

新規なリポソーム製造方法およびインラインリアクターを利用したリポソーム製造装置

Method for producing Liposome by self-assembly and manufacturing apparatus using In-Line Reactor

清水 佳隆

東海大学先進生命科学研究所・高機能食品部門

Yoshitaka Shimizu

Division of Functional Food Sciences

Institute of Advanced Biosciences, Tokai University

[要旨]

リン脂質等の自己組織化による新規なリポソーム製造方法を開発した。本法は水混和性有機溶媒を含む水溶液に脂質類を混合後、加温することで脂質類を溶解させ、続く冷却によって均一粒子径のリポソームが生成する現象を利用したリポソームの製造方法である。さらに、本法をマイクロインラインリアクター製造装置に適用することで無菌的なリポソームの連続製造を可能とした。

[Abstract]

A novel technique called the “LibMec method” is presented for the preparation of Liposome. The method consists of three main steps. A first mixing step wherein one or more lipids are mixed with an aqueous solution containing a water-miscible organic solvent; a heating step wherein the mixture obtained by mixing the lipids with the aqueous solution is heated to a temperature at which the lipids are dissolved in the aqueous solution; and a cooling step following the heating step, wherein the resulting mixture is cooled down to a temperature at which a liposome is produced. Uniform-sized liposomes having a high encapsulation rate can be easily obtained by the method. Furthermore, based on the LibMec method, we developed a device that can aseptically and continuously produce liposomes using a micro flow reactor.

[Key Words]

Liposome, Selfassembly, In-line reactor, aseptically and continuous production

1. はじめに

リポソームは細胞膜の主要な構成成分であるリン脂質等から再構成された脂質二分子膜からなる閉鎖小胞である。

A.D. Bangham と R.W. Horne により始めてリポソームに関する報告¹がなされてからすでに半世紀が経過した。この間、リポソームに関する研究は基礎から応用に至るまで膨大なものとなり、現在も増え続けている。近年では物理、化学、生物、薬学、医学など広範な分野の基礎から応用に関する成書²も発刊され、特にリポソームの産業応用に関して多くの章が割かれていることはこの分野の進展を物語るものである。応用分野で突出して研究がすすんでいるのは医薬品

分野であるが、これはリポソームの生体親和性が高く、水溶性物質はその内水相へ、脂溶性物質はその脂質膜中に比較的容易に保持でき、ドラッグデリバリーシステムへの応用、薬物の徐放化や安定化等の性質が医薬品の性質向上に役立つと考えられてきたためである。

これまでに、種々のリポソームの調製方法²⁾が提唱されているが、研究開発段階で行われる典型的なリポソーム調製方法として、いわゆるバンガム法が挙げられる。この方法は、フラスコ等の容器内でリン脂質等の脂質膜構成成分を有機溶媒に溶解し、ロータリーエバポレーターにより有機溶媒を除去後、一旦、容器内壁に脂質薄膜を形成させる。そこに緩衝液等の水溶液を加え入れて攪拌や超音波等の物理

的な剪断力を与え、脂質類を水和させることでリポソームを形成させている。これにより得られるリポソームは粒子径が不均一であるため、ポリカーボネートなどの濾過膜を用いた高圧濾過等による整粒操作が必須である。製薬企業をはじめとした各種研究機関でも未だにこのような実験室レベルの調製法により得られたリポソームを用いて検討が行われているのが実状である。医薬用リポソームをはじめとした粒子製剤は、製造工程の変更による物理的・化学的特性のわずかな差が有効性や安全性に影響を及ぼす可能性があることが指摘されており³⁾、リポソーム製剤の実製造を目指す場合には大きなスケールアップリスクが存在している。これまでにリポソームを工業的に製造する種々の方法²⁾が提唱されてはいるものの、リポソーム製剤の製造には大規模な製造設備や施設が必要で、特に無菌化の困難性が指摘されている³⁾。さらに、濾過滅菌を最終的な無菌化工程とする場合、無菌濾過膜を通過できない大きな粒子径を持つリポソームの無菌製剤化は極めて困難であると言わざるを得ない。本論文で報告する“LibMec法”はこれらの状況を解決できる手段として確立、特許化された新規なリポソーム調製方法である⁴⁾。

2. 概要

LibMec法はリン脂質等のリポソーム原料に、特定の水混和性アルコール(*t*-ブタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、2-ブトキシエタノール)を一部含む水溶液を添加して加温すると脂質成分が溶解すること、続く冷却で自己組織化によりリポソームが形成する現象を利用している(図1)。



図1 各種*t*-BuOH濃度における脂質(リン脂質およびコレステロール混合物)の溶解性。72(上段)加温後に室温(下段)まで冷却。

本研究で用いた上記水混和性有機溶媒以外にもエタノールをはじめとした各種溶媒に関して検討を行ったが図1に示した様な溶解挙動は示さなかった(データは示していない)。

本法によれば加温冷却という単純な工程により均一性の高いリポソームが調製できる。さらに、本法によるリポソーム製剤の製造を実現するため、インラインリアクター技術を融合させたリポソーム製造装置の開発も行った⁵⁾。インラインリアクターは、近年の化学合成分野で利用されている技術であり、ステンレス細管などのマイクロ流路内で反応溶液の精密な温度制御や混合をフロー系で実現できる装置である。LibMec法はリポソーム原料脂質懸濁液を加温冷却することでリポソームを生成させることから、精密な温度制御が可能なインラインリアクターとの親和性が高い。さらに、インラインリアクターの加温溶解部に濾過滅菌膜を設置し、流路内を予め無菌閉鎖系化することで濾過滅菌膜を通過し得ない大きな粒子径のリポソームであっても無菌製剤の製造を実現可能である(図2)。また、反応釜等を使用したバッチ生産技術とは異なり、生成リポソームの均一性や再現性に優れており、原理的に製造量の上限が無いことから、スケールアップリスクが低減されるなど、製剤製造上で多くの利点を有している。

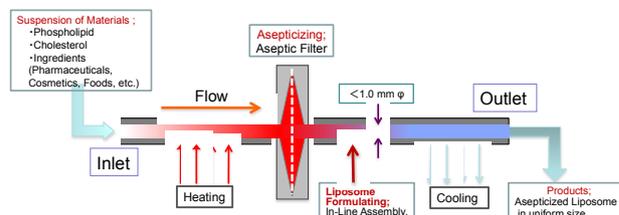


図2 インラインリアクターを用いた無菌リポソーム連続製造装置の概念図

3. 実験

1) LibMec法によるリポソーム調製

材料

ジパルミトイルホスファチジルコリン(DPPC)およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)は日油株式会社、コレステロール(Chol.)はシグマアルドリッチ社製を用いた。スクロース、*tert*-ブタノール(*t*-BuOH)、1-プロパノール、2-プロパノール、2-ブトキシエタノールは和光純薬工業株式会社から購

入した。その他の試薬は市販特級品を用いた。

粒度分布測定

リポソームの粒度分布測定は、動的光散乱による粒度分布計（マルバーン社製、ZETA SIZER Nano-ZS）を用いて行った。リポソームは、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）で希釈して測定した。ZETA SIZER Nano-ZS による測定値は、平均粒子径 Z-Average (d.nm)として算出される。同時に算出される多分散指数 (PDI) の値を指標としてリポソームの粒度分布の均一性の指標とすると共に、「Result quality」に表示される測定結果を、均一な粒度分布を持つリポソームが生成したかどうかの判断基準とした。すなわち、マルバーン社の粒子径測定の品質判定基準を満たす場合、「Result quality」は「Good」と表示される。測定結果が「Good」を示さなかった場合は動的光散乱に適さない多分散なサンプルであると判断した。

溶解温度範囲

380mg の DPPC および 200mg のコレステロールを秤量し、20mL の 10%スクロースおよび 4.25mL の *t*-BuOH を添加した。このバイアルをウォーターバス中で 80 に保温しながら 10 分間攪拌した。80 における溶液は白濁状態であった。次に、攪拌を継続しながらウォーターバスの保温を止め、室温下にて自然冷却を行った。80 における溶液は白濁状態であったが、72 付近から溶液はわずかに青白い澄明な状態となり 62 付近まで澄明な状態を維持した。62 付近から溶液は白濁し始め、58 で完全に白濁状態となった。この状態変化は可逆的であり、室温から段階的に昇温した場合も同様の状態変化が観察された。また、DPPC およびコレステロールをそれぞれ単独で同様の検討を行ったところ、DPPC は、80 から 50 の範囲で溶液は澄明で、48 付近でわずかに青白い澄明な状態となり約 35 までその状態を維持し、約 35 から急激に白濁状態となった。一方、コレステロール単独の場合には、いずれの温度においても、澄明な溶液とはならなかった。

有機溶媒濃度

32.7mg の DPPC と 17.2mg のコレステロールを加え入れたガラスバイアル中に、スクロース溶液（終濃度 10%）と、表 1 に示した各濃度になるように *t*-BuOH をそれぞれ添加した。各バイアルを 90 のウォーターバス中で 10 分間攪拌後、バイアルをウォーターバスから取り出し、室温下で攪拌冷却した。室温まで冷却後、生じたリポソームの粒度分布を測定した。その結果、*t*-BuOH が 12% から 18% の範囲において、平均粒子径 400nm から 650nm、PDI 値 0.2 以下の均一性の高いリポソームが生成されていることが確認された（表 1）。また、1-プロパノール、2-プロパノール、2-ブトキシエタノールでも *t*-BuOH の場合と同様に有機溶媒濃度と生成リポソームの粒度分布を測定したところ、1-プロパノールは 5% から 19%、2-プロパノールは 13% から 26%、2-ブトキシエタノールは 6% から 9% の範囲で、均一性の高いリポソームが生成することが確認された（詳細なデータは示していない）。

表 1 有機溶媒濃度の検討

<i>t</i> -BuOH (%)	Z-Average (d. nm)	PDI	Result quality
10	2338	1.000	*
12	442	0.196	Good
14	651	0.194	Good
16	498	0.195	Good
18	394	0.130	Good
20	1589	0.644	*
22	1324	0.529	*
24	1463	0.747	*
26	1160	0.708	*
28	1010	0.630	*

* マルバーン社の粒子径測定の品質基準を満たさない多分散な粒子

各種溶媒による調製と水溶性物質の封入率

76mg の DPPC、40mg のコレステロールおよび 0.77mg の DPPG の混合物に対して、17% の *t*-BuOH、17% の 1-プロパノール、25% の 2-プロパノールもしくは 8% の 2-ブトキシエタノールを含む 10%スクロース溶液をそれぞれ 4.85mL 添加した。各バイアルを 70 のウォーターバス中で 30 分間攪拌溶解後、室温下で攪拌冷却した。生じたリポソームは PBS に懸濁して 3 回の遠心洗浄を行った。リポソーム内に封入保持されたスクロース量はフェノール硫酸法により定量した。

表 2 各種溶媒による生成リポソームの粒度分布およびスクロースの封入率

溶媒	Z-Average (d. nm)	PDI	封入率 *
1-Propanol	165	0.066	0.212
2-Propanol	185	0.171	0.313
2-Butoxyethanol	228	0.228	0.396
<i>t</i> -Butanol	191	0.235	0.435

* 洗浄後のスクロース濃度 / 洗浄前のスクロース濃度

表 2 に示したように比較的小粒子径で均一なリポソーム生成とリポソーム内水相への高いスクロース封入率を示した。特に、*t*-BuOH を用いた場合はスクロースの封入率は 40% 以上となり、極めて高い効率で水溶

性物質をリポソーム内に封入保持できることが明らかになった。このことは、リポソーム調製時の溶液中に封入すべき物質を溶解させておけば、スクロースと同様に極めて高い効率でリポソーム内に物質が封入できることを示している。

2) インラインリアクターを用いたリポソーム調製

原料液の調製

6.3g の DPPC、3.3g のコレステロールおよび 64mg の DPPG をガラスボトル中に秤量した。87.5mL の *t*-BuOH を添加し、75 のウォーターバス中で脂質類を溶解後、一旦、室温まで冷却した。続いて、413mL の 10%スクロースを添加し、再度 75 のウォーターバス中で 30 分間攪拌した。この脂質懸濁液を室温まで冷却し、インラインリアクター用の脂質原料液とした。

装置

脂質原料液のインラインリアクターへの送液は市販の HPLC 用送液ポンプ (Flom 社 : model AL-12) を用いた。

インラインリアクターは Lipo-TB (東レエンジニアリング株式会社) を用いた。インラインリアクターは図 3 に示すように、3つのゾーンから構成される。第一槽は脂質原料の溶解と濾過、第二槽はリポソームが生成する温度への冷却、第三槽はリポソーム懸濁液を室温まで除熱するゾーンである。各槽にはそれぞれ独立した恒温水循環装置を接続し、第一槽は 72、第二槽は 40、第三槽は 25 に保温した。また、槽内部にはコイル状の内径 0.8mm x 5m のステンレス細管をそれぞれ設置し、第一槽の終端には濾過滅菌用メンブレン (ザルトリウス社 : ザルトポア 2) を設置した。

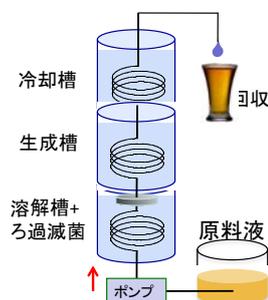


図 3 インラインリアクターの構成 (模式図)

インラインリアクターへの脂質原料送液は流速 2mL/分で行った。インラインリアクター通過液を回収し、調製されたリポソームの粒度分布を測定したところ、図 4 に示したような平均粒子径 130nm (PDI 値 < 0.1) の極めて

均一性の高いリポソームが調製可能であることが明らかとなった。また、本論文には示していないが溶媒濃度や温度等の諸条件を最適化することで LibMec 法および同法を適用したインライン製造装置は種々の脂質組成のリポソーム調製に適用できることも明らかとなった。

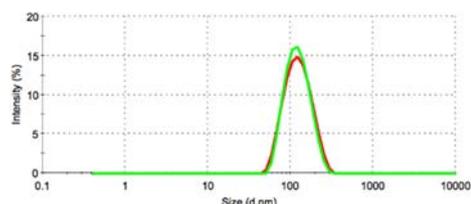


図 4 インラインリアクターにより調製されたリポソームの粒度分布測定例

4. 展望

現在、医薬品として上市されているリポソーム製剤は十数品目を数え、今後さらにその数は拡大していくものと考えられる。一方、化粧品、食品、その他の工業分野でもリポソームの有用性を示す研究は数多いが、実際に上市されたリポソーム製剤は極僅かであり基礎的研究に留まっているのが実状である。これは高品質なりポソームを低コストで大量製造できる製造技術が無いことと、基礎研究での少量調製と実製造での大量製造のいずれにも対応できる橋渡し技術が無いことが要因であると考えられる。そのため、本研究により確立された製造方法と製造装置はリポソーム産業の発展に大きく貢献できるものと考えられる。

5. 謝辞

本研究開発の遂行に際し、多大なるご協力をいただいた株式会社バイオメッドコアの三部泰彦氏に、また、インラインリアクターを用いた検討では東レエンジニアリング株式会社の黒田政計氏ならびに津田雄一郎氏に大変お世話になりました。ここに感謝申し上げます。

6. 参考・引用文献

- [1] A.D. Bangham *et al.*, *J. Mol. Biol.*, **8**, 660(1964).
- [2] リポソーム応用の新展開 (秋吉一成 監修), 株式会社エヌ・ティー・エス (2005).
- [3] FDA : Guidance for Industry Liposome Drug Products (Draft guidance), 2015.
- [4] 清水佳隆 他 : 日本特許第 4857392 号.
- [5] 清水佳隆 他 : 日本特許第 5771366 号.