

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	超臨界二酸化炭素を利用した製剤化におけるフロー型プロセスに関する研究
Title(English)	
著者(和文)	村上裕哉
Author(English)	Yuya Murakami
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11477号, 授与年月日:2020年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:下山 裕介,関口 秀俊,大河内 美奈,吉川 史郎,松本 秀行
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11477号, Conferred date:2020/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

博士論文

超臨界二酸化炭素を利用した製剤化に おけるフロー型プロセスに関する研究

村上 裕哉

東京工業大学 物質理工学院
応用化学系 応用化学コース

指導教員：下山 裕介 教授

目次

目次.....	2
第1章 緒言.....	5
1.1 研究背景.....	5
1.2 研究目的.....	6
1.3 本論文の構成.....	6
第2章 既往の研究.....	7
2.1 ナノ・サブミクロン粒子を利用した薬物送達機構.....	7
2.1.1 薬物/高分子複合微粒子を利用した薬物送達機構.....	7
2.1.1.1 ナノ析出法.....	8
2.1.1.2 エマルション蒸発法.....	8
2.1.1.3 超臨界流体法.....	13
2.1.2 リポソームを利用した薬物送達機構.....	13
2.1.2.1 薄膜水和法.....	17
2.1.2.2 溶媒注入法.....	23
2.1.2.3 逆相蒸発法.....	23
2.1.2.4 超臨界流体法.....	23
2.2 フロー型製造プロセス.....	25
2.2.1 生産効率.....	25
2.2.1.1 界面プロセス.....	25
2.2.1.2 熱交換.....	29
2.2.1.3 光化学反応.....	29
2.2.2 安全性.....	29
2.2.2.1 リアルタイム解析.....	29
2.2.2.2 危険物製造.....	30
2.2.3 持続可能性.....	30
2.2.3.1 on-demand 製造.....	30
2.2.3.2 超臨界・亜臨界流体プロセス.....	33
2.3 超臨界二酸化炭素を用いた微粒子作製技術.....	33
2.3.1 超臨界二酸化炭素を用いた薬物 /高分子複合体の作製法.....	36
2.3.1.1 超臨界溶体急速膨張法 (RESS 法).....	36
2.3.1.2 超臨界貧溶媒法 (SAS 法).....	37
2.3.1.3 超臨界エマルション抽出法 (SFEE 法).....	42

2.3.2	超臨界二酸化炭素を用いたリポソーム作製法	42
2.3.2.1	超臨界溶体急速膨張法 (RESS 法)	47
2.3.2.2	超臨界逆相蒸発法	47
2.3.2.3	SuperLip 法	50
第 3 章	疎水性薬物/高分子複合体の作製と機能化	53
3.1	研究目的と方針	53
3.2	実験操作	53
3.2.1	試料	53
3.2.2	Oil in water エマルション作製	54
3.2.3	スラグ流の形成と観察	54
3.2.4	フロー型超臨界エマルション抽出法	57
3.2.5	Chitosan による表面修飾	57
3.2.6	作製微粒子評価	57
3.3	結果と考察	61
3.3.1	スラグ流の制御	61
3.3.2	フロー型超臨界エマルション抽出法における粒子作製	69
3.3.3	Ibuprofen ナノ粒子作製および chitosan による表面修飾	75
3.4	本章のまとめ	81
第 4 章	超臨界エマルション抽出における物質移動解析	84
4.1	研究目的	84
4.2	実験操作	84
4.2.1	試料	84
4.2.2	Oil in water エマルション作製	85
4.2.3	超臨界エマルション抽出における相挙動の可視化	85
4.2.4	画像解析	85
4.2.5	粒子径の予測	87
4.3	結果と考察	87
4.3.1	高圧 CO ₂ /エマルション系における物質移動解析	87
4.3.2	超臨界 CO ₂ /エマルション系における物質移動解析	92
4.3.3	操作因子が物質移動速度に与える影響	97
4.3.4	ニューラルネットワークを利用した粒子径推定	97
4.4	本章のまとめ	103
第 5 章	親水性薬物内包リポソームの作製	108
5.1	研究目的	108

5.2 実験操作.....	108
5.2.1 試料.....	108
5.2.2 Water in supercritical CO ₂ エマルション作製.....	109
5.2.3 リポソームの作製.....	109
5.2.4 作製リポソーム評価.....	109
5.3 結果と考察.....	114
5.3.1 Water in supercritical CO ₂ エマルション作製.....	114
5.3.2 リポソームの作製.....	114
5.3.3 リポソームの性質制御.....	114
5.4 本章のまとめ.....	120
第6章 結言.....	125
引用文献.....	127
謝辞.....	148

第1章 緒言

1.1 研究背景

今日の薬学分野における急速な発展に伴い、膨大な量の化学物質に医薬品有効成分 (active pharmaceutical ingredient: API) としての価値が見出されている一方で、多くの API 分子は、体内において患部へ到達する前に免疫系によって排除されてしまうという問題を抱える [1]. すなわち、効率的な API の利用には、化学的な分子構造制御に加えて、形態や結晶状態などの物理的性質の制御による薬物送達機構 (drug delivery system: DDS) の構築が必要不可欠となる. 高度の DDS 構築には、API のナノ粒子化 [2], 高分子材料との複合 [3], リポソームへの内包 [4], 粒子表面の修飾 [5] が有効であることが報告されている. 一方で、従来法による API の物理的性質の制御プロセスにおいて、操作中に発生する熱による API の劣化や [6], 使用する有機溶媒の有毒性による安全性の低下などが [7], 実用化を妨げる大きな障壁となってきた.

上記の問題を克服する手法として、超臨界二酸化炭素 ($scCO_2$) の利用が注目されている. $scCO_2$ の特長として、(1) 非極性・低分子量物質の溶解が可能 [8], (2) 臨界温度 ($T_c = 304.3 \text{ K}$)・臨界圧力 ($P_c = 7.38 \text{ MPa}$) が比較的容易に達成可能, (3) 常圧・常温で気体なので分離が容易 [9], (4) 人体・環境に対して低毒性 [10], (5) 安価で豊富な材料 [11] などが挙げられる. これらの特長から、特に製薬プロセスとの相性が良いと考えられており、近年 $scCO_2$ を用いた API/高分子複合体 [12 – 23] や API 内包リポソーム [24 – 29] の作製に関する研究が盛んに行われている. 一方で、 $scCO_2$ を利用したプロセスは、高圧下での操作が前提となるため、既存の設備の利用が困難であることが大半である [30]. すなわち、運転コスト面で有利な $scCO_2$ であるが、初期コストが高むことから、その普及は憚られてきた.

$scCO_2$ の利用の他に、製薬分野に革新をもたらす技術として期待されているのが、フロー型製造プロセスである. フロー型製造プロセスとは、原料と製品が定常的に流入および流出するプロセスのことで [31], 主に μm から mm オーダーの管が反応容器として用いられる [32]. フロー型製造プロセスを採用することで、(1) 製造効率の向上 [33, 34], (2) 製造コストの削減 [35 – 38], (3) 製造物の品質の向上および均一化 [39 – 43], (4) プロセスの安全性向上 [44 – 46], (5) スケールの柔軟性獲得 [47], (6) プロセスの汎用性向上 [48 – 50] など多くの利点を得られる. このことから、石油化学や食品加工の分野においてはフロー型プロセスが広く用いられているが、比較的複雑な反応経路を伴う製薬プロセスにおいては、フロー型製造プロセスの普及は遅れている [51]. 一方で、近年アメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) や欧州医薬品庁 (European Medicines Agency: EMA) はその普及を強く推奨しており [31, 32], フロー型

製造プロセスを製薬分野に展開するために、知見の集積が求められている。

フロー型製造プロセスの特長として、反応器の小型化が挙げられる。これにより、反応器内の物質・エネルギー移動効率が向上し、反応条件の制御が容易となるため、従来のバッチ型製造では採算が合わなかった高温・高圧プロセスも、その利用幅が大きく広がると考えられる。すなわち、高温・高圧プロセスの代表ともいえる scCO₂ を用いた製薬プロセスを、フロー型製造プロセスと融合させることで、両者の特長を活かした次世代型のプロセスへの展開が期待できる。

1.2 研究目的

本研究では、前述の scCO₂ を利用した製薬プロセスとフロー型製造プロセスの融合を目指し、新たな製薬プロセスの提案を目指す。具体的に、(A) 疎水性 API/高分子複合微粒子の作製プロセス、(B) 親水性 API 内包リポソームの作製プロセスにおいて、フロー型製造を取り入れる。これにより、下記の項目を達成することが本研究の目的となる。

1. 製薬プロセスにおける scCO₂ の利用による有機溶媒使用量の削減、並びにそれに伴う運転コスト削減と製品の安全性向上
2. 製薬プロセスにおけるフロー型製造の利用、並びにそれに伴う製造効率の向上とプロセスの操作性向上

1.3 本論文の構成

本論文は全 6 章から構成される。

第 1 章では、本研究の背景ならび目的について概説した。

第 2 章では、本研究に関する既往の研究を、(1) ナノ・サブミクロン粒子を利用した DDS の設計手法、(2) フロー型設計プロセスの採用によるプロセス改善、(3) 製薬分野における scCO₂ を用いた微粒子作製技術の 3 つの観点から紹介する。

第 3 章では、scCO₂ を用いたフロー型プロセスによって、疎水性 API/高分子複合微粒子の作製と機能化を行った。

第 4 章では、前章で取り扱ったプロセスにおいてより詳細なプロセス設計を行うために、耐圧可視化セルを用いた scCO₂ における物質移動挙動の解析を行った。

第 5 章では、scCO₂ を用いたフロー型製造プロセスによって、親水性 API 内包リポソームの作製とその性質制御を行った。

第 6 章では、本研究で得られた結果と考察をまとめ、本論文の結言とした。

第2章 既往の研究

2.1 ナノ・サブミクロン粒子を利用した薬物送達機構

薬物送達機構 (drug delivery system: DDS) を設計する手法は、腫瘍付近への医薬品有効成分 (active pharmaceutical ingredients: API) 粒子の貯留を促進する「受動送達」と、それぞれの腫瘍特有の構造体との結合性を高める「能動送達」に大別される。腫瘍周囲の血管やリンパ組織は不完全であるため、20–500 nm 程度の粒子 [52, 53] は腫瘍周囲の血管で漏れ出し、貯留しやすい傾向を有する (enhanced permeability and retention effect: EPR 効果) [54]。受動送達ではこの EPR 効果を利用し、腫瘍付近における API の滞留時間を向上させる。この際に、粒子径のみならず、粒子の生体適合性や親/疎水性、表面電位も重要な因子となる [55]。一方で、能動送達においては、粒子表面に化学修飾を施すことで腫瘍/粒子間の親和性を向上させ、API の滞留時間を向上させる [56]。この時、化学修飾は目的とする腫瘍の特性に合わせて行う必要があるため、用途に合わせた粒子設計が必須となる。実用的な DDS のデザインには、上記の受動送達と能動送達を共に効率的に活用する必要があり、その実現のために様々なナノ・サブミクロン粒子が考案されてきた。

最も初期のナノ・サブミクロン粒子を用いた DDS は、1954 年に Jatzkewitz らによって考案された。Jatzkewitz らは、mescaline と poly-vinyl-pyrrolidone の API/高分子複合微粒子にペプチドを添加することで、mescaline の徐放性が得られることを示した [57]。また、1964 年には Bangham らがリン脂質の二重膜からなる微小構造体であるリポソームを発見し [58, 59]、後にこのリポソームは、API キャリアとしての価値が見出される。半世紀以上が経過した現在においても、これらの二種類の微小構造体は、DDS をデザインする一般的な技術として認知されている。そこで本節では、API/高分子複合微粒子およびリポソームを利用した DDS に関する既往の研究を紹介する。

2.1.1 薬物/高分子複合微粒子を利用した薬物送達機構

高分子分野の目覚ましい発展に伴い、複雑な構造を持つ高分子や、分子量分布の狭い高分子の合成といった、高精度の高分子合成が可能となっている [60, 61]。これらの技術と、ナノ・サブミクロン粒子の合成技術を融合させることで、種々の API/高分子複合微粒子の作製が可能となり、より高度な DDS のデザインの実現が期待される。API/高分子複合微粒子の主な利点として、疎水性 API の溶解性向上、API の体内保持時間の向上、API の生体内利用率の向上などが挙げられる [1]。一方で、2.1 で述べた通り、高度な DDS のデザインには、用途に応じた最適な粒子設計が必要となる [62–64]。一般的に研究対象となっている粒子構造の例として、高分子ミセルの内部に API が取り込

まれる高分子ミセル体 (Fig. 2.1 (a)) や、高分子粒子の内部に API が溶存もしくは分散した高分子微粒子 (Fig. 2.1 (b)) が挙げられる [3]. いずれの構造体も、API と高分子は物理的な相互作用によって結びついているため、多岐にわたる疎水性 API の内包ができる点や、API の放出がスムーズ起きる点で優れている [65]. 近年、開発されている API の約 40% が疎水性であることから [66], これらの構造体を利用した DDS に関する研究は盛んに行われている. Table 2.1 には、現在臨床試験が行われている高分子微粒子の例を示す.

一方で、Fig. 2.1 (a) および (b) に示したような単純な構造を有する API /高分子複合微粒子は、血中から排除されやすいため、肝臓、脾臓、骨髄などへの送達にのみしか利用ができない [67, 68]. 血中での滞留時間を向上させ API の受動送達を達成するためには、Fig. 2.1 (c) に示したような、表面修飾を行う必要がある [5, 69, 70]. 表面の修飾には、水溶性高分子である poly(ethylene glycol) (PEG) 誘導体が広く用いられている [71, 72]. さらに、能動送達を効率的に行うためには、Fig. 2.1 (d) に示したように、表面修飾分子に対して指向性分子を添加する必要がある [73]. このような高度なナノ粒子構造の設計には、適切な材料の選定や高分子内での API の挙動といった包括的な視点での研究が必要なうえ [74], その作製手法にも工夫が必要である. そこで本項では、これまでに行われてきた様々な API /高分子複合微粒子の作製手法について、既往の研究を紹介する.

2.1.1.1 ナノ析出法

API/高分子複合微粒子は、血中で構造を維持する必要があるため、疎水性の高分子が用いられる場合が多い. すなわち、その作製法の多くにおいて、高分子をあらかじめ有機溶媒を溶解させる必要がある. ナノ析出法と呼ばれる作製手法では、高分子を溶解させた有機溶媒を水相へ滴下することで、疎水性分子の凝集効果を利用して API /高分子複合微粒子を作製する (Fig. 2.2). Djurdjic らは、ナノ析出法により、camprothecin を内包した poly(acrylic acid)-poly(ϵ -caprolactone) 共重合体ミセルの作製を試みた [75]. その結果、120–140 nm の高分子ミセルの作製に成功したが、使用した API 量に対する微粒子内に内包された API の割合を示す内包効率の値は、室温化の作製条件で 30 %程度と低い値となった. これは、有機溶媒が水相に拡散する過程で、同時に API も水相へと拡散しているためであると考えられる [76, 77]. このような現象を防ぐためには、操作温度を上げることで有機溶媒の水に対する溶解度を向上させる必要がある [75].

ナノ析出法の操作は簡便であるため、この他にも Table 2.2 に示した通り、多くの研究が行われている. 一方で前述のような API の内包効率の低下や、粒子径の操作性の乏しさが課題となっている.

2.1.1.2 エマルション蒸発法

付加価値が高い製薬プロセスでは、API の内包効率の改善がプロセスの運転コストに

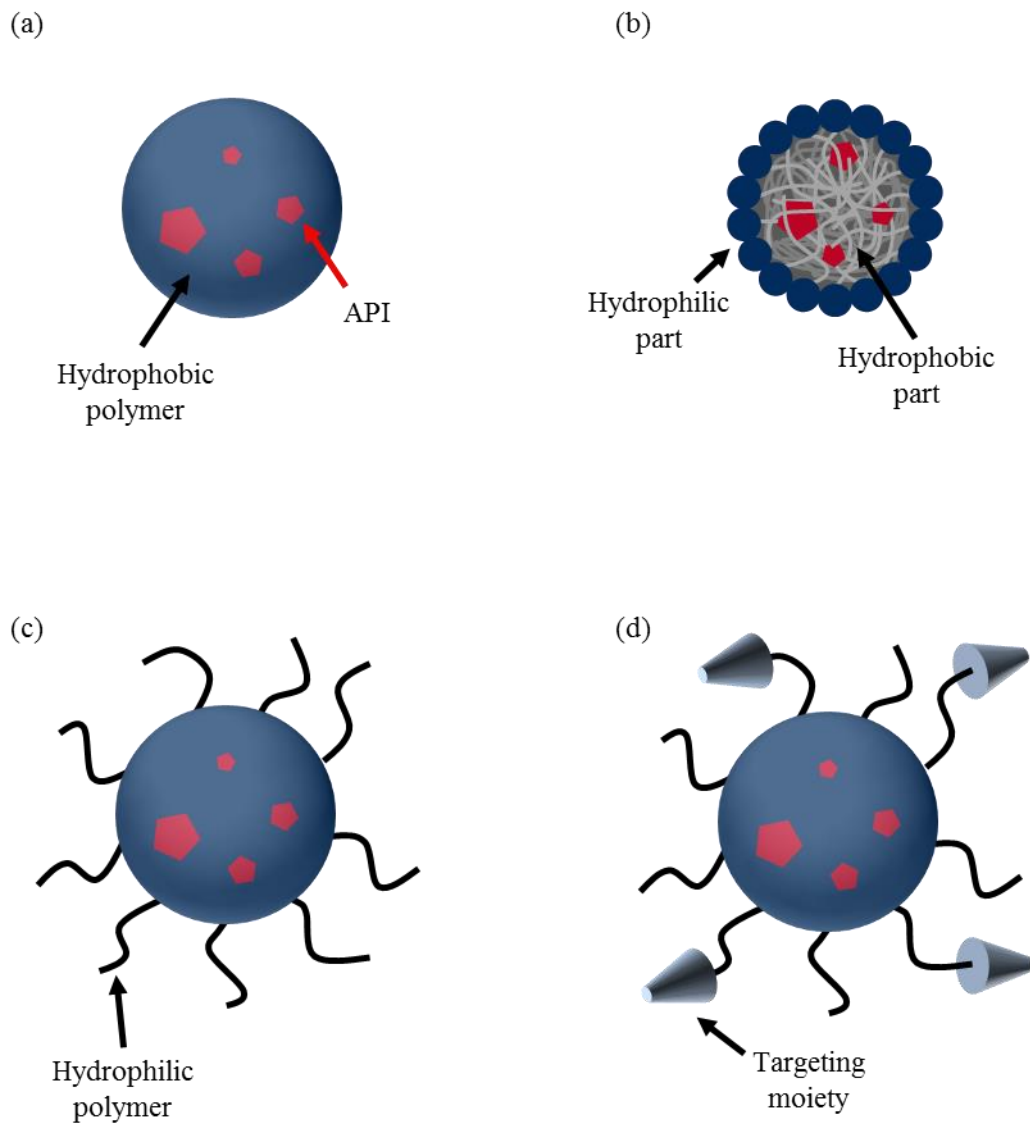


Fig. 2.1 Different structures of drug/polymer nanoparticles. (a) polymer particle, (b) polymer micelle, (c) polymer particle with surface modification, (d) polymer particle with surface modification and targeting moiety [1]

Table 2.1 List of API/polymer nanoparticles under clinical trial

API	Polymer	Ref.
paclitaxel	albumin nanoparticle	[200]
docetaxel	albumin nanoparticle	[201]
rapamycin	albumin nanoparticle	[202]
docetaxel	PEG-PLGA polymeric nanoparticle	[203]
siRNA targeting ribonucleotide reductase subunit	cyclodextrin polymeric nanoparticle	[204]
camptothecin	cyclodextrin nanoparticle	[205]

*PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)

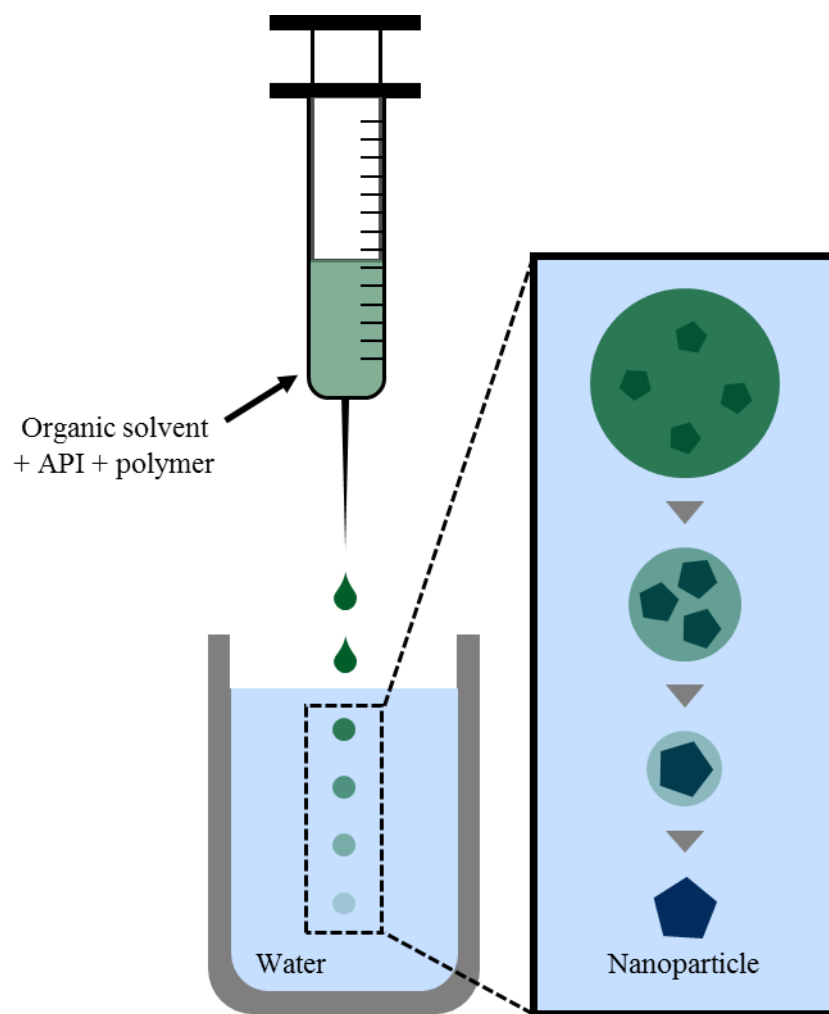


Fig. 2.2 Scheme of nanoparticle production using nanoprecipitation

Table 2.2 List of API/polymer nanoparticles prepared by nanoprecipitation

Polymer	Loaded chemical	Solvent	Particle size	Ref.
PLGA	curcumin	acetone	95 - 560 nm	[12]
PLGA	Lucifer yellow	acetone/ethanol	63 - 90 nm	[13]
PLGA	coenzyme Q-10	acetonitrile	164 nm	[14]
Allylic starch	-	acetone	270 nm	[15]
Dextran ester	ibuprofen	acetone	77 nm	[16]
Eudragit L100-55	tacrolimus	acetone/ethanol	120 nm	[17]

*PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)

大きな影響を及ぼす。内包効率を向上させることができる微粒子作製手法として、エマルジョン蒸発法が知られている。エマルジョン蒸発法では、Fig. 2.3 に示すように、あらかじめエマルジョンの内部に API を溶解させておくことで、効率的なミセル内部への API 添加が可能となるという利点を有する。Byagari らはエマルジョン蒸発法により、抗がん剤である docetaxel を内包した poly(lactide-co-glycolide) – polyethylene oxide – polypropylene oxide 共重合体ミセルの作製を試みた [78]。その結果、200 nm 程度の高分子ミセル体の作製に成功し、内包効率も約 85 % と高い値となった。加えて、動物実験により、この高分子ミセル体の安全性と薬理活性が確認された [78]。

エマルジョン蒸発法では、高い内包効率が見込めることに加え、oil in water in oil 型のダブルエマルジョンを作製することで、親水性 API の微粒子作製にも拡張可能であることから、API/高分子複合微粒子の作製法として最も一般的に用いられている [79]。Table 2.3 に示したように、本法によって種々の高分子のナノ粒子が作製可能であることが示されている。一方で、有機溶媒の使用による API の劣化や、有機溶媒の除去にかかる熱エネルギーコストが課題となっている。

2.1.1.3 超臨界流体法

製薬プロセスにおいて製品の安全性を評価する上で、残存有機溶媒量は重要な指標となる。しかしながら、疎水性 API および高分子を扱う API /高分子複合微粒子製造プロセスにおいては、これらの物質を一度溶解させる必要があるため、大量の有機溶媒の使用が前提となってきた。このような現状を打破するために近年注目を集めているのが、超臨界流体法である。超臨界二酸化炭素 (scCO₂) に代表される超臨界流体は、有機溶媒との親和性が良いため、有機溶媒を代替する次世代の溶媒として期待されている。製薬プロセスに scCO₂ を用いることで、有機溶媒の使用量を大幅に抑制できるため、人体・環境への負荷の低減が見込まれる [80, 81]。本手法による微粒子製造の詳細については、2.3 にて後述する。

2.1.2 リポソームを利用した薬物送達機構

DDS のデザインにおいて、生体由来の材料を使用することは、システムの生体適合性を大きく向上させるだけではなく、血中での滞留時間や API 添加量を増加させる効果が期待できる [82]。また、生体内で分解・吸収されやすく、分解後も毒性を発現しないため、一般的な合成高分子と比較して、人体への負荷の大幅な軽減が期待できる [83, 84]。このことから、Fig. 2.4 に示したようなリン脂質の二重膜から構成されるリポソームは、1976 年に Gregoriadis らが DDS への利用を提唱して以来 [4, 85, 86]、生体由来の API キャリアとして 50 年以上研究されている。API /高分子複合体と同様に、リポソームを利用した DDS においても、受動送達と能動送達を効率よく行うことで、副作用を抑えながら薬理活性を向上させることが可能となる [87]。また、疎水性分子および親水性分子を、脂質二重膜内部もしくはリポソーム中心部の水相にそれぞれ取り込むことが

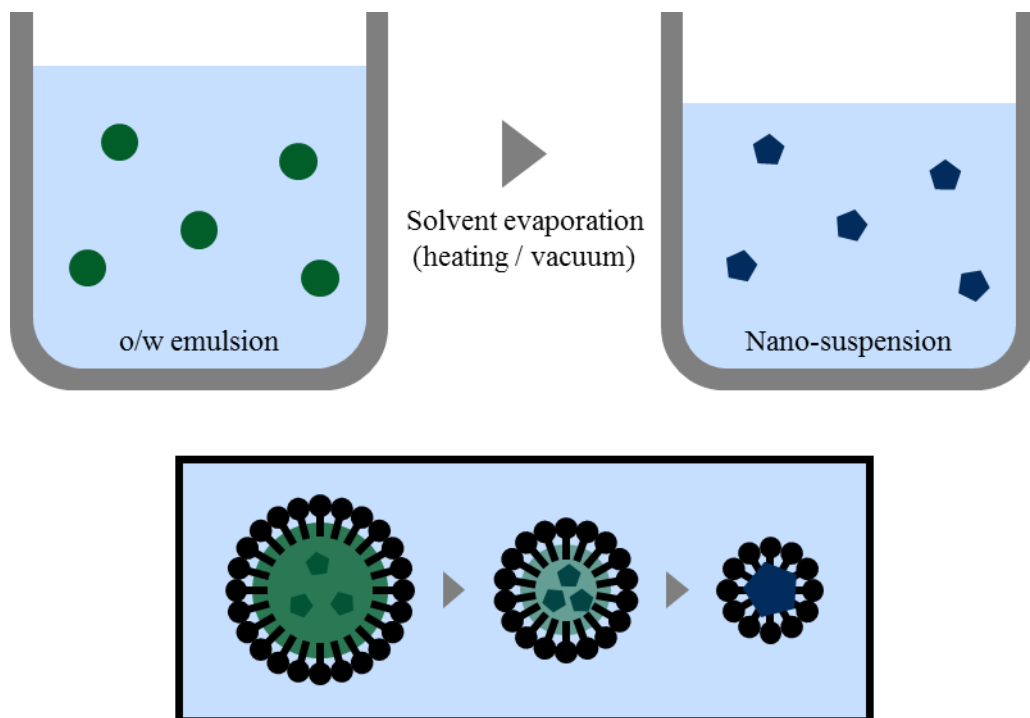


Fig. 2.3 Scheme of nanoparticle production using emulsion evaporation

Table 2.3 List of API/polymer nanoparticles prepared by emulsion evaporation

Polymer	Solvent	Particle size	Emulsion type	Ref.
PS	THF	300 nm	o/w	[18]
POP	acetone	200 nm	o/w	[19]
PLGA	dichloromethane/acetone	60 - 200 nm	o/w	[20]
PLGA	dichloromethane	200 nm	w/o/w	[21]
PLGA	chloroform	76 nm	w/o/w	[22]
PLA	methylene chloride	200 nm	w/o/w	[23]

*PS: poly styrene, THF: tetrahydrofuran, POP: poly(organo phosphazene), PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid), PLA: polylactic acid

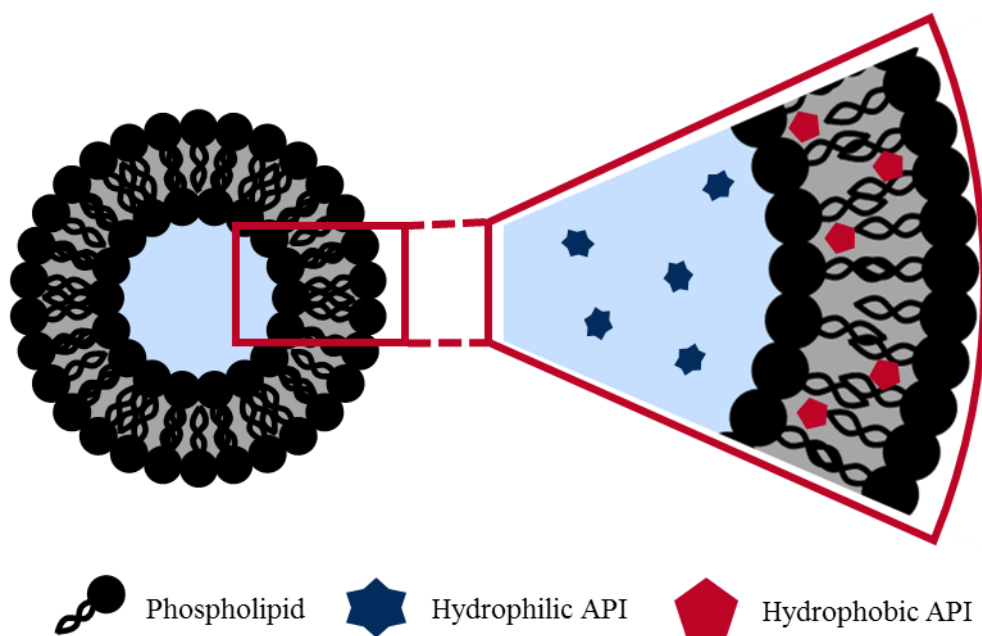


Fig. 2.4 Typical structure of liposome with single lipid bilayer [87]

できるため、Table 2.4 に示すように種々の API のキャリアとしての利用が可能である [88, 89]. これらの利点から、Table 2.5 に示すように、多くのリポソーム薬剤についての臨床試験が行われており、既にアメリカ食品医薬品局 (Food and Drug Administration: FDA) の認可を受けて実用化に至っている例も複数ある [90].

リポソームの性質は、粒子径 (分布) [91], 形状 [92–95], リン脂質種 [96], ラメラリティ (リポソームを構成する二重膜の枚数) [91, 97, 98], 表面電荷 [99] によって大きく異なる. 特に、粒子径 (分布) は DDS において最も重要となる因子の一つである [91], 例として、脾臓への API 送達効率は、粒子径とほぼ完全な相関関係があることが明らかとされている (Fig. 2.5) [100, 101]. また、腫瘍の種類によって細胞へ移動できる粒子の大きさの範囲が異なることも明らかとなっている (Table 2.6) [102, 103]. これらの事実から、用途に応じたリポソームの粒子径制御は、高度の DDS デザインに必要不可欠であるといえる.

粒子径に加えて、ナノオーダーのリポソームの場合は、体積比表面積が極めて大きいため、粒子表面の状態がリポソームの性質に与える影響は大きくなることが予測される. 例として、正の表面電位を有するリポソームが、帯電していないリポソームと比較して、特定の腫瘍に対して効率的に送達される例が複数報告されている [104, 105]. このような現象は、生体内の粘膜の多くが負に帯電しているために [106–108], 親和性が増加したことが原因であると考えられているが、詳細なメカニズムについては不明な点も多い. 一方で、水溶性高分子 poly(ethylene glycol) (PEG) や生分解性高分子 chitosan を利用した表面の修飾によって、明確な機能性の向上が確認されている. 具体的には、PEG の添加により血中滞留時間が 10 倍向上した例 [109, 110] や、PEG/ ϵ -caprolactone 共重合体の添加により paclitaxel による腫瘍阻害効果が 32.5 % から 75.1 % まで向上した例 [111], chitosan の添加によりリポソームの安定性が改善された例 [112] などが挙げられる. このような高分子の添加は、DDS のデザインに非常に有効な手段となるが、構造が複雑化するにつれて、その製造法においても工夫が必要となる.

本項では、上記の粒子径制御性や表面状態制御に向けて、リポソームの製造法がどのように発展してきたか紹介する.

2.1.2.1 薄膜水和法

リポソームの製造法のうちで、最も古典的かつ簡便なものが薄膜水和法である. Fig. 2.6 に示すように、本法ではリン脂質を溶解させた有機溶媒から、溶媒を除去することによってリン脂質の薄膜を得る. その後、API を溶解させた水溶液と薄膜を接触させながら振盪することで、リン脂質の自己集合作用によって多層リポソーム (multi-lamellar vesicles: MLV) が得られる [113]. 他手法と比較してシンプルな操作でリポソームの作製が可能である一方、API 内包効率は 5–15 % と非常に低い [96]. 内包効率は、薄膜をより薄く調整し、溶媒を真空下で完全に除去した上で、水和にかける時間を延ばすことで改善することが明らかになっているが [114], これにより製造効率は劇的に低下する.

Table 2.4 List of API encapsulated in liposome

API	$\log(P_{ow})$	Ref.
topotecan	-2.88	[24]
cisplatin	-2.21	[25]
oxaliplatin	-1.65	[26]
paclitaxel	3.96	[27]
irinotecan	4.37	[28]
rapamycin	5.77	[29]

* P_{ow} : partition coefficient in octanol/water

Table 2.5 List of liposome based API under clinical trial

API	Particle size	Trial phase	Ref.
docetaxel	60 - 80 nm	Phase I	[206]
topotecan	100 nm	Phase I	[207]
paclitaxel	180 - 200 nm	Phase II	[208]
oxaliplatin	180 nm	Phase II	[209]
cisplatin	110 nm	Phase III	[210]
irinotecan	100 - 110 nm	Phase III	[211]

*Phase I: best dosage examination, Phase II: safety examination, Phase III: comparison with standard API

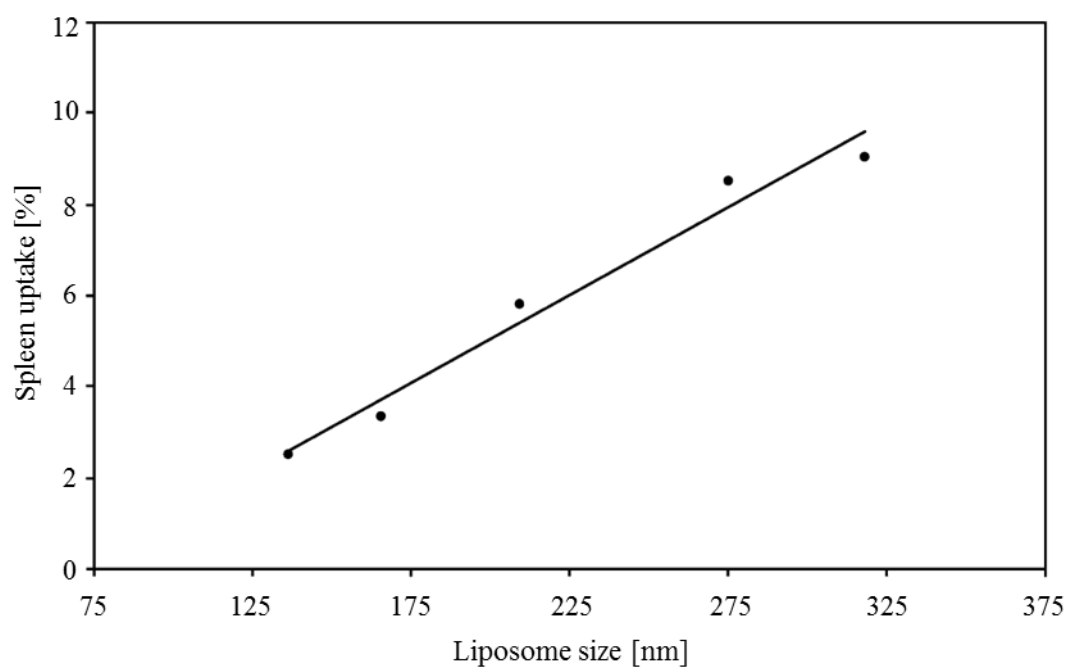


Fig. 2.5 Effect of liposome size on API uptake by spleen [101]. ● experimental results, — fitting by linear function

Table 2.6 Examples of inter- and intra- cellular pore size in tumors

Tumor	Pore size	Ref.
murine hepatoma (HCa-1)	380 - 550 nm	[102]
human colon adenocarcinoma (LS174T)	400 - 600 nm	[103]
murine mammary carcinoma (MCa IV)	1200 - 2000 nm	[103]

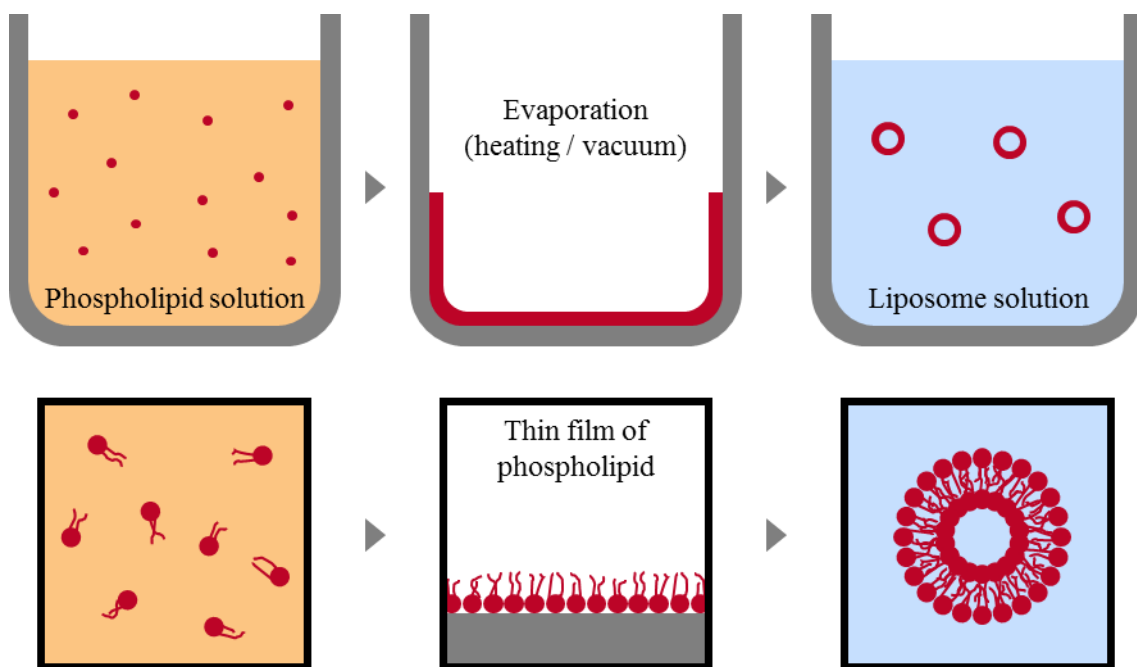


Fig. 2.6 Scheme of liposome production using thin film hydration

以上の欠点を克服するために、有機溶媒の存在下で薄膜の水和を行う、溶媒添加薄膜水和法が考案された [115]。この手法では、水和時に有機溶媒を水相に加えることで、内包効率の高いリポソームを作製し、その後使用した溶媒を気化させて除去する。これにより、内包効率は 40 %程度まで改善されるが、大量の有機溶媒がリポソーム中に残存してしまうため [116]、実用的なりポソーム製造には適さない。

2.1.2.2 溶媒注入法

薄膜水和法と並び、簡便なりポソーム製造法として認知されている手法の一つが、溶媒滴下法である。本手法では、前述のナノ析出法と同様に、diethyl ether もしくは ethanol にリン脂質を溶解させ、溶液を微量ずつ大量の水相へと注入する。水中に注入された溶媒は水相中を拡散するが、リン脂質は水の貧溶媒効果で凝集し、自己集合作用によりリポソームを形成する [117]。この手法では、比較的小さい単層リポソーム (uni-lamellar vesicle: ULV) が作製可能であることが知られているが [118]、多くのリポソーム製造法と同様に、作製後に diethyl ether や ethanol という、水と親和性の良い溶媒を水相から除去しなければならないため、残留溶媒の除去が困難であるという欠点を有する [96]。

2.1.2.3 逆相蒸発法

高い内包効率が見込めるリポソーム製造法の一つとして、逆相蒸発法が挙げられる。本手法では、大量の有機溶媒中に API の水溶液を加えて攪拌することで water in oil 型エマルションを作製する。このエマルションを真空化に静置し、有機溶媒を気化させることで、Fig. 2.7 に示したように、エマルションの転相によってリポソームが形成される [119]。この手法では、作製されるリポソームの数密度が大きいため、60–65 %程度の比較的高い内包効率が見込めるという利点を有するが [119]、大量の有機溶媒の使用による API の劣化や、有機溶媒の除去にかかる膨大なエネルギーコストが問題となる [96]。

2.1.2.4 超臨界流体法

リポソームの製造法では、リン脂質を一度有機溶媒に溶解させ、作製後に有機溶媒を除去するという手順が一般的である。これにより、有機溶媒の除去にかかるエネルギーコストや、残留溶媒による人体・環境負荷という問題が避けて通れない。このような背景を踏まえて、2000 年初頭から注目を集めているのが、超臨界二酸化炭素を用いたリポソーム製造法である。超臨界二酸化炭素は少量の共溶媒を加えるだけでリン脂質を溶解することができる上、減圧によって容易に除去が可能であるため、残留溶媒を限りなく減らすことが可能となる。本手法によるリポソーム製造の詳細については、2.3 にて後述する。

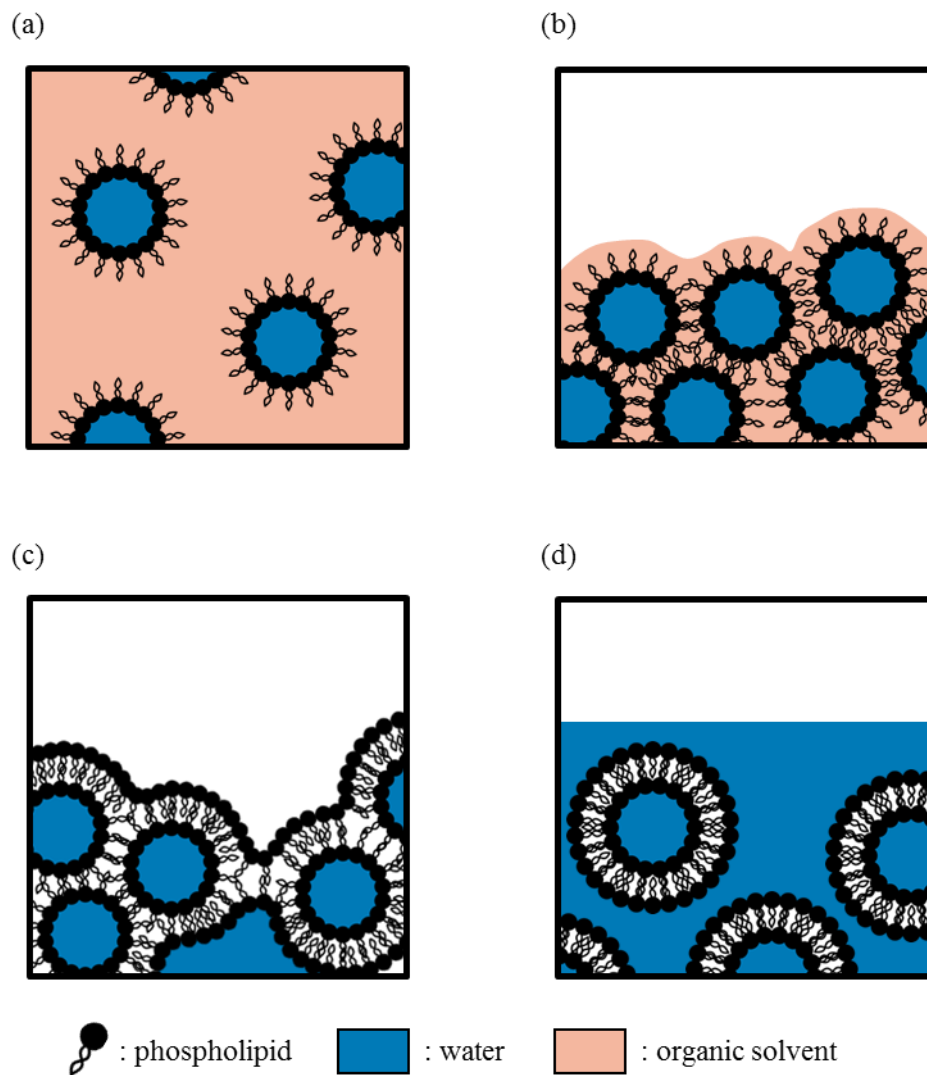


Fig. 2.7 Scheme of liposome production using reverse phase evaporation [119]. (a) water in oil emulsion, (b) evaporation of organic solvent, (c) phase inversion, (d) liposome

2.2 フロー型製造プロセス

Figure 2.8 に示すように、製造プロセスはバッチ型プロセスと連続型プロセスに大別される [31]. 連続型製造プロセスの中でも、特に μm から mm オーダーの流路内で反応や物質移動を行うプロセスは、フロー型製造プロセスと呼ばれる [32]. バッチ型製造プロセスと比較して、フロー型製造プロセスは多くの利点を有することが知られている。例として、製造効率の向上 [33, 34], 品質の向上 [39–43], コスト削減 [35–38], 安全性の向上 [45–46], スケールの柔軟性獲得 [47], 需要に対する応答性向上 [120], プロセスの汎用性獲得 [48–50]などが挙げられる。これらの特長から、石油化学分野や食品分野においては、フロー型製造が多く採用されているが、製薬分野では未だにバッチ型製造がほとんどを占める [51]. このような背景から、近年 FDA や EMA によって、API 製造におけるフロー型製造プロセスの実現が強く推奨されている [31, 32]. 本節では、フロー型製造プロセスの利点を活かした例を、生産効率、安全性、持続可能性の3つの観点から紹介する。

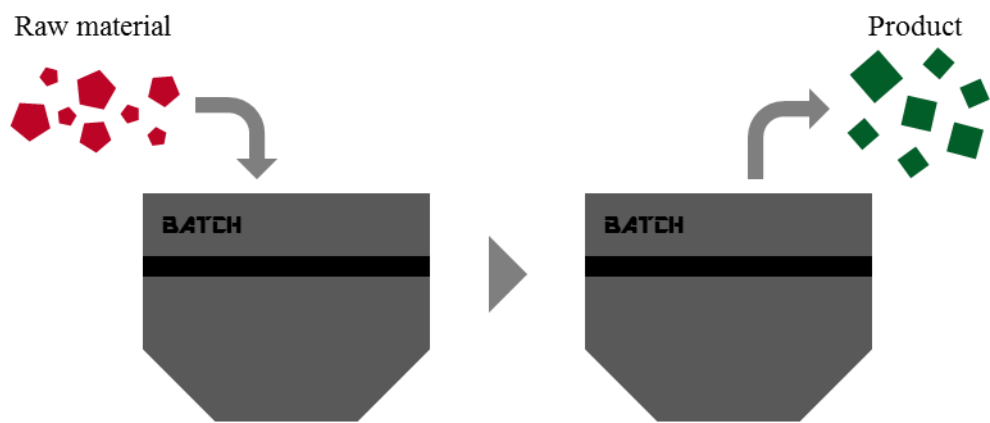
2.2.1 生産効率

フロー型製造プロセスの大きな特徴の一つに、反応容器の小型化が挙げられる。これにより、反応器内における物質・熱の拡散距離が短くなるため、エネルギーコストの削減のみならず、反応器内の不均一性の解消による品質・純度の向上も達成することができる。品質・純度の向上が実現できれば、プロセス下流における精製工程が不要となり、結果的にプロセス全体のコスト削減につながる。本項では、このような生産効率の向上に成功した例を紹介する。

2.2.1.1 界面プロセス

バッチ型の気液界面プロセスや液液界面プロセスでは、反応器の大型化と共に二相間の接触効率が著しく低下する。一方、マイクロ流路を用いたフロー型プロセスでは、流路内で二流体を交互に並べるスラグ流を形成させることで、接触効率を容易に向上させることができる [121]. Sinkovec らは、Fig. 2.9 に示したように、 $0.25 \mu\text{m}$ の流路内で dichloromethane 相と水相によるスラグ流形成させ、Fig. 2.10 に示す Wittig 反応を行った [122]. その結果、バッチ型プロセスでは $1.61 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ であった生成速度は、スラグ流によって液液界面の接触効率を向上させることで、 $3.35 \text{ mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$ まで上昇した。また、バッチ型プロセスでは攪拌によって不均一な液液界面が生じるのに対して、スラグ流を利用することで均一な液液界面が形成されるため、界面積を容易に測定できる。この性質を利用することで、界面間の物質移動速度の推測が可能となり、結果的に効率的なプロセスデザインが実現できる。

(a) Batch operation



(b) Continuous operation

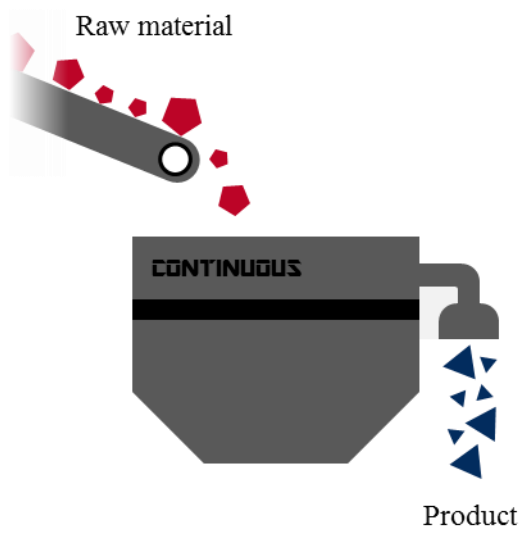


Fig. 2.8 Definition of batch operation and continuous operation [31]

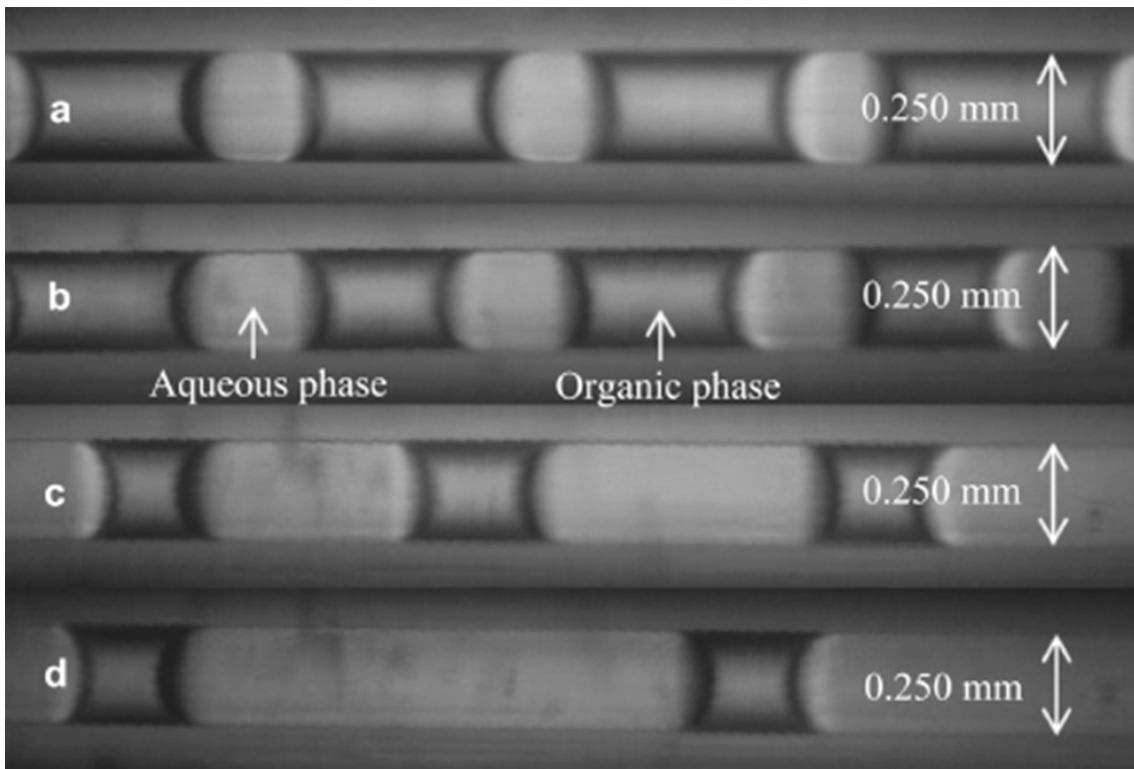


Fig. 2.9 Dichloromethane/water slug flow in microchannel [122]

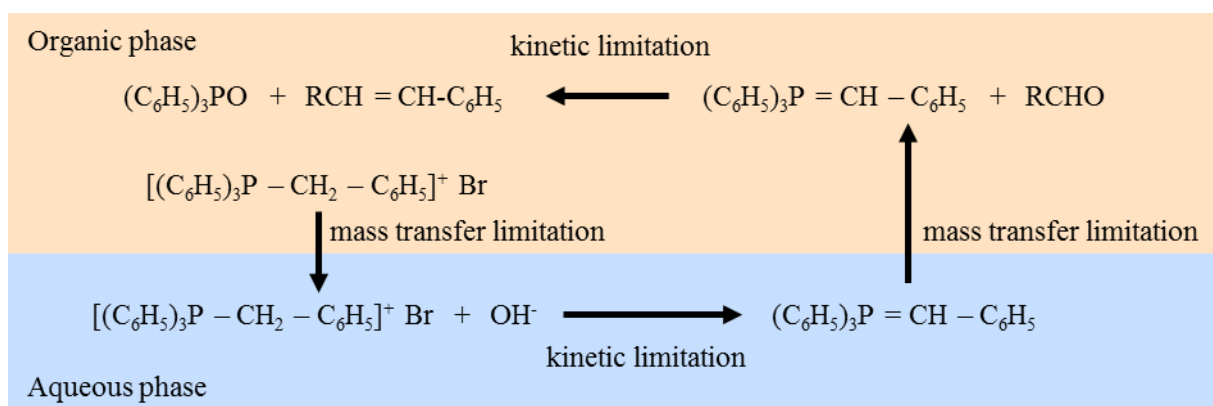


Fig. 2.10 Scheme of Wittig reaction in dichloromethane/water binary system [122]

2.2.1.2 熱交換

反応容器の小型化により、物質移動のみならず、エネルギーの移動も効率化することができる。Becht らが行った、気相部分酸化による acrolein 合成プロセス中の熱収支シミュレーションによると [123]、管径 10 mm の反応器を用いた場合、管内温度は 130 °C 上昇するのに対し、管径 1 mm の反応器を用いることで、温度上昇は 1.3 °C まで抑えられることが明らかとなった。これにより、使用する触媒の劣化を予防することができるため、プロセス全体の生産性は 20 % 向上すると報告されている。このような温度制御によるプロセスの最適化例は他にも複数報告されている [124–126]。

2.2.1.3 光化学反応

光化学反応は、その有用性が広く認知されている一方で、バッチ型の反応器を使った場合に光の効率的な照射ができないことから、商業化が困難であった [51]。一方、フロー型プロセスでは、マイクロ流路に対する均一な光の照射が容易に行えるため、光化学反応プロセスの実現可能性を大きく向上させることができる。Mukae らは、2-(2-alkenyloxymethyl)-naphthalene-1-carbonitrile の光環状付加反応をバッチ型とフロー型で行い、比較した [127]。その結果、フロー型プロセスを採用することで、照射時間を 240 分から 1 分まで大幅に短縮させることに成功した。また、照射時間の短縮により副反応の進行を抑えることができるため、反応選択率も 55 % から 96 % まで劇的に改善した。この他にも、光化学反応を利用したフロー型製造プロセスは多数報告されており、バッチ型製造プロセスに比べて優れた生産性を示している [128–130]。また、同様の考え方に基づき、電磁波を用いた加熱プロセスなども提案されている [131–133]。

2.2.2 安全性

バッチ型製造プロセスの大きな問題点に、中間生成物の保管・輸送に伴うリスクが挙げられる。プロセスのスケールが大きくなるにつれて、中間生成物の量は増加するが、この中間生成物に異物混入などの問題が発生した場合、そのバッチは丸ごと破棄されることになる。一方、フロー型製造プロセスの場合は、スケールに関係なく問題がある部分のみを破棄することで製品の健全性は維持される。また、反応性の高い危険な中間生成物が生成するようなプロセスにおいても、このような物質をすぐに次の操作へと送ることでリスクの低減が図れるという点でも、フロー型製造プロセスは優れている。本節では、このような安全性の向上に成功した例を紹介する。

2.2.2.1 リアルタイム解析

フロー型製造プロセスでは、中間生成物の一部を取り出してしまうとプロセスの連続性が損なわれてしまうため、検査用のサンプルを中間生成物から取り出す従来法による品質検査が困難である。そのため、商業スケールのフロー型製造プロセスの実現には、

流動中成分のリアルタイム分析手法を確立させる事が重要となる [51]. Nordan らは Raman 分光法をマイクロ流路に取り付け、リアルタイムで反応速度の解析を行った [134]. この手法により、従来法よりも 5 倍の効率での分析を可能とし、精度の向上も見られた. このようリアルタイムでの分析が可能となれば、異常発生時に即座にメンテナンスが行えるために、深刻な事故のリスクを最小限に抑えることができる. 他にも、赤外分光法 [135 – 136]や質量分析法 [137]によるリアルタイム分析手法も提案されている.

2.2.2.2 危険物製造

バッチ型製造において、高反応性の中間生成物の貯蔵・輸送リスクマネジメントは時に大きな代償を伴う. 例として、製薬分野で有用性を見出されている tetrazole の製造において、中間生成物であるアジ化水素 (HN_3) の爆発性が高いことから [138], アジ化ナトリウム (NaN_3) を経由する反応プロセスを用いられることが一般的であった [139, 140]. しかしながら、 NaN_3 中に含まれる Na は副生成物として廃棄されるため、安全性の代償としてプロセスのコストが嵩み、廃棄物も増加してしまうという問題点があった. そこで、Gutmann らは、Fig. 2.11 に示すようなフロー型製造プロセスによって HN_3 を経由した tetrazole の製造を試みた [141, 142]. フロー製造を行うことで、 HN_3 は空気と触れることなく直ちに tetrazole へと変化するため、プロセスの安全性は保障される. また、15 分の反応時間で 98 % の転化率を得ることに成功した. このようなフロー製造プロセスによる安全性の確保の例は、他にも報告されている [143].

2.2.3 持続可能性

近年、深刻化している地球温暖化や廃棄物による環境破壊などを解決するために、持続可能なプロセスの提案が急務である. フロー型製造では、バッチ型製造と比較して高度なプロセスの合理化が必要となるため、反応経路や反応速度に関する深い理解が必要になる. それに伴い、必然的にプロセスの無駄が淘汰されるため、廃棄物の削減、エネルギーの効率利用が実現されることになり、プロセスの持続可能性を向上させることができる. 本項では、このようにプロセスの合理化を通じて持続可能性の向上に成功した例を紹介する.

2.2.3.1 on-demand 製造

フロー型製造プロセスでは、反応容器の大きさではなく、稼働時間で製造量を変化させることができるので、バッチ型製造プロセスと比較して製造量の調整が容易に行える. また、反応容器の小型化が行えることから、“on-site”かつ“on-demand”の製造が可能となる. Adamo らは、Fig. 2.12 に示したようなフロー型製造機構を組み込んだ小型製造装置（幅 1.0 m × 奥行 0.7 m × 高さ 1.8 m）を用いることで、十分な品質と生産量を保持したまま diphenhydramine hydrochloride, lidocaine hydrochloride, diazepam, fluoxetine hydro-

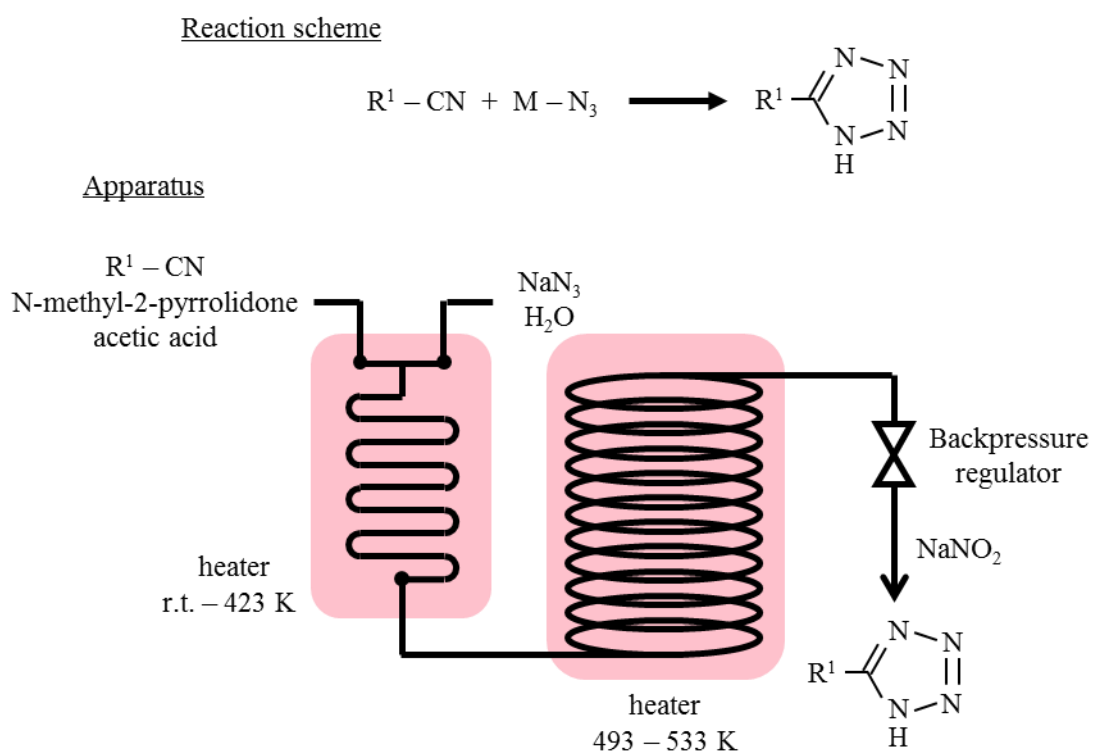
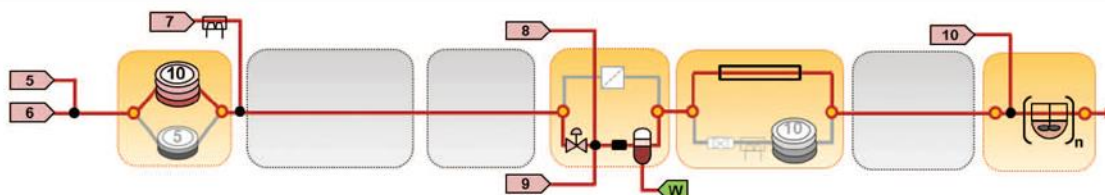
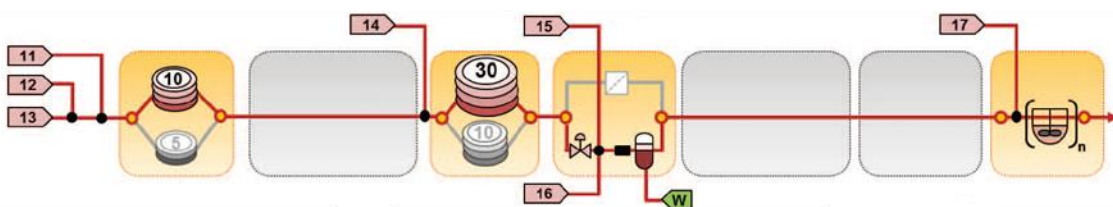


Fig. 2.11 Reaction scheme of tetrazol production and schematic diagram of flow-type reactor for tetrazol production [141]

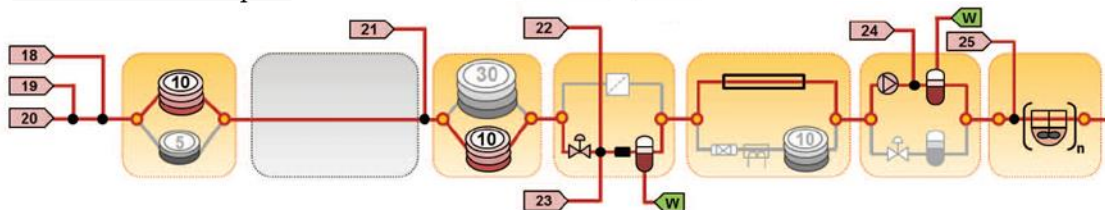
Production of diphenhydramine hydrochloride



Production of lidocaine hydrochloride



Production of diazepam



Production of fluoxetine hydrochloride

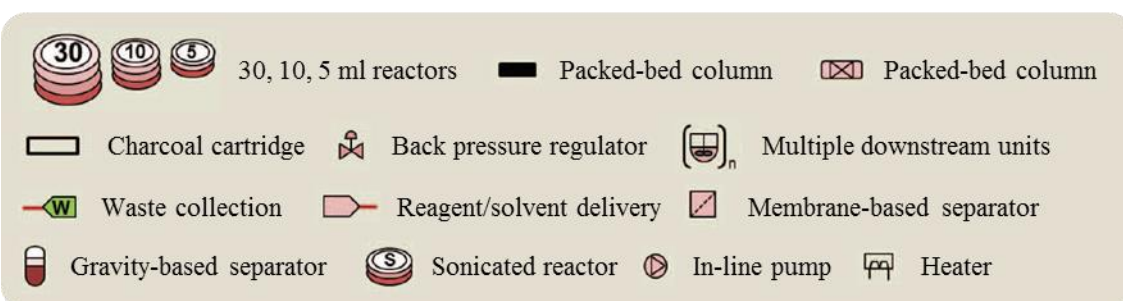
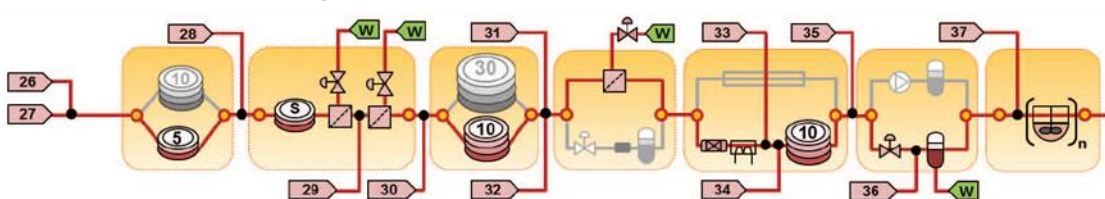


Fig. 2.12 Schematic diagram of reconfigurable flow-type reactor for production of API [144]

chloride の 4 種類の API が合成できることを示した [144]. このような製造手法により、必要とされる場所において必要量だけ薬剤製造を行う新たな供給システムが構築可能となり、薬剤劣化の懸念や貧困地域における薬剤不足といった問題を一挙に解決することが可能となる.

2.2.3.2 超臨界・亜臨界流体プロセス

連続的に少量ずつ反応を行うフロー型製造プロセスでは、反応条件の影響の検討が効率的に行えるという利点を有する. 反応条件を連続的に制御することで、一度の実験で多くの結果が得られるうえに、温度制御が容易なためにエネルギーコストの削減も期待できる. これに伴い、バッチ型プロセスでは困難であった高温・高圧プロセスの検討が比較的容易に行えるようになるため、これまでに使用方法が限られていた超臨界流体などの利用の幅が広がる. Tilstam らは、Fig. 2.13 に示した Newman-Kwart 転移反応の最適条件の探索を dimethoxyethane 雰囲気下で行った. この際に、フロー型プロセスを用いることで、dimethoxyethane の臨界点を超える 573 K, 6.9 MPa という高温・高圧条件においてプロセスの制御を行い、結果として 99.1 % の転化率を得ることに成功した [145]. また、Sato らは、亜臨界水を用いることで、触媒なしで Fig. 2.14 に示すアルコールのアシル化反応を行った [146]. フロー型プロセスを採用することで、473 K, 5.0 MPa という高温高圧条件でのプロセス制御を実現させ、結果として 93 % の転化率と 100 % の選択性を得た. また、このプロセスでは、常温常圧下で無害な水を溶媒として利用している上に、生成物の分離が行えるという利点も有する. このような結果から、フロー型プロセスと超臨界流体の融合によって、持続可能なプロセスの提案が可能になると期待されるが、現状での研究報告例は限られている.

2.3 超臨界二酸化炭素を用いた微粒子作製技術

2.1 で述べた通り、API のナノ・サブミクロン化は DDS の実現の上で非常に重要な技術である. その方法は、大きな粒子を粉碎して小さな粒子を得るトップダウン的手法と、有機溶媒などに溶解させた分子を析出させることで微粒子を得るボトムアップ的手法に大別される. これまでに商業化されているナノ・サブミクロン化技術のほとんどが、高圧ホモジナイザーを利用したトップダウン的手法を採用している [2, 6, 147 – 149]. トップダウン的手法は、(1) 粒子径・形状の制御性の低さ [150], (2) 目的物質が劣化する懸念 [151], (3) 力学的エネルギーを発生させるためのコスト [152, 153], (4) 不純物混入の懸念 [154, 155] といった複数の問題点を抱えている. 一方で、ボトムアップ的手法は、(1) 溶媒の除去のための膨大な熱エネルギーコスト [6], (2) 溶媒および溶媒除去時の加熱操作による API 分子の劣化 [6, 7], (3) 粒子径・形状の制御性の低さ [156] といった問題から、いまだに商業化に至っていない.

近年、ボトムアップ的手法が有する、溶媒除去に付随する問題点を克服するために、

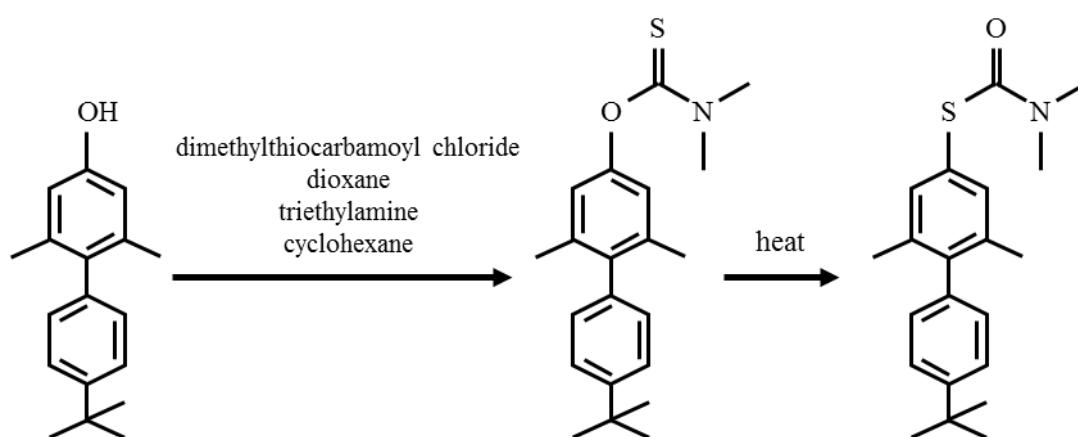


Fig. 2.13 Reaction scheme of Newman-Kwart re-arrangement under supercritical dimethoxyethane [145]

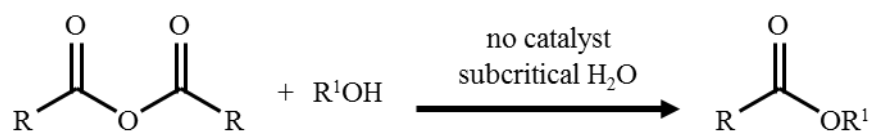


Fig. 2.14 Reaction scheme of non-catalyst acylation of alcohol under subcritical water [146]

超臨界二酸化炭素 (scCO₂) を用いたプロセスが複数提案されている。scCO₂ は、比較的低温 ($T_c=304.3\text{ K}$) で得られる超臨界流体で、多くの無極性の分子の良溶媒であることが知られている [8]。また、減圧による分離が可能なことから、分離プロセスを省くことができる上に [9]、二酸化炭素は安価で豊富な材料であるため [11]、従来法と比較して運転コストが削減できるという利点を有する。さらに、一般的な有機溶媒と比較して、反応性や人体・環境に対する負荷が低い [10]、製薬技術との相性が良く、持続可能なプロセスのデザインやプロセスの安全管理という観点からも優れている。

一般的に、超臨界流体を用いたプロセスは、高圧プロセスとなるために既存の設備が利用できず、初期コストが嵩んでしまうという問題を有する。このような問題は、2.2 で述べたフロー型製造プロセスの導入や、近年の高圧プロセス用設備の進歩による改善が期待される [30]。超臨界流体は、温度や圧力の変化に伴って、密度、拡散性、粘度、誘電率などの熱力学的な物性が、液体に近い値から気体に近い値まで連続的に変化することから、操作性に優れた溶媒であるといえる [80]。フロー型製造プロセスにおいてこの操作性を活用することで、2.2.3.2 で述べたようなプロセスの最適化がより効率的に遂行できる。すなわち、超臨界流体とフロー型製造プロセスの融合により、既往の微粒化プロセスを凌駕する、低コストかつ高効率で持続可能なプロセスの提案が容易に行えるようになると考えられる。

微粒化プロセスにおける scCO₂ の役割は、API に対する良溶媒としての利用と、API に対する貧溶媒としての利用の二種類に大別される [30]。本節では、プロセスにおける scCO₂ の役割に焦点を置きながら、scCO₂ を利用した API/高分子複合体およびリポソームの製造法を紹介する。

2.3.1 超臨界二酸化炭素を用いた薬物 /高分子複合体の作製法

2.1.1 で述べたように、高分子ミセル体や高分子微粒子では、作製法によってその性質が大きく左右することが明らかとなっている。ナノ析出法やエマルジョン蒸発法では、粒子径や内包効率に優れた API /高分子複合体が得られているものの、有機溶媒による API の劣化やその残存が依然深刻な課題として残されている [7, 6]。このような問題を解決すべく、API/高分子複合体の作製において、scCO₂ を用いることで有機溶媒の使用を最小限に抑えたプロセスが複数提案されている。

一般的に、ボトムアップ的手法による微粒子の作製では、外的刺激によって目的物質の溶解度を低下させることで、過飽和状態を生み出し溶質を析出させる。scCO₂ を用いたプロセスでは、圧力の減少もしくは scCO₂ の貧溶媒効果を利用して過飽和状態を生み出すことが一般的である。本項では、これらを利用した微粒子作製法を紹介する。

2.3.1.1 超臨界溶体急速膨張法 (RESS 法)

scCO₂ を用いた微粒子作製プロセスの中で、最も初期に開発されたものが、超臨界溶体急速膨張 (rapid expansion of supercritical solute: RESS) 法である [157 – 160]。本手法

では、Fig. 2.15 に示したように、scCO₂がAPIおよび高分子の良溶媒として作用し、ノズルを通して圧力を急速に大気圧まで低下させることで、溶質の過飽和状態を生み出し、微粒子の作製を行う。臨界圧力 ($P_c = 7.38 \text{ MPa}$) を超える圧力からの急速な減圧に伴い、目的物質の溶解度が急激に減少するため、過飽和度は 10^5 から 10^8 程度まで上昇する [30]。これに伴い、急速に ($10^{32} \text{ cm}^{-3} \text{ s}^{-1}$ 程度) 目的物質の核化が進行し [161, 162]、発生した核が成長もしくは凝集することで、微粒子が得られる。これらの粒子は、作製後にノズル付近に設置されたフィルターによって捕集される。本法では、一般的な微粒子作製で用いられる温度変化による過飽和状態と比較して、非常に大きな過飽和度が得られるため、より微細な粒子が得られるうえに [163–165]、結晶性の向上が実現できるという報告もある [166]。また、操作圧力、操作温度、ノズル形状などによって過飽和度の制御が行えるため、得られる粒子の粒子径制御が可能とする報告もある [167–169]。Table 2.7 に示すとおり、これまでに複数のAPI種でAPI単体微粒子の作製ができることが示されている。

一方で、本法は、scCO₂中の溶解度が低い物質では、十分な過飽和度が得られず、微粒子が生成できないという欠点も有する [170, 171]。一般的な高分子はscCO₂中の溶解度が低いことから、本法によるAPI/高分子複合体の作製例は限られている。高分子の溶解度を上昇させるためには、共溶媒の添加が必要となるが、このような溶媒は膨張時に液化するために、微粒子中への残存や相分離による微粒子への悪影響が懸念される。また、フィルター上で粒子同士が凝集しやすいため、捕集直後の粒子径は制御できていても、プロセス終了後の粒子径はマイクロオーダーまで大きくなってしまいうことも少なくない。このような現状を踏まえると、本手法の商業スケールへの応用までの障壁は依然高いといえる。

2.3.1.2 超臨界貧溶媒法 (SAS 法)

現在、scCO₂を利用した微粒子作製プロセスの中で、最も研究が盛んに行われているものが超臨界貧溶媒法 (supercritical anti-solvent: SAS 法) である [30]。本手法では、Fig. 2.16 に示したように、scCO₂で満たされた容器内に目的物質を溶解させた有機溶媒を噴霧することで、有機溶媒とscCO₂を接触させる。この際、有機溶媒の液滴は、scCO₂と均一相を形成するまで膨張し、その過程で目的物質の溶解度は低下する [172–174]。すなわち、scCO₂は目的物質の貧溶媒として作用しており、有機溶媒の噴霧後に目的物質は過飽和状態となるため、微粒子の形成が始まる。本法では、APIや高分子は微粒子形成前の段階で有機溶媒中に溶解しているため、有機溶媒種を変更することで多岐にわたる物質に適用可能である [175]。また、有機溶媒を使用するものの、系内には有機溶媒と親和性の良いscCO₂が十分量存在するため、残存溶媒の懸念は少ない [176–178]。作製後の粒子は、RESS法と同様に、ノズル付近に設置されたフィルターによって捕集される。Table 2.8 に示すとおり、これまでに多くのAPI/高分子複合体の作製例が報告されている。

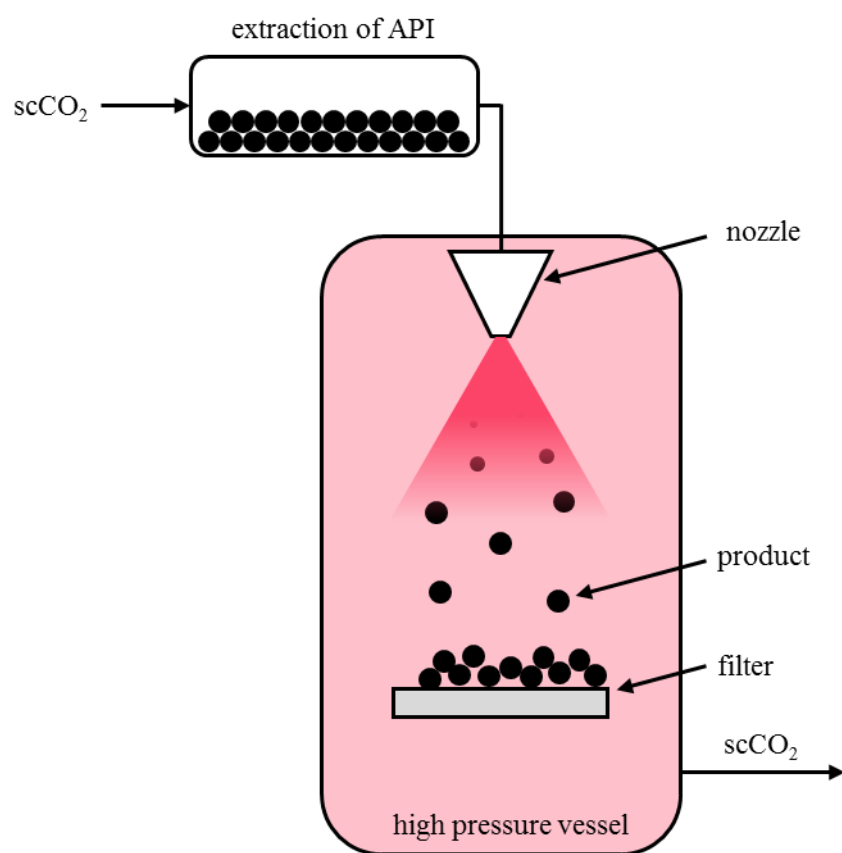


Fig. 2.15 Schematic diagram of nanoparticle production using RESS [30]

Table 2.7 List of API nanoparticles prepared by RESS

Drug	Particle size	Ref.
ralozifene	18 - 137 nm	[212]
digitoxin	68 - 458 nm	[213]
creatine monohydrate	360 - 9060 nm	[214]
artemisinin	500 nm	[215]
cholesterol	620 - 4830 nm	[216]
cephalexin	860 - 7220 nm	[217]

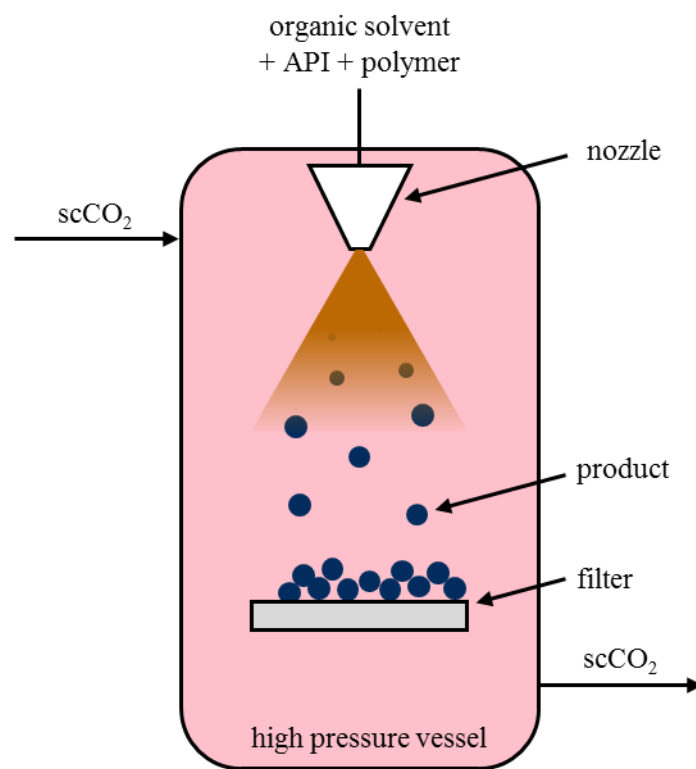


Fig. 2.16 Schematic diagram of nanoparticle production using SAS [30]

Table 2.8 List of API/polymer nanoparticles prepared by SAS

Drug	Solvent	Particle size	Ref.
samarium acetate	DMSO	50 - 150 nm	[218]
lysozyme	DMSO	59 - 247 nm	[219]
ampicillin	NMP, DMSO, ethanol	100 - 300 nm	[220]
indinavir	acetone	174 - 773 nm	[221]
amoxicilline	NMP	216 - 505 nm	[222]
5-fluoroacil	methanol	2374 - 2967 nm	[223]

*DMSO: dimethyl sulfoxide, NMP: N-methyl-2-pyrrolidone

一方で、RESS 法と同様に、フィルター上での粒子の凝集が問題とされている [179]。これにより、粒子径制御性が損なわれてしまい、DDS への利用が困難となる。また、ノズルによる有機溶媒の噴射は、噴射直後の圧力・温度の変化により局所的な相状態の変化を誘発する可能性がある。これにより、粒子径分布が広がり、作製粒子の捕集方法を改善しても完全な粒子径制御は困難であると考えられる。

2.3.1.3 超臨界エマルジョン抽出法 (SFEE 法)

前述の超臨界プロセスでは、いずれも粒子径制御性が実用化への大きな妨げとなっていた。Shekunov らは、このような現状を踏まえ、エマルジョンを微粒子のテンプレートとして利用する超臨界エマルジョン抽出 (supercritical fluid extraction of emulsion: SFEE) 法を考案した [180]。本手法では、目的物質を溶解させた有機溶媒を水相中に分散させ oil in water (o/w) エマルジョンを作製し、この o/w エマルジョンと scCO₂ を接触させる。これにより、o/w エマルジョン中の有機溶媒は scCO₂ 中へ抽出されるため、有機溶媒中に溶解しきれなくなった目的物質が微粒子として析出する (Fig. 2.17)。本手法の大きな特徴として、(1) o/w エマルジョンの内部で目的物質が析出するため、o/w エマルジョン径の制御によって容易に作製粒子の粒子径が制御可能、(2) 作製粒子は水相中に分散しているため、作製後の粒子の凝集が起こりにくい、(3) 原料および生成物が共に液体であることから、フロー型製造プロセスへの展開が行いやすいという点が挙げられる [181, 182]。一方で、scCO₂ 相と有機溶媒相が水相によって隔てられているために、SAS 法と比較して有機溶媒の抽出速度が低下する事が考えられる。

Kluge らは、本法によって lysozyme や ketoprofen を内包した poly(lactic-co-glycolic) acid の微粒子の作製を試みた [183, 184]。この際、抽出を迅速に行うために、Fig. 2.18 のような装置を用いて、o/w エマルジョンを scCO₂ で満たされた塔内に噴霧し、超臨界相と液相の効率的な接触を目指した。これにより、Fig. 2.19 に示したような微粒子の作製に成功し、粒子径も 100 から 1000 nm の範囲で制御が可能であることを示した。これ以外にも多くの API・高分子を用いた微粒子の作製の成功例が報告されている (Table 2.9)。

以上の報告から示されるように、本法によって様々な物質を利用した API /高分子複合微粒子の作製、およびその粒子径制御が可能であることが示されている。一方で、プロセスの実用化には、スケールアップを念頭に置いた詳細な物質移動の理解や、抽出効率の向上手法の確立が必要となる。特に、現在主流である噴霧による o/w エマルジョン /scCO₂ の接触効率の向上は、噴射直後の温度・圧力変化による局所的な相状態の変化や、スケールアップの際の流動状態の変化が想定されるため、プロセスの汎用性向上の妨げとなっている。

2.3.2 超臨界二酸化炭素を用いたリポソーム作製法

リポソームの作製においては、脂質の自己集合作用を利用することができるため、ボトムアップ的手法による製造プロセスが一般的である。ただし、2.1.2 で述べた通り、そ

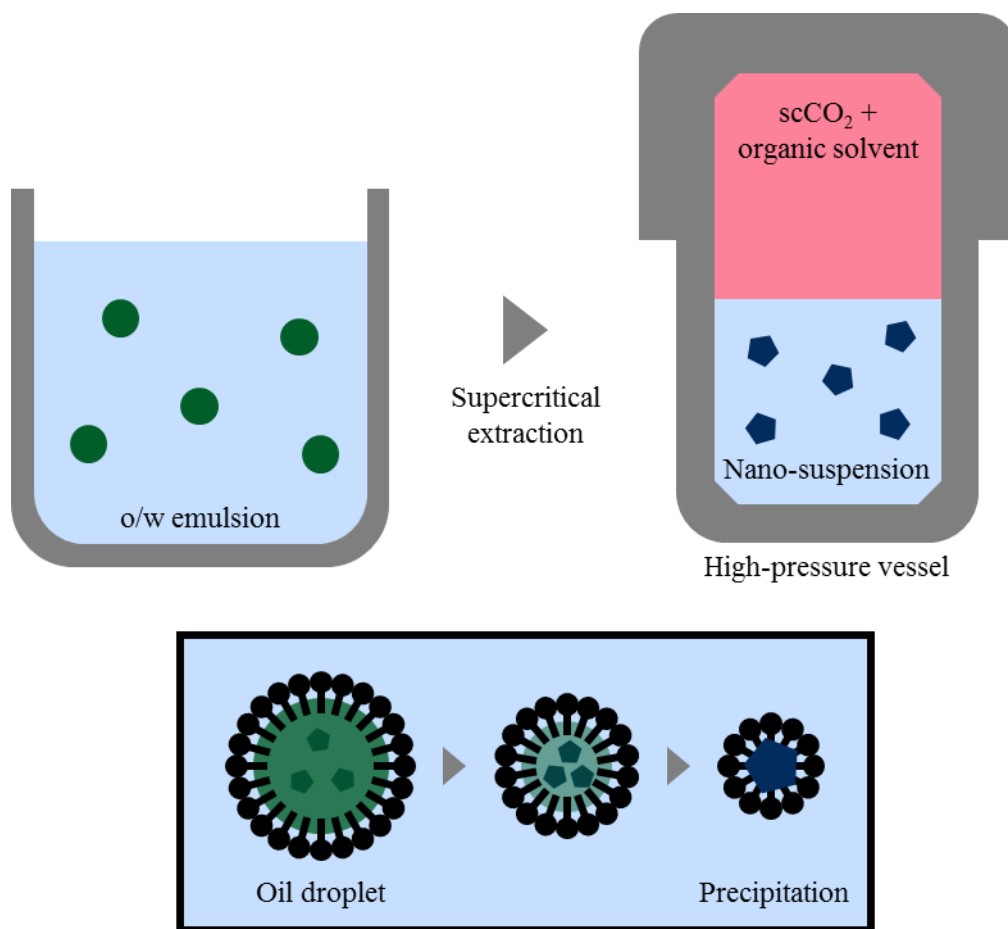


Fig. 2.17 Scheme of nanoparticle production using SFEE

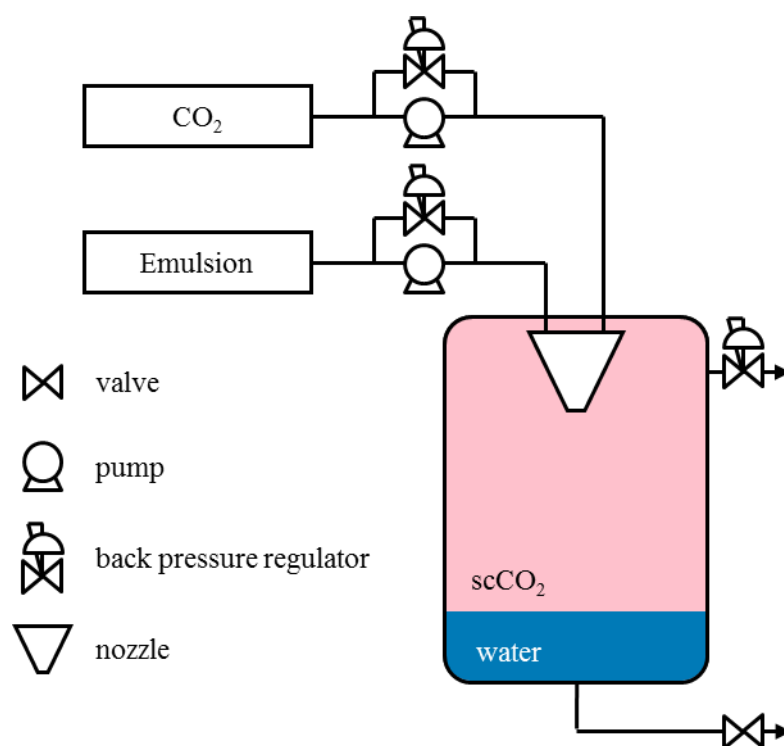


Fig. 2.18 Schematic diagram of SFEE apparatus for production of API/polymer nanoparticle [183]

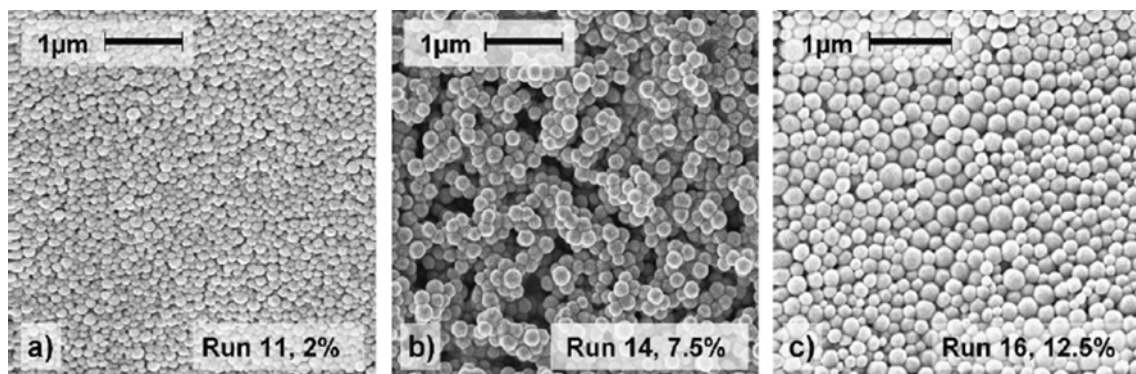


Fig. 2.19 Lysozyme/PLGA nanoparticles prepared by SFEE. (a) $C_{\text{PLGA/solvent}} = 2.0\%$, $d_{\text{ave}} = 125$ nm, (b) $C_{\text{PLGA/solvent}} = 7.5\%$, $d_{\text{ave}} = 139$ nm, (c) $C_{\text{PLGA/solvent}} = 12.5\%$, $d_{\text{ave}} = 166$ nm [183]

Table 2.9 List of drug/polymer nanoparticles prepared by SFEE

Drug	Polymer	Solvent	Particle size	Ref.
vitamin E	PCL	acetone	9 - 84 nm	[224]
quercetin	-	ethyl acetate	82 - 141 nm	[225]
astaxanthin	ethyl cellulose	ethyl acetate	161 - 733 nm	[226]
β -carotene	PLA	chloroform	300 - 4300 nm	[227]
piroxiacam	PLGA	ethyl acetate	890 - 3460 nm	[228]
ratinyl acetate	PLGA	acetone	3200 - 4300 nm	[229]

*PCL: polycaprolactone, PLA: polylactic acid, PLGA: poly(lactic-co-glycolic acid)

の多くは大量の有機溶媒の使用を前提としており、API キャリアとしての利用を考えると、大いに改善の余地がある。超臨界流体を用いた製造プロセスは、前述の通り、コストと品質管理のどちらの観点からも製薬プロセスとの相性が良いため、2000 年初頭からリポソーム製造にも用いられてきた。本項では、scCO₂を用いたリポソーム製造法についての既往の研究を紹介する。

2.3.2.1 超臨界溶体急速膨張法 (RESS 法)

API /高分子複合体の作製と同様に、その優れた操作性からリポソームの作製にも RESS 法が用いられてきた。リポソームの作製の際には、原料となるリン脂質が scCO₂ に溶解しにくいいため、共溶媒が利用される。リポソームへ内包する水溶性 API は、scCO₂ の減圧の直後に別のノズルを介して供給される。また、リポソームの構造体は乾燥により破壊されてしまうため、scCO₂ を水相中へ噴射することでリポソームを得る。Frederiksen らはこの手法を用いることで、25 MPa, 333 K の条件で Zn(II) phthalocyanine tetrasulfonic acid を内包したリポソームの作製を行った [185]。結果、内包効率 20% でリポソームが作製可能であることを示し、共溶媒として用いられた ethanol の使用量は、従来法である溶媒注入法と比較して 7% 以下となった。また、作製されたリポソームの径はノズルの大きさによって 180 から 980 nm 程度の範囲で制御が可能であることを示した。一方、Tsai らは、Fig. 2.20 に示した装置内で RESS 法を行うことで、有機溶媒を必要としないリポソーム製造に成功した。本手法では、20.6 MPa, 333 K の条件で、scCO₂ とリン脂質を 2 時間接触させることで、有機溶媒を使用せずにリン脂質を scCO₂ に溶解させることに成功している。これにより、内包効率 31.7% でリポソームが作製可能であることを示した [186–188]。

上記の報告から示される通り、リポソーム製造プロセスにおいて scCO₂ を利用することで、有機溶媒使用量の大幅な削減が可能である。一方で、(1) 内包効率が低い、(2) 噴霧式の減圧・混合を採用しているため、スケールアップが困難、(3) リン脂質の溶解には scCO₂ との長時間の気固接触が必要といった問題点が挙げられる。

2.3.2.2 超臨界逆相蒸発法

有機溶媒使用量の削減による製品の安全性向上に並び、内包効率の向上による高付加価値な API の効率的な利用は、リポソーム製造における重要要件の一つである。Otake らは、従来法である逆相蒸発法で用いた溶媒を scCO₂ に置き換えることで、高い内包効率の実現を目指した、超臨界逆相蒸発法を提案した [189–191]。本法では、まず、リン脂質を溶解させた scCO₂ を装置内に充満させ、少量ずつ水相を送液することで、scCO₂ 相に水が分散した water in scCO₂ (w/CO₂) 型エマルションを作製する。w/CO₂ エマルション作製後も水相の送液を続けることで、分散しきれなくなった水相がバルク相を形成した後に、エマルションの相転換が起こり、scCO₂ in water 型エマルションが形成する [192]。その後、減圧によって scCO₂ を除去することでリポソームが形成される (Fig. 2.21)。

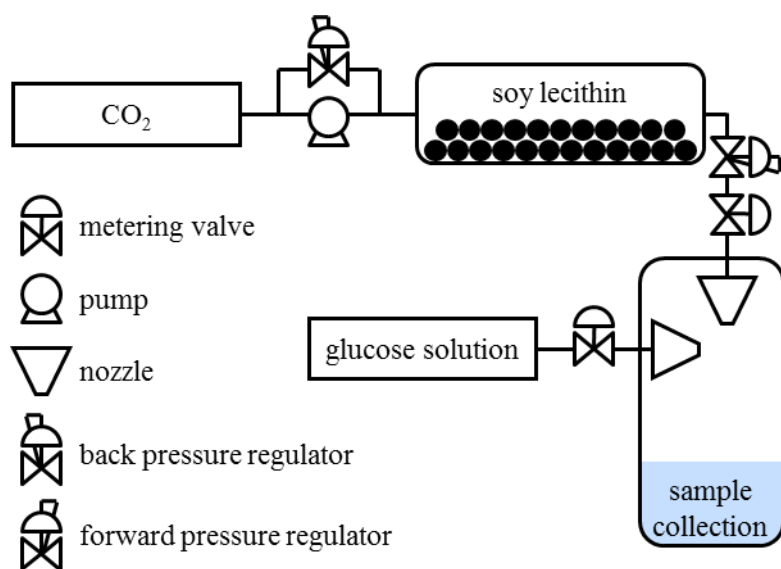


Fig. 2.20 RESS apparatus for liposome production [186]

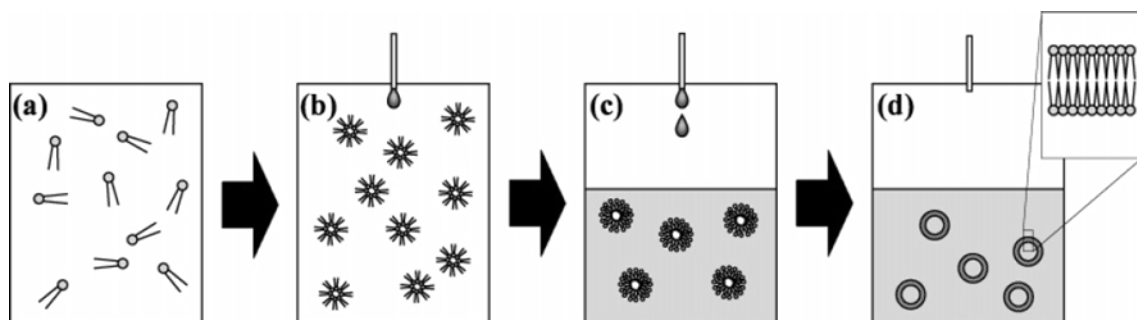


Fig. 2.21 Scheme of liposome production using supercritical reverse phase evaporation [191]
(a) dissolution of phospholipid into scCO_2 , (b) formation of w/CO_2 emulsion, (c) phase inversion,
(d) formation of liposome

本手法により、リポソームの生成が確認され、操作圧力によってその平均粒子径は 100 から 1000 nm 程度の範囲で制御可能であることが示された。また、L- α -dioleoylphosphatidylcholine をリン脂質として用いた際に、最大で 40% 程度の内包効率を達成することに成功した。

一方で、本手法は scCO₂ 相と水相の混合および減圧から構成されるバッチ型のプロセスであり、特に混合プロセスに膨大な時間がかかるために、商業化を念頭に置いた生産量の向上が困難である。

2.3.2.3 SuperLip 法

scCO₂ を利用したリポソーム製造において、更なる内包効率の向上と、リポソームの製造量の向上を目指し、Campardelli らは 2016 年に新規のプロセスを提案した [193 – 199]。SuperLip 法と名付けられた本法の最大の特徴は、Fig. 2.22 に示した装置内で w/CO₂ エマルジョンを連続的に作製し、w/CO₂ エマルジョン相/水相界面で半連続的なリポソームの製造を実現している点にある。本法では、リン脂質を溶解した scCO₂ が充満した容器に、目的物質を溶解した水相を噴霧することで、微小な液滴を形成する。この液滴は scCO₂ との密度差によって容器内を降下し、容器の底部にためられたバルクの水相と接触する。そして、scCO₂ 相/水相界面に存在するリン脂質が、液滴を囲むことでリポソームを形成していると考えられる。本手法により、Fig. 2.23 示すようなリポソームの形成が確認され、その径は流量条件により 280 から 1760 nm 程度まで変化することが明らかとなった。加えて、内包効率は最大で 97% 程度と非常に高い値を示した。さらに、本法では半連続的なリポソーム製造が実現されており、製造量の向上が可能なプロセスであると主張されている。

以上の結果から、SuperLip 法は従来法と比較して多くの面で優れた特性をもったリポソーム製造プロセスであると期待される。一方、2.2 で述べたフロー型製造プロセスへの展開という観点を考慮すると、(1) 噴霧式の液滴生成方式はマイクロ流路内での実現が困難であるため、フロー型プロセスへの転換が行えない、(2) scCO₂ 相/水相界面でのリポソーム形成は、体積比表面積が小さいことから非効率である、(3) 大容量の塔型のリポソーム生成容器を用いているため、スケールアップの際に流動状態や熱移動の複雑な最適化プロセスが避けられないといった問題を抱えている。

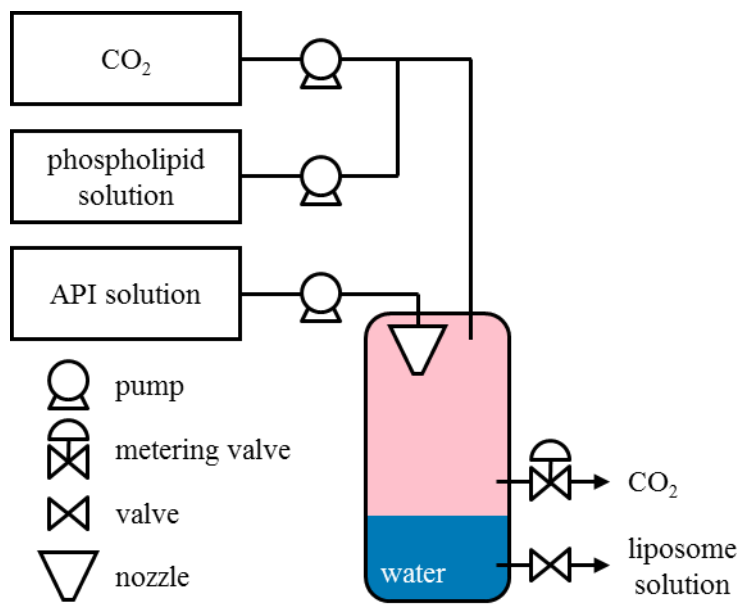
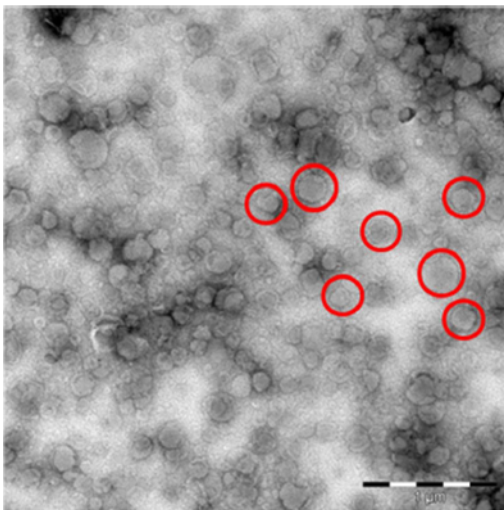


Fig. 2.22 SuperLip apparatus for liposome production [196]

(a) TEM image



(b) SEM image

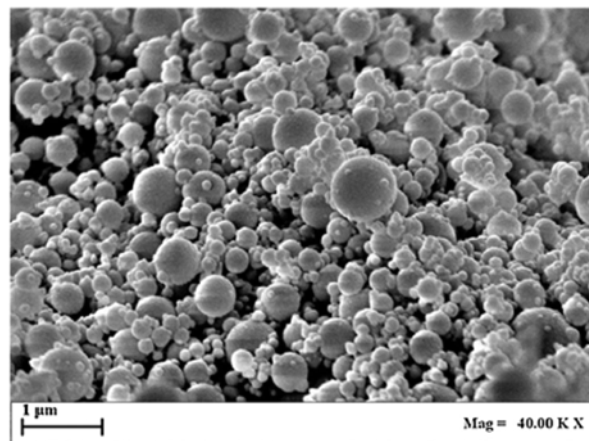


Fig. 2.23 Appearance of liposome produced by SuperLip. (a) TEM image, (b) SEM image [195]

第3章 疎水性薬物/高分子複合体の作製と機能化

3.1 研究目的と方針

近年開発されている API の約 40% が疎水性分子であるため [66], 疎水性 API 用の高度な DDS 設計手法の確立は急務である. そこで本章では, 前述した $scCO_2$ とフロー型プロセスの融合により, 疎水性 API の新規ナノ粒子化プロセスを提案する.

2.3.1.3 で述べた通り, 超臨界エマルジョン抽出 (SFEE) 法は, DDS 構築を念頭に置いたナノ粒化技術の中で, 非常に効果的な手法である. 一方, 既往の研究においては, 二相間での物質移動を促進し有機溶媒の抽出効率を向上させるために, o/w エマルジョンを $scCO_2$ へと噴霧する必要あるため, スケールアップやフロー型プロセスの実現が困難であった. 2.2.1.1 で述べた通り, マイクロ流路内におけるスラグ流の利用は, 界面間の物質移動促進に有効な手法である. そこで, 本章では, SFEE 法においてスラグ流を活用することでフロー型プロセスを実現し, 効率的な疎水性 API ナノ粒子製造を目指した.

また, 作製した微粒子の機能性向上を実現するために, 生体分解性高分子 chitosan による微粒子の表面修飾に取り組んだ. 2.1.2 で述べた通り, chitosan による表面修飾によって, 微粒子の安定性が向上すると報告されており [112], 表面電位が変わることから体内における滞留時間の向上も期待できる [104, 105]. また, chitosan は水に不溶であるが, アミノ基を多く有するために, 希酸に可溶であることが知られている. このことから, $scCO_2$ 存在下では水相への溶解が溶解に行えたと期待でき, 表面修飾プロセスが容易になると考えられる. これらを踏まえ, 本研究では, SFEE 法による溶媒抽出後に作製微粒子への chitosan の添加を目指した.

以上から, 本章における研究目的を以下の 3 点とした.

1. マイクロ流路内におけるスラグ流の連続製造およびその性質制御
2. スラグ流を利用した SFEE 法による有機溶媒の効率的な抽出
3. SFEE 法により作製した微粒子への chitosan による表面修飾

3.2 実験操作

3.2.1 試料

エマルジョンの作製の際には, 有機溶媒として ethyl acetate (EA, 純度 99.5% 以上, 富士フィルム和光純薬株式会社), 界面活性剤として高鹼化度 poly(vinyl alcohol) (PVA-H, 分子量 31,000–50,000, 鹼化度 98–99%, Sigma-Aldrich Co. LLC), もしくは低鹼化

度 PVA (PVA-L, 分子量 66, 000–79,000, 鹸化度 78–82 %, 富士フィルム和光純薬工業株式会社) を用いた. SFEE 法の際には, 二酸化炭素に液化炭酸ガス (CO_2 , 純度 99.5 % 以上, 藤井物産株式会社) を用いた. 加えて, 微粒子作製とその機能化を行う際に, ibuprofen (IBP, 純度 98.5 % 以上), chitosan (CTS, 脱アセチル化度 80 % 以上) を, いずれも富士フィルム和光純薬株式会社より購入して用いた. すべての実験において, 使用する超純水は Direct-Q UV3 (Merck KGaA 製) を使用して製造し, 電気抵抗率が 18.2 $\text{M}\Omega \text{ cm}$ であることを確認した.

3.2.2 Oil in water エマルション作製

o/w エマルションの水相には, PVA-H もしくは PVA-L の 0.2 wt% 水溶液を利用した. PVA-H もしくは PVA-L の溶解は, 353 K に加熱した状態で 2 時間攪拌することで行った. また, IBP を添加した o/w エマルションを作製する際は, あらかじめ EA に対して IBP を溶解させた. 水相と EA 相を重量比 77:23 で混合し, 283 K に冷却した状態で攪拌することで, o/w エマルションを作製した. 攪拌は, ホモジナイザー (STIRRER P-1, アズワン株式会社製) を用いて, 3,000 rpm の速さで 15 分間行った.

3.2.3 スラグ流の形成と観察

sc CO_2 と水からなるスラグ流の作製・観察に用いた装置の概図を, Fig. 3.1 に示す. 装置上流から供給される CO_2 を, 冷却器 (TBG020AA, 株式会社東洋製作所製) によって 268 K に冷却することで液化したのちに, ダブルプランジャーポンプ (NP-D-461, 日本精密化学株式会社) によって加圧した. 系内の圧力は, ポンプ直後に取り付けられた背圧弁 (26-1700 Series, テスコム電機株式会社製) によって, 8.0–15.0 MPa の範囲で制御した. 同時に, 水相は, 液相用ポンプ (L-10AS, 株式会社島津製作所製) により定流量送液した. 二相は, 恒温水槽 (BK 300, ヤマト科学株式会社製) 内で 313.0 K まで昇温されたのち, T 字結合子 (内径 1/16 in., SS-100-3, Swagelok 製) にて接触し, その下流に繋がる透明な polyphenylsulfone マイクロ流路 (内径 500 μm , Radel Tube 1220L, エムエス機器株式会社製) 内部でスラグ流を形成した. 長さ 1.2 m のマイクロ流路を通過したスラグ流は, 耐圧セル (容積 33 mL, 耐圧硝子工業株式会社製) 内に滞留し, sc CO_2 相のみをセル上部の出口から装置下流へと流出させた. 流出した sc CO_2 は, 微量調整バルブ (内径 1/8 in, HOKE 製) により定流量で大気圧へと減圧した.

圧力の測定は, マイクロ流路の前後に取り付けられた 2 つの圧力計 (耐圧硝子工業株式会社製) によって行われた. この際これらの差圧から, マイクロ流路における圧力損失は 0.1 MPa 以下であることが確認された. 温度の測定は, 装置内に取り付けられた温度計 (TM-300, アズワン株式会社製) によって行われた. CO_2 流量は, 減圧後に水相トラップを通過した CO_2 を, 湿式体積流量計 (WS-1A, 株式会社シナガワ製) によって測定した.

Figure 3.2 に示すように, 本実験装置で用いているマイクロ流路が透明であることか

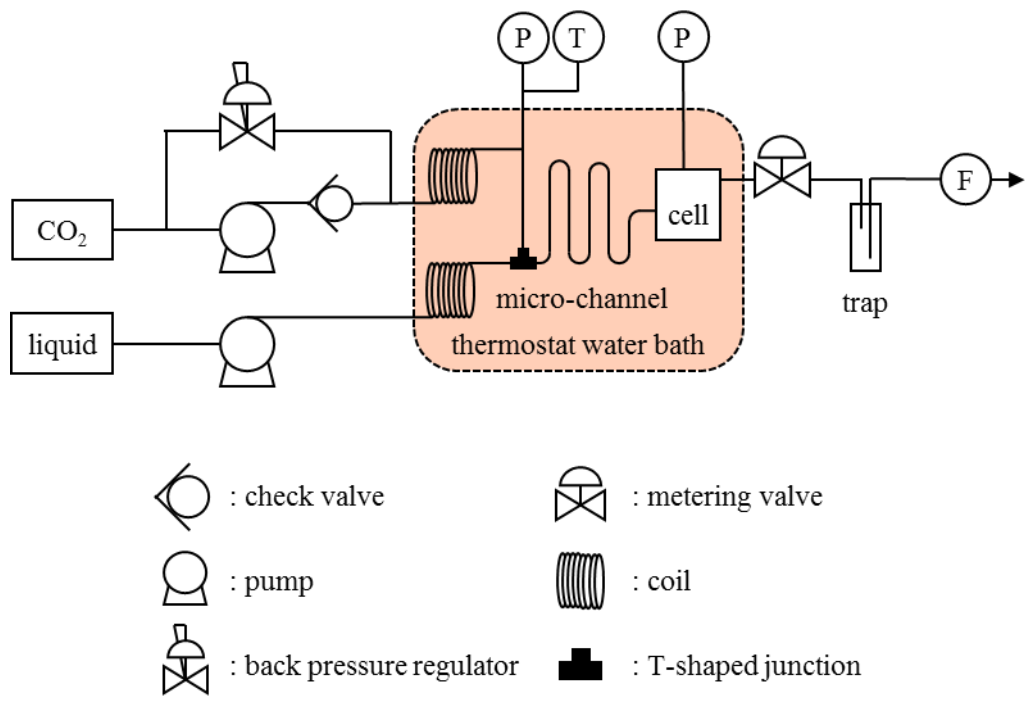


Fig. 3.1 Schematic diagram of apparatus for slug observation and SFEE

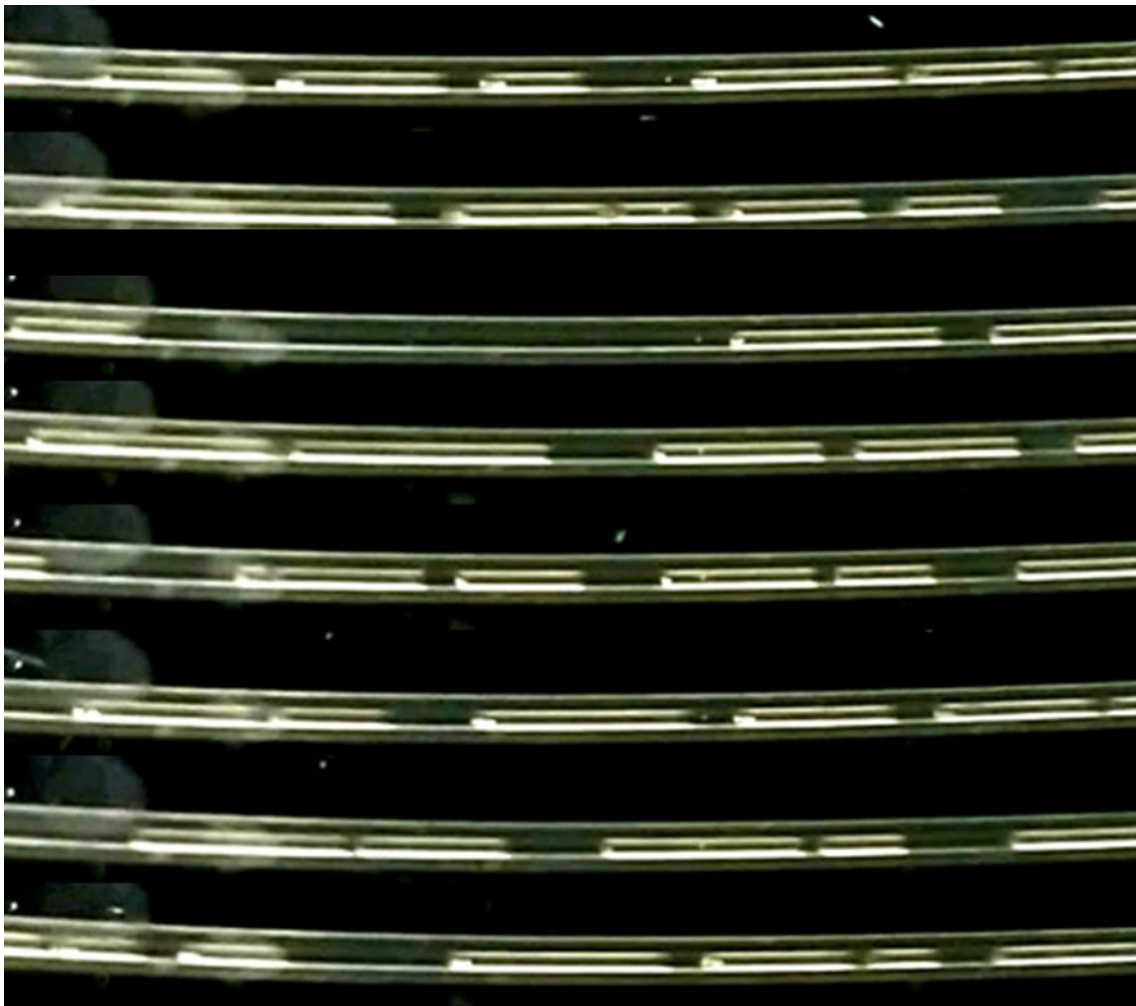


Fig. 3.2 Appearance of microchannel and slug flow in this study

ら、高圧化でのスラグ流の様子を外部から観察することが可能である。スラグ流の観察は、スラグ流の形成地点から 10 cm の地点で行い、計 30 枚の画像を解析することでスラグ平均長さ (l_{slug}) および式 (3.1) で定義される変動係数 (coefficient of variation: C_V) を測定した。

$$C_V = \frac{\sum_i \sqrt{(l_i - l_{\text{slug}})^2}}{l_{\text{slug}}} \quad (3.1)$$

l_i は、測定されたスラグの長さを示す。測定を行った条件は、Table 3.1 に示す。

3.2.4 フロー型超臨界エマルション抽出法

フロー型 SFEE 法は、3.2.3 と同様の手順で、水相を o/w エマルションに替えることで行った。SFEE の実験条件を、Table 3.2 に示す。

3.2.5 Chitosan による表面修飾

scCO₂ 雰囲気下における CTS の溶解性を確認するために、Fig. 3.3 の装置を用いて CTS の溶解実験を行った。実験に先立ち、ガラスセル内に水 1.0 ml と固形の CTS 2.0 mg とスターラーを加え、溶液を攪拌した状態で実験装置内の可視窓部にセルを静置した。装置上流から供給される CO₂ を、冷却器 (TBG045AR, 株式会社東洋製作所製) によって 268 K に冷却することで液化したのちに、ダブルプランジャーポンプ (NP-D-461, 日本精密化学株式会社) によって加圧した。系内の圧力は、ポンプ直後に取り付けられた背圧弁によって 10.0 MPa となるように制御した。流入した CO₂ は余熱部にて 310 K まで加熱されたのち、可視窓部に流入した。可視窓部に静置したセルの様子は、CCD カメラ (CCD Color Camera, 株式会社東芝製) によって 30 分間連続撮影された。

作製微粒子に対する CTS の添加は、Fig. 3.1 の装置内の耐圧セル内で行った。耐圧セル内にあらかじめ一定量の固形 CTS を静置し、SFEE 操作後の作製微粒子溶液をセル内に流入させることで、CTS を溶解させ、微粒子表面へ添加した。

3.2.6 作製微粒子評価

o/w エマルション内に分散している EA 相液滴の大きさ、および SFEE 法により作製した溶液に分散している微粒子の大きさは、動的光散乱法 (dynamic light scattering: DLS, nano partica SZ-100-Z, 株式会社堀場製作所製) によって測定した。測定は 3 度行い、再現性を確認した。平均粒子径 (d)、および粒子径分布の標準偏差 (standard deviation: σ) を式 (3.2)、式 (3.3) でそれぞれ定義した。

Table 3.1 Experimental conditions for water/CO₂ slug formation and observation

Run #	P [MPa]	Q_{CO_2} [ml min ⁻¹]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml min ⁻¹]	R_v [-]	ρ_{CO_2} [g ml ⁻¹]
SLG 01	8.0	235.1	0.168	0.115	0.278
SLG 02	8.0	235.7	0.090	0.062	0.278
SLG 03	8.0	235.7	0.090	0.062	0.278
SLG 04	8.0	157.5	0.392	0.403	0.278
SLG 05	8.0	198.5	0.093	0.076	0.278
SLG 06	8.0	146.5	0.396	0.436	0.278
SLG 07	8.0	164.1	0.269	0.265	0.278
SLG 08	8.0	159.6	0.194	0.196	0.278
SLG 09	8.0	104.9	0.507	0.782	0.278
SLG 10	8.0	91.8	0.503	0.884	0.278
SLG 11	8.0	129.8	0.266	0.331	0.278
SLG 12	8.0	122.2	0.048	0.064	0.278
SLG 13	8.0	105.5	0.095	0.145	0.278
SLG 14	8.0	105.6	0.051	0.077	0.278
SLG 15	8.0	64.9	0.180	0.449	0.278
SLG 16	8.0	61.6	0.141	0.370	0.278
SLG 17	8.0	30.2	0.204	1.091	0.278
SLG 18	10.0	37.6	0.086	0.838	0.629
SLG 19	10.0	29.6	0.094	1.167	0.629
SLG 20	15.0	35.6	0.066	0.840	0.780

* R_v : volumetric ratio of CO₂ over water in experimental conditions

Table 3.2 Experimental conditions for SFEE

Run #	surfactant	P [MPa]	Q_{CO_2} [ml min ⁻¹]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml min ⁻¹]	R_v [-]	ρ_{CO_2} [g ml ⁻¹]
SFEE 01	PVA-H	15.0	16.8	0.018	0.485	0.780
SFEE 02	PVA-H	12.0	16.0	0.018	0.470	0.718
SFEE 03	PVA-H	8.5	63.8	0.202	0.651	0.354
SFEE 04	PVA-H	8.5	61.5	0.064	0.216	0.354
SFEE 05	PVA-H	8.5	41.3	0.034	0.169	0.354
SFEE 06	PVA-H	8.5	35.1	0.065	0.380	0.354
SFEE 07	PVA-H	8.5	33.6	0.122	0.745	0.354
SFEE 08	PVA-H	8.5	16.6	0.126	1.560	0.354
SFEE 09	PVA-H	8.5	9.4	0.026	0.561	0.354
SFEE 10	PVA-H	8.5	4.8	0.012	0.517	0.354
SFEE 11	PVA-L	12.0	17.3	0.019	0.467	0.718
SFEE 12	PVA-L	10.0	9.6	0.019	0.711	0.629
SFEE 13	PVA-L	8.5	9.4	0.018	0.404	0.354

* R_v : volumetric ratio of CO₂ over water in experimental conditions

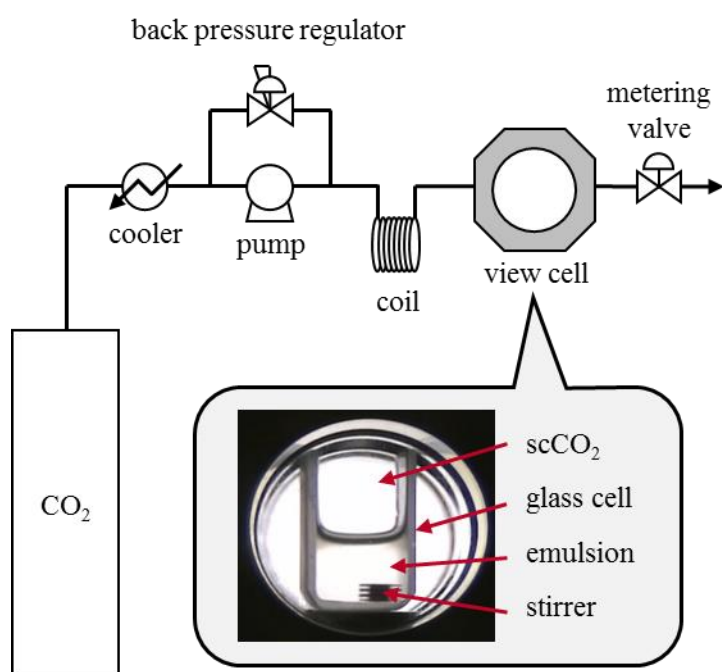


Fig. 3.3 Schematic diagram of apparatus for observation of chitosan dissolution under scCO_2

$$d = \sum_i p_i \times d_i \quad (3.2)$$

$$\sigma = \sum_i \sqrt{p_i \times (d_i - \bar{d})^2} \quad (3.3)$$

d_i は、区間*i*を代表する粒子径、 p_i は、区間*i*に存在する粒子の重量基準の割合を示す。同様に、DLSを利用してゼータ電位 (zeta potential: ZP) を測定し、表面電位の評価も行った。

作製した微粒子分散液中の残留 EA 濃度 (C_{EA}^{fin}) は、ガスクロマトグラフィ (gas chromatography: GC, GC14B, 株式会社島津製作所製) によって測定した。GCの測定条件は、インジェクター温度 423 K, カラム温度 423 K, 検出器温度 433 K とし、カラムには porapak Q (ジーエルサイエンス株式会社製) を用いた。計算は、式 (3.4) の物質収支式を基に行った。

$$C_{EA}^{fin} \times m_{product} = C_{EA}^{int} \times m_{used} - \frac{R_{EA}}{R_{EA} + R_{H_2O}} \times \{m_{used} - m_{product}\} \quad (3.4)$$

C_{EA}^{int} , C_{EA}^{fin} は、SFEE 操作前と後の溶液中に含まれる EA 重量濃度を示し、 m_{used} , $m_{product}$ は使用した o/w エマルジョンおよび作製分散溶液の重量を示す。 R_{EA} , R_{H_2O} は、GCによって測定される値であり、減圧後の CO₂に含まれる EA および水の質量濃度を示す。また、 C_{EA}^{fin} を用いることで、式 (3.5) から EA の抽出効率 (eff_{SFEE}) を算出した。

$$eff_{SFEE} = 1 - \frac{C_{EA}^{fin}}{C_{EA}^{int}} \quad (3.5)$$

3.3 結果と考察

3.3.1 スラグ流の制御

まず、装置ならびにスラグ長さ測定の健全性を確認するために、scCO₂/水系のスラグ流において、入口における測定水/CO₂体積流量比 (R_V) と、 l_{slug} より算出される理論水/CO₂体積流量比 (R_V^{calc}) の比較を行った。 R_V は、CO₂と水の大气圧下での体積流量 (Q) および密度 (ρ) を利用し、式 (3.6) により算出した。

$$R_V = \frac{\int_{t_{\text{fin}}}^{t_{\text{int}}} Q_{\text{H}_2\text{O}} dt \times \rho_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{atm}} / \rho_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{exp}}}{\int_{t_{\text{fin}}}^{t_{\text{int}}} Q_{\text{CO}_2} dt \times \rho_{\text{CO}_2}^{\text{atm}} / \rho_{\text{CO}_2}^{\text{exp}}} \quad (3.6)$$

t_{int} , t_{fin} は、それぞれ操作開始時間および操作終了時間、 ρ^{atm} , ρ^{exp} はそれぞれ大気圧下と実験条件下の密度を示す。一方、 R_V^{calc} を算出するためには、 l_{slug} をスラグ体積に変換する必要があるが、本実験では scCO₂ スラグの形状が、Fig. 3.4 のような円柱と半球の組み合わせであると仮定して計算を行った。この仮定により、 R^{calc} は l_{slug} および各相の密度を用いて、式 (3.7) により算出される。

$$R_V^{\text{calc}} = \frac{l_{\text{H}_2\text{O}} \times \frac{\pi D^2}{4} - \frac{\pi D^3}{6}}{l_{\text{CO}_2} \times \frac{\pi D^2}{4} + \frac{\pi D^3}{6}} \quad (3.7)$$

$l_{\text{H}_2\text{O}}$, l_{CO_2} は液相・気相スラグの平均長さ、 D は流路の内径 (500 μm) を示す。Fig. 3.5 には、各実験 (SLG 01–17) における R_V と R_V^{calc} の関係を示す。二つの値には良好な相関関係が認められることから、装置ならびにスラグ長さ測定の健全性が確認された。

続いて、操作因子による $l_{\text{H}_2\text{O}}$ の制御を試みた。まず、 Q_{CO_2} が $l_{\text{H}_2\text{O}}$ に与える影響を検討した。 Q_{CO_2} を変化させた際の $l_{\text{H}_2\text{O}}$ 分布を Fig. 3.6 に示し、その際の C_V を Table 3.3 に示す。これらの結果から、 Q_{CO_2} の増加に伴い、 $l_{\text{H}_2\text{O}}$ が減少する一方で、 C_V が増大することが示唆された。これは、 Q_{CO_2} の上昇とともに、スラグ流の生成部である T 字結合子内での流動状態が激しくなり、短いスラグが多く形成されるようになったためであると考えられる。スラグの長さを制御するためには、 C_V が小さいほうが望ましいため、以後の実験では Q_{CO_2} を 60 ml min⁻¹以下に設定した。

Q_{CO_2} に続き、入口における水/CO₂ 重量流量比 (R_M) および R_V による $l_{\text{H}_2\text{O}}$ の制御を試みた。 R_M と R_V の間には、式 (3.8) の関係が成り立つ。

$$R_M = R_V \times \frac{\rho_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{exp}}}{\rho_{\text{CO}_2}^{\text{exp}}} \quad (3.8)$$

この際、圧力を 8–15 MPa の範囲で変化させることで、 R_M と R_V のどちらがより $l_{\text{H}_2\text{O}}$ に大きな影響を与えるかを検討した。Table 3.4 および Fig. 3.7 には、各実験 (SLG 15–20) における R_M , R_V と $l_{\text{H}_2\text{O}}$ の値を示す。結果、 $l_{\text{H}_2\text{O}}$ は R_V とより強い相関があることが確認され、式 (3.9) に示す原点を通る曲線で良く近似できることが明らかとなった。

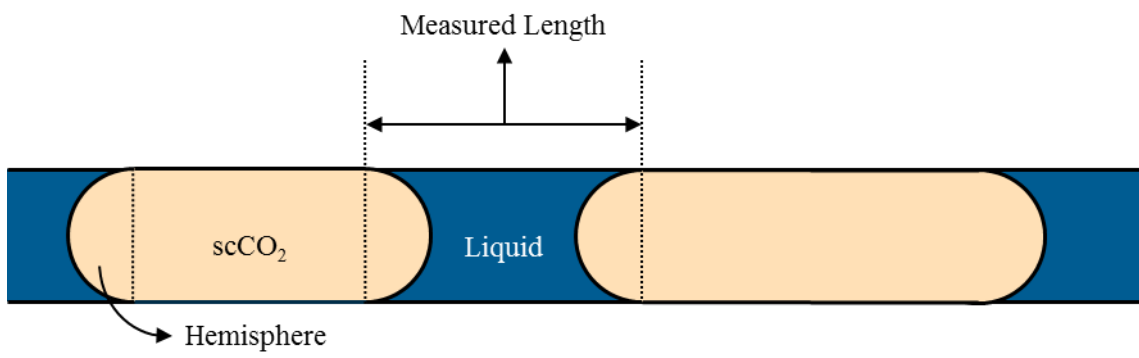


Fig. 3.4 The assumption made to determine volume of slugs

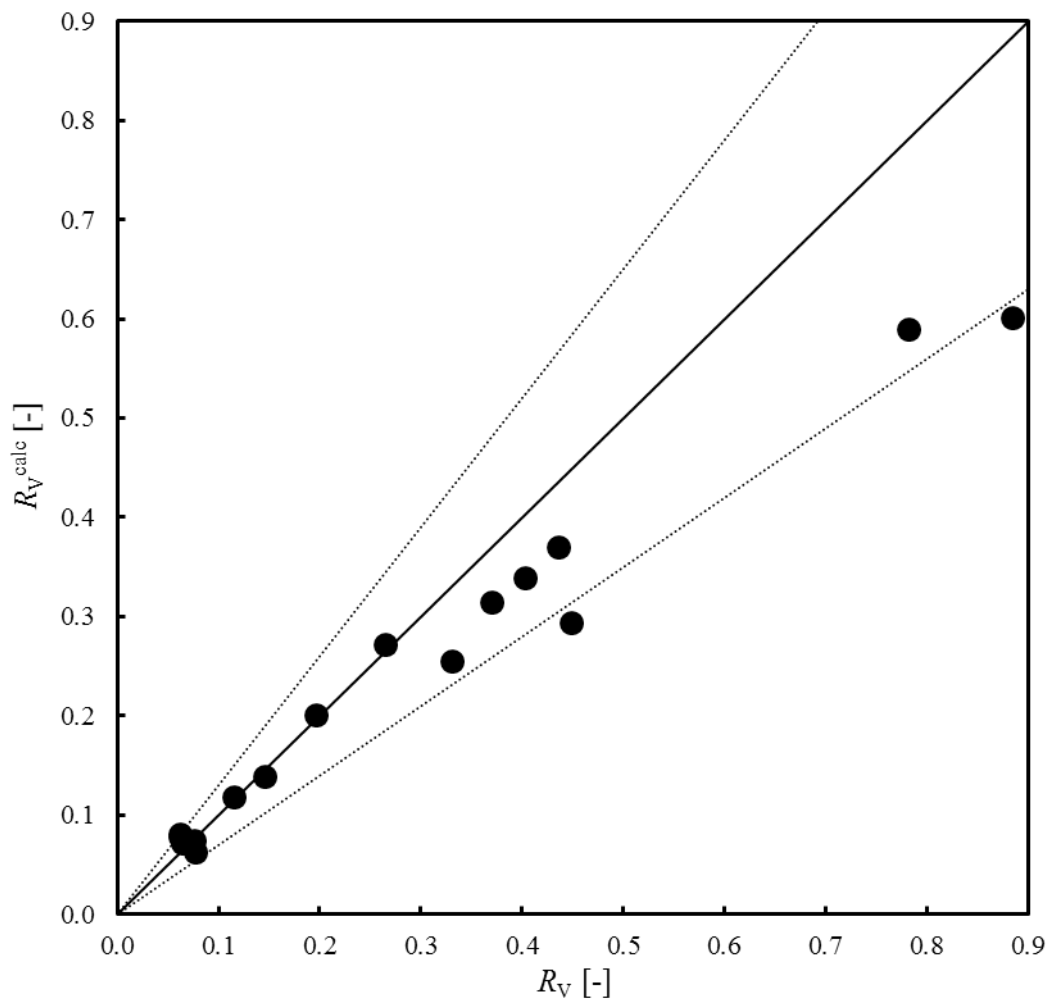


Fig. 3.5 Comparison of measured and calculated value of water to CO₂ volumetric ratio

● experimental results, — 0 % error, ··· ±30 % error

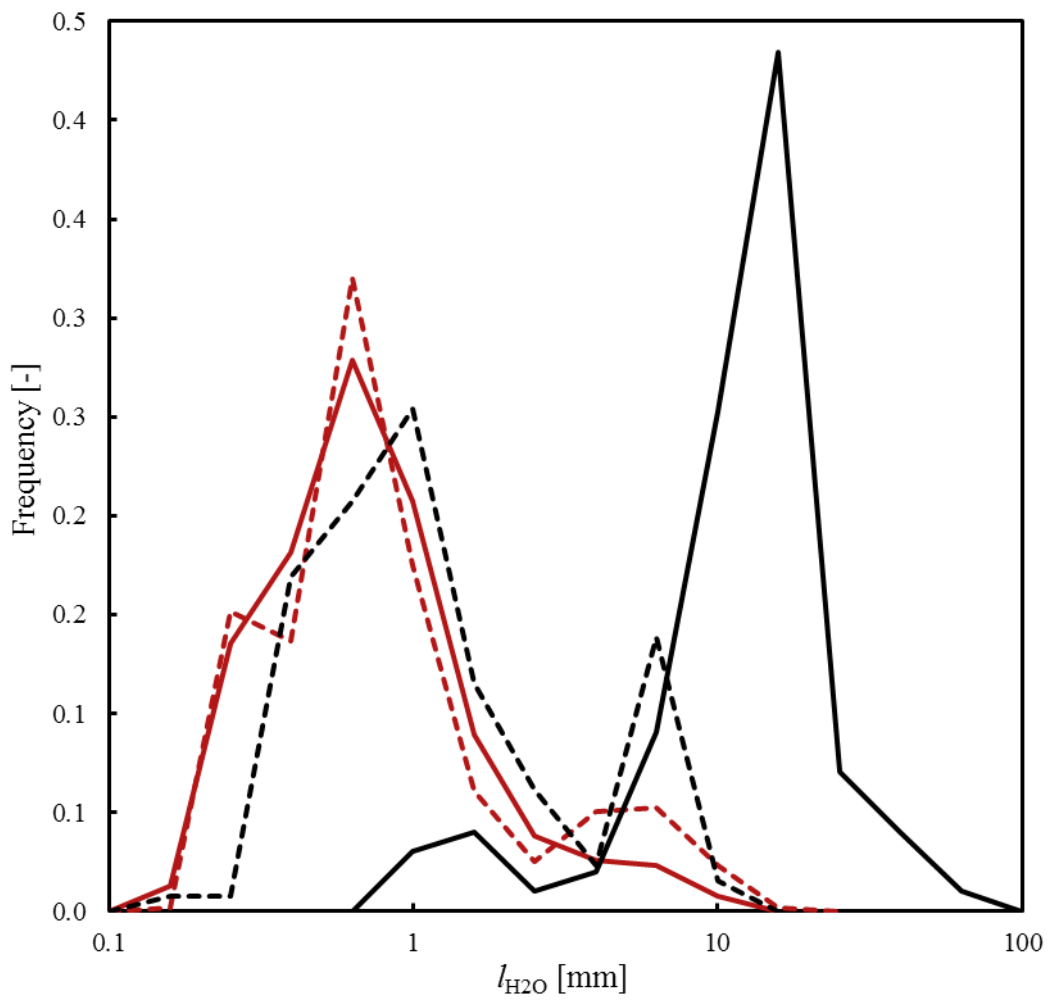


Fig. 3.6 Water slug length distribution. — SLG 01 ($Q_{CO_2} = 235.1 \text{ ml min}^{-1}$), - - - SLG 11 ($Q_{CO_2} = 129.8 \text{ ml min}^{-1}$), - - - SLG 13 ($Q_{CO_2} = 105.5 \text{ ml min}^{-1}$), — SLG 17 ($Q_{CO_2} = 30.2 \text{ ml min}^{-1}$)

Table 3.3 Effect of CO₂ flow rate on water slug properties

Run #	Q_{CO_2} [ml min ⁻¹]	R_V [-]	l_{H_2O} [mm]	C_V [-]
SLG 01	72.9	0.103	1.3	0.892
SLG 11	48.0	0.249	1.8	1.230
SLG 13	33.6	0.127	1.6	0.773
SLG 17	17.6	0.522	15.8	0.156

* R_V : volumetric ratio of CO₂ over water in experimental conditions, l_{H_2O} : average length of water slugs,
 C_V : coefficient of variation

Table 3.4 Effect of water to CO₂ ratio on water slug length

Run #	P [MPa]	ρ_{CO_2} [g ml ⁻¹]	$l_{\text{H}_2\text{O}}$ [mm]	R_V [-]	R_M [-]
SLG 15	8.0	0.278	4.3	0.449	1.114
SLG 16	8.0	0.278	3.8	0.370	0.972
SLG 17	8.0	0.278	15.8	1.091	1.877
SLG 18	10.0	0.629	13.8	0.838	0.725
SLG 19	10.0	0.629	18.5	1.167	0.857
SLG 20	15.0	0.780	9.6	0.840	0.585

* $l_{\text{H}_2\text{O}}$: average length of water slugs, R_V , R_M : volumetric and mass ratio of CO₂ over water in experimental conditions

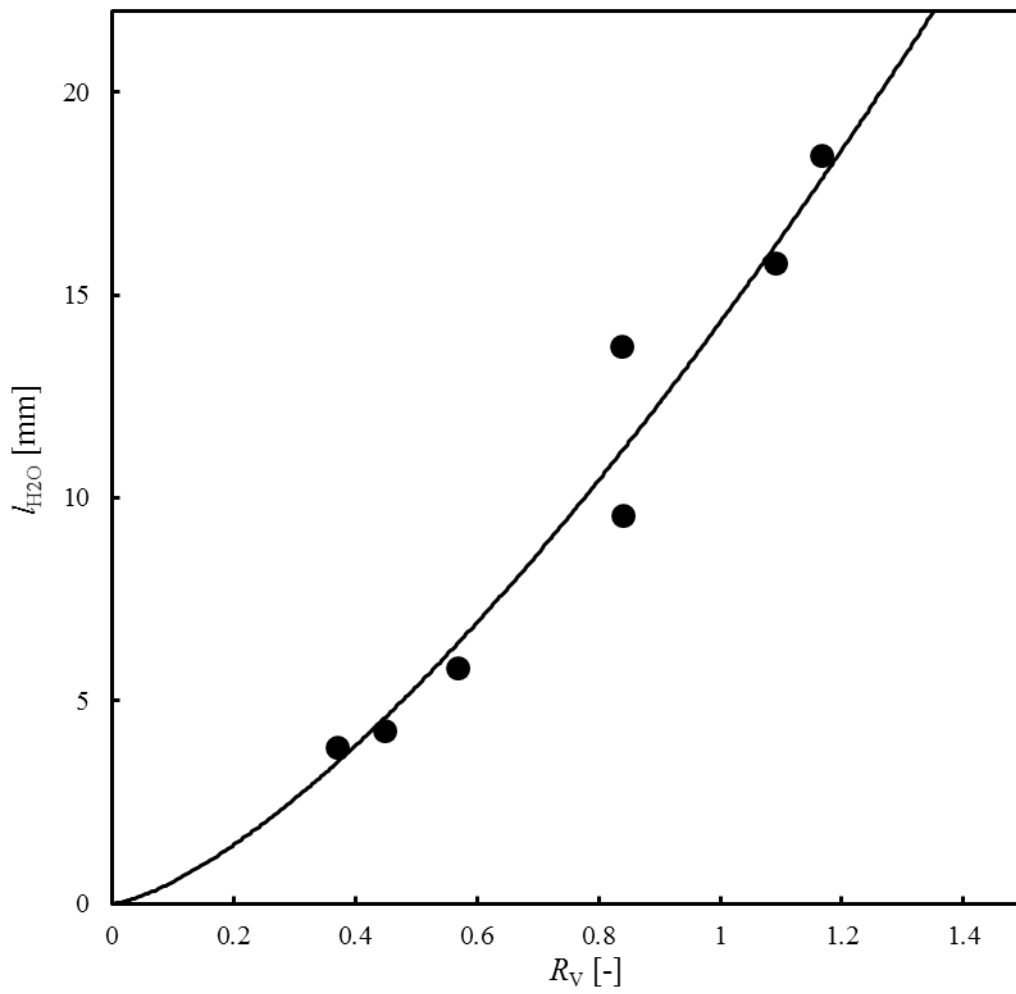


Fig. 3.7 Effect of water to CO₂ volumetric ratio on water slug length. ● experimental results, — fitting by eq. (3.9)

$$l_{\text{H}_2\text{O}} = A \times (R_V)^B \quad (3.9)$$

A , B はそれぞれ定数であり, $A = 14.34$, $B = 1.423$ で最も良い相関結果が得られた. 曲線が原点を通ることは, $Q_{\text{H}_2\text{O}} = 0$ のとき (すなわち $R_V = l_{\text{H}_2\text{O}} = 0$) に, 水スラグが形成されなくなるという現象と矛盾がないことに注意されたい. R_M は CO_2 および水の重量流量のみに依存する一方, R_V は, CO_2 相の密度変化によって大きく変化する. CO_2 相の流速や動粘度などの物性による流動状態がスラグの形状に大きく影響することから, $l_{\text{H}_2\text{O}}$ と R_V の間に強い相関がみられたのだと考えられる.

3.3.2 フロー型超臨界エマルション抽出法における粒子作製

前項では, マイクロ流路内においてスラグ流の形成と長さの制御ができることが明らかになった. 本項では, この知見を活かすことで, o/w エマルションから効率的に EA を抽出できる条件の検討を行う. まず, 流路内の空間時間が十分であることを確認するために, EA 抽出効率 (eff_{SFEE}) と平衡組成の比較を行った. 平衡組成は, 系が PVA-H を除いた CO_2 /水/EA の三成分系であると仮定し, 操作温度, 操作圧力における文献値と比較した [230]. 水/EA の比率は一定であるため, 三成分平衡から求められる理論 EA 抽出効率 ($eff_{\text{SFEE}}^{\text{calc}}$) は CO_2 /水重量流量比 ($R_{\text{CO}_2/\text{w}}$) の関数として表すことができる. この計算結果を, Fig. 3.8 に示す. 結果から, 現実的な CO_2 流量の範囲において, $eff_{\text{SFEE}}^{\text{calc}}$ は 95 % 程度まで上昇することが明らかとなった.

続いて, 式 (3.9) を用いて R_V によるスラグ流の制御が行うことで, 二相間の体積比表面積 (S_V) が eff_{SFEE} に与える影響を検討した. スラグ形状を Fig. 3.4 のようであると仮定することで, S_V は式 (3.10) のように R_V の関数で表すことができる.

$$S_V = \frac{12}{3A \times (R_V)^B - 2D} \quad (3.10)$$

すなわち, $eff_{\text{SFEE}}^{\text{calc}}$ も S_V の関数として表現することが可能となる. これを利用し, 総流量を一定の条件で S_V を変えた実験 (SFEE 01–04) における eff_{SFEE} と $eff_{\text{SFEE}}^{\text{calc}}$ 結果を Table 3.5 と Fig. 3.9 に示す. いずれの実験条件においても $eff_{\text{SFEE}}^{\text{calc}}$ はほぼ飽和している一方で, S_V の向上によって eff_{SFEE} は若干上昇の傾向が見られた. しかしながら, 極端に S_V が大きい条件においても平衡組成が達成されていないことから, scCO_2 /水相界面間の物質移動は十分に迅速に起きていると考えられる. スラグ流内には強い対流が存在しているため [231], scCO_2 相と水相内の拡散は, 律速段階になりにくいことを考慮すると, 本プロセスにおける EA 抽出の律速段階は, EA が水相へ溶解する過程であると考えられる (Fig. 3.10).

この仮説を検証するために, マイクロ流路内の空間時間 (τ) が eff_{SFEE} に与える影響を検討し, その結果 (SFEE 01–08) を Table 3.5 と Fig. 3.11 に示す. 結果から, τ の向

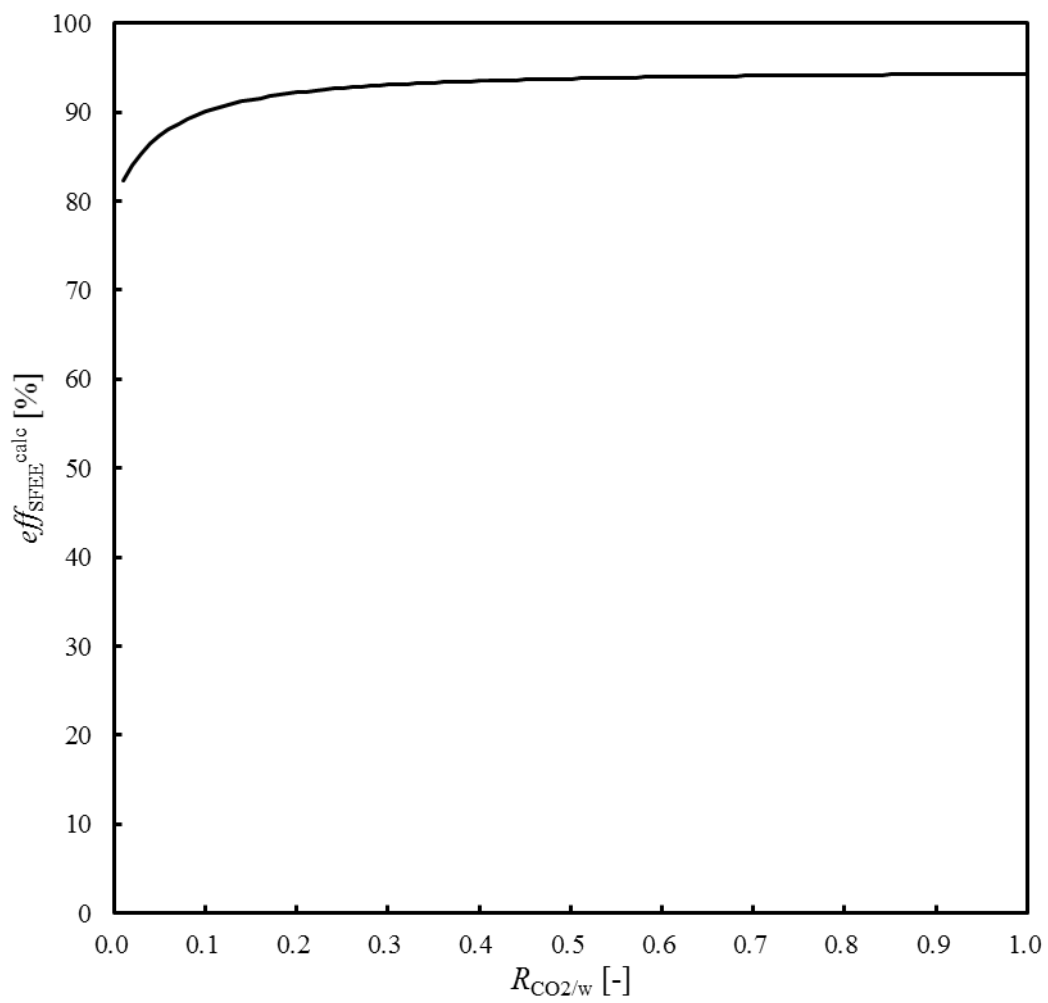


Fig. 3.8 Calculation of equilibrium extraction efficiency using ternary phase equilibrium data [230]

Table 3.5 Effect of surfactant, specific surface area and space time on extraction efficiency

Run #	surfactant	P [MPa]	S_V [m^{-1}]	τ [min]	eff_{SFEE} [%]
SFEE 01	PVA-H	8.5	4745.4	1.005	54.1
SFEE 02	PVA-H	8.5	545.4	1.000	38.9
SFEE 03	PVA-H	8.5	110.6	0.827	29.7
SFEE 04	PVA-H	8.5	19.8	1.143	32.2
SFEE 05	PVA-H	8.5	151.7	0.460	24.2
SFEE 06	PVA-H	8.5	2299.4	0.648	34.5
SFEE 07	PVA-H	8.5	214.7	3.228	79.7
SFEE 08	PVA-H	8.5	260.9	6.634	75.6
SFEE 09	PVA-H	12.0	327.3	4.485	67.1
SFEE 10	PVA-H	15.0	303.2	4.273	85.5
SFEE 11	PVA-L	8.5	468.6	5.752	100.0
SFEE 12	PVA-L	10.0	123.2	3.932	100.0
SFEE 13	PVA-L	12.0	331.9	2.656	100.0

* S_V : specific surface area of water slugs, τ : space time of micro-channel

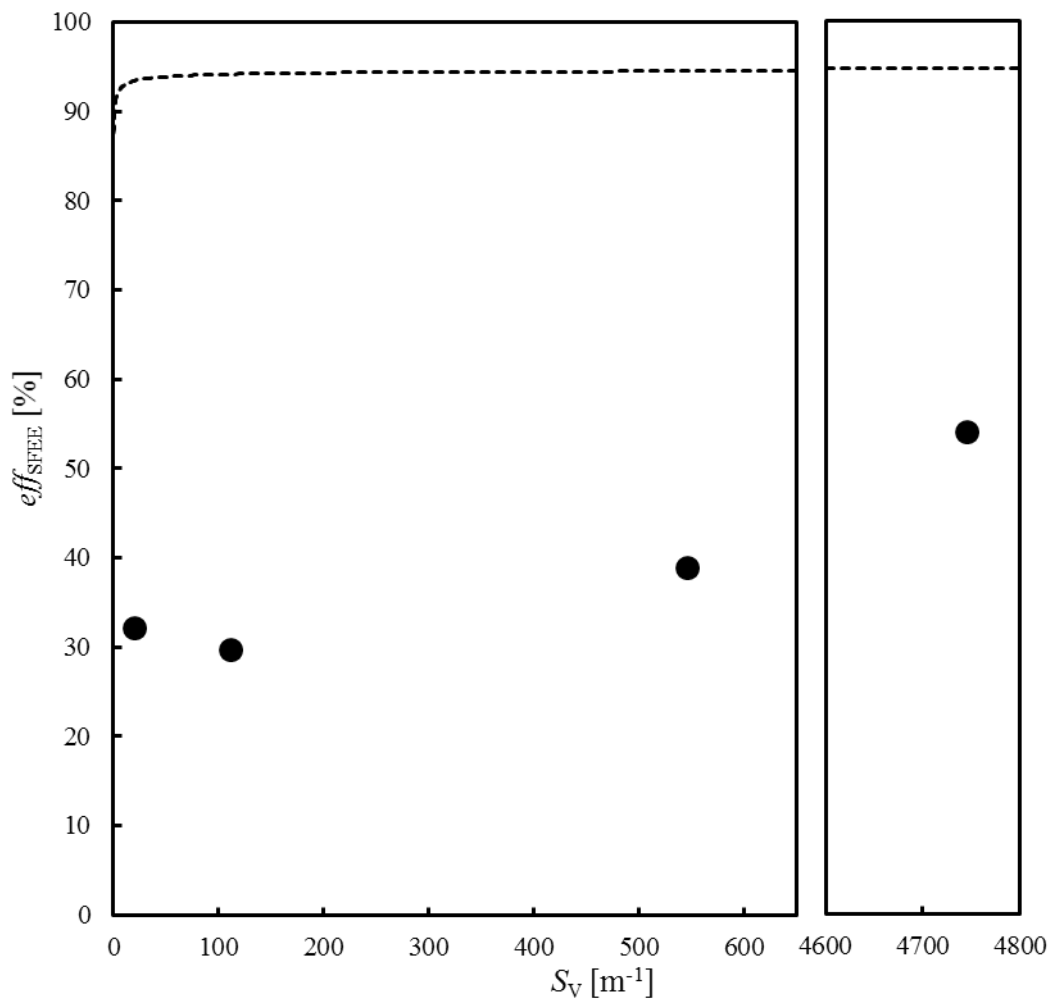


Fig. 3.9 Effect of specific surface area on extraction efficiency. ● experimental results, - - - calculated equilibrium extraction efficiency

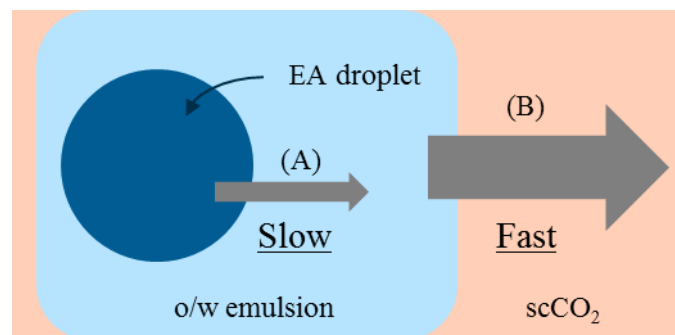


Fig. 3.10 Mass transfer during SFEE in slug flow. (A) dissolution of EA from droplets into water phase, (B) extraction of EA from water phase into scCO₂ phase

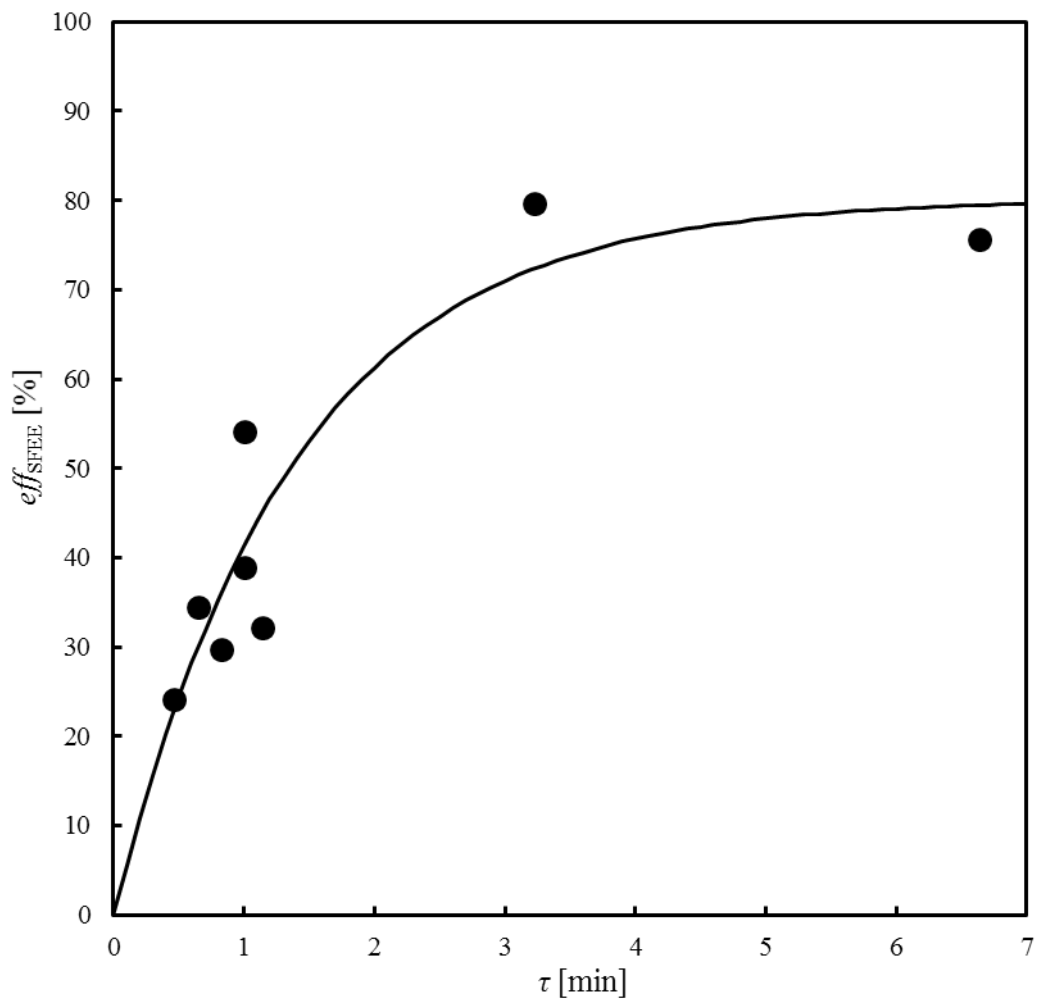


Fig. 3.11 Effect of space time on extraction efficiency. ● experimental results, — fitting by eq. (3.11)

上によって eff_{SFEE} が大きく増加することが明らかになった。これらの相関関係を、式 (3.11) に示す物質移動モデルを利用して、フィッティングにより eff_{SFEE} の平衡値を求めたところ、およそ 80 % となった。

$$eff_{SFEE} = eff_{SFEE}^{eq} \times (1 - e^{-k\tau}) \quad (3.11)$$

この値は、三成分平衡をもとに計算した eff_{SFEE}^{calc} (95 %) と比較して小さな値であることから、PVA-H の存在下では平衡がずれており、EA が水相に残存しやすいことが示唆された。

以上の検討を基に、界面活性剤種を PVA-H から PVA-L に替えて同様の実験を行った。界面活性剤種を変更する目的は、

1. EA 油滴を取り囲むように存在している界面活性剤種を変えることで、EA 抽出の律速段階である EA/水相間の物質移動速度を変化させる
2. 界面活性剤種を変えることで、四成分平衡を EA 抽出に有利な方向へ変化させるの 2 点である。この結果 (SFEE 07-13) を Table 3.5 に示す。PVA-L を界面活性剤として用いることで、複数の圧力条件において eff_{SFEE} の改善が確認され、EA を完全に抽出することに成功した。

続いて、作製した微粒子の評価を行うために粒子径 (d) の測定を行った。 d の測定では、PVA-H と PVA-L を用いて作製した抽出前の o/w エマルジョン (EML-H および EML-L)、抽出が完了していない作製微粒子溶液 (SFEE 05 および SFEE 07)、抽出が完了している作製微粒子溶液 (SFEE 12) を比較した。測定の結果を、Table 3.6, Fig. 3.12 および Fig. 3.13 に示す。異なる界面活性剤を用いた場合、o/w エマルジョンにおける d の値が異なるが、いずれの場合も抽出による d の減少が確認された。一方で、抽出が完了していない微粒子溶液では、o/w エマルジョン内の EA 油滴のサイズに近い粒子 (d_1) と EA 油滴のサイズよりも大幅に小さい粒子 (d_2) が見られた。本実験においては、EA 相に溶解している物質がないため、抽出が完了した粒子は界面活性剤のミセルとなっているため、このような極めて小さいナノ粒子観察されていると考えられる。

以上の結果から、PVA-L を用いた場合に効率的な EA 抽出が可能であることが明らかとなったため、以後の実験では、PVA-L を界面活性剤として使用する。

3.3.3 Ibuprofen ナノ粒子作製および chitosan による表面修飾

前項までに、フロー型プロセスによる SFEE 法を用いて、PVA-L を界面活性剤として使った o/w エマルジョンから、効率的な EA の抽出が可能であることが明らかとなった。本項では、この知見を活かし、実際に疎水性 API である IBP のナノ粒子の作製を試みる。さらに、生分解性高分子 CTS によるナノ粒子の表面修飾についても検討する。

まず、IBP を添加した o/w エマルジョンを用いて、ナノ粒子の作製を行った。作製を行った条件 (NPC 01-03) と作製粒子の d を Table 3.7 および Fig. 3.14 に示す。IBP の添

Table 3.6 Result of particle size of droplet and product of SFEE

Run #	$d_1 \pm \sigma_1$ [nm]		$d_2 \pm \sigma_2$ [nm]	
EML-H	344.6	± 166.1	N/A	
SFEE 05	165.7	± 59.4	14.6	± 5.1
SFEE 07	123.2	± 34.1	13.1	± 2.2
EML-L	58.4	± 21.0	N/A	
SFEE 12	N/A		35.8	± 12.0

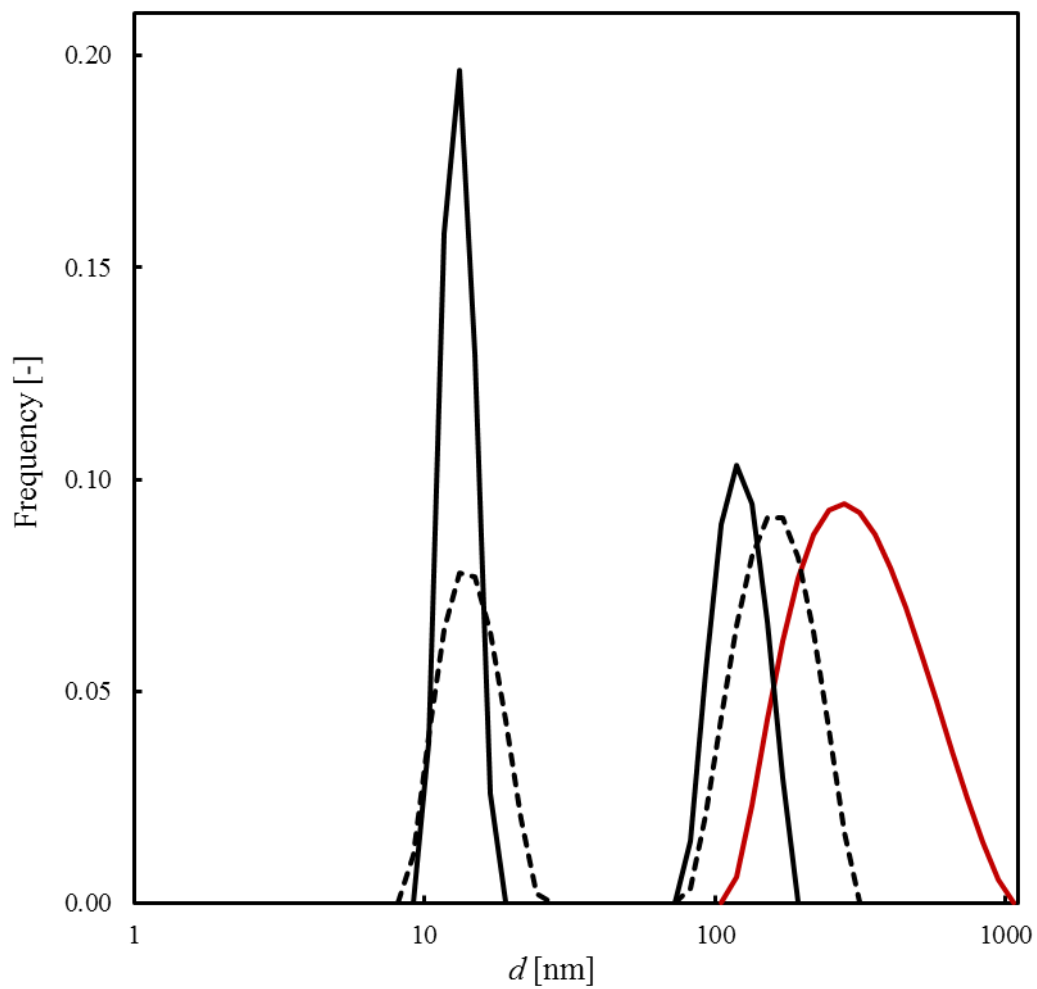


Fig. 3.12 Particle size distribution of emulsion and SFEE product. — EML-H, - - - SFEE 05 ($eff_{SFEE} = 24.2\%$), — SFEE 07 ($eff_{SFEE} = 79.7\%$)

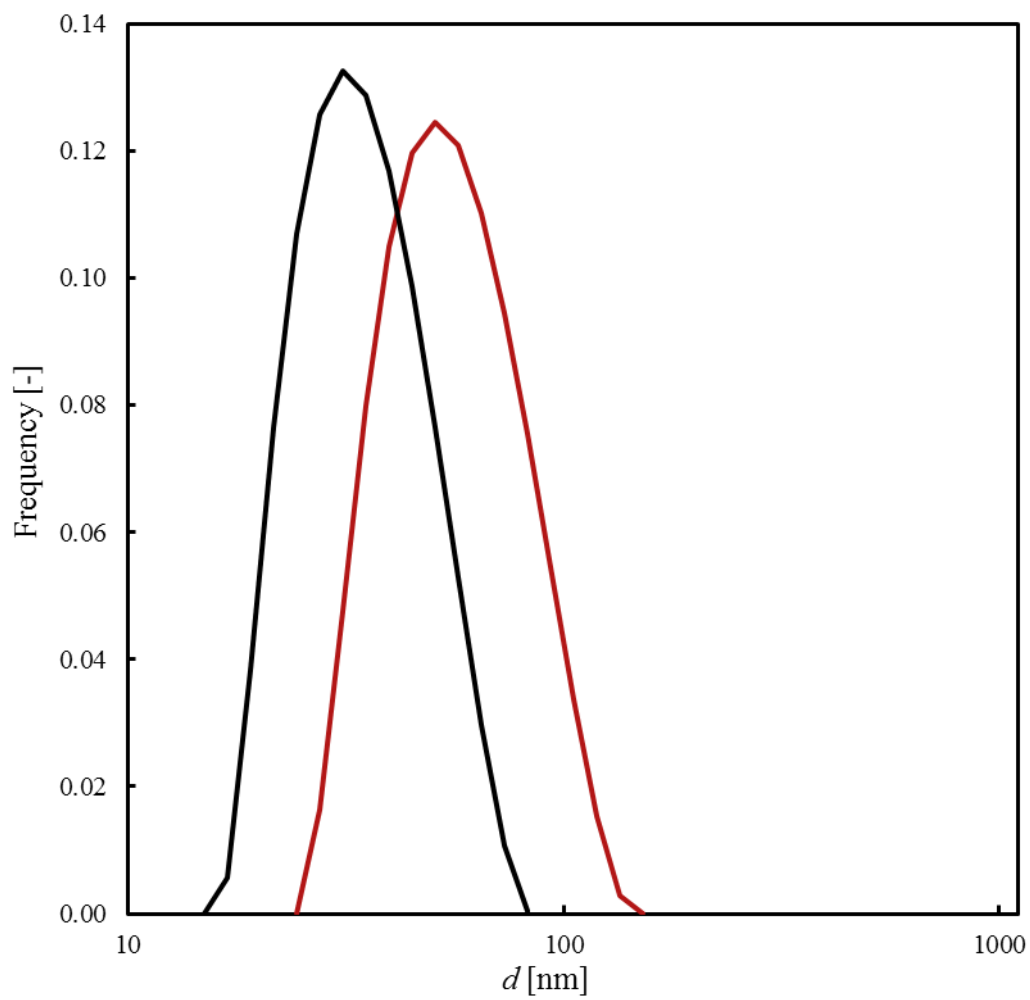


Fig. 3.13 Particle size distribution of emulsion and SFEE product. — EML-L,— SFEE 12 ($eff_{SFEE} = 100.0\%$)

Table 3.7 Particle size and surface charge of IBP nanoparticles and chitosan-modified particles

Run #	C_{CTS} [wt%]	C_{IBP} [wt%]	d [nm]	ZP [mV]
NPC 01	0.00	0.00	35.8 ± 12.0	0.4 ± 0.1
NPC 02	0.00	0.19	80.5 ± 13.9	N/A
NPC 03	0.00	0.30	278.5 ± 69.2	N/A
NPC 04	0.02	0.00	340.2 ± 118.9	1.4 ± 1.3
NPC 05	0.05	0.00	418.1 ± 74.9	32.9 ± 3.4
NPC 06	0.10	0.00	226.1 ± 146.0	44.8 ± 2.0
NPC 07	0.20	0.00	1591.8 ± 85.8	42.4 ± 0.9

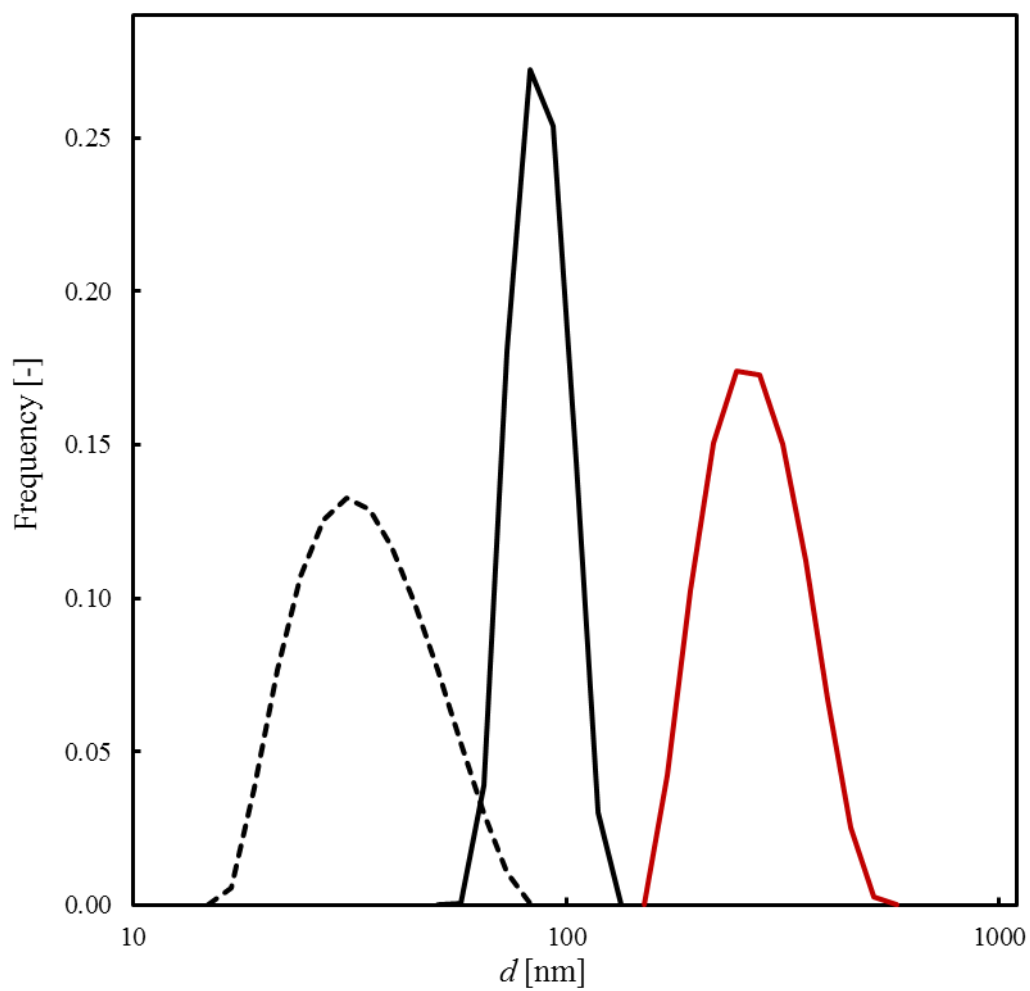


Fig. 3.14 Particle size distribution of IBP nanoparticles. - - - NPC 01 ($C_{IBP} = 0.00\%$), — NPC 02 ($C_{IBP} = 0.19\%$), — NPC 03 ($C_{IBP} = 0.30\%$)

加と共に d の大幅な向上が確認されたことから、PVA-L ミセル内部に IBP が取り込まれていると考えられる。

続いて、作製した IBP ナノ粒子に対する CTS の添加を行うために、scCO₂ 雰囲気下での CTS の溶解挙動観察を行った。Fig. 3.15 に示すように、CTS は scCO₂ 雰囲気下で水に対して可溶であることが明らかとなった。この溶解性を利用することで、PVA-L ミセルに対する CTS の添加を行った。添加を行った条件 (NPC 04-07) とその結果を、Table 3.7 および Fig. 3.16 に示す。結果として、CTS の添加によって d および表面電位 (ZP) の大幅な向上が見られた。 d の向上は、Fig. 2.1 (c)に示す構造体のように、CTS が PVA-L ミセル表面に付着しているためであると考えられる。CTS 分子鎖は多くのアミノ基を有するため、分子鎖同士の静電的反発力により、粒子表面に広がって分布するため、微量の CTS 添加により大幅な d の向上が見られたのだと考えられる。この静電力により、PVA-L ミセルは正に帯電し、最大で 45 mV 程度の ZP を付与することに成功した。このような正帯電性のナノ粒子は、薬物送達に有利であることが報告されているため、高度な DDS の設計にあたり、高い利用価値が期待される。

3.4 本章のまとめ

本章では、以下の3点を目的として研究を行った。

1. マイクロ流路内におけるスラグ流の連続製造およびその性質制御
2. スラグ流を利用した SFEE 法による有機溶媒の効率的な抽出
3. SFEE 法により作製した微粒子への CTS による表面修飾

その結果として、以下の成果を得た。

1. 高压条件下において、scCO₂ と水を T 字結合しで混合することで、スラグ流が連続的に形成できることを示した。
2. 1.において、スラグ流の長さは、水/scCO₂ の体積比によって制御できることを示した。
3. マイクロ流路内のスラグ流を利用したフロー型 SFEE プロセスにおいて、抽出条件を制御することで有機溶媒の抽出を効率的に行えることを示した。
4. 3.において、物質移動の律速段階は有機溶媒相から水相への物質移動であり、界面活性剤種と CO₂ との親和性がこの物質移動に大きく影響することが確認された。
5. フロー型 SFEE プロセスにおいて、ibuprofen を疎水性 API として利用することで、50–300 nm 程度の粒子が作製可能であることを示した。
6. scCO₂ 雰囲気下において、chitosan の水への溶解が可能であることを示し、この溶解性を利用して微粒子の表面修飾が可能であることを示した。また、これにより粒子表面を正に帯電させることに成功した。

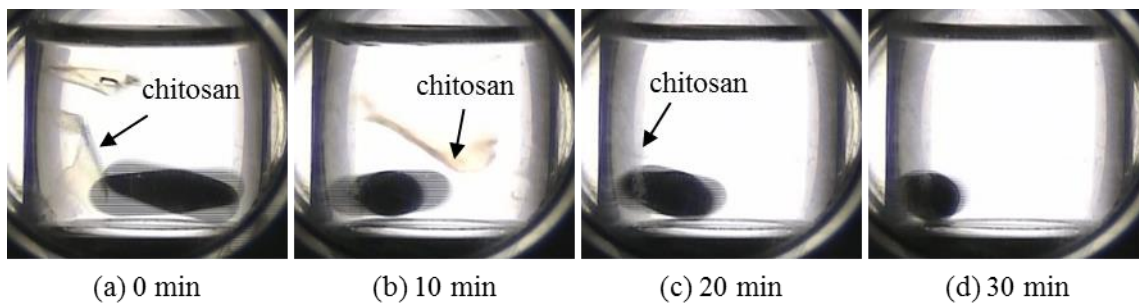


Fig. 3.15 Observation of chitosan dissolution (0.2 wt%) under scCO₂ (10 MPa). (a) before treatment, (b) 10 min after treatment, (c) 20 min after treatment, (d) 30 min after treatment

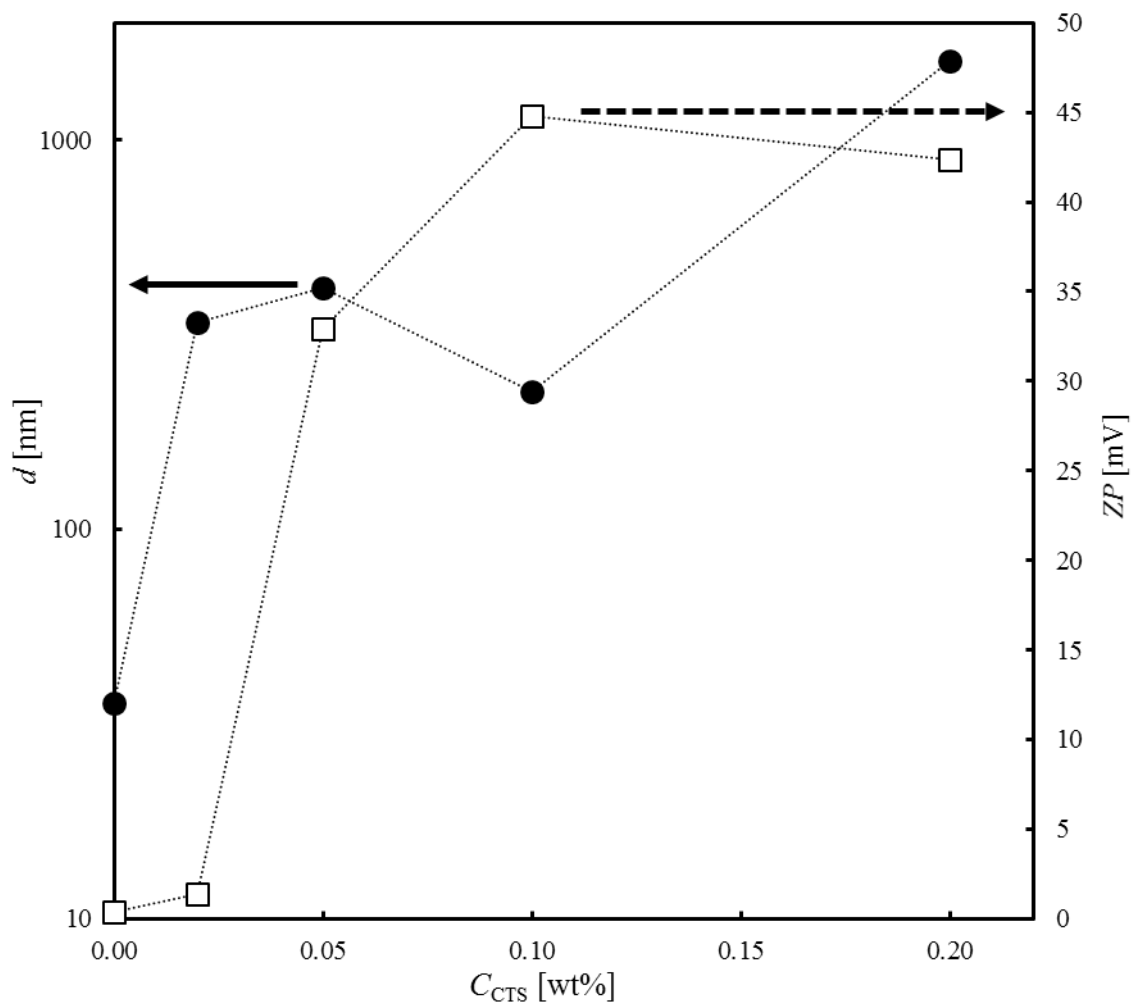


Fig. 3.16 Particle size and zeta-potential of chitosan-modified SFEE product. ● particle size, □ zeta-potential

第4章 超臨界エマルジョン抽出における 物質移動解析

4.1 研究目的

前章では、フロー型 SFEE プロセスにより、疎水性 API のナノ粒子が作製可能であることを示した。本法は、第2章で述べた通り、従来の製薬プロセスと比較して以下の点で優れている。

1. 作製ナノ粒子径の操作性が得られているため、API の体内での挙動が制御可能
2. フロー型製造による品質およびプロセス制御性の向上
3. 有機溶媒の使用量・残留溶媒量の削減による、コストおよび安全性の向上

一方で、前章で作製したナノ粒子は、IBP 内包 PVA-L 粒子のみであり、異なる物質を用いた際に、プロセスの変更を強いられる可能性は否定できない。ただし、無数存在する API 全てのナノ粒子の作製を試みてその確認を行うことは非効率的であるため、現実的にはプロセス中における現象を理解し、そこからナノ粒子の作製における支配的な因子を特定することが重要となる。SFEE 法においては、化学的な反応こそ生じないものの、scCO₂ 相、水相、有機溶媒相の三相間での物質移動が同時に進行するため、プロセスにおける支配因子の特定は容易とはいえない。これを踏まえ、本章における研究目的を以下の4点とした。

1. 高圧 CO₂ 雰囲気下における、CO₂ の o/w エマルジョンへの溶解過程の物質移動解析
2. scCO₂ 雰囲気下における、有機溶媒の抽出過程における物質移動解析
3. 操作因子や使用物質が2.や3.の物質移動に与える影響の把握
4. 物質移動速度の定量評価方法の確立

4.2 実験操作

4.2.1 試料

本章から o/w エマルジョン作製の際に、界面活性剤として polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (Tween 80, 水分 4.0% 以下) および polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate (Tween 20, 水分 5.0% 以下) を用いた。また、ナノ粒子の作製を行う際は、stearic acid (SA, 純度 95.0% 以上) を用いた。いずれの試薬も、富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

4.2.2 Oil in water エマルション作製

本章では、SFEE 法において有機溶媒油滴の大きさが抽出速度に与える影響を検討するために、o/w エマルション径の制御を試みた。具体的には、Tween 80 もしくは Tween 20 の 1.0 wt% 溶液と EA を、重量比 90 : 10 で混合し、313.0 K において 500 rpm の速度で攪拌した。この際に、攪拌時間を 10 – 1000 min の範囲で変えることで粒子径の制御を試みた。SA を添加した実験においては、o/w エマルション作製前にあらかじめ EA に対して 0.5 もしくは 1.0 wt% の SA を溶解させた。

4.2.3 超臨界エマルション抽出における相挙動の可視化

SFEE 法の可視化には、Fig. 3.3 と同様の装置を用いた。実験に先立ち、ガラスセル内に作製した o/w エマルションを 0.75 もしくは 1.00 ml 加え、溶液を攪拌した状態で実験装置内の可視窓部にセルを静置した。高圧 CO₂ 雰囲気下での o/w エマルション観察実験では、30 分間隔で液化ガスを少量ずつ装置へと供給し、1.7 MPa から 0.2 MPa ずつ昇圧を行った。圧力が 3.3 MPa に達した後は、30 分間隔で微量調整バルブから CO₂ を排出し、1.5 MPa まで 0.2 MPa ずつ減圧した。この間の o/w エマルションの様子は CCD カメラにて撮影した。

scCO₂ 雰囲気下での o/w エマルション観察実験では、装置上流から CO₂ を供給し、313 K、15.0 MPa の条件下で scCO₂ と o/w エマルションを接触させた。CCD カメラによる撮影は、溶液の変化がなくなるまで、およそ 3–4 時間行った。相挙動の観察を行った条件を Table 4.1 に示す。

4.2.4 画像解析

実験中に得られた相挙動の動画は、1 分間隔で画像に変換され、o/w エマルションの溶液部分の平均明度 (g) により溶液の濁度を評価した。 g は画像内の各ピクセルの色を HSV 色空間で表した際の明度の平均値であり、RGB 色空間から HSV 色空間への変換は式 (4.1) で行う。

$$g = \max(\text{red}, \text{green}, \text{blue}) \quad (4.1)$$

red , green , blue はそれぞれ RGB 色空間における赤、緑、青の強度を、0-1 の範囲に収まるように正規化した値である。

Table 4.1 Experimental conditions for observation of SFEE

Run #	P [MPa]	v_i [ml]	surfactants	d_{oil} [nm]	C_{SA} [wt%]
OPT 01	15.0	1.00	Tween 80	272.8	0.00
OPT 02	15.0	0.75	Tween 80	249.2	0.00
OPT 03	15.0	0.75	Tween 80	776.0	0.00
OPT 04	15.0	0.75	Tween 80	969.4	0.00
OPT 05	15.0	0.75	Tween 80	212.2	0.50
OPT 06	15.0	0.75	Tween 80	178.8	1.00
OPT 07	15.0	0.75	Tween 20	1662.1	0.50
OPT 08	15.0	0.75	Tween 20	455.7	1.00

* v_i : initial loading amount of emulsion, C_{SA} : concentration of stearic acid

4.2.5 粒子径の予測

SFEE 操作中における油滴径を推定するために、 g を利用した粒子径推算モデルの作成を試みた。具体的には、実測値から得られる o/w エマルションの粒子径 (d_{oil}) と o/w エマルション中の粒子数 (N_{oil}) を、ニューラルネットワークを利用して g と関連することで、 g と N_{oil} が既知の場合における d_{oil} の推算を目指した。モデルの複雑化を防ぐために、 g との相関が強いと考えられる N_{oil} 、 d_{oil} 、粒子表面積 (πd_{oil}^2)、粒子体積 ($\pi d_{oil}^3/6$) を全て入力値として用いた。ノードを 20 個有する中間層を 2 層用意し、出力値は g とした。

4.3 結果と考察

4.3.1 高圧 CO₂/エマルション系における物質移動解析

まず、SFEE 法プロセス中の挙動の観察を行う前に、高圧 CO₂ 雰囲気下で o/w エマルションにどのような変化が起こるかを確認した。時間ごとの平均明度 (g) および圧力の変化を Fig. 4.1 に示し、その際の o/w エマルションの様子を Fig. 4.2 に示す。 g の値が大きければ、溶液は多くの光を透過しているために透明であり、 g の値が小さければ、光が透過できないことから溶液は懸濁している、この観察から、以下の興味深い結果が得られた。

1. 常圧から 1.5 MPa の範囲では懸濁していた o/w エマルションが、2.1 MPa 前後で透明となった
2. 一度透明となった o/w エマルションは、3.3 MPa 前後で再び完全に懸濁した
3. o/w エマルションを再度減圧したところ、上記 1. および 2. の変化が再度観察されたため、これらは可逆的な変化であることが示唆された

今回の観察に用いた o/w エマルション中には、200 nm 前後の EA 液滴が分散しているため、常圧下では懸濁している。一方、今回観察された g の変化は、可逆的な変化であることから、観察中に EA の抽出が進行し、o/w エマルション内から EA 液滴が消失しているとは考えにくい。すなわち、高圧 CO₂ との接触に伴う EA 液滴の物性の変化のみによって、 g に変化が生じていると考えられる。Table 4.2 には、水、CO₂、EA の波長 632 nm の光に対する屈折率 (n) を示す [232]。高圧下では、CO₂ は EA に溶解していると考えられるため、EA の屈折率は圧力上昇と共に CO₂ に近づき減少していく。この際に、EA/CO₂ 混合相と水相の屈折率が等しくなる圧力が存在し、この圧力では二相の屈折率が等しくなるために、溶液内で光の散乱が起これずに g が向上すると考えられる。このような現象は、mm オーダーの液滴においてはすでに観測されている [182]。

以上の議論から、 g は EA 相の CO₂ 濃度 (x_{CO_2}) に応じて変化すると考えられる。1.7 MPa と 1.9 MPa の条件における、昇圧および減圧後の g の経時変化を、Fig. 4.3 に示す。

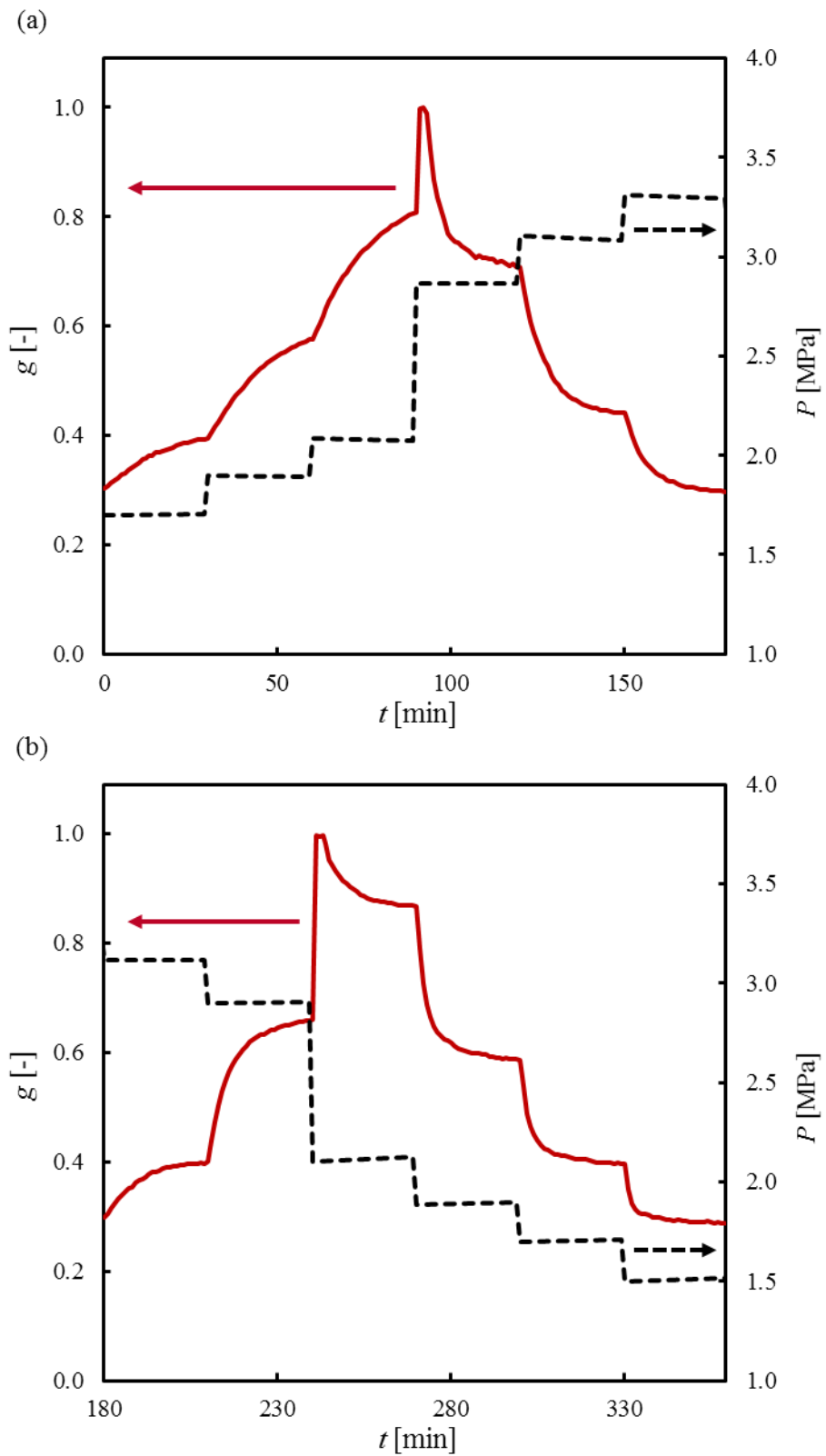


Fig. 4.1 Lightness change of o/w emulsion under high-pressure CO₂ atmosphere during (a) pressurization and (b) depressurization. — lightness, - - - pressure

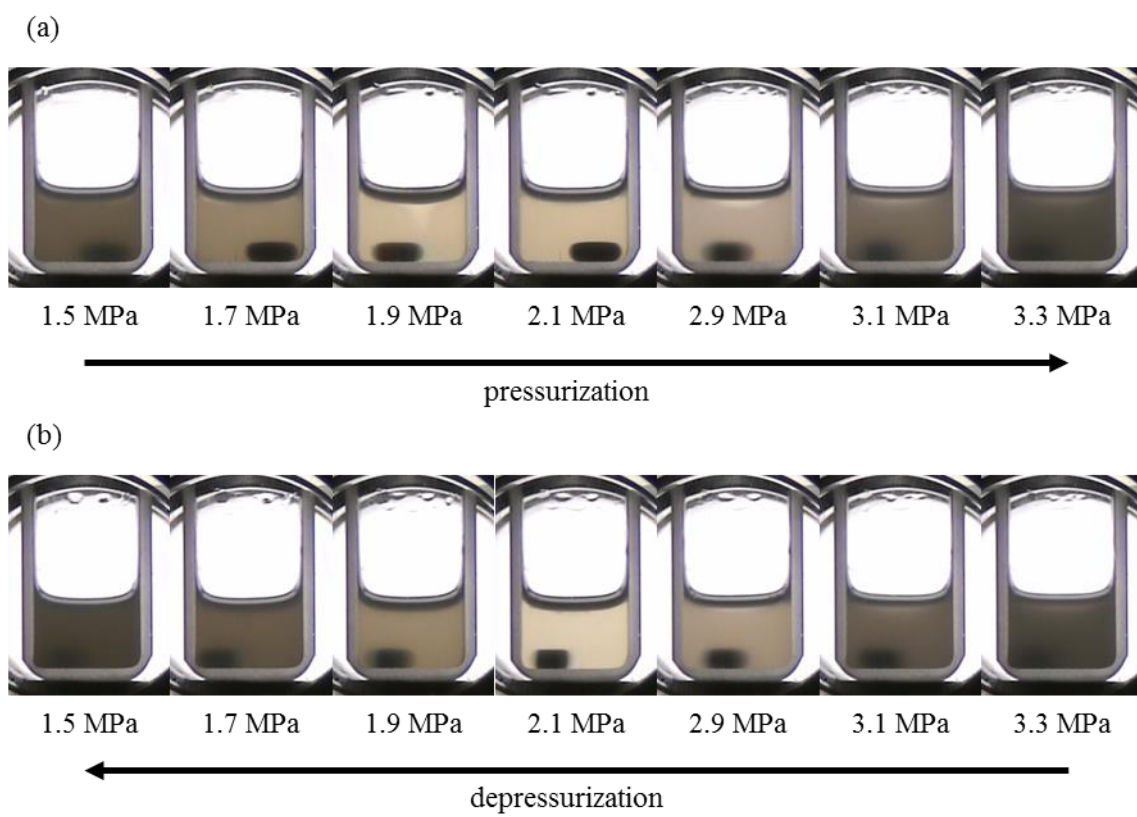


Fig. 4.2 Appearance of o/w emulsion under high-pressure CO₂ during (a) pressurization and (b) depressurization

Table 4.2 Refractive index of water, carbon dioxide and ethyl acetate at given conditions [232]

substance	P [MPa]	T [K]	n [-]
H ₂ O	8.5	310.7	1.331
CO ₂	8.5	310.7	1.109
EA	8.5	313.0	1.369

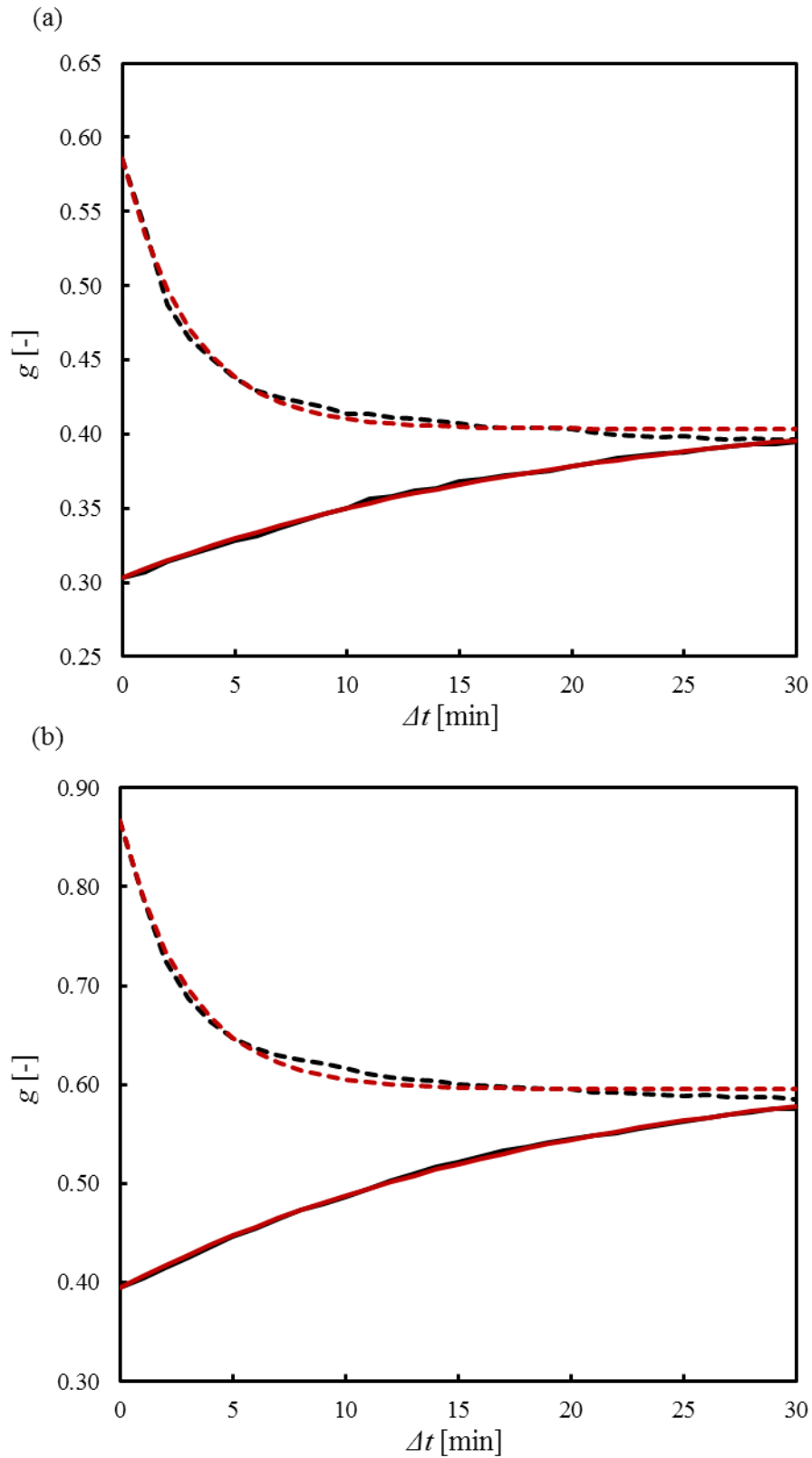


Fig. 4.3 Appearance change of o/w emulsion under (a) 1.7 MPa and (b) 1.9 MPa. — during pressurization, — fitting, - - - during depressurization, - - - fitting

x_{CO_2} の平衡値は圧力に対して一意に定まるため、 g も十分な時間が経過することで、初期状態によらない一定値 (g^{eq}) に収束することが確認できる。また、式 (4.2) の物質移動式で、 g が x_{CO_2} に比例すると仮定すると式 (4.3) が得られ、圧力操作時の g の経時変化を推算することができる。

$$\frac{dx_{\text{CO}_2}}{dt} = K'_{\text{CO}_2} \times (x_{\text{CO}_2}^{\text{eq}} - x_{\text{CO}_2}) \quad (4.2)$$

$$g = (g^{\text{eq}} - g^{\text{init}}) \times \{1 - \exp(-K_{\text{CO}_2} \times \Delta t)\} + g^{\text{init}} \quad (4.3)$$

Δt は圧力操作からの経過時間、 g^{init} は、それぞれ $\Delta t = 0$ における g の値である。これらの仮定を基に計算した K_{CO_2} の値を Table 4.3 に示し、その際の g の経時変化の計算値を Fig. 4.3 に示す。いずれの条件においても良好な相関が得られ、昇圧・減圧時の K_{CO_2} がそれぞれ一定値をとっていることから、 g が x_{CO_2} に比例するという仮定に大きな誤りがないことが示唆された。

上記の計算により得られた K_{CO_2} を比較することで、 CO_2 がEA相に溶解、EA相から離脱する速度を比較することができる。昇圧時の K_{CO_2} が減圧時の値と比較して約6倍小さいことから、 CO_2 のEA相への溶解は、 CO_2 がEA相からの離脱と比較してかなり遅い物質移動であることが示唆された。水相を十分な速度で攪拌している今回の系において x_{CO_2} の平衡達成までに30分程度の時間がかかっていることを踏まえると、Fig. 4.4 に示した物質移動のうち、水相への CO_2 の溶解もしくは水相に溶解した CO_2 がEA相に溶解する物質移動が、 CO_2 溶解過程全体の律速段階となっていることが推測される。

4.3.2 超臨界 CO_2 /エマルション系における物質移動解析

前項では、高圧 CO_2 雰囲気下におけるo/wエマルションの挙動を観察したが、この過程ではEAの抽出が進行していないと示唆された。本項では、sc CO_2 雰囲気下においてo/wエマルションを観察することで、SFEEプロセスで重要となる有機溶媒の抽出過程における解析を試みた。15 MPa, 313 Kの条件 (OPT 01) におけるo/wエマルションの経時変化を Fig. 4.5 に示し、その際の g の変化を Fig. 4.6 に示す。操作開始後数分に、 CO_2 の溶解による g の上昇と減少が見られ、その後数時間で再度 g の上昇が見られた。この変化は不可逆的で、減圧後も溶液は透明であったことから、EAの抽出による油滴の消失に起因すると考えられる。

EAの抽出過程における物質移動の律速段階を検討するために、セル内へのo/wエマルションの導入量を替えて同様の観察を行った (OPT 01 - 02)。Fig. 4.6 に示した通り、導入量を75%に減少させることで、 CO_2 の溶解とEAの抽出に起因する g の変化は、共に約1.3倍の速さで進行した。これは、導入量の減少により、o/wエマルション体積当

Table 4.3 Mass transfer parameter at given conditions

Operation	P [MPa]	K_{CO_2} [$\times 10^{-1}$]
Pressurization	1.7	0.491
Depressurization	1.7	3.295
Pressurization	1.9	0.504
Depressurization	1.9	3.305

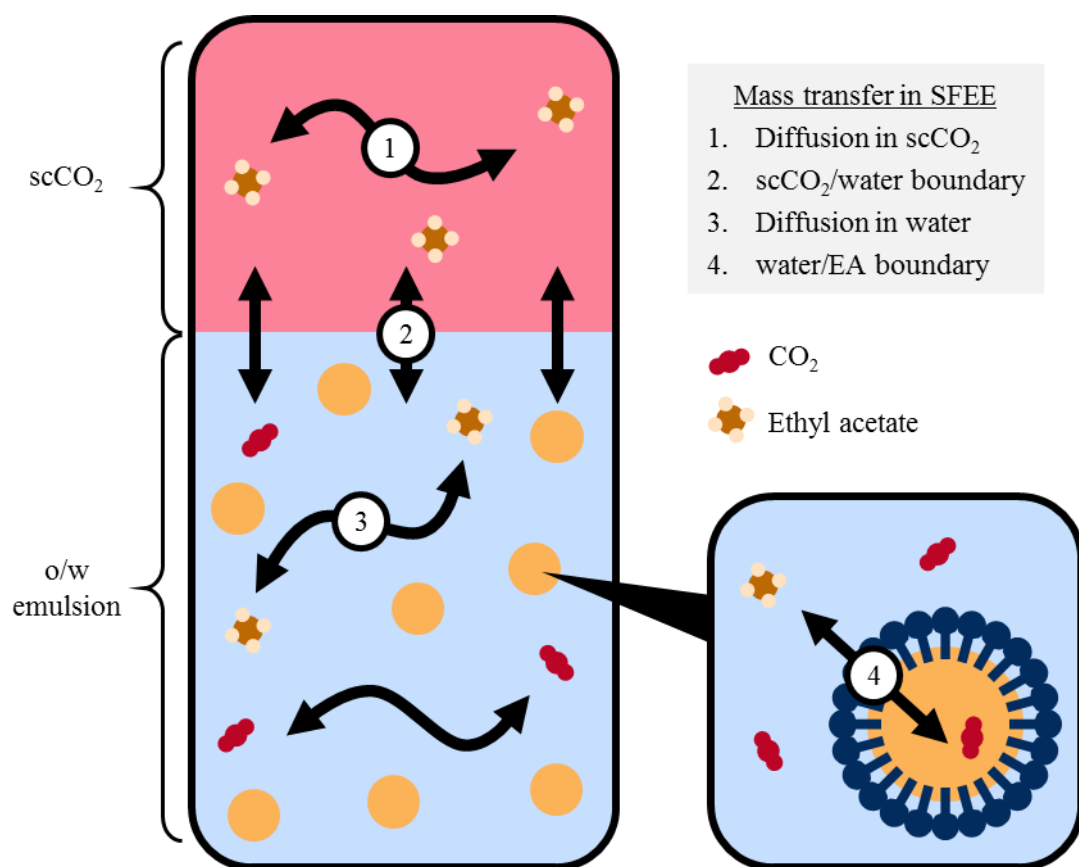


Fig. 4.4 Mass transfer of CO₂ and ethyl acetate during SFEE

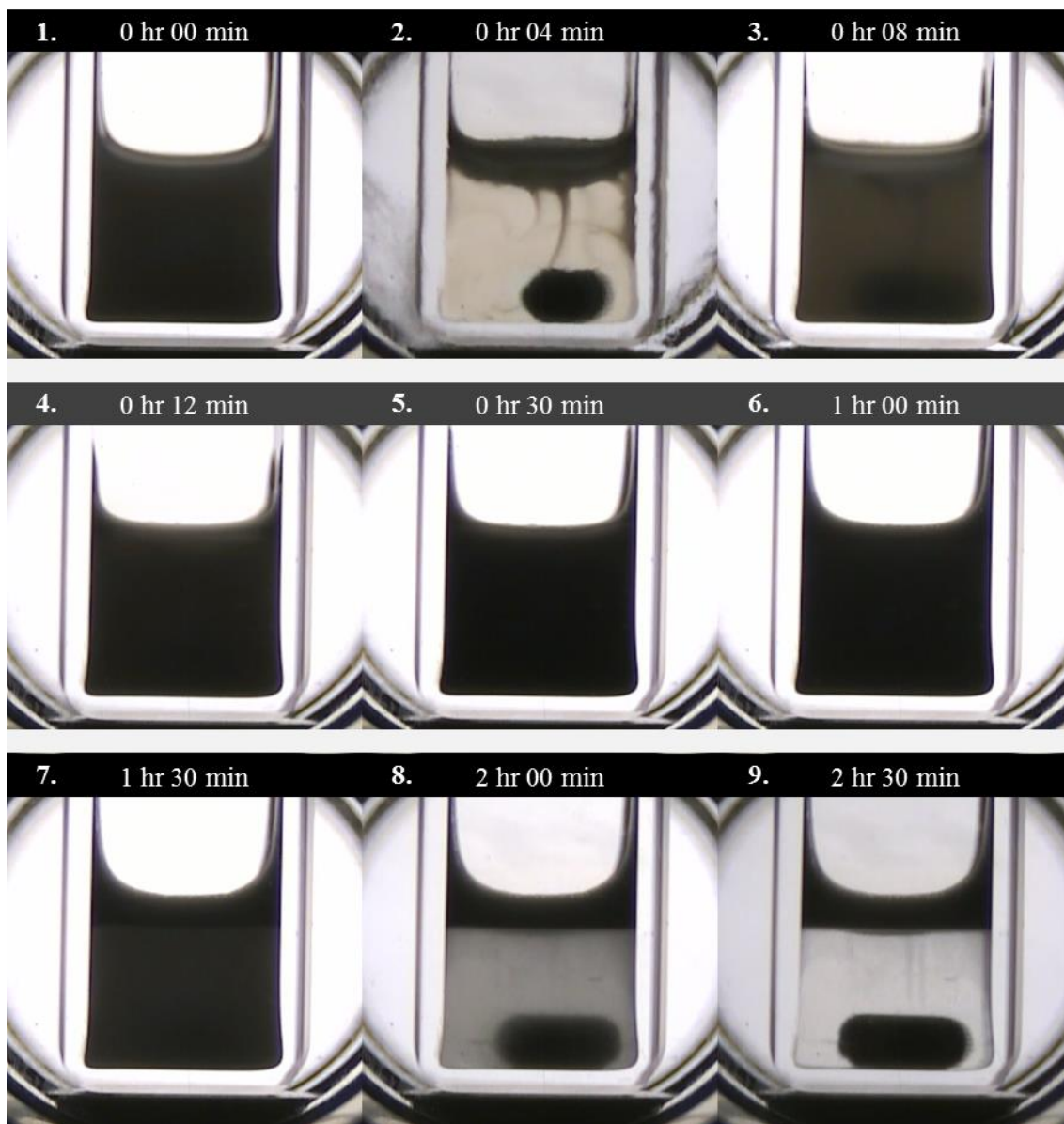


Fig. 4.5 Appearance change of o/w emulsion under scCO₂ (OPT 01)

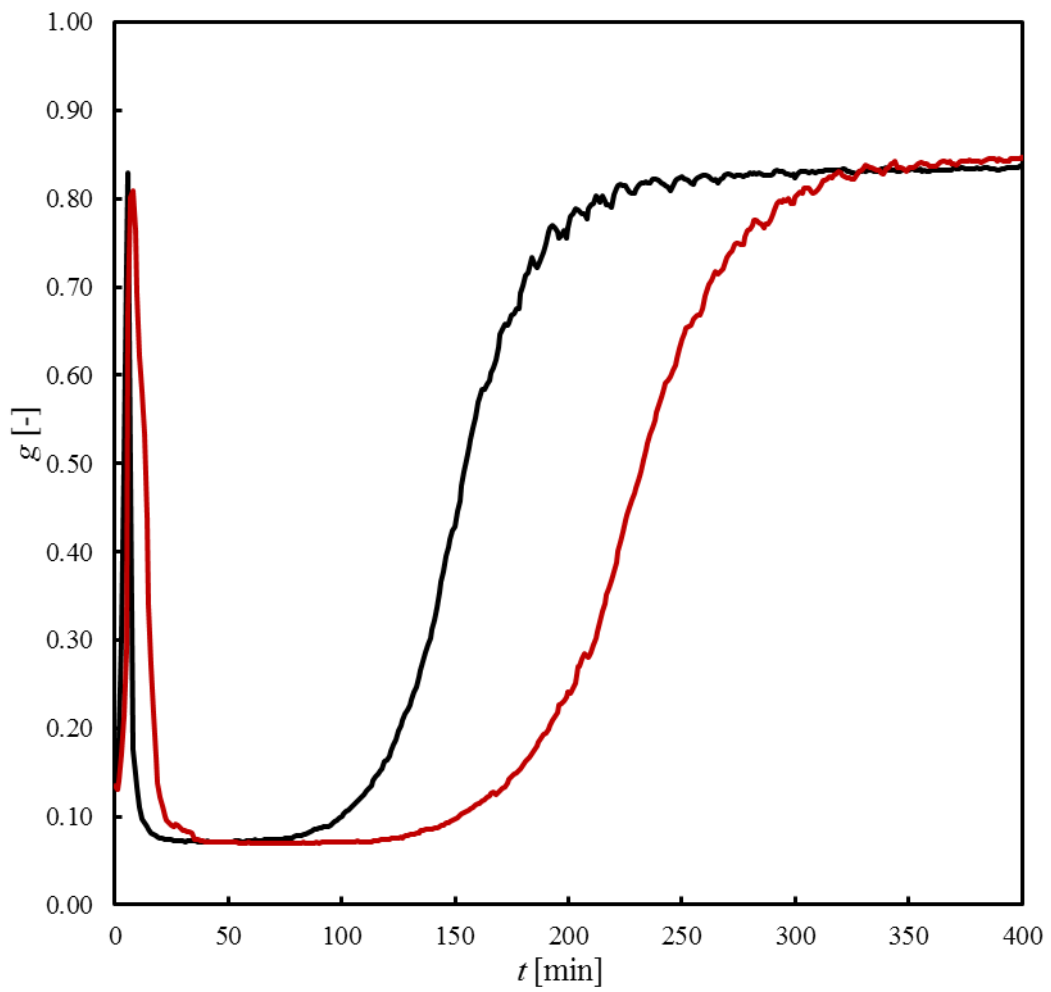


Fig. 4.6 Effect of loading amount of o/w emulsion on appearance change over time. — 1.00 ml (OPT 01), — 0.75 ml (OPT 02)

たりの scCO₂ との接触面積が増加したことが原因であると考えられる。すなわち、本実験のような低体比表面積の SFEE プロセスにおける律速段階は、scCO₂/水相間の物質移動であることが示唆された。これによって、スラグ流などの利用により体比表面積を向上させることで、EA 抽出速度の改善に一定の成果が得られていることが確認できた。

4.3.3 操作因子が物質移動速度に与える影響

本項では、複数の操作因子が溶媒抽出速度に与える影響を検討することで、SFEE プロセスの効率化を実現する手法を模索する。まず、使用する o/w エマルジョン中に含まれる EA 油滴径 (d_{oil}) が、抽出速度に与える影響を検討した (OPT 02-04)。o/w エマルジョンの作製において、攪拌時間を制御することで Fig. 4.7 のように d_{oil} の制御を行った。 d_{oil} が異なる o/w エマルジョンを用いて SFEE における相挙動の可視化を行った結果を Fig. 4.8 に示す。結果として、 d_{oil} が大きい条件において抽出速度が低下する傾向が見られた。

続いて、o/w エマルジョン内に存在する溶質が EA 抽出速度に与える影響を検討するために、SA を添加した o/w エマルジョンを作製し、SFEE の可視化を行った (OPT 05-06)。また、この際に界面活性剤種として Tween 80 と Tween 20 の 2 種を用い、その影響も検討した (OPT 07-08)。EA 抽出速度に対する SA 添加の影響を Fig. 4.9 に示し、界面活性剤種の影響を Fig. 4.10 に示す。結果として、SA の添加による EA 抽出速度の低下や、Tween 20 を利用することによる EA 抽出速度の向上が確認される。

一方で、上記の結果は、4.3.2 で得られた「scCO₂/水相間の物質移動が律速段階である」という結論と一見矛盾する。scCO₂/水相間の物質移動が十分に遅い条件においては、溶質の添加や界面活性剤の変更によって水/EA 相間の物質移動速度が変化しても、全体の物質移動速度に影響を与えないと考えられるためである。この現象は、一定量の CO₂ が溶解した後に EA の抽出が開始するというモデルを考えることで説明が可能となる。このモデルは Fig. 4.11 に示すように、(1) CO₂ の EA 相への溶解、(2) EA 相の膨潤による液相の安定性低下、(3) EA 相からの EA の抽出という物質移動が段階的に進行する。4.3.2 での検討から、(1) および (3) のにおける律速段階は scCO₂/水相間の物質移動であると考えられるが、(2) における液相の安定性低下までに要する時間は、溶質の存在や界面活性剤種に強く依存するため、EA 抽出速度に大きな違いが生じたと考えられる。すなわち、SFEE 法における汎用性の向上には、液滴の安定性が低下する液滴中の臨界 CO₂ 濃度の特定が重要であり、それに応じてプロセスを設計する必要がある。

4.3.4 ニューラルネットワークを利用した粒子径推定

前項までの検討により、SFEE 法における有機溶媒抽出速度を決定する因子は、scCO₂/水相間界面積と、使用物質に依存する液滴中の臨界 CO₂ 濃度であることが示唆された。一方で、o/w エマルジョン中に分散している有機溶媒中の CO₂ 濃度を、高压条件下で測定することは不可能であるため、臨界 CO₂ 濃度の特定は困難である。一方で、本章で用

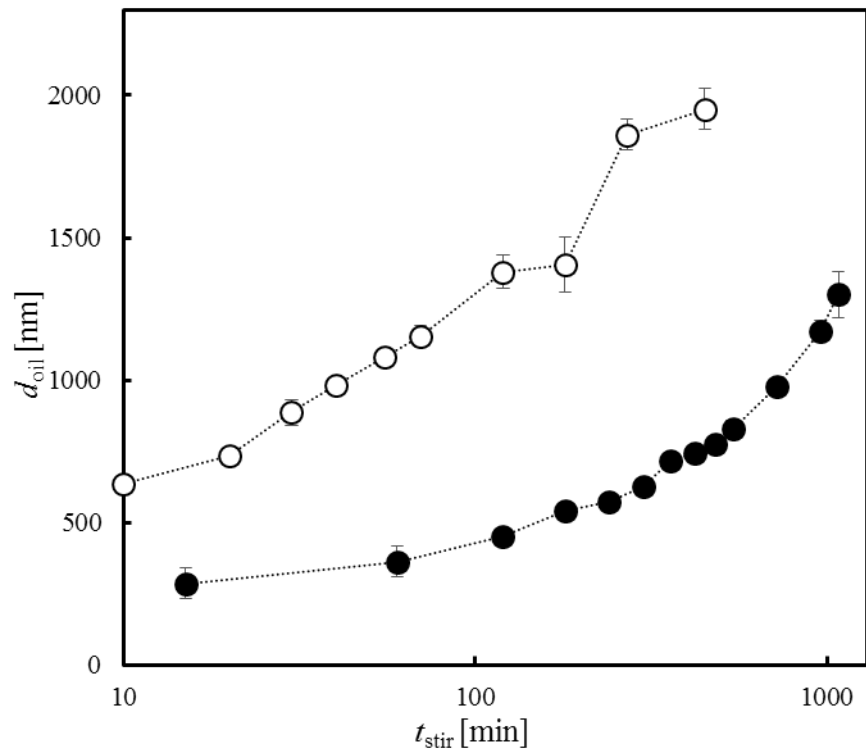


Fig. 4.7 Size control of o/w emulsion by stirring time. ● Tween 80 as surfactant, ○ Tween 20 as surfactant

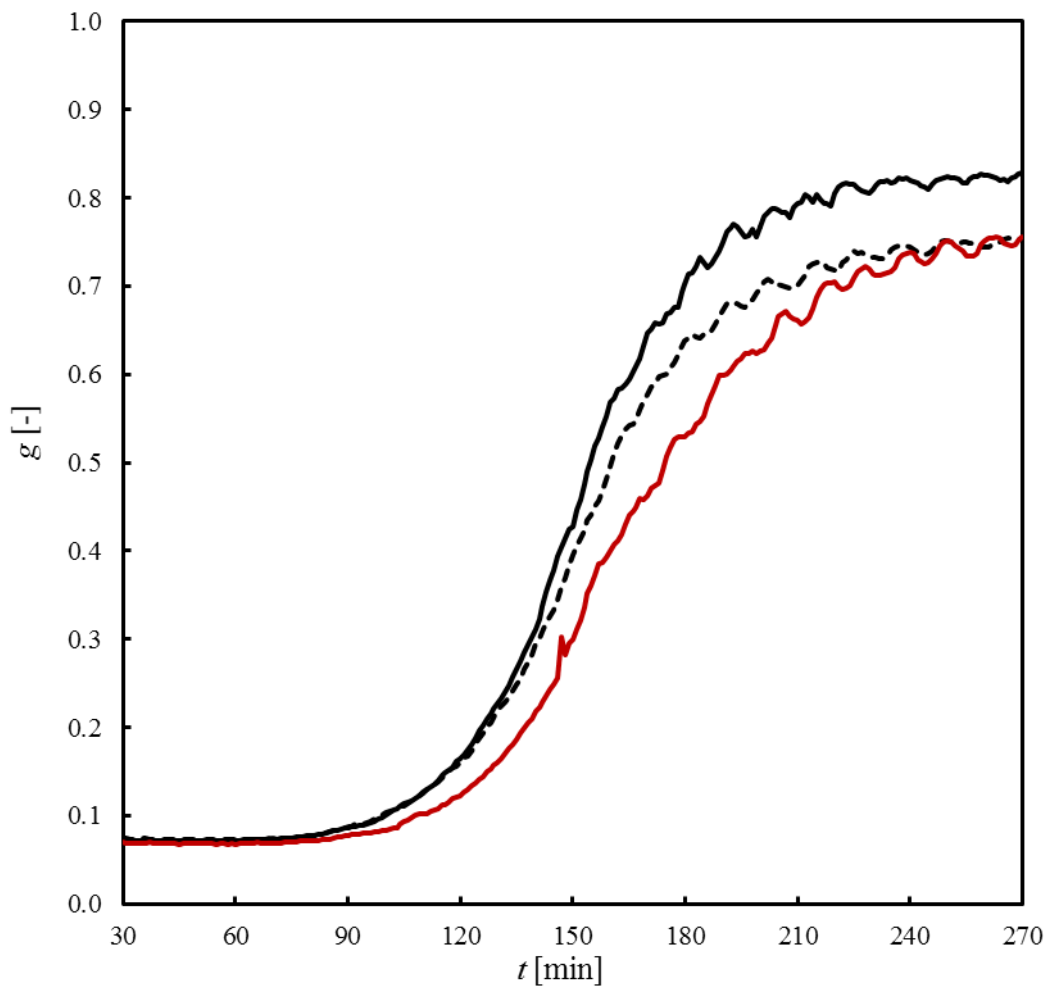


Fig. 4.8 Effect of droplet size in o/w emulsion on appearance change over time. — OPT 02 ($d_{oil} = 249.2$ nm), - - - OPT 03 ($d_{oil} = 776.0$ nm), — OPT 04 ($d_{oil} = 969.4$ nm)

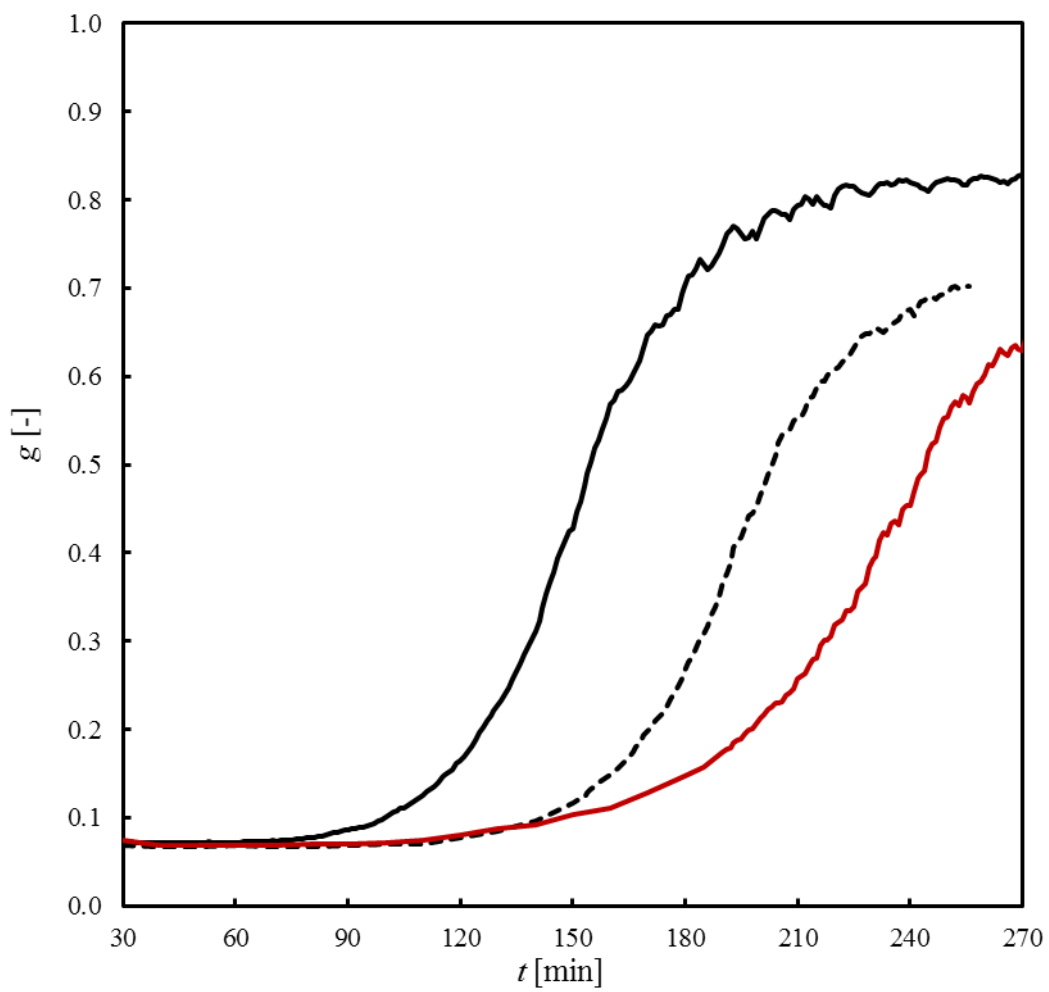


Fig. 4.9 Effect of salicylic acid on appearance change of o/w emulsion under SFEE. — OPT 02 ($C_{SA} = 0.0$ wt%), - - - OPT 05 ($C_{SA} = 0.5$ wt%), — OPT 06 ($C_{SA} = 1.0$ wt%)

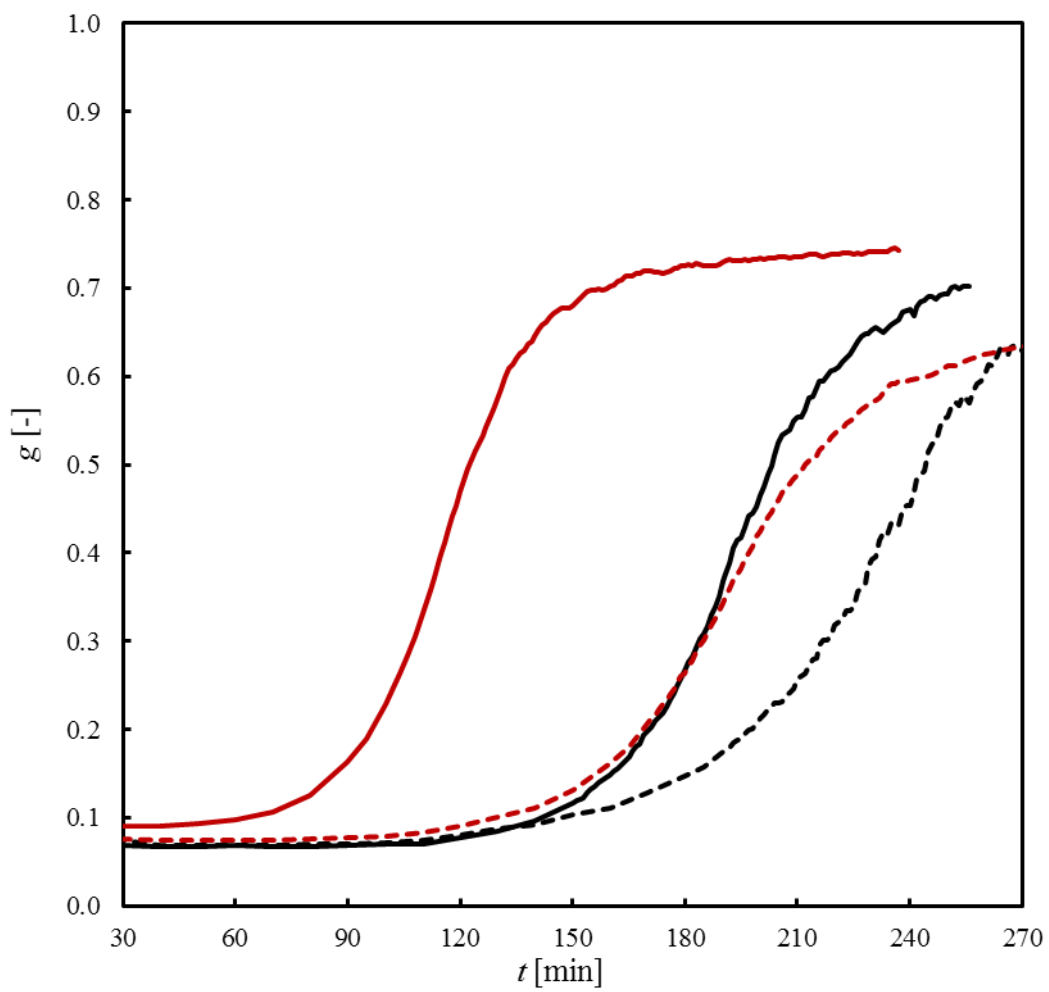


Fig. 4.10 Effect of surfactants on appearance change of o/w emulsion under SFEE. — OPT 02 (Tween 80, $C_{SA} = 0.5$ wt%), - - - OPT 05 (Tween 80, $C_{SA} = 1.0$ wt%), — OPT 06 (Tween 20, $C_{SA} = 0.5$ wt%), - - - OPT 05 (Tween 20, $C_{SA} = 1.0$ wt%)

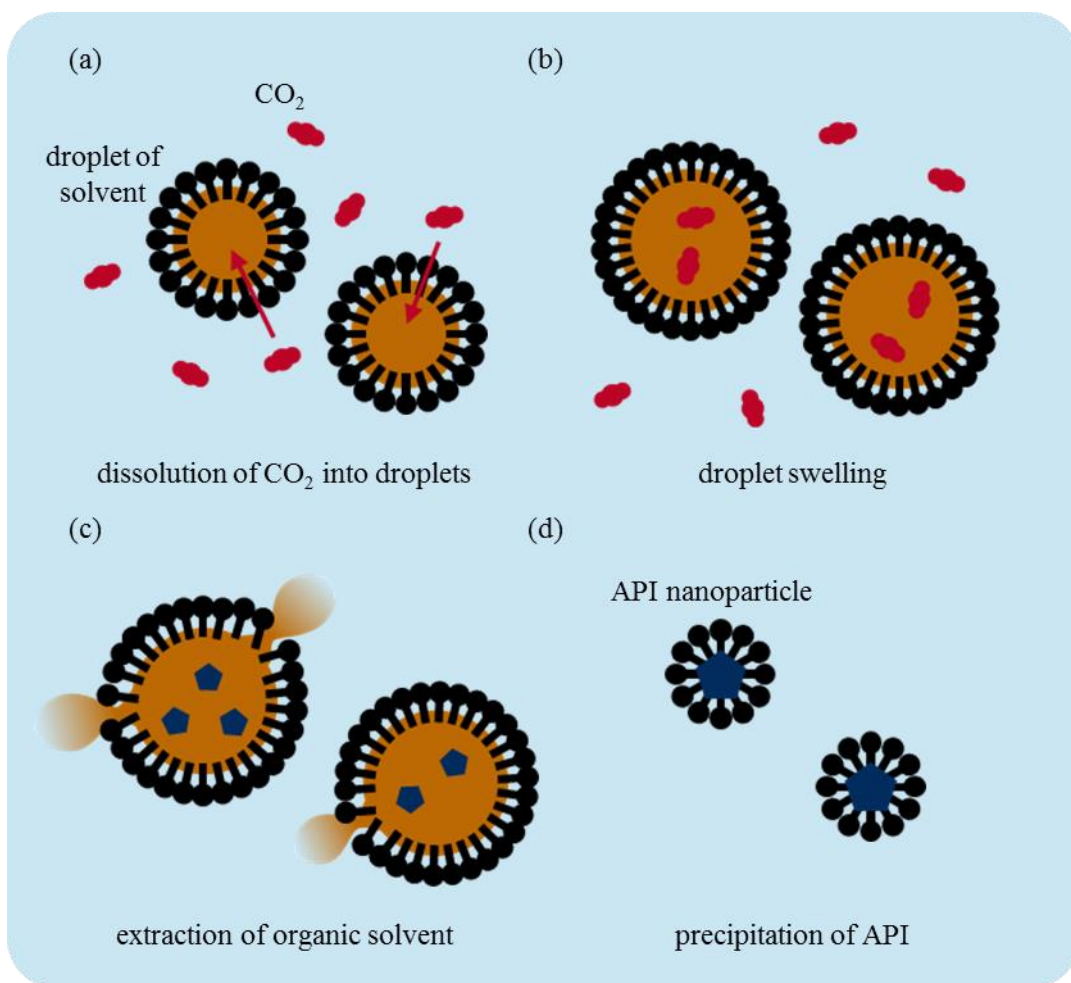


Fig. 4.11 Mechanism of solvent removal from o/w emulsion during SFEE

いている手法により、SFEE プロセス中における g が測定可能であるため、 g と有機溶媒相中の CO_2 濃度の間に関係性を見つかることができれば、臨界 CO_2 濃度の特定の手掛かりになると考えられる。本項では、 CO_2 の溶解に伴い有機溶媒相が膨張する性質に着目し、 g と液滴径の間の相関関係を、ニューラルネットワークにより求めた。

光の散乱は、溶液中に含まれる体積当たりの液滴の数 (N_{drop})、大きさ (d_{drop})、屈折率 (n_{drop}) により変化する。すなわち、これらの値が既知である o/w エマルションを用いて g の測定を行うことで、 g をこれら 3 つの値の関数として表現することが可能となる。今回は、異なる N_{drop} および d_{drop} を有する EA in water エマルションを用いて、 g の推定を試みた。 N_{drop} は、既知である d_{drop} と EA の体積分率 (v_{EA}) を用いて、式 (4.4) から算出した。

$$N_{\text{drop}} = \frac{v_{\text{EA}}}{\pi d_{\text{drop}}^3 / 6} \quad (4.4)$$

入力値として用いた EA in water エマルションの N_{drop} と d_{drop} の値を、Table 4.4 および Fig. 4.12 に示す。これらの値を入力値として相関を行ったところ、Fig. 4.13 の結果を得た。この時の平均相対誤差は、4.2% となり、精度の高い推算が行えていることがうかがえた。また、以下のような N_{drop} 、 d_{drop} 、 g の関係性を的確に表現できていることから、本手法による粒子径推算が可能であることが示唆される。

1. d_{drop} が大きくなるにつれて、 g が減少する。
2. 一方、 v_{EA} が一定の条件で d_{drop} が極端に大きくなると、 N_{drop} が減少するため g の値も減少する。
3. d_{drop} が 200 nm 前後で急激に光の散乱量が減少し、 g の値が上昇する。

今回の粒子径推定では、溶媒の屈折率が一定の条件でのみ推算を行ったが、異なる屈折率を有する溶媒を用いることで、さらに汎用性の高い粒子径推算モデルの構築が可能になると思われる。

4.4 本章のまとめ

本章では、以下の 4 点を目的として研究を行った。

1. 高圧 CO_2 雰囲気下における、 CO_2 の o/w エマルションへの溶解過程の物質移動解析
2. sc CO_2 雰囲気下における、有機溶媒の抽出過程における物質移動解析
3. 操作因子や使用物質が 2. や 3. の物質移動に与える影響の把握
4. 物質移動速度の定量評価方法の確立

その結果として、以下の成果を得た。

1. o/w エマルションと高圧 CO_2 の接触により、溶液の透明度に可逆的な変化が観察さ

Table 4.4 Properties of EA in water emulsion used for fitting by neural network

Run #	v_{EA} [vol%]	d_{drop} [nm]	N_{drop} [μm^{-3}]	g [-]
PCL 01	1.33	284.8	1.10	.302
PCL 02	1.33	485.7	0.22	.202
PCL 03	1.33	572.7	0.14	.202
PCL 04	1.33	1482.0	0.01	.341
PCL 05	1.88	273.4	1.76	.227
PCL 06	1.88	467.9	0.35	.149
PCL 07	1.88	616.4	0.15	.148
PCL 08	1.88	1162.1	0.02	.187
PCL 09	2.43	311.1	1.54	.151
PCL 10	2.43	468.2	0.45	.113
PCL 11	2.43	602.0	0.21	.128
PCL 12	2.43	903.2	0.06	.119
PCL 13	2.98	312.3	1.87	.107
PCL 14	2.98	450.0	0.63	.103
PCL 15	2.98	548.3	0.35	.110
PCL 16	2.98	718.5	0.15	.121
PCL 17	3.54	308.4	2.30	.103
PCL 18	3.54	400.5	1.05	.103
PCL 19	3.54	486.4	0.59	.086

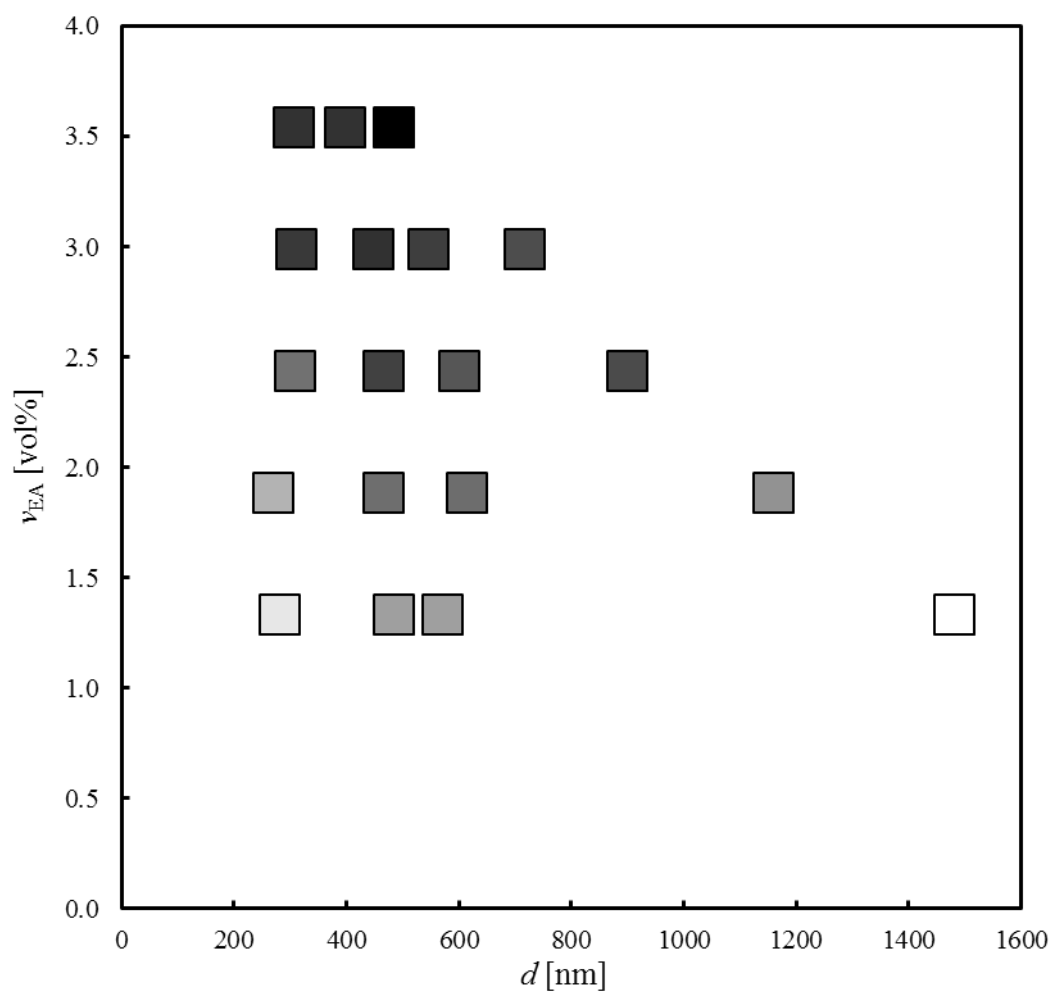


Fig. 4.12 Transparency of EA in water emulsion, size of droplets and volumetric fraction of EA (color of symbol correspond to its transparency)

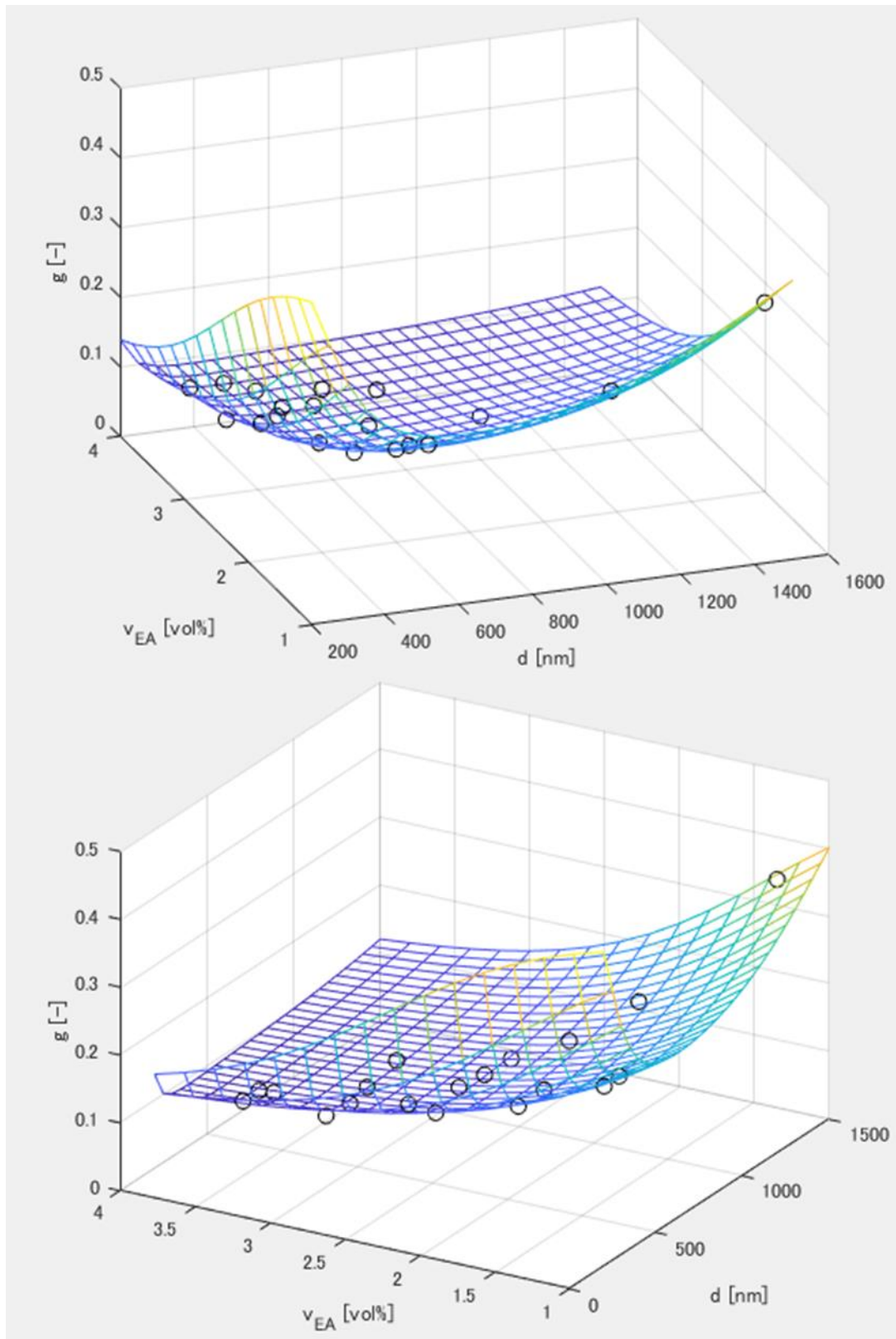


Fig. 4.13 3D plot of properties of EA in water emulsion and fitting results (from 2 different angles)

れた。

2. 1.の変化が、EA 相への CO_2 の溶解によって引き起こされることを明らかにし、この物質移動は比較的低速で進行することが示唆された。
3. o/w エマルションと sc CO_2 の接触により、溶液の透明度に不可逆的な変化が見られた。
4. 3.の変化が、抽出に伴う EA 相の消失によって引き起こされることを明らかにし、この物質移動の律速段階は sc CO_2 /水相界面であることを示した。
5. 上記の検討を踏まえ、SFEE 法では、 CO_2 の溶解、有機溶媒相の膨潤、有機溶媒相という順序で進行することを明らかとした。
6. 有機溶媒の抽出速度を見積もる手段として、ニューラルネットワークを利用したモデルにより o/w エマルションの透明度から粒子径を予測する手法を確立した。

第5章 親水性薬物内包リポソームの作製

5.1 研究目的

1976年に Gregoriadis らが DDS への利用を提唱して以来 [4, 85, 86], 生体適合性の高いリポソームは, 理想的な API キャリアとして長年研究され続けている. その結果, すでに複数のリポソーム型薬剤が FDA の認可を受け, 実用化に至っているが [90], その作製法にはまだ改善の余地がある. 2.1.2 で述べた通り, 従来のリポソーム製造法における問題点は, (1) 有機溶媒の大量の使用, (2) バッチ式製造に起因する低製造効率, (3) 薬物内包効率の低さ, (4) 粒子径制御性の低さなどが挙げられる [96, 116].

前章までに, scCO_2 を利用することで, 有機溶媒の使用量を低減したプロセスの提案ができることを示した. 加えて, scCO_2 はフロー型製造プロセスと相性がいいことから, これを併用することで大幅な製造効率の改善が期待できる. そこで本章では, scCO_2 を用いた新たなフロー型プロセスを提案することで, 従来法に代替するリポソーム製造法の確立を目指した. また, リポソーム製造手法を評価するにあたり, 内包効率や粒子径制御性も重要な指標となる. 本研究では, scCO_2 中に API 水溶液が分散した, w/CO_2 エマルジョンをテンプレートとしたリポソームの製造を行うことで, これらの改善を目指した.

以上から, 本章における研究目的を以下の3点とした.

1. scCO_2 を用いたフロー型プロセスにおける w/CO_2 エマルジョンの連続的な製造
2. 2. で作製した w/scCO_2 エマルジョンを利用した, フロー型リポソーム製造プロセスの提案
3. 3. のプロセスにおけるリポソームの性質制御性の獲得

5.2 実験操作

5.2.1 試料

リポソームの原料となるリン脂質として卵黄レシチン (LP, リン脂質含有率分率 98.0 % 以上), リン脂質を溶解するための共溶媒として ethanol (EtOH, 純度 99.5 % 以上), リポソームに内包する親水性 API として timolol maleate salt (TM, 純度 98.0 % 以上) を用いた. また, 内包効率の測定を行う際に, methanol (純度 99.8 % 以上) および acetic acid (純度 99.9 % 以上) を用いた. いずれの試薬も, 富士フィルム和光純薬株式会社から購入した.

5.2.2 Water in supercritical CO₂ エマルション作製

Figure 5.1 には、w/CO₂ エマルションの連続作製を行った装置を示す。装置上流から供給された CO₂ を、冷却器によって 268 K に冷却することで液化したのちに、CO₂ 用ポンプ (PU-4386, 日本分光株式会社製) によって加圧した。系内の圧力は、ポンプ直後に取り付けられた背圧弁 (26-1700 Series, テスコム電機株式会社製) によって、10.0 MPa に設定した。同時に、液相用ポンプ (PU-2080, 日本分光株式会社製) によって、LP を 0.1–0.5 wt% 溶解させた EA もしくは EtOH を、0.100–0.280 ml min⁻¹ の範囲で定流量送液した。T 字結合子により、CO₂ と EtOH を混合し、二相は恒温水槽内で 313.0 K まで昇温されることで、均一な超臨界相を形成した (Fig. 5.2 (a))。また、異なる液相用ポンプにより、0.5 wt% 濃度に調製された TM 水溶液を 0.005–0.015 ml min⁻¹ の範囲で定流量送液した。超臨界相と TM 水溶液は、恒温水槽内に設置されたマイクロミキサー (4-1/16YSM-0.8-0.5-S, 株式会社杉山商事製) 内で連続的に混合され、これにより w/CO₂ エマルションが形成された (Fig. 5.2 (b))。形成された w/CO₂ エマルションは、下流の耐圧可視セル (耐圧硝子工業株式会社製) 内に滞留し、ここで視覚的な観察が行われた。耐圧可視セルから流出した超臨界相は、微量調整バルブを通して減圧された。減圧後の CO₂ 流量は、1000 ml min⁻¹ となるように制御した。圧力の測定は、系内に取り付けられた圧力計によって行われ、CO₂ 流量の測定は、液相トラップと吸湿剤に接続された乾式流速計 (GF1010, ジーエルサイエンス株式会社) によって行った。

5.2.3 リポソームの作製

リポソームの作製は、w/CO₂ エマルションの作製と同様の条件にて、Fig. 5.1 の装置内で行った。w/CO₂ エマルションの作製と同時に、別の液相用ポンプにより水相を 0.100 ml min⁻¹ で定流量送液した。この水相は、T 字結合子において w/CO₂ エマルションと混合され、マイクロ流路内 (内径 500 μm, 流路長 2.0 m) でスラグ流を形成した。スラグ流内部において、w/CO₂ エマルション中の液滴は水相へと取り込まれ、リポソームが形成された (Fig. 5.2 (c))。

リポソームの作製は、EA と EtOH の 2 種類の共溶媒を用いて行った。それぞれの共溶媒を用いた時の作製条件を Table 5.1, Table 5.2 に示す。

5.2.4 作製リポソーム評価

作製したリポソームの粒子径は、3.2.6 と同様に DLS にて評価し、その形状は透過型電子顕微鏡 (transmission electron microscope: TEM, H-7650 Zero.A, 株式会社日立ハイテクノロジー製) にて観察された。TEM によるリポソームの観察は、ネガティブ染色法により行った。また、リポソームへの薬物内包効率 (eff_{Lip}) を測定するために、透析によるリポソームの分離と、溶液中の高速液体クロマトグラフ (high performance liquid chromatography: HPLC) による TM の濃度測定を行った。透析膜には、Float-A-Lyzer® G2

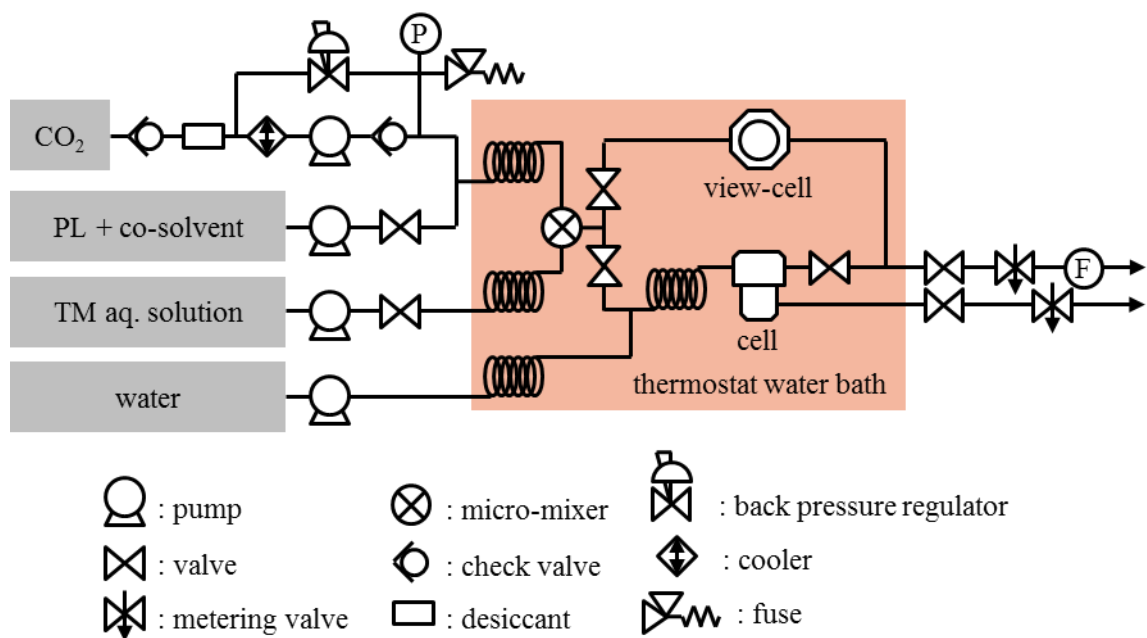


Fig. 5.1 Schematic diagram of experimental apparatus for flow production of w/scCO₂ emulsion and liposome

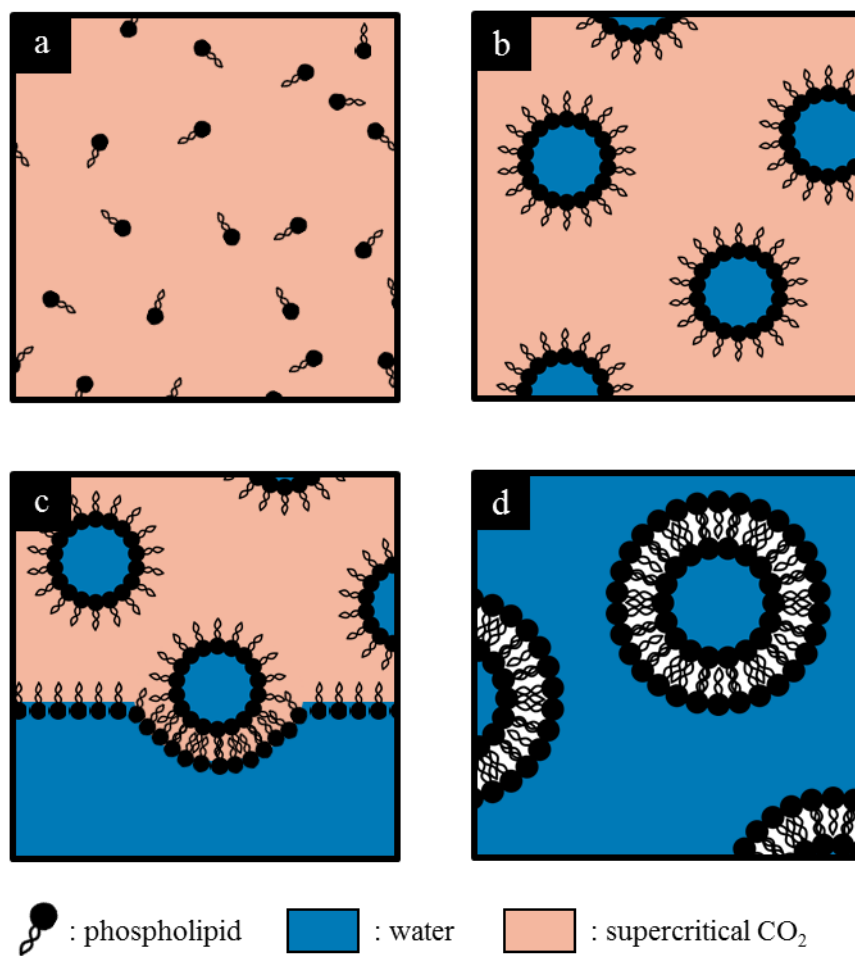


Fig. 5.2 Mechanism of liposome formation in this study. (a) dissolution of phospholipid into scCO₂, (b) formation of w/CO₂ emulsion, (c) formation of liposome at phase interface between emulsion and water, (d) liposome

Table 5.1 Experimental conditions and results of liposome production (EA as co-solvent)

Run #	C_{LP} [wt%]	Q_{LP} [ml min ⁻¹]	$d \pm \sigma$ [nm]	eff_{Lip} [%]
LP-EA 01	0.10	0.100	124.5 \pm 3.3	22.1
LP-EA 02	0.10	0.140	122.9 \pm 1.2	42.6
LP-EA 03	0.10	0.200	121.6 \pm 1.7	19.5
LP-EA 04	0.30	0.100	125.8 \pm 3.7	4.2
LP-EA 05	0.30	0.140	118.4 \pm 0.5	14.5
LP-EA 06	0.30	0.160	130.7 \pm 0.4	1.1
LP-EA 07	0.30	0.180	134.8 \pm 6.0	0.4
LP-EA 08	0.30	0.200	118.8 \pm 3.9	7.5
LP-EA 09	0.30	0.240	121.0 \pm 3.4	3.2
LP-EA 10	0.30	0.280	122.2 \pm 0.9	15.7
LP-EA 11	0.50	0.100	124.5 \pm 4.5	11.0
LP-EA 12	0.50	0.140	118.8 \pm 1.9	37.8
LP-EA 13	0.50	0.200	120.9 \pm 6.0	9.2

Table 5.2 Experimental conditions and results of liposome production (EtOH as co-solvent)

Run #	C_{LP} [wt%]	Q_{LP} [ml min ⁻¹]	$d \pm \sigma$ [nm]	eff_{Lip} [%]
LP-ET 01	0.10	0.140	80.1 ± 7.4	48.3
LP-ET 02	0.10	0.160	234.2 ± 2.8	47.4
LP-ET 03	0.10	0.180	407.8 ± 77.5	53.0
LP-ET 04	0.10	0.200	196.6 ± 13.9	28.9
LP-ET 05	0.10	0.220	3311.3 ± 269.2	64.5
LP-ET 06	0.10	0.240	3030.0 ± 1060.7	82.9
LP-ET 07	0.10	0.260	3335.3 ± 691.1	70.3
LP-ET 08	0.30	0.140	126.8 ± 36.7	43.9
LP-ET 09	0.30	0.160	197.9 ± 41.6	55.3
LP-ET 10	0.30	0.180	252.9 ± 37.6	55.9
LP-ET 11	0.30	0.200	857.0 ± 58.3	50.5
LP-ET 12	0.30	0.220	1533.5 ± 137.4	63.1
LP-ET 13	0.30	0.240	2300.4 ± 272.9	58.8
LP-ET 14	0.50	0.140	131.6 ± 9.3	51.5
LP-ET 15	0.50	0.160	222.8 ± 8.9	62.6
LP-ET 16	0.50	0.180	204.6 ± 3.7	51.9
LP-ET 17	0.50	0.200	270.4 ± 44.5	69.5
LP-ET 18	0.50	0.220	2776.7 ± 234.2	82.2
LP-ET 19	0.50	0.240	3333.9 ± 398.4	73.0
LP-ET 20	0.50	0.260	3557.1 ± 291.1	71.5

(G235073, Spectrum Laboratories, Inc.製) を使用し, 10 時間の透析でリポソームと TM が分離できることを確認した (Fig. 5.3). HPLC 分析では, 0.2 % 酢酸水溶液と methanol の重量比 7:3 混合物を移動相として用い, Unifinepak C18 (03100-3M, 内径 3.0 mm, 長さ 100 mm, 日本分光株式会社製) をカラムとして, 273 nm の波長で TM の検出を行った. この際に使用した機器は, ポンプ (PU-4580), 恒温槽 (CO-4060), 紫外分光光度計 (UV-4570) で, いずれも日本分光株式会社より購入した.

5.3 結果と考察

5.3.1 Water in supercritical CO₂ エマルション作製

リポソームの作製に先立ち, マイクロミキサーを用いた w/CO₂ エマルションの連続的な形成を確認するために, scCO₂ 相と API 水溶液をマイクロミキサーで混合後に耐圧可視セル内に滞留させ, その様子を確認した. 観察された w/CO₂ エマルションを Fig. 5.4 に示す. w/scCO₂ エマルション中には, 数百 nm 程度の API 水溶液の液滴が分散していると考えられるが, 耐圧可視セル内には, scCO₂ 相と水相の他に懸濁した相が見られた. この相は, scCO₂ 相よりも重く, 水相よりも軽いことから, w/CO₂ エマルションであると考えられる. すなわち, マイクロミキサーを用いることで, w/CO₂ エマルションの連続的な形成に成功した.

5.3.2 リポソームの作製

前項の検討により, w/CO₂ エマルションの作製が可能であることが示されたため, w/CO₂ エマルションと水相の接触によるリポソームの作製に取り組んだ. 作製された溶液は Fig. 5.5 のような透明もしくは半透明となり, レーザー光を当てることによってチンダル現象が観測されたうえ, 粒子径測定の結果, Fig. 5.6 のような単分散のピークが観測された. これらの結果から, 本手法によるナノ粒子の形成が示唆された.

以上の測定に加え, TEM を用いたナノ粒子の直接的な観察も行った. 観察された TEM 像を Fig. 5.7 に示す. 100–1000 nm 前後のリポソームと思われる球体状の構造体が多くみられ, TEM 像の解析から得られる粒子径分布は DLS による粒子径測定結果とおおむね一致した. 1000 nm を超える大型のリポソームには, 表面に亀裂のようなものが見られることがあったが, これは TEM 撮影時の乾燥工程における構造の破壊に起因すると思われる. 以上の検討から, 新たに提案したフロー型プロセスにより, リポソームの製造が可能であることが示唆された.

5.3.3 リポソームの性質制御

前項までに, リポソームの作製が可能であることが示された. 一方, 実用的なリポソームにおいては, その性質の制御が重要であり, 特に粒子径制御は高度な DDS を設計

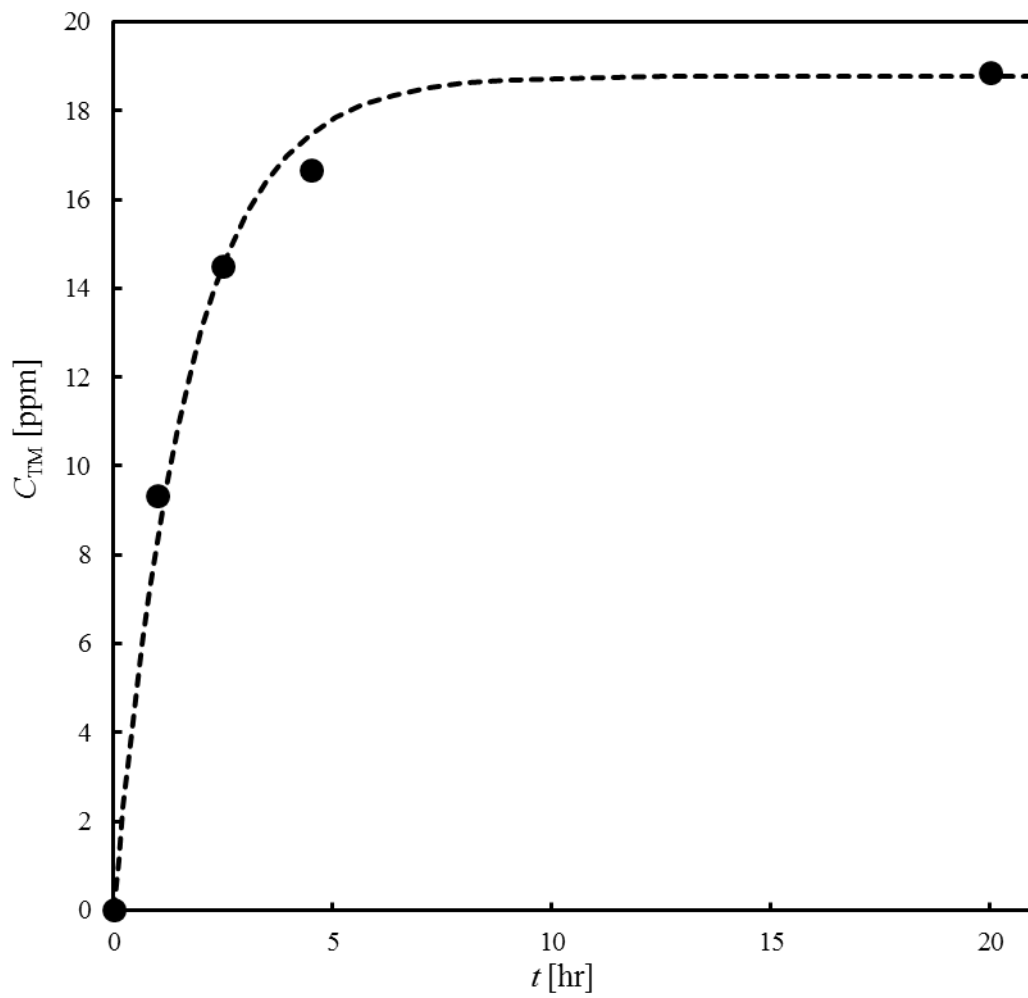


Fig. 5.3 TM concentration separated from liposome solution by dialysis. ● experimental results, --- fitting by $C_{TM} = A(1 - e^{-kt})$

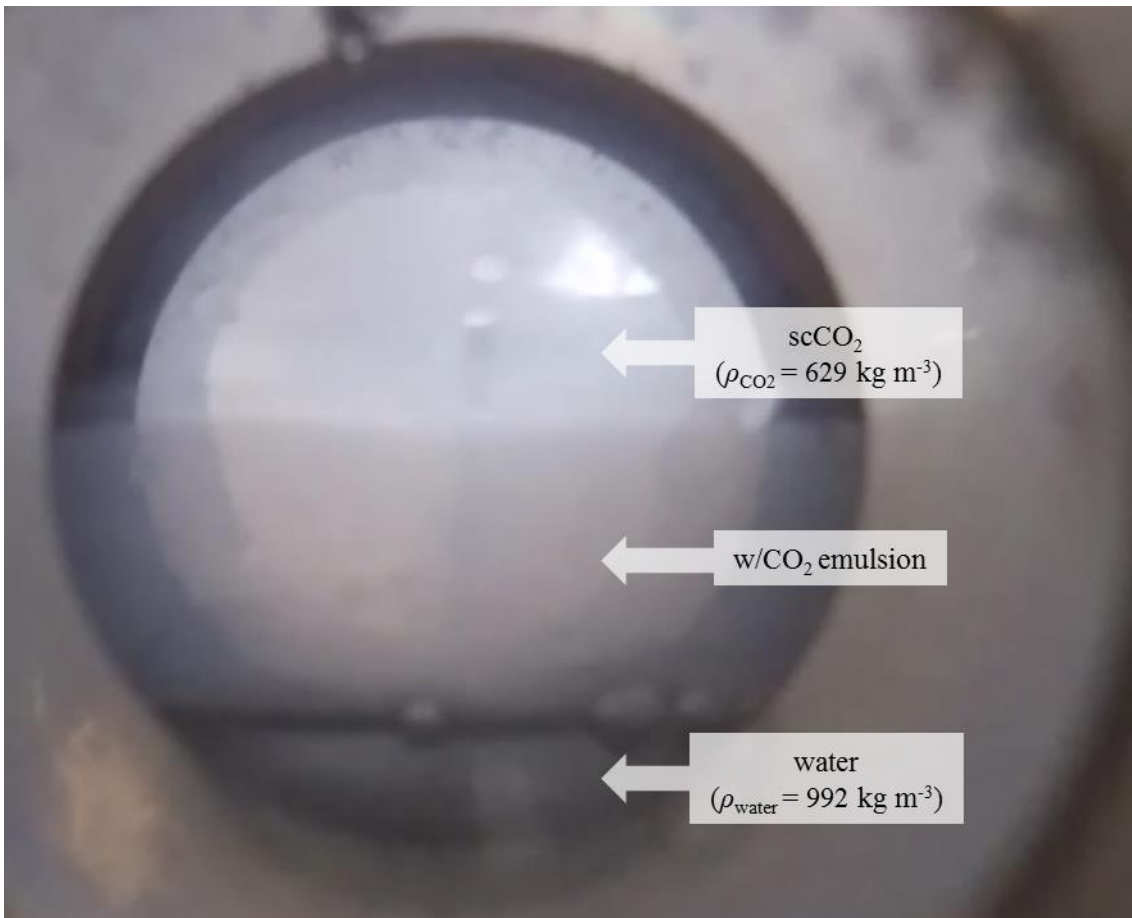


Fig. 5.4 w/CO₂ emulsion observed in high-pressure view cell

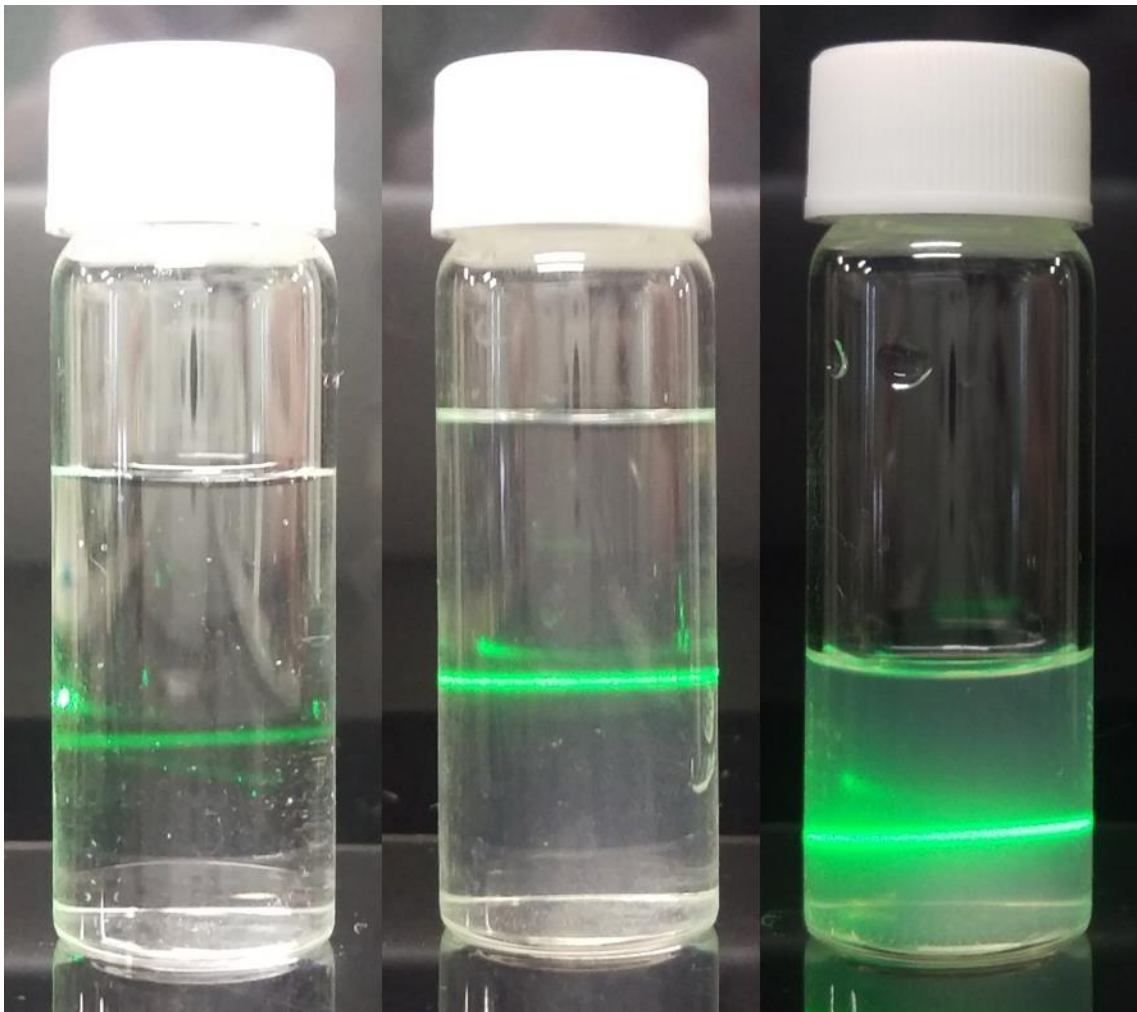


Fig. 5.5 Typical appearance of prepared liposome dispersed solution

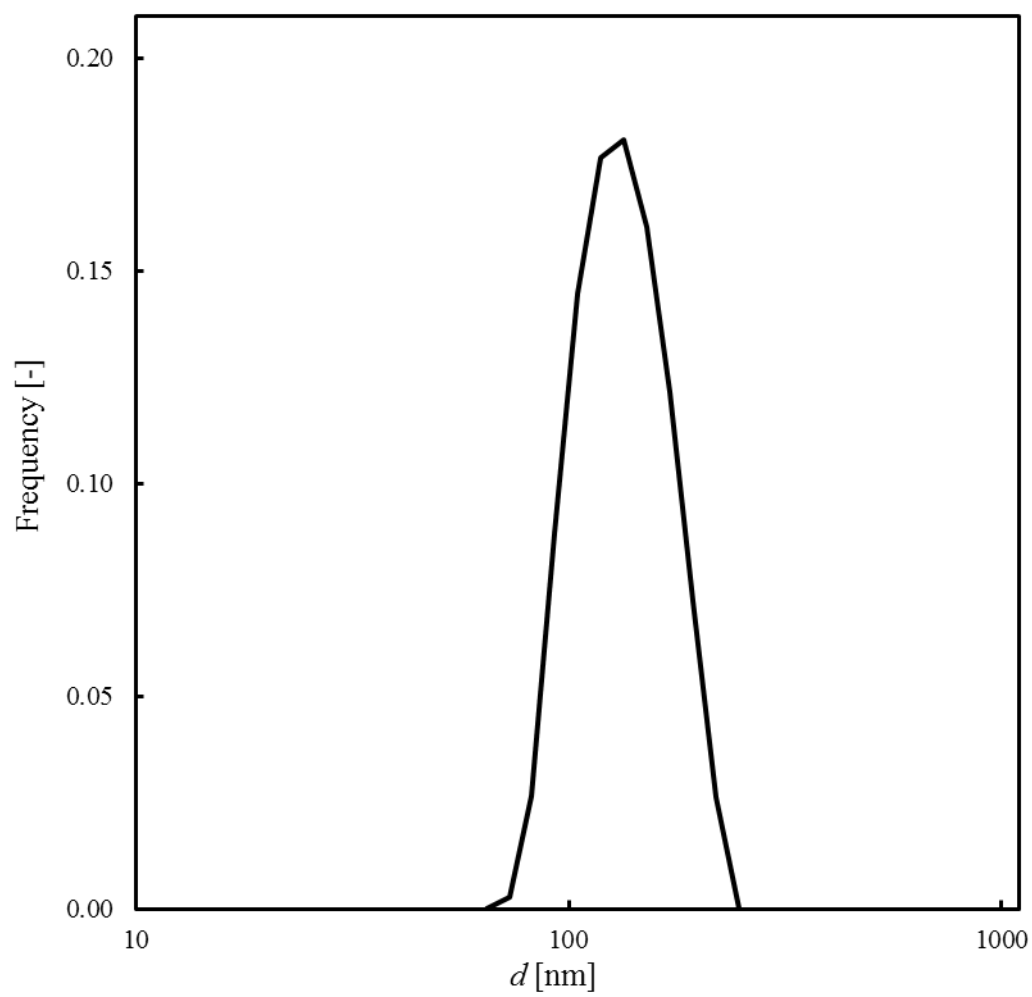


Fig. 5.6 Typical result of particle size measurement of fabricated liposome (LP-EA 01)

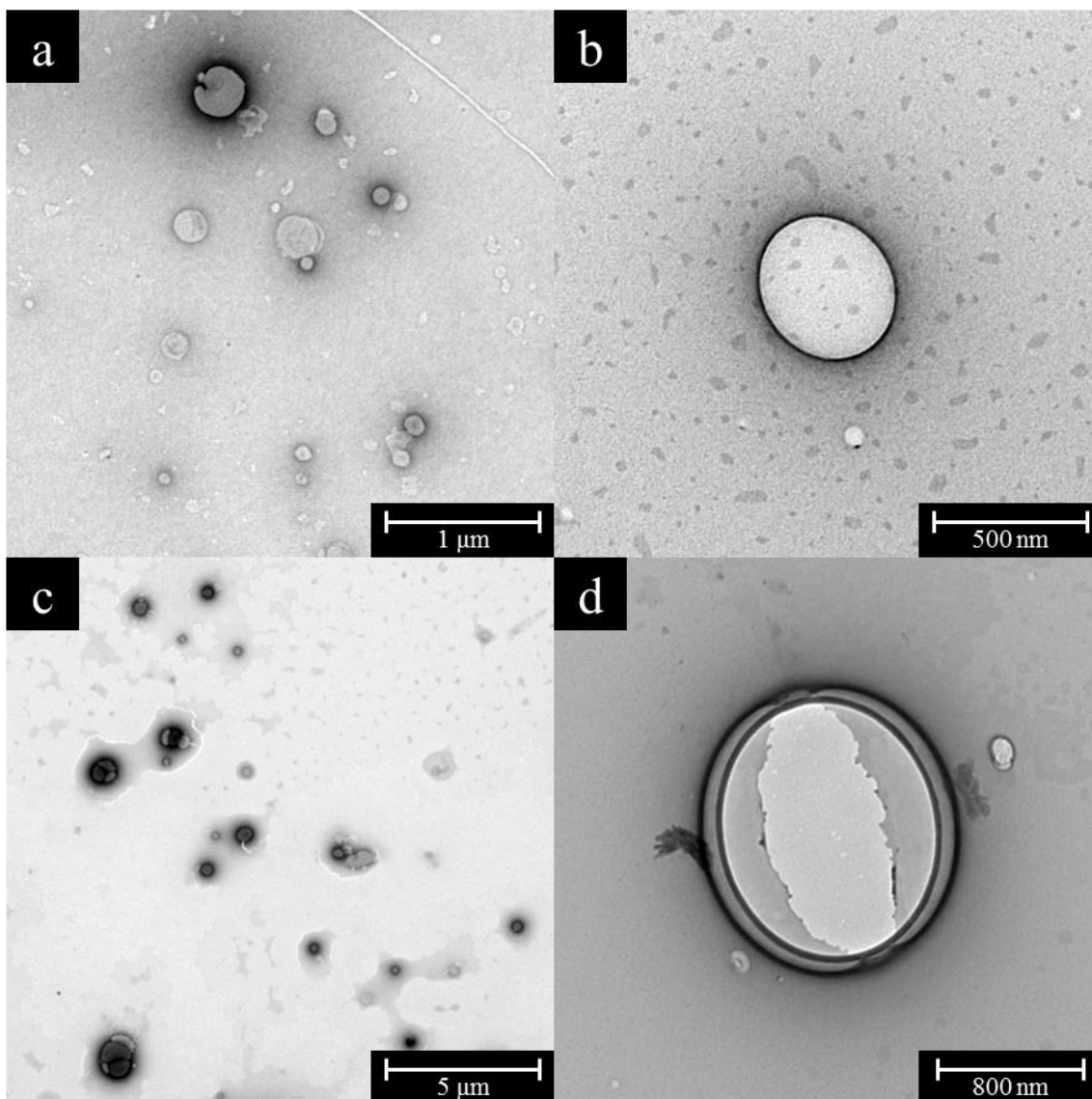


Fig. 5.7 TEM image of liposome produced in this study. (a) and (b) LP-ET 18, (c) and (d) LP-ET 19

する際に欠かせない。本項では、リポソーム作製条件を変えることで、粒子径を始めとするリポソームの性質の制御について検討した。

まず、EA を共溶媒として用いる際に、EA/LP 溶液の流量 (Q_{LP}) および溶液中の LP 濃度 (C_{LP}) がリポソームに与える影響を検討した (LP-EA01-13)。得られた粒子の粒子径 (d) 測定結果を Fig. 5.8 に示し、そのリポソーム作製における内包効率 (eff_{Lip}) 測定結果を Fig. 5.9 に示す。 d は、いずれの条件においても 120 nm でほぼ一定であり、 eff_{Lip} はほとんどの条件において 30%を下回った。粒子径測定結果より、プロセスの再現性が高いことは確認できたが、リポソームの性質制御の実現はできなかった。また、 eff_{Lip} が従来法と同程度であることから、更なる eff_{Lip} の向上が必要となる。

続いて、共溶媒を EtOH に変更して同様の検討を行うことで、これらの結果がどのように変化するかを確認した (LP-EtOH 01-20)。作製されたリポソームにおける d の値を Fig. 5.10 に示し、 eff_{Lip} の値を Fig. 5.11 に示す。結果から、いずれの C_{LP} においても、 Q_{LP} を変化させることで、リポソームの粒子径が 100 nm 程度から 3000 nm 程度まで制御可能であることが明らかとなった。 Q_{LP} による粒子径の向上は、系内に溶解している EtOH の量により、流体の粘度が向上したためであると考えられる。粘度の増加に伴い、w/CO₂ エマルション内の液滴径も大きくなるため、 d の値にも増加傾向が見られた。また、 eff_{Lip} の値も 45-85%と既往の手法と比較して高い値が得られた。

以上の結果から、EtOH を共溶媒として用いたフロー型リポソーム製造プロセスにおいて、粒子径制御性の獲得と高い内包効率の実現を達成した。

5.4 本章のまとめ

本章では、以下の 4 点を目的として研究を行った。

1. scCO₂を用いたフロー型プロセスにおける w/scCO₂ エマルションの連続的な製造
 2. 1.で作製した w/scCO₂ エマルションを利用した、フロー型リポソーム製造プロセスの提案
 3. 2.のプロセスにおけるリポソームの性質制御性の獲得
- その結果として、以下の成果を得た。
1. マイクロミキサーを用いたフロー型プロセスにより、w/CO₂ エマルションの連続的な形成に成功した。
 2. w/CO₂ エマルションと水相をスラグ流内で接触させることにより、リポソームの作製に成功した。
 3. 上記のリポソーム作製プロセスにおいて、共溶媒を ethanol とすることで、粒子径制御性の獲得と高い内包効率の実現を達成した。

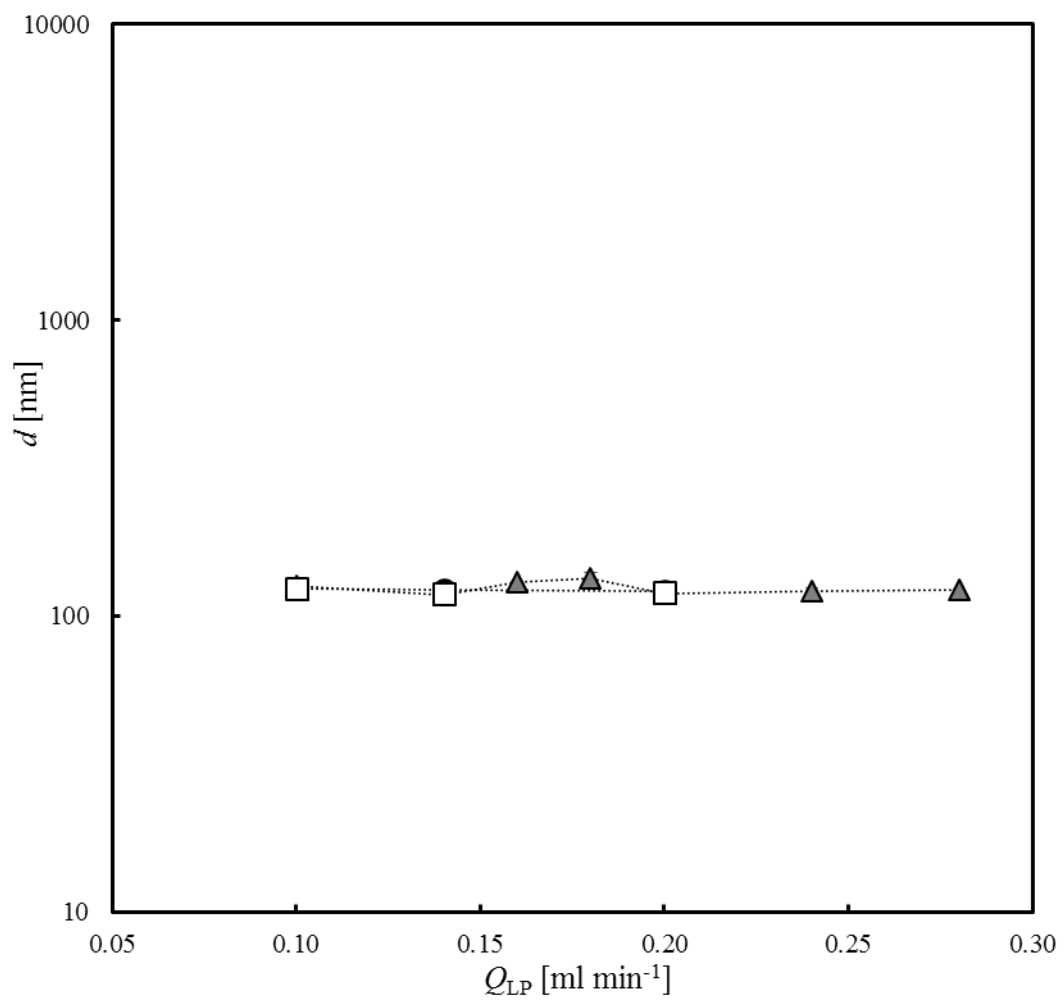


Fig. 5.8 Effect of LP/EA flow rate on liposome size. ● $C_{LP} = 0.1$ wt%, ▲ $C_{LP} = 0.3$ wt%, □ $C_{LP} = 0.5$ wt%

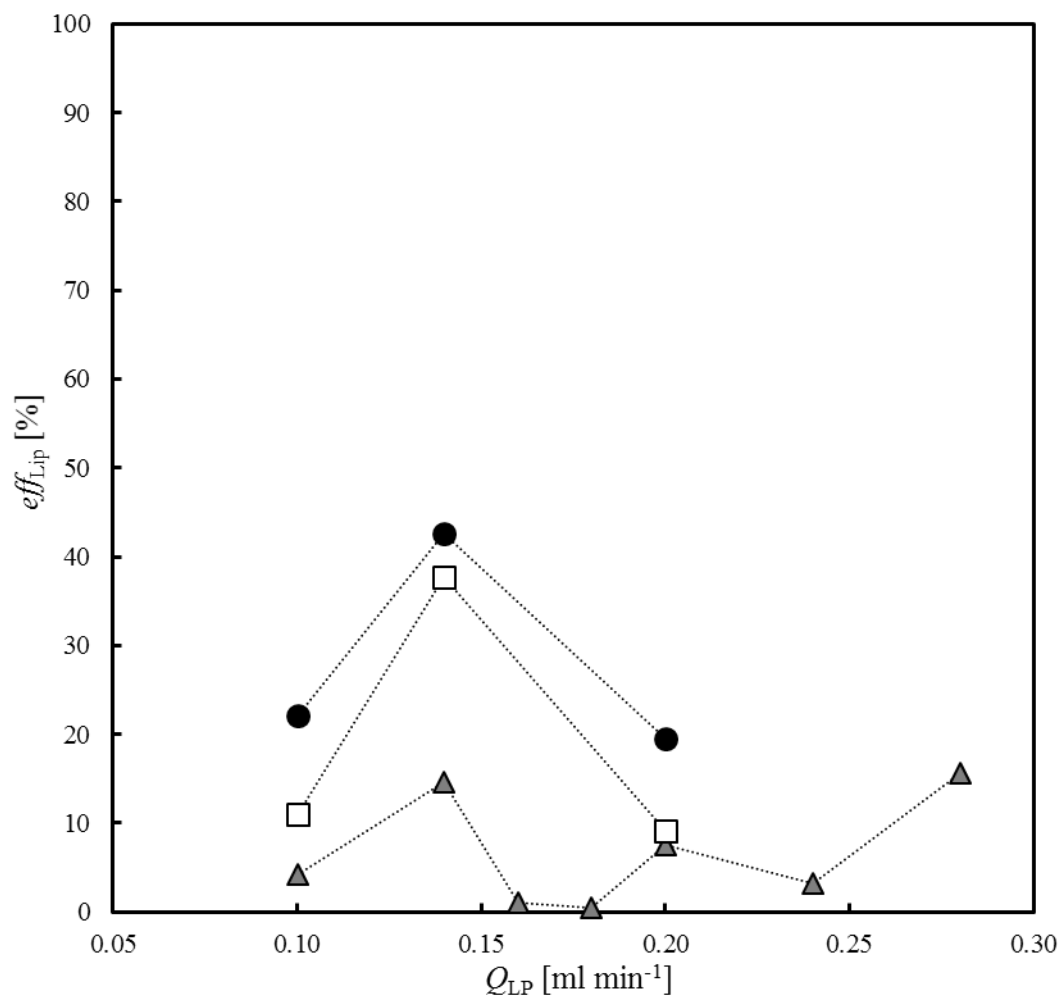


Fig. 5.9 Effect of LP/EA flow rate on encapsulation efficiency. ● $C_{LP} = 0.1$ wt%, ▲ $C_{LP} = 0.3$ wt%, □ $C_{LP} = 0.5$ wt%

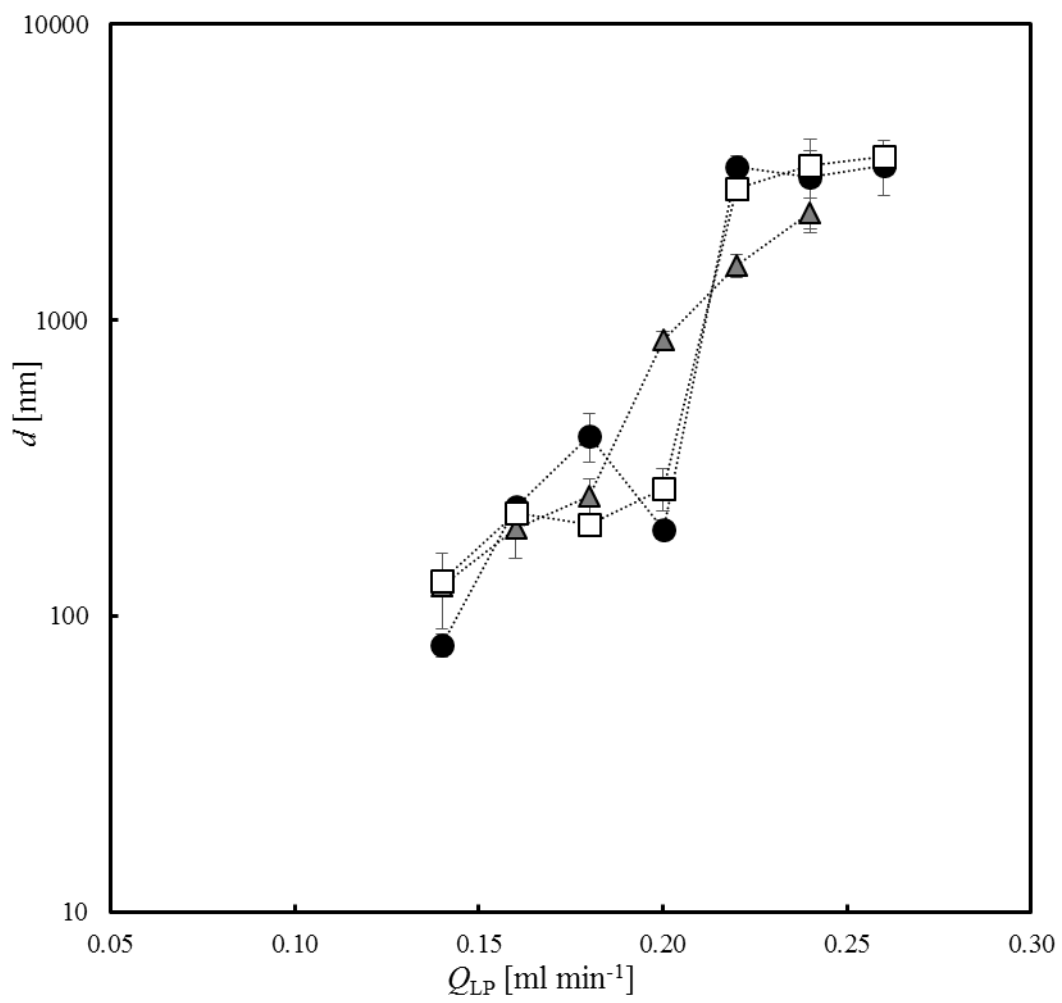


Fig. 5.10 Effect of LP/EtOH flow rate on liposome size. ● $C_{LP} = 0.1$ wt%, ▲ $C_{LP} = 0.3$ wt%, □ $C_{LP} = 0.5$ wt%

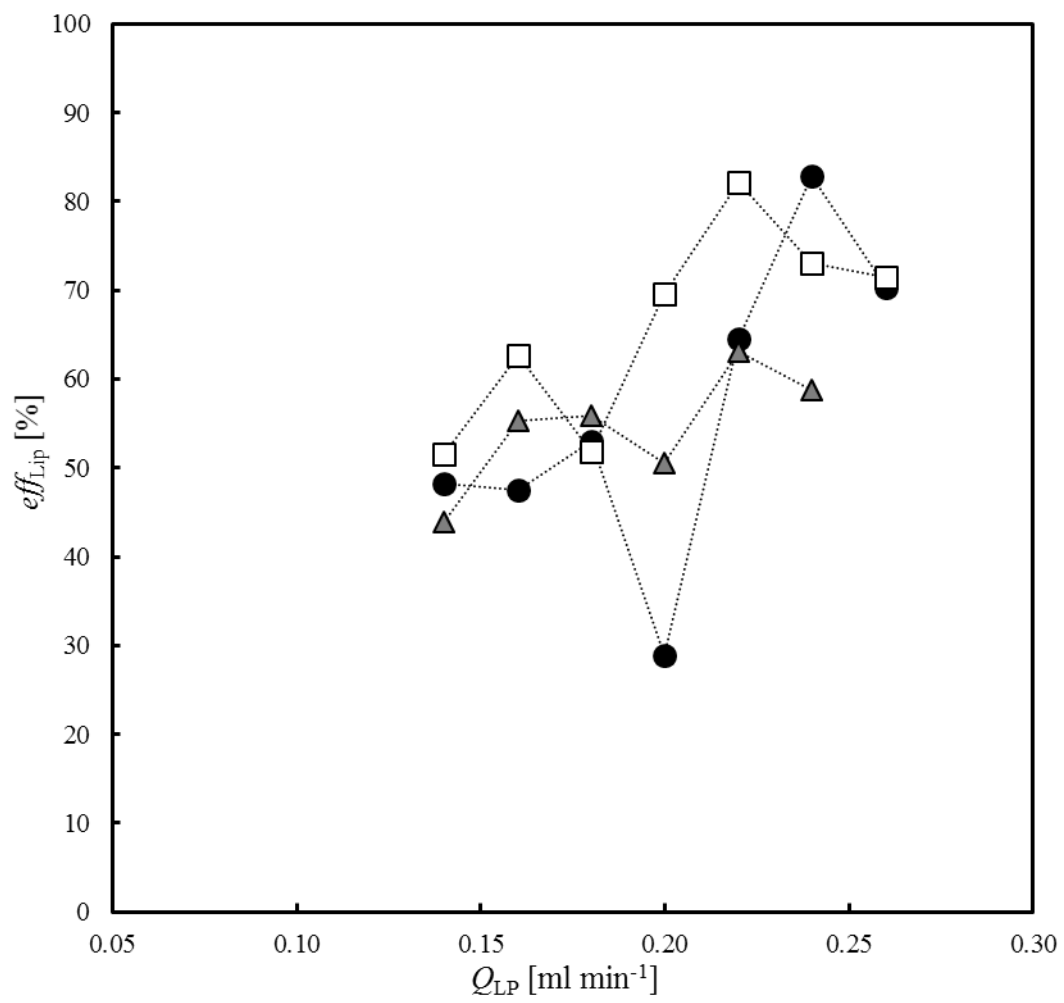


Fig. 5.11 Effect of LP/EtOH flow rate on encapsulation efficiency. ● $C_{LP} = 0.1$ wt%, ▲ $C_{LP} = 0.3$ wt%, □ $C_{LP} = 0.5$ wt%

第6章 結言

本研究では、フロー型製剤化技術において超臨界二酸化炭素を用いることで、従来よりも製造効率、性質制御性、安全性に優れたプロセスの提案を行った。以下では、本研究で得られた成果について示す。

マイクロ流路内のスラグ流を利用した超臨界エマルジョン抽出 (SFEE) 法において、疎水性 API のナノ粒子化およびその機能化が可能であるかを検討した (第3章)。その成果として、以下が得られた。

1. 高压条件下において、scCO₂ と水を T 字結合しで混合することで、スラグ流が連続的に形成できることを示した。
2. 1.において、スラグ流の長さは、水/scCO₂ の体積比によって制御できることを示した。
3. マイクロ流路内のスラグ流を利用したフロー型 SFEE プロセスにおいて、抽出条件を制御することで有機溶媒の抽出が効率的に行えることを示した。
4. 3.において、物質移動の律速段階は有機溶媒相から水相への物質移動であり、界面活性剤種と CO₂ との親和性がこの物質移動に大きく影響することが確認された。
5. フロー型 SFEE プロセスにおいて、ibuprofen を疎水性 API として利用することで、50–300 nm 程度の粒子が作製可能であることを示した。
6. scCO₂ 雰囲気下において、chitosan の水への溶解が可能であることを示し、この溶解性を利用して微粒子の表面修飾が可能であることを示した。また、これにより粒子表面を正に帯電させることに成功した。

上記の SFEE プロセスの設計指針を確立するために、耐圧可視セル内で相挙動の観察を行い、プロセスにおける物質移動メカニズムや操作因子の影響について検討した (第4章)。その成果として、以下が得られた。

1. o/w エマルジョンと高压 CO₂ の接触により、溶液の透明度に可逆的な変化が観察された。
2. 1.の変化が、EA 相への CO₂ の溶解によって引き起こされることを明らかにし、この物質移動は比較的低速で進行することが示唆された。
3. o/w エマルジョンと scCO₂ の接触により、溶液の透明度に不可逆的な変化が見られた。
4. 3.の変化が、抽出に伴う EA 相の消失によって引き起こされることを明らかにし、この物質移動の律速段階は scCO₂/水相界面であることを示した。
5. 上記の検討を踏まえ、SFEE 法では、CO₂ の溶解、有機溶媒相の膨潤、有機溶媒相という順序で進行することを明らかとした。
6. 有機溶媒の抽出速度を見積もる手段として、ニューラルネットワークを利用したモデルにより o/w エマルジョンの透明度から粒子径を予測する手法を確立した。

最後に、超臨界二酸化炭素を用いた新たなフロー型プロセスにより、親水性 API を内包したリポソームの製造およびその性質制御がについて検討した（第 5 章）。その成果として、以下が得られた。

1. マイクロミキサーを用いたフロー型プロセスにより、w/CO₂ エマルジョンの連続的な形成に成功した。
2. w/CO₂ エマルジョンと水相をスラグ流内で接触させることにより、リポソームの作製に成功した。
3. 上記のリポソーム作製プロセスにおいて、共溶媒を ethanol とすることで、粒子径制御性の獲得と高い内包効率の実現を達成した。

以上から、本研究では超臨界二酸化炭素を主溶媒とした新規フロー型プロセスを利用することで、疎水性・親水性 API のナノ粒子化が可能となることを明らかとした。超臨界二酸化炭素を用いることで、プロセスにおける有機溶媒量の削減や、運転コストの低減などの効果が見込めるうえに、フロー型製造プロセスにより製造効率の向上や、プロセス設計の易化が実現できる。さらに、本手法によって得られた粒子の機能化やその性質制御が行えることも明らかとなった。

引用文献

- [1] K. Ulbrich, K. Hola, V. Subr, A. Bakandritsos, J. Tucek and R. Zboril, "Targeted drug delivery with polymers and magnetic nanoparticles: Covalent and noncovalent approaches, release control, and clinical studies," *Chemical Reviews*, vol. 116, pp. 5338 - 5431, 2016.
- [2] R. Al-Kassas, M. Bansal and J. Shaw, "Nanosizing techniques for improving bioavailability of drugs," *Journal of Controlled Release*, vol. 260, pp. 202 - 212, 2017.
- [3] M. Jones and J. Leroux, "Polymeric micells - a new generation of colloidal drug carriers," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 48, pp. 101 - 111, 1999.
- [4] G. Gregoriadis, "Engineering liposomes for drug delivery: Progress and problems," *Trends in Biotechnology*, vol. 13, pp. 527 - 537, 1995.
- [5] J. Lode, I. Fichtner, J. Kreuter, A. Berndt, J. E. Diederichs and R. Reszka, "Influence of surface-modifying surfactants on the pharmacokinetic behavior of ¹⁴C-poly (methylmethacrylate) nanoparticles in experimental tumor models," *Pharmaceutical Research*, vol. 18, no. 11, pp. 1613 - 1619, 2001.
- [6] U. Wais, A. W. Jackson, T. He and H. Zhang, "Nanoformulation and encapsulation approaches for poorly water-soluble drug nanoparticles," *Nanoscale*, vol. 8, pp. 1746 - 1769, 2016.
- [7] A. A. Thorat and S. V. Dalvi, "Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: recent developments and future perspective," *Chemical Engineering Journal*, Vols. 181 - 182, pp. 1 - 34, 2012.
- [8] N. Foster, R. Mammucari, F. Dehghani, A. Barrett, K. Bexanehtak, E. Coen, G. Combes, L. Meure, A. Ng, H. L. Regtop and A. Tandy, "Processing pharmaceutical compounds using dense gas technology," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 42, no. 25, pp. 6476 - 6493, 2003.
- [9] C. Pando, A. Cabanas and I. Cuadra, "Preparation of pharmaceutical co-crystals through sustainable processes using supercritical carbon dioxide: a review," *RSC Advances*, vol. 6, pp. 71134 - 71150, 2016.
- [10] I. Pasquali and R. Bettini, "Are pharmaceuticals really going supercritical?," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 364, pp. 176 - 187, 2008.
- [11] Z. Knez, E. Markocic, M. Leitgeb, M. Primozic, M. K. Hrnacic and M. Skerget, "Industrial applications of supercritical fluids: a review," *Energy*, vol. 77, pp. 235 - 243, 2014.

- [12] M. M. Yallapu, B. K. Gupta, M. Jaggi and S. C. Chauhan, "Fabrication of curcumin encapsulated PLGA nanoparticles for improved therapeutic effects in metastatic cancer cells," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 351, pp. 19 - 29, 2010.
- [13] J. Chang, Y. Jallouli, M. Kroubi, X. Yuan, W. Feng, C. Kang, P. Pu and D. Betbeder, "Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 379, pp. 285 - 292, 2009.
- [14] B. J. Nehilla, M. Bergkvist, K. C. Popat and T. A. Desai, "Purified and surfactant-free coenzyme Q10-loaded biodegradable nanoparticles," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 348, pp. 107 - 114, 2008.
- [15] Y. Tan, P. Wang, K. Xu, W. Li, H. An, L. Li, C. Liu and L. Dong, "Designing starch-based nanospheres to make hydrogels with high mechanical strength," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 294, pp. 855 - 859, 2009.
- [16] S. Hornig, H. Bunjes and T. Heinze, "Preparation and characterization of nanoparticles based on dextran-drug conjugates," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 338, pp. 56 - 62, 2009.
- [17] T. Nassar, A. Rom, A. Nyska and S. Benita, "Novel double coated nanocapsules for intestinal delivery and enhanced oral bioavailability of tacrolimus, a P-gp substrate drug," *Journal of Controlled Release*, vol. 133, pp. 77 - 84, 2009.
- [18] P. Quellec, R. Gref, E. Dellacherie, F. Sommer, M. D. Tran and M. J. Alonso, "Protein encapsulation within poly(ethylene glycol)-coated nanospheres. II. Controlled release properties," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 47, no. 3, pp. 388 - 395, 1999.
- [19] J. Vandorpe, E. Schacht, S. Stolnik, M. C. Garnett, M. C. Davies, L. Illum and S. S. Davis, "Poly(organo phosphazene) nanoparticles surface modified with poly(ethylene oxide)," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 52, pp. 89 - 95, 1996.
- [20] C. X. Song, V. L. Labhasetwar, H. Murphy, X. Qu, W. R. Humphrey, R. J. Shebuski and R. J. Levy, "Formulation and characterization of biodegradable nanoparticles for intravascular local drug delivery," *Journal of Controlled Release*, vol. 43, pp. 197 - 212, 1997.
- [21] D. Lemoine and V. Preat, "Polymeric nanoparticles as delivery system for influenza virus glycoproteins," *Journal of Controlled Release*, vol. 54, pp. 15 - 27, 1998.
- [22] A. Musyanovych, J. Schmitz-Wienke, V. Mailander, P. Walther and K. Landfester, "Preparation of biodegradable polymer nanoparticles by miniemulsion technique and their cell interactions," *Macromolecular Bioscience*, vol. 8, pp. 127 - 139, 2008.
- [23] M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, P. Maincent, E. Dellacherie, M. J. Alonso, P. Labrude and C. Vigneron, "Influence of experimental parameters on the characteristics of

- poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method," *Journal of Controlled Release*, vol. 50, pp. 31 - 40, 1998.
- [24] D. K. Yadav and F. Khan, "QSAR, docking and ADMET studies of camptothecin derivatives as inhibitors of DNA topoisomerase-I," *Journal of Chemometrics*, vol. 27, pp. 21 - 33, 2013.
- [25] J. J. Wilson and S. J. Lippard, "In vitro anticancer activity of cis-diammineplatinum(II) complexes with β -diketonate leaving group ligands," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 55, pp. 5326 - 5336, 2012.
- [26] D. Screnci, M. J. McKeage, P. Galettis, T. W. Hambley, B. D. Palmer and B. C. Baguley, "Relationships between hydrophobicity, reactivity, accumulation and peripheral nerve toxicity of a series of platinum drugs," *British Journal of Cancer*, vol. 82, no. 4, pp. 966 - 972, 2000.
- [27] H. Saari, E. Lazaro-Ibanez, T. Viitala, E. Vuorimaa-Laukkanen, P. Siljander and M. Yliperttula, "Microvesicle- and exosome-mediated drug delivery enhances the cytotoxicity of Paclitaxel in autologous prostate cancer cells," *Journal of Controlled Release*, vol. 220, pp. 727 - 737, 2015.
- [28] Y. Pommier, "Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, pp. 789 - 802, 2006.
- [29] M. L. Forrest, C. Won, A. W. Malick and G. S. Kwon, "In vitro release of the mTOR inhibitor rapamycin from poly(ethylene glycol)-b-poly((-caprolactone) micelles," *Journal of Controlled Release*, vol. 110, pp. 370 - 377, 2006.
- [30] L. Padrela, M. A. Rodrigues, A. Duarte, A. M. A. Dias, M. E. M. Braga and H. C. Sousa, "Supercritical carbon dioxide-based technologies for the production of drug nanoparticles/nanocrystals – A comprehensive review," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 131, pp. 22 - 78, 2018.
- [31] S. L. Lee, T. F. O'Connor, X. Yang, C. N. Cruz, S. Chatterjee, R. D. Madurawe, C. M. V. Moore, L. X. Yu and J. Woodcock, "Modernizing pharmaceutical manufacturing: from batch to continuous production," *Journal of Pharmaceutical Innovation*, vol. 10, pp. 191 - 199, 2015.
- [32] R. Gerardy, N. Emmanuel, T. Toupy, V. Kassin, N. N. Tshibalonza, M. Schmitz and J. M. Monbaliu, "Continuous flow organic chemistry: successes and pitfalls at the interface with current societal challenges," *European Journal of Organic Chemistry*, pp. 2301 - 2351, 2018.
- [33] M. M. Nasr, M. Krumme, Y. Matsuda, B. L. Trout, C. Badman, S. Mascia, C. L. Cooney, K. D. Jensen, A. Florence, C. Johnston, K. Konstantinov and S. L. Lee, "Regulatory

- perspectives on continuous pharmaceutical manufacturing: moving from theory to practice: September 26-27, 2016, International Symposium on the Continuous Manufacturing of Pharmaceuticals," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 106, pp. 3199 - 3206, 2017.
- [34] A. Almaya, L. D. Belder, R. Meyer, K. Nagapudi, H. H. Lin, J. Jayanth, G. Bajwa, J. DiNunzio, A. Tantuccio, D. Blackwood and A. Abebe, "Control strategies for drug product continuous direct compression - state of control, product collection strategies, and startup/shutdown operations for the production of clinical trial materials and commercial products," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 106, pp. 930 - 943, 2017.
- [35] S. D. Schaber, D. I. Gerogiorgis, R. Ramachandran, J. M. B. Evans, P. I. Barton and B. L. Trout, "Economic analysis of integrated continuous and batch pharmaceutical manufacturing: a case study," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 50, pp. 10083 - 10092, 2011.
- [36] S. V. Tsukanov, M. D. Johnson, S. A. May, M. Rosemeyer, M. A. Watkins, S. P. Kolis, M. H. Yates and J. N. Johnston, "Development of an intermittent-flow enantioselective Aza-Henry reaction using an aryl nitromethane and homogeneous Brønsted acid-base catalyst with recycle," *Organic Process Research and Development*, vol. 20, pp. 215 - 226, 2016.
- [37] J. Li, B. L. Trout and A. S. Myerson, "Multistage continuous mixed-suspension, mixed-product removal (MSMPR) crystallization with solids recycle.," *Organic Process Research and Development*, vol. 20, pp. 510 - 516, 2016.
- [38] T. Seifert, S. Sievers, C. Bramsiepe and G. Schembecker, "Small scale, modular and continuous: a new approach in plant design," *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, vol. 52, pp. 140 - 150, 2012.
- [39] J. Chen, B. Sarna, J. M. B. Evans and A. S. Myerson, "Pharmaceutical crystallization," *Crystal Growth and Design*, vol. 11, pp. 887 - 895, 2011.
- [40] J. Vercruyse, U. Dalaet, I. V. Assche, P. Cappuyens, F. Arata, G. Caporicci, T. D. Beer, J. P. Remon and C. Vervaet, "Stability and repeatability of a continuous twin screw granulation and drying system," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 85, pp. 1031 - 1038, 2013.
- [41] B. Aksu, T. D. Beer, S. Folestad, J. Ketolainen, H. Kinden, J. A. Lopes, M. Matas, W. Oostra, J. Rantanen and M. Weimer, "Strategic funding priorities in the pharmaceutical sciences allied to Quality by Design (QbD) and Process Analytical Technology (PAT)," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 47, pp. 402 - 405, 2012.
- [42] J. Rantanen and J. Khinast, "The future of pharmaceutical manufacturing sciences," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 104, pp. 3612 - 3638, 2015.
- [43] A. C. Fisher, S. L. Lee, D. P. Harris, L. Buhse, S. Kozlowski, L. Yu, M. Kopcha and J.

- Woodcock, "Advancing pharmaceutical quality: an overview of science and research in the U.S. FDA's Office of Pharmaceutical Quality," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 515, pp. 390 - 402, 2016.
- [44] B. Gutmann and C. O. Kappe, "Forbidden chemistries - paths to a sustainable future engaging continuous processing," *Journal of Flow Chemistry*, vol. 7, no. 3 - 4, pp. 65 - 71, 2017.
- [45] K. P. Cole, B. M. Campbell, M. B. Forst, J. M. Groh, M. Hess, M. D. Johnson, R. D. Miller, D. Mitchell, C. S. Polster, B. J. Reizman and M. Rosemeyer, "An automated intermittent flow approach to continuous Suzuki coupling," *Organic Process Research and Development*, vol. 20, pp. 820 - 830, 2016.
- [46] M. E. Kopach, K. P. Cole, P. M. Pollock, M. D. Johnson, T. M. Braden, L. P. Webster, J. M. Groh, A. D. McFarland, J. P. Schafer, J. J. Adler and M. Rosemeyer, "Flow grignard and lithiation: screening tools and development of continuous processes for a benzyl alcohol starting material," *Organic Process Research and Development*, vol. 20, pp. 1581 - 1592, 2016.
- [47] C. L. Burcham, A. J. Florence and M. D. Johnson, "Continuous manufacturing in pharmaceutical process development and manufacturing," *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, vol. 9, pp. 253 - 281, 2018.
- [48] M. Tezyk, B. Milanowski, A. Ernst and J. Lulek, "Recent progress in continuous and semi-continuous processing of solid oral dosage forms: a review," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 42, no. 8, pp. 1195 - 1214, 2016.
- [49] C. Vervaet and J. P. Remon, "Continuous granulation in the pharmaceutical industry," *Chemical Engineering Science*, vol. 60, pp. 3949 - 3957, 2005.
- [50] K. Plumb, "Continuous processing in the pharmaceutical industry. Changing the mind set," *Chemical Engineering Research and Design*, vol. 83, no. A6, pp. 730 - 738, 2005.
- [51] C. Wiles and P. Watts, "Continuous flow reactors: a perspective," *Green Chemistry*, vol. 38, p. 14, 2012.
- [52] H. Maeda, H. Nakamura and J. Fang, "The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, pp. 71 - 79, 2013.
- [53] H. Nakamura, F. Jun and H. Maeda, "Development of next-generation macromolecular drugs based on the EPR effect: challenges and pitfalls," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 12, pp. 53 - 64, 2015.
- [54] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," *Journal of Controlled Release*,

vol. 65, pp. 271 - 284, 2000.

- [55] H. Maeda, "Tumor-selective delivery of macromolecular drugs via the EPR effect: Background and future prospects," *Bioconjugate Chemistry*, vol. 21, pp. 797 - 802, 2010.
- [56] S. D. Steichen, M. Caldorera-Moore and N. A. Peppas, "A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics," *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 48, pp. 416 - 427, 2013.
- [57] R. A. Petros and J. M. Desimone, "Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 9, pp. 615 - 627, 2010.
- [58] A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids," *Journal of Molecular Biology*, vol. 13, no. 1, pp. 238 - 252, 1965.
- [59] A. D. Bangham and R. W. Horne, "Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope," *Journal of Molecular Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 660 - 668, 1964.
- [60] G. Moad, E. Rizzardo and S. H. Thang, "Radical addition - fragmentation chemistry in polymer synthesis," *Polymer*, vol. 49, pp. 1079 - 1131, 2008.
- [61] W. A. Braunecker and K. Matyjaszewski, "Controlled/living radical polymerization: Features, developments, and perspectives," *Proress in Polymer Science*, vol. 32, pp. 93 - 146, 2007.
- [62] M. Elsabahy and K. L. Wooley, "Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications," *Chemical Society Reviews*, vol. 41, pp. 2545 - 2561, 2012.
- [63] V. Delplace, P. Couvreur and J. Nicolas, "Recent trends in the design of anticancer polymer prodrug nanocarriers," *Polymer Chemistry*, vol. 5, pp. 1529 - 1544, 2014.
- [64] J. Nicolas, S. Mura, D. Brambilla, N. Mackiewicz and P. Couvreur, "Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery," *Chemical Society Reviews*, vol. 42, pp. 1147 - 1235, 2013.
- [65] M. L. Adams, A. Lavasanifar and G. S. Kwon, "Amphiphilic block copolymers for drug delivery," *Journal of Pharmaceutical Sciennces*, vol. 92, no. 7, pp. 1343 - 1355, 2003.
- [66] J. Hu, K. P. Johnston and R. O. Williams III, "Nanoparticle engineering processes for enhancing the dissolution rates of poorly water soluble drugs," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 30, no. 3, pp. 233 - 245, 2004.
- [67] I. Brigger, C. Dubernet and P. Couvreur, "Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 24 - 36, 2012.

- [68] C. Verdun, F. Brasseur, H. Vranckx, P. Couvreur and M. Roland, "Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 26, pp. 13 - 18, 1990.
- [69] S. I. Jeon, J. H. Lee, J. D. Andrade and P. G. Dennes, "Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide I. Simplified theory," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 142, no. 1, pp. 149 - 158, 1991.
- [70] S. I. Jeon and J. D. Andrade, "Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide II. Effect of protein size," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 142, no. 1, pp. 159 - 166, 1991.
- [71] G. Storm, S. O. Belliot, T. Daemen and D. D. Lasic, "Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 17, pp. 31 - 48, 1995.
- [72] V. P. Torchilin and V. S. Trubetskoy, "Which polymers can make nanoparticulate drug carriers long-circulation?," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 16, pp. 141 - 155, 1995.
- [73] R. Bazak, M. Hourri, S. E. Achy, S. Kamel and T. Rafaat, "Cancer active targeting by nanoparticles: A comprehensive review of literature," *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, vol. 141, pp. 769 - 784, 2015.
- [74] R. Duncun and R. Gaspar, "Nanomedicine(s) under the microscope," *Molecular pharmaceuticals*, vol. 8, pp. 2101 - 2141, 2011.
- [75] B. Djurdjic, S. Dimchevska, N. Geskovski, M. Petrushevska, V. Gancheva, G. Georgiev, P. Petrov and K. Goracinova, "Synthesis and self-assembly of amphiphilic poly(acrylic acid)-poly(ϵ -caprolactone)-poly(acrylic acid) block copolymer as novel carrier for 7-ethyl-10-hydroxy camptothecin," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 29, pp. 867 - 881, 2015.
- [76] S. Chen, S. Cheng and R. Zhuo, "Self-assembly strategy for the preparation of polymer-based nanoparticles for drug and gene delivery," *Macromolecular Bioscience*, vol. 11, pp. 576 - 589, 2011.
- [77] J. G. J. L. Lebouille, L. F. W. Vleugels, A. A. Dias, F. A. M. Leermakers, M. A. C. Stuart and R. Tuinier, "Controlled block copolymer micelles formation for encapsulation of hydrophobic ingredients," *The European Physical Journal E*, vol. 36, p. 107, 2013.
- [78] K. Byagari, A. Shanavas, A. K. Rengan, G. C. Kundu and R. Srivastava, "Biocompatible amphiphilic pentablock copolymeric nanoparticles for anti-cancer drug delivery," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 10, pp. 109 - 119, 2014.
- [79] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Progress in Polymer Science*, vol. 36, pp. 887 - 913, 2011.

- [80] P. York, "Strategies for particle design using supercritical fluid technologies," *Pharmaceutical Science and Technology Today*, vol. 11, no. 2, pp. 430 - 440, 1999.
- [81] Y. Kawashima, "Nanoparticulate systems for improved drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, pp. 1 - 2, 2001.
- [82] Z. Liu, Y. Jiao, Y. Wang, C. Zhou and Z. Zhang, "Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 1650 - 1662, 2008.
- [83] M. A. Vandelli, F. Rivasi, P. Guerra, F. Forni and R. Arletti, "Gelatin microspheres crosslinked with D,L-glyceraldehyde as a potential drug delivery system: Preparation, characterisation, in vitro and in vivo studies," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 215, pp. 175 - 184, 2001.
- [84] S. Sahin, H. Selek, G. Ponchel, M. T. Ercan, M. Sargon, A. A. Hincal and H. S. Kas, "Preparation, characterization, and in vivo distribution of terbutaline sulfate loaded albumin microspheres," *Journal of Controlled Release*, vol. 82, pp. 345 - 358, 2002.
- [85] G. Gregoriadis, "The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts)," *The new england journal of medicine*, vol. 295, pp. 704 - 710, 1976.
- [86] G. Gregoriadis, "The carrier potential of liposomes in biology and medicine (second of two parts)," *The New England Journal of Medicine*, vol. 295, pp. 765 - 770, 1976.
- [87] P. Yingchoncharoen, D. S. Kalinowski and D. R. Richardson, "Lipid-based drug delivery systems in cancer therapy: What is available and what is yet to come," *Pharmacological Reviews*, vol. 68, pp. 701 - 787, 2016.
- [88] T. M. Allen, "Liposomal drug formulations," *Drugs*, vol. 56, no. 5, pp. 747 - 756, 1998.
- [89] J. Gubernator, "Active methods of drug loading into liposomes: Recent strategies for stable drug entrapment and increased in vivo activity," *Expert Opinion on Drug Delivery*, vol. 8, pp. 565 - 580, 2011.
- [90] U. Bulbake, S. Doppalapudi, N. Kommineni and W. Khan, "Liposomal formulation in clinical use: An updated review," *Pharmaceutics*, vol. 9, no. 2, p. 12, 2017.
- [91] M. Wacker, "Nanocarriers for intravenous injection - The long hard road to the market," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 457, pp. 50 - 62, 2013.
- [92] B. D. Chithrani, A. A. Ghazani and W. C. W. Chan, "Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells," *Nano letters*, vol. 6, no. 4, pp. 662 - 668, 2006.
- [93] Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai, R. Tsai, M. Tewari, T. Minko and D. E. Discher, "Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery," *Nature Nanotechnology*, vol. 2, pp. 249 - 255, 2007.

- [94] S. E. A. Gratton, P. A. Ropp, P. D. Pohlhaus, J. C. Luft, V. J. Madden, M. E. Napier and J. M. DeSimone, "The effect of particle design on cellular internalization pathways," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 33, pp. 11613 - 11618, 2008.
- [95] J. Wang, J. D. Byrne, M. E. Napier and J. M. DeSimone, "More effective nanomedicines through particle design," *Small*, vol. 7, no. 14, pp. 1919 - 1931, 2011.
- [96] S. Vemuri and C. T. Rhodes, "Preparation and characterization of liposome as therapeutic delivery system: A review," *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, vol. 70, pp. 95 - 111, 1995.
- [97] F. Maestrelli, M. L. Gonzalez-Rodriguez, A. M. Rabasco and P. Mura, "Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 312, pp. 53 - 60, 2006.
- [98] R. Pignatello, T. Musumeci, A. C. E. Graziano, D. L. Furno, P. Varamini, F. M. Mansfeld, V. Cardile and I. Toth, "A study on liposomal encapsulation of a lipophilic prodrug of LHRH," *Pharmaceutical Development and Technology*, pp. 1 - 8, 2015.
- [99] T. S. Levchenko, R. Rammohan, A. N. Lukyanov, K. R. Whiteman and V. P. Torchilin, "Liposome clearance in mice: the effect of a separate and combined presence of surface charge and polymer coating," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 240, pp. 95 - 102, 2002.
- [100] D. C. Litzinger, A. M. J. Buiting, N. Rooijen and L. Huang, "Effect of liposome size on the circulation time and intraorgan distribution of amphipathic poly(ethylene glycol)-containing liposomes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1190, pp. 99 - 107, 1994.
- [101] V. D. Awasthi, D. Garcia, B. A. Goins and W. T. Phillips, "Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 253, pp. 121 - 132, 2003.
- [102] F. Yuan, M. Dellian, D. Fukumura, M. Leunig, D. A. Berk, V. P. Torchilin and R. K. Jain, "Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size," *Cancer Research*, vol. 55, pp. 3752 - 3756, 1995.
- [103] S. K. Hobbs, W. L. Monsky, F. Yuan, W. G. Roberts, L. Griffith, V. P. Torchilin and R. K. Jain, "Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment," *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America*, vol. 95, pp. 4607 - 4612, 1998.
- [104] C. M. Lee, T. Tanaka, T. Murai, M. Kondo, J. Kimura, W. Su, T. Kitagawa, T. Ito, H. Matsuda and M. Miyasaka, "Novel Chondroitin sulfate-binding cationic liposomes loaded with Cisplatin efficiently suppress the local growth and liver metastasis of tumor cells in

- vivo," *Cancer Research*, vol. 62, pp. 4282 - 4288, 2002.
- [105] R. B. Campbell, D. Fukumura, E. B. Brown, L. M. Mazzola, Y. Izumi, R. K. Jain, V. P. Torchilin and L. Munn, "Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors," *Cancer Research*, vol. 62, pp. 6831 - 6836, 2002.
- [106] M. E. Davis, Z. Chen and D. M. Shin, "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer," *Nature Reviews Drug Discovery*, vol. 7, pp. 770 - 782, 2008.
- [107] R. F. van Golen, T. M. van Gulik and M. Heger, "Mechanistic overview of reactive species-induced degradation of the endothelial glycocalyx during hepatic ischemia/reperfusion injury," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 52, pp. 1382 - 1402, 2012.
- [108] M. J. Mitchell and M. R. King, "Physical biology in cancer. 3. The role of cell glycocalyx in vascular transport of circulating tumor cells," *American Journal of Physiology Cell Physiology*, vol. 306, pp. C89 - C97, 2014.
- [109] A. L. Klibanov, K. Maruyama, A. M. Beckerleg, V. P. Torchilin and L. Huang, "Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1062, pp. 142 - 148, 1991.
- [110] D. D. Lasic, F. J. Martin, A. Gabizon, S. K. Huang and D. Papahadjopoulos, "Sterically stabilized liposomes: A hypothesis on the molecular origin of the extended circulation times," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1070, pp. 187 - 192, 1991.
- [111] X. He, L. Li, H. Su, D. Zhou, H. Song, L. Wang and X. Jiang, "Poly(ethylene glycol)-b- ϵ -caprolactone- and phospholipid-based stealth nanoparticles with enhanced therapeutic efficacy on murine breast cancer by improved intracellular drug delivery," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, pp. 1791 - 1804, 2015.
- [112] J. Filipovic-Grcic, N. Skalko-Basnet and I. Jalsenjak, "Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: Characteristics and stability," *Journal of Microencapsulation*, vol. 18, pp. 3 - 12, 2001.
- [113] A. Sharma and U. S. Sharma, "Liposomes in drug delivery: Progress and limitation," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 154, pp. 123 - 140, 1997.
- [114] F. Olson, C. A. Hunt, F. C. Szoka, W. J. Vail and D. Papahadjopoulos, "Preparation of liposome of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 557, pp. 9 - 23, 1979.
- [115] D. Papahadjopoulos and J. C. Watkins, "Phospholipid model membranes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 135, pp. 639 - 652, 1967.
- [116] S. M. Gruner, "Novel multilayered lipid vesicles: Comparison of physical characteristics

- of multilamellar liposomes and stable plurilamellar vesicles," *Biochemistry*, vol. 24, pp. 2833 - 2842, 1985.
- [117] S. Batzri and E. D. Korn, "Single bilayer liposomes prepared without sonication," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 298, pp. 1015 - 1019, 1973.
- [118] D. Deamer and A. D. Bangham, "Large volume liposomes by an ether vaporiation method," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 443, pp. 629 - 634, 1976.
- [119] F. Szoka Jr. and D. Papahadjopoulos, "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 75, no. 9, pp. 4194 - 4198, 1978.
- [120] R. L. Hartman, J. P. McMullen and K. F. Jensen, "Deciding whether to go with the flow: evaluating the merits of flow reactors for synthesis," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 50, pp. 7502 - 7519, 2011.
- [121] C. N. Baroud and H. Willaime, "Multiphase flows in microfluidics," *Comptes Rendus Physique*, vol. 5, pp. 547 - 555, 2004.
- [122] E. Sinkovec and M. Krajnc, "Phase transfer catalyzed Wittig reaction in the microtube reactor under liquid-liquid slug-flow pattern," *Organic Process Research and Development*, vol. 15, pp. 817 - 823, 2011.
- [123] S. Becht, R. Franke, A. Gei-βelmann and H. Hahn, "Micro process technology as a means of process intensification," *Chemical Engineering and Technology*, vol. 30, pp. 295 - 299, 2007.
- [124] A. Nagaki, S. Yamada, M. Doi, Y. Tomida, N. Takabayashi and J. Yoshida, "Flow microreactor synthesis of disubstituted pyridines from dibromopyridines via Br/Li exchange without using cryogenic conditions," *Green Chemistry*, vol. 13, pp. 1110 - 1113, 2011.
- [125] A. Nagaki, A. Kenmoku, Y. Moriwaki, A. Hayashi and J. Yoshida, "Cross-coupling in a flow microreactor: space integration of lithiation and Murahashi coupling," *Angewandte Chemie International Edition*, Vols. 7543 - 7547, p. 49, 2010.
- [126] P. J. Nieuwland, K. Koch, N. van Harskamp, R. Wehrens, J. C. M. van Hest and F. P. J. T. Rutjes, "Flash chemistry extensively optimized: high-temperature Swern-Moffatt oxidation in an automated microreactor platform," *Chemistry an Asian Journal*, vol. 5, pp. 799 - 805, 2010.
- [127] H. Mukae, H. Maeda, S. Nashihara and K. Mizuno, "Intermolecular photocycloaddition of 2-(2-alkenyloxymethyl)-naphthalene-1-carbonitriles using glass-made microreactors," *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, vol. 80, no. 6, pp. 1157 - 1161, 2007.

- [128] H. Lu, M. A. Schmidt and K. F. Jensen, "Photochemical reactions and on-line UV detection in microfabricated reactors," *Lab on a Chip*, vol. 1, pp. 22 - 28, 2001.
- [129] O. Shvydkiv, K. Nolan and M. Oelgemoller, "Microphotochemistry: 4,4'-Dimethoxybenzophenone mediated photodecarboxylation reactions involving phthalimides," *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, vol. 7, pp. 1055 - 1063, 2011.
- [130] Z. He, Y. Li, Q. Zhang and H. Wang, "Capillary microchannel-based microreactors with highly durable ZnO/TiO₂ nanorod arrays for rapid, high efficiency and continuous-flow photocatalysis," *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. 93, pp. 376 - 382, 2010.
- [131] J. D. Moseley and C. O. Kappe, "A critical assessment of the greenness and energy efficiency of microwave-assisted organic synthesis," *Green Chemistry*, vol. 13, pp. 794 - 806, 2011.
- [132] D. Obermayer, T. N. Glasnov and C. O. Kappe, "Microwave-assisted and continuous flow multistep synthesis of 4-(pyrazol-1-yl)carboxanilides," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 76, pp. 6657 - 6669, 2011.
- [133] S. Ceylan, L. Coutable, J. Wegner and A. Kirschning, "Inductive heating with magnetic materials inside flow reactors," *Chemistry: a European Journal*, vol. 17, pp. 1884 - 1893, 2011.
- [134] S. Mozharov, A. Nordon, D. Littlejohn, C. Wiles, P. Watts, P. Dallin and J. M. Girkin, "Improved method for kinetic studies in microreactors using flow manipulation and noninvasive Raman spectrometry," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 133, pp. 3601 - 3608, 2011.
- [135] C. F. Carter, I. R. Baxendale, M. O'Brien, J. B. J. Pavey and S. V. Ley, "Synthesis of acetal protected building blocks using flow chemistry with flow I.R. analysis: preparation of butane-2,3-diacetal tartrates," *Organic and Biomolecular Chemistry*, vol. 7, pp. 4594 - 4597, 2009.
- [136] T. M. Floyd, M. A. Schmidt and K. F. Jensen, "Silicon micromixers with infrared detection for studies of liquid-phase reactions," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 44, pp. 2351 - 2358, 2005.
- [137] B. V. Silva, F. A. Violante, A. C. Pinto and L. S. Santos, "The mechanism of Sandmeyer's cyclization reaction by electrospray ionization mass spectrometry," *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, vol. 25, pp. 423 - 428, 2011.
- [138] M. E. Kopach, M. M. Murray, T. M. Braden, M. E. Kobierski and O. L. Williams, "Improved synthesis of 1-(azidomethyl)-3,5-bis-(trifluoromethyl)benzene: development of batch and microflow azide processes," *Organic Process Research and Development*, vol. 13, pp. 152 - 160, 2009.

- [139] W. G. Finnegan, R. A. Henry and R. Lofquist, "An improved synthesis of 5-substituted tetrazoles," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 80, pp. 3908 - 3911, 1958.
- [140] B. S. Jursic and B. W. LeBlac, "Preparation of tetrazoles from organic nitriles and sodium azide in micellar media," *Journal of Heterocyclic Chemistry*, vol. 35, pp. 405 - 408, 1998.
- [141] B. Gutmann, J. Roduit, D. Roberge and C. O. Kappe, "Synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles from nitriles and hydrazoic acid by using a safe and scalable high-temperature microreactor approach," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 49, pp. 7101 - 7105, 2010.
- [142] B. Gutmann, T. N. Glasnov, T. Razzaq, W. Goessler, D. M. Roberge and C. O. Kappe, "Unusual behavior in the reactivity of 5-substituted- 1H-tetrazoles in a resistively heated microreactor," *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, vol. 7, pp. 503 - 517, 2011.
- [143] N. Zaborenko, E. R. Murphy, J. G. Kralj and K. F. Jensen, "Synthesis and kinetics of highly energetic intermediates by micromixers: direct multistep synthesis of sodium nitrotetrazolate," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 49, pp. 4132 - 4139, 2010.
- [144] A. Adamo, R. L. Beingessner, M. Behnam, J. Chen, T. F. Jamison, K. F. Jensen, J. M. Monbaliu, A. S. Myerson, E. M. Revalor, D. R. Snead, T. Stelzer, N. Weeranoppanant, S. Y. Wong and P. Zhang, "On-demand continuous-flow production of pharmaceuticals in a compact, reconfigurable system," *Science*, vol. 352, no. 6281, pp. 61 - 67, 2016.
- [145] U. Tilstam, T. Defrance and T. Giard, "The Newman-Kwart rearrangement revisited: continuous process under supercritical conditions," *Organic Process Research and Development*, vol. 13, pp. 321 - 323, 2009.
- [146] M. Sato, K. Matsushima, H. Kawanami and Y. Ikushima, "A highly selective, high-speed, and hydrolysis-free o-acylation in subcritical water in the absence of a catalyst," *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 46, pp. 6284 - 6288, 2007.
- [147] R. Shegokar and R. H. Muller, "Nanocrystals: industrially feasible multifunctional formulation technology for poorly soluble actives," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 399, pp. 129 - 139, 2010.
- [148] J. P. Moschwitz, "Drug nanocrystals in the commercial pharmaceutical development process," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 453, pp. 142 - 156, 2013.
- [149] W. W. L. Chin, J. Parmentier, M. Widzinski, E. H. Tan and R. Gokhale, "A brief literature and patent review of nanosuspensions to a final drug product," *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 103, no. 10, pp. 2980 - 2999, 2014.
- [150] B. Sinha, R. H. Muller and J. P. Moschwitz, "Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size," *International Journal of*

Pharmaceutics, vol. 453, pp. 126 - 141, 2013.

- [151] V. B. Junyaprasert and B. Morakul, "Nanocrystals for enhancement of oral bioavailability of poorly water-soluble drugs," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 10, pp. 13 - 23, 2015.
- [152] J. Salazar, R. H. Muller and J. P. Moschwitz, "Combinative particle size reduction technologies for the production of drug nanocrystals," *Journal of Pharmaceutics*, vol. 2014, p. 265754, 2014.
- [153] L. Peltonen and J. Hirvonen, "Drug nanocrystals – Versatile option for formulation of poorly soluble materials," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 537, pp. 73 - 83, 2018.
- [154] H. Chen, C. Khemtong, X. Yang, X. Chang and J. Gao, "Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs," *Drug Discovery Today*, vol. 16, no. 7, pp. 354 - 360, 2011.
- [155] J. A. H. Junghanns and R. H. Muller, "Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 3, no. 3, pp. 295 - 309, 2008.
- [156] H. Chan and P. C. L. Kwok, "Production methods for nanodrug particles using the bottom-up approach," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 63, pp. 406 - 416, 2011.
- [157] R. D. Smith and H. R. Udseth, "Mass spectrometry with direct supercritical fluid injection," *Analytical Chemistry*, vol. 55, pp. 2266 - 2272, 1983.
- [158] R. D. Smith, J. L. Fulton, R. C. Petersen, A. J. Kopriva and B. W. Wright, "Performance of capillary restrictors in supercritical fluid chromatography," *Analytical Chemistry*, vol. 58, pp. 2057 - 2064, 1986.
- [159] R. C. Petersen, D. W. Matson and R. D. Smith, "Rapid precipitation of low vapor pressure solids from supercritical fluid solutions: the formation of thin films and powders," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 108, pp. 2100 - 2102, 1986.
- [160] D. W. Matson, R. C. Petersen and R. D. Smith, "Production of powders and films by the rapid expansion of supercritical solutions," *Journal of Materials Science*, vol. 22, pp. 1919 - 1928, 1987.
- [161] E. M. Phillips and V. J. Stella, "Rapid expansion from supercritical solutions: application to pharmaceutical processes," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 94, pp. 1 - 10, 1993.
- [162] J. W. Tom and P. G. Debenedetti, "Particle formation with supercritical fluids-a review," *Journal of Aerosol Science*, vol. 22, no. 5, pp. 555 - 584, 1991.
- [163] P. G. Debenedetti, J. W. Tom, X. Kwauk and S. Yeo, "Rapid expansion of supercritical solutions (RESS): fundamentals and applications," *Fluid Phase Equilibria*, vol. 82, pp.

311 - 321, 1993.

- [164] M. Turk, "Influence of thermodynamic behaviour and solute properties on homogeneous nucleation in supercritical solutions," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 18, pp. 169 - 184, 2000.
- [165] M. Turk, "Manufacture of submicron drug particles with enhanced dissolution behaviour by rapid expansion processes," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 47, pp. 537 - 545, 2009.
- [166] K. Byrappa, "Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 299 - 327, 2008.
- [167] M. Turk, G. Upper and P. Hils, "Formation of composite drug–polymer particles by co-precipitation during the rapid expansion of supercritical fluids," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 39, pp. 253 - 263, 2006.
- [168] Z. Huang, G. Sun, Y. C. Chiw and S. Kawi, "Formation of ultrafine aspirin particles through rapid expansion of supercritical solutions (RESS)," *Powder Technology*, vol. 160, pp. 127 - 134, 2005.
- [169] C. Su, M. Tang and Y. Chen, "Micronization of nabumetone using the rapid expansion of supercritical solution (RESS) process," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 50, pp. 69 - 76, 2009.
- [170] M. Perrut and J. Clavier, "Supercritical fluid formulation: process choice and scale-up," *Industrial and Engineering Chemistry Research*, vol. 42, pp. 6375 - 6383, 2003.
- [171] H. Okamoto and K. Danjo, "Application of supercritical fluid to preparation of powders of high-molecular weight drugs for inhalation," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 433 - 446, 2008.
- [172] E. Reverchon, "Supercritical antisolvent precipitation of micro- and nano-particles," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 15, pp. 1 - 21, 1999.
- [173] E. Reverchon, R. Adami, G. Caputo and I. D. Marco, "Spherical microparticles production by supercritical antisolvent precipitation: Interpretation of results," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 47, pp. 70 - 84, 2008.
- [174] E. Reverchon and I. D. Marco, "Mechanisms controlling supercritical antisolvent precipitate morphology," *Chemical Engineering Journal*, vol. 169, pp. 358 - 370, 2011.
- [175] H. Y. Jin, F. Xia and Y. P. Zhao, "Preparation of hydroxypropyl methyl cellulose phthalate nanoparticles with mixed solvent using supercritical antisolvent process and its application in co-precipitation of insulin," *Advanced Powder Technology*, vol. 23, pp. 157 - 163, 2012.
- [176] G. W. Brun, A. Martin, E. Cassel, R. M. F. Vargas and M. J. Cocero, "Crystallization of

- caffeine by supercritical antisolvent (SAS) process: analysis of process parameters and control of polymorphism," *Crystal Design and Growth*, vol. 12, pp. 1943 - 1951, 2012.
- [177] F. Zahran, A. Cabanas, J. A. R. Cheda, J. A. R. Renuncio and C. Pando, "Dissolution rate enhancement of the anti-inflammatory drug diflunisal by coprecipitation with a biocompatible polymer using carbon dioxide as a supercritical fluid antisolvent," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 88, pp. 56 - 65, 2014.
- [178] V. Prosapio, I. D. Marco and E. Reverchon, "Supercritical antisolvent coprecipitation mechanisms," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 138, pp. 247 - 258, 2018.
- [179] R. Thiering, F. Dehghani and N. R. Foster, "Current issues relating to anti-solvent micronisation techniques and their extension to industrial scales," *Journal of Supercritical Fluids*, vol. 21, pp. 159 - 177, 2001.
- [180] B. Y. Shekunov, P. Chattopadhyay, J. Seitzinger and R. Huff, "Nanoparticles of poorly water-soluble drugs prepared by supercritical fluid extraction of emulsions," *Pharmaceutical Research*, vol. 23, no. 1, pp. 196 - 204, 2006.
- [181] G. Levai, A. Martin, S. R. Rojo, M. J. Cocero and T. M. Fieback, "Measurement and modelling of mass transport properties during the supercritical fluid extraction of emulsions," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 129, pp. 36 - 47, 2017.
- [182] F. Mettea, A. Martin, C. Schulz, P. Jaeger, R. Eggers and M. J. Cocero, "Behavior of an organic solvent drop during the supercritical extraction of emulsions," *AIChE Journal*, vol. 56, no. 5, pp. 1184 - 1195, 2010.
- [183] J. Kluge, F. Fusaro, M. Mazzotti and G. Muhrer, "Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: I. Encapsulation of lysozyme," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 50, pp. 327 - 335, 2009.
- [184] J. Kluge, F. Fusaro, M. Mazzotti and G. Muhrer, "Production of PLGA micro- and nanocomposites by supercritical fluid extraction of emulsions: II. Encapsulation of Ketoprofen," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 50, pp. 336 - 343, 2009.
- [185] L. Frederiksen, K. Anton, P. van Hoogevest, H. R. Keller and H. Leuenberger, "Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 86, no. 8, pp. 921 - 928, 1997.
- [186] W. Tsai and S. S. H. Rizvi, "Microencapsulation and characterization of liposomal vesicles using a supercritical fluid process coupled with vacuum-driven cargo loading," *Food Research International*, vol. 96, pp. 94 - 102, 2017.
- [187] W. Tsai and S. S. H. Rizvi, "Simultaneous microencapsulation of hydrophilic and lipophilic bioactives in liposomes produced by an ecofriendly supercritical fluid process," *Food Research International*, vol. 99, pp. 256 - 262, 2017.

- [188] W. Tsai and S. S. H. Rizvi, "Liposomal microencapsulation using the conventional methods and novel supercritical fluid processes," *Trends in Food Science and Technology*, vol. 55, pp. 61 - 71, 2016.
- [189] K. Otake, T. Imura, H. Sakai and M. Abe, "Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide," *Langmuir*, vol. 17, pp. 3898 - 3901, 2001.
- [190] T. Imura, K. Otake, S. Hashimoto, T. Gotoh, M. Yuasa, S. Yokoyama, H. Sakai, J. F. Rathman and M. Abe, "Preparation and physicochemical properties of various soybean lecithin liposomes using supercritical reverse phase evaporation method," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 27, pp. 133 - 140, 2002.
- [191] K. Otake, T. Shimomura, T. Goto, T. Imura, T. Furuya, S. Yoda, Y. Takebayashi, H. Sakai and M. Abe, "Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method," *Langmuir*, vol. 22, pp. 2543 - 2550, 2006.
- [192] T. Imura, T. Gotoh, K. Otake, S. Yoda, Y. Takebayashi, S. Yokoyama, H. Takebayashi, H. Sakai, M. Yuasa and M. Abe, "Control of physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method," *Langmuir*, vol. 19, pp. 2021 - 2025, 2003.
- [193] R. Campardelli, I. E. Santo, E. C. Albuquerque, S. V. Melo, G. D. Porta and E. Reverchon, "Efficient encapsulation of proteins in submicro liposomes using asupercritical fluid assisted continuous process," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 107, pp. 163 - 169, 2016.
- [194] P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, "Production of liposomes loaded with antioxidants using a supercritical CO₂ assisted process," *Powder Technology*, vol. 323, pp. 155 - 162, 2018.
- [195] R. Campardelli, P. Trucillo and E. Reverchon, "Supercritical assisted process for the efficient production of liposomes containing antibiotics for ocular delivery," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 25, pp. 235 - 241, 2018.
- [196] P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, "Supercritical CO₂ assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading," *Journal of CO₂ Utilization*, vol. 18, pp. 181 - 188, 2017.
- [197] P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, "A versatile supercritical assisted process for the one-shot production of liposomes," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 146, pp. 136 - 143, 2019.
- [198] P. Trucillo, R. Campardelli and E. Reverchon, "Antioxidant loaded emulsions entrapped in liposomes produced using a supercritical assisted technique," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 154, pp. 1 - 9, 2019.

- [199] P. Trucillo, R. Campardelli, M. Scognamiglio and E. Reverchon, "Control of liposomes diameter at micrometric and nanometric level using a supercritical assisted technique," *Journal of CO2 Utilization*, vol. 32, pp. 119 - 127, 2019.
- [200] M. A. Socinski, I. Bodarenko, N. A. Karaseva, A. M. Makhson, I. Vynnychenko, I. Okamoto, J. K. Hon, V. Hirsh, P. Bhar, H. Zhang, J. L. Iglesias and M. F. Renschler, "Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 30, no. 17, pp. 2055 - 2062, 2012.
- [201] M. J. Hawkins, P. Soon-Shiong and N. Desai, "Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, pp. 876 - 885, 2008.
- [202] A. M. Gonzalez-Angulo, F. Meric-Bernstam, S. Chawla, G. Falchook, D. Hong, A. Akcakanat, H. Chen, A. Naing, S. Fu, J. Wheler, S. Moulder, T. Helgason, S. Li, I. Elias, N. Desai and R. Kurzrock, "Weekly nab-iraparib in patients with advanced nonhematologic malignancies: final results of a phase I trial".
- [203] P. Zhao and D. Astruc, "Docetaxel nanotechnology in anticancer therapy," *ChemMedChem*, vol. 7, pp. 952 - 972, 2012.
- [204] M. E. Davis, J. E. Zuckerman, C. H. J. Choi, D. Seligson, A. Tolcher, C. A. Alabi, Y. Yen, J. D. Heidel and A. Ribas, "Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles," *Nature*, vol. 464, no. 7291, pp. 1067 - 1070, 2010.
- [205] S. Guar, Y. Wang, L. Kretzner, L. Chen, T. Yen, X. Wu, Y. Yuan, M. Davis and Y. Yen, "Pharmacodynamic and pharmacogenomic study of the nanoparticle conjugate of camptothecin CRLX101 for the treatment of cancer," *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 10, pp. 1477 - 1486, 2014.
- [206] T. Dragovich, D. Mendelson, S. Kurtin, K. Richardson, D. V. Hoff and A. Hoos, "A Phase 2 trial of the liposomal DACH platinum L-NDDP in patients with therapy-refractory advanced colorectal cancer," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 58, pp. 759 - 764, 2006.
- [207] D. Mahalingam, J. J. Nemunaitis, L. Malik, J. Sarantopoulos, S. Weitman, K. Sankhala, J. Hart, A. Kousba, N. S. Gallegos, G. Anderson, J. Charles, J. M. Rogers, N. N. Senzer and A. C. Mita, "Phase I study of intravenously administered ATI-1123, a liposomal docetaxel formulation in patients with advanced solid tumors," *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, vol. 74, pp. 1241 - 1250, 2014.
- [208] A. Awada, I. N. Bondarenko, J. Bonnetterre, E. Nowara, J. M. Ferrero, A. V. Bakshi, C. Wilke and M. Piccart, "A randomized controlled phase II trial of a novel composition of

paclitaxel embedded into neutral and cationic lipids targeting tumor endothelial cells in advanced triple-negative breast cancer (TNBC)," *Annals of Oncology*, vol. 25, pp. 824 - 831, 2014.

- [209] R. van der Meel, L. J. C. Vehmeijer, R. J. Kok, G. Storm and E. V. B. van Gaal, "Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 65, pp. 1284 - 1298, 2013.
- [210] G. P. Stathopoulos, D. Antoniou, J. Dimitroulis, P. Michalopoulou, A. Bastas, K. Marosis, J. Stathopoulos, A. Provata, P. Yiamboudakis, D. Veldekis, N. Lolis, N. Georgatou, M. Toubis, C. Pappas and G. Tsoukalas, "Liposomal cisplatin combined with paclitaxel versus cisplatin and paclitaxel in non-small-cell lung cancer: a randomized phase III multicenter trial," *Annals of Oncology*, vol. 21, pp. 2227 - 2232, 2010.
- [211] A. C. Roy, S. R. Park, D. Cunningham, Y. K. Kang, Y. Chao, L. T. Chen, C. Rees, H. Y. Lim, J. Taberero, F. J. Ramos, M. Kujundzic, M. B. Cardic, C. G. Yeh and A. de Gramont, "A randomized phase II study of PEP02 (MM-398), irinotecan or docetaxel as a second-line therapy in patients with locally advanced or metastatic gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma," *Annals of Oncology*, vol. 24, pp. 1567 - 1573, 2013.
- [212] A. Keshavarz, J. Karimi-Sabet, A. Fattahi, A. Golzary, M. Rafiee-Tehrani and F. A. Dorkoosh, "Preparation and characterization of raloxifene nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution (RESS)," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 63, pp. 169 - 179, 2012.
- [213] C. Atila, N. Yildiz and A. Calimli, "Particle size design of digitoxin in supercritical fluids," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 51, pp. 404 - 411, 2010.
- [214] A. Z. Hezagve, S. Aftab and F. Esmailzadeh, "Micronization of creatine monohydrate via rapid expansion of supercritical solution (RESS)," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 55, pp. 316 - 324, 2010.
- [215] H. Yu, X. Zhao, Y. Zu, X. Zhang, B. Zu and X. Zhang, "Preparation and characterization of micronized artemisinin via a rapid expansion of supercritical solutions (RESS) method," *International Journal of Molecular Science*, vol. 13, pp. 5060 - 5073, 2012.
- [216] H. R. Satvati and M. N. Lotfollahi, "Effects of extraction temperature, extraction pressure and nozzle diameter on micronization of cholesterol by RESS process," *Powder Technology*, vol. 210, pp. 109 - 114, 2011.
- [217] A. Z. Hezave and F. Esmailzadeh, "Investigation of the rapid expansion of supercritical solution parameters effects on size and morphology of cephalixin particles," *Journal of Aerosol Science*, vol. 41, pp. 1090 - 1112, 2010.
- [218] E. Torino, I. D. Marco and E. Reverchon, "Organic nanoparticles recovery in supercritical

- antisolvent precipitation," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 55, pp. 300 - 306, 2010.
- [219] S. Chang, M. Lee and H. Lin, "Role of phase behavior in micronization of lysozyme via a supercritical anti-solvent process," *Chemical Engineering Journal*, vol. 139, pp. 416 - 425, 2008.
- [220] A. Tenorio, M. D. Gordillo, C. Pereyra and E. J. M. de la Ossa, "Controlled submicro particle formation of ampicillin by supercritical antisolvent precipitation," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 40, pp. 308 - 316, 2007.
- [221] J. C. Imperiale, G. Bevilacqua, P. T. V. e Rosa and A. Sosnik, "Production of pure indinavir free base nanoparticles by a supercritical anti-solvent (SAS) method," *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 40, pp. 1607 - 1615, 2014.
- [222] A. Montes, A. Tenorio, M. D. Gordillo, C. Pereyra and E. J. M. de la Ossa, "Screening design of experiment applied to supercritical antisolvent precipitation of amoxicillin: exploring new miscible conditionns," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 51, pp. 399 - 403, 2010.
- [223] P. Kalantarian, A. Rouholamini, Najafabadi, I. Haririan, A. Vatanara, Y. Yamimi, M. Darabi and K. Gilani, "Preparation of 5-fluorouracil nanoparticles by supercritical antisolvents for pulmonary delivery," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 5, pp. 763 - 770, 2010.
- [224] C. Prieto, L. Calvo and C. M. M. Duarte, "Continuous supercritical fluid extraction of emulsions to produce nanocapsules of vitamin E in polycaprolactone," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 124, pp. 72 - 79, 2017.
- [225] G. Levai, J. Q. Albarelli, D. T. Santos, M. A. A. Meireles, A. Martin, S. Rodriguez-Rojo and M. J. Cocero, "Quercetin loaded particles production by means of supercritical fluid extraction of emulsions: process scale-upstudy and thermo-economic evaluation," *Food and Bioproducts Processing*, vol. 103, pp. 27 - 38, 2017.
- [226] D. F. Tirado, I. Palazzo, M. Scognamiglio, L. Calvo, G. D. Porta and E. Reverchon, "Astaxanthin encapsulation in ethyl cellulose carriers by continuous supercritical emulsions extraction: a study on particle size, encapsulation efficiency, release profile and antioxidant activity," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 150, pp. 128 - 136, 2019.
- [227] C. Gimenez-Rota, I. Palazzo, M. R. Scognamiglio, A. Mainar, E. Reverchon and G. D. Porta, " β -Carotene, α -tocopherol and rosmarinic acid encapsulated within PLA/PLGA microcarriers by supercritical emulsion extraction: Encapsulation efficiency, drugs shelf-life and antioxidant activity," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 146, pp. 199 - 207, 2019.
- [228] G. D. Porta and E. Reverchon, "Nanostructured microspheres produced by supercritical

fluid extraction of emulsions," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, no. 5, pp. 1020 - 1033, 2008.

- [229] G. D. Porta, R. Campardelli, N. Falco and E. Reverchon, "PLGA microdevices for retinoids sustained release produced by supercritical emulsion extraction: continuous versus batch operation layouts," *Journal of Pharmaceutical Science*, vol. 100, no. 10, pp. 4357 - 4367, 2011.
- [230] S. K. Luther, J. J. Schuster, A. Leipertz and A. Braeuer, "Non-invasive quantification of phase equilibria of ternary mixtures composed of carbon dioxide, organic solvent and water," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 84, pp. 146 - 154, 2013.
- [231] M. N. Kashid, F. Platte, D. W. Agar and S. Turek, "Computational modelling of slug flow in a capillary microreactor," *Journal of Computational and Applied Mathematics*, vol. 203, pp. 487 - 497, 2007.
- [232] S. K. Luther, J. J. Schuster, A. Leipertz and A. Braeuer, "Microfluidic investigation into mass transfer in compressible multi-phase systems composed of oil, water and carbon dioxide at elevated pressure," *The Journal of Supercritical Fluids*, vol. 84, pp. 121 - 131, 2013.

謝辞

本研究を完遂するにあたり、終始ご指導を賜りました東京工業大学物質理工学院 下山裕介教授に、厚く御礼を申し上げます。

本論文の審査にあたり、多大なる助言を賜りました、東京工業大学物質理工学院 関口秀俊教授、大河内美奈教授、吉川史郎教授、松本秀行教授に深い感謝の意を表します。

また、同大学院下山研究室の各位には、研究の遂行に当たり、日頃より有益なご討論をして頂いたことに心より感謝いたします。

最後になりますが、研究の技術面に関してご支援いただいた国立大学法人東京工業大学 技術部大岡山分析部門の皆さまに、厚く御礼申し上げます。

令和2年3月