

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02509

研究課題名(和文) ナノ・リポソームの連続調製を目的としたCO₂マルチ相変化による向流接触法の構築研究課題名(英文) Continuous production of nano sized liposomes using multi phase CO₂ and countercurrent contact method

研究代表者

相田 卓 (Aida, Taku)

福岡大学・工学部・助教

研究者番号：00466541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：医療用ナノ・リポソーム(LS)生産の課題は、有機溶剤を使用しない生産性の高い連続式のプロセスの開発である。本研究では、まず、回分式反応装置を開発し、圧力、温度、超音波照射時間、二酸化炭素の相(ガス、超臨界、液体)がLS生成に及ぼす影響について検討した。次に、本回分式装置を3つ縦型に連結し、向流接触が可能な連続式反応器への改良を試みた。具体的には、圧力条件一定下(8MPa)で高温(60℃)から低温(10℃)まで温度勾配を与え、塔頂から原料のリン脂質懸濁液、塔底から液体CO₂を供給し、懸濁液と相変化した高圧CO₂相を向流接触、超音波を直接照射装置の開発を行い、今後の課題と開発の方向性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療用ナノリポソームは、mRNAのワクチンで使用されるように非常に有用である。本研究では、ナノ・リポソーム(LS)生産の課題である有機溶剤を使用しない生産性の高い連続式のプロセスの開発に独創的かつ新規な装置の開発により挑戦したものである。本プロセスは、二酸化炭素を有効利用、有機溶媒を使用しない、超音波照射などのグリーン技術を駆使した点からも、社会的意義は大きい。本向流式の連続装置の完成は、実現はできなかったが、多くの課題が明確となり、今後の開発の方向性も示すことができた。今後、これらの課題が解決され、装置が完成し、本手法の優位性が明らかとなることを願う。

研究成果の概要(英文)：The development of a organic solvent free method for producing nano size d liposomes (LP) for medical uses is a big challenge. In this work, we challenged to develop a continuous method for producing LP using supercritical CO₂, water and direct ultrasonication. First, we developed a batch reactor and examined the effects of pressure, temperature, ultrasonic irradiation time, and CO₂ phases (gas, supercritical, liquid) on LS generation. Next, 3 of these batch reactors were connected vertically, in a tower manner: phospholipid suspension is supplied from the top of the tower, liquid CO₂ is supplied from the bottom of tower, allowing countercurrent contact, where temperature gradient is applied from high temperature (60 °C) to low temperature (10 °C) under constant pressure conditions (8MPa), changing the CO₂ phase (gas, supercritical, liquid) as the suspension is contacted with additional ultrasonic sonication. Issues and future prospects of this method have been made clear.

研究分野：化学工学、反応工学、超臨界流体工学、高分子科学、糖化学、バイオマス、超臨界水改質、天然高分子

キーワード：リポソーム 超臨界二酸化炭素 超音波 向流接触流通式反応装置

1. 研究開始当初の背景

【ナノ・リポソームの重要性と生産における課題】リポソーム (LS) とは、細胞の構成成分である両親媒性のリン脂質からなる小胞体 (マイクロからナノサイズ) のことであり、優れた生体適合性、生体分解性から、ドラッグデリバリー (DDS) のキャリアーとして用いられている。とくに、ナノ LS を用いた DDS は、優れた細胞透過性から、静脈注射による副作用の少ない次世代の癌治療法として注目されている。従来の LS 調製法は、原料のリン脂質の溶解を上げるために有機溶媒を使用するが、LS への溶媒残渣が懸念されており、また回分式による手法であるため、生産性が低い。また、従来法では選択的なナノサイズの LS 生成は難しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、医療用ナノ LS の連続調製法の構築である。具体的には、本プロセスの操作因子と LS の収率、薬剤の内包率、粒径の関係を明らかにし、相平衡、移動現象、反応速度を評価することにより現象を理解し、モデルによる定量化を行い、ナノ LS 相の安定性に及ぼす反応因子の解明を行う。最後に薬剤内包ナノ LS を調製し、その薬理活性の評価を行い、本手法の優位性と課題を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 回分式装置を用いた検討 (リポソームの安定性の評価)

既存の、回分式装置を用いて、CO₂ の相変化 (ガス、超臨界、液体) が LS 相生成に及ぼす影響を圧力条件 (6.8 - 8MPa)、各温度帯 (高温: 70-60、中温 30-40、低温: 25-10) において解明し、ナノ LS 調製の最適条件 (温度、圧力、超音波時間、水・CO₂ 組成) を明確にした。試料にレシチンを用いた。実験は、高压セル (150 cc) に超音波振動子 (VC-750, Sonic and Materials Inc.) が設置された装置を用いて行った (図 1)^{1,2)}。まず、高压セルに水、レシチンを所定量仕込み密封した。その後、高压セルを反応温度一定に制御された水浴に設置し、反応温度に昇温させたのち、セル上部のラインから二酸化炭素をポンプ (SCF-get, JASCO) により送液、反応圧力 (8MPa) まで昇圧したのち密封し、反応開始とした。超音波は、振幅 25% にて 5s ON, 10s OFF のサイクルで反応時間が終了するまで照射した。反応終了後、高压セルを冷却、ゆっくりと減圧させた後、セルの内容物を回収した。回収物は、0.22 μm 径のフィルターによりろ過し、残存レシチンとリポソーム溶液に分離した。残存レシチンは、乾燥させ秤量した。リポソームの平均粒径および粒径分布は、リポソーム溶液を SALAD7500 により測定した (図 2)。リポソーム収率は、仕込みレシチンと回収したレシチンから算出した。

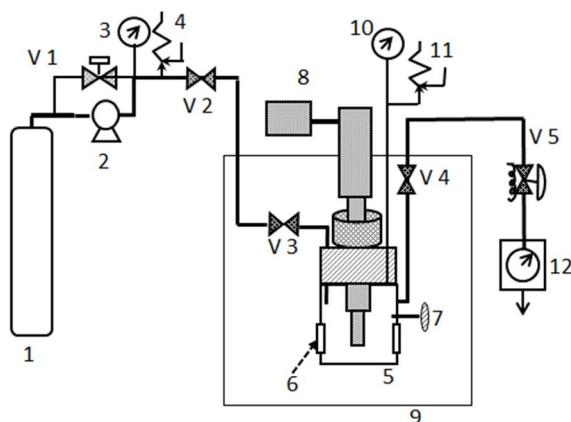


図 1 リン脂質懸濁液と高压二酸化炭素の超音波照射によるリポソームの調製に用いた回分式装置
 図: CO₂ ポンプ (1)、冷却機能付き HPLC CO₂ 送液ポンプ (2)、圧力計 (3) (10)、安全弁 (4) (11)、高压反応器 (5)、耐圧ガラス窓 (6)、熱電対 (7)、超音波発生機 (8)、ウォーターバス (9)、ガス流量計 (12)、超音波ホーン (13)、背圧弁 (V1) (V5)、バルブ: (V2) (V3) (V4)。

4. 研究成果

(1) 回分式装置を用いた検討 (リポソームの安定性の評価)

まず、超音波ホーンと回分式反応装置のシール部分に緩衝材を挟み込んでシールすることにより、超音波の過重負荷による緊急停止 (オーバーロード) の発生を抑制できることを見出した。このことにより、従来圧力条件 6.8MPa¹⁾ と比べて高い圧力条件 8MPa で行うことが可能となった。

図 3 に、LS の調整において CO₂ の相変化 (ガス、超臨界、液体) が LS 相生成に及ぼす影響について検討した (圧力: 8MPa、温度: 60、35、25) における (a) LS の平均粒径、(b) LS の回

収率を示す．図3よりLSの粒径は超音波照射をかけない場合200nm程度であった．また，各温度において，超音波照射時間125sにおいて140nmまで減少したが，それ以上照射時間をかけても粒径の変化は小さかった．一方，LS収率は，超音波を照射しない条件において一番高く，いずれの温度においても60-70%程度であり，超音波を照射時間の増大に50%程度に減少した．本結果は，超音波照射がLSの粒径の減少に有効である一方で，LSの凝集にも作用していることを示唆している．本結果は，各CO₂相においてもLSが生成し，超音波照射はLSの粒径減少に有効であり，ナノLSを高収率に得るためには照射時間が短い125sが最適であることを示唆している．

(2) 向流式反応装置の作成

最後に，向流接触式流通装置の開発を試みた．本装置は，開発した回分式反応装置をベースにこのセグメント(SG)を3つ連結することで構成した．本装置の簡略図を，図4に示す．本装置は，設定圧力条件(8MPa)において，高温(60℃)から低温(10℃)まで温度勾配を与え，塔頂から原料のリン脂質懸濁液，塔底から液体CO₂を供給し，リン脂質懸濁液とマルチに相変化した高圧CO₂(気相超臨界相液相)を向流接触し，超音波を直接照射し，ナノリポソームを含む液相を回収する構想のものである．

本装置は，A:送液部，B反応部，C:超音波照射部，D減圧・回収部により構成した．送液部(図

4A)は，HPLCポンプによる懸濁液の送液，CO₂は冷却器付きの超臨界ポンプを使用している．所定圧力(8MPa)において一定流量の供給が可能であった．反応部(図4B)は，3つの窓付きのセグメントを縦に連結した縦型の塔構成をとっている．SG間におけるCO₂と懸濁液の交換は2本の高さの異なるチューブで並列に連結することで行った．1本目のチューブはSG中の液相の高さがチューブの高さをこえるとオーバーフローした液体が下のSGの液相へ供給される構造，2本目のチューブはSGの上部に設置し，SG中の上層(CO₂相)のみが上セグメントの上層(CO₂相)へと移動できるように配置した．これを，塔頂と塔中，塔中と塔底SGの間の2か所に設置した．塔中SG，塔底SGは新たに作成したアルミブロックで完全に保護し，これに恒温流体を循環させることで各所定温度に制御を行った．本構成により塔底SGは低温，塔中SGは中温度に制御することで，それぞれ塔底のCO₂は液相，塔中のCO₂は超臨界状態となる．登頂SGは，独立したヒーターと断熱材の保護により高温に温度制御し，CO₂がガス相となるよう設定した．超音波照射部(図4C)は，SG中の反応液に直接超音波が照射するように3つのSGに水平方向から超音波ホーンを直接挿入する構造に設計した．反応は高压で行うため，超音波ホーンと反応装置は厳密にシールし，また，安全性を確保するために装置全体をアルミフレームに固定した．この超音波照射ホーンに対する体感重量により，超音波照射時に超音波ホーンにかかる負荷が急激に増大し，

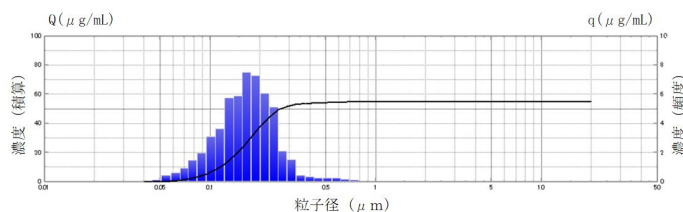


図2 リン脂質懸濁液と高圧二酸化炭素の超音波照射(25℃, 8 MPa, 125 s)により調整したリポソームの粒径分布(平均粒径: 165nm, SALAD7500により測定)

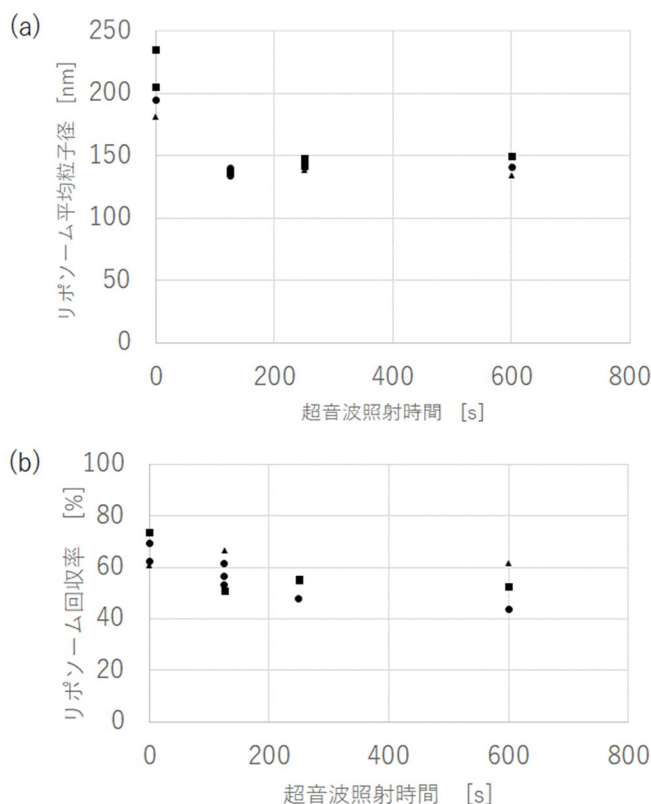


図3 リン脂質懸濁液と高圧二酸化炭素の超音波照射により調整したリポソームの(a)平均粒径分布および(b)リポソーム収率、超音波照射時間の依存性．調整条件8MPa: 圧力温度: 60 () 35 () 25 () ．

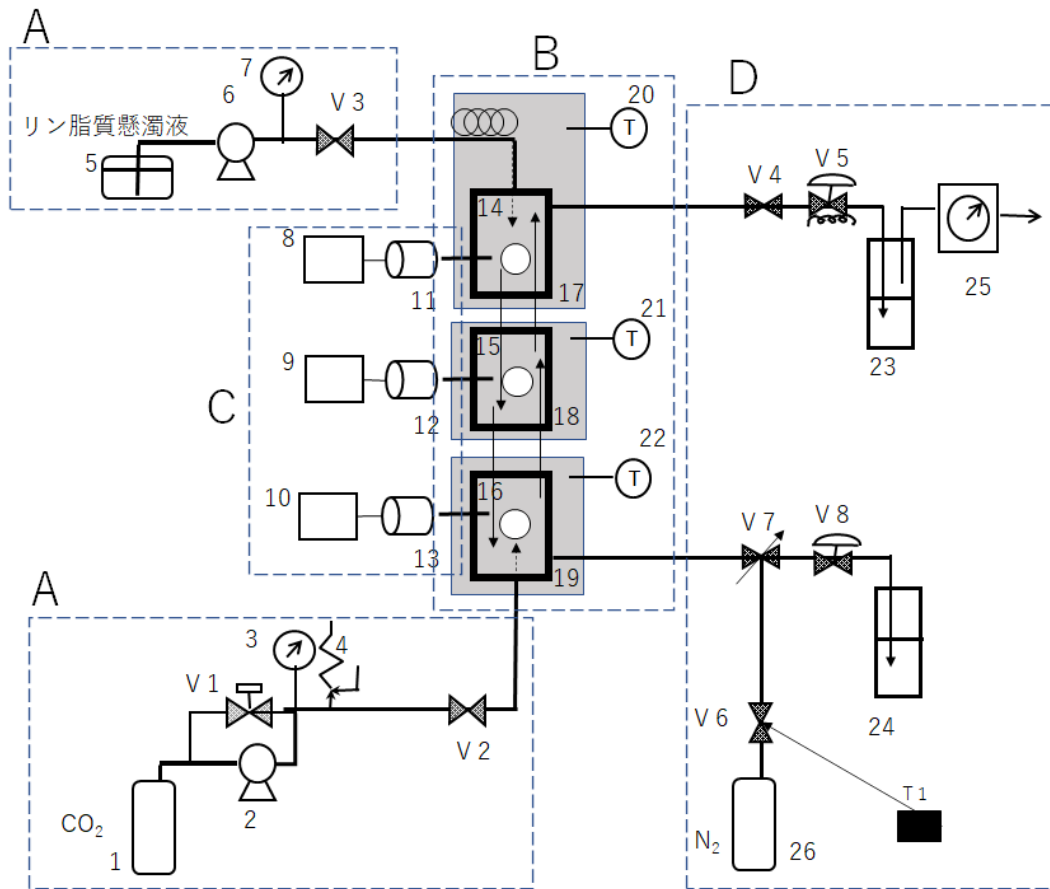


図4 本研究で開発したリン脂質懸濁液と高圧二酸化炭素の超音波の直接照射が可能な向流接触式流通装置の概略図。点線で囲まれた部分：送液部(A)、反応部(B)、超音波照射部(C)、減圧・回収部(D)を示す。装置の構成は以下の通り：CO₂ポンプ(1)、冷却機能付き HPLC - CO₂送液ポンプ(2)、リン脂質懸濁液(5)、HPLC送液ポンプ(6)、圧力計(3)(7)、安全弁(4)、耐圧ガラス窓付き高圧反応器(14)(15)(16)、熱電対(20)(21)(22)、超音波発生機(8)(9)(10)、ヒーター断熱材保護部分(17)、恒温アルミブロック(18)(19)、ガス流量計(24)、超音波ホーン(11)(12)(13)、自動式背圧弁(V5)背圧弁(V1)(V8)、バルブ(V2)(V3)(V4)、窒素ポンプ(26)、タイマー(T1)付きソレノイドバルブ(V6)、アクチュエーターバルブ(V7)、気液分離機(23)(24)、ガス流量計(25)。

安全装置である緊急停止(オーバーロード)が発生する。超音波ホーンへの負荷を緩和する緩衝材を用いた構造で新規に再設計・作成しこの発生を抑制した。減圧と回収(図4D)は、反応装置の塔頂と塔底の2か所に接続した2つの背圧弁により圧力を制御し、塔頂からはCO₂のガス、塔底からは水液相がそれぞれ背圧弁を介して回収する。塔頂のCO₂ラインは、設定圧力により自動的に開閉する背圧弁の作動により回収した。塔底の液相ラインは、タイマーにより加圧空気区駆動式アクチュエータで開閉するバルブとその先には、背圧弁を設置した。この背圧弁の設定圧力は、塔頂回収部のCO₂自動背圧弁設定圧力より少し低圧で解放するように設定した。本機構により、高圧力下で、少しの圧力変動で、CO₂、液相の回収が交互に行えるように工夫した。

今回は、設定圧力条件において、CO₂と懸濁液の連続供給、かくセグメントの温度制御には成功した一方で、多くの課題も明らかにした。具体的には、装置セグメントと超音波ホーンの連結の機構による照射時におけるホーンへの過重負荷が引き起こす緊急停止(オーバーロード)の発生や、塔頂と塔底からのサンプル回収、不均一な回収による圧力変動、リン脂質懸濁液の析出による、バルブや背圧弁の閉塞の問題が明らかとなった。

<新たに見えてきた課題> 超音波照射による、過重負荷のオーバーロードに関しては、シールの機構の改良や新たな緩衝材の選定、装置の小型化による、装置重量の現象で回避が可能であると考える。本装置では、塔底の液回収、減圧部では、アナログの背圧弁などを使用したため、供給量と回収量のバランスが崩れ、圧力変動や、サンプルの析出、閉塞も起きたと考えている。今後、セグメントの窓から2相境界の変動のモニタリングによる物質移動、圧力変動、回収液量、回収

気体量を制御する制御システムの構築が必要だと考える。

今回は、新たな手法に向けた装置の開発を試みた。本手法の実現はできなかったが、本研究を通して、多くの課題が明確となり、その開発の糸口も示すことができた。今後、これらの課題が解決され、装置が完成し、本手法の優位性が明らかとなることを願う。

<引用文献>

Tokunaga S. *et al.*, Journal of Supercritical Fluids, 160, (2020), 10.1016/j.supflu.2020.104782.

相田 卓, 堺 洸稀, 徳永 真一, シャーミン タンジナ, 三島 健司. 高圧二酸化炭素-水系における超音波直接照射によるミクロ相分離を利用したナノリポソームの調製. 高圧力の科学と技術. 2021. 31. 1. 26-31

相田卓, 徳永真一, 小野賢登, 伊藤稚菜, 堺洸稀, 柴田浩一郎, シャーミン タンジナ, 三島健司, 高圧二酸化炭素・水における超音波の直接照射を用いたナノ・リポソームの調製, 化学工学会第 51 回秋季大会, 2020.9

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 AIDA Taku, SAKAI Hiroki, TOKUNAGA Shinichi, SHARMIN Tanjna, MISHIMA Kenji	4. 巻 31
2. 論文標題 Micro-Phase Separation of High Pressure Carbon Dioxide and Water Using Direct Ultra-Sonation for Production of Nano Sized Liposomes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Review of High Pressure Science and Technology	6. 最初と最後の頁 26～31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4131/jshpreview.31.26	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenji MISHIMA, Tanjina SHARMIN, Taku Michael AIDA, Kento ONO
2. 発表標題 Application of direct sonication under high-pressure two-phase system
3. 学会等名 Proceedings of the 9th International Symposium on Molecular Thermodynamics and Molecular Simulation (MTMS ' 21) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野 堅登、中村 美由紀、シャーミン タンジナ、相田 卓、三島 健司
2. 発表標題 高圧二酸化炭素を用いたナノ小胞体の形成
3. 学会等名 化学工学会第87年会（神戸）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 五嶋涼、明石侑子、シャーミンタンジナ、中村美由紀、相田卓、三島健司
2. 発表標題 気液界面膨張技術により調製されたりポソームの薬剤内包率の評価
3. 学会等名 第58回化学関連支部合同九州大会外国人研究者交流国際シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 五嶋涼, 徳永真一, シャーミン タンジナ, 中村美由紀, 相田卓, 三島健司
2. 発表標題 高圧二酸化炭素を用いた機能性リボソームの調整
3. 学会等名 化学工学会九州支部オンライン学生発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相田卓, 徳永真一, 小野賢登, 伊藤稚菜, 堺洗稀, 柴田浩一朗, シャーミン タンジナ, 三島健司
2. 発表標題 高圧二酸化炭素・水における超音波の直接照射を用いたナノ・リボソームの調製
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 相田卓, シャーミン タンジナ, 三島健司, 立花克郎
2. 発表標題 [依頼講演] 水・二酸化炭素・超音波を用いたナノデバイスの調製
3. 学会等名 化学工学会第51回秋季大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 徳永真一, 中村美由紀, Sharmin Tanjina, 相田卓, 三島健司
2. 発表標題 超音波による気液界面拡張を利用したリン脂質小胞体の形成
3. 学会等名 第29回ソノケミストリー討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 八嶋なな子、中村美由紀、シャーミンタンジナ、相田卓、三島健司
2. 発表標題 エマルション抽出技術を利用した医療用ナノ粒子の開発
3. 学会等名 第23回化学工学会学生発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢田守、中村 美由紀、シャーミン タンジナ、相田 卓、三島 健司
2. 発表標題 SFEE法を用いたレスベラトロールナノカプセルの調製
3. 学会等名 化学工学会第86年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 S. Tokunaga, M. Nakamura, T. Sharmin, T.M. Aida, K. Mishima
2. 発表標題 Preparation of medical nanomaterials by ultrasonic irradiation
3. 学会等名 41st Symposium on Ultrasonic Electronics (USE2020) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	シャーミン タンジナ (SHAMIN TANJINA) (00794182)	福岡大学・工学部・助教 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三島 健司 (MISHIMA KENJI) (40190623)	福岡大学・工学部・教授 (37111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関