

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：32613

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23656496

研究課題名（和文） 膜を用いたリポソームプロセッシング技術の創製

研究課題名（英文） Development of processing techniques for liposomes using membranes

研究代表者

中尾 真一 (NAKAO SHIN-ICHI)

工学院大学・工学部・教授

研究者番号：00155665

研究成果の概要（和文）：SPG膜を用いた単分散リポソームの新規調製法の開発に成功した。本手法はアルコール中に溶解した脂質をSPG膜を介して水相へ展開することにより、膜面付近でアルコールと水が溶解する界面を形成し、脂質の溶解度が減少することでリポソームの自発的形成を促すものである。本手法により粒径100nm程度の極めて単分散なリポソームを調製できることを明らかにした。また使用するアルコールの種類により、リポソームの凍結融解に対する応答が大きく異なることを明らかにした。これはアルコールが脂質膜の流動性に影響を与えるためと考えられた。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a facile and novel method for preparing liposomes simply by permeating lipid-alcohol solutions through Shirasu porous glass (SPG) membranes. This is based on the phenomenon in which an interface between a lipid-alcohol solution and water is formed and the two solutions mix with each other at the surface of an SPG membrane when the lipid-alcohol solution is slowly permeated through the membrane; this reduces the concentration of the alcohol solution and induces spontaneous formation of liposomes. We successfully prepared 100-nm monodispersed liposomes by this method using lipid-isopropyl alcohol (IPA) and lipid-ethanol (EtOH) solutions. Additionally, an increase in the liposome size was clearly observed in freezing-thawing treatment when IPA was used as the alcohol, whereas the liposome size was unchanged by freezing-thawing treatment when EtOH was used. It is interesting that the alcohol affected the liposome properties, in particular the membrane fluidity, even although no effect of the alcohol on the liposome structure, such as size, monodispersity, was observed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：膜工学

科研費の分科・細目：プロセス工学，化工物性・移動操作・単位操作

キーワード：リポソーム，SPG膜，脂質，単分散，流動性，アルコール

1. 研究開始当初の背景

1990年代前半，O/W(あるいはW/O，W/O/W，O/W/Oなどの複合型も含む)エマルジョン調製法として膜乳化法が提案された。本手法は，O/Wエマルジョンを例に説明すると，水と混和しない油相を膜細孔を介して水相へ圧入

分散することで，エマルジョンを得る手法である。それ以降，膜によるエマルジョン濃縮に関する研究が進み，我々も膜によるエマルジョンの分級手法の開発，さらには膜乳化エマルジョンを利用した機能性微粒子の開発を行ってきた。これら一連の膜を用いたエマ

ルシオンプロセス技術は、膜を分離媒体として捉えるという従来の概念を打ち破り、新しい膜利用法を確立したという点でも、画期的であった。

近年、脂質膜で構成されたカプセル状の球体物質であるリポソームが注目を集めている。リポソームを細胞のモデルとして捉えた研究が進む傍ら、薬物を封入するキャリアとしての利用法が提案され、またリポソームを機能性素子と捉えて新規な材料開発を目指す工学分野も提唱されるなど、目覚ましい成果をあげている。一方で、大量生産へ展開可能なリポソームの調製法や制御法などは検討の余地が残っていた。

2. 研究の目的

本研究では新規な工学的手法として、膜を用いたリポソームプロセス技術を提案した。膜を用いる手法であるため、スケールアップが容易である点が最大の利点であるが、リポソームを膜を用いて調製するという本研究は極めてチャレンジングな提案であった。

研究期間内では膜を利用した(1)単分散リポソーム調製と(2)多分散リポソーム分級を行うことを当初の目的とした。より具体的には、(1)では、アルコールの種類(=水との混和性の違い)や膜細孔径、さらには膜透過の運転条件を変化させることで、リポソーム調製が可能な条件を探索するとともに、調製されるリポソームの粒径や粒度分布がどのように変化するかを詳細に追跡することを目的とした。(2)では、既存の単純水と法やエタノールインジェクション法により多分散リポソームを調製し、膜でろ過することにより分級を行うことを計画した。すなわち運転条件が分級に与える影響を詳細に追跡し、原液側のリポソームの粒度分布と膜細孔径から、透過側のリポソームの粒度分布が予測できるモデルの開発を行うことを目的とした。

しかし、(1)の課題を推進中に、調製したリポソームの性質がアルコールの種類により急激に変化することが明らかになり、この点の詳細な検討に予想以上に時間を費やした。さらに(2)の課題について類似研究が韓国のグループにより 2011 年に発表された (*Colloids and Surfaces A*, 2011, 392, 250-255) こともあり、(1)の課題に注力して研究を実施した。

3. 研究の方法

3-*sn*-phosphatidylcholine とコレステロールを 1:1 となるようにクロロホルムに溶解し、減圧乾燥することで脂質薄膜を得た。ここにイソプロピルアルコール (以下 IPA) またはエタノール (EtOH) を添加し、1 mM または 10 mM の脂質-アルコール溶液を調製した。こ

れを外圧式マイクロキット (SPG テクノ製) を使い、SPG 膜 (細孔径 0.2, 0.5, 1.1 μm) を介して水相へ展開しリポソームを調製した。調製したリポソームは DLS, TEM (ネガティブ染色法) により評価した。また凍結融解法により粒径の変化を追跡することで、リポソームの性質を評価した。

4. 研究成果

(1) リポソームの TEM による評価

脂質濃度 10 mM, SPG 膜細孔径 1.1 μm とし、アルコールとして IPA を用いた際に調製されたリポソームの TEM を図 1 に示す。図 1 より、マルチラメラとなっていることが明らかとなった。EtOH を用いた場合も同様にマルチラメラのリポソームが調製されたことが明らかとなった。

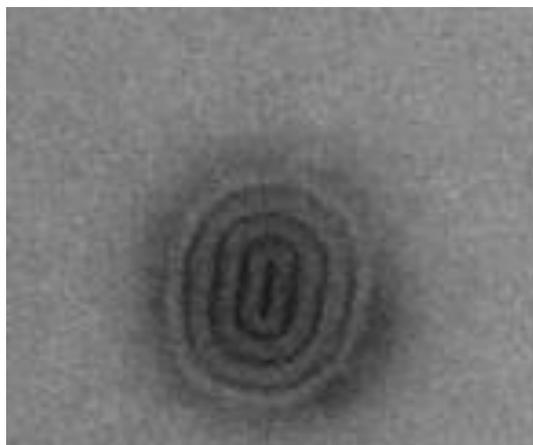


図 1. 本手法により調製されたリポソームの TEM (脂質濃度 10 mM, SPG 膜細孔径 1.1 μm , アルコール IPA)

(2) リポソームの DLS による評価

脂質濃度 10 mM, SPG 膜細孔径 1.1 μm とし、アルコールとして IPA と EtOH を用いた際に調製されたリポソームの粒度分布を DLS により測定した。アルコールとして IPA を用いた場合のリポソーム平均粒径は 121 nm, エタノールを用いた場合は 124 nm となり、アルコールの種類に依らず極めて単分散なリポソームが調製された。

(3) SPG 膜細孔径・脂質濃度がリポソーム径に与える影響の評価

SPG 膜細孔径とリポソーム径の関係を図 2 に示す。脂質濃度は 1 mM と 10 mM の 2 種類の条件でリポソームを調製した。図 2 より明らかなように、リポソーム径は SPG 細孔径に依らず 100~150 nm 程度であり、SPG 膜細孔径と比べて小さな値である。また脂質濃度にも依らない。一方で SPG 膜乳化法でエマルション調製を行う場合は、調製されるエマルション径は SPG 膜細孔径の約 3 倍となることが知られている。よって、本提案手法において

は、乳化現象は起きておらず、コンセプト通りアルコールが膜界面で水と混和・溶解し、脂質の溶解度が減少することで、リポソームが自発的に形成されていることを示す結果と言える。これらの結果は IPA と EtOH の違いに依らなかった。これは IPA と EtOH はどちらも水への溶解性が極めて高いことに起因すると考えられる。

またアルコールとして水への溶解度が 7.7 g/L と IPA や EtOH に比べて低いブタノールを用いて同様の実験を行ったところ、再現よくリポソーム調製をすることができなかつた。すなわち、脂質溶解用溶媒として用いるアルコールの種類、とくに水への溶解度は、本手法において重要なファクターであることが明らかとなった。

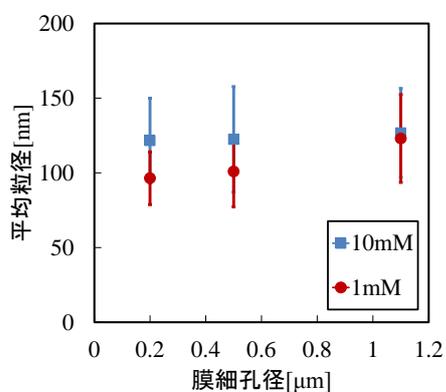
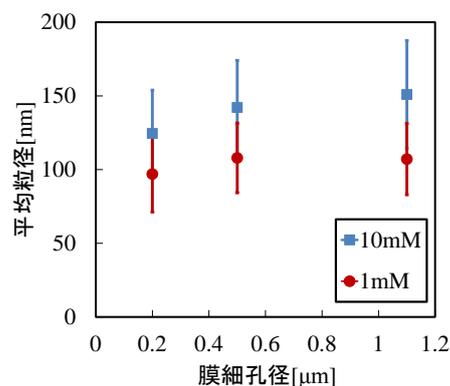


図 2. SPG 膜細孔径・脂質濃度とリポソーム径の関係(アルコール 上: IPA, 下: EtOH)

(4) リポソームの凍結融解

本手法で調製したリポソームを、液体窒素で凍結した後に室温で溶解し DLS により粒径を測定するというサイクルを 1 回とし、計 5 回のサイクルを実施した。サイクル数とリポソーム径の関係を図 3 に示す。アルコールとして IPA と EtOH を用いた場合、上記のようにリポソーム径や構造にはほとんど影響を与えなかったにも関わらず、凍結融解の挙動は大きく異なった。まずアルコールとし

て IPA を用いた場合、粒径はサイクル数とともに上昇し、339 nm まで増加した。一方でアルコールとして EtOH を用いた場合、粒径はサイクル数によって変化することはなかった。IPA と EtOH の誘電率、水への溶解度に大きな違いはないため、本調製により調製されるリポソーム膜内部にわずかにアルコールが残存し、これが脂質膜の流動性に影響を与え、上記のような結果が得られたものと考えられる。膜流動性はリポソームにとって重要な性質の 1 つであり、本手法を用いてこれを制御する方法論を今後確立することは極めて重要であると言える。

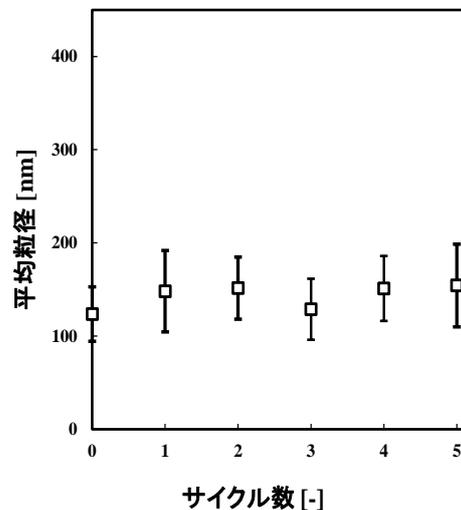
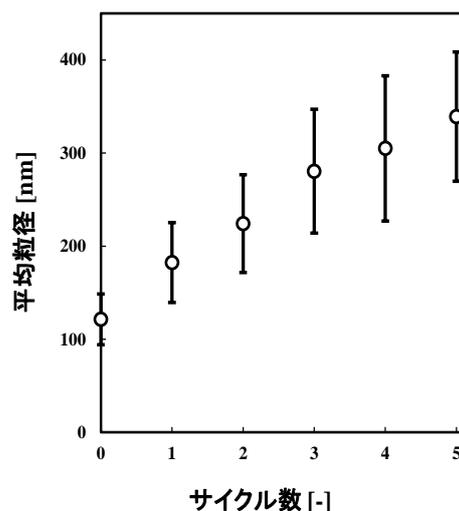


図 3. 本手法で調製したリポソーム径と凍結融解回数の関係(アルコール 上: IPA, 下: EtOH)

なお、本成果に関する学術論文を現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔学会発表〕(計2件)

- (1) 赤松憲樹, 清水勇輔, 清水龍太郎, 中尾真一, SPG膜を利用したリボソーム調製法の開発, 日本膜学会第35年会, 2013年5月20日~21日, 早稲田大学
- (2) 清水勇輔, 清水龍太郎, 赤松憲樹, 中尾真一, SPG膜を用いたリボソーム調製法に関する研究, 日本海水学会若手会第4回学生研究発表会, 2013年3月7日~8日, 横浜国立大学

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ns.kogakuin.ac.jp/~wwb1051/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中尾 真一 (NAKAO SHIN-ICHI)
工学院大学・工学部・教授
研究者番号: 00155665

(2) 研究分担者

赤松 憲樹 (AKAMATSU KAZUKI)
工学院大学・工学部・助教
研究者番号: 50451795

(3) 連携研究者

()

研究者番号: