

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2020年9月3日(03.09.2020)



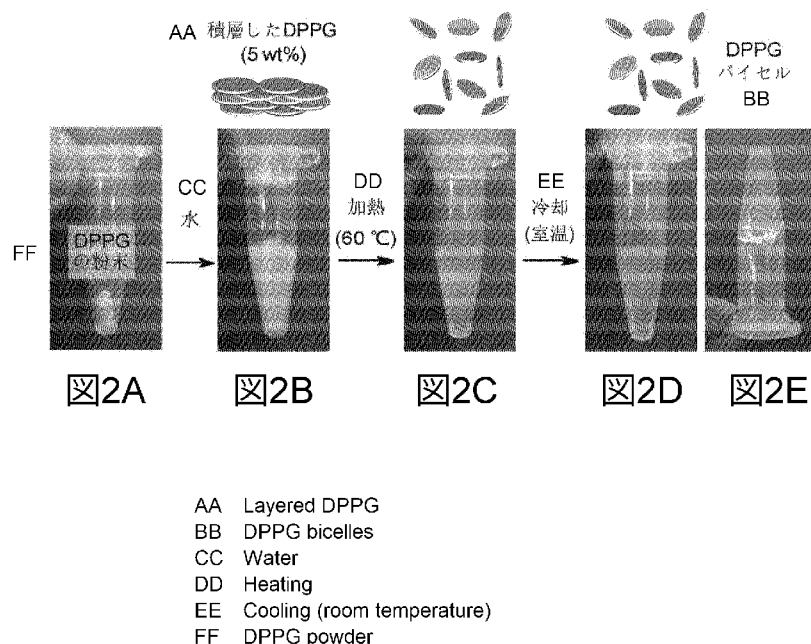
(10) 国際公開番号

WO 2020/175281 A1

- (51) 国際特許分類:
A61Q 19/00 (2006.01) A61K 47/24 (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) G01N 24/08 (2006.01)
A61K 8/55 (2006.01) A61K 31/337 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/006556
- (22) 国際出願日: 2020年2月19日(19.02.2020)
- (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 2019-036902 2019年2月28日(28.02.2019) JP
- (71) 出願人: 国立研究開発法人理化学研究所 (RIKEN) [JP/JP]; 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: 内田 紀之 (UCHIDA Noriyuki); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
ロウ ジウエイ ケニー (LOW Zhi wei kenny); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
石田 康博 (ISHIDA Yasuhiro); 〒3510198 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号 国立研究開発法人理化学研究所内 Saitama (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人牛木国際特許事務所 (USHIKI & ASSOCIATES); 〒1050001 東京都港区虎ノ門一丁目 1 4 番 1 号 郵政福祉琴平ビル 3 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,

(54) Title: BICELLE AND USE THEREOF

(54) 発明の名称: バイセル及びその利用



(57) Abstract: Provided is a bicelle capable of maintaining a disc-shaped structure body even in dilute conditions or in vivo environments, which can be readily prepared, and which have excellent biocompatibility and skin penetrability. The invention relates to a bicelle containing 50% by mass or more of a phospholipid whereof the entirety of the molecule is negatively charged in a region of pH 6 to 8, and relates to a cosmetic, a carrier material, a photonic material, and an NMR alignment agent, which contain the bicelle.

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

- (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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則4. 17に規定する申立て：

- 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4. 17(v)）

添付公開書類：

- 国際調査報告（条約第21条(3)）

(57) 要約：希釈条件や生体内環境でもディスク状の構造体を維持することができ、調製が容易で、生体適合性及び皮膚透過力に優れるバイセルを提供する。 pH6～8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を50質量%以上含む、バイセル、並びに該バイセルを含む化粧料、キャリア材料、フォトニック材料及びNMR配向剤。

明 細 書

発明の名称： バイセル及びその利用

技術分野

[0001] 本発明はバイセル及びバイセルを含む各種材料に関する。

背景技術

[0002] バイセルは、リン脂質二分子膜のディスク状分子集合体である。バイセルの模式図を図1に示す。従来、(1) ディスク状の平面部分1を構成する疎水性基が長い長鎖リン脂質及び(2) ディスク状の屈曲部分2を構成する疎水性基が短い短鎖リン脂質又は界面活性剤、の少なくとも2成分から構成されるバイセルが知られている。

このようなバイセルは最小の脂質二分子膜モデルとして生体膜の研究に利用されている。バイセルは、磁場配向する性質からNMRを用いた膜タンパク質の解析に利用されたり、薬物送達システムのキャリア材料、化粧品及び皮膚外用剤等に利用されている(特許文献1-2、非特許文献1-7)。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特開2011-089946号公報

特許文献2：国際公開第2017/090740号

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Durr, U. H. N. Gildenberg, M.; Ramamoorthy, A. Chem. Rev. 2012, 112, 6054-6074

非特許文献2：Lin, L. et al. RSC Adv. 2016, 6, 79811-79821

非特許文献3：Marcotte, I.; Auger, M. Concepts Magn. Reson. Part A 2005, 24, 17-37

非特許文献4：Isabettini, S. ACS Appl. Mater. Interfaces 2018, 10, 8926-8936

非特許文献5：Barbosa-Barros, L. et al. Small 2012, 8, 807-818

非特許文献6 : Shapiro, R. A.; Brindley, A. J.; Martin, R. W. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 11406-11407

非特許文献7 : Barbosa-Barros, L. et al. Langmuir 2008, 24, 5700-5706

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、従来のバイセルは、(1) 長鎖リン脂質及び(2) 短鎖リン脂質又は界面活性剤の種類に応じて、構成成分の配合量や配合割合などディスク状構造を形成する条件の検討が必要であった。

また、従来の少なくとも2成分で構成されるバイセルの分散液は、希釈すると、その構成成分である(2) 短鎖リン脂質又は界面活性剤が乖離してしまい、ディスク状の構造体を維持することができないという問題があった。同様に、生体内の夾雑物が多い環境などでも(2) 短鎖リン脂質又は界面活性剤が乖離してしまい、ディスク状の構造体を維持することができず、また乖離した界面活性剤は生体に有害なため、使用条件や使用環境に制限があった。

[0006] 従って、本発明の目的は、希釈条件や生体内環境でもディスク状の構造体を維持することができ、調製が容易で、生体適合性及び皮膚透過力に優れるバイセルを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究した結果、下記のバイセルが上述した課題を解決できることを見出し、本発明を完成した。

即ち、本発明は、次の発明を提供するものである。

< 1 >

pH6~8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を50質量%以上含む、バイセル。

< 2 >

前記リン脂質が、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルイノシトールから選ばれる一種以上

のリン脂質である＜1＞に記載のバイセル。

＜3＞

平面部分の長径が10nm～10 μ mである＜1＞又は＜2＞に記載のバイセル。

＜4＞

＜1＞～＜3＞のいずれか1項に記載のバイセルを含む、化粧品。

＜5＞

＜1＞～＜3＞のいずれか1項に記載のバイセルを含む、キャリア材料。

＜6＞

＜1＞～＜3＞のいずれか1項に記載のバイセルを含む、フォトニック材料。

＜7＞

＜1＞～＜3＞のいずれか1項に記載のバイセルを含む、NMR配向剤。

＜8＞

下記工程1及び工程2を有する方法により製造することを特徴とする、＜1＞～＜3＞のいずれか1項に記載のバイセルの製造方法。

〈工程1〉

pH6～8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を、2質量%以上の濃度で、前記リン脂質の相転移温度未満の温度で、水系分散液に分散する工程

〈工程2〉

前記リン脂質の水系分散液を、前記リン脂質の相転移温度以上の温度に加熱する工程

発明の効果

[0008] 本発明のバイセルは、希釈条件や生体内環境でもディスク状の構造体を維持することができ、調製が容易で、経皮透過力に優れる。また、本発明のバイセルは分散液中の濃度に応じて異なる構造色を呈する。従って、本発明のバイセルは、化粧品、フォトニック材料、キャリア材料及びNMR配向剤等に有用である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]バイセルの模式図を表す。

[図2]実施例1のDPPGバイセル分散液の調製手順を表す図である。

[図3]実施例及び比較例で調製した各バイセルの ^{31}P NMRのスペクトルである。

[図4]実施例1のDPPGバイセルのTEM画像である。

[図5]実施例1のDPPGバイセルの濃度を变化した場合（図5 A）及び分散液中の食塩濃度を变化した場合（図5 B）の ^{31}P NMRのスペクトルである。

[図6]実施例1のDPPGバイセルのSAXS解析結果を表す図である。

[図7]実施例1のDPPGバイセルに所定時間超音波処理した場合のDLS測定結果（図7 A）及びSAXS解析結果（図7 B）を表す図である。

[図8]蛍光ラベルしたパクリタキセルを内包したDPPGバイセルの写真（図8 A）及びSAXS解析結果（図8 B）を表す図である。

[図9]蛍光ラベルしたDPPGバイセルの経皮浸透試験における概念図（図9 A、B）及び投与時間に対する透過量を示したグラフ（図9 C）である。

[図10]蛍光ラベルしたDPPGバイセルの経皮浸透試験における皮膚組織中への集積量を示したグラフである。

[図11]経皮浸透試験において皮膚組織を透過した透過物のSAXS解析結果を表す図である。

[図12]実施例1のDPPGバイセル及び比較用のDMPGミセルのがん細胞に対する細胞毒性試験の結果を表す図である。

[図13]実施例1のDPPGバイセルの各濃度における吸収スペクトル及び分散液の写真である。

[図14]磁場配向後の実施例1のDPPGバイセルの各濃度における吸収スペクトル及び分散液の写真である。

[図15]実施例1のDPPGバイセルの各温度における2D SAXS解析結果を表す図である。

[図16]実施例1のDPPGバイセルの温度変化させた場合の吸収スペクトルの变化を表す図である。

[図17]実施例1のDPPGバイセルをアクリルアミドゲルに包埋したゲルの写真である。

[図18]実施例1のDPPGバイセルをアクリルアミドゲルに包埋したゲルの温度を変化させた場合のゲルの写真（図18A）及び吸収スペクトル（図18B）である。

[図19]実施例1のDPPGバイセルの写真（図19B）及びDPPGベシクルの写真（図19A）である。

発明を実施するための形態

[0010] 以下本発明のバイセルについて詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。また、本発明において「室温」とは周囲環境温度をいう。

[バイセル]

本発明のバイセルは、pH6～8の領域で分子全体が負に帯電しているリン脂質を50質量%以上含む。一実施形態においては、バイセルの平面部分及びバイセルの屈曲部分（周縁部）のいずれも当該リン脂質を含んでいる。

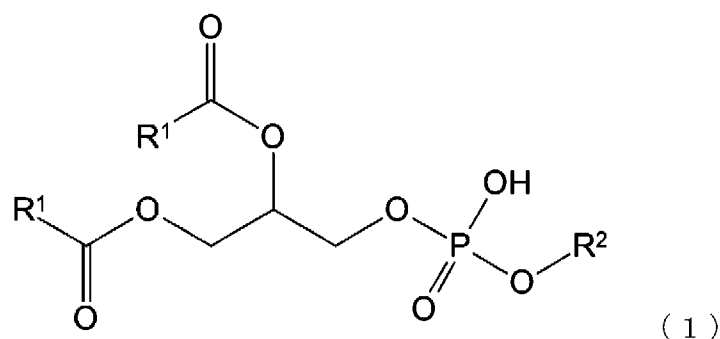
前記リン脂質のバイセル中の含有量は50質量%以上であり、70～100質量%であることが好ましく、90～100質量%であることがより好ましく、95～100質量%であることが更に好ましく、100質量%であることが特に好ましい。

バイセル中に含まれるリン脂質は1種類であってもよいし複数種類であってもよい。

本発明のバイセルは、前記リン脂質を主成分とするものであり、調製が容易であり、希釈した場合等でもディスク状の構造体を維持することができる。また、本発明のバイセルは、 Na^+ 、 K^+ 、 NH_4^+ 、 Li^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、テトラメチルアンモニウム（ Me_4N^+ ）、テトラエチルアンモニウム（ Et_4N^+ ）、テトラプロピルアンモニウム（ Pr_4N^+ ）、テトラブチルアンモニウム（ Bu_4N^+ ）、トリスヒドロキシメチルアミノメタンイオン（ Tris ）等の対イオンを有していてもよい。

[0011] pH6～8の領域で分子全体が負に帯電しているリン脂質は、pH6～8の領域で陰イオン性の親水基を有するアニオン性のリン脂質であり、例えば、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジリノシトール等が挙げられ、これらを1種単独で用いても2種以上を用いてもよい。また、該リン脂質は、バイセルに所望の機能性を付与するため置換基（蛍光ラベル化剤、がん細胞表面等に存在する標的分子に対して結合するリガンド分子、薬剤分子等）を有していてもよい。前記リン脂質として、例えば、下記一般式（1）で表される化合物又はその塩（以下、塩も含めて「一般式（1）で表される化合物」という場合がある）が挙げられる。

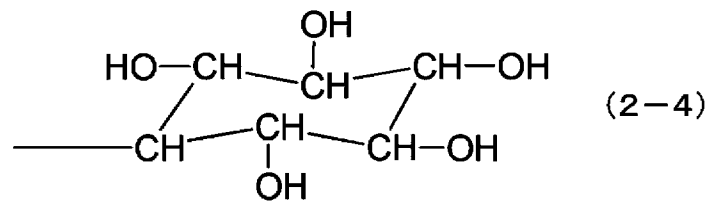
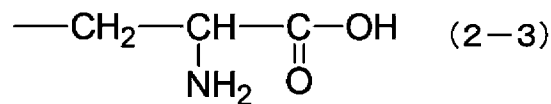
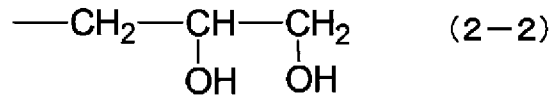
[0012] [化1]



[0013] 一般式（1）中、R¹は互いに独立にアルキル基を示す。R¹としては、炭素数10～20の直鎖のアルキル基が好ましく、具体的には、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基及びエイコシル基等が挙げられる。これらのうち、室温でバイセルを調製する場合、R¹としては、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基及びエイコシル基が好ましく、さらに入手のしやすさの面から、ペンタデシル基及びヘプタデシル基がより好ましい。

[0014] 一般式（1）中、R²は下記式（2-1）～（2-4）で表される基から選ばれるいずれかの基を示す。

[化2]



[0015] 上記一般式（１）において、水素原子は置換基により置換されていてもよい。置換基としては、ハロゲン原子、炭素数１～４のアルコキシ基や、蛍光分子や薬剤分子を有する基等が挙げられる。

[0016] 一般式（１）で表される化合物の具体例として、以下の化合物が挙げられる。

ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG；相転移温度 4 1℃）

ジステアロイルホスファチジルグリセロール（DSPG；相転移温度 5 5℃）

ジパルミトイルホスファチジルセリン（DPPS；相転移温度 5 4℃）

ジパルミトイルホスファチジン酸（DPPA；相転移温度 6 5℃）

[0017] 一般式（１）で表される化合物には、上記例示した化合物のナトリウム塩、カリウム塩などの金属塩、及びアンモニウム塩などの有機塩も含まれる。

一般式（１）で表される化合物は、１種でも単独で用いても、異なる２種以上を組み合わせ用いてもよい。

[0018] 本発明のバイセルは、前記リン脂質以外の化合物を含んでもよい。前記リン脂質以外の化合物としては、前記リン脂質以外のリン脂質、コレステロールといった疎水性分子等が挙げられるが、これらのバイセル中の含有量は 0～50 質量％であり、好ましくは 0～30 質量％であり、より好ましくは 0

～10質量%であり、更に好ましくは0～5質量%である。

また、本発明のバイセルに機能性を付与するため、前記リン脂質以外の化合物には、蛍光ラベル化剤、リガンド、薬剤分子等を結合したものをを用いてもよい。

[0019] 本発明において、バイセルの大きさとは、ディスク状の平面部分の長径をいい、透過型電子顕微鏡観察で測定される値をいう。本発明のバイセルの大きさは調製条件によっても異なるが、通常10nm～10 μ m程である。また、動的光散乱法によって測定した粒径（体積基準の頻度分布において累積頻度が50%となる粒径）から、バイセルの大きさを測定することもできる。例えば、バイセル分散液に、超音波処理を施した場合、超音波処理時間が長いほどバイセルの大きさが小さくなることが動的光散乱法によって測定した粒径から把握される。

また、本発明において、バイセルの厚さは通常2～6nm程である。

[0020] [バイセルの製造方法]

本発明のバイセルは、以下の工程1及び工程2を有する方法により製造することができる。

[0021] 〈工程1〉

工程1では、pH6～8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を、2質量%以上の濃度で、前記リン脂質の相転移温度未満の温度で、水系分散液に分散する。

[0022] 前記リン脂質の、工程1の水系分散液における濃度は、2～10質量%であり、好ましくは3～7質量%、より好ましくは5質量%である。本発明のバイセルが前記リン脂質以外の化合物を含む場合も、工程1における水系分散液における混合物の濃度は、前記の範囲とすることが好ましい。

[0023] 工程1において水分散媒を調製する際の温度は、前記リン脂質の相転移温度未満の温度であり、好ましくは、室温である。

[0024] 工程1における分散媒は、水系分散液であり、例えば、水（脱イオン水、蒸留水、純水等）及びpH6～8に調整可能な、リン酸緩衝液、クエン酸リン酸

緩衝液、トリス塩酸緩衝液、トリスEDTA緩衝液、HEPES緩衝液等の各種緩衝液が挙げられる。

[0025] 〈工程2〉

工程2では、工程1で調製した水系分散液を、前記リン脂質の相転移温度以上の温度に加熱する。前記リン脂質を2種以上用いる場合は、加熱温度を最も相転移温度が高い化合物の相転移温度以上とする。加熱する温度は、前記リン脂質の相転移温度より2℃以上30℃以下の温度であることが好ましい。加熱する方法は、分散液全体が所望とする温度以上になる方法であれば特に限定されず、例えば、容器に入れた分散液を湯浴に浸漬して温める方法、電子レンジでマイクロ波を照射する方法などが挙げられる。加熱する時間は、加熱する方法にもよるが、15分程度であることが好ましい。

[0026] 工程2の後、必要に応じて以下の工程3を行なってもよい。

〈工程3〉

工程3では、工程2で加熱した水系分散液を、前記リン脂質の相転移温度未満の温度に冷却する。冷却する温度は、前記リン脂質の相転移温度より好ましくは2℃以下の温度、より好ましくは15℃以下の温度である。冷却する方法は、分散液全体が所望とする温度以下になる方法であれば特に限定されず、例えば、容器に入れた分散液を室温で静置する、氷浴に浸漬する方法が挙げられる。冷却する時間は、冷却する方法にもよるが、1時間程度であることが好ましい。

[0027] 必要に応じて、工程3の後得られるバイセルの分散液を分散媒で希釈してもよい。本発明のバイセルは、その分散液中での前記リン脂質の濃度が10～0.2質量%であり、この濃度に応じて分散液は構造色を示す。特に、前記リン脂質の濃度が0.5～1.5質量%の濃度範囲において、UV領域（350nm）から可視光領域（650nm）まで、幅広い波長の構造色を調整することができる。

[0028] また、本発明のバイセルの分散液は、分散液の温度変化に応じて可逆的に異なる色を呈する。この温度変化により生じる構造色の変化は、バイセルの第一の構造と第二の構造とに起因するものである。第一の構造は前記リン脂

質が平面的な集合構造（ゲル相）であり、第二の構造は前記リン脂質が波状の集合構造（リップル相）であり、バイセルがいずれの構造となるかは、前記リン脂質の相転移温度によって決まる。

[0029] [用途]

本発明のバイセルは、生体に対する有害性が懸念される界面活性剤を必要とせず、生体適合性に優れるリン脂質を主成分とするものであり、生体適合性に優れる。また、本発明のバイセルは、希釈条件や生体内環境でもディスク状の構造体を維持することができ、皮膚透過力にも優れる。したがって、本発明のバイセルはスキンケア材料をはじめとする各種化粧品や薬物送達システム用のキャリア材料に有用である。

[0030] 特に前記リン脂質がホスファチジルグリセロールである（一般式（1）で表される化合物において R^2 が式（2-2）である）場合、該化合物は極性基に親水性に優れるヒドロキシル基を2つ有する。このようなジオール構造を有する化合物（例えば、セラミドなど）は、保湿剤として利用されており、本発明のバイセルはそれ自身が高い保湿力を有し、かつ皮膚透過力が高い化粧品として期待される。化粧品は、本発明のバイセル及び目的に応じて添加される各種成分を含む組成物として使用できる。目的に応じて添加される各種成分として、酸化防止剤、pH調整剤、粘度調整剤、香料、顔料、消毒剤、抗菌活性剤、医薬活性剤等が挙げられる。

[0031] また、本発明のバイセルは、その構造中に疎水性物質を内包できる。したがって、例えば、調製時に疎水性物質を内包させることで、キャリア材料として利用できる。本発明のバイセルは、皮膚透過力に優れ、皮膚表面（表皮）のみならず、真皮及び皮下組織にまで透過するため、経皮吸収用の薬物等のキャリアに有用である。また、目的部位に結合するリガンドを配合したバイセルを作成することで標的指向性を付与させることが可能になる。

[0032] 本発明のバイセルは、分散液中の濃度や温度に応じて構造色が変わるため、フォトニック材料に有用である。外部環境の変化に応じて色が変わることを生かして、センサーとしての利用も期待される。また、標的に対するリ

ガンドを配合したバイセルを作成することで標的を認識するセンサーへの応用が期待される。

[0033] 本発明のバイセルは、磁場中で一方向に配向するため、NMR配向剤に有用である。

実施例

[0034] [試験例 1] バイセル分散液の調製

下記の例に示す方法で、バイセル分散液を調製した。

[0035] [実施例 1] ジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)バイセル分散液の調製

図 2 に DPPG バイセルの調製手順を示す。まず、室温 (25℃) で DPPG の粉末を容器に入れ、DPPG の粉末が 5wt% となるように水を添加し、DPPG の水分散液を調製した。次に、この DPPG の水分散液を 60℃ で 15 分間加熱した後、室温 (25℃) へと冷却することで積層した DPPG バイセル同士を剥離させ、水中に DPPG バイセルが分散した DPPG バイセル分散液を得た。得られた 5wt% の DPPG 分散液は、必要に応じて希釈して、下記試験例に示す試験に供した。

[0036] [実施例 2] ジステアロイルホスファチジルグリセロール(DSPG)バイセル分散液の調製

DPPG の代わりに DSPG を用いた以外は実施例 1 と同様にして DSPG バイセル分散液を得た。

[0037] [実施例 3] ジパルミトイルホスファチジルセリン(DPPS)バイセル分散液の調製

DPPG の代わりに DPPS を用いた以外は実施例 1 と同様にして DPPS バイセル分散液を得た。

[0038] [実施例 4] ジパルミトイルホスファチジン酸(DPPA)バイセル分散液の調製
DPPG の代わりに DPPA を用い、工程 2 の加熱時間を 70℃ とした以外は実施例 1 と同様にして DPPA バイセル分散液を得た。

[0039] [比較例 1] ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)分散液の調製

DPPG の代わりに DPPC を用いた以外は実施例 1 と同様の手順で分散液の調製

を行なった。

[0040] [試験例 2] ^{31}P NMRスペクトル測定によるバイセル形成の確認

実施例又は比較例で調製した各バイセル分散液（リン脂質濃度0.9wt%）の ^{31}P NMRスペクトルを室温で測定し、分散液中にバイセルが形成されていることの確認を行なった。 ^{31}P NMRスペクトルの測定結果を図3に示す。実施例1～4ではディスク状の形状を示す負のピークが観察されたのに対し、比較例1では負のピークが観察されずバイセルが形成されていないことがわかった。

[0041] [試験例 3] TEMによるバイセルの構造確認

実施例1のDPPGバイセルの水分散液（リン脂質濃度0.2wt%）のTEM画像を図4に示す。図4から、DPPGが大きさ50～2000nmのディスク状の集合体を形成していることが確認できた。

[0042] [試験例 4] バイセル分散液の希釈安定性及び塩耐性

DPPG濃度が0.5wt%、1.0wt%、2.0wt%及び5.0wt%のバイセル分散液に対して上記と同様に、 ^{31}P NMRスペクトル測定によるバイセル形成の確認を行なった。結果を図5Aに示す。

また、DPPG濃度2.0wt%のバイセル分散液に対して、10mM又は100mMとなるように食塩を添加し、塩存在下でのバイセル形成の確認を ^{31}P NMRスペクトル測定により行なった。結果を図5Bに示す。

図5Aと図5Bとから、DPPG濃度が0.5wt%と薄くても、また食塩添加後でも、 ^{31}P NMRスペクトルにおける負のピークが観察され、DPPG濃度が低濃度であっても、また塩存在下でもバイセル構造が形成されていることが確認できた。

[0043] [試験例 5] SAXSによるバイセル形成の確認

実施例1のDPPGバイセル水分散液（リン脂質濃度0.5wt%）のSAXS解析の結果を図6に示す。強度の傾きがディスク状の構造が形成されている場合に特徴的な「-2」の傾きを示しており、DPPGバイセルが確かにディスク状の構造体を形成していることが確認できた。

[0044] [試験例 6] 超音波処理によるDPPGバイセルのサイズ制御

実施例 1 のDPPGバイセル水分散液（リン脂質濃度5wt%）を超音波処理した際のサイズ変化を示したDLSデータを図 7 A に示す。超音波処理を行わなかった場合の流体力学半径は1000nm程であり、超音波処理を15分行なった場合の流体力学半径は200nm程であり、超音波処理を3時間行なった場合の流体力学半径は30nm程であった。したがって、超音波処理時間に応じてバイセルのサイズが小さくなることがわかった。

また、超音波処理を3時間行なった後に、上記試験例 5 と同様にSAXSによりバイセルの形成確認を行なったところ（図 7 B）、ディスク形状が維持されていることが確認できた。

[0045] [試験例 7] パクリタキセル内包型DPPGバイセルの作成

実施例 1 のDPPG水分散液（リン脂質濃度5wt%）の調製において、蛍光ラベルされたパクリタキセルを0.0025wt%となるように添加し、通常のバイセル作製と同様に昇温・冷却操作を行うことでバイセルの形成と共にパクリタキセル内包を行った際の、DPPGバイセル分散液の写真を図 8 A に示す。また、このパクリタキセル内包DPPGバイセル分散液のSAXS解析の測定結果を図 8 B に示す。水に不溶性のパクリタキセルがDPPG膜に取り込まれることによって、分散液は透明であった。また、SAXS解析において小さなq領域においてディスク状の形状に特徴的な「-2」の傾きが観察され、DPPGバイセルはパクリタキセル内包後もディスク状の形状を維持していることがわかった。

[0046] [試験例 8] 蛍光ラベルDPPGバイセルの経皮浸透試験

蛍光性NBDでラベルされたジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE-NBD）：DPPG＝3：97（質量比）となるようにバイセルを調製し、DPPGを97wt%含む蛍光ラベルされたバイセルの分散液（リン脂質濃度2.0wt%）を得た。このバイセル分散液に対して、試験例 6 と同様に超音波処理を行ない、DLS測定において200nmの粒径を有するバイセル分散液及び30nmの粒径を有するバイセル分散液をそれぞれ得た。

ヘアレスラットから摘出した皮膚をフランチセルにセットし、皮下投与実験を行なった。フランチセルに対する初期の投与は2wt%のバイセル分散液を

使用した。皮下投与実験の概要を図9 A及びBに、皮膚組織からの透過量を図9 Cにそれぞれ示す。サイズが小さい30nmのバイセルの場合だけでなく、サイズが大きい200nmのバイセルの場合でも24時間後に皮膚組織を透過したバイセルからの蛍光が観察できた。

また、過去に報告されている界面活性剤とリン脂質の二成分から構成されるバイセルを用いた例においては20wt%のバイセルを用いて皮下投与を行っても皮膚を透過するバイセルは観察されていない（非特許文献5）。

[0047] [試験例9] 蛍光ラベルDPPGバイセルの皮膚組織の集積量測定

試験例8のバイセルのうち、DLS測定において200nmの粒径のバイセルを皮膚組織へ投与して24時間後の皮下における各々の組織中への集積量を図10に示す。DPPGバイセルは、最表層から20 μ m以内の角質だけでなく、それよりも深部である表皮や真皮、さらには皮膚組織を透過するバイセルを確認できた。

[0048] [試験例10] 皮下透過試験における透過サンプルのSAXS解析

試験例8におけるDPPGバイセルの皮下浸透試験において、投与して24時間後の皮膚組織からの透過物をSAXS解析した結果を図11に示す。ディスク状の構造体が形成されている場合に特徴的な「-2」の傾きを示しており、皮膚組織透過後もDPPGバイセルはディスク状の形状を維持していることがわかった。

[0049] [試験例11] DPPGバイセル及びDMPGミセルの細胞毒性試験

実施例1のDPPGバイセル（リン脂質濃度0.01-1wt%）をがん細胞（Hep3B細胞）に投与して24時間後の細胞生存率をCell Counting Kitにより評価した。

比較として、常法により調製したジミリストイルホスファチジルグリセロール(DMPG)ミセル（リン脂質濃度0.01-1wt%）も同様にがん細胞（Hep3B細胞）に投与して24時間後の細胞生存率をCell Counting Kitにより評価した。結果を図12に示す。

DPPGバイセルを使用した場合、0.1wt%の濃度で添加した場合においても大部分の細胞が生存しており、DPPGバイセルはDMPGミセルと比較して細胞毒性

が低いことがわかった。

[0050] [試験例 1 2] DPPGバイセルの構造色

DPPGバイセル分散液をリン脂質濃度5.0wt%から希釈（2.0-0.7wt%）した際の25℃における分散液の吸収スペクトル及び目視による観察結果を図13に示す。分散液中のDPPGの重量を変化させることでUV光から可視光まで幅広い波長の構造色の溶液を調製することができることがわかった。

[0051] [試験例 1 3] 磁場配向したDPPGバイセルの構造色

2.0wt%から0.7wt%のDPPGバイセル分散液を9Tの回転磁場中で静置させた際の25℃における分散液の吸収スペクトル及び目視による観察結果を図14に示す。回転磁場を印加する前と比較してスペクトルが鋭くなるとともに均一な構造色へと変化することがわかった。

[0052] [試験例 1 4] DPPGフォトリック構造体のSAXS解析

リン脂質濃度1.2wt%のバイセル分散液における2D SAXS解析の結果を図15に示す。フォトリック構造体の繰り返し構造に由来する円状のピークが室温から37℃までの温度領域で観察されることがわかった。

[0053] [試験例 1 5] DPPG構造色の温度応答性

リン脂質濃度0.9wt%のDPPGバイセル分散液を35℃から37℃の間で繰り返し温度変化させた際の外観及び吸収スペクトルの変化を図16に示す。わずか2℃の温度変化にも関わらず、波長が鋭敏に変化し、この変化が可逆的であることがわかった。

[0054] [試験例 1 6] DPPGバイセル内包型ゲルの外観

DPPGバイセルの分散液（リン脂質濃度0.9、1.1、1.2wt%）を、5wt%のアクリルアミドゲルに包埋した際のゲルの外観を図17に示す。全ての濃度において、ハイドロゲルからDPPGフォトリック構造体から生ずる構造色を観察することができた。

[0055] [試験例 1 7] DPPGバイセル内包型ゲルにおける温度応答性

リン脂質濃度0.8wt%のバイセル分散液を、2wt%のアクリルアミドゲルに包埋した際におけるゲルの温度に依存した色変化の外観及びスペクトル変化を

図 1 8 に示す。DPPGバイセルによる構造色はハイドロゲル中においても鋭敏な色変化を起こしていることがわかった。

[0056] [試験例 1 8] DPPGバイセルのみのゲル化挙動

DPPGバイセルの5.0wt%水分散液における目視観察画像を図 1 9 B に示す。

1wt%のDPPG分散液に対して加熱・冷却操作を行うことで調製したDPPGベシクル（リン脂質濃度5.0wt%）は溶液状態なのに対し（図 1 9 A）、DPPGバイセルの溶液は高分子ネットワークを導入することなくゲル化していることがわかった。

産業上の利用可能性

[0057] 本発明のバイセルは、生体に対する有害性が懸念される界面活性剤を必要とせず、生体適合性に優れるリン脂質を主成分とするものであり、また希釈条件や生体内環境でもディスク状の構造体を維持することができ、皮膚浸透性に優れるため、スキンケア材料や薬物送達システム用のキャリア材料として期待される。また、本発明のバイセルは、その分散液の濃度や温度に応じて異なる構造色を呈するため、フォトニック材料やセンサーとしても期待される。さらに、本発明のバイセルは、磁場配向性を有するため、NMR配向剤としても期待される。

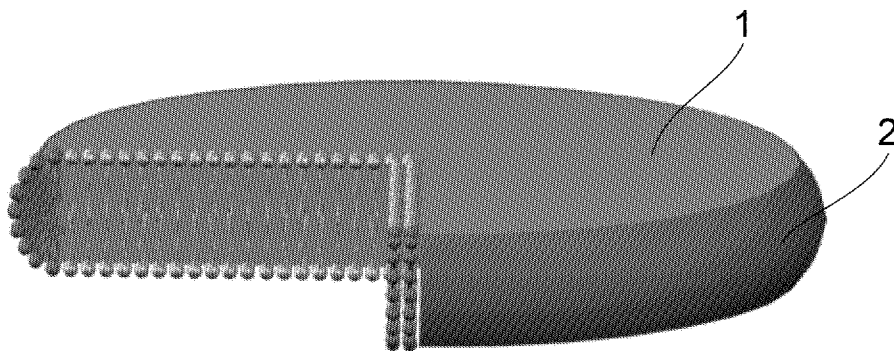
符号の説明

- [0058] 1 バイセルの平面部分
2 バイセルの屈曲部分

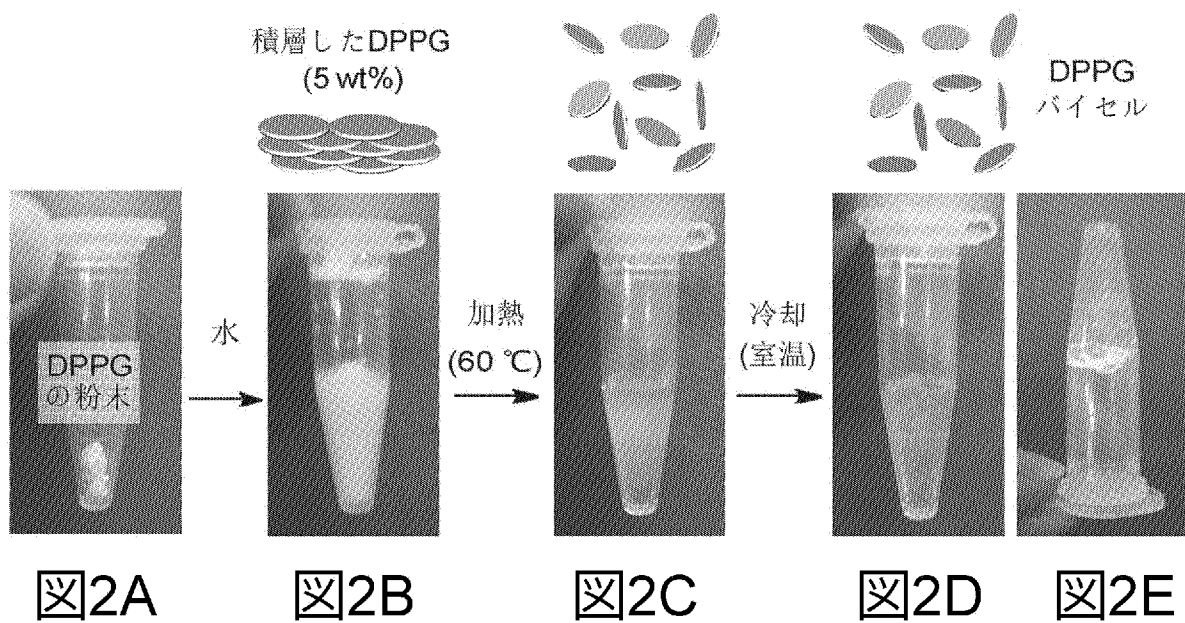
請求の範囲

- [請求項1] pH6～8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を50質量%以上含む、バイセル。
- [請求項2] 前記リン脂質が、ホスファチジン酸、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジルセリン、及びホスファチジルイノシトールから選ばれる一種以上のリン脂質である請求項1に記載のバイセル。
- [請求項3] 平面部分の長径が10nm～10 μ mである請求項1又は2に記載のバイセル。
- [請求項4] 請求項1～3のいずれか1項に記載のバイセルを含む、化粧品。
- [請求項5] 請求項1～3のいずれか1項に記載のバイセルを含む、キャリア材料。
- [請求項6] 請求項1～3のいずれか1項に記載のバイセルを含む、フォトニック材料。
- [請求項7] 請求項1～3のいずれか1項に記載のバイセルを含む、NMR配向剤。
- [請求項8] 下記工程1及び工程2を有する方法により製造することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載のバイセルの製造方法。
- 〈工程1〉
- pH6～8の領域において分子全体が負に帯電しているリン脂質を、2質量%以上の濃度で、前記リン脂質の相転移温度未満の温度で、水系分散液に分散する工程
- 〈工程2〉
- 前記リン脂質の水系分散液を、前記リン脂質の相転移温度以上の温度に加熱する工程

[図1]



[図2]



[図3]

図3A

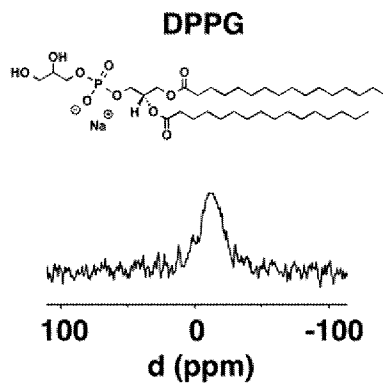


図3B

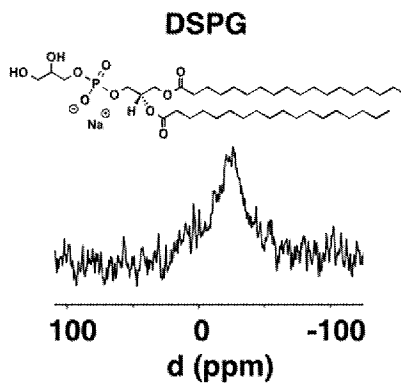


図3C

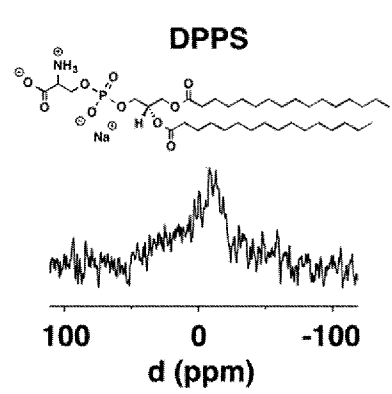


図3D

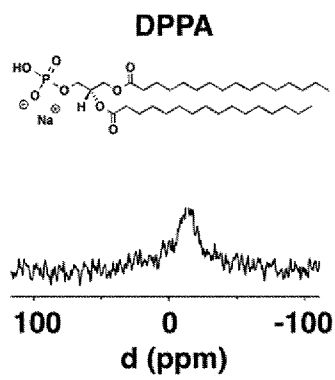
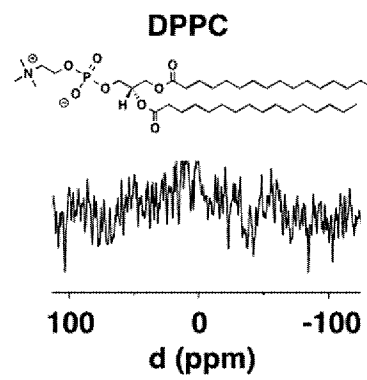


図3E



[図4]

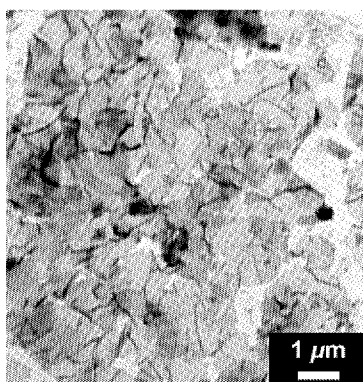


図4A

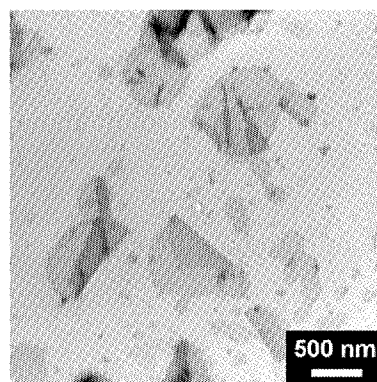


図4B

[図5]

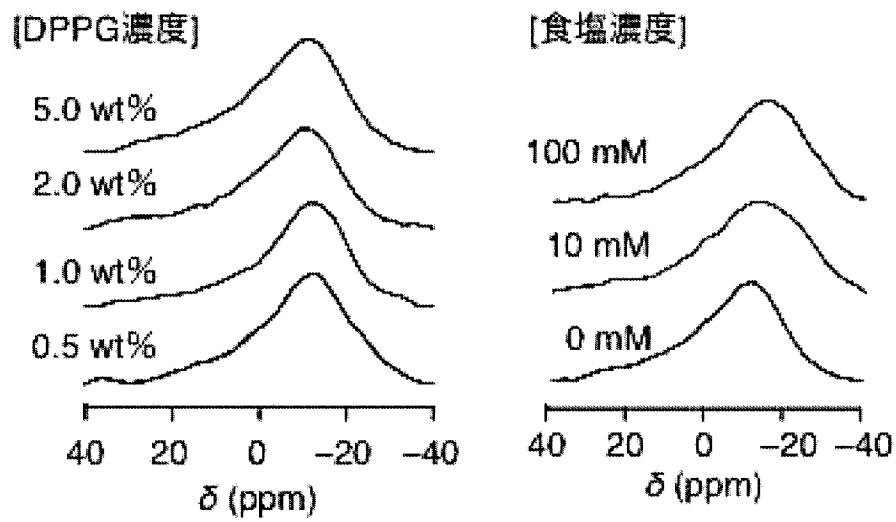
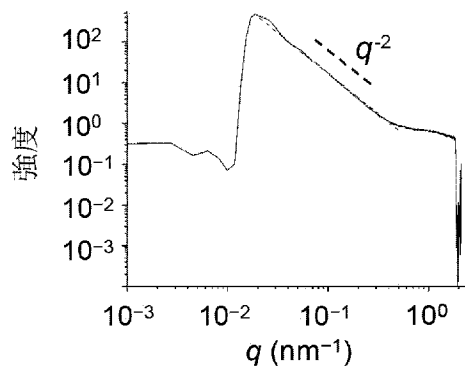


図5A

図5B

[図6]



[図7]

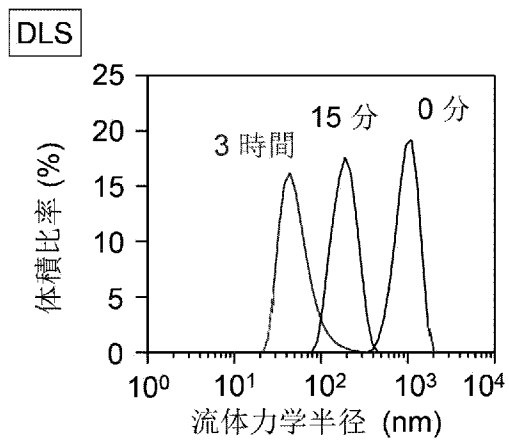


図7A

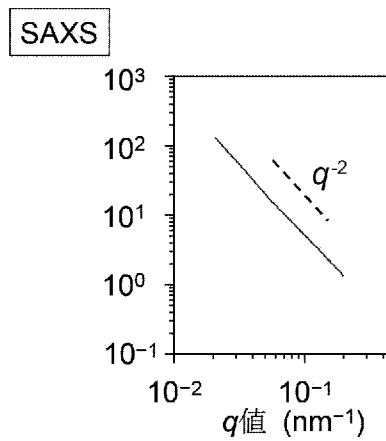


図7B

大きなバイセル (200 nm)

皮膚

透過

小さいバイセル (30 nm)

皮膚

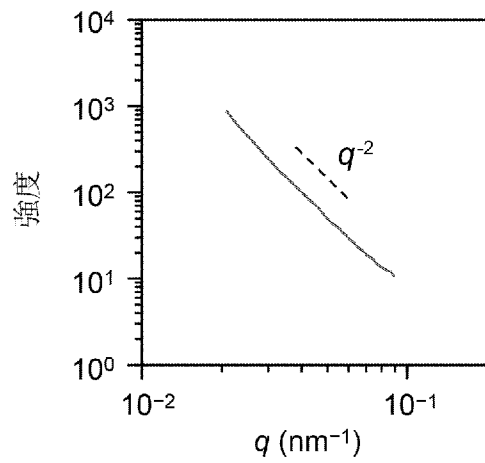
透過

Figure 1 is a scatter plot showing the permeation amount (μmol/cm²) of small and large cyclodextrins over time (0 to 25 hours). The y-axis ranges from 0 to 0.5 μmol/cm². The x-axis ranges from 0 to 25 hours. Small cyclodextrin (小さいバイセル) is represented by solid circles, and large cyclodextrin (大きなバイセル) is represented by open circles. Both show an increase in permeation over time, with small cyclodextrin reaching a higher permeation amount (approx. 0.45 μmol/cm² at 25h) compared to large cyclodextrin (approx. 0.21 μmol/cm² at 25h).

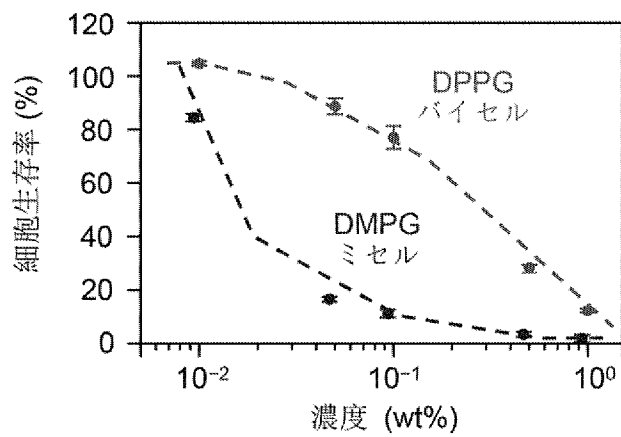
投与時間 (時間)	小さいバイセル (μmol/cm²)	大きなバイセル (μmol/cm²)
0	0.00	0.00
2	0.01	0.00
4	0.01	0.00
6	0.02	0.00
12	0.03	0.00
18	0.15	0.07
24	0.45	0.21

Condition	浸透量 ($\mu\text{mol}/\text{cm}^2$)
角質	~0.0066
表皮・真皮	~0.0036
透過量	~0.0011

[図11]



[図12]



[図13]

図13A

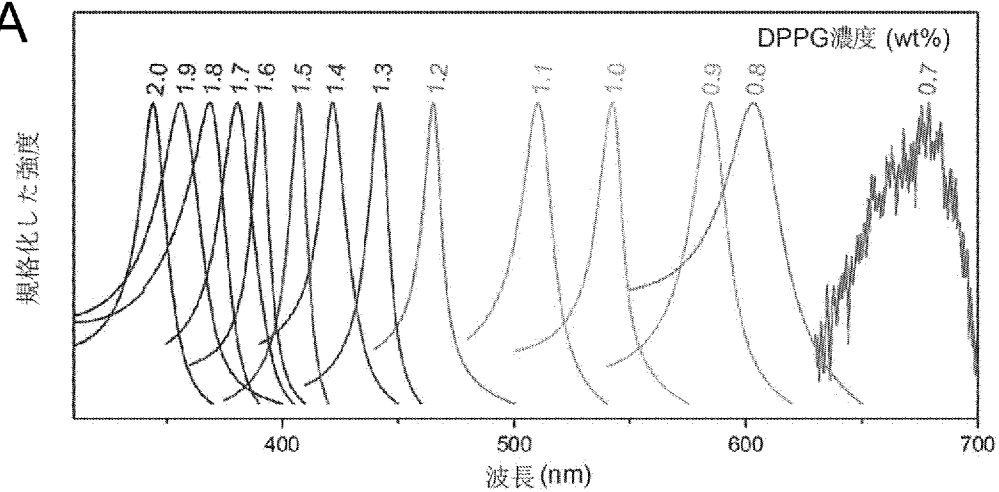
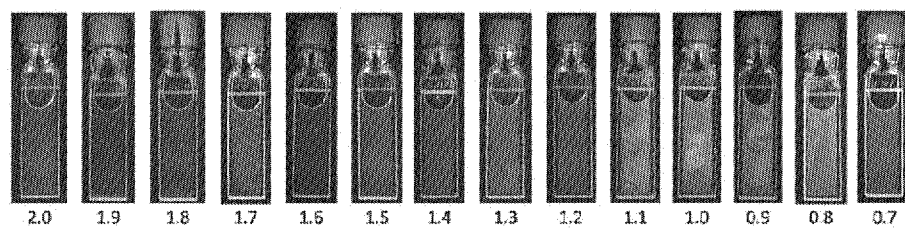


図13B



[図14]

図14A

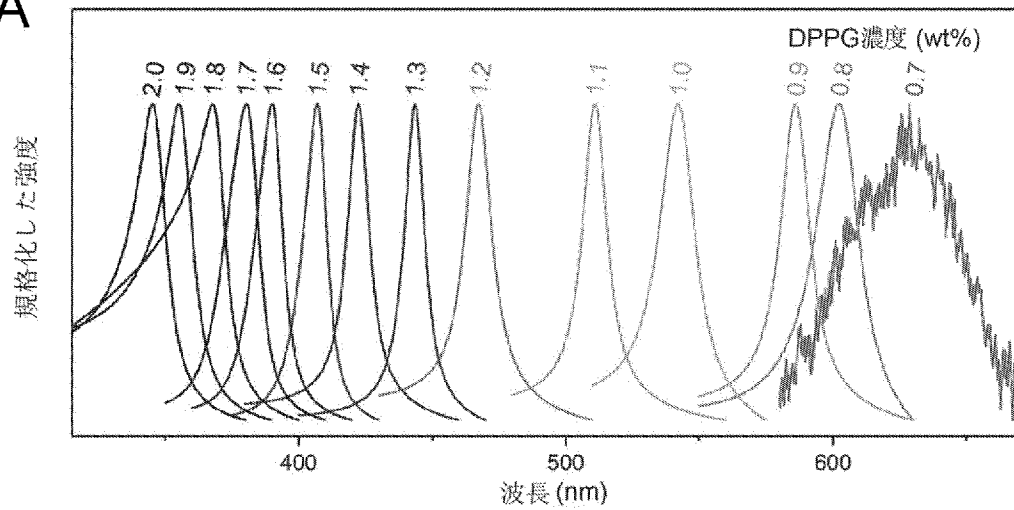
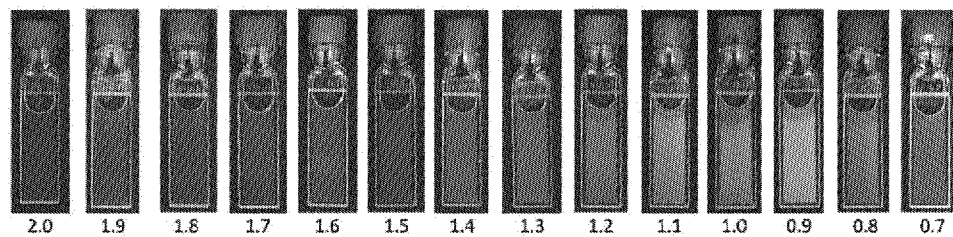
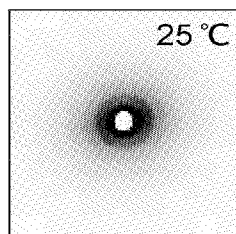


図14B



[図15]

図15A



33 °C

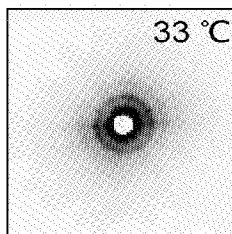
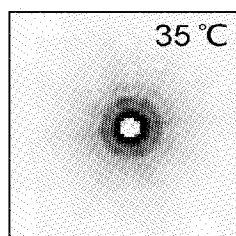


図15B

図15C



37 °C

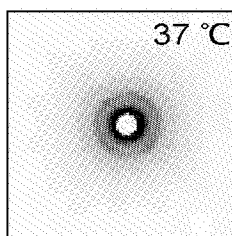
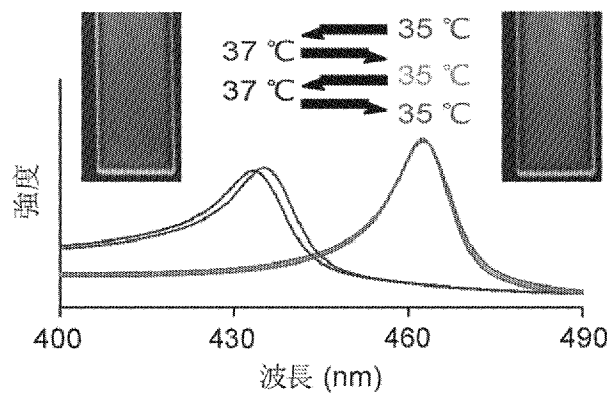


図15D

[図16]



[図17]

0.9 wt%

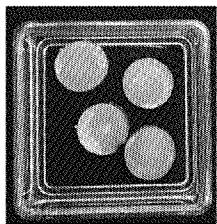


図17A

1.1 wt%

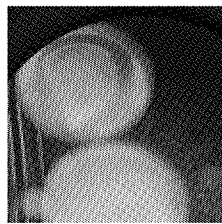


図17B

1.2 wt%

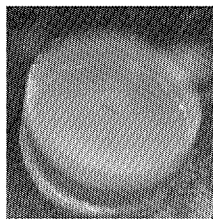


図17C

[図18]

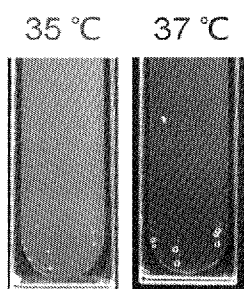


図18A

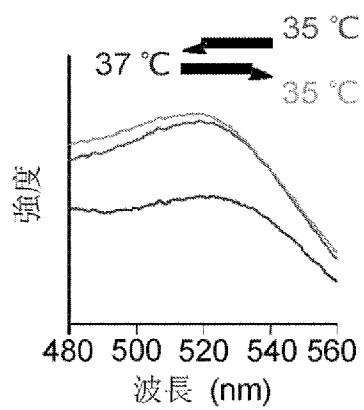


図18B

[図19]

DPPGベシクル

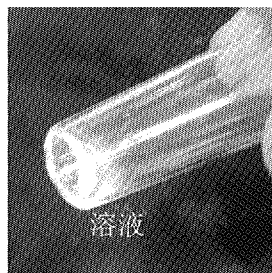


図19A

DPPGバイセル

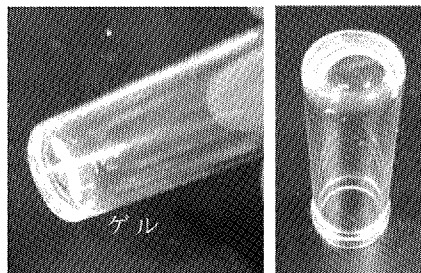


図19B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/006556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61Q 19/00(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 8/55(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; G01N 24/08(2006.01)i; A61K 31/337(2006.01)i
FI: A61K47/24; A61K8/55; A61K9/10; A61K31/337; A61K47/24 ZNM;
A61Q19/00; G01N24/08 510N

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61Q19/00; A61K9/10; A61K8/55; A61K47/24; G01N24/08; A61K31/337

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2020
Registered utility model specifications of Japan	1996-2020
Published registered utility model applications of Japan	1994-2020

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII);
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FUJII, S., "Rheological characterization of thermal phase behavior of anionic lipid DMPG dispersions.", J Biorheology, 2017, vol. 31, no. 1, pp. 6-11, in particular, page 7 2., page 9, right column, abstract	1-3, 8
Y	in particular, page 7 2., page 9, right column, abstract	4-7
Y	WO 2017/090740 A1 (KOSÉ CORPORATION) 01.06.2017 (2017-06-01) in particular, claim 2, paragraph [0002], examples	4-7
Y	US 2012/0321683 A1 (DE LA MAZA RIVERA ALFONS) 20.12.2012 (2012-12-20) in particular, claims 41-47, examples	4-7
Y	JP 2018-200233 A (RIKEN, INSTITUTE OF PHYSICAL AND CHEMICAL RESEARCH) 20.12.2018 (2018-12-20) in particular, claims, examples, pp. 15-16	4-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
08 May 2020 (08.05.2020)

Date of mailing of the international search report
19 May 2020 (19.05.2020)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2020/006556

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SCHNEIDER, MS, et al., "Network formation of lipid membranes: Triggering structural transitions by chain melting", PNAS., 1999, vol. 96, no. 25, pp. 14312-14317, in particular, Materials and Methods	1-8
A	KOT, EF, et al., "Behavior of most widely spread lipids in isotropic bicelles.", Langmuir, 2018, vol. 34, pp. 8302-8313, in particular, Sample Preparation	1-8
A	JP 2014-506884 A (CERENIS THERAPEUTICS HOLDING S.A.) 20.03.2014 (2014-03-20) in particular, claims 12, 13, paragraphs [0069]-[0073], [0102]	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2020/006556

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2017/090740 A1	01 Jun. 2017	CN 108289821 A claim 2, examples	
		KR 10-2018-0084766 A	
		TW 201725027 A	
US 2012/0321683 A1	20 Dec. 2012	WO 2011/107643 A1 claims 41-47, examples	
		EP 2543360 A1	
JP 2018-200233 A	20 Dec. 2018	(Family: none)	
JP 2014-506884 A	20 Mar. 2014	WO 2012/109162 A1 claims 12, 13, paragraphs [0069]- [0073], [0102]	
		US 2012/0232005 A1	
		EP 2673296 A	
		CN 103443123 A	
		KR 10-2014-0053848 A	
		RU 2013139066 A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） A61Q 19/00(2006.01)i; A61K 9/10(2006.01)i; A61K 8/55(2006.01)i; A61K 47/24(2006.01)i; G01N 24/08(2006.01)i; A61K 31/337(2006.01)i FI: A61K47/24; A61K8/55; A61K9/10; A61K31/337; A61K47/24 ZNM; A61Q19/00; G01N24/08 510N		
B. 調査を行った分野		
調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC）） A61Q19/00; A61K9/10; A61K8/55; A61K47/24; G01N24/08; A61K31/337		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2020年 日本国実用新案登録公報 1996-2020年 日本国登録実用新案公報 1994-2020年		
国際調査で利用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語） JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	FUJII S, Rheological characterization of thermal phase behavior of anionic lipid DMPG dispersions., J Biorheology, 2017, Vol.31 No.1, p.6-11 特に、p.7 2.、p.9右欄、要約	1-3, 8
Y	特に、p.7 2.、p.9右欄、要約	4-7
Y	WO 2017/090740 A1 (株式会社コーセー) 01.06.2017 (2017-06-01) 特に、請求項2, [0002], 実施例	4-7
Y	US 2012/0321683 A1 (DE LA MAZA RIVERA ALFONS) 20.12.2012 (2012-12-20) 特に、請求項4 1-47, 実施例	4-7
Y	JP 2018-200233 A (国立研究開発法人理化学研究所) 20.12.2018 (2018-12-20) 特に、特許請求の範囲、実施例、p.15-16	4-7
A	SCHNEIDER MS, et al., Network formation of lipid membranes : Triggering structural transitions by chain melting, PNAS., 1999, Vol.96 No.25 , p.14312-14317 特に、Materials and Methods	1-8
☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。 ☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー “A” 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの “E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの “L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す） “O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 “P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献 “T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの “X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの “Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの “&” 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 08.05.2020		国際調査報告の発送日 19.05.2020
名称及びあて先 日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		権限のある職員（特許庁審査官） 横田 倫子 4C 3764 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	KOT EF, et al., Behavior of most widely spread lipids in isotropic bicelles., Langmuir, 2018, Vol.34, p.8302-8313 特に、Sample Preparation	1-8
A	JP 2014-506884 A (セレニス セラピューティクス ホールディング エスアー) 20.03.2014 (2014 - 03 - 20) 特に、請求項 1 2, 1 3, [0069]-[0073], [0102]	1-8

国際調査報告
 パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2020/006556

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2017/090740	A1	01.06.2017	CN	108289821	A	
				Claim2, Examples			
				KR	10-2018-0084766	A	
				TW	201725027	A	
US	2012/0321683	A1	20.12.2012	WO	2011/107643	A1	
				Claim41-47, Examples			
				EP	2543360	A1	
JP	2018-200233	A	20.12.2018	(ファミリーなし)			
JP	2014-506884	A	20.03.2014	WO	2012/109162	A1	
				claim 12, 13, [0069]-[0073], [0102]			
				US	2012/0232005	A1	
				EP	2673296	A	
				CN	103443123	A	
				KR	10-2014-0053848	A	
				RU	2013139066	A	