

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H01773

研究課題名（和文）超臨界セグメント空間を利用した生体癒着性リポソームの連続合成プロセス

研究課題名（英文）Flow process of bioadhesive liposome production using supercritical-segmented solution

研究代表者

下山 裕介（Shimoyama, Yusuke）

東京工業大学・物質理工学院・教授

研究者番号：30403984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：微小流路流路における超臨界二酸化炭素の流動状態を利用したリポソームの連続合成プロセスを構築し、リポソーム表面をPEG化するプロセスへと展開した。微小流路で形成される超臨界セグメント空間により、流動した状態でリポソーム構造が形成されることを確認した。また、脂質成分をethanolに溶解することで、溶媒流量の変化により、リポソームの平均粒子径を大幅に変化させることを可能にした。PEG化リポソームの形成では、容器内の攪拌によるリポソーム形成手法と比較し、PEG化脂質をバルク水相に溶解させるプロセスを用いることで、リポソームの微粒化、ならびにカプセル化効率の向上を可能とした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超臨界二酸化炭素を利用することで、人体に有害となる有機溶媒の使用量を大幅に低減でき、かつ連続的なリポソームの生成プロセスを構築した点は、安全かつ低価格な医薬品、化粧品の製造への応用が期待され、社会的な意義がある。本研究課題における微小流路での流動状態、ならびに微量流路におけるリポソームの構造化は、超臨界二酸化炭素の新たな技術展開として学術的意義がある。

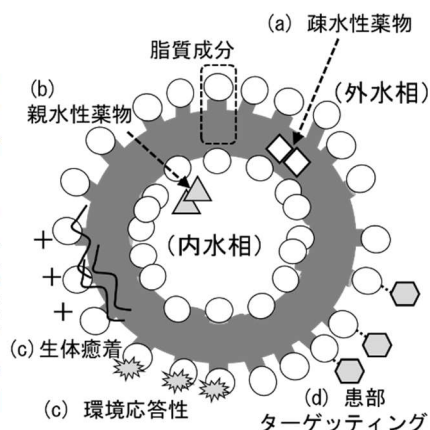
研究成果の概要（英文）：Flow-type fabrication method of liposome was developed by using flow state of supercritical carbon dioxide in microfluid system. This flow-type process was extended to the fabrication of PEGylated liposome. It is found that the structured-liposome can be formed in this flow-type process. Size of liposome can be controlled largely using ethanol as solvent for lipid in the flow-type process. Also, the fabrication process of PEGylated liposome in Post-Tube process allows to reduce the particle size of liposome and increase the encapsulation efficiency compared with those by the batch-type process.

研究分野：化学工学

キーワード：超臨界二酸化炭素 フロープロセス リポソーム 微小流路

1. 研究開始当初の背景

脂質二重層で形成されるリポソームは、右図のように、内水相を有するカプセル構造であり、疎水性薬物(右図 a)や親水性薬物(右図 b)のキャリアとして、薬物輸送システムに応用される。さらには、リポソーム中の脂質の修飾により、生体癒着・環境応答性や(右図 c)、タンパク質、ペプチドを用いた患部ターゲティング(右図 d)といった機能性の付加も可能であり、実用化への展開が注目される。リポソームの作製方法として、既存技術では、脂質成分の薄膜形成を利用した Bangham 法や、逆相蒸発法が主流であるが、リポソームの粒径が不均一である点、作製プロセスにおいて熱操作や大量の有機溶媒を用いることから、薬物成分やタンパク質の熱分解や変性が生じる点が問題となる。このような問題点の解決に向けて、超臨界 CO₂ を媒体としたリポソーム作製技術も提案されている。ここでは、圧力変化による超臨界 CO₂ の密度・溶解性を大幅に変化することで生じる相分離を利用し、リポソームを作製することが可能である。これまでの超臨界 CO₂ を利用したリポソームの作製プロセスでは、研究室規模における少量生産に留まっているのが現状であり、産業実用化における大量生産を想定した場合、超臨界 CO₂ 技術の連続合成プロセスへの展開が不可欠である。また、体内への薬物投与において、患部表面への投与を効率化するために、リポソームへ生体癒着性を付加することも重要である。



2. 研究の目的

本研究では、単に超臨界 CO₂ を媒体として扱うのではなく、超臨界 CO₂ 相と液相が混在するシステムを機能的空間として利用したリポソームの連続合成プロセスを構築することを目的とした。これまでに他の研究グループにより報告されている、超臨界 CO₂ を利用したリポソームの作製技術では、超臨界 CO₂ の溶媒効果として、①急速膨張、②貧溶媒、③脂質の溶解といった性質が利用されている。①～③の作製技術では、リポソームの作製で課題とされている「有機溶媒の使用量」や「高温条件でのプロセス操作」を回避できる利点がある。一方で、①、③の手法では、「超臨界 CO₂ に溶解可能な脂質成分が限定される点」、②の手法では、「合成後のリポソームの粒径が不均一」といった問題が残されている。さらには、①～③の共通する問題点として、「装置コストの増大」や、「少量生産」が挙げられる。リポソームの作製プロセスでは、脂質成分の溶解、相分離、溶媒除去、リポソームの精製等、多段の単位操作によるプロセス構築が必要となる。そこで本研究課題では、「超臨界 CO₂ の特性を巧みに利用する」点と、「リポソーム作製に必要な多段の単位操作を連続プロセスに展開する」点を融合することを念頭にし、超臨界 CO₂ 相と液相が形成する「エマルション」や「スラグ流」といった「超臨界セグメント空間」における迅速な混合・物質移動と、超臨界 CO₂ の溶解性を利用し、生体癒着性リポソームの連続合成プロセスを構築し、プロセス設計の指針を確立することを、目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 微小流路における超臨界 CO₂ 相と有機溶媒相との流動観察

超臨界セグメント空間を利用した、リポソーム連続合成プロセスでは、有機溶媒相に脂質成分を溶解させ、超臨界 CO₂ 相と混合する必要があるため、微小流路における超臨界 CO₂ 相と有機溶媒相が形成する流動状態を把握することは不可欠となる。Fig. 1 に示す装置を用いて、超臨界 CO₂ + 有機溶媒系の微小流路における流動状態の観察実験を行い、有機溶媒種、温度・圧力の影響について検証した。Fig. 1 に示す装置を用いた、微小流路における流動状態の観察実験では、超臨界 CO₂ と有機溶媒の混合を促進するために、Fig. 2 に示すように、swirl 型のマイクロ混合部を使用し、混合部の下流部に、管径 1 mm の微小流路内を直接観察できるサファイア製の可視窓を設置した。ここでは、有機溶媒として、1-propanol, ethanol, methanol, hexane を用いた流動状態の観察実験を行っている。温度 60 °C、圧力 10.0 MPa における超臨界 CO₂ + 1-propanol, ethanol, methanol, hexane 系の流動観察実験を行った。この温度・圧力条件では、超臨界 CO₂ + 1-propanol, ethanol, methanol 系では、気液二相領域である。

3-2. 微小流路におけるリポソーム連続合成プロセス

超臨界 CO₂ 相と有機溶媒相との混合、水相とのセグメント空間の形成を利用し、微小流路を用いたリポソームの連続合成プロセスを構築した。Fig. 3 に示すように、超臨界 CO₂、脂質成分を溶解した有機溶媒、医薬品成分を溶解した水溶液、バルク相の水を、それぞれ 4 つの微小流路より供給した。超臨界 CO₂ と混合した脂質成分溶液と、医薬品成分が溶解した水溶液は、swirl 型の微小混合部で混合され、水/CO₂ エマルションが形成される。Swirl 型混合部で形成された水/CO₂ エマルションは、バルク相の水と接触し、水/CO₂ エマルション中の水滴がバルク水相へ移動し、リポソームが形成される。

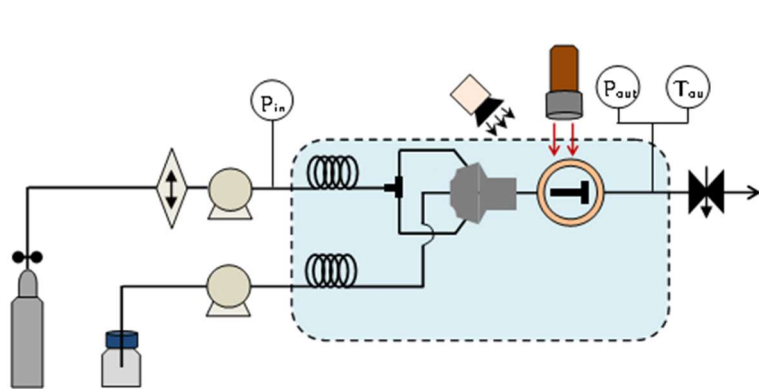


Fig. 1 微小流路における流動観察装置

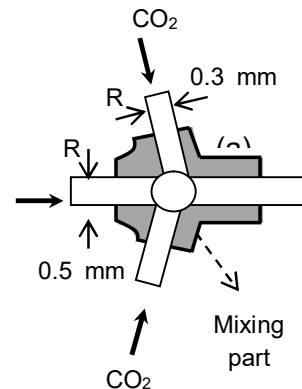


Fig. 2 swirl型混合部

ここでは、リポソームを形成する脂質成分として *lecithin* を、*lecithin* を溶解する溶媒として、*ethyl acetate*, *ethanol* を、医薬品成分として、*timolol maleate* を用いた。本研究課題では、形成されたりポソームの粒子径を、動的散光法により測定した。また、リポソームに内包された医薬品成分のカプセル化効率は、透析実験により決定した。形成されたりポソームの粒子径、ならびにカプセル化効率に対する、有機溶媒種、ならびに *lecithin* 溶液の流量が及ぼす影響について検討した。

さらに、リポソームの体内における滞留時間、*timolol maleate* の生体利用能の向上を目指し、脂質成分として

1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC) , 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amine(polyethylene glycol)-2K] (DSPE-PEG, average molecular weight of 2000) を用い、PEG 化リポソームの形成を図った。ここでは、PEG 化脂質として利用する DSPE-PEG を、DSCP 溶液に溶解させた場合の Pre-Tube 法と、DSPE-PEG をバルク水相に溶解させた場合の Post-Tube 法を用いて、PEG 化リポソームを形成した。形成したりポソームに対して、粒子径、*timolol maleate* のカプセル化効率に及ぼす DSPE-PEG 質量分率の影響について検討した。

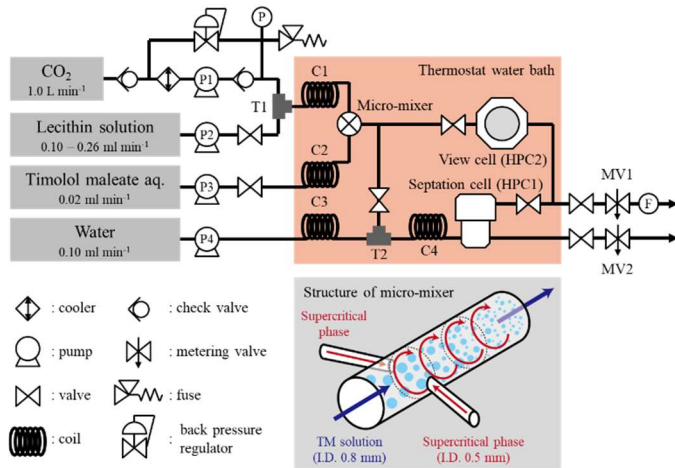


Fig. 3 リポソームの連続合成プロセス

4. 研究成果

Fig. 4 に超臨界 CO₂+1-propanol, ethanol, methanol 系の微小流路における流動状態の観察結果を示す。Fig. 4 に示すように、超臨界 CO₂+1-propanol, ethanol, methanol 系では、CO₂モル分率 $x_{CO_2}=0.5$ の場合には、droplet flow, slug flow, bubble flow といった、有機溶媒の液相がセグメント分割された流動状態を形成している。CO₂モル分率が增大するに伴い、セグメント長さが長くなる流動状態へと変化していることが確認される。超臨界 CO₂+hexane 系においては、観察実験を行った温度 60 °C, 圧力 10.0 MPa では、均一相を形成する条件である。Fig. 4(d)に示すように、CO₂モル分率 $x_{CO_2} = 0.5$ の場合には、均一相流れを形成する一方、CO₂モル分率が增大するに伴い、slug flow の二相流れとなることが確認される。

Fig. 3 で示される微小流路における超臨界セグメント空間を利用し合成したりポソームを透過型電子顕微鏡により観察した結果、脂質膜により、外水相と内水相が隔たられたりポソーム構造が形成されることが確認された。形成されたりポソームの粒子径、ならびに *timolol maleate* のカプセル化効率に及ぼす、脂質溶解に用いる溶媒種、ならびに脂質溶液の流量が及ぼす影響を、それぞれ Figs. 5, 6 に示す。Fig. 5(a)に示すように、*lecithin* を溶解させる溶媒として、*ethyl acetate* (EA)を用いた場合、脂質溶液の流量を変化させても、形成されたりポソームの平均粒子径は、約 100 nm とほぼ一定となることがわかる。一方で、Fig. 5(b)に示すように、*lecithin* の溶媒として *ethanol* (EtOH)を選択した場合、*lecithin* 溶液の流量が増大するに伴い、りポソームの平均粒子径も増大する。特に、EtOH を溶媒とした場合、*lecithin* 溶液の流量を変化させるのみで、形成されたりポソームの平均粒子径を、約 100 nm~3 μm と大幅に変化させることに成功した。りポソームに内包される *timolol melate* のカプセル化効率について、Fig. 6(a)に示すように、*lecithin* の溶媒に EA を選択した場合、溶液の流量依存性は小さく、カプセル化効率も 30%程度であった。Fig. 6(b)に示すように、*lecithin* の溶媒に、EtOH を用いた場合、溶液流量の増大に伴い、カプセル化効率も増大し、約 80%まで向上することが確認された。

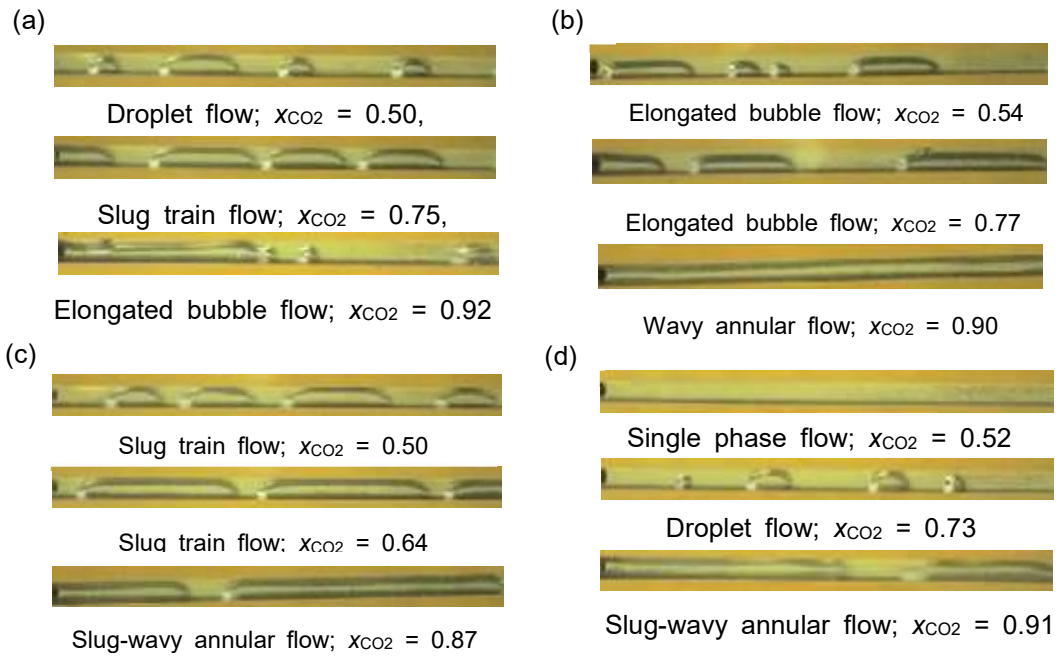


Fig. 4. 60 °C, 10.0 MPa における微小流路における流動状態の観察結果. (a) CO_2 + 1-propanol, (b) CO_2 + ethanol, (c) CO_2 + methanol, (d) CO_2 + hexane systems.

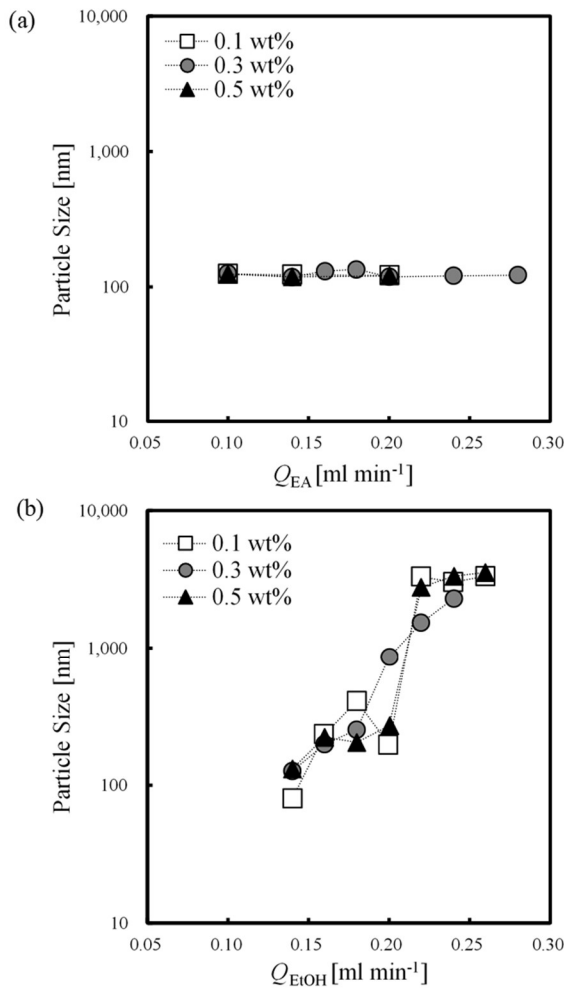


Fig. 5. リポソーム粒子径に対する溶液流量の影響. (a) EA, □: $C_{\text{lec}} = 0.1$ wt%, ●: $C_{\text{lec}} = 0.3$ wt%, ▲: $C_{\text{lec}} = 0.5$ wt%, (b) EtOH, □: $C_{\text{lec}} = 0.1$ wt%, ●: $C_{\text{lec}} = 0.3$ wt%, ▲: $C_{\text{lec}} = 0.5$ wt%

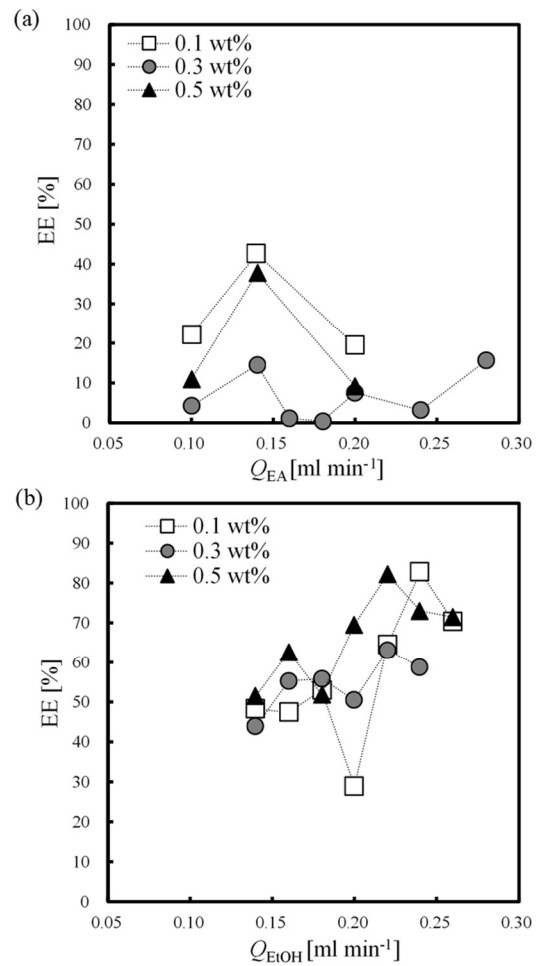


Fig. 6. カプセル化効率に対する溶液流量の影響. (a) EA, □: $C_{\text{lec}} = 0.1$ wt%, ●: $C_{\text{lec}} = 0.3$ wt%, ▲: $C_{\text{lec}} = 0.5$ wt%, (b) EtOH, □: $C_{\text{lec}} = 0.1$ wt%, ●: $C_{\text{lec}} = 0.3$ wt%, ▲: $C_{\text{lec}} = 0.5$ wt%

Fig. 7 に、PEG 化リポソームの形成における手法の影響を示す。容器内の攪拌によりリポソームを形成する手法である Pre-mix 法、Post-insertion 法に対して、超臨界セグメント空間を利用した Post-Tube 法により形成された PEG 化リポソームの粒子径分布、ならびに timolol maleate のカプセル化効率の結果を比較している。Fig. 7 に示すように、超臨界セグメント空間を利用した連続合成プロセスである Post-Tube 法では、形成された PEG 化リポソームの粒子径が、Pre-mix 法、Post-insertion 法よりも小さくなるのがわかる。さらに、Fig. 7(a) に示すように、Post-Tube 法で形成された PEG 化リポソームに内包された timolol maleate のカプセル化効率は、Pre-mix 法、Post-insertion 法よりも高い値を示している。また、Post-Tube を用いて形成した PEG 化リポソームの平均粒子径、timolol maleate のカプセル化効率に対する DSPE-PEG 質量分率の影響を Fig. 8 に示す。DSPE-PEG 質量分率が增大するに伴い、PEG 化リポソームの平均粒子径は増大する一方、timolol maleate のカプセル化効率はほぼ一定の値を示すことが確認される。

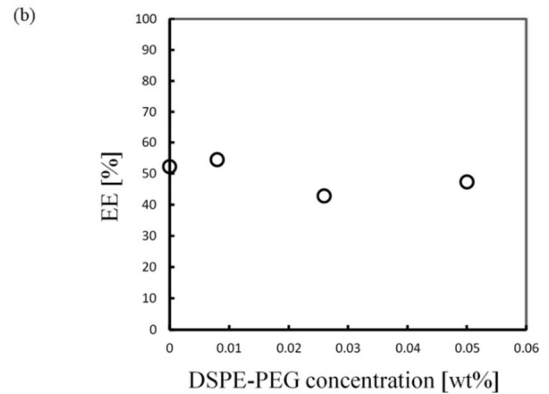
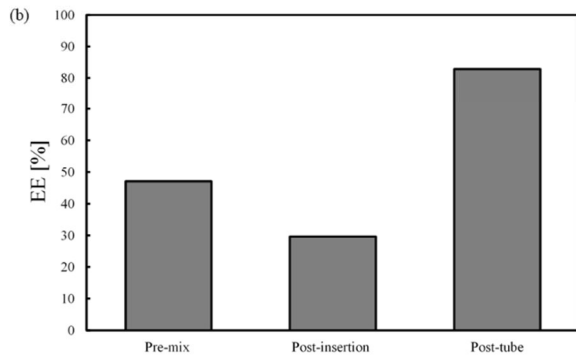
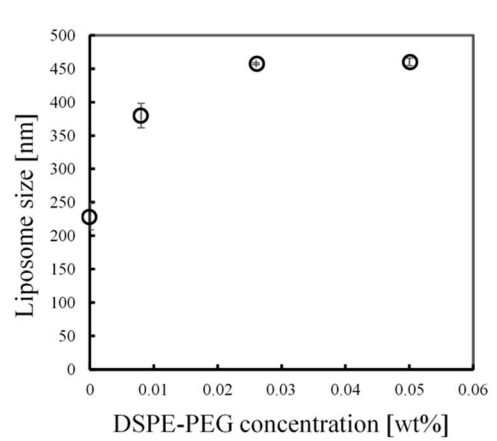
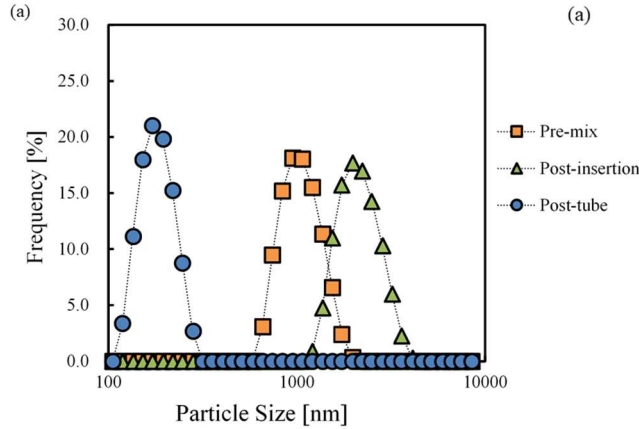


Fig. 7. PEG 化リポソームの (a) 粒子径分布、(b) カプセル化効率における形成プロセスの影響

Fig. 8. PEG 化リポソームの (a) 平均粒子径 (b) カプセル化効率に対する DSPE-PEG 質量分率の影響.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Peany Houg, Yuya Murakami, Yusuke Shimoyama	4. 巻 394
2. 論文標題 Flow patterns in microfluidic system of CO ₂ + 1-propanol, ethanol, methanol, and hexane binary mixtures at high pressures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 124891
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cej.2020.124891	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Peany Houg, Yuya Murakami, Yusuke Shimoyama	4. 巻 163
2. 論文標題 Effect of Slug Flow Pattern on Supercritical Extraction of Phenolic Compounds from Aqueous Solutions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Supercritical Fluids	6. 最初と最後の頁 104885
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.supflu.2020.104885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Peany Houg, Yuya Murakami, Yusuke Shimoyama	4. 巻 47
2. 論文標題 Micro-mixing in flow-type process for supercritical CO ₂ extraction of ferulic acid and gallic acid from aqueous solution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of CO ₂ utilization	6. 最初と最後の頁 101503
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jcou.2021.101503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 2件／うち国際学会 5件）

1. 発表者名 下山裕介
2. 発表標題 超臨界二酸化炭素相と界面を利用した材料プロセス
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 Bao Qiuqi, 織田耕彦, 下山裕介
2. 発表標題 超臨界エマルジョン抽出法を利用したポリカプロラクトンナノ分散液の作製
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 Wijakmatee Thossaporn, 織田耕彦, 下山裕介
2. 発表標題 Effect of pressure and surfactant on formation of solid lipid particles using supercritical fluid extraction of emulsion
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 鳥田勇介, 村上裕哉, 下山裕介
2. 発表標題 超臨界エマルジョン抽出における相挙動解析と抽出機構の解明
3. 学会等名 分離技術会年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peany Houn, Yuya Murakami, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Supercritical micro-flow extraction of phenolic compounds from aqueous solution: Effect of residence time
3. 学会等名 分離技術会年会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上溪汰, 秋山龍之介, 村上裕哉, 下山裕介
2. 発表標題 超臨界二酸化炭素による界面フロープロセスを利用したリポソーム生成
3. 学会等名 化学工学会横浜大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Murakami, Keita Inoue, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Flow production of functionalized liposome using supercritical carbon dioxide and microfluid system
3. 学会等名 Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Peany Houng, Yuya Murakami, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Investigation of flow patterns in microfluidic system for binary and ternary systems
3. 学会等名 Asian Pacific Confederation of Chemical Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Flow production of nanosuspension in supercritical CO2
3. 学会等名 Supergreen 2019 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Murakami, Yusuke Torita, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Mass transfer analysis on supercritical fluid extraction of emulsion using image analysis of phase behavior
3. 学会等名 IMPRES2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuya Murakami, Yusuke Torita, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Oil phase swelling and extraction mechanism during supercritical fluid emulsion extraction via phase behavior observation
3. 学会等名 8th International Symposium on Molecular Thermodynamics and Molecular Simulation (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上裕哉, 鳥田勇介, 下山裕介
2. 発表標題 画像解析を用いた超臨界エマルション抽出における物質移動解析
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yuya Murakami, Yusuke Torita, Yusuke Shimoyama
2. 発表標題 Nobel production of liposome in a continuous manner using micro-mixer and supercritical carbon dioxide
3. 学会等名 6th International Workshop on Process Intensification
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 村上裕哉, 鳥田勇介, 下山裕介
2. 発表標題 超臨界エマルション抽出を利用した疎水性化合物分散溶液の作製と物質移動解析
3. 学会等名 化学工学会第84年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------