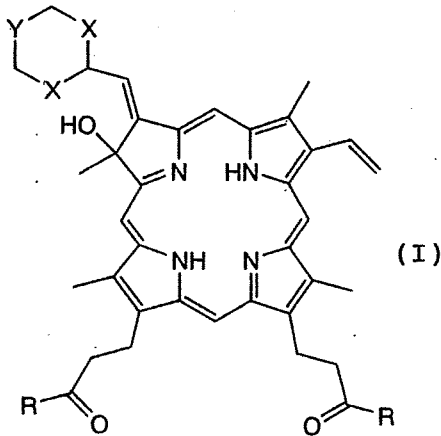
発明の名称 : 皮膚疾患治療剤
 出願番号 : 特願 2008-118187
 出願日 : 2008年(平成20年)4月30日

【書類名】 特許請求の範囲

【請求項1】

次式 (I) :

【化1】



(式中、

Xは、O又はSを表し、

Yは、 $-(CH_2)_n-$ 又は $-(CHOH)-$ を表し、

Rは、 $-OH$ 、 $-O(CH_2)_m CH_3$ 、 $-O(CH_2)_l -OH$ 又は $-S(CH_2)_l -SH$ を表し、

nは、0~10の整数を表し、

mは、0~11の整数を表し、

lは、2~12の整数を表す)

で示されるクロリン誘導体又はその薬理的に許容される塩を有効成分とする光線力学療法 (PDT: Photodynamic Therapy) 用の皮膚疾患治療用剤。

【請求項2】

式 (I) で示されるクロリン誘導体又はその薬理的に許容される塩を製剤重量に対して0.1~20.0重量%含有してなる請求項1に記載の光線力学療法 (PDT) 用の皮膚疾患治療用軟膏剤。

【請求項3】

軟膏基剤が、FAPG (H) 軟膏基剤、FAPG (K) 軟膏基剤、PEG軟膏基剤、PEG-PG軟膏基剤、ワセリン軟膏基剤、SRワセリン軟膏基剤、SRワセリン-I PM軟膏基剤またはプラスチックベース軟膏基剤から選択させるものである請求項4に記載の光線力学療法 (PDT) 用の皮膚疾患治療用軟膏剤。

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年9月4日 (04.09.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/105386 A1

- (51) 国際特許分類:
C07C 229/60 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 31/196 (2006.01) A61P 35/04 (2006.01)
A61K 31/44 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61K 31/505 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01) C07C 311/08 (2006.01)
A61P 3/02 (2006.01) C07D 213/74 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) C07D 213/80 (2006.01)
A61P 19/08 (2006.01) C07D 239/42 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2008/053240
- (22) 国際出願日: 2008年2月26日 (26.02.2008)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2007-048059 2007年2月27日 (27.02.2007) JP
特願2007-246591 2007年9月25日 (25.09.2007) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人 岡山大学 (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION OKAYAMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7008530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 Okayama (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 加来田 博貴 (KAKUTA, Hiroki) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 佐々木 健二 (SASAKI, Kenji) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津

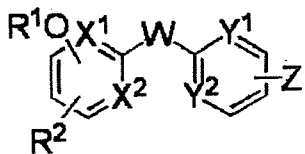
島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 高松 佳代 (TAKAMATSU, Kayo) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 高野 敦史 (TAKANO, Atsushi) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁目1番1号 国立大学法人岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内 Okayama (JP). 薬師寺 信匡 (YAKUSHIJI, Nobumasa) [JP/JP]; 〒7708530 岡山県岡山市津島中一丁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

- (74) 代理人: 庄司 隆, 外 (SHOJI, Takashi et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3-4-1 秋場ビル6階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SA, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: REXINOID COMPOUND HAVING ALKOXY GROUP

(54) 発明の名称: アルコキシ基を有するレキシノイド化合物



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

(57) 要約: 本発明は、核内受容体の一つであるレチノイドX受容体 (RXR) に対し結合し、その作用もしくは拮抗作用を有する、下記的一般式で表される化合物を提供する。(式中、R¹はアルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基からなる群から選択される。R²はアルコキシ基、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基からなる群から選択される。Wは、NR³又はCR³であり、R³は水素、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基及びアリール基から選択される。X¹、Y¹は、CH若しくはNから選択される。X²、Y²は、CH、CR⁴、若しくはNから選択される。R⁴は、アルキル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシ基、ハロゲン、ニトロ基及びアミノ基から選択される。Zは、直接、若しくはアルキル基、アルケニル基、アルキニル基を介したカルボン酸、カルボン酸エステル、又はヒドロキサム酸から選択される。)

WO 2008/105386 A1



(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE,

SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

明 細 書

アルコキシ基を有するレキシノイド化合物

技術分野

- [0001] 本発明は、核内受容体であるレチノイドX受容体 (retinoid X receptor; RXR) に対し、作動性若しくは拮抗性物質として作用する化合物 (以降、「レキシノイド化合物」と称す。) であり、アルコキシ基を有する新規化合物に関する。さらにはその作用に関する。
- [0002] 本出願は、参照によりここに援用される場所の日本出願特願2007-048059号及び特願2007-246591優先権を請求する。

背景技術

- [0003] レチノイドX受容体 (以降、「RXR」と略す。) は、9-cisレチノイン酸やドコサヘキサエン酸 (DHA) を内因性リガンドにすると考えられている、リガンド依存的な転写因子である核内受容体の一つである。その機能は、ホモ二量体として、また種々の核内受容体とヘテロ二量体を形成し発揮される (非特許文献1)。
- [0004] RXRのヘテロ二量体のパートナーとしては、細胞分化や増殖に関与するレチノイン酸受容体 (RAR)、同じく細胞分化や増殖また骨代謝に関与するビタミンD受容体 (VDR)、脂質代謝に関与するペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR)、甲状腺ホルモン受容体のチロイドホルモン受容体 (TR) のほか、薬物代謝酵素で知られるCYP3A4発現に関わるPXRなどがある。従って、RXRの機能とこれら核内受容体の活性発現は密接な関係にあり、RXR機能を制御する作動性もしくは拮抗性物質は、これらのヘテロ二量体の機能を制御することが可能になる (非特許文献2)。
- [0005] 例えば、RAR作動性物質であるAm80 (一般名: タミバロテン: 再発又は難治性の急性前骨髄球性白血病の治療薬: 4-[(5,6,7,8-tetrahydro-5,5,8,8-tetramethyl-2-naphthyl)carbamoyl] benzoic acid: 非特許文献3) は、 3.3×10^{-10} M濃度で単独に存在する場合はほとんど細胞分化誘導作用を示さないのに対し、Am80とRXR作動性物質を併用すると、RXR作動性物質はAm80のシナジストとして機能し、有意な分化誘導作用が見られるようになる (非特許文献4)。このようなRXR作動性物質による核

内受容体ヘテロ二量体に対するシナジスト効果はRARに対してのみならず、RXRとヘテロ二量体を形成するVDRやPPAR等においても見られる。すなわち、このような核内受容体を標的とした脂溶性の高い医薬分子において、その薬物を低容量で用いても効果を発揮させるシナジストとして効果が発揮できる。

[0006] またRXR拮抗性物質は、選択的にRXR含有ヘテロ二量体の機能を抑制することも可能になる。例えば、RXR拮抗性物質であるHX531は、PPAR-RXRヘテロ二量体に対し、その機能を抑制することで、インスリン抵抗性及び肥満を改善することができる。そのため、II型糖尿病に対する医薬応用が期待されている(非特許文献5)。

[0007] RXR作動性物質は、RXRを含有する核内受容体ヘテロ二量体を介した作用に限ることはない。例えば、乳がん治療に用いられるタモキシフェンは、RXRとヘテロ二量体を形成しないエストロゲン受容体(ER)が分子標的であるものの、RXR作動性物質がエストロゲン抵抗性乳がんにおいて、その抵抗性を改善する報告がされている(非特許文献6)。さらに、RXR作動性物質単独もしくはタモキシフェンとの併用による発がん予防効果も報告されている(非特許文献7)。またタキソール抵抗性がんにおける、RXR作動性物質の有効性も報告されている(非特許文献8)。加えて、RXR作動性物質の血管新生抑制作用も報告されている(非特許文献9)。

[0008] また、RXR作動性物質は単独投与においても興味深い生理活性が得られている。たとえばII型糖尿病モデルマウスにRXR作動性物質を投与すると、インスリン抵抗性が改善され血糖値低下が見られることが報告されている(非特許文献10)。

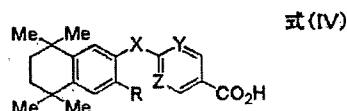
[0009] またRXR作動性物質は、毛根周期に作用し毛髪育成作用があることから、育毛剤としての応用も報告されている(特許文献1)。

[0010] RXR作動性物質及び拮抗性物質は、総じてレキシノイドといわれる。従来開発されているレキシノイド化合物は脂溶性が高いものが多く($\log P > 7$)、体内蓄積、又は胎盤関門通過による催奇形性が不安視された。一般に、レキシノイドは、一般式IIIで表されるようなテトラメチルテトラヒドロナフチル基を特徴とする疎水性部位と、安息香酸等からなる酸性部位を、部分構造に有する化合物である。(非特許文献11、非特許文献12、特許文献2)例えば、Xに $C=CH_2$ 、Rにメチル基、Y及びZにCHを有する化合物LGD1069などが知られる(非特許文献13)が、これらはいずれも脂溶性が高い。

[0011] RXRには3つのサブタイプ(α 、 β 、 γ)があることが知られている(非特許文献14)。しかし、現在サブタイプ選択的リガンドは合成されていない(非特許文献15)。

[0012] 一般式IV:

[化4]



- [0013] 非特許文献1: Science, 290, pp.2140-2144, 2000
 非特許文献2: Cell, 83, pp.841-850, 1995
 非特許文献3: アムノレイク錠2mg<タミバロテン製剤>日本新薬販売添付文書(2005年6月作成)
 非特許文献4: Journal of Medicinal Chemistry, 37, pp.1508-1517, 1994
 非特許文献5: The Journal of Clinical Investigation, 108, pp.1001-1013, 2001
 非特許文献6: Cancer Research, 58, pp.479-484, 1998など
 非特許文献7: Cancer Letters, 201, pp.17-24, 2003
 非特許文献8: Clinical Cancer Research, 10, pp.8656-8664, 2004
 非特許文献9: British Journal of Cancer, 94, pp.654-660, 2006
 非特許文献10: Nature, 386, pp.407-410, 1997
 非特許文献11: Journal of Medicinal Chemistry, 48, pp.5875-5882, 2005
 非特許文献12: Journal of Medicinal Chemistry, 38, pp.3368-3383, 1995
 非特許文献13: Journal of Medicinal Chemistry, 37, pp.2930-2941, 1994
 非特許文献14: Cell, 83, pp.835-839, 1995
 非特許文献15: The Journal of Nutrition, 130, pp.479S-482S, 2000
 非特許文献16: Chemistry & Pharmaceutical Bulletin, 48, pp.1504-1513, 2000
 非特許文献17: Journal of Medicinal Chemistry, 42, pp.742-750, 1999
 特許文献1: 米国特許第5,962,508号公報
 特許文献2: 国際公開パンフレットWO00/66595号公報(複素環カルボン酸誘導体)
 特許文献3: 特開平10-338658号公報(レチノイド作用調節剤)

