

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C08B 31/18, 37/00, 37/02 C08B 37/12, 37/18, A61K 49/00	A1	(11) 国際公開番号 WO 92/22586
		(43) 国際公開日 1992年12月23日(23. 12. 1992)
(21) 国際出願番号 PCT/JP92/00735 (22) 国際出願日 1992年6月8日(08. 06. 92)		戸澤菜穂子(TOZAWA, Nahoko)[JP/JP] 〒489 愛知県瀬戸市東山村1丁目170番地の4 Aichi, (JP) 山田恵子(YAMADA, Keiko)[JP/JP]
(30) 優先権データ 特願平3/166334 1991年6月11日(11. 06. 91) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 名糖産業株式会社 (MEITO SANGYO KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒451 愛知県名古屋市西区篠塚町2丁目41番地 Aichi, (JP)		〒503 岐阜県大垣市牧新田町10番地の2 Gifu, (JP) 鬼頭恭二(KITO, Kyoji)[JP/JP] 〒463 愛知県名古屋市守山区弁天が丘701番地 Aichi, (JP) 北國秀三郎(HOKUKOKU, Shusaburo)[JP/JP] 〒509-02 岐阜県可児市若葉台8丁目55番地 Gifu, (JP)
(72) 発明者; および (73) 発明者/出願人(米国についてのみ) 長谷川正勝(HASEGAWA, Masakatsu)[JP/JP] 〒457 愛知県名古屋市南区道徳新町5丁目29番地 Aichi, (JP) 長江英夫(NAGAE, Hideo)[JP/JP] 〒486 愛知県春日井市東野町2丁目8番地7 Aichi, (JP) 伊藤嘉雄(ITO, Yoshiro)[JP/JP] 〒466 愛知県名古屋市昭和区山花町203番地の3 Aichi, (JP) 水谷彰宏(MIZUTANI, Akihiro)[JP/JP] 〒451 愛知県名古屋市西区東岸町2丁目48番地 Aichi, (JP) 広瀬公男(HIROSE, Kimio)[JP/JP] 〒502 岐阜県岐阜市栗野西1丁目433番地 Gifu, (JP) 大海真裕(OHGAI, Masahiro)[JP/JP] 〒462 愛知県名古屋市北区志賀町2丁目68番地 Aichi, (JP) 山下泰治(YAMASHITA, Yasushi)[JP/JP] 〒451 愛知県名古屋市西区篠塚町1丁目7番地 Aichi, (JP)		(74) 代理人 弁理士 小田島平吉, 外(ODAJIMA, Heikichi et al.) 〒107 東京都港区赤坂1丁目9番15号 日本自転車会館 小田島特許事務所 Tokyo, (JP)
		(81) 指定国 AT(欧州特許), AU, BE(欧州特許), CA, CH(欧州特許), DE(欧州特許), DK(欧州特許), ES(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), GR(欧州特許), IT(欧州特許), JP, LU(欧州特許), MC(欧州特許), NL(欧州特許), NO, SE(欧州特許), US.
		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : OXIDIZED COMPOSITE COMPRISING WATER-SOLUBLE CARBOXYPOLYSACCHARIDE AND MAGNETIC IRON OXIDE

(54) 発明の名称 水溶性カルボキシ多糖-磁性酸化鉄酸化複合体

(57) Abstract

An oxidized composite comprising a water-soluble carboxypolysaccharide and ultrafine magnetic iron oxide particles. It has an extremely reduces toxicity and an excellent stability, exhibits scarcely any or no hypotensive activity even if directly administered into the blood vessel of an animal, is reduced in the activity of platelet agglutination, and is useful in the medical field as, for example, a contrast medium for MRI and a pyrogenic agent for thermotherapy.

(57) 要約

水溶性カルボキシ多糖と磁性酸化鉄超微粒子とからなる複合体であって、該複合体が酸化されていることを特徴とする水溶性カルボキシ多糖—磁性酸化鉄酸化複合体。該酸化複合体は毒性が極めて少なく且つ安定性に優れしており、動物の血管内に直接投与しても血圧低下作用を殆んどまたは全く示さず、しかも血小板凝集作用も小さく、MR I 造影剤、温熱療法用発熱剤などの医療の分野で有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT オーストリア	FI フィンランド	MN モンゴル
AU オーストラリア	FR フランス	MR モーリタニア
BB バルバードス	GA ガボン	MW マラウイ
BE ベルギー	GN ギニア	NL オランダ
BF ブルキナ・ファソ	GB イギリス	NO ノルウェー
BG ブルガリア	GR ギリシャ	NZ ニュージーランド
BJ ベナン	HU ハンガリー	PL ポーランド
BR ブラジル	IE アイルランド	PT ポルトガル
CA カナダ	IT イタリー	RO ルーマニア
CF 中央アフリカ共和国	JP 日本	RU ロシア連邦
CG コンゴー	KP 朝鮮民主主義人民共和国	SD スーダン
CH スイス	KR 大韓民国	SE スウェーデン
CI コート・ジボアール	LI リヒテンシュタイン	SN セネガル
CM カメルーン	LK スリランカ	SU ソヴィエト連邦
CS チェコスロバキア	LU ルクセンブルグ	TD チャード
DE ドイツ	MC モナコ	TG トーゴ
DK デンマーク	MG マダガスカル	UA ウクライナ
ES スペイン	ML マリ	US 米国

明細書

水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄酸化複合体

技術分野

本発明は、MR I 造影剤、温熱療法の発熱助剤、X線造影剤等の生物学分野及び医療分野で特に有用である新規な水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄酸化複合体に関する。

背景技術

コロイドサイズを持った磁性酸化鉄超微粒子は超常磁性を有し、その水性ゾルである磁性流体は、近年特にMR I 造影剤として注目されている。しかしながら、磁性酸化鉄超微粒子のみからなる水性ゾルは、塩の添加時における安定性、加熱滅菌や経時安定性が極めて低く、更に静脈内投与における急性毒性も極めて強く、このままでは医療用として使用することができず、これらの改善が図られてきた。

これらの安定性・安全性の向上のための1つの手段として多糖類等と磁性酸化鉄超微粒子との複合体を形成せしめることが提案されている。

例えば、特公昭59-13521号公報（米国特許第4,101,435号明細書）には、デキストランまたはデキストランを水酸化ナトリウムで加熱処理して得られるカルボキシデキストランと磁性酸化鉄超微粒子との複合体が開示されており、また、米国特許第4,452,773号明細書には、デキストランー磁性酸化鉄微小球が開示されており、さらに、特公昭64-500196号公報（国際公開WO 88/00060号明細書）には、上記と類似の動物の器官および組織のin vivo MR I 造影用のデキストランー磁性酸化鉄微小球の組成物が開示されている（後記比較例1参照）。これら、特にカルボキシデキストランー磁性酸化鉄

超微粒子複合体は種々の安定性や急性毒性の向上が著しいが、こうして得られる複合体や微小球の水性ゾルを血管内に投与すると著しい血圧低下をきたし、時には死に至ることが確認された。

そこで本発明者らは銳意検討の結果、水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄超微粒子複合体を酸素ガスなどの酸化剤で処理して得られる酸化複合体は、原料複合体が有している磁気的性質、代謝性、組織特異性等の性質に実質的に影響を与えることなく、血圧低下を殆どもしくは全く示さないこと、そして血圧低下と関連していると考えられる血小板凝集作用をも顕著に低減しうることを見いだし、本発明を完成するに至った。

10 発明の開示

しかし、本発明によれば、水溶性カルボキシ多糖と磁性酸化鉄超微粒子とからなる複合体であって、該複合体が酸化されていることを特徴とする水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄酸化複合体が提供される。

本発明により提供される水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄酸化複合体は水性ゾルの形態で極めて毒性が弱く且つ安定性に優れており、動物の血管内に直接投与しても従来の複合体のように血圧低下作用を殆どもしくは全く示さず、しかも血小板凝集作用も小さく、薬剤としての安全性に優れており、例えば、核磁気共鳴イメージング（以下、MRIと略記する）造影剤、温熱療法用の発熱助剤、薬物の局所投与用担体等として医療の分野において好適に使用することができる。

以下、本発明の水溶性カルボキシ多糖ー磁性酸化鉄酸化複合体（以下、酸化複合体ということがある）についてさらに詳細に説明する。

本発明の酸化複合体は水溶性カルボキシ多糖（以下、CPSと略称する）と酸化鉄超微粒子との複合体を酸化することにより得ることができ

る。本発明の酸化複合体の直接の出発原料である上記複合体はそれ自体既知のものであり、例えば、特公昭59-13521号公報（米国特許第4,101,435号明細書）に記載の方法で調製することができる。

本発明の酸化複合体の製造に用いることのできる複合体の一方の成分であるCPSは多糖分子の還元末端にカルボキシル基1個を有する水溶性多糖であり、その製法としては、水溶性多糖をアルカリ、特に、水酸化ナトリウムで加熱処理する方法や水溶性多糖の末端還元基のみを選択的に酸化、例えばヨウ素-水酸化ナトリウムまたは次亜塩素酸ナトリウムなどの酸化剤により酸化する方法などが例示できる。より具体的には例えば、多糖水溶液に水酸化ナトリウムを加え、約30～約100℃、好ましくは約60～約100℃の温度で0.5～6時間加熱処理することにより得ることができる。このようにして製造されるCPSは通常精製することが望ましく、その精製はそれ自体既知の方法、例えば、貧溶媒による沈殿法、透析法、限外濾過法、陽イオンおよび陰イオン交換樹脂法、電気透析法などを一つまたは組み合わせて行なうことができる。こうして得られるCPSはその1分子に1個のグルコメタサッカリン酸残基を持つとされている [Carbohydr. Res., 11 (1969), 77-84参照]。

また、例えば多糖水溶液にヨウ素-水酸化ナトリウムまたは次亜塩素酸ナトリウムなどの酸化剤を加え、約10～約60℃、好ましくは約20～約40℃の温度で0.5～16時間酸化処理することによってもCPSを得ることができ、次いで、通常、上記と同様な方法で精製することができる。

本発明において用いることのできるCPSは、好ましくはアルカリ処

理によって得られるCPSであり、数平均分子量は一般に約500～約30万、好ましくは約1000～約5万、さらに好ましくは約1500～約2万の範囲内にあることができる。更に上記のアルカリ処理もしくは酸化処理において、多糖からCPSへの変換率はアルカリ量や酸化剤が多いほど、処理温度が高いほど、および処理時間が長いほど高くなり、一般にその変換率は、多糖の還元糖をP%、処理物の還元糖をC%とすると、 $100(P-C)/P\%$ で表わすことができる。本発明においては一般に、変換率が約30%以上、好ましくは約50%以上、更に好ましくは約80%以上のCPSを用いることができる。

ここで用い得る多糖類としては、水溶性のもの、例えば、グルコースポリマーであるデキストラン、デンプン、グリコーゲン、ブルラン等；ガラクトースポリマーであるアガロース、ガラクタン等；キシロースポリマーであるキシラン等が挙げられ、この中でもデキストラン、デンプン及びブルランが好ましく、デキストランが特に好ましい。

本発明の酸化複合体の製造に用いることのできる複合体（以下、原料複合体ということがある）の調製法は、予め調製した磁性酸化鉄超微粒子のみから成る水性ゾルとCPSとを反応させる第一の方法と、CPSの存在下に1ステップで合成する第二の方法に大別できる。

第一の方法では、まず磁性酸化鉄超微粒子のみから成る水性ゾルを調製する。この水性ゾルの調製法には、アルカリ共沈法やイオン交換樹脂法等を例示することができる。

アルカリ共沈法では、例えば、第一鉄鉱酸塩と第二鉄鉱酸塩とをモル比で約1：3ないし約2：1の範囲内の比率で含む約0.1～約2Mの水溶液と、NaOH、KOH、NH₄OH等の塩基とをpHが約7～約

12になるように混合し、必要に応じて加熱熟成し、次いで生成する磁性酸化鉄を分離、水洗した後、水に再分散し、塩酸などの鉱酸を液のpHが約1～約3となるまで加えることにより、磁性酸化鉄水性ゾルを得ることができる。

一方、イオン交換樹脂法では、例えば、第一鉄塩と第二鉄塩とを約1：2のモル比で含む約0.1～約2Mの水溶液を、強塩基性交換樹脂スラリーに攪拌下pHを約8～約9に保ちながら添加した後、塩酸などの鉱酸をpHが約1～約3となるまで加え、次いで樹脂を濾別することにより磁性酸化鉄水性ゾルを得ることができる。必要に応じてこれらの水性ゾルは、透析、限外濾過、遠心等により精製及び／または濃縮することができる。こうして得られる磁性酸化鉄水性ゾルとCPS水溶液とは、厳密に制限されるものではないが、通常、鉄とCPSとの重量比が約1：1ないし約1：6の割合で混合し加熱反応させる。反応液中の磁性酸化鉄の濃縮は、これも特に制限されるものではないが、通常、鉄として約0.1～約10W/V%、好ましくは約1～約5W/V%の範囲内が適当である。反応は一般に室温ないし約120℃の温度で約10分ないし約10時間行うことができるが、通常約1時間程度還流加熱すれば十分である。

次いで、精製及び調整を行うが、それはそれ自体既知の方法を一つまたは組み合わせて用いることができる。例えば、限外濾過により生成する複合体から未反応のCPS及び低分子化合物を分離する操作を繰り返し、所望の純度及び濃度を有する複合体水性ゾルを得ることができ、また、得られる反応液にメタノール、エタノール、アセトン等の複合体に対する貧溶媒を添加し、生成した複合体と優先的に沈殿析出させ、析出

物を分離し、ついで析出物を水に再溶解し、流水透析し、必要に応じて減圧濃縮し、所望の純度及び濃度を有する複合体水性ゾルを得ることができる。この際所望に応じて、上記工程の途中及び／または最後に、p H調整、遠心分離及び／または濾過の工程を入れることもできる。

得られる複合体全体の粒子直径は一般に約20～約400nmの範囲にあり、また複合体中の磁性酸化鉄の粒子直径は一般に約5～30nmの範囲にある。さらに、得られる複合体の1テスラにおける磁化は通常鉄1gあたり約20～約150emuの範囲内にある。

複合体調製の第二の方法は、CPSの存在下に、2価鉄鉱酸塩及び3価鉄鉱酸塩の混合鉄塩水溶液と塩基水溶液とを混合して反応させ、1工程で複合体を得る方法である。この第二の方法は更に添加順序により、
10 (A) 該CPS水溶液に混合鉄塩水溶液を添加し、ついで塩基水溶液を添加し反応させる方法； (B) 該CPS水溶液に塩基水溶液を添加し、次いで混合鉄塩水溶液を添加し反応させる方法； (C) 塩基水溶液に該CPS水溶液と混合鉄塩水溶液との混液を添加する方法； (D) 混合鉄塩水溶液に該CPS水溶液と塩基水溶液の混液を添加する方法などに分類することができる。これら(A)、(B)、(C)及び(D)法は添加順序が相違するのみで、他の反応条件は本質的には変わらない。

上記混合鉄塩水溶液の調製は、第1鉄塩と第2鉄塩とをモル比で約1：4ないし約3：1、好ましくは約1：3ないし約1：1の割合で水性媒体中に溶解することにより行なうことができる。この鉄塩水溶液の濃度は広い範囲にわたつて変えることができるが、通常約0.1～約3M、好ましくは約0.5～2Mの範囲内が適当である。

鉄塩としては、例えば塩酸、硫酸、硝酸等の鉱酸との塩を挙げること

が⁵でき、また、塩基としては、例えばNaOH、KOH等のアルカリ金属水酸化物；アンモニア、トリエチルアミン、トリメチルアミン等のアミン類などから選ばれる少なくとも1種を使用することができる。塩基水溶液の濃度も広範囲にわたり変えることができ、通常約0.1～約1.0N、好ましくは約1～約5Nの範囲内が適当である。用いる塩基の量は添加終了後の反応液のpHがほぼ中性ないし約pH12になる量、即ち鉄塩と塩基との比が約1：1ないし約1：1.5（規定比）となるような量とすることができます。

更に、使用するCPSの量は、用いる鉄塩中の鉄の重量を基準にして約1～約15倍、好ましくは約3～約10倍とすることができる。また、CPS水溶液の濃度も厳密に制限されるものではないが、通常約1～約40W/V%、好ましくは約5～約30W/V%の範囲内が適当である。各水溶液の添加及び混合は攪拌下に室温から約100℃までの加熱下に行うことができ、必要に応じて塩基または酸を添加してpHを調整した後、約30～約120℃の温度で約10分～約5時間、通常約1時間加熱還流することにより反応させる。こうして得られる反応液は前記第一の方法におけると同様に精製し、所望ならば、pH調整、濃縮、さらには濾過することができる。

得られる複合体全体の粒子直径は通常約10～約300nmの範囲内にあることが望ましく、また、複合体中の磁性酸化鉄の粒子直径は通常約2～20nmの範囲内にあるのが好都合である。さらに、得られる複合体の1テスラにおける磁化は一般に鉄1g当たり約10～約150emuの範囲内にあることができる。

上記いずれの方法によつても、得られる原料複合体におけるCPSと

磁性酸化鉄との比率は磁性酸化鉄粒子の直径やCPSの分子量等に依存し、広い範囲で変化させうるが、原料複合体は、一般に磁性酸化鉄中の鉄1重量部当りCPSを約0.1～約5重量部、好ましくは約0.2～約3重量部の範囲内で含有することができる。

5 なお、第一及び第二の何れの方法による原料複合体の調製においても、第1鉄塩の50モル%以下を他の2価金属塩、例えば、マグネシウム、カルシウム、マンガン、ニッケル、コバルト、銅、亜鉛、ストロンチウム、バリウム等の1種または2種以上の各塩で置き換えることもでき、そのような置き換えによって製造される原料複合体も本発明に包含されるものである。

10 本発明の酸化複合体は、上記の如くして製造されたCPS-磁性酸化鉄原料複合体を酸化することにより製造することができる。この酸化に際して使用される原料複合体は、一般に、その磁性酸化鉄の粒子直径が約2～約30nm、好ましくは約4～15nmの範囲内にあり、また複合体の1テスラにおける磁化は鉄1g当り約10～約150emu、好ましくは約30～約150emuの範囲内にあり、さらに、複合体の鉄に対するCPSの重量比が約0.1～約5、好ましくは約0.2～約3の範囲内にあることができ、そして製法としては、前記第二の方法によって得られる複合体が好ましい。

15 本発明において、酸化は通常、原料複合体の水性ゾルに適当な酸化剤を作用させることにより行なうことができる。用いられる酸化剤としては、磁性酸化鉄を酸化して2価鉄含量を減少させるが、CPSを実質的に酸化もしくは分解しない、いわゆる副反応を起こさない酸化剤が好ましく、例えば、過酸化水素、オゾンなどの過酸化物や、さらに好ましくは酸素

ガスまたは酸素ガスと不活性ガスとの混合気体のような酸化性ガスを例示することができる。

過酸化物による酸化では、過酸化物として過酸化水素、オゾン等を例示することができるが、中でも過酸化水素が好ましい。酸化反応の際、原料複合体水性ゾルの濃度は、特に制限されるものではないが、一般には鉄として約0.1～約4M、好ましくは約0.5～約2Mの範囲内が適当である。この水性ゾルに過酸化物を2価鉄に対するモル比で約0.2～約4倍、好ましくは約0.3～約2倍添加し、好ましくは攪拌し、約0～約80°C、好ましくは約15～約40°Cで、約10分ないし約24時間、好ましくは約1～約5時間反応させるのがよい。所望ならば、亜硫酸ナトリウムなどの過酸化物の分解剤を添加した後、前記原料複合体の調製について述べたと同様の方法で精製及び／または調整を行い、所望の純度、濃度及びpHを有する本発明の酸化複合体水性ゾルを得ることができる。この際、特に限外濾過法で精製する場合に複合体のCPS含量が少なくなれば、所望の濃度までCPSを添加することは、安定性の向上のために好ましい。得られる水性ゾルは、それ自体既知の方法、好ましくは凍結乾燥法で乾燥することにより、粉末状の酸化複合体を得ることもできる。得られる酸化複合体の全体の粒子直径、複合体中の磁性酸化鉄の粒子直径及び複合体の1テスラにおける磁化は、原料複合体のそれと比較して実質的に変化がなく、同程度となる。

一方、酸化性ガスによる酸化では、用い得る酸化性ガスとして、酸素ガス、空気、または窒素ガス、アルゴンガス、またはヘリウムガスなどの不活性ガスと酸素ガスとの混合気体を例示することができるが、酸素ガスまたは空気が特に好ましい。所望ならば、白金、パラジウム、イ

リジュウム及びそれらの化合物などの触媒を用いることもできる。酸化反応に際して、原料複合体水性ゾルの濃度は、特に制限されるものではないが、上記と同様に約0.1～約4M、好ましくは約0.5～約2Mの範囲内が適当である。酸化反応は、攪拌下に酸化性ガス雰囲気で、所望により加圧下さらに／もしくは超音波照射下に行なうことができる。

酸化反応は、原料の性質と酸化性ガス濃度、温度、pH及び時間を主要因として進行するが、反応が進みすぎると複合体が凝集してくる、酸化反応の最適条件は実験的に簡単に決めることができる。一般には、室温ないし約120°C、好ましくは約60～約100°Cの温度において、最終pHが約3～約8、好ましくは約4～約6になるように調整し、約0.5時間ないし約3日間、好ましくは約2～約16時間反応させることができる。ついで必要ならば、上記と同様の方法で精製及び／または調整を行い、所望の純度、濃度及びpHを有する本発明の酸化複合体水性ゾルを得ることができる。この際、特に限外濾過法で精製する場合に複合体のCPS含量が少なくなれば、所望の濃度までCPSを添加することは同様に好ましいことである。得られる水性ゾルは前記と同様に、好ましくは凍結乾燥法で乾燥することにより、粉末状の酸化複合体として得ることができる。酸化性ガス、特に酸素ガスは、過酸化物を用いた場合に比較して副反応がより少ないと言う点で好ましい。原料複合体と比較した得られる酸化複合体の形状と物理的性質は、過酸化物を用いた場合と同様に実質的に変化がない。

かくして得られる本発明の酸化複合体は、原料に用いた複合体に比較して、少ない2価鉄含量と血圧に影響を及ぼさない性質、即ち高い安全性を有する他は、原料複合体とほぼ同様な性質を有する。以下に、本発

明の酸化複合体の性質についてさらに詳しく説明する。また、特に断わ
らない限り、該酸化複合体及び原料複合体についての各種性質の測定方
法は同じである。

本発明の酸化複合体におけるCPSに対する磁性酸化鉄の比率は、主
として用いた原料複合体の比率に左右され、更に酸化条件や精製条件に
よっても変化するが、一般に、原料複合体の比率の半分ないし同程度に
なる。この比率が小さくなりすぎる場合には、該酸化複合体の水性ゾル
に原料に用いるCPSを、例えば、鉄1重量部に対しCPSが約0.5
～約4、好ましくは約0.8～約2重量部になるまで添加すれば、酸化
複合体の安定性は向上する。

なお、本明細書における複合体中の鉄含量（この鉄は磁性酸化鉄に由
来する全鉄が含まれる）は、例えば Analytical Chem., 22 (195
0) 326に記載の方法に準拠し、o-フェナントロリンによる比色定
量法によって決定した値である。即ち、複合体の水性ゾルまたは粉末に
濃塩酸を添加し、含まれる鉄を完全に塩化物までに分解した後、適当に
希釈し、検液とする。この検液2mlに10%塩酸ヒドロキシルアミン
の1mlを、次いで0.4M酢酸バッファー(pH 4)中の0.1%o-
フェナントロリン試液の7mlを加え、波長510nmでの吸光度を求
める。一方、鉄基準液と測定に用いた水についても、同様に吸光度を求
め、その比率から鉄含量を決定する。

また、複合体中のCPS含量は、Analytical Chem., 25, 1656
(1953)に記載の方法に準拠し、硫酸アントロン法で測定したと
きの値である。すなわち、上記鉄含量の測定に用いた塩酸分解液を適當
に希釈した液を硫酸アントロン試薬に加えて発色させ、吸光度を測定

WO 92/22586

する。同時に複合体の製造に用いたCPSを基準物質として、同様に発色させ、吸光度を測定し、両者の吸光度の比率からCPSの含量を求める。

本発明の酸化複合体の全鉄に対する2価鉄含量は、酸化条件や磁性酸化鉄の粒子径などによって変化するが、一般に約0～約10%、好ましくは約2～約7%の範囲内であり、一方、原料複合体のそれは一般に約10～約30%である。なお、全鉄に対する2価鉄含量は、空気による測定中の酸化を防ぐために窒素置換などの配慮をした上で、10%塩酸ヒドロキシルアミンの代わりに1Mフッ化カリウムを用い、上記鉄含量の測定法と同様に操作して求める。

本発明の酸化複合体及び原料複合体を、粉末X線回折計（ターゲット：Co、波長：1.790 Å）を用いX線回折を行うと、両者の回折パターンはいずれもブロードではあるが、マグнетイト（Fe₃O₄）標準試料のそれによく一致する。回折角度については、原料複合体のそれはマグネットイトに一致もしくは近い値を取るが、酸化複合体のそれはやや高角側にずれる。これらのこととは、酸化により、複合体中の磁性酸化鉄の基本骨格は変わらないが、格子定数（結晶単位の長さ）が小さくなつたことを示している。なお、本発明の酸化複合体はX線回折学的に磁性酸化鉄をその要素とすることを意味し、結晶水やその表面に水酸基を有する磁性酸化鉄をも包含する。

また、ここで得られる回折ピークは、複合体に含まれる磁性粒子の直径の減少に従ってブロード、すなわち小さくなる。従って、複合体に含まれる磁性酸化鉄の粒子直径が0.1 μm以下においては、X線回折により粒子直径を測定することができる。すなわち、X線回折での最強ピ

ークについて下記シェラー (Scherrer) 式に従って粒子直径を計算することができる。

$$D = k \lambda / \beta \cdot \cos \theta,$$

$$\beta = \sqrt{B^2 - b^2}$$

ここで

D : 粒子直径 (Å)

k : 定数、0.9

λ : X線波長 (1.790 Å)

θ : ブラッグ角 (度)

B : 試料の半値幅 (ラジアン)

b : 標準試料の半値幅 (ラジアン)

なお、用いる標準試料は粒子直径 $1 \mu\text{m}$ 以上のマグネタイトである。

こうして求めた値は透過型電子顕微鏡から求めた値と比較的良く一致する。

さらに、本発明の酸化複合体全体の粒子直径は、動的光散乱法 [例えば、Polymer J.、13、1037-1043 (1981) 参照] により測定された値であり、本発明の酸化複合体は一般に約 $10 \sim 500 \text{ nm}$ 、好ましくは約 $20 \sim 200 \text{ nm}$ の範囲内の直径を有することができる。

本発明の酸化複合体は単なる混合物ではなく、磁性酸化鉄とCPSとの化合物である。このことは、例えば、本発明の酸化複合体水性ゾルをゲルカラムで分画すると、CPSの溶出位置より高分子側に溶出ピークが認められ、かつそのピークの分析により糖及び鉄の両方が検出され、そして該酸化複合体の製造工程中、該複合体より小さい粒子を通過させ

られるポアーサイズを有した限外濾過膜を用いて精製するとき、残った水性ゾルの糖と鉄の比率は次第に一定の値に収束してゆくことなどから理解できる。

本発明の酸化複合体の磁性（例えば、磁化及び保磁力）は、室温で振動試料式磁力計を用いて磁化－磁場曲線（いわゆるM－H曲線）を描き、これから求めることができる。本発明の酸化複合体の1テスラにおける磁化は、一般に鉄1g当たり約10～約150emu、好ましくは約30～約150emuの範囲内である。また、本発明の酸化複合体の保磁力は約30エルステッド以下であり、実質的に超常磁性である。

水性ゾルの形態の本発明の酸化複合体の T_2 緩和能力は、本発明の酸化複合体を水で種々の濃度に希釈した水性ゾル及び希釈に用いた水について、60MHz（磁場が約1.4テスラ）のCW-NMRを用い、水のプロトンの共鳴曲線を描き、得られるピークの半値幅： $\Delta\nu_{1/2}$ （単位：Hz）を求め、さらに $1/T_2$ （単位： sec^{-1} ）＝ $\pi \cdot \Delta\nu_{1/2}$ を計算し、 $1/T_2$ と測定試料の水性ゾル中の鉄濃度（単位：mM）との関係をグラフにプロットし、最小自乗法で求めた直線の傾きから求めることができる〔単位：（ $\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ 〕。かようにして算出される本発明の水性ゾルの形態の酸化複合体の T_2 緩和能力は、一般に、約5～約1000（ $\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ 、好ましくは約10～約500、さらに好ましくは約20～約300（ $\text{sec} \cdot \text{mM})^{-1}$ の範囲内である。

原料複合体の水性ゾルを例えれば兎に静脈内投与すると、従来既知の様々な磁性酸化鉄製剤と同様に、数分後には兎の血圧は著しく低下し、場合によっては死に至ることさえある。ところが、全く予想外のことではあるが、本発明の酸化複合体では、この様な血圧低下が全く起こらない

か、もしくは血圧低下の程度が非常に小さく、著しい改善がみられる。

同様に、本発明の酸化複合体は血小板凝集作用が著しく少ないことも分かった。即ち、各複合体の水性ゾルを例えば兎に静脈内投与し、5分後の血液中の血小板数を投与直前の血小板数に対する比率（すなわち血小板の残存率、%）を求めるとき、一般に、原料複合体では約1～約20%であるのに対し、本発明の酸化複合体では約20～約100%となり、著しく改善される。

さらに、本発明の酸化複合体は、従来既知の未酸化複合体もしくは微小球と比較して、牛製アルブミンとの相互作用に大きな差を有する。すなわち、後記試験例3に示すように、従来既知の複合体もしくは本発明の酸化複合体の各ゾルと牛製アルブミン水溶液とを混和するとき、従来既知の複合体はアルブミンと相互作用を起こし、著しい凝集が起るが、本発明の酸化複合体ではアルブミンとの相互作用はきわめて弱く、相互作用の結果生ずる凝集は実質的に認められないかもしくは極くわずかである。

一方、マウスを用いた静脈内投与による各複合体の急性毒性LD₅₀の比較では、本発明の酸化複合体のそれは、鉄として約15～約80mmol/Kgであり、原料複合体のそれと同等である。

また、各複合体を鉄として5mmol/Kgの量ずつマウスに静脈内投与し、その5分後に摘出した肺の病理組織学的検査成績による比較でも、本発明の酸化複合体のそれは原料複合体のそれと同様である。すなわち、ヘマトキシリソ・エオシン染色およびベルリン・ブルー染色を施したいずれの組織標本でも塞栓を認められず、それ以外の異常も認められない。

さらに、各複合体水性ゾルの少なくとも複合体の磁性酸化鉄部分は、
静脈内投与後速やかに細網内皮系の発達した臓器、例えば肝臓、脾臓、
骨髄等に集積し易く、特に低投与量（例えば鉄として $0.1 \text{ mmol}/\text{Kg}$ 以下）では投与した複合体の大半、おそらく実質的に全てが肝臓の
5 クッパー星細胞に集積することが分かつている。この事実に基き、CW
-NMR を用いて肝臓の磁化の程度を測定することにより、これら複合
体の代謝性を評価した。

すなわち、複合体水性ゾルを鉄として $0.1 \text{ mmol}/\text{Kg}$ の量をラット
10 に静脈内投与し、例えば投与後 1 時間、2 時間、4 時間、1 日、3 日、
7 日及び 14 日経過した時点でラットの肝臓について、 T_2 緩和能力の
測定と同様にして $1/T_2$ (単位: s^{-1}) を求め、未投与ラット群
の肝臓の $1/T_2$ 値による補正をした後、投与後の時間との関係から各
複合体の代謝性を半減期 (Half life) として算出する。本発明の好ま
しい態様、例えば実施例 1 に示される酸化複合体の半減期は約 4 日であ
り、一方、参考例 2 に示される原料複合体のそれも約 4 日であり、酸化
15 は代謝性に対して影響を与えないことが分る。

しかし、本発明の酸化複合体は生物学分野及び医療分野、例えば鉄
補給剤、X線造影剤、MRI 造影剤、温熱療法の際の発熱助剤、血流の
測定、さらには磁場を利用した局所への薬物の集中投与の際の担体など
20 として安全に使用することができ、この内でも、血管内へ投与する使用
方法において特に有利に使用することができる。

MRI 造影剤として好ましく使用し得る本発明の酸化複合体は、投与
方法や目的とする組織によって広く変え得るが、一般に、CPS の数平
均分子量が約 500～約 30 万、好ましくは約 1000～約 5 万、より

好ましくは約1500～約2万の範囲内にあり、磁性酸化鉄の粒子直径が約2～約30nm、好ましくは約5～約15nmの範囲内にあり、そしてT₂緩和能力が一般に約5～約1000(sec·mM)⁻¹、好ましくは約10～約500(sec·mM)⁻¹、より好ましくは約20～約300(sec·mM)⁻¹の範囲内にあるものが好適である。

本発明の酸化複合体をMR I造影剤として使用する場合には、酸化複合体を水性ゾルの形態で使用することが望ましい。この際の酸化複合体の濃度は広範囲にわたつて変えることができるが、通常鉄換算で約1mmol/1ないし約4mmol/1、好ましくは約0.01～約2mmol/1の範囲内を例示することができる。また、水性ゾルの調製に際しては、例えば塩化ナトリウムなどの無機塩；ブドウ糖などの単糖類；マンニット、ソルビット等の糖アルコール類；酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酒石酸塩などの有機酸塩；あるいはリン酸緩衝剤、トリス緩衝剤などの生理学的に許容される種々の助剤を添加することもでき、さらには種々のリングル液に該酸化複合体水性ゾルを添加することもできる。

本発明の酸化複合体をMR I造影剤として使用する場合のその使用量は、診断部位によって異なるが、通常鉄換算で約1μmol/Kg～約10mmol/Kg体重、好ましくは約2μmol/Kg～約1mmol/Kg体重の範囲内である。投与方法としては、例えば、静脈内、動脈内、膀胱内、筋肉内、皮下などへの注射、注入などが挙げられるが、場合によっては経口投与または腸内直接投与も可能である。例えば好ましい形態の本発明の酸化複合体を静脈内投与すると、比較的速く、例えば数時間以内にその多くが細網内皮系、特に肝臓に集まり、その結果肝臓のMR I撮影が好適におこなわれる。この際、肝臓にたとえば癌など

の細網内皮系機能の低下した病変部があれば、他の正常部位と比較して病変部には本発明の酸化複合体が全くまたは少ししか集まらないので、病変部のMR I撮影による特定を容易に行うことができる。なお、本発明の酸化複合体はT₂画像のみならずT₁画像に対しても造影剤としての効果を有している。

図面の簡単な説明

図1は、実施例1で製造された酸化複合体の粉末X線回折計（ターゲット：Co、波長：1.790 Å）を用いて得られたX線回折図であり、

図2は、参考例2で製造された原料複合体の粉末X線回折計（ターゲット：Co、波長：1.790 Å）を用いて得られたX線回折図である。

実施例

以下、本発明を参考例、実施例等によってさらに具体的に説明する。

参考例1

分子量4,000のデキストランを水酸化ナトリウムを用いて加熱処理して得られるカルボキシデキストラン（変換率95%）105gを水350mlに溶解し、これに1M-塩化第二鉄水溶液140ml（塩化第二鉄・六水塩37.8g相当）に塩化第一鉄・四水塩13.6gを窒素気流下で溶解した水溶液を加え、さらに加温しながら、攪拌下に3規定水酸化ナトリウム水溶液を242ml添加する。次いで6規定塩酸を加えpHを7.0に調整した後、1時間30分加熱還流する。冷後、2,100×Gで30分間遠心分離し、上清体積の93%のエタノールを添加して複合体を沈澱させ、2,100×Gで10分間遠心分離し、得られた沈澱物を水に溶解し、16時間流水透析する。透析液のpHを水酸化ナトリウムで7.2に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルタ

— (ポアーサイズ : 0.2 μm) で濾過を行ない目的とする複合体水性ゾル (参考例1) 190 ml (鉄濃度 : 56 mg/m³) を得る。磁性酸化鉄の粒子径 : 8.8 nm、全体の粒子径 : 70 nm、CPS/鉄重量比 : 1.08、1テスラにおける磁化 : 91 emu/1 g鉄、T₂緩和能力 : 230 (mM · sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合 : 21%。

参考例2

参考例1で用いたカルボキシデキストラン1,050 gを水3,500 mlに溶解し、これに1M-塩化第二鉄水溶液1,400 ml (塩化第二鉄・六水塩378 g相当) に塩化第一鉄・四水塩136 gを窒素気流下で溶解した水溶液を加え、さらに加温しながら、攪拌下に3規定水酸化ナトリウム水溶液を2,420 ml添加する。次いで6規定塩酸を加えpHを7.1に調整した後、2時間加熱還流する。冷後2,100 × Gで30分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルター (ポアーサイズ : 0.2 μm) で濾過し、水を加えて101とし、限外濾過 (分画分子量 : 10万ダルトン) で1.5 lまで濃縮した後、濃縮液に水を加えながら排出液量が121になるまで限外濾過 (分画分子量 : 10万ダルトン) を行ない、濾過内液にカルボキシデキストランと鉄の重量比が1:1になるように所定量のカルボキシデキストランを添加した後、pHを水酸化ナトリウムで7.0に調整し、2,100 × Gで1時間30分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルター (ポアーサイズ : 0.2 μm) で濾過を行なって目的とする複合体水性ゾル (参考例2) 1.9 l (鉄濃度 : 57 mg/m³) を得る。磁性酸化鉄の粒子径 : 8.6 nm、全体の粒子径 : 64 nm、CPS/鉄重量比 : 1.03、1テスラにおける磁化 : 89 emu/1 g鉄、T₂緩和能力 : 220 (mM · sec)⁻¹、

全鉄中の二価鉄割合：23%。

参考例3

アンバーライト IRA-410（ロームアンドハース社製イオン交換樹脂）1000mlに水580mlを加えて得られるスラリーに、攪拌下に30°C以下でpHを8.0～8.7に維持しながら1M塩化第二鉄水溶液200mlおよび1M塩化第一鉄水溶液100mlの混合液を添加し、続いて濃塩酸を加えてpHを1.5にし、同一pHで1時間攪拌する。次いでイオン交換樹脂と濾別したゾルを10時間流水透析すると、磁性酸化鉄水性ゾル（pH3.5、鉄濃度12.8mg/ml）が得られる。このゾル980mlに参考例1で用いたカルボキシデキストラン100gを加えて40分間加熱還流し、冷後、エタノール840mlを加え、2,100×G、10分間遠心分離する。沈殿を水に溶解し16時間流水透析し、透析液に所定量のカルボキシデキストランを添加し、これを水酸化ナトリウム水溶液でpHを7.2に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルター（ポアーサイズ：0.45μm）で濾過を行ない目的とする複合体水性ゾル（参考例3）210ml（鉄濃度：54mg/ml）を得る。磁性酸化鉄の粒子径：6.5nm、全体の粒子径：80nm、CPS/鉄重量比：0.86、1テスラにおける磁化：85emu/1g鉄、T₂緩和能力：195(mM·sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合9.0%。

参考例4

分子量20,000のデキストランを水酸化ナトリウムを用いて加熱処理して得られるカルボキシデキストラン（変換率90%）167gを水700mlに溶解し、これに1M-塩化第二鉄水溶液280ml（塩

化第二鉄・六水塩 75.6 g 相当) に塩化第一鉄・四水塩 27.2 g を窒素気流下で溶解した水溶液を加え、さらに加温しながら、攪拌下に 3 規定水酸化ナトリウム水溶液を 484 ml 添加する。次いで 6 規定塩酸を加え pH を 7.0 に調整した後、1 時間 30 分加熱還流する。冷後、2, 100 × G で 30 分間遠心分離し、上清の 55% のエタノールを添加して複合体を沈澱させ、2, 100 × G で 10 分間遠心分離する。得られた沈澱物を水に溶解し、その溶液体積の 57% のエタノールを添加して複合体を再沈澱させ、2, 100 × G で 10 分間遠心分離し、得られた沈澱物を水に溶解し、16 時間流水透析する。透析液の pH を水酸化ナトリウムで 7.2 に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルター(ポアーサイズ: 0.2 μm) で濾過を行ない目的とする複合体水性ゾル(参考例 4) 390 ml (鉄濃度: 56 mg/m1) を得る。磁性酸化鉄の粒子径: 7.8 nm、全体の粒子径: 63 nm、CPS/鉄重量比: 1.12、1 テスラにおける磁化: 85 emu/1 g 鉄、T₂ 緩和能力: 195 (mM · sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合: 16%。

参考例 5

分子量 10,000 のデキストリン(デンプン)を水酸化ナトリウムを用いて加熱処理して得られるカルボキシデキストリン(変換率 73%) 147 g を水 700 ml に溶解し、これに 1 M- 塩化第二鉄水溶液 280 ml (塩化第二鉄・六水塩 75.6 g 相当) に塩化第一鉄・4 水塩 27.2 g を窒素気流下で溶解した水溶液を加え、さらに加温しながら、攪拌下に 3 規定水酸化ナトリウム水溶液 484 ml を添加する。次いで 6 規定塩酸を加えて pH を 7.0 に調整した後、1 時間加熱還流する。冷後、2, 100 × G で 30 分間遠心分離し、上清液にエタノールを 0.

7.4倍量添加して複合体を沈澱させ、得られた沈澱物を水に再溶解し、
16時間流水透析する。透析液のpHを水酸化ナトリウムで7.2に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルター（ポアーサイズ：0.
45 μm）で濾過し、原料複合体水性ゾル（参考例5）390ml（鉄
濃度：56mg/ml）を得る。磁性酸化鉄の粒子径：5.1nm、全
5 体の粒子径：53nm、CPS/鉄重量比：2.04、1テスラにおける
磁化：45emu/1g鉄、T₂緩和能力：40 (mM · sec)⁻¹、
全鉄中の二価鉄割合：13%。

比較例1

分子量20,000のデキストラン75gを水56mlと25%アン
モニア水100mlの混合液に溶解し、そこへ塩化第一鉄・六水塩20.
5gおよび塩化第二鉄・四水塩11.3gを含有する150mlの溶液
を激しく攪拌しながら5分間かけて徐々に加える。生成したスラリーを
超音波破碎（20分）し、80°Cで30分攪拌したのち、塩酸でpHを
10.6とし、次いで加熱（100°C、1時間）、冷却し、2,100×G
15で30分遠心分離する。得られる上清液420mlにエタノール320
mlを加えて、複合体を沈澱させ、2,100×Gで10分遠心分離す
る。得られた沈澱物を水に溶解させ（400ml）、エタノール（20
20 5ml）を加えて複合体を再沈澱させ、2,100×Gで10分遠心分
離する。得られた沈澱物を水に溶解し、16時間流水透析する。透析液
のpHを水酸化ナトリウムで7.6に調整し、減圧濃縮し、次いでメン
ブレンフィルター（ポアーサイズ：0.45μm）で濾過を行なって目的とする微小球水性ゾル（115ml（鉄濃度：57mg/ml）を得
る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：7.4nm、全体の粒子径：96nm、

C P S／鉄重量比：1.25、1テスラにおける磁化：90 emu／1 g 鉄、 T_2 緩和能力：220 (mM・sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：14%。

実施例1

参考例1で用いたと同じカルボキシデキストラン1,050 g を参考例2に従つて水3,500 ml に溶解し、これに1M-塩化第二鉄水溶液1,400 ml (塩化第二鉄・六水塩378 g相当) に塩化第一鉄・四水塩136 gを窒素気流下で溶解した水溶液を加え、さらに加温しながら、攪拌下に3規定水酸化ナトリウム水溶液を2,420 ml 添加する。次いで6規定塩酸を加えpHを7.1に調整した後、2時間加熱還流する。冷後2,100×Gで30分間遠心分離し、上清をメンブレンフィルター(ポアーサイズ：0.2 μm)で濾過し、その濾過液に水を加えて101とし、限外濾過(分画分子量：10万ダルトン)で1.5 lまで濃縮した後、濃縮液に水を加えながら排出液量が121になるまで限外濾過(分画分子量：10万ダルトン)を行なって、カルボキシデキストランと鉄の重量比が0.4:1となった複合体水性ゾル1.91 (鉄濃度：57 mg/m1) のpHを水酸化ナトリウムで7.5に調整した後、水酸化ナトリウムで反応pHが4.2以下にならないように調整しながら酸素ガスを用いて95°Cで3時間30分酸化する。冷却後、反応液を限外濾過(分画分子量：10万ダルトン)で1 lに濃縮し、濃縮液に水を加えながら排出液量が121になるまで限外濾過(分画分子量：10万ダルトン)を行ない、濾過内液にカルボキシデキストランと鉄の重量比が1:1になるように所定量のカルボキシデキストランを添加した後、pHを水酸化ナトリウムで7.0に調整し、遠心分離し、上

清をメンブレンフィルター（ポアーサイズ：0.2 μm）で濾過を行なつて目的とする複合体水性ゾル（実施例1）1.751（鉄濃度：56 mg/m³）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：8.5 nm、全体の粒子径：67 nm、CPS/鉄重量比：1.08、1テスラにおける磁化：87 emu/1 g鉄、T₂ 緩和能力：210 (mM·sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：3.4%。

実施例2

参考例1に従って調製した複合体水性ゾル1.1（鉄濃度：56 mg/m³）を、酸素ガスを用いて95°Cで7時間酸化し、冷却後、実施例1と同様に処理して目的とする複合体水性ゾル（実施例2）950 ml（鉄濃度：55 mg/m³）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：8.8 nm、全体の粒子径：68 nm、CPS/鉄重量比：1.05、1テスラにおける磁化：88 emu/1 g鉄、T₂ 緩和能力：220 (mM·sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：3.3%。

実施例3

参考例2に従って合成反応を行ない、その加熱還流液の濾過液に水を加えて101とした複合体反応液を、限外濾過（分画分子量：10万ダルトン）で1.5 lまで濃縮してカルボキシデキストランと鉄の重量比が1.4:1となった複合体水性ゾル1.1（鉄濃度：56 mg/m³）を、酸素ガスを用いて95°Cで7時間酸化し、冷却後、実施例1と同様に処理して目的とする複合体水性ゾル（実施例3）960 ml（鉄濃度：56 mg/m³）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：8.6 nm、全体の粒子径：69 nm、CPS/鉄重量比：1.07、1テスラにおける磁化：86 emu/1 g鉄、T₂ 緩和能力：220 (mM·sec)⁻¹、

全鉄中の二価鉄割合：3.6%。

実施例4

参考例4に従って調製した複合体水性ゾル300ml（鉄濃度：56mg/ml）を実施例1と同様にして酸素ガスを用いて95°Cで3時間30分酸化し、冷却後、16時間流水透析する。透析液のpHを水酸化ナトリウムで7.2に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルター（ポアーサイズ：0.2μm）で濾過を行ない目的とする複合体水性ゾル（実施例4）285ml（鉄濃度：55mg/ml）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：7.7nm、全体の粒子径：78nm、CPS/鉄重量比：0.97、1テスラにおける磁化：84emu/1g鉄、T₂緩和能力：205(mM・sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：1.7%。

実施例5

参考例3に従って調製した複合体水性ゾル300ml（鉄濃度：56mg/ml）を実施例1と同様にして酸素ガスを用いて90°Cで3時間酸化し、冷却後、16時間流水透析する。透析液にカルボキシデキストランと鉄の重量比が1:1になるように所定量のカルボキシデキストランを添加した後、pHを水酸化ナトリウムで7.2に調整し、減圧濃縮し、次いでメンブレンフィルター（ポアーサイズ：0.2μm）で濾過を行ない目的とする複合体水性ゾル（実施例5）285ml（鉄濃度：54mg/ml）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：6.4nm、全体の粒子径：88nm、CPS/鉄重量比：1.10、1テスラにおける磁化：85emu/1g鉄、T₂緩和能力：220(mM・sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：2.1%。

実施例6

参考例2に従って調製した複合体水性ゾル500ml（鉄濃度：56 mg/m³）に室温で35%過酸化水素水6.7mlを加え、2時間攪拌し、亜硫酸ナトリウム13gを加えた後、流水で16時間透析する。
 5 目的とする複合体水性ゾル（実施例6）450ml（鉄濃度：56mg/m³）を得る。酸化磁性酸化鉄の粒子径：8.7nm、全体の粒子径：
 10 : 58nm、CPS/鉄重量比：0.76、1テスラにおける磁化：89emu/1g鉄、T₂緩和能力：200(mM·sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：5.3%。

実施例7

参考例5で得られた複合体水性ゾル300mlを、水酸化ナトリウムで反応液のpHが4.3以下にならないように調整しながら、酸素ガスを用いて95°Cで3時間30分間酸化する。冷後、16時間流水透析し、以下実施例4と同様にして目的とする酸化複合体水性ゾル（実施例7）290ml（鉄濃度：55mg/m³）を得る。酸化酸化鉄の粒子径：5.6nm、全体の粒子径：45nm、CPS/鉄重量比：1.53、1テスラにおける磁化：43emu/1g鉄、T₂緩和能力：37(mM·sec)⁻¹、全鉄中の二価鉄割合：3.4%。

試験例1

参考例1～5、比較例1および実施例1～7で製造した各複合体水性ゾルについて血圧試験を行なった。体重2.5～3kgの兎を用い、シリコンチューブによって水銀マノメーターに繋がれたカニューレを兎頸動脈内に挿入し、血圧の変動に伴う水銀の動きをガラス製フロート付き

ヘルベルを介して煤煙紙上に描かせる観血法を行なった。被検液は、複合体濃度が鉄として $10\text{ mg}/\text{ml}$ となるように生理食塩水を用いて希釈調製したものを用い、 $10\text{ mg}\text{ 鉄}/\text{kg}$ 兎体重の投与量を耳介静脈内に投与した。血圧測定の結果を表1に示す。

5

試験例2

参考例1～5、比較例1および実施例1～7で製造した各複合体水性ゾルについて血小板数に与える影響を調べた。体重 $2\sim 3\text{ kg}$ の兎を用い、対照血を採血した後、被検液を鉄として $5\text{ mg}/0.5\text{ ml}/\text{kg}$ の量ずつ静脈内投与し、その5分後および60分後に採血し、ブレッヒャーークロンカイト(Brecher-Cronkite)法により、EDTA加血とし、1%シウ酸アンモニウム液で101倍希釈し、血球計算板に入れて位相差顕微鏡で血小板数を測定した。血小板数の測定結果を対照血の血小板数に対する比率(残存率)として表1に示す。

10

15

20

表1. 血圧測定結果および血小板数測定結果

複合体番号	血 圧	血小板数(残存率: %)	
		投与後時間	
		5分	1時間
参考例1	36 mmHg 低下	3	9
参考例2	44 mmHg 低下	4	12
参考例3	31 mmHg 低下	6	10
参考例4	49 mmHg 低下	2	8
参考例5	26 mmHg 低下	15	63
比較例1	50 mmHg 低下	1	7
実施例1	低下せず	68	105
実施例2	低下せず	57	101
実施例3	低下せず	52	83
実施例4	低下せず	56	90
実施例5	低下せず	20	60
実施例6	低下せず	38	85
実施例7	低下せず	66	90

試験例 3

参考例1～5、比較例1および実施例1～7で得られた各複合体水性ゾルについて、牛製アルブミン（和光純薬株式会社製、一級試薬）との相互作用を調べた。各複合体水性ゾルをマクルバイン（McIlvaine）の緩衝液（リン酸水素二ナトリウムークエン酸緩衝液：pH 3.4）で100倍に希釈した液（鉄濃度0.55 mg/m1相当）と、等容量の1%アルブミン水溶液を混合し、60℃の恒温槽中で60分間放置した。反応液を室温まで放冷した後、波長800 nmでの透過率を測定した。なお、対照品として緩衝液とアルブミン水溶液の代わりに蒸留水のみで各複合体水性ゾルを測定濃度に希釈した液（透過率100%とする）を用いた。結果を表2に示す。

表2. アルブミンとの相互作用

複合体番号	透過率(%)	複合体番号	透過率(%)
参考例1	3	実施例2	92
参考例2	2	実施例3	96
参考例3	15	実施例4	96
参考例4	2	実施例5	94
参考例5	2	実施例6	73
比較例1	10	実施例7	96
実施例1	83		

試験例 4

参考例1～5及び実施例1～7で製造した複合体水性ゾルについて、インビボMR像の撮影を行った。即ち、肝臓内にノビコフ（Novikoff）腫瘍を移植したウイスター（Wistar）系ラットに複合体

水性ゾルを金属として $20\text{ }\mu\text{m o l}$ 量ずつ静脈内投与し、シスコ（Sisco）社（米国、カリフォルニア）製動物用MR I 装置を用いてスピンエコー法により、繰り返し時間 400 m s e c 、エコー時間 25 m s e c の条件でMR像の撮影を行った。

5 複合体水性ゾル投与前のMR像では、いずれのラットにおいても、腫瘍結節が不明瞭で、大きさも形状も、また、位置すらも判別できなかっ
た。

一方、参考例1～5で製造した複合体水性ゾルを投与した後のMR像
では、いずれのラットにおいても、肝臓部位の腫瘍結節が位置、形状及
10 び大きさともに明確に判別できた。

また実施例1～7で製造した複合体水性ゾルを投与した後のMR像も、
参考例1～5で製造した複合体水性ゾルの場合と全く同様に、いずれの
ラットにおいても、肝臓部位の腫瘍結節が位置、形状及び大きさともに
明確に判別できた。

15 産業上の利用可能性

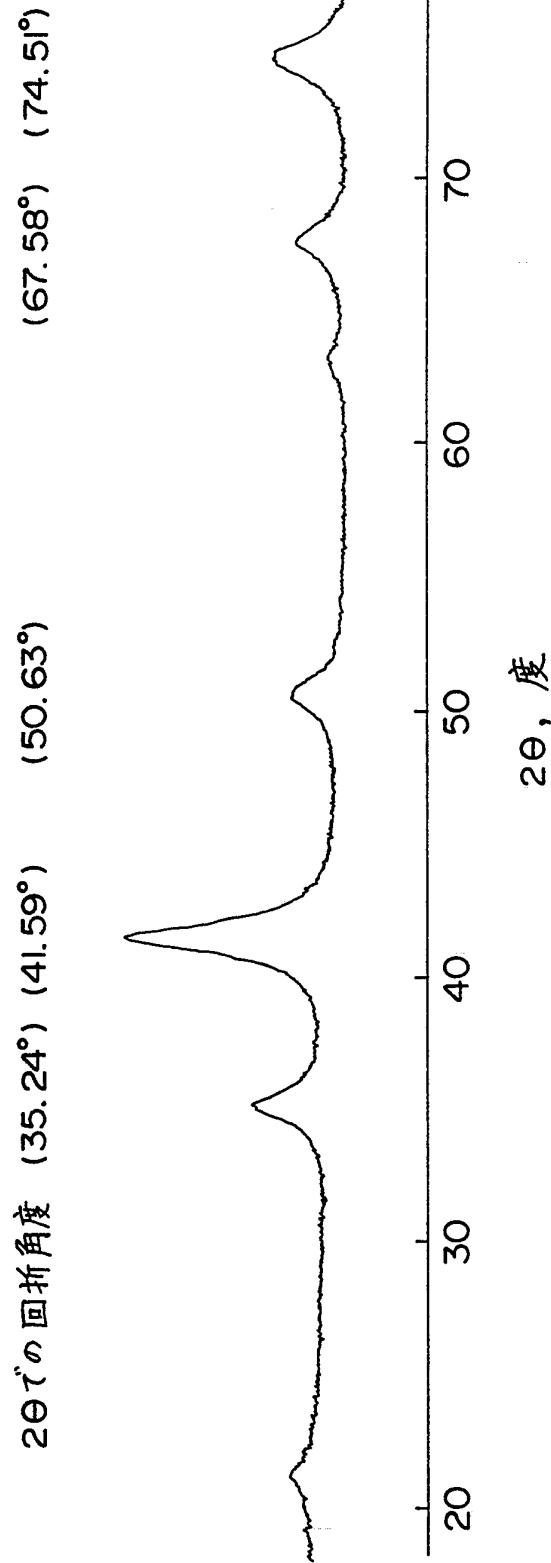
以上述べたとおり、本発明の酸化複合体は、毒性が極めて少なく且つ
安全性に優れており、動物の血管内に直接投与しても血圧低下作用を殆
んどまたは全く示さず、しかも血小板凝集作用も小さく、生物学分野及
び医療分野において、鉄補給剤、X線造影剤、MR I 造影剤、温熱療法
20 の際の発熱助剤、血流の測定、磁場を利用した局所への薬物の集中投与
の際の担体などとして利用することができる。

請求の範囲

1. 水溶性カルボキシ多糖と磁性酸化鉄超微粒子とからなる複合体であって、該複合体が酸化されていることを特徴とする水溶性カルボキシ多糖-磁性酸化鉄酸化複合体。
- 5 2. 水溶性カルボキシ多糖がデキストラン、デンプン及びブルランから選ばれる請求の範囲第1項記載の酸化複合体。
3. 水溶性カルボキシ多糖の分子量が500から300,000の範囲内にある請求の範囲第1または2項記載の酸化複合体。
- 10 4. 水溶性カルボキシ多糖の分子量が1000から50,000の範囲内にある請求の範囲第1～3項のいずれかに記載の酸化複合体。
5. 磁性酸化鉄の粒子径が2ないし30nmの範囲内にあり、鉄1gあたりに換算した1テスラにおける磁化が10ないし150emuの範囲内にある請求の範囲第1～4項のいずれかに記載の酸化複合体。
- 15 6. 複合体が水性ゾルの状態で酸化されている請求の範囲第1～5項のいずれかに記載の酸化複合体。
7. 酸化が酸素ガス、空気及び過酸化水素から選ばれる酸化剤を用いて行なわれる請求の範囲第1～6項のいずれかに記載の酸化複合体。
8. 酸化が室温ないし120°Cの範囲内の温度で行なわれる請求の範囲第1～7項のいずれかに記載の酸化複合体。
- 20 9. 請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の酸化複合体を含有することを特徴とするMR I造影剤。
10. 請求の範囲第1～8項のいずれかに記載の酸化複合体の有効量を被験者に投与し、MR I造影を行なうことを特徴とするMR I造影法。

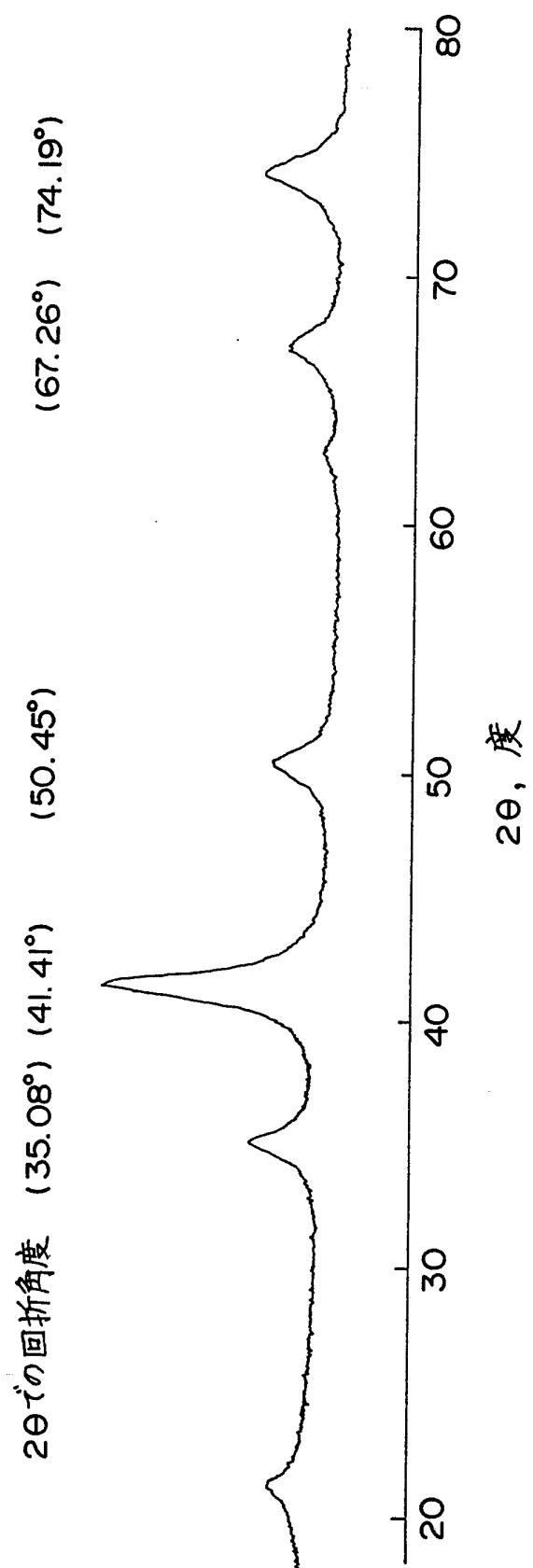
Fig. I

実施例 1



2/2

Fig. 2 参考例2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP92/00735

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl⁵ C08B31/18, 37/00, 37/02, 37/12, 37/18, A61K49/00

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
IPC	C08B15/04, 31/18, 37/00, 37/02, 37/12, 37/18, A61K49/00, 49/04, A61N1/40, H01F1/00, 1/28

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 51-151320 (Meito Sangyo K.K.), December 25, 1976 (25. 12. 76) & US, A, 4,101,435	1-9
A	JP, A, 1-500196 (Advanced Magnetics, Inc.), January 26, 1989 (26. 01. 89) & EP, A, 275,285 & US, A, 4,770,183	1-9
A	US, A, 4,452,773 (Canadian Patents and Development Limited.), June 5, 1984 (05. 06. 84)	1-9
A	JP, A, 3-134001 (Meito Sangyo K.K.), June 7, 1991 (07. 06. 91) & EP, A, 450,092	1-9
A	JP, A, 1-235851 (Shering AG.), September 20, 1989 (20. 09. 89) & US, A, 4,829,984	1-9
A	JP, A, 61-233001 (Polydex Pharmaceuticals Ltd.), October 17, 1986 (17. 10. 86)	1-9

* Special categories of cited documents: ¹⁰

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

"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

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

August 4, 1992 (04. 08. 92)

Date of Mailing of this International Search Report

August 25, 1992 (25. 08. 92)

International Searching Authority

Japanese Patent Office

Signature of Authorized Officer

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM THE SECOND SHEET

A	& EP, A, 150,085 & US, A, 4,788,281 JP, A, 57-109802 (Thomas C. Usher), July 8, 1982 (08. 07. 82) & EP, A, 51,707 & US, A, 4,370,476	1-9
A	JP, A, 57-42701 (Laboratorien Hausmann AG.), March 10, 1982 (10. 03. 82) & EP, A, 44,050 & US, A, 4,599,405	1-9

V. OBSERVATIONS WHERE CERTAIN CLAIMS WERE FOUND UNSEARCHABLE ¹

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2) (a) for the following reasons:
1. Claim numbers 10, because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

It corresponds with a diagnosis of the human or animal body.

2. Claim numbers . . . , because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claim numbers . . . , because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of PCT Rule 6.4(a).

VI. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING ²

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims of the international application.

2. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims of the international application for which fees were paid, specifically claims:

3. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claim numbers:

4. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, the International Searching Authority did not invite payment of any additional fee.

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号PCT/JP 92/00735

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. C08B 31/18, 37/00, 37/02, 37/12, 37/18, A61K 49/00		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	C08B 15/04, 31/18, 37/00, 37/02, 37/12, 37/18, A61K 49/00, 49/04, A61N 1/40, H01F 1/00, 1/28	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
III. 関連する技術に関する文献		
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	請求の範囲の番号
A	J P, A, 51-151320 (名糖産業株式会社), 25. 12月. 1976 (25. 12. 76) & U S, A, 4,101,435	1-9
A	J P, A, 1-500196 (アドバンスド マグネティックス, インコーポレーテッド), 26. 1月. 1989 (26. 01. 89) & E P, A, 275,285 & U S, A, 4,770,183	1-9
A	U S, A, 4,452,773 (Canadian Patents and Development Limited), 5. 6月. 1984 (05. 06. 84)	1-9
A	J P, A, 3-134001 (名糖産業株式会社), 7. 6月. 1991 (07. 06. 91) & E P, A, 450,092	1-9
※引用文献のカテゴリー		
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、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の後に公表された文献であって出 願と矛盾するものではなく、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の文献		
IV. 認証		
国際調査を完了した日 04. 08. 92	国際調査報告の発送日 25.08.92	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 稲村 慶樹	4 C 7 6 2 4

第2ページから続く情報

	(III 欄の続き)	
A	JP, A, 1-235851 (シェーリング・アクチングゼル シャフト), 20. 9月. 1989 (20. 09. 89) & US, A, 4,829,984	1-9
A	JP, A, 61-233001 (ポリデックス ファーマスー ティカルズ, リミテッド), 17. 10月. 1986 (17. 10. 86) & EP, A, 150,085 & US, A, 4,788,281	1-9

V. 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. 請求の範囲 10 は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

人又は動物の身体の診断方法に該当する。

2. 請求の範囲 _____ は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

3. 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲でありかつPCT規則6.4(a)第2文の規定に従って起草されていない。

VI. 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

1. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかつたので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
3. 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかつたので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
請求の範囲 _____
4. 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかつた。

追加手数料異議の申立てに関する注意

- 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。
- 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかつた。

III. 関連する技術に関する文献(第2ページからの続き)

引用文献の カテゴリ*	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	請求の範囲の番号
A	JP, A, 57-109802 (トーマス・シー・ウシャー), 8. 7月. 1982 (08. 07. 82) & EP, A, 51,707 & US, A, 4,370,476	1-9
A	JP, A, 57-42701 (ラボラトリエン・ハウスマン・ アクチーエンゲゼルシャフト), 10. 3月. 1982 (10. 03. 82) & EP, A, 44,050 & US, A, 4,599,405	1-9