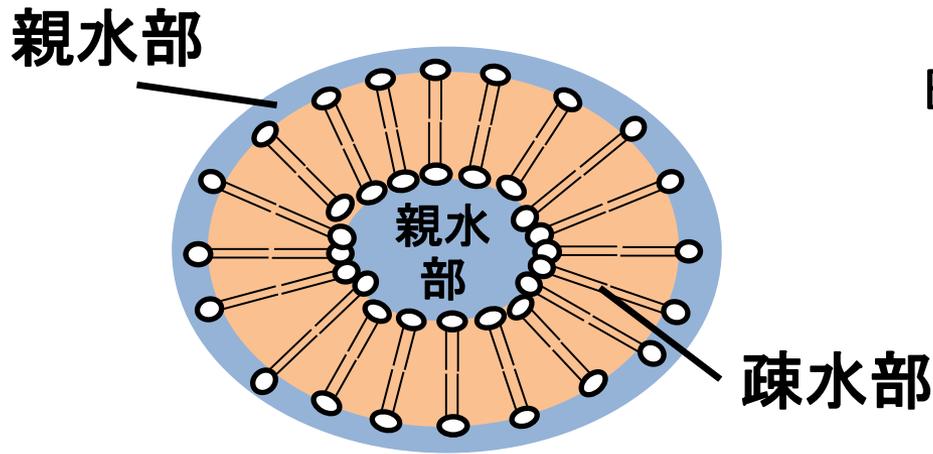


実用性の高い高濃度 リポソームの製造方法

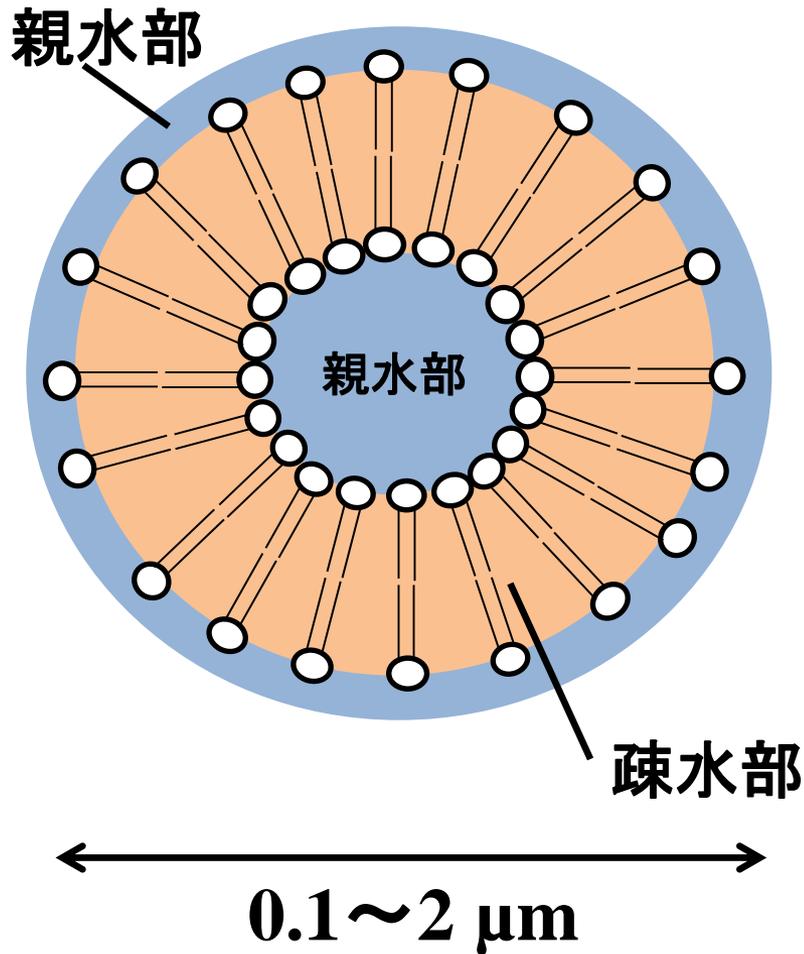
福岡大学・工学部 化学システム工学科

教授 三島 健司



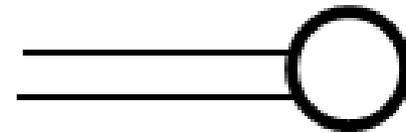
E-mail; mishima@fukuoka-u.ac.jp

リポソームについて

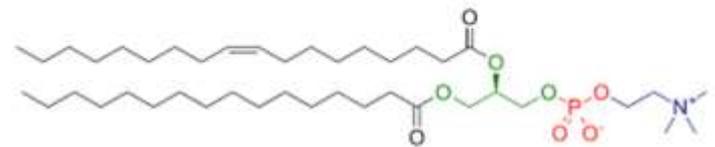


- ・リン脂質分子が二重になった構造を持つ直径 **0.1-2μmのマイクロナノカプセル**
- ・高い生体適応性
- ・親水疎水いずれの薬剤も内包可能

リン脂質分子



||

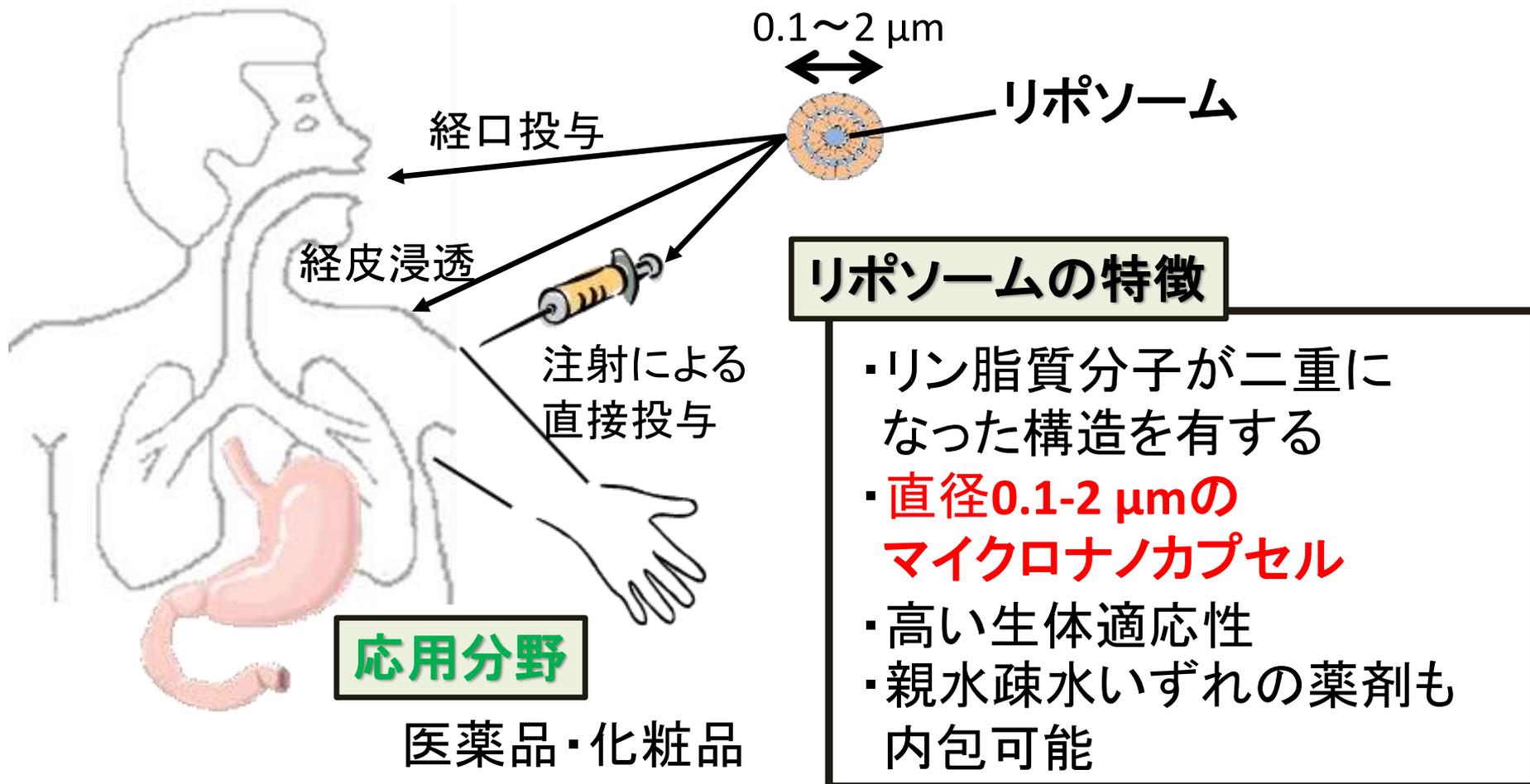


疎水基

親水基

ナノマシンとしてのリポソームについて

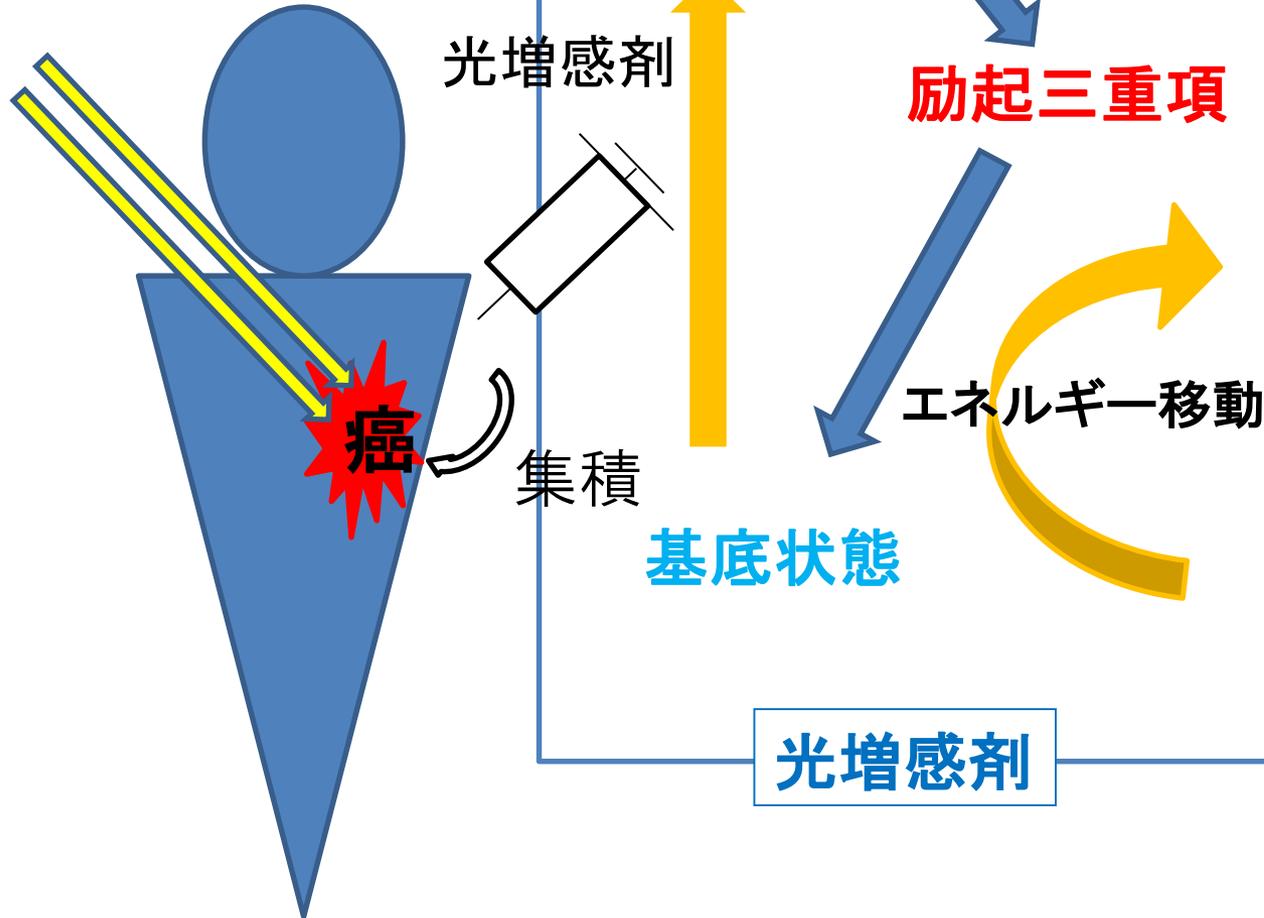
あらゆる方法で生体への投与が可能



腫瘍封止ナノデバイスの開発

光線力学療法(PDT)の作用機序

レーザー光
(200nm~800nm)



従来技術とその問題点

従来、リポソームは、生体に有害な有機溶剤を用いて製造されていた。外部超音波照射や流体循環でリポソームの製造方法も提案されたが、高濃度生産は困難であった。

発明等の特徴

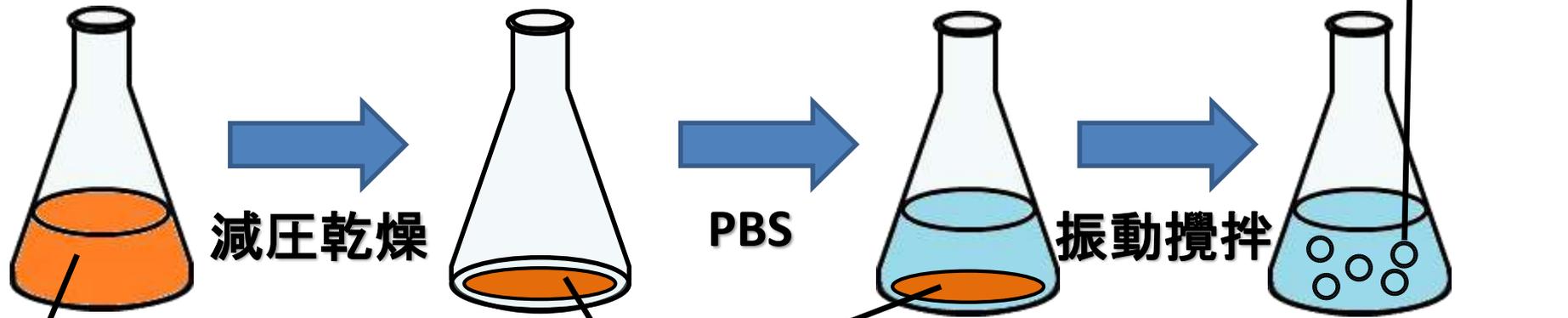
二分子膜からなる閉鎖小胞構造を有するリポソームは、生体ナノデバイスとして期待されている。従来、リポソームは、生体に有害な有機溶剤を用いて製造されていた。本発明では、有機溶剤を用いずに、実用性の高い高濃度のリポソーム溶液を超臨界二酸化炭素と内部超音波照射により可能とした。

発明等の効果

- 1) 有機溶媒を用いない実用性の高い高濃度リポソームの製造方法を実現した。
- 2) 健康食品・化粧品・医療分野への適応可能となった。
- 3) ナノマシンの可能性が拡張された。

従来のリポソーム調製法

○Bangham法(脂質薄膜法): 最も一般的な調製法



リン脂質: 1 mM
クロロホルム-
メタノール(1:1)

脂質薄膜

有機溶媒の完全な
除去が困難

人体適用を想定

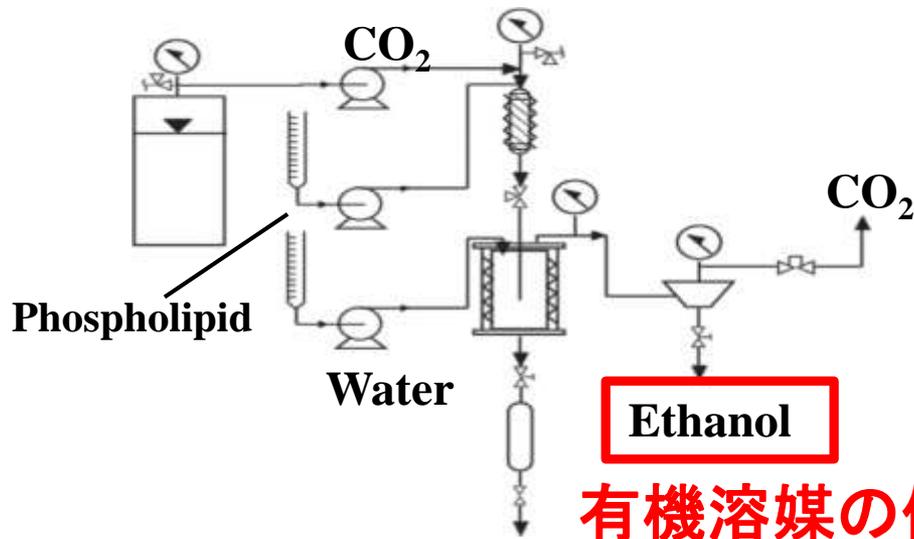
検査の必要性
調製コストの増加

超臨界二酸化炭素噴霧法を用いたリポソーム生成の既往の技術

Liposomes preparation using a supercritical fluid assisted continuous process

Islane Espirito Santo, Roberta Campardelli, Elaine Cabral Albuquerque, Silvio Vieira de Melo, Giovanna Della Porta, Ernesto Reverchon

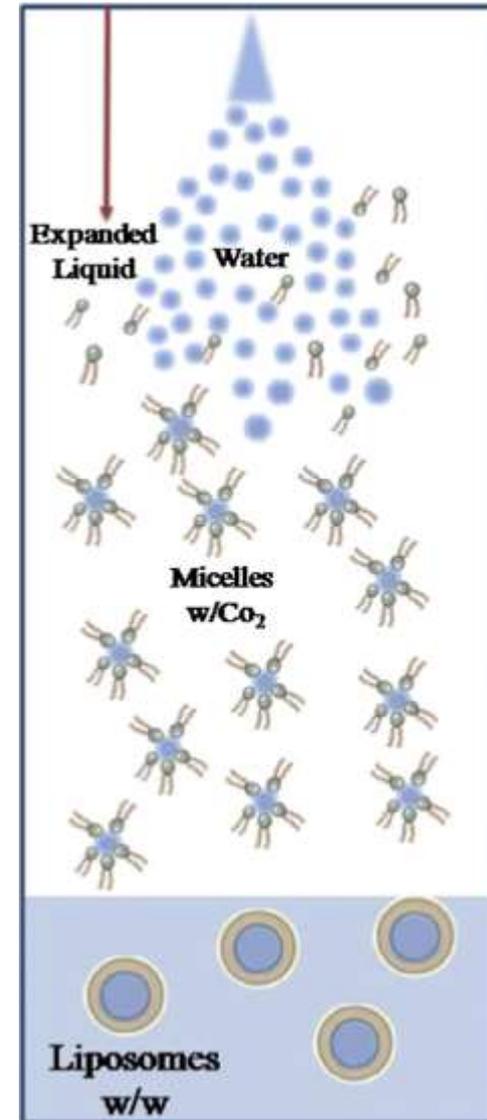
Chemical Engineering Journal 249 (2014) 153–159



Liposome Suspension

装置図

有機溶媒の使用

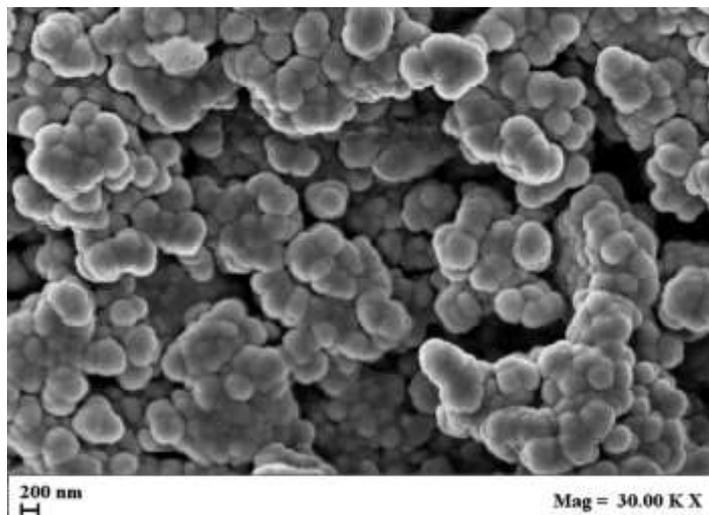


原理図

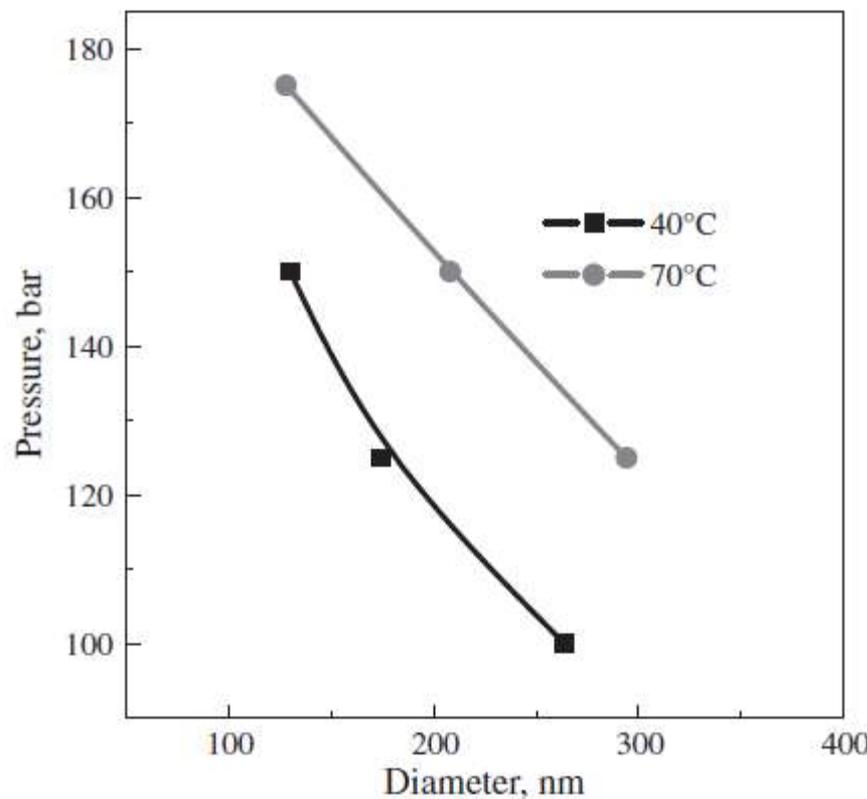
超臨界CO₂を用いた際の測定結果

Liposomes size distribution. Process conditions: CO₂ flow rate 6.7 g/min, GLR = 2.42, water flow rate 10 mL/min, nozzle diameter 80 μm.

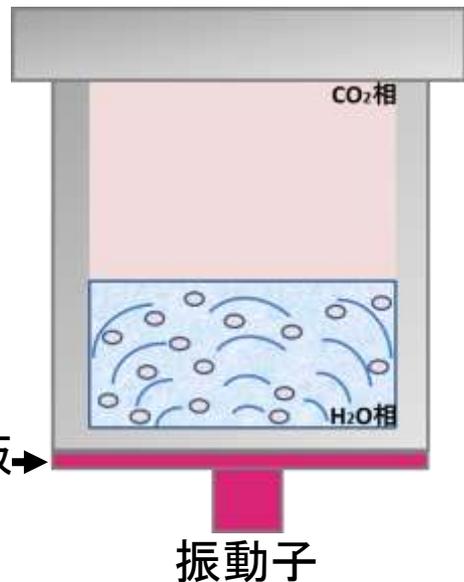
Mixer and vessel T (°C)	Mixer and vessel p (bar)	CO ₂ density (kg m ⁻³)	Mean size (nm ± SD)
70	125	378	294 ± 144
70	150	510	208 ± 105
70	175	600	128 ± 61
40	100	625	264 ± 66
40	125	730	174 ± 69
40	150	815	130 ± 62



TEM写真



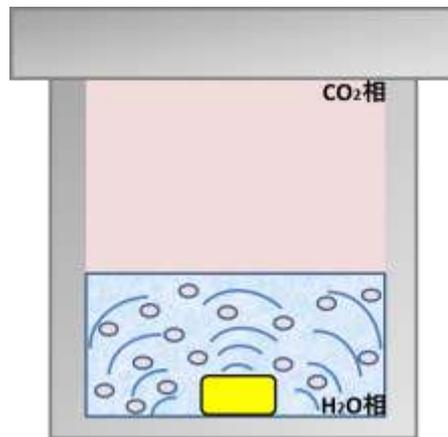
超音波間接照射型装置



振動板→

振動子

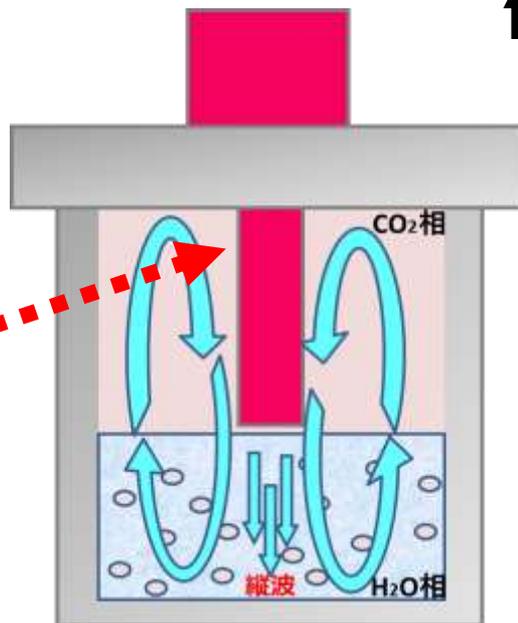
投げ込み型超音波振動子



振動子

超音波直接照射型装置(新規法)

振動子
(ホーン)



攪拌力が弱い
縦波が起きにくい



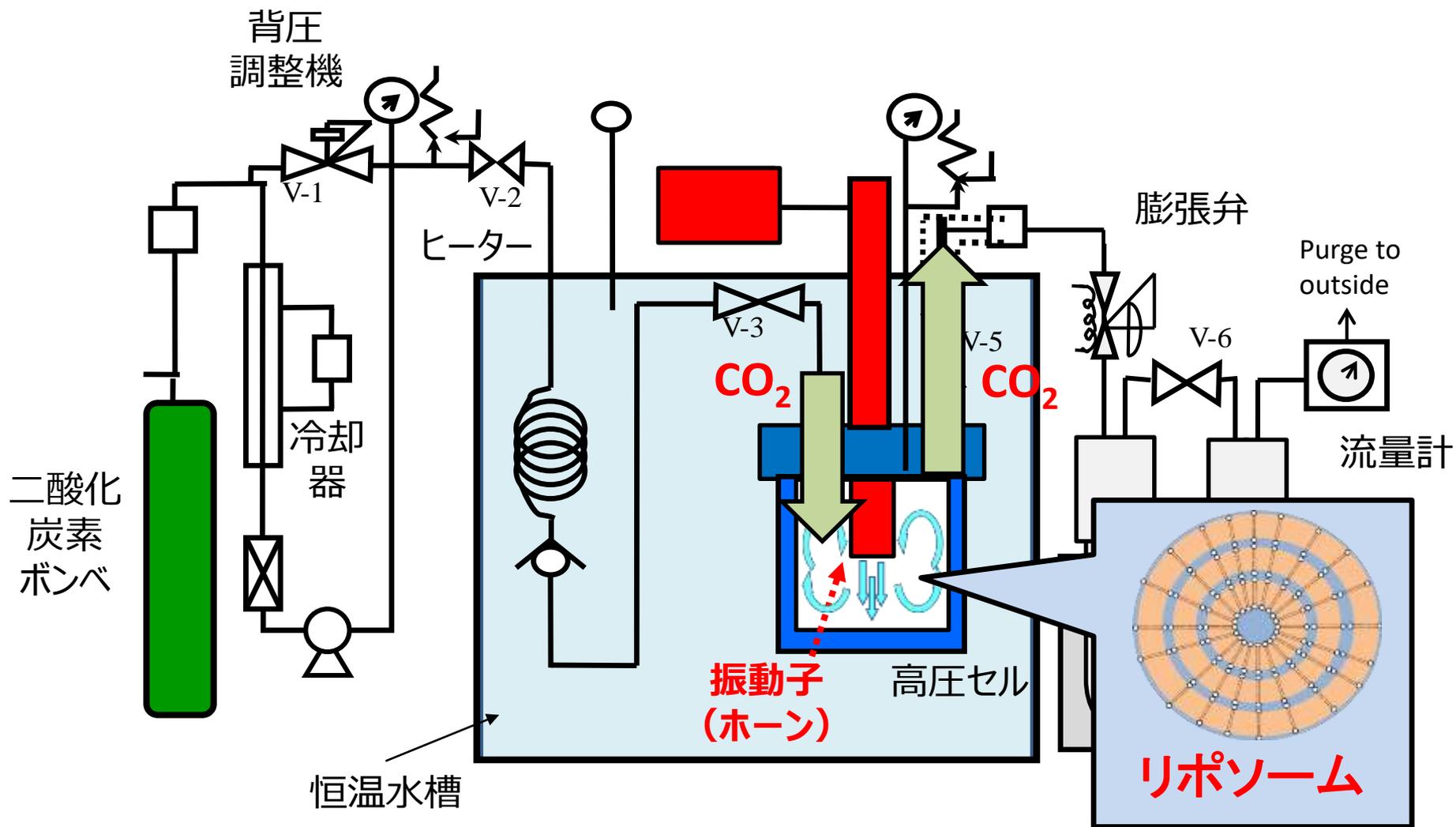
・リポソーム形成に長時間かかる
・高濃度リポソームを調製するのが困難

高圧セル内でマイクロ相分離
が誘発される

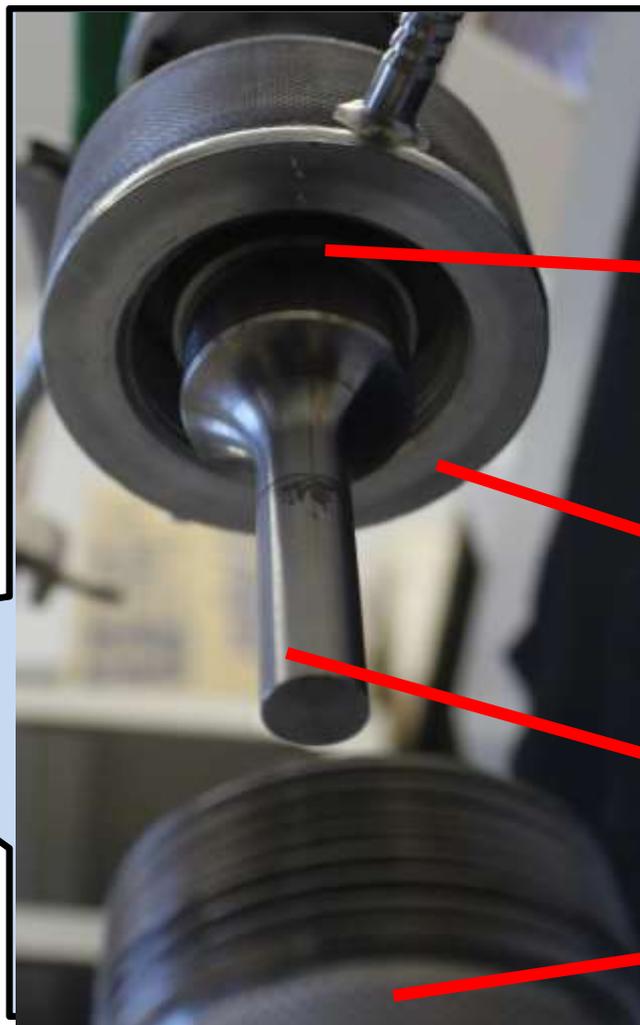
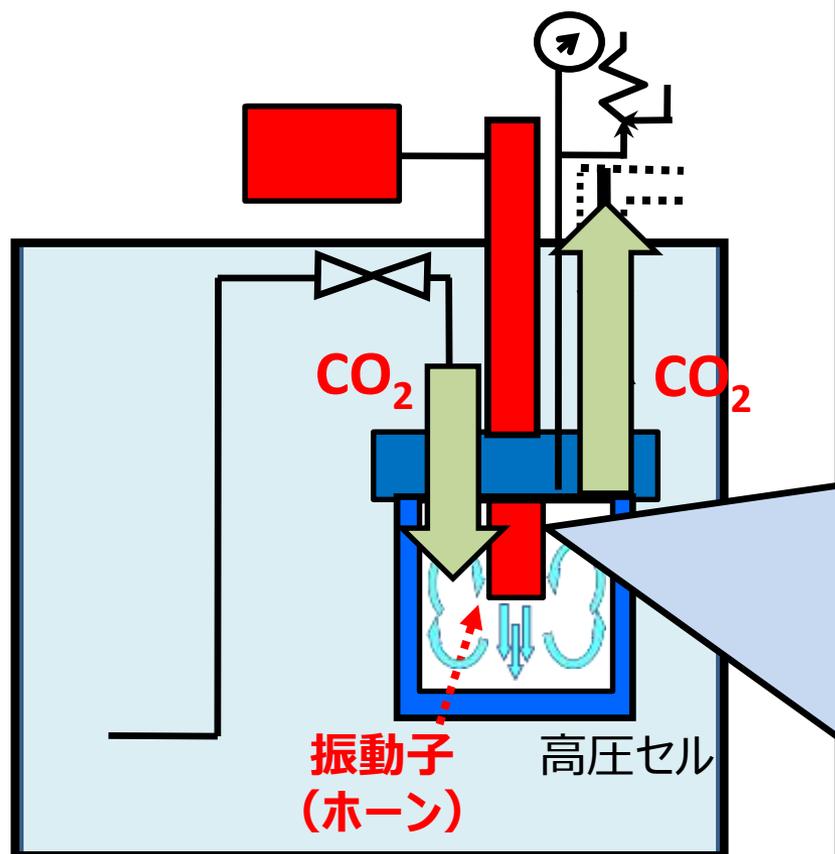


短時間で高濃度リポソーム
を調製可能である

・リポソームの新規調製法(装置図)



超音波照射ホーン(直接照射型)



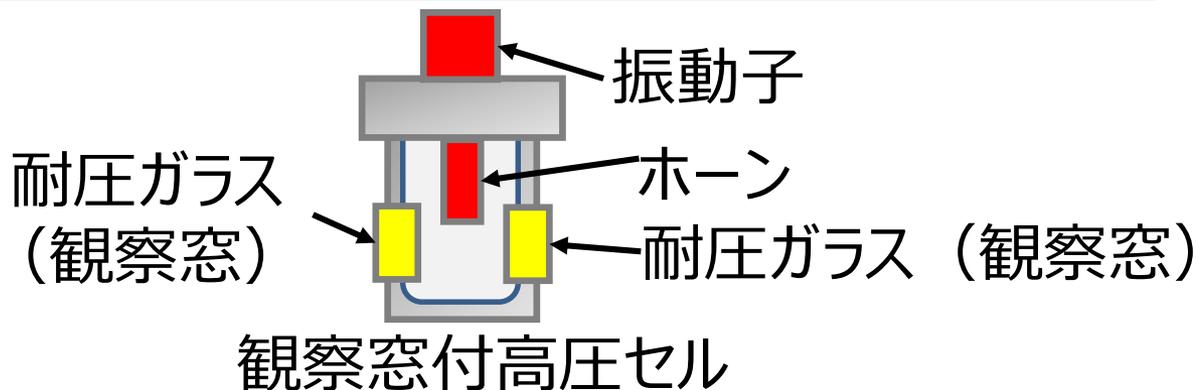
圧力止め
特殊ゴム
パッキン

高圧セル
の蓋

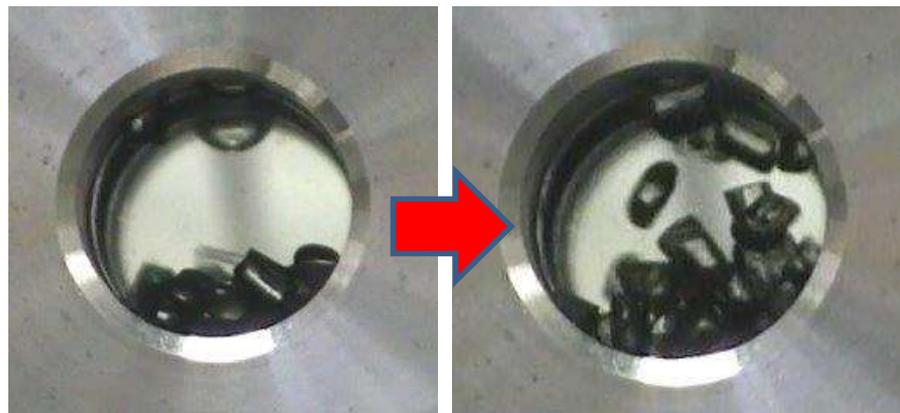
超音波照
射ホーン

高圧セル

超音波照射時のセル内の状態観察



セル内
(水・ガラスビーズ)



超音波
照射前

超音波
照射時

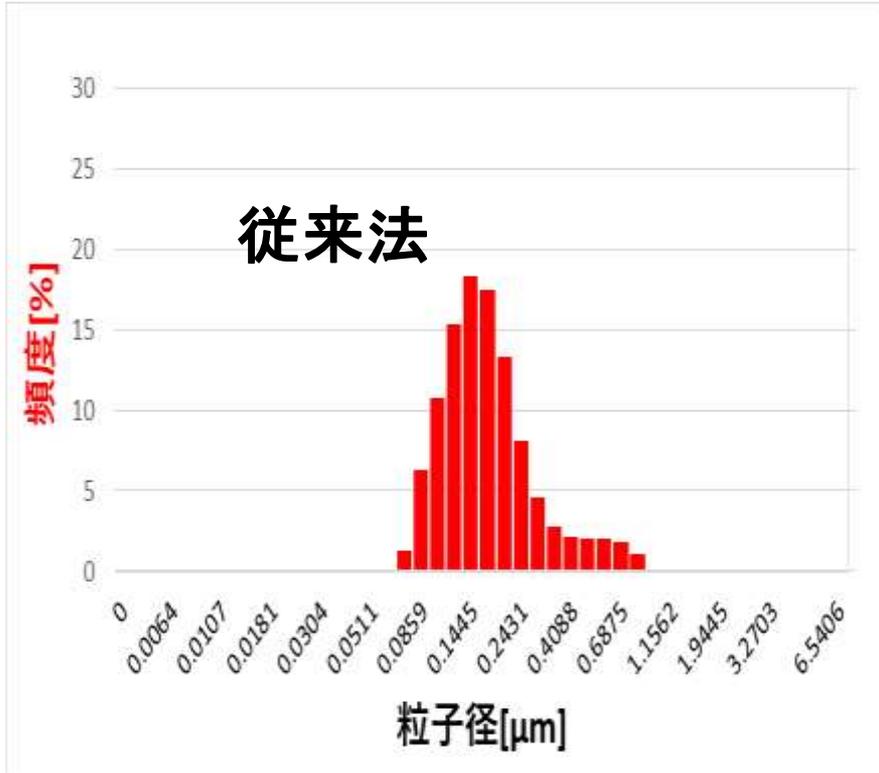
セル内
(液体二酸化炭素・ガラスビーズ)



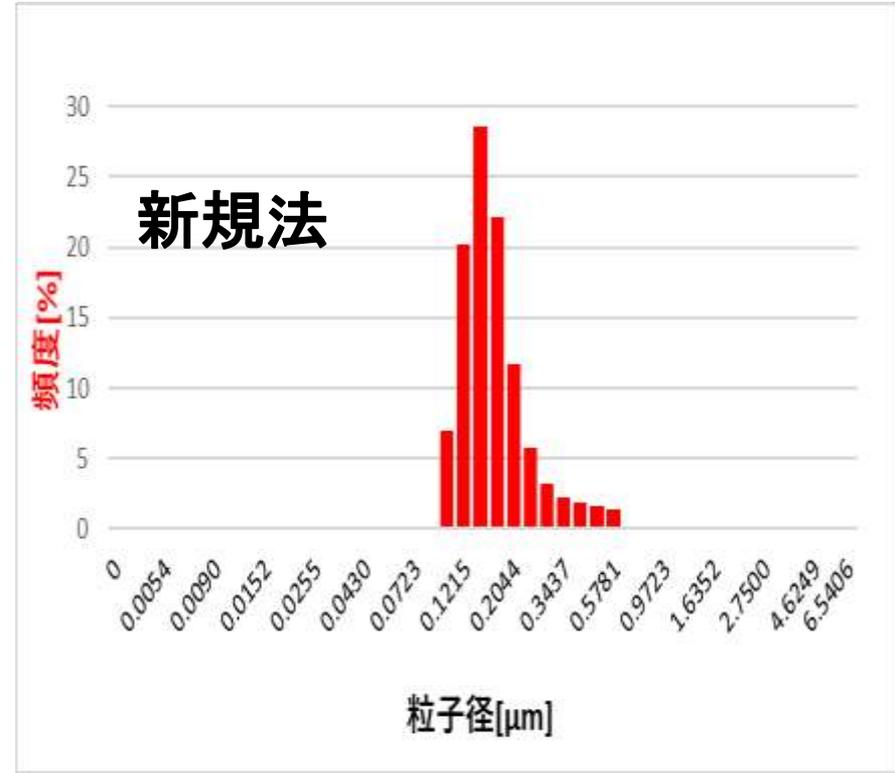
超音波
照射前

超音波
照射時

従来法と新規法で調製したリポソーム溶液の粒子径比較



平均粒径：
0.1748 [μm]



平均粒径：
0.1590 [μm]

従来法と同様の大きさのリポソームを液体二酸化炭素を用いた新規法で調製可能

濃度・粒子濃度

UV検出器結果より、

【直接照射型】温度25°C、水量25 g、リン脂質量0.03 g、超音波照射時間125 sec

濃度 : 0.711 mg/mL

Nanosightの測定結果より、 1.50×10^{11} particles/mL

【間接照射型】温度25°C、水量25 g、リン脂質量0.03 g、超音波照射時間125 sec

濃度 : 0.234 mg/mL

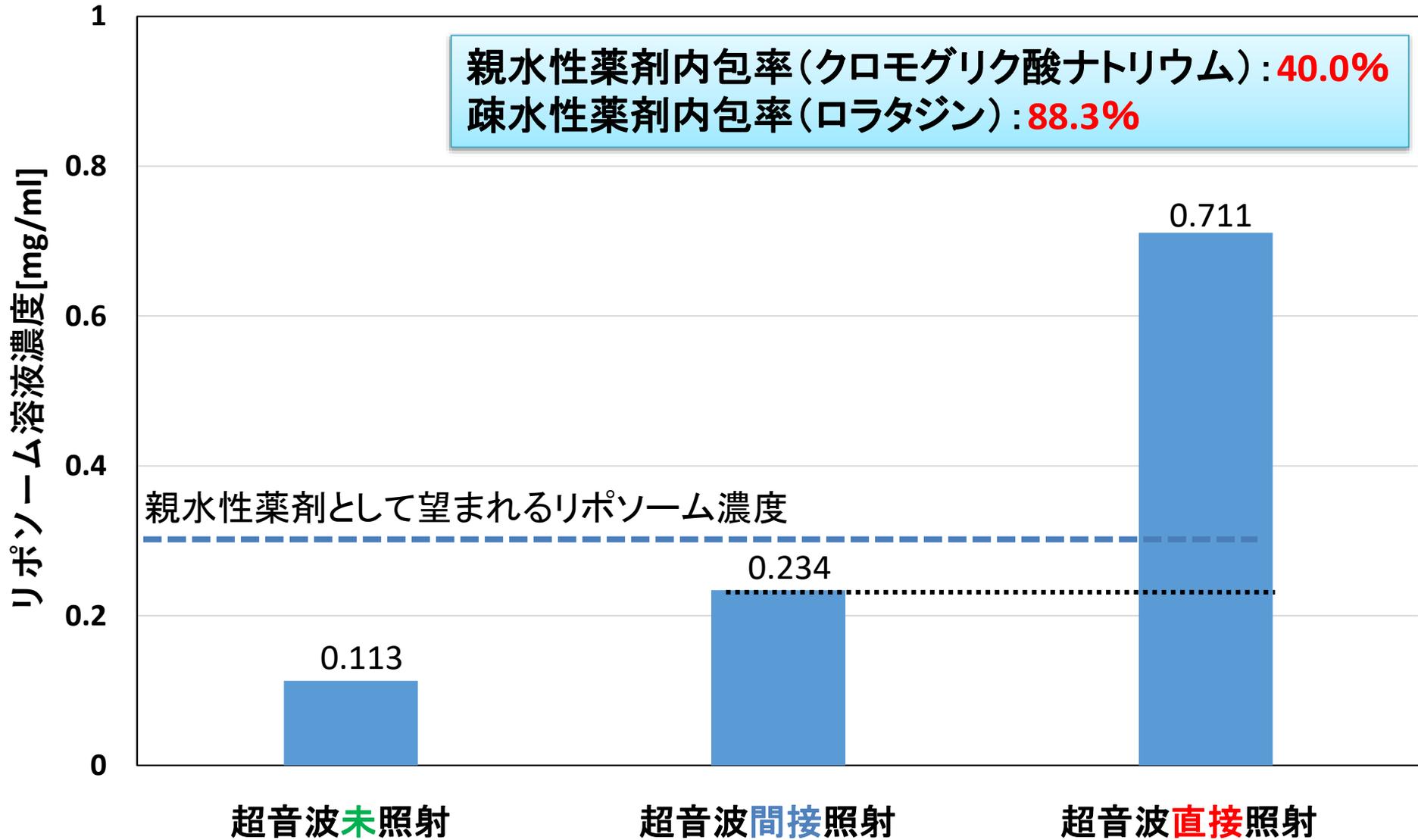
Nanosightの測定結果より、 4.94×10^{10} particles/mL

【未照射型】温度25°C、水量25 g、リン脂質量0.03 g、超音波照射時間125 sec

濃度 : 0.113 mg/mL

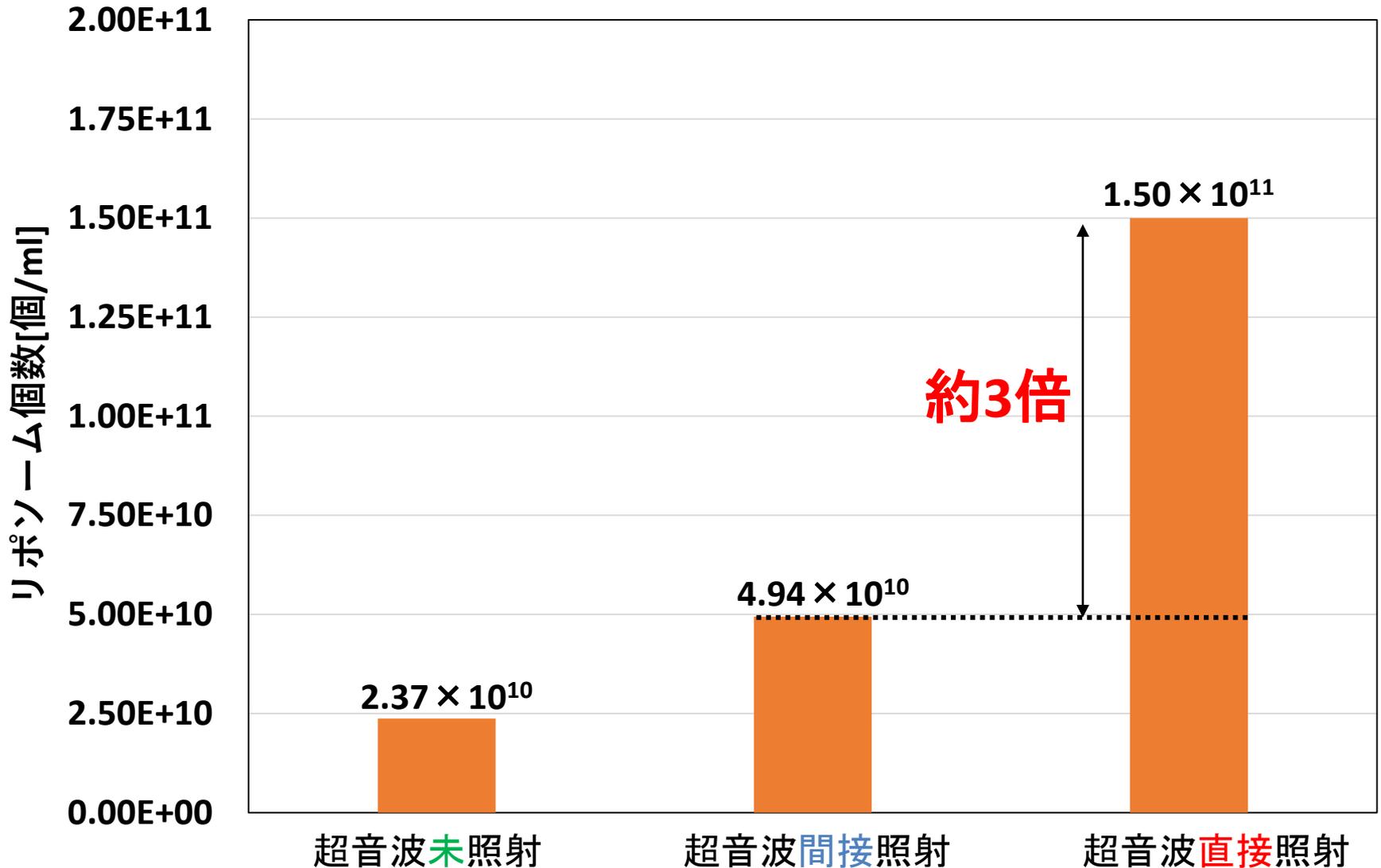
Nanosightの測定結果より、 2.37×10^{10} particles/mL

超音波照射方法ごとのリポソーム溶液濃度(UV検出器より測定)



一度の工程で多くの薬剤内包リポソームを調製可能である

超音波照射方法ごとのリポソーム個数(Nano)



生成率

リポソーム 生成率	$\frac{W - W'}{W}$	W:仕込みリン脂質量 W':未反応リン脂質量
--------------	--------------------	---------------------------

【直接照射】

仕込みリン脂質量:0.0303 g

未反応リン脂質量:0.009 g

生成率=70.3 %

【間接照射】

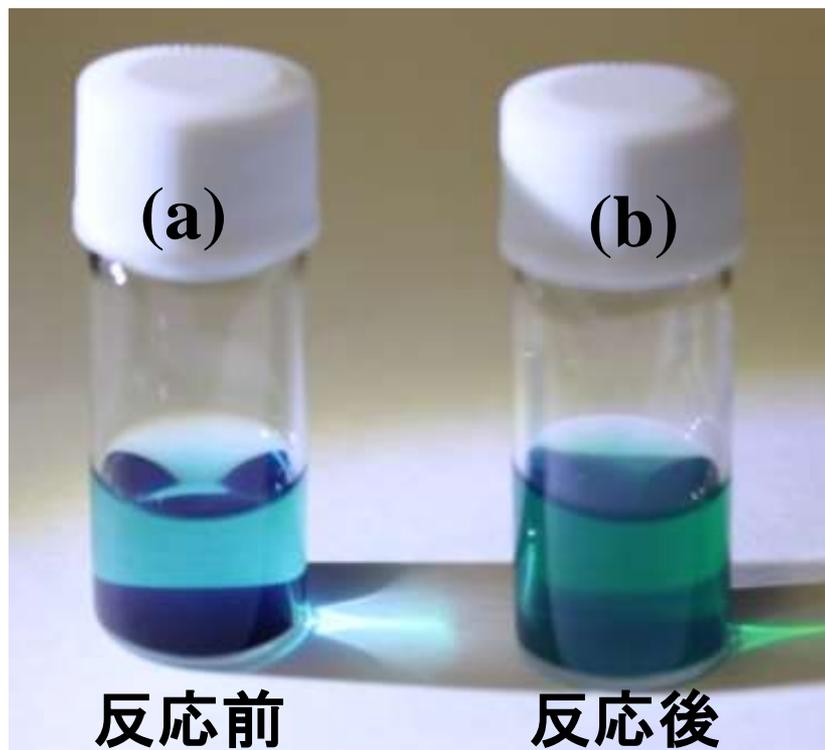
仕込みリン脂質量:0.0307 g

未反応リン脂質量:0.0145g

生成率=52.7 %

5. 実験結果

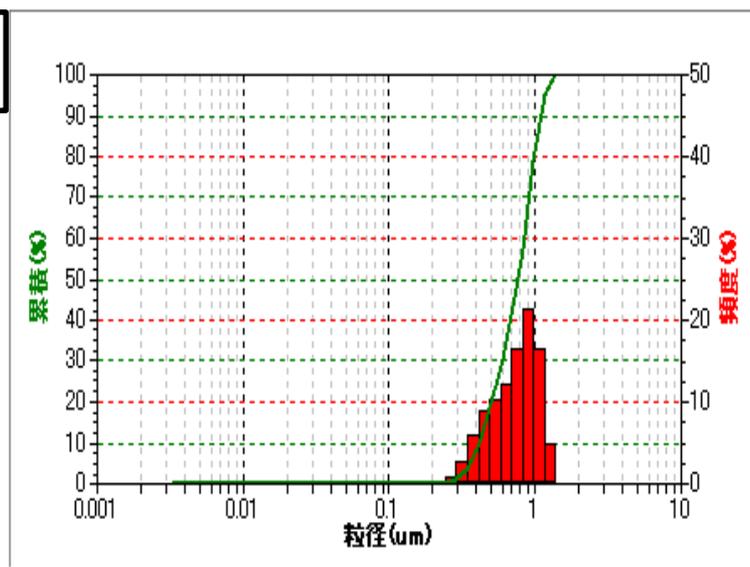
亜鉛フタロシアニン塩素付加
マイクロトラックを用いて測定した結果



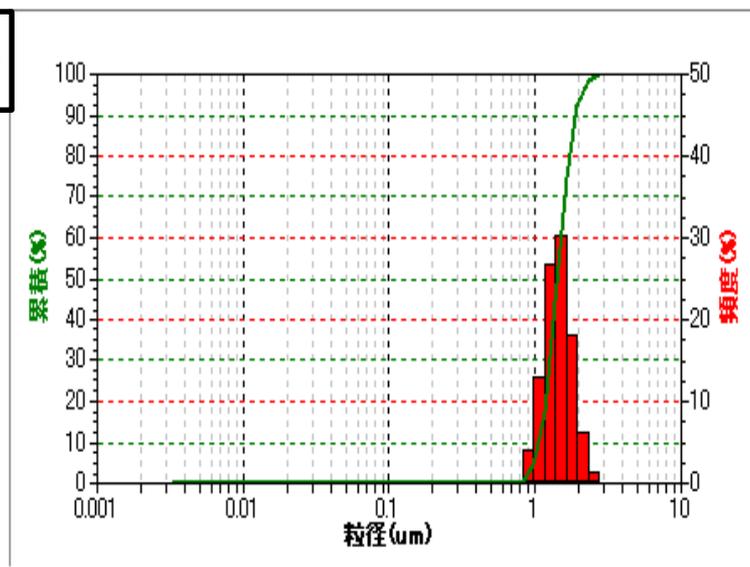
(a) 亜鉛フタロシアニン(エタノール)

(b) 塩素化亜鉛フタロシアニン(エタノール)

(a)



(b)



5. 結果

リポソームによるコーティング

実験条件

塩素化亜鉛フタロシアニン: 0.0184g

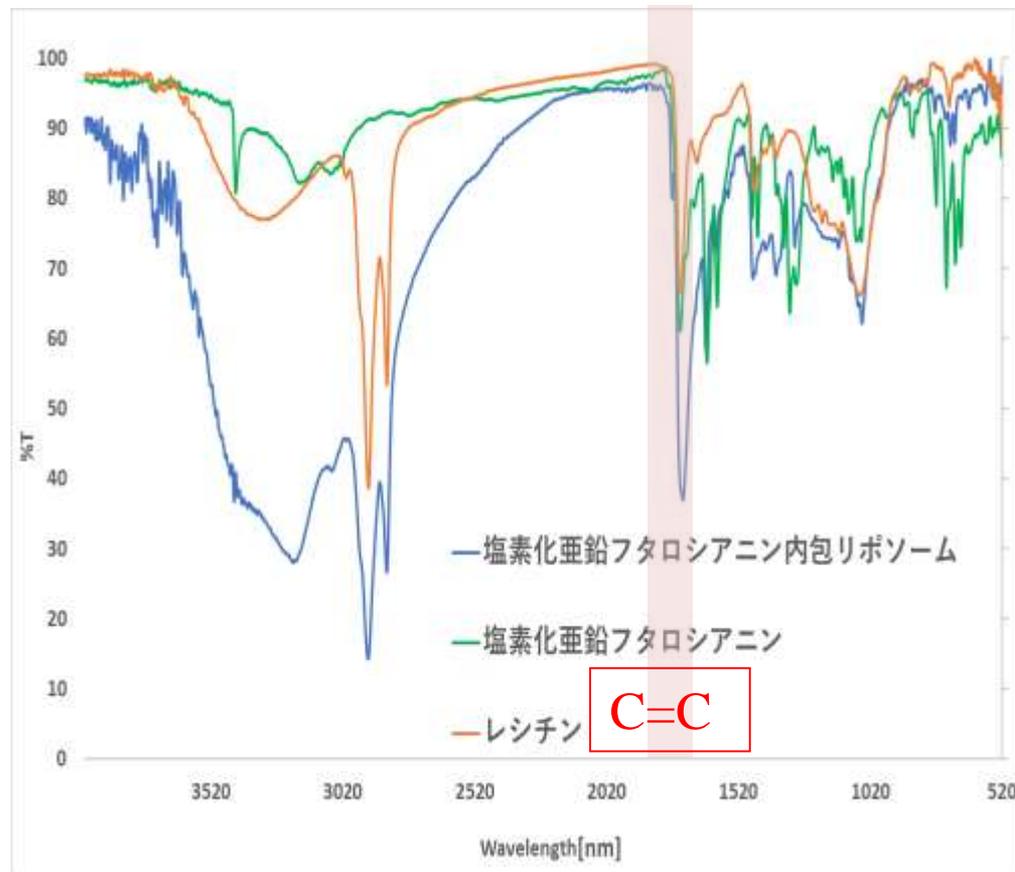
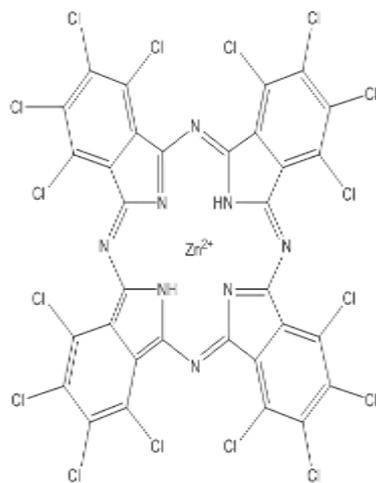
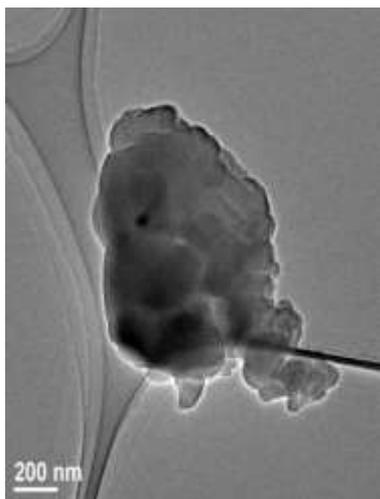
レシチン: 0.0250g

水: 30ml

恒温槽: 40~60°C

圧力: 6.8MPa

CO₂の量: 20.4ml



塩素化亜鉛フタロシアニン
内包リポソーム(レシチン)

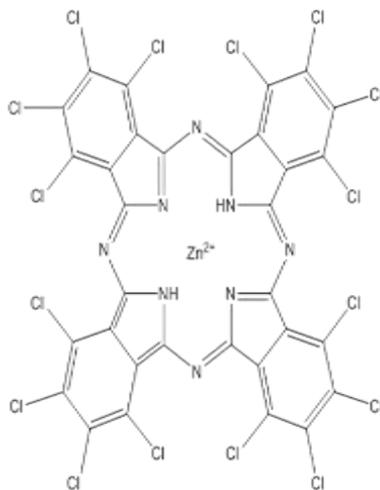
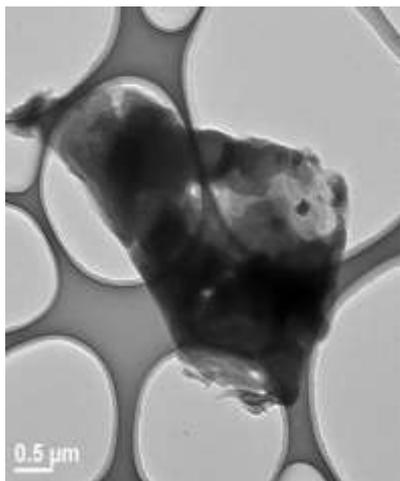
FT-IRを用いて測定した吸収帯の比較

5. 結果

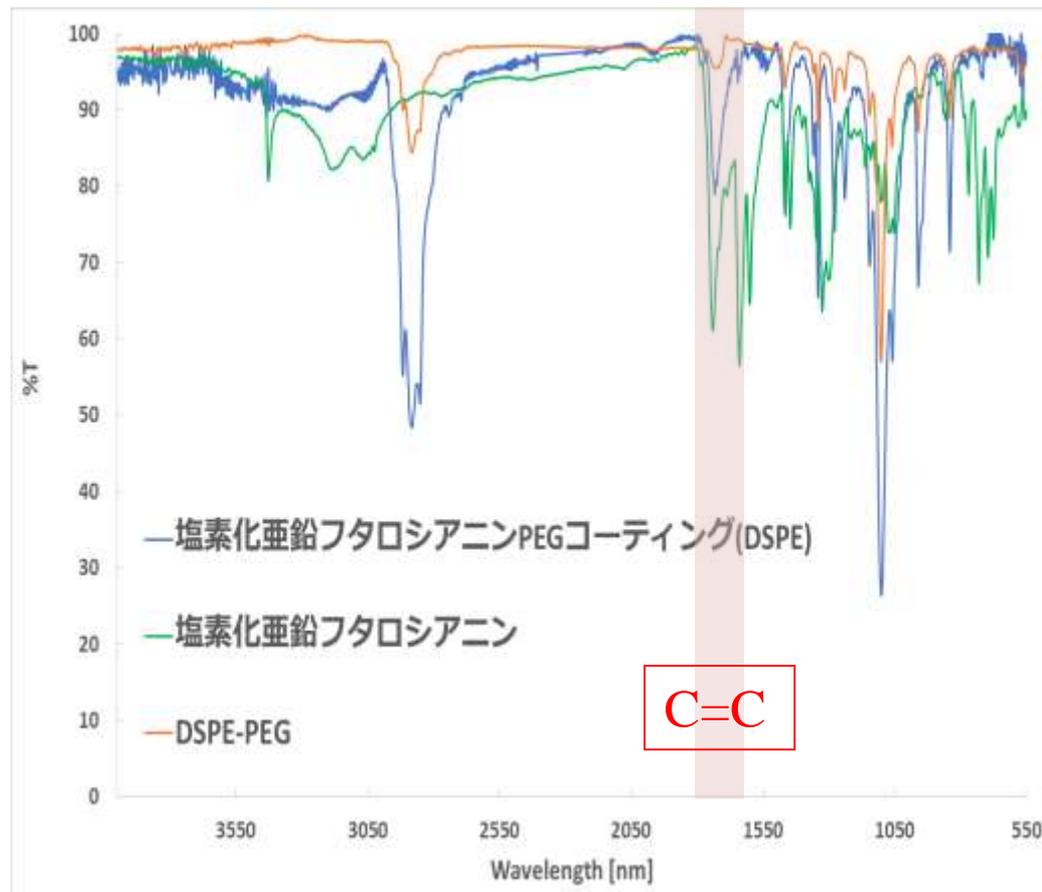
DSPE-PEGによるコーティング

実験条件

塩素化亜鉛フタロシアニン: 0.019g
 DSPE-PEG: 0.0842g
 水: 30ml
 恒温槽: 40~60°C
 圧力: 6.8MPa
 CO₂の量: 20.8ml



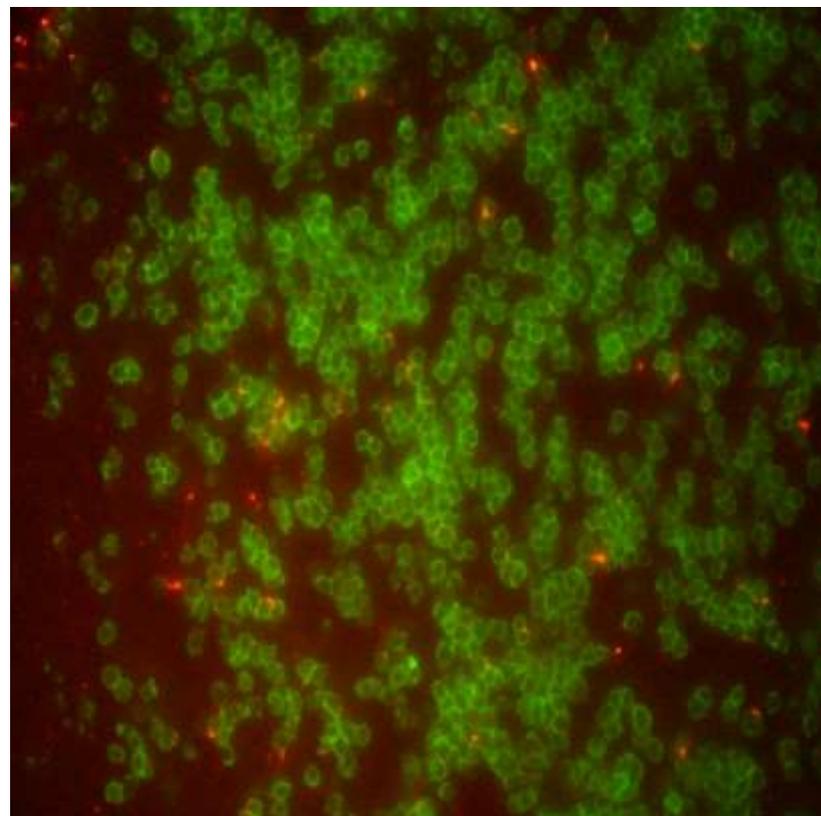
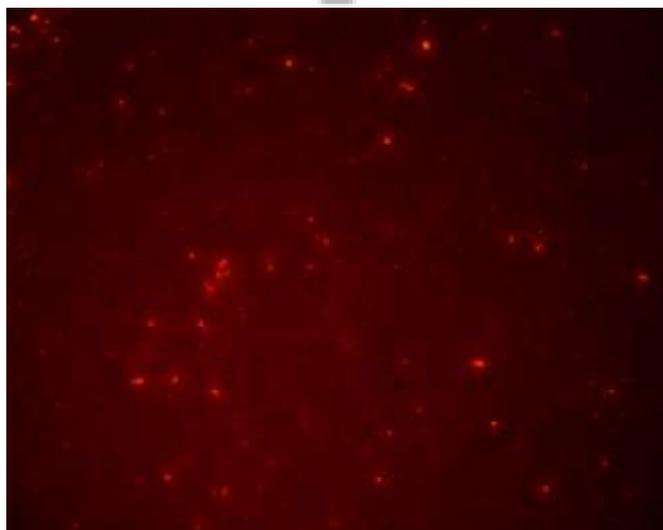
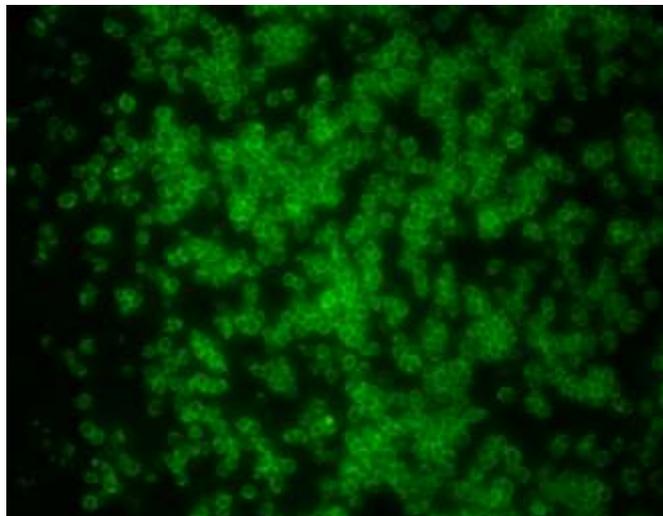
塩素化亜鉛フタロシアニン
 DSPE-PEGコーティング



FT-IRを用いて測定した吸収帯の比較

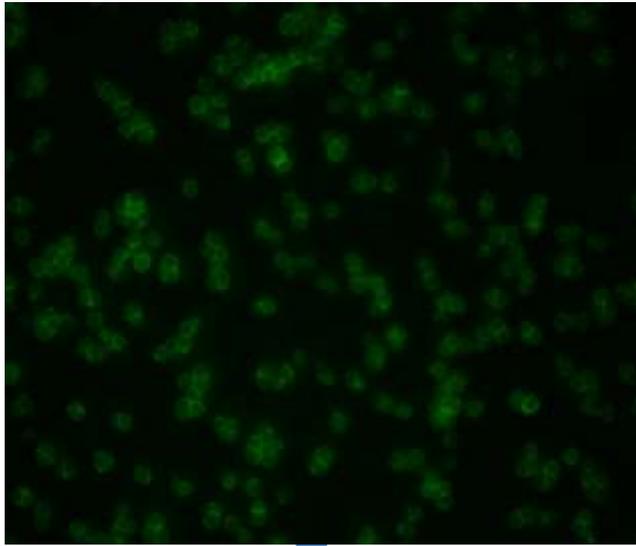
レシチンリポソーム

3×10^4 cells/wellのJ774細胞と、
 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のクロモグリク酸ナトリウム封入リポソーム



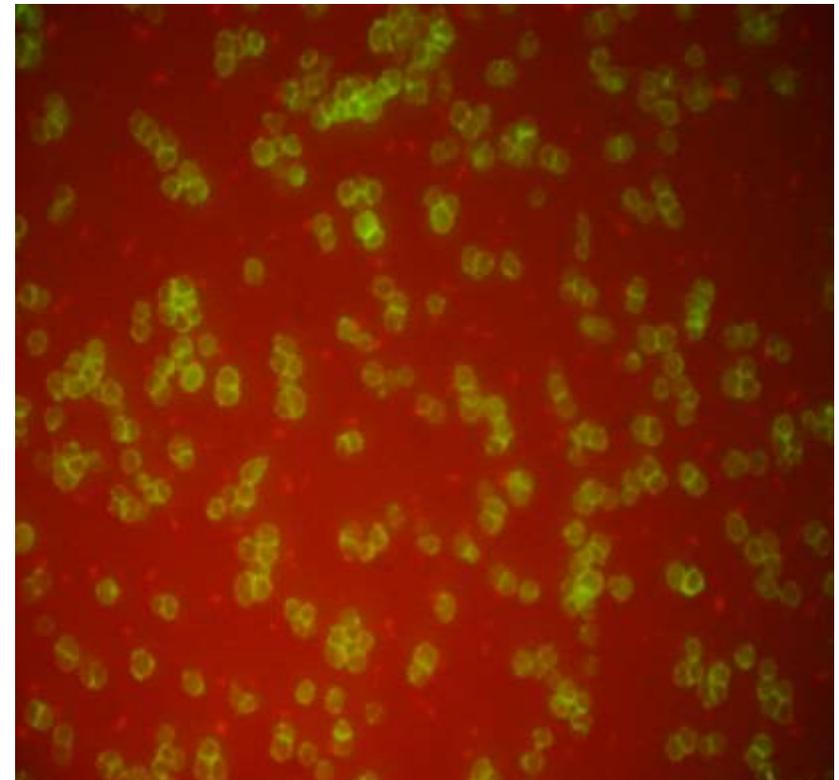
- ローダミンB (0.1mM)によるリポソーム蛍光
- ファロイジンによる細胞の蛍光

DSPE-PEGリポソーム



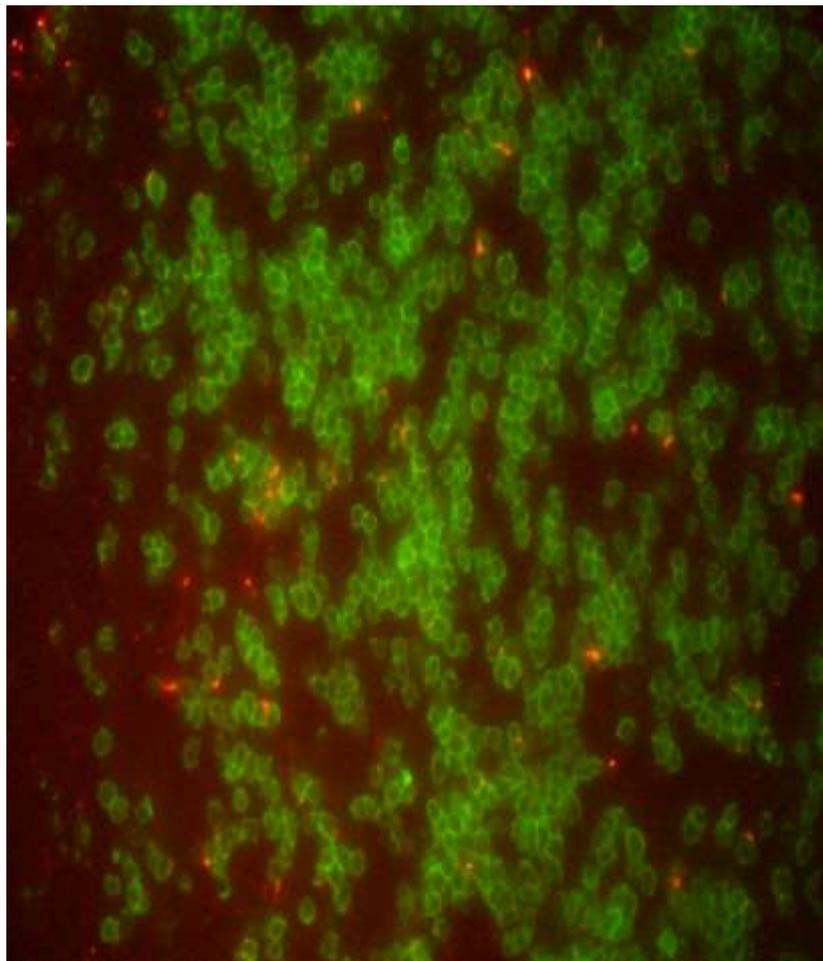
3×10^4 cells/wellのJ774細胞と、 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ のクロモグリク酸ナトリウム封入リポソーム

- ローダミンB (0.1mM) によるリポソーム蛍光
- ファロイジンによる細胞の蛍光

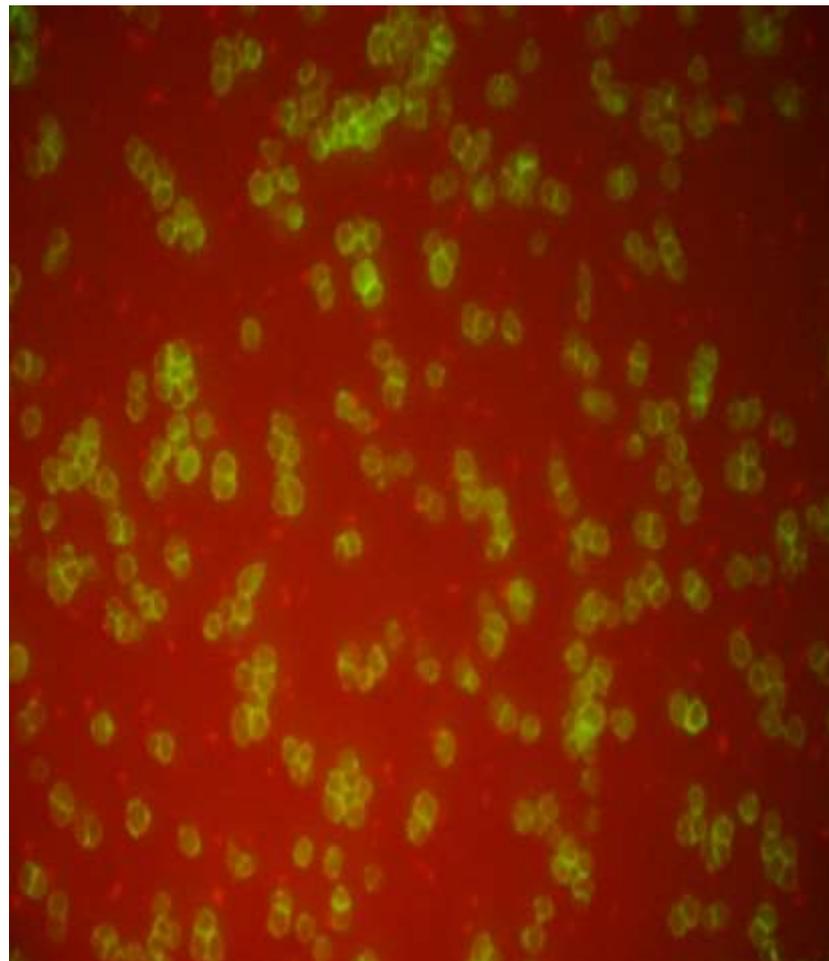


レシチンリポソーム

DSPE-PEG リポソーム



緑：マクロファージ



赤：リポソーム

結言

- ・有機溶剤を用いずに、二酸化炭素を溶媒として超音波照射により、リポソームを調製することが可能である。
- ・DSPE-PEG誘導体リン脂質を利用したステルスリポソームはレシチンリポソームに比べて、マクロファージ中では貪食されないことが確認できた。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 従来の**有害有機溶媒**を用いるリポソーム製造技術の問題点であった残留有機溶媒の懸念を払拭することに成功した。
- 従来は、高濃度のリポソーム溶液の製造が困難であったが、実用化できるレベルでの生産が可能となった。

想定される用途

- 本技術の特徴を活かし、**高付加価値製品製造**に適用することのメリットは大きいと考えられる。
- 上記以外に、製品の**高機能化**の効果も期待される。
- また、無害性の面に着目すると、**食品・化粧品・医薬品**といった分野や用途への展開も可能と思われる。

実用化に向けた課題

- 現在、リポソームナノマシンについて生産が可能なところまで開発済み。販路の点が未解決である。
- 今後、有望な販路について検討していく。
- 実用化に向けて、生産性を向上する技術の確立が必要である。

企業への期待

- 今回の超臨界流体の技術を活用した企業との共同研究により、未解決の問題を克服できると考えている。
- **高付加価値製品の生産技術**を持つ、企業との共同研究を希望。
- また、**ナノマシン**を開発中の企業、化粧品、健康食品、医薬、医療品分野への展開を考えている企業には、本技術の導入が有効と思われる。

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : リポソームの製造方法
- 出願番号 : 特願2018-091759
- 出願日 : 2018年5月10日
- 出願人 : 学校法人福岡大学(100%)
- 発明者 : 三島 健司

産学連携の経歴 三島健司

- 1995年-1997年 日本ペイント社と共同研究実施
- 1999年-2000年 福岡県産業・科学技術振興財団地域開発促進拠点支援事業（研究育成型）に採択
- 1999年-2001年 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）平成11年度ベンチャー企業支援型地域コンソーシアム研究開発事業に採択
- 2000年-2001年 平成12年度ホソカワ粉体工学振興財団研究助成に採択
- 2001年-2003年 新エネルギー・産業技術総合開発機構（NEDO）平成13・14年度産学連携実用化開発補助事業に採択
- 2000年-2002年 花王株式会社と共同研究実施
- 2001年-2003年 JST研究成果活用プラザにおける実用化のための育成研究事業に採択
- 2006年-2008年 株式会社ファンケルと共同研究実施
- 2007年-2008年 JST平成19年度シーズ発掘試験に採択
- 2007年-2008年 文部科学省平成19年度都市エリア産学官連携促進事業（発展型）可能性試験に採択
- 2007年-2008年 財団法人九州産業技術センター平成19年試験研究に採択
- 2007年-2008年 財団法人福岡県環境保全公社平成19年研究に採択
- 2008年-2009年 新日本石油株式会社と共同研究実施
- 2009年-2010年 株式会社九州電化と共同研究実施 J
- 2009年-2010年 新日本石油株式会社と共同研究実施
- 2010年大学発研究所 福岡大学産学官連携研究機関複合材料研究所設立（所長）

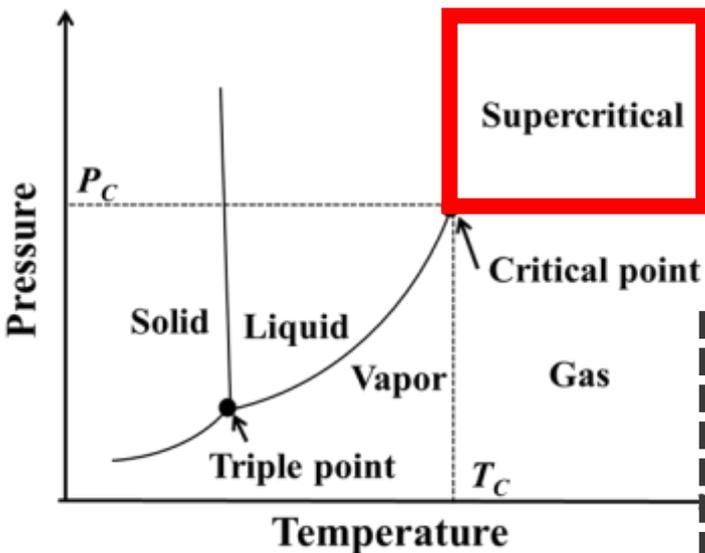
超臨界二酸化炭素によるマイクロコーティング

超臨界とは

臨界条件が緩い

各物質の臨界点

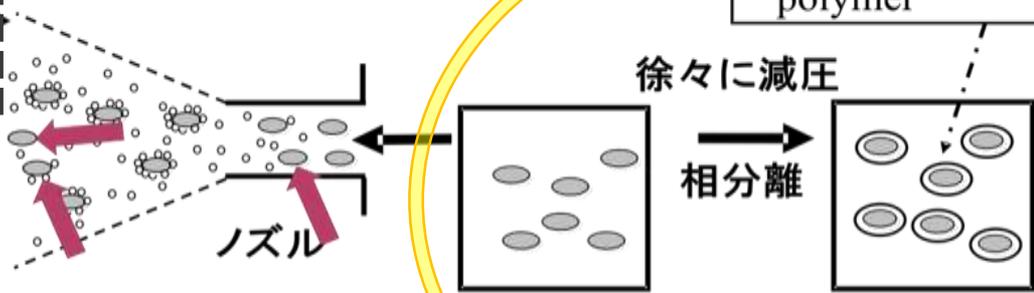
	臨界温度 T_c [°C]	臨界圧力 P_c [MPa]
水	373.9	21.3
二酸化炭素	31.1	7.4
メタノール	374.1	22.1



コーティングにムラができる

徐々に減圧し、セル内でコーティングする

coacervation of polymer



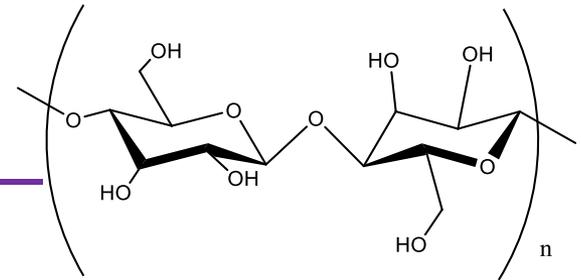
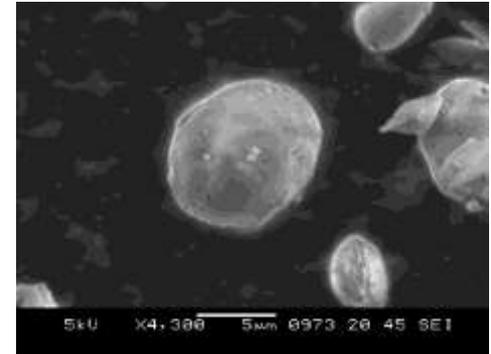
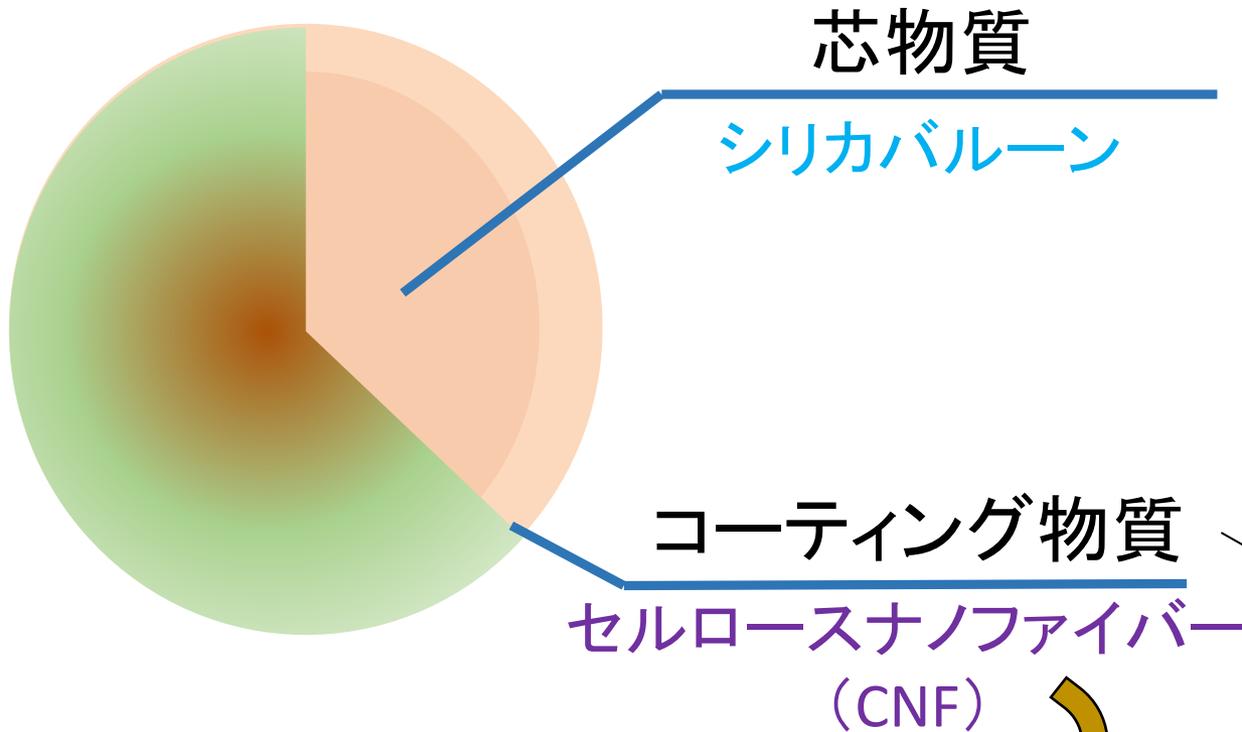
PIPS法であれば、
むらなく均一な
粒子を製造できる

(a) RESS法 (急速膨張法)

(b) PIPS法 (相分離圧力誘起法)

CNFによるマイクロコーティング ①化学修飾

マイクロカプセルの構造

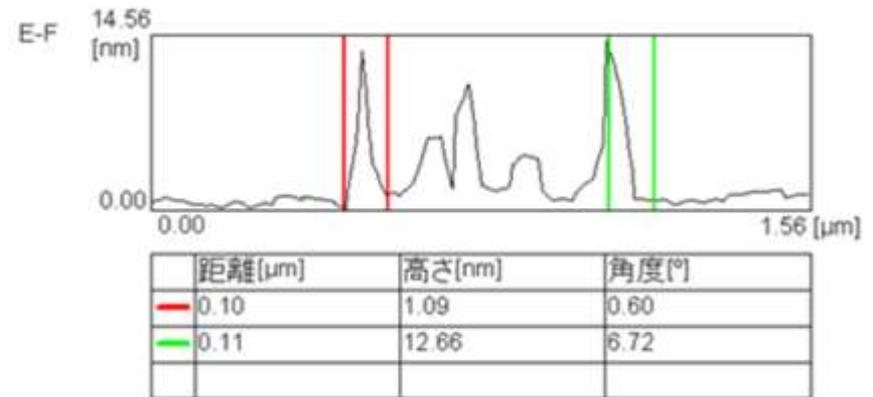
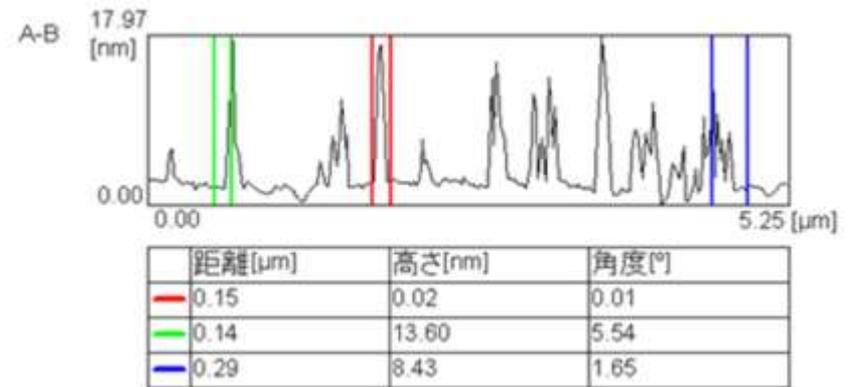
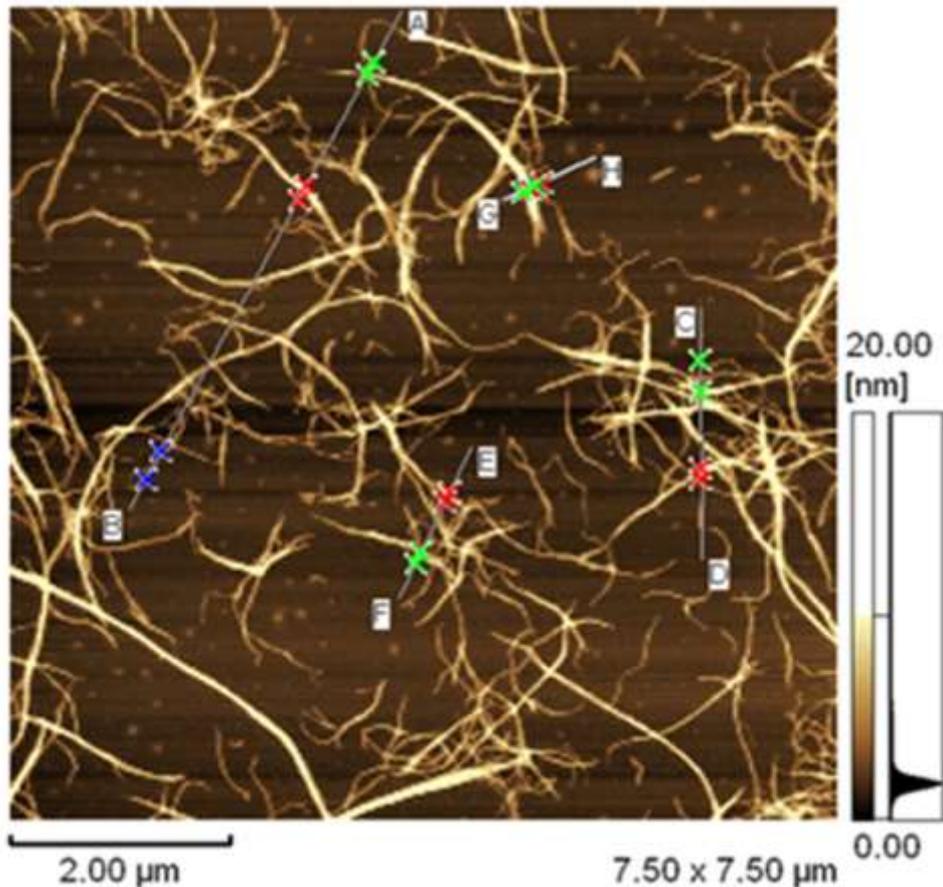


芯物質との親和性を得るためのスチレン付加

CNFによるマイクロコーティング ②高分散化

・原子間力顕微鏡 (AFM) で測定した結果

CNF (TEMPO処理後)

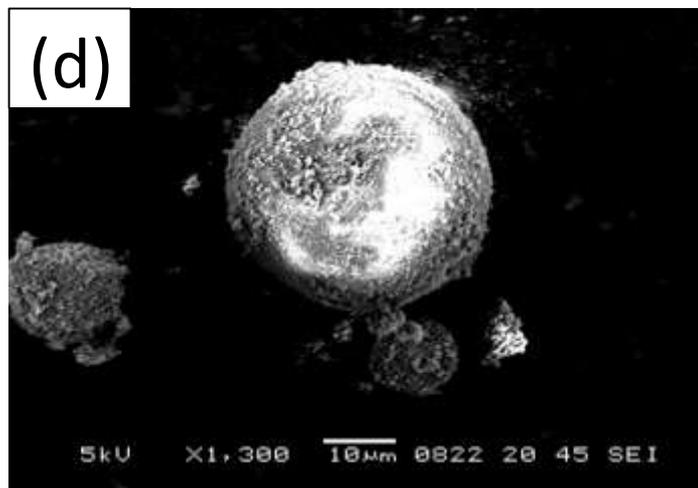
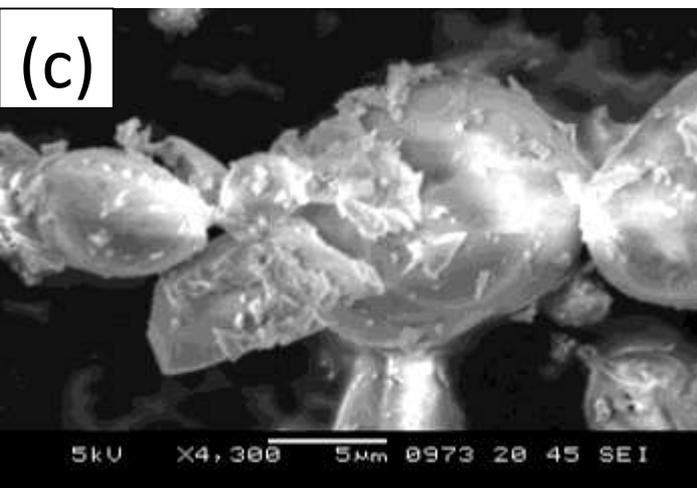
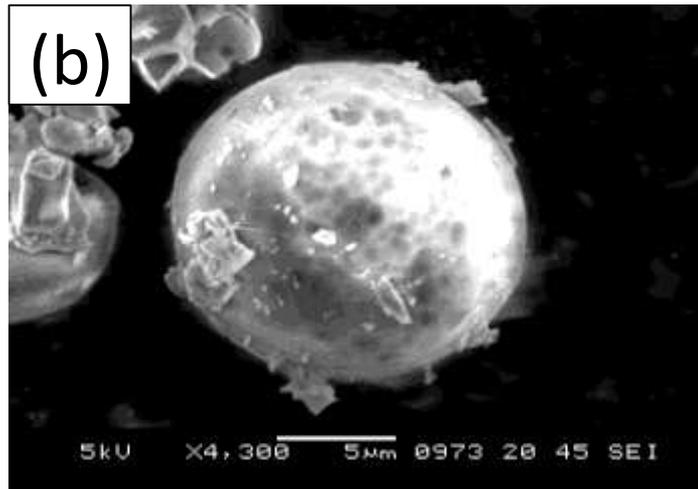
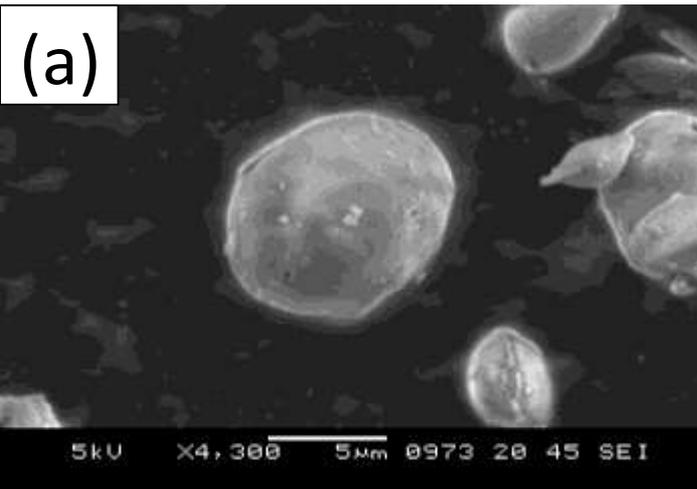


走査範囲: 7.5 μm 33

CNFによるマイクロコーティング ③実験結果

マイクロカプセル化

・走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いた比較



(a) シリカバルーンのみ

(b) シリカ-CNF

(c) シリカ-CNF-スチレン

(d) シリカ-CNF-スチレン
(高分散化)

お問い合わせ先

福岡大学 研究推進部 産学官連携センター
担当コーディネーター 北井 三正

TEL 092-871-6631 (内線2803)

FAX 092-866-2308

e-mail sanchi@adm.fukuoka-u.ac.jp