

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	微小流路を利用したリポソームの連続形成プロセスに関する研究
Title(English)	
著者(和文)	秋山龍之介
Author(English)	Ryunosuke Akiyama
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京科学大学, 報告番号:甲第308号, 授与年月日:2025年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:下山 裕介,松本 秀行,森 伸介,和田 裕之,原田 琢也
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Institute of Science Tokyo, Report number:甲第308号, Conferred date:2025/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

# 博士論文

## 微小流路を利用したリポソームの 連続形成プロセスに関する研究

東京科学大学大学院  
理工学系 物質理工学院 応用化学系 応用化学コース  
秋山 龍之介  
指導教員：下山 裕介 教授

# 目次

第1章 緒言 .....	5
1.1 背景 .....	5
1.2 本研究の目的 .....	6
1.3 本論文の構成 .....	6
第2章 既往の研究 .....	8
2.1 リポソームの作製法 .....	8
2.1.1 薄膜水和法 .....	8
2.1.2 エタノール注入法 .....	9
2.1.3 逆相蒸発法 .....	10
2.1.4 マイクロデバイスを利用した手法 .....	11
2.1.5 超臨界逆相蒸発法 .....	12
2.1.6 既往法のまとめ .....	12
2.2 エマルションの作製法 .....	13
2.2.1 機械的手法 .....	13
2.2.2 物理化学的手法 .....	13
2.2.3 マイクロデバイスを利用した手法 .....	13
2.3 有機溶媒に対する固体溶質の溶解度測定法 .....	13
2.3.1 液相濃度分析法 .....	14
2.3.2 均一相探索法 .....	14
第3章 リポソームの生成機構および溶解度の確認 .....	15
3.1 研究目的 .....	15
3.2 可視光レーザーを利用した解析装置 .....	15
3.2.1 レーザー装置の構成 .....	15
3.2.2 測定原理 .....	16
3.3 実験操作 .....	16
3.3.1 試料 .....	16
3.3.2 装置詳細 .....	17
3.3.3 実験方法 .....	17
3.3.3.1 形成機構の確認 .....	17
3.3.3.2 溶解度測定 .....	18
3.4 結果と考察 .....	18
3.4.1 リポソーム形成機構の確認 .....	18
3.4.2 溶解度測定法の妥当性の確認 .....	20
3.4.3 リン脂質の各溶媒に対する溶解度測定 .....	21
3.5 まとめ .....	24

<b>第 4 章 微小流路を利用した一段階リポソームの形成.....</b>	<b>28</b>
4.1 研究目的 .....	28
4.2 実験操作 .....	28
4.2.1 試料.....	28
4.2.2 薄膜水和法によるリポソームの形成 .....	28
4.2.3 微小流路を利用したリポソームの形成.....	28
4.2.4 評価方法 .....	29
4.3 結果と考察.....	29
4.3.1 リポソーム形成の確認および薄膜水和法との比較 .....	29
4.3.2 リポソーム形成の平衡論的条件.....	31
4.3.3 リポソーム形成の速度論的条件.....	32
4.3.4 リポソームのサイズと流動状態の関係性.....	35
4.3.5 リポソームのサイズとリン脂質の関係性.....	36
4.4 まとめ .....	37
<b>第 5 章 微小流路を利用した二段階リポソームの形成.....</b>	<b>40</b>
5.1 研究目的 .....	40
5.2 実験操作 .....	40
5.2.1 試料.....	40
5.2.2 微小流路を利用したエマルションの形成.....	40
5.2.3 微小流路を利用したリポソームの形成.....	40
5.2.4 評価方法 .....	41
5.3 結果と考察.....	42
5.3.1 エマルションの形成の確認 .....	42
5.3.2 ミキサーの変更による粒子径および転化率への影響 .....	43
5.3.3 混合部の長さや内径の変更による粒子径および転化率への影響....	43
5.3.4 リン脂質濃度の変更による影響.....	45
5.3.5 リポソームの形成の確認.....	47
5.3.5.1 一段階目の影響 .....	47
5.3.5.2 二段階目のミキサーの変更.....	48
5.3.5.3 Lecithin 濃度および Ethanol 濃度の変更.....	50
5.4 まとめ .....	54
<b>第 6 章 超臨界と微小流路を利用したリポソームの形成 ....</b>	<b>57</b>
6.1 研究目的 .....	57
6.2 実験操作 .....	57
6.2.1 試料.....	57
6.2.2 リポソームの形成 .....	57
6.2.3 PEG 化リポソームの形成 .....	59

6.2.4	薄膜水和法による PEG 化リポソームの形成 .....	59
6.2.5	評価方法 .....	60
6.3	結果と考察.....	61
6.3.1	Lecithin リポソームの粒子径及びカプセル化効率.....	61
6.3.1.1	Lecithin 溶液及び Timolol maleate 溶液の流量の影響 .....	61
6.3.1.2	H <sub>2</sub> O の流量の影響及びコイル追加による影響.....	63
6.3.1.3	コイル追加後の Lecithin 溶液の流量の影響 .....	65
6.3.1.4	コイル追加後のマイクロチャンネル (C <sub>5</sub> ) の長さの変更の影響 .....	66
6.3.2	DSPC リポソームの粒子径及びカプセル化効率 .....	67
6.3.3	PEG 化リポソームの形成 .....	68
6.3.3.1	PEG 脂質投入ラインの影響 .....	68
6.3.3.2	リポソームの粒子径分布と EE に対する作製法の影響 .....	69
6.3.3.3	リポソームの粒子径と EE に対する DSPC および DSPE-PEG 濃度の影響 .....	70
6.3.3.3	PEG 化リポソームの FALT の確認 .....	72
6.4	まとめ .....	73
第 7 章	結言 .....	83
7.1	結言.....	83
7.2	将来展望.....	84
参考文献	.....	86
業績	.....	102
謝辞	.....	103

# 第1章 緒言

## 1.1 背景

近年、薬物送達機構(Drug Delivery System: DDS)[1-4]が医薬品・化粧品関係で注目を集めている。DDS とは必要な部位に必要な時間、必要な量届ける技術である。これは有効成分が標的部位への到達前に分解吸収されることによる副作用を防ぐこと[5]と、標的部位に到達させるために過剰量必要となっていた有効成分の使用量を削減することが目的である。DDS 技術は広く研究されており[6, 7], ナノ粒子[8-13], 医薬品共結晶[14-19], エマルジョン[20-25], マイクロスフィア[26-31]など多くの薬物キャリアが開発されている。その中でもリポソームと呼ばれるものが注目され多く研究開発されている[32-34].

リポソームとは、リン脂質の二重膜により形成され内部に特有な水相を持つ構造体である[35]. Fig.1.1 にリポソームの構造を示す。リン脂質由来の構造体であるため、生体親和性が高く生分解性で体内での悪影響が少ない[36]. また、内部に特有な水相を持つ構造体であるため水性の原薬を生体環境から保存し、原薬を体内に送達することができる。しかし、リポソームの構造を崩さずに効果的なデリバリーを実現するためには、リポソームのサイズをコントロールする必要がある。また、効果的なデリバリーを実現するためには、原薬の高いカプセル化効率 (Encapsulation Efficiency: EE) も必要です。そのため、リポソームを作製する際には、高いカプセル化効率を達成しつつ、サイズを制御できる方法が望まれている。

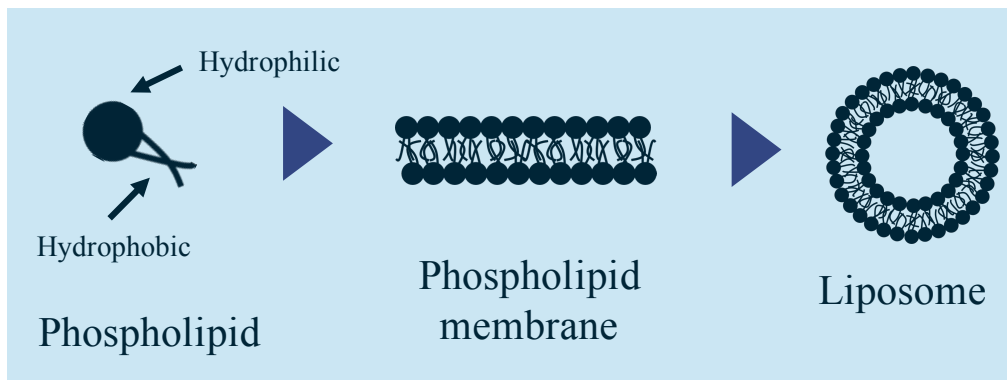


Fig.1.1 Structure of liposome

リポソームの構造は Bangham ら[37]によって初めて報告され、薄膜水和法[38-44], 超音波法[45-49], 界面活性剤除去法[50-54], 溶媒注入法[55-60], 逆相蒸発法[61-65]など、多くのリポソーム製造技術が開発されてきた。しかし、これらの方法は、人体に有害な有機溶媒を大量に必要とする。リポソームを薬物キャリアとして使用する際には、残存する有機溶媒を加熱により完全に除去する必要があるため、有機溶媒の使用は好ましくない。有機溶媒の除去工程は多段階で行われることが多く、エネルギーコストが高い。またこれらの方法は大量生産ができないという問題がある。また現在産業用に利用されている手法は薄膜水和法がほとんどである。しかし、この手法では、脂質膜の水和過程が制御できないため、不規則な形状の膜や不均一なリポソームが形成

される[66, 67]. さらに粒子径を制御するために後処理を施すため更なる生産効率の悪化が起こりうる[68].

これらの問題を解決するため新たな手法の開発が行われている. 粒子径制御という観点からの手法として微小流路を利用したリポソームの生成[69-79]というものが行われている. 微小流路を利用することで反応場を小型化することで, 再現性の低さや制御製のなさ, 効率の悪さといった既往のリポソーム作製法の問題点を解決しようとしたものである. また, 専用のマイクロデバイスを作製している関係上拡張性の低さや使用する物質を変更した際に新たなマイクロデバイスを作製する必要があるという問題点がある.

また上記した有機溶媒の使用という問題点を解決するために超臨界二酸化炭素を利用したリポソーム生成法[80-88]も研究が行われている. 超臨界流体(Super Critical Fluid: SCF)とは, 高密度で気体のような粘性をもち良好な物質移動を促すなど, 液体と気体の両方の物理化学的性質を兼ね備えている. 二酸化炭素は安価で毒性も少なく, 臨界圧力が 73.8 bar, 臨界温度が 31.1 °Cと低い為, 医薬品製造に適した安全な流体である. 有機溶媒の代わりに超臨界二酸化炭素を用いることで有機溶媒の削減が出来るだけでなく, リポソーム生成においての操作温度の低下ができ, また減圧処理で溶媒とリポソーム溶液を分離可能であるため, 製造コスト削減にもつながる[89, 90]しかしながら, これらの方法はバッチ式であるため, リポソームの制御が難しいという問題点がある.

そのため本研究では, 簡易的にプロセス変更の可能な微小流路を用いたリポソームの生成と超臨界二酸化炭素を利用した微小流路でのリポソームの作製と制御, さらに表面修飾を行なった. またこれらの実験を行う際の知見としてリン脂質の溶解度のデータが必要となるが, 現在リン脂質の溶解度に関するデータがあまり存在しない. そのため, 今回はリン脂質の溶解度測定も行なった. さらにリポソームの形成プロセスもはっきりとされていないため, その探索も行なった.

## 1.2 本研究の目的

本研究では 1.1 で示したように, 粒子径制御可能で様々な問題を解決したプロセスの提案を目指し, 微小流路を利用した一段階のリポソームの生成を行う. そのために必要となる生成機構と溶解度の探索を行う. 次に内包率と拡張性の向上を目指し, 微小流路を利用した二段階のリポソームの生成を行う. また有機溶媒の使用量削減と内包率の向上を目指し超臨界二酸化炭素を用いた微小流路でのリポソームの生成を行う. さらには表面修飾リポソームを形成することも取り組んだ. これらを実現するために微小流路を利用した各リポソーム生成手法の制御指針を構築していくことが目的である.

## 1.3 本論文の構成

本論文では7章で構成されている.

- ・第1章では, 本研究の背景と目的について概説した.
- ・第2章では, 溶解度測定とリポソームの製造法に関する既往研究を紹介した.

- ・第3章では、リポソームの形成機構の探索および溶解度測定について述べた。
- ・第4章では、微小流路を利用した一段階リポソームの形成についての実験方法、結果と考察を述べた。
- ・第5章では、微小流路を利用した二段階リポソームの形成についての実験方法、結果と考察を述べた。
- ・第6章では、超臨界と微小流路を利用したリポソームの形成についての実験方法、結果と考察を述べた。
- ・第7章では、本研究で得られた結果をまとめ結言とした。

## 第2章 既往の研究

### 2.1 リポソームの作製法

#### 2.1.1 薄膜水和法

薄膜水和法(Thin layer hydration method)とはBangham methodとも呼ばれるリポソーム生成手法であり, Banghamらによりリポソームが初めて発見された際に用いられた製法である[37]. この方法は, Fig.2.1 に示すように有機溶媒に対しリン脂質を溶解させる. クロロホルムやクロロホルムとメタノールの混合溶媒が有機溶媒として主に用いられる. この溶液から有機溶媒を除去することで脂質膜を得る. 有機溶媒の量が少量の場合乾燥窒素やアルゴン気流による溶媒乾燥, 量が多い場合はロータリーエバポレータを用いて溶媒を減圧除去もしくは加熱による蒸発乾燥をしてフラスコの縁に脂質膜を生成し, そこに水を加え震盪することによりリポソームを得るというものである.

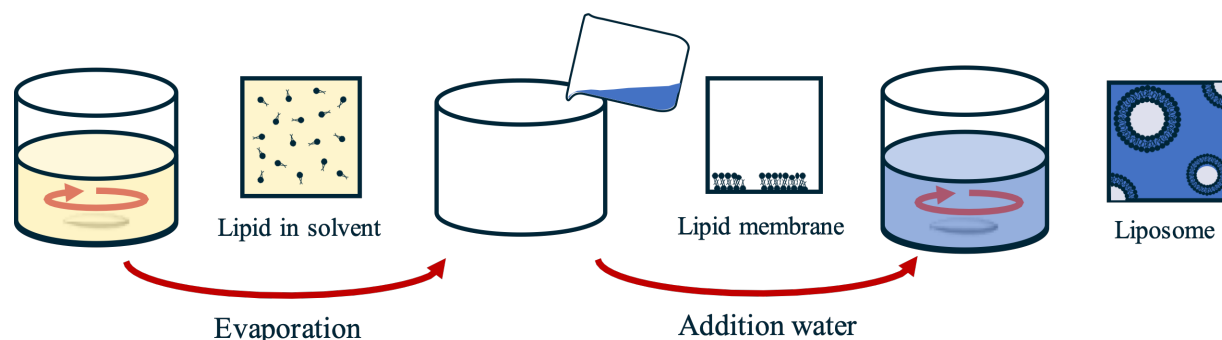


Fig.2.1 Scheme of liposome production using thin layer hydration method

この方法が簡易的であり始めに発見された手法であるため現在もリポソーム生成法として広く使われているが, 製品化するには様々な問題が存在する. まず粒子径制御が難しいという点である. 薄膜水和法ではロータリーエバポレータを利用し脂質膜の生成を行い, また同一フラスコにおいてリポソーム生成を行うため生成された粒子サイズを制御することができない. そのため粒径制御のために超音波やエクストルーダーといった追加の処理を必要としている. さらに, 多重膜のリポソームの形成を防ぐことができず, できるリポソームの均一性は非常に低い.

2 つ目に薬物効率の悪い点である. 上記の生成過程において最終段階の水和において水相に薬物を溶かすしか内包する方法がない為, どうしても薬物の大量のロスが生まれる. その際の処理として透析などによる追加処理を必要としている. これは, 製品の質という面でも生産のコストという面でも問題となる.

3 つ目に有毒な有機溶媒を利用するため完全な除去が必要となる. 上記のようにクロロホルムなどの有毒な有機溶媒が用いられており, 残存溶媒の危険性が高い. そのため溶媒除去を厳密に行う必要があり, その過程でリン脂質へのダメージが考えられ, リポソームの崩壊を起こし生産効率が悪くなる.

4 つ目にスケールアップの難しさがある. 多量のリポソームを生成しようとした場

合、反応場を巨大にする必要があるが、その際今以上に制御ができなくなりまた無駄になる試料も多くなる。

最後に連続生成の難しさである。ロータリーエバポレータのように減圧蒸発などを用いるバッチでの反応のため連続生成には不向きである。

実際本手法を用いたリポソーム形成の結果[44]として多重膜のリポソームであり、粒子径も  $0.4 \sim 3.5 \mu\text{m}$  と幅広く形成しており、粒子径の均一性はない。さらに、カプセル化効率も  $1 \sim 8.5\%$  と非常に低くなっている。

### 2.1.2 エタノール注入法

エタノール注入法(Ethanol injection method) [55, 57-60]とは、薄膜水和法で粒径の均一化のために用いられる超音波処理によるリン脂質の分解を防ぎつつ、界面活性剤を用いることのできない薬剤に対する微小な単一膜のリポソームを製作するリポソーム調整法として考案された方法である。手順としては、Fig.2.2 に示す装置を用い Ethanol にリン脂質を溶解させた溶液をシリンジから直接適度に加熱した(温度: リン脂質の相転移温度以上)水相に注入する。

この方法は水に対しリン脂質溶液を注入するのみで良いため極めて操作が簡単であり、再現性も高いが、あらかじめ水に薬物を溶解させておく必要があり、カプセル化効率が非常に低いことは薄膜水和法と大きく差は存在しない。Ethanol を注入するため生成物に Ethanol が残存しリポソームが不安定になるといった問題も存在する。さらには、Ethanol 残存濃度の限界や粒子径の制御因子が濃度であるとされているため、粒子径を大きく変動させることは難しく、また濃度の均一化を測るためにはスケールアップも難しいため多量生産できず、バッチでの反応のため連続生産にも不向きである。実際本手法を用いたリポソーム形成の結果[91]として Ethnaol 濃度が低いと  $100 \text{ nm}$  以下の粒子径となっており、DDS で利用する際よく用いられる粒子径レンジである  $100 \sim 300 \text{ nm}$  付近にするには Ethanol 濃度が  $30\%$  を超えなければ形成ができていないといった結果が示されている。またカプセル化効率は薬物により異なるが  $0.1 \sim 50\%$  と高いものもあればほとんど内包できないものまで存在する[60]。

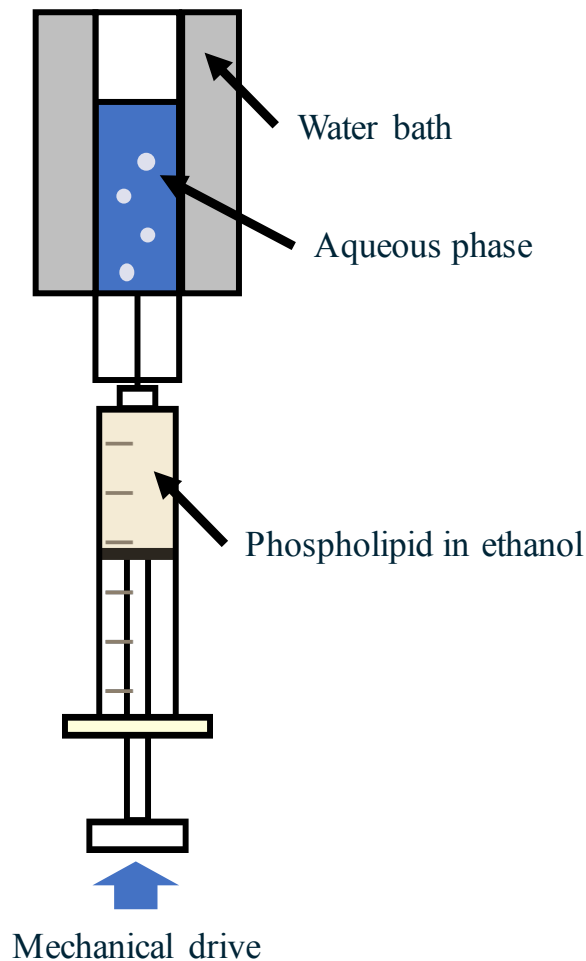


Fig.2.2 Schematic diagram of experimental equipment of ether injection method

### 2.1.3 逆相蒸発法

逆相蒸発法(Reverse phase evaporation method) [61-65]は Fig.2.3 に示すようにリン脂質を有機溶媒に溶かし，そこに水相を加え超音波で攪拌することで W/O エマルションを作製，その後ロータリーエバポレータで溶媒を減圧乾燥する．その過程で一部のエマルションが崩壊し，水相ができ余っていたリン脂質によりエマルションの膜を二重膜にすることでリポソームを生成する．

この方法は反応場が大きい為，制御性や再現性の悪さが存在するため粒子径やカプセル化効率が安定しない．さらには操作が煩雑である点，また有機溶媒の完全除去の必要性などの問題点がある．実際本手法の結果[92]として粒子径は 200 ~ 1000 nm，カプセル化効率は 30 ~ 60%と安定性は見られないが，前二つの手法と比べるとカプセル化効率は非常に増加していることがわかる．

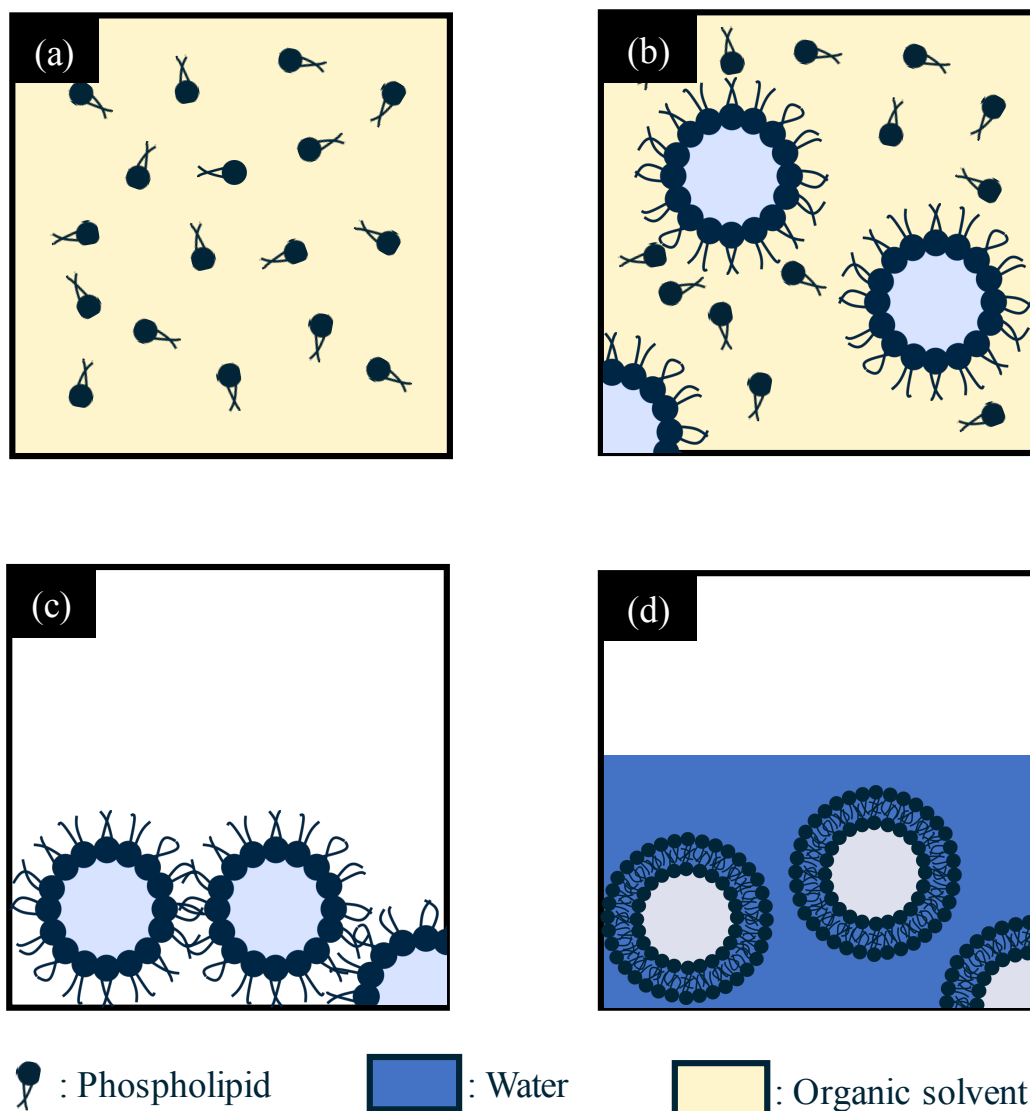


Fig.2.3 Scheme of liposome production using reverse phase evaporation method  
(a) Phospholipid in organic solvent, (b) Water in organic solvent emulsion,  
(c) Evaporation of organic solvent, (d) Liposome

#### 2.1.4 マイクロデバイスを利用した手法

層流を利用したマイクロ流体アプローチは、流れの状態（混合条件）を正確に制御し、均一なリポソームを連続的に調製する有望な解決策である[73, 74]. この手法では、リン脂質/アルコール溶液をマイクロデバイス内で制御された層流の下で水溶液と混合する. 限られた空間での安定した対向拡散は、脂質膜の形成、成長、自己組織化など、脂質からリポソームへの変化を制御することができ、均一なリポソームの連続的な形成を可能にする. この原理からわかるように、ミキサーや連結管は、流れの状態やリポソームの性質を制御するために注意深く設計されなければならない. そのため、多くの研究者は、代表的な内径(I.D.)が 100  $\mu\text{m}$  未満[94, 95, 105, 106], 100 - 500  $\mu\text{m}$ [93-95, 97-100, 103], 500 - 1000  $\mu\text{m}$ [103]の長方形[94-104, 106, 107]や円形[93, 105]の内部形状を持つ T[93], cross[94-100], Y[101-104], V[93]の二次元形状のミキサーや三次元クロス型ミキサー[94, 103, 105-107]を開発してきた. これらの

様々なミキサーは、直管[93-100, 103, 105-107], 蛇行管[103], 内側に herringbone 構造を持つ直管[101, 102, 104]に接続されており, 内径  $100\ \mu\text{m}$  未満[94, 95, 105, 106],  $100\text{-}500\ \mu\text{m}$ [94, 95, 97-104],  $500\text{-}1000\ \mu\text{m}$ [93]の代表的な内径を持つ長方形[94-104, 106, 107]と円形[93, 105]の内部形状を持つ. このようなマイクロミキシングシステムは, 流体力学的知見により, 流動状態とリポソームサイズを制御することが可能である. しかし, 既往の研究は, 流速によるリポソームサイズの変化に限定されており, 高い生成物収率, 高いリポソーム濃度, 十分な滞留時間など, 効率的なリポソーム調製を達成するための平衡および動学的知識が著しく不足している. さらに, これまでの研究は, マイクロ流体フローシステムに限定されており, マイクロフローシステムには, メリットだけでなく, 圧力損失[108]や流路の目詰まり[109]などの潜在的な懸念もある. したがって, リポソームの効率的な形成条件とサイズ制御性を, マイクロからミリ流体プロセスにおける平衡および速度論的側面から明らかにする必要がある. 一例として本手法による結果[101]は粒子径が均一で約  $50\text{nm}$  と小さくカプセル化効率は約  $50\%$ と逆相蒸発法と同じく他手法に比べ高い効率を示した.

### 2.1.5 超臨界逆相蒸発法

超臨界逆相蒸発法(Supercritical reverse phase evaporation method) [80-86]は 2.1.3 で述べた逆相蒸発法に関して超臨界  $\text{CO}_2$  を利用することで有毒な有機溶媒の使用の削減を目的とし考案された方法である. リン脂質と Ethanol をあらかじめ耐圧セルに導入し, 超臨界二酸化炭素を導入する. 平衡状態になったのち HPLC ポンプで内包物を含んだ水溶液を注入する. その後, 超臨界二酸化炭素を減圧処理で取り除くことでリポソーム溶液を得るという方法である.

この方法では, 有毒な有機溶媒の使用を避けることができ, 利用した Ethanol も超臨界二酸化炭素によって除去が可能となる. 粒子径に関しては均一ではあるが操作因子による変動が何で起きているのかが不明なことが多く圧力変動で粒子径に影響があるものもあればそうでない結果のものも存在している. さらに, バッチ式の生成法であるため連続生成に向かない点が問題である. 一例として本手法による結果[110]は約  $500\ \text{nm}$  で均一な粒子が形成できるが操作因子による粒子径の変更はできず, カプセル化効率も約  $10\sim 40\%$ と未だ高効率とは言えない.

### 2.1.6 既往法のまとめ

上記のように各手法において利点と問題点が存在している. Fig.2.4 にまとめを示す. 各々に関し全てが良い条件となる手法は存在していない. 特にカプセル化効率がどの手法でも低い状況である. その中ではマイクロデバイスを利用した手法が総合的に見て良い実験手法となっている. そこでカプセル化効率を高く維持したまま, 更なる良い条件となるために本研究においては微小流路を利用した手法の開発を行った. また超臨界二酸化炭素利用による有機溶媒の使用量削減や安定性も見られることがわかったため微小流路と超臨界二酸化炭素利用を組み合わせた手法についても開発を行った.

Methods	Thin layer hydration	Ethanol injection	Reverse phase evaporation	Microdevice	Supercritical reverse phase evaporation
Size controllability	x	Δ	x	Δ~○	Δ
Encapsulation efficiency	x	x~Δ	x~○	Δ	Δ
High use of organic solvents	x	x~Δ	x	x~Δ	Δ~○
Operability	x~Δ	Δ	x~Δ	Δ	x
Production efficiency	x	x	Δ	Δ	x

Fig.2.4 Summary of advantages and problems associated with each method

## 2.2 エマルションの作製法

### 2.2.1 機械的手法

機械的手法[111]はホモジナイザーやミキサーなどを用い水と油を攪拌し、乳化する手法である。昔は強力な乳化剤を多量に用い低剪断力のミキサーで混ぜていたが、近年では、高剪断力を持つミキサーの利用[112]や高圧のホモジナイザーの利用[112-116]がされている。これら利用することで、乳化剤の量を減らしエマルションの微細化が可能であり、特に化粧品利用としてよく用いられるエマルションとしては皮膚透過生の向上が見込まれる微細化が可能な高圧手法は特に期待されている。

### 2.2.2 物理化学的手法

物理化学的手法[117, 118]は機械的手法とは異なり強力な攪拌を行わず、乳化する手法である。機械的手法の攪拌だけでは時間が経つことで再び分離してしまうという問題がある。そのため乳化剤となる界面活性剤を利用し化学的な駆動力を利用し微力な攪拌でエマルションの形成を行う。物理化学的手法には様々な手法が存在するが転相乳化法[119-122], D相乳化法[123-126], 転相温度乳化法[118, 119, 127, 128], 液晶乳化法[129]などが存在する。

### 2.2.3 マイクロデバイスを利用した手法

マイクロデバイスを利用した手法は[130-132]は強力な攪拌を行わず、乳化する手法である。数マイクロオーダーの流路を持つマイクロデバイスを3Dプリンターなどで制作し、油と水を投入し一方の流体をも一方の流体で剪断することでエマルションを生成する。流路径に依存することが多いため、均一なマイクロサイズのエマルションを連続的に生成する手法である。本手法はエマルションのみではなくマイクロゲル[133]などの他のマイクロオーダーの単分散粒子の形成が可能とされるプロセスである。

## 2.3 有機溶媒に対する固体溶質の溶解度測定法

有機溶媒に対する固体溶質の溶解度は、プロセスの条件の設定や機能化材料の設計において重要な知見となる。特にリポソーム作製手法においては薄膜水和法であればクロロホルム、アルコール注入法であれば Ethanol や Methanol, Isopropyl alcohol などのアルコールにリン脂質を溶解させ利用している。このように有機溶媒にリン脂質を溶解させ利用する手法がほとんどでありながら、リン脂質の有機溶媒に対する溶解度

の知見は非常に少なく，リポソームの形成に関する論文においても析出するまで溶解させといった記述があるような状態である．そこで本研究においてはリン脂質の溶解度を計測すべく手法の開発を行う必要があり，既往の溶解度測定手法は以下に示すような大きく二つの方法が用いられている[134].

### 2.3.1 液相濃度分析法

液相濃度分析法とは，溶媒に対し固体溶質を過剰量加えることにより生成する，液相と固相のうち，液相の濃度を分光法で分析もしくはクロマトグラフィーなどの方法で濃度測定を行う手法である[135-137].

この液相濃度分析法の問題点の1つは，分析手法の決定が溶質により異なってくるため難しい点である．そのため測定に取り掛かる前に分析法の決定が必要となり測定に至るまで時間がかかる．

もう一つの問題点として，濃度分析を行うため，検量線の作成が必要となる．検量線の作成には均一相領域での分析が必要となり，溶解度が既知でない溶質を溶かしているので均一相の生成が難しく検量線の製作に時間がかかり，測定に時間がかかってしまう点である．

### 2.3.2 均一相探索法

均一相探索法とは，溶媒に対し固体溶質を過剰量加えることにより生成する，液相と固相の二相に対し溶媒を添加，もしくは温度を変化させることで均一相となる濃度と温度を測定する手法である[138].

この均一相探索法の問題点の一つは，均一相の把握が難しい点である．そもそも均一相が知見としてないものを扱っているため，試行錯誤を繰り返しながらの測定となる．このため，測定にかかる時間か長時間となってしまう．

もう一つの問題点として，濃度と温度の精度が正確ではなくなる点である．少量での測定となるため，溶質を量り取る時の誤差や溶媒の追加の際の誤差など濃度に正確性がなくなる．またそもそも均一相になった際の判定が難しいため濃度温度に誤差が生じ易い．

最後の問題点として，溶解度が極小の溶質に対しては適用が難しい点である．極小の溶質を量り取ることが困難であるため二つ目の問題と同様に測定に測定の正確性が失われるためである．

## 第3章 リポソームの生成機構および溶解度の確認

### 3.1 研究目的

1.1 で前述したようにリポソームの生成にはリン脂質が用いられる。微小流路を利用した生成法に関しても溶媒の濃度現象により溶解度を下げることでのリン脂質膜生成を行うため、リン脂質の溶解度の知見が必要になる。しかしながらリン脂質の溶解度データは存在せず、実際リポソームの生成を行う研究においても、濃度を決めておらず、溶解しなくなるまで溶かし利用しているものもある。また生成機構そのものもしっかりと定義されていないため溶解度とともに生成機構についても探索を行なった。本研究において測定は 25, 40 度で行った。

### 3.2 可視光レーザーを利用した解析装置

#### 3.2.1 レーザー装置の構成

本章では、可視光レーザーの透過強度変化による、液体に対する個体の溶解度測定装置を利用した。本装置では水槽(31.5 cm × 16 cm × 24 cm)に容積約 3.5 mL の光学セル(12.5 cm × 12.5 cm × 45 cm) 3 個を設置し、この光学セルに対し波長 660 nm の可視光レーザーを照射し、レーザーの照射側と反対に反射板を設置、反射光を検出した。光学セルを設置する台の下にスターラーを設置し、セル内を攪拌することができるようにしている。溶解度測定装置の概略図を Fig.3.1 に示し、実際の装置画像を Fig.3.2 に示す。

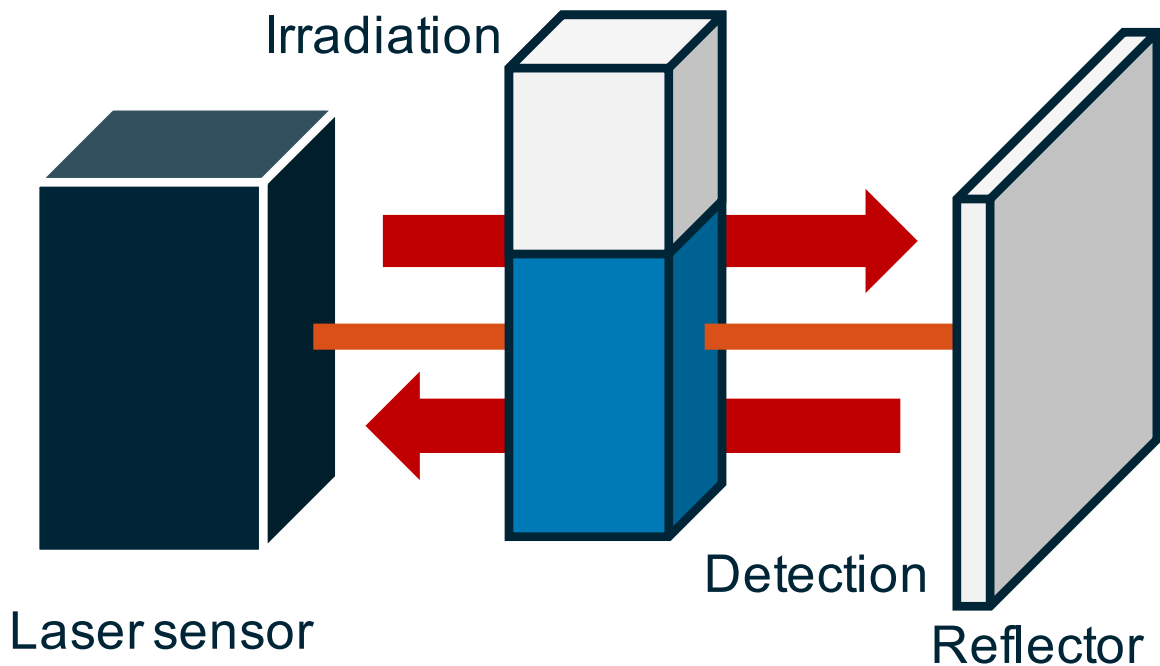


Fig.3.1 Schematic diagram of laser system

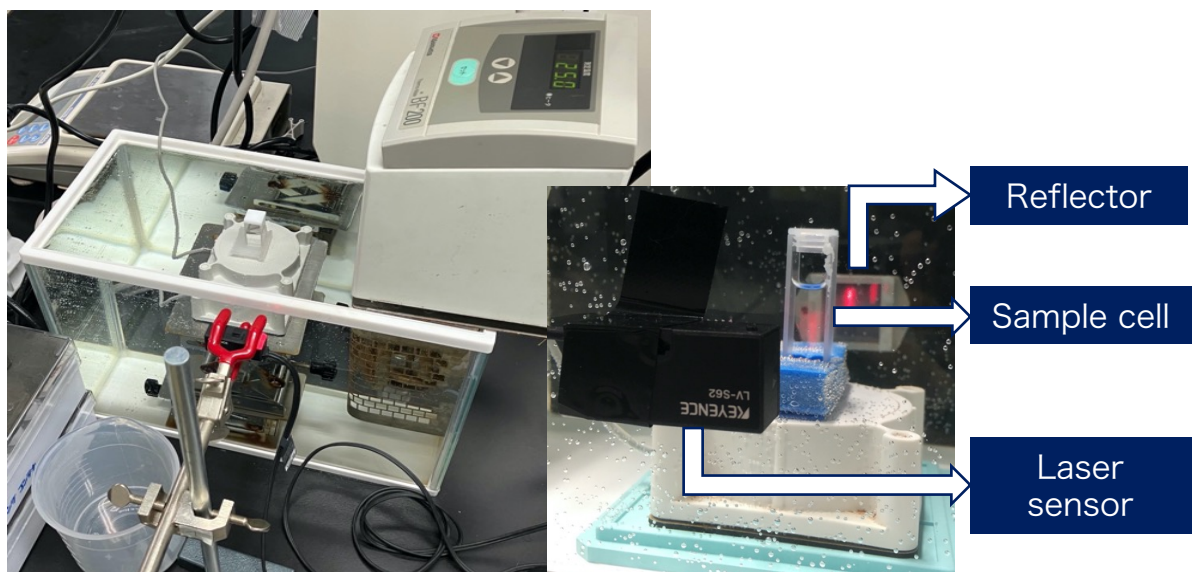


Fig.3.2 Image of the solubility measurement device

### 3.2.2 測定原理

測定原理の模式図を Fig.3.3 に示す. 光学セルの中が均一相になっている場合, 可視光レーザーの強度が一定になる. それに対し, 固液が不均一相の場合の可視光レーザーの強度は, 液体に溶解しきれない溶質の濃度に反比例する. レコーダを用いて可視光レーザーの透過強度を複数の濃度でモニタリングすることで, 光学セル内の相状態を把握することができる.

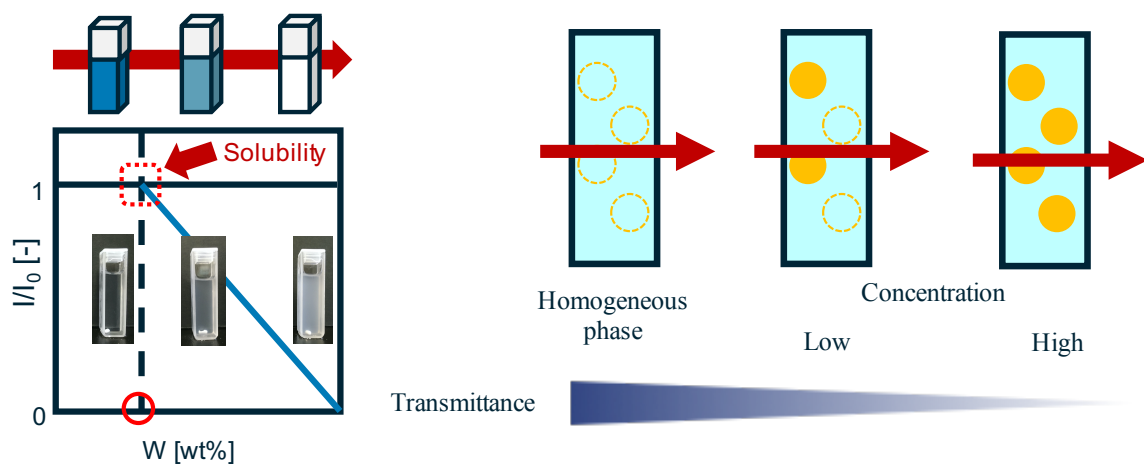


Fig.3.3 Principle of solubility measurement

## 3.3 実験操作

### 3.3.1 試料

本章では有機溶媒として Ethanol (EtOH, 純度 99.5 %以上), Methanol (MeOH, 純度 99.8 %以上), Ethyl Acetate(EA, 純度 99.5 %以上), 2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol(DEGEE, 純度 98.0%以上), Acetone(純度 99.5 %以上)を使用した. 脂質として Palmitic acid(純度 99.5 %以上), Stearic acid(純度 99.5 %以上), リン脂質として Egg yolk Lecithin(Lecithin,

純度 95.0 %以上), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC, 純度 95.0 %以上), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC, 純度 95.0 %以上), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC, 純度 95.0 %), 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(POPC, 純度 99.0 %)を使用した. Ethanol, Methanol, ETHYL ACETATE, DEGEE, Acetone, Palmitic acid, Stearic acid, Lecithin は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した. DMPC, DPPC, DSPC は東京化成工業株式会社から購入した. POPC は日油株式会社から購入した.

### 3.3.2 装置詳細

- 1) レーザーセンサ  
キーエンス社製のセンサヘッド 回帰反射 平行光エリア LV-S62 を使用した. 光源は可視光半導体レーザー, 波長は 660 nm である.
- 2) 反射板  
キーエンス社製のリフレクタ R-6L を使用した. 寸法は 45 mm × 29.4 mm, 反射部は 23 mm × 23 mm である.
- 3) ペーパーレスレコーダ  
キーエンス社製の計測器本体 5 型パネルタイプ TR-V500 を使用した.
- 4) 恒温水槽  
水槽は魚類用水槽 マリーナ スリム SMRS-300WH を使用した. 容積は 10 L, サイズは 31.5 cm × 16 cm × 24 cm, 素材はガラス/PS 等である  
恒温装置はアズワン社のサーマルロボ TR-1A を使用した. 温度調節範囲は室温+5 ~ 80 °C.
- 5) 光学セル  
オプティマ社製の石英セルを使用した. 容積は 3.5 L である.
- 6) マグネチックスターラー  
アズワン社製のマグネチックスターラー 防水タイプ S-1 を使用した. 回転数は 100 ~ 1500 rpm である.

### 3.3.3 実験方法

#### 3.3.3.1 形成機構の確認

リン脂質を Ethanol に 0.5 wt% とかした溶液を 1.5 mL 調製した. この溶液に純水を 6.0 mL h<sup>-1</sup> の速度で滴下し, その様子を可視光レーザーにて測定を行なった. 初期のリン脂質溶液のみの強度を  $I_0 = 1.0$  とし, 強度の最低値が 0.0 となるように計算を行う. そのレーザー挙動の確認と, 挙動変化各ポイントにて粒子軌跡解析法(particle tracking analysis: PTA)を用いて粒子径を測定し, 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ズ製)を用い, ネガティブ染色法を用いて状態観察を行なった. また Fig.3.3 に示すように強度が落ち始めた点から直線近似を行い, その近似直線と  $I=1.0$  の直線との交点を溶解度とした.

### 3.3.3.2 溶解度測定

可視光レーザーを利用し 30 分間測定を行い, python を用いてペーパレスレコーダに記録されたデータを用いて解析する. ペーパレスレコーダには 1 秒毎のレーザーの反射強度が記録されていく. 測定したデータの最終データから 10 秒間のうちに測定された強度の標準偏差の平均値が 0.01 以下になるまで 1 秒ずつ前にずらしながら計算を繰り返す. この標準偏差の平均値が 0.01 以下になった時を定常状態になったと仮定し, その 10 秒間のレーザーの反射強度の平均を算出する. これを各濃度で行い, 溶媒のみの強度を  $I_0 = 1.0$  とし, 強度の最低値が 0.0 となるように計算を行う. Fig.3.3 に示すように強度が落ち始めた点から直線近似を行い, その近似直線と  $I=1.0$  の直線との交点を溶解度とした.

## 3.4 結果と考察

### 3.4.1 リポソーム形成機構の確認

測定したレーザー挙動を Fig.3.4 に示した. この結果からわかるように明らかにレーザーの強度低下に段階があることがわかる. そこで挙動変化の影響を調べるために  $V_W / V_{EtOH}$  の値が 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 の各ポイントでの粒子径測定を行いその結果を Table 1. に示した.  $V_W / V_{EtOH}$  が 0.3, 0.4, 0.5 が異なる挙動のポイントであるそのためその三点において PTA 解析による粒子径分布を Fig.3.5, TEM 像を Fig.3.6 に示した.  $V_W / V_{EtOH} = 0.3$  の粒径分布や TEM 像からわかるようにミセルやリン脂質膜であるとわかる.そこから  $V_W / V_{EtOH} = 0.4$  の時にリポソームの形成が確認され,  $V_W / V_{EtOH} = 0.5$  の時には完全に全てがリポソームとなっている. このことからリポソームの形成機構としては Fig.3.7 のようにエタノール濃度の減少によりリン脂質膜となり, その後更なる濃度減少により脂質膜が自発的にリポソームになっているという機構であると考えられる.

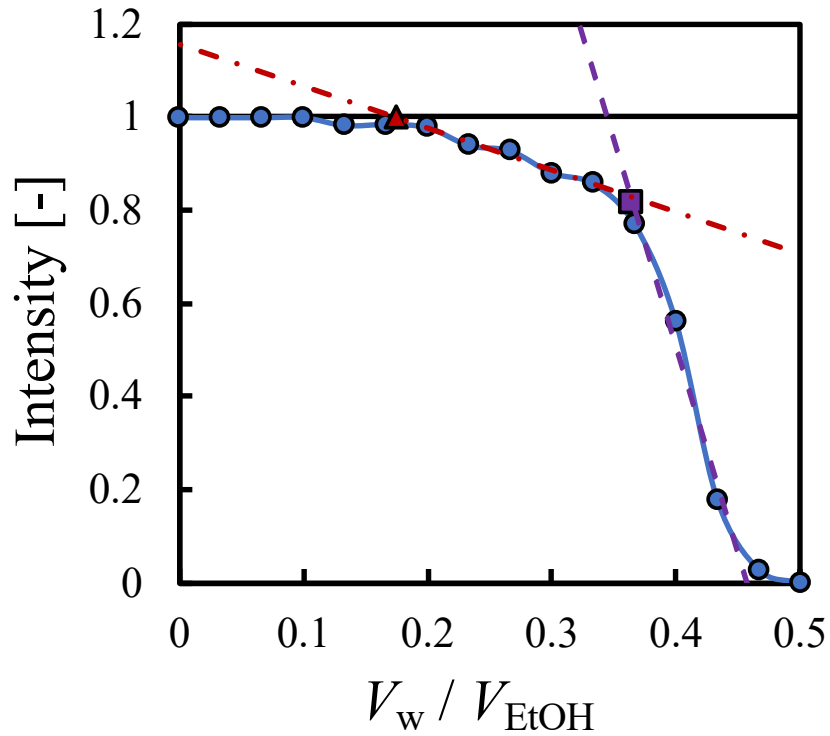


Fig.3.4 Effect of volume ratio variation on laser behavior

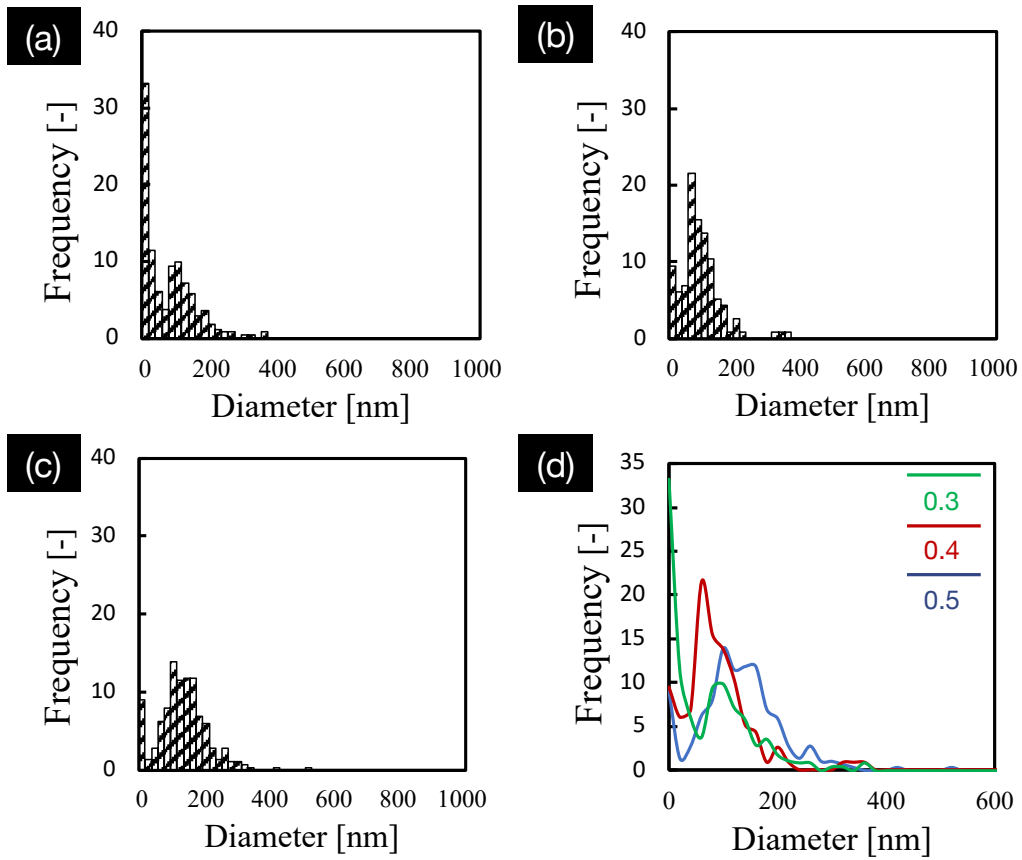


Fig.3.5 Particle size distribution and comparison at each point

(a)  $V_W / V_{EtOH} = 0.3$ , (b)  $V_W / V_{EtOH} = 0.4$ , (c)  $V_W / V_{EtOH} = 0.5$ , (d) Comparison of three points

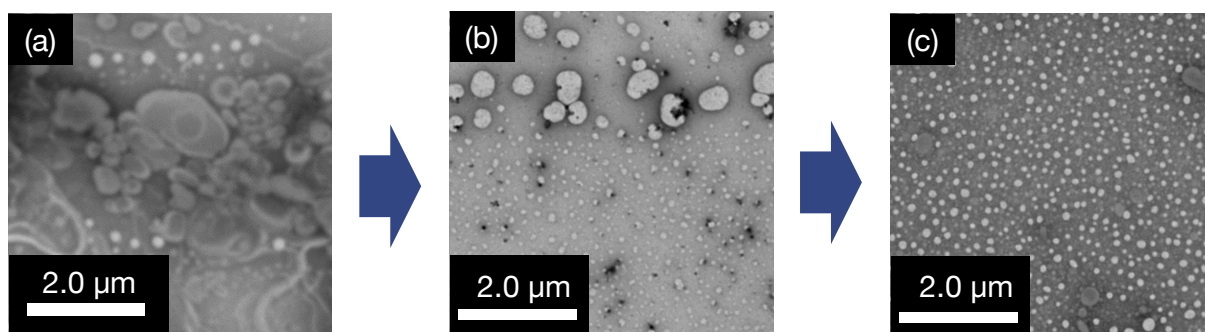


Fig.3.6 TEM images of products at each point  
 (a)  $V_W / V_{EtOH} = 0.3$ , (b)  $V_W / V_{EtOH} = 0.4$ , (c)  $V_W / V_{EtOH} = 0.5$

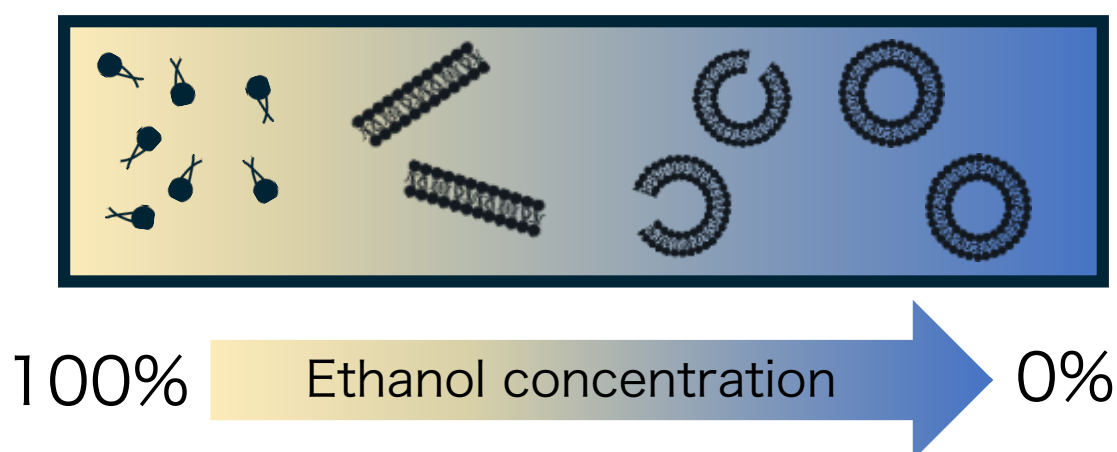


Fig.3.7 Liposome formation mechanism

### 3.4.2 溶解度測定法の妥当性の確認

文献値が存在する Palmitic acid と Stearic acid[139, 140]を利用して 23 °Cにおける溶解度測定を行い、文献値と比較することで溶解度測定における本手法の妥当性の確認を行なった。今回行った実験の結果と文献値を比較したものを Fig. 3.8 に示した。文献値では、Palmitic acid の Ethanol に対する溶解度及び Acetone に対する溶解度は、9.71 wt% ・ 7.20 wt%、Stearic acid の Ethanol に対する溶解度は、2.84 wt%である。本手法を用いた結果は、Palmitic acid の Ethanol に対する溶解度及び Acetone に対する溶解度は、9.96 wt% ・ 7.80 wt%、Stearic acid の Ethanol に対する溶解度は、2.93 wt%であった。

この結果からわかるように、本測定法によって求められた溶解度は文献値に近い値を示すことがわかり、本手法の妥当性を示すことができた。

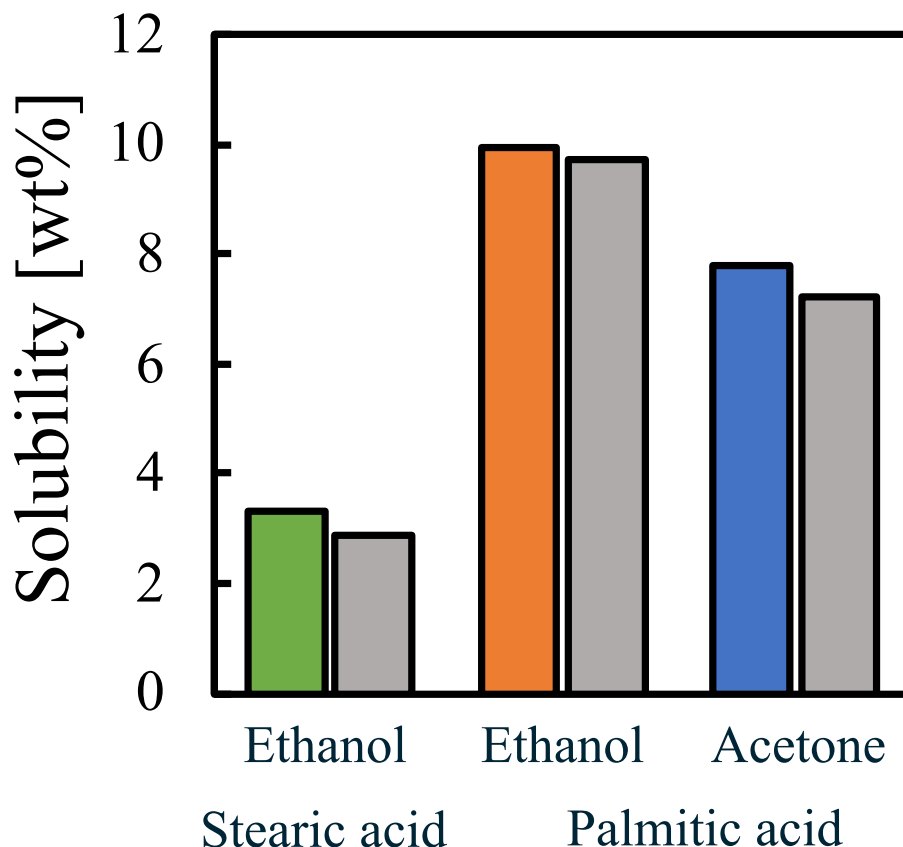


Fig.3.8 Comparison of solubility of stearic acid and palmitic acid in ethanol and acetone at 23 °C with reference values □: Reference value [139, 140]

### 3.4.3 リン脂質の各溶媒に対する溶解度測定

本章で利用したリン脂質の構造式と相転移温度[141-143]を Table 2.に示した. また 25 °C における測定データを Fig.3.9~ Fig.3.13 に示し, 測定結果のまとめを Table 3. に示した. 本研究では濃度の上限を 5 wt%とした. Table 2.に示したように DMPC < DPPC < DSPC と炭化水素鎖の長さが長くなっている. DEGEE に対する溶解度の結果からわかるように有機溶媒に対する溶解度は炭化水素鎖が長い方が低くなるのが分かる. POPC の結果から二重結合を持つことで溶解度が上昇することもわかった. Ethyl Acetate に対する溶解度は本結果から, 二重結合の有無に関わらず phosphatidylcholine (PC)は Ethyl Acetate に溶解しないことが分かる. しかしながら, Lecithin が Ethyl Acetate に溶解するのは Table 2.に示したように, Lecithin が複合リン脂質であることが原因である. Lecithin は PC 以外に phosphatidylethanolamine (PE)を多く含んでいる[144]. PE が Ethyl Acetate に溶けやすいと考えられる. また, Ethanol に対する溶解度が低い原因も PE の存在によるものである.

以上のことからリポソームの製作を行うには Ethyl Acetate は PC 単体を利用する際には適さず, Ethanol や Methanol などを利用すべきである. しかし炭化水素鎖の長いリン脂質を利用したい場合は溶解度に気をつける必要がある.

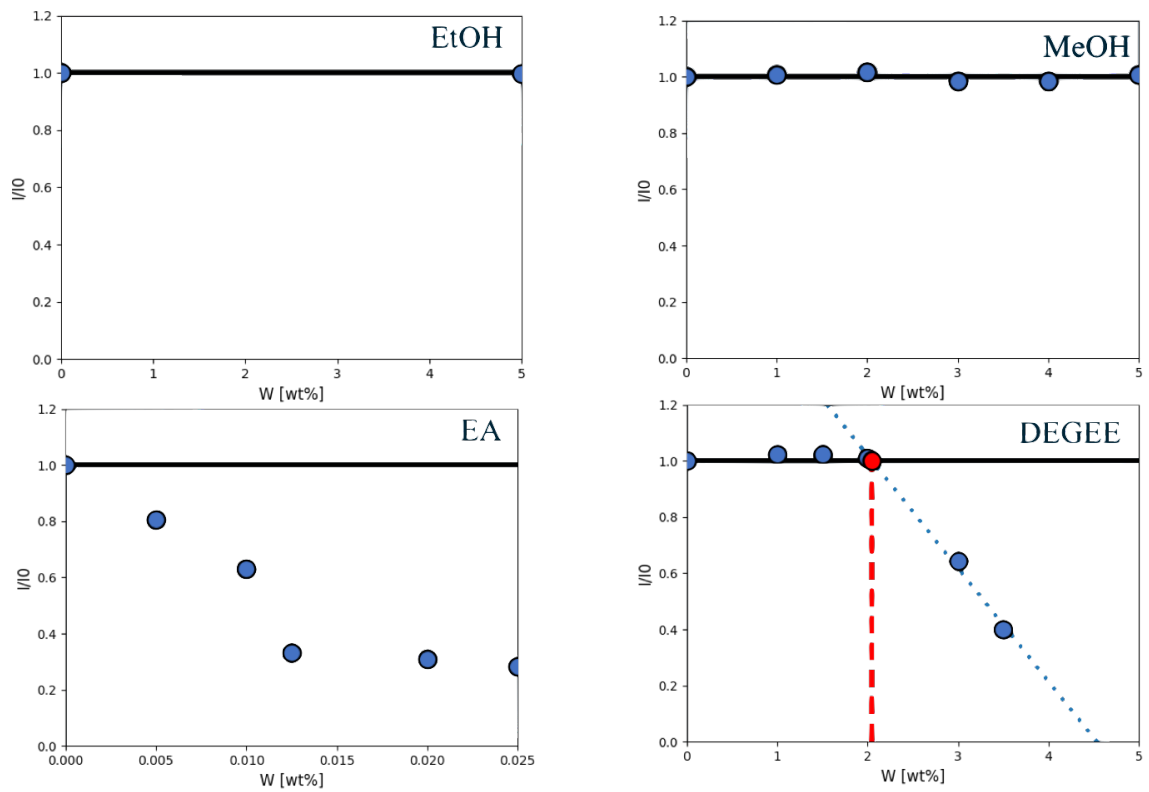


Fig.3.9 Measurement results of DMPC solubility for each solvent at 25 °C

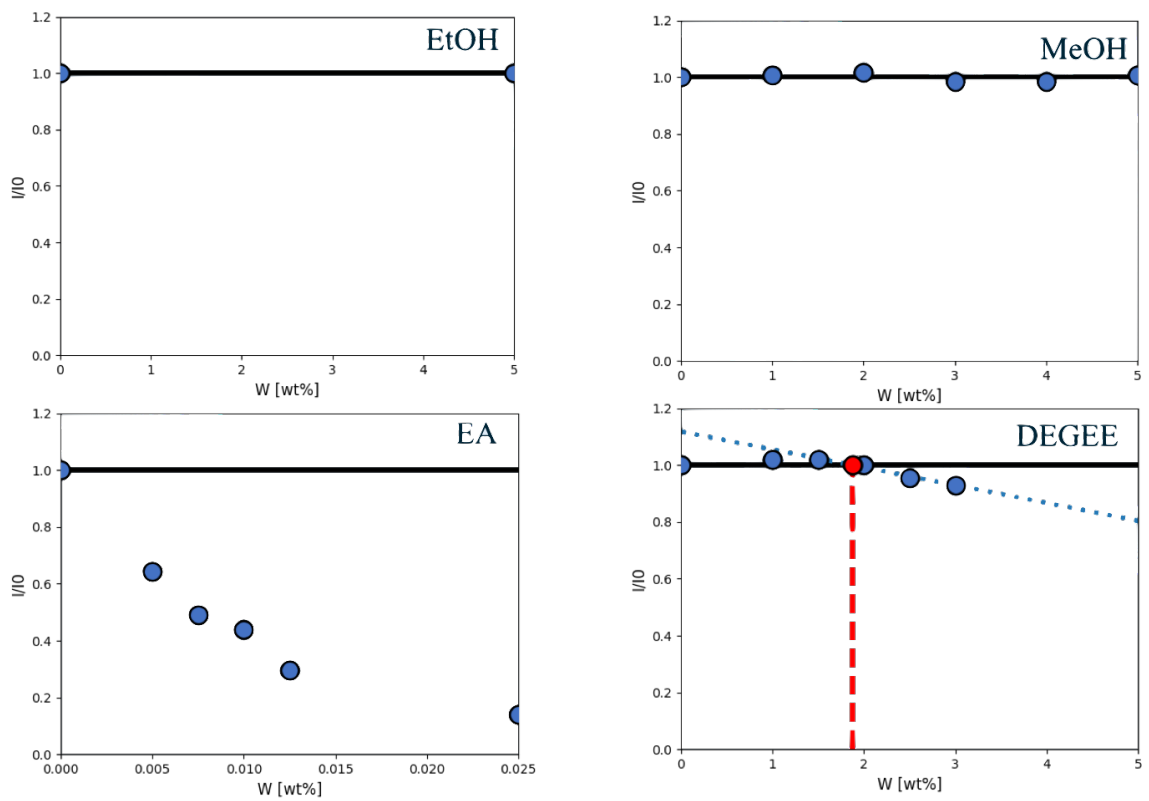


Fig.3.10 Measurement results of DPPC solubility for each solvent at 25 °C

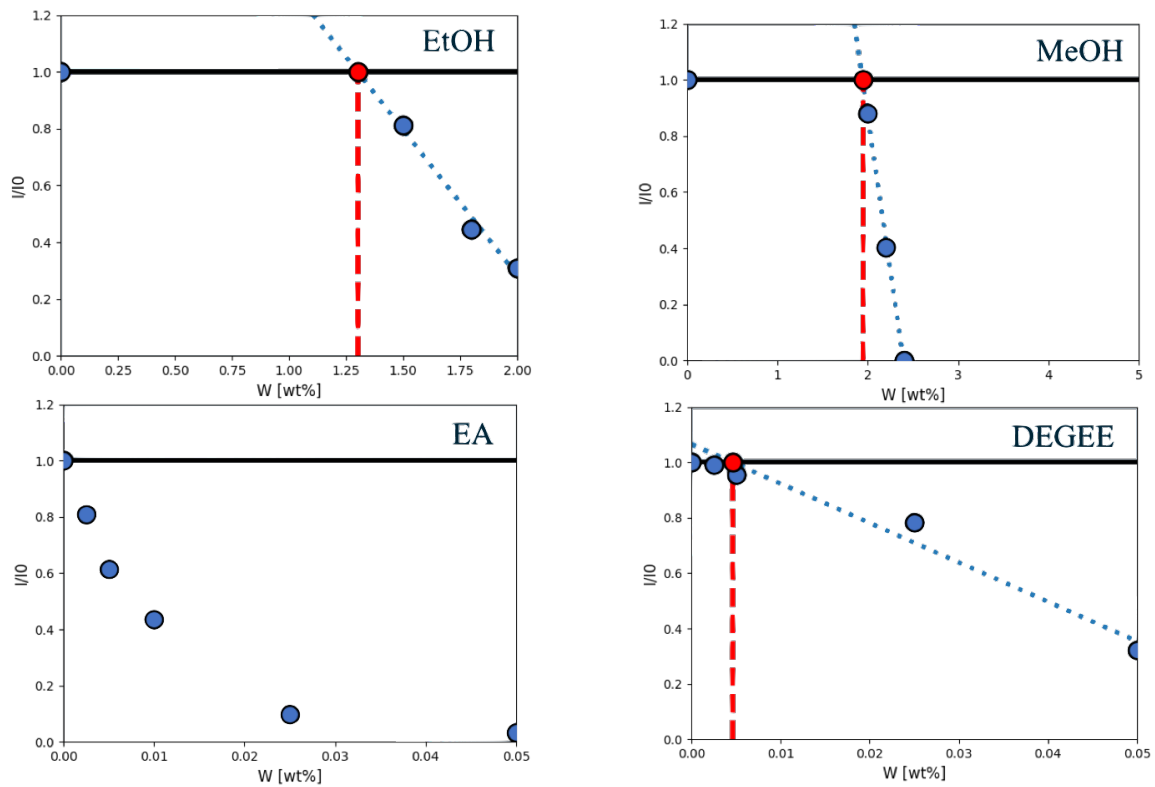


Fig.3.11 Measurement results of DSPC solubility for each solvent at 25 °C

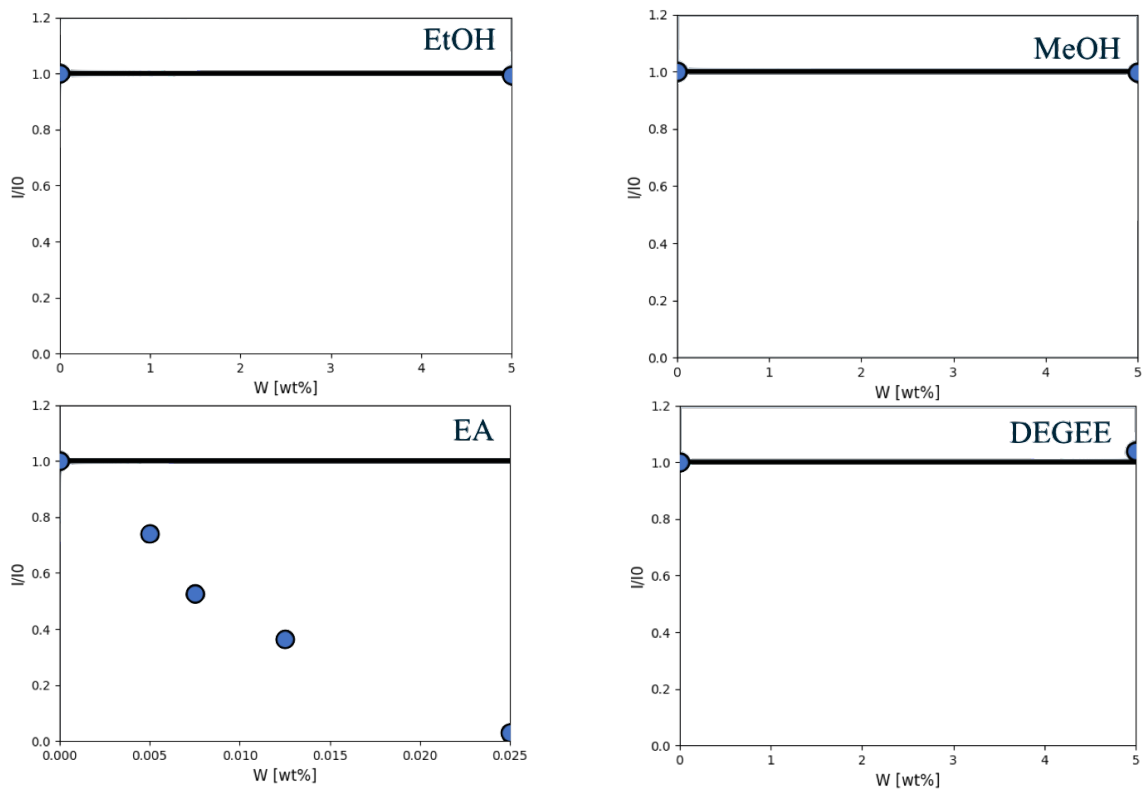


Fig.3.12 Measurement results of POPC solubility for each solvent at 25 °C

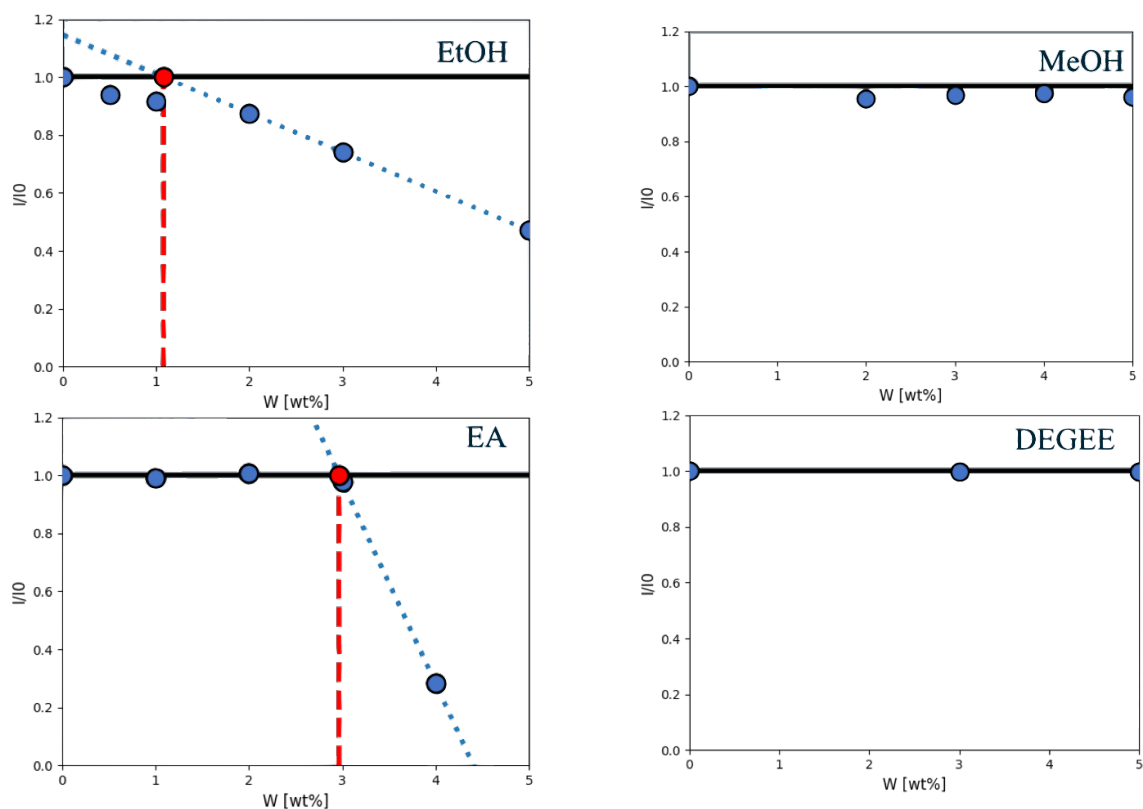


Fig.3.13 Measurement results of lecithin solubility for each solvent at 25 °C

### 3.5 まとめ

本章では、以下を目的として研究を行った.

1. 可視光レーザーを利用したリポソーム形成機構の確認
2. 可視光レーザーを利用した溶解度測定装置の構築
3. リン脂質の有機溶媒に対する溶解度データの蓄積

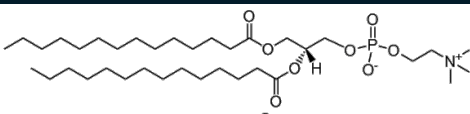
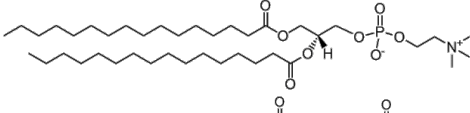
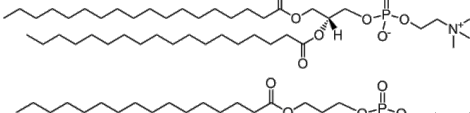
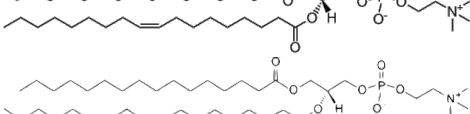

その結果として、以下の成果を得た.

1. レーザーと TEM を利用し、リポソーム形成機構を明らかにした.
2. 溶解度データの存在する物質を利用し装置及び計測法の妥当性を示した.
3. 未知であったリン脂質の溶解度データの取集に成功した.

Table 1. Size of production

NO.	$V_W / V_{EtOH}$	Size [nm]
#3-1	0.0	-
#3-2	0.1	72.96
#3-3	0.2	59.42
#3-4	0.3	79.07
#3-5	0.4	97.14
#3-6	0.5	138.01

Table 2. Phospholipids used in this study

Name	Structure	Chain length	$T_c$ [°C]
DMPC		C <sub>14:0</sub> - C <sub>14:0</sub>	24
DPPC		C <sub>16:0</sub> - C <sub>16:0</sub>	41
DSPC		C <sub>18:0</sub> - C <sub>18:0</sub>	55
POPC		C <sub>16:0</sub> - C <sub>18:1</sub>	-3
Lecithin		C <sub>16:0</sub> , C <sub>18:0</sub> , C <sub>18:1</sub> , C <sub>18:2</sub>	Unknown <sup>1)</sup>

1) Since egg yolk lecithin is a mixture, no single structural formula can be given and the transition temperature is not known.

Table 3. Solubility of phospholipids in each solvent

Phospholipid	$T$ [°C]	Solubility			
		Organic Solvent			
		EtOH	MeOH	EA	DEGEE
DMPC	25	○	○	×	2.049
	40	○	○	×	○
DPPC	25	○	○	×	1.877
	40	○	○	×	○
DSPC	25	1.301	1.941	×	0.0046
	40	1.721	○	×	0.073
POPC	25	○	○	×	○
	40	○	○	×	○
Lecithin	25	0.953	○	2.966	○
	40	0.771	○	○	○

○: over 5 wt%, ×: Not dissolve, -: Not measured

## 第4章 微小流路を利用した一段階リポソームの形成

### 4.1 研究目的

薬物キャリアとしてのリポソームは長年研究されていて、現在すでに複数のリポソーム型製剤が認可されている[145]。しかしながら、これらの薬剤はどれも薄膜水和法にて製造され、追加処理により粒子径の制御を行って製造されている。そのため粒子径制御性の低さや有毒な有機溶媒の大量使用、バッチ式な製造法による製造効率の低さ、薬物内包率の低さが問題となる。そのため第一に微小流路を利用することで連続生成を可能とし、製造効率を向上させる。その上で、1.2でも述べたように、粒子径制御可能なリポソームを製作すること、また本手法においてのパラメータ変動による形成条件の探索を目的として、微小流路を用いてリポソーム形成を行った。

### 4.2 実験操作

#### 4.2.1 試料

本章では有機溶媒として Ethanol(EtOH, 純度 99.5 %以上)を使用した。リン脂質として Egg yolk Lecithin(Lecithin, 純度 95.0 %以上), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DMPC, 純度 95.0 %以上), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DPPC, 純度 95.0 %以上), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC, 純度 95.0 %)を使用した。Ethanol, Lecithin は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。DMPC, DPPC, DSPC は東京化成工業株式会社から購入した。

#### 4.2.2 薄膜水和法によるリポソームの形成

比較実験のため薄膜水和法によるリポソームの形成を行なった。

Lecithin を Ethanol に 0.5 wt% とかした溶液を 10 g 調製した。60 °C の水浴で 30 分間 500 rpm で加熱しながら攪拌し溶媒を蒸発させた。その後デシケーターで一晩かけ溶媒を完全に除去した。これにより、バイアルの壁面にリン脂質の膜を生成した。

水を 10 g 添加し、最高速度で 10 秒間のボルテックス(ボルテックスミキサー ジェニー2, サイエントフィックインダストリーズ製)を 3 回行う。(リン脂質膜が壁面に残る場合、15 秒間の超音波処理を行い、再度 10 秒間のボルテックスを行う。) その後 4 °C で一晩静置。

水浴で 10 分間の超音波処理(超音波洗浄機 AS-22GTU, アズワン製)を行う。これによりリポソーム溶液を作製する。

#### 4.2.3 微小流路を利用したリポソームの形成

微小流路を利用したリポソームの形成装置の概略図を Fig.4.1 に示す。Lecithin を Ethanol に 0.5 wt% 溶かした。リン脂質溶液と水はシリンジポンプ(IC-3100, Kenis 社製)で供給した。恒温槽(設定温度: 25 °C)内の T 字型接合部でこれら二つの溶液を接触させ、リポソームを形成させた。実験条件は Table 4, 5. に示した。

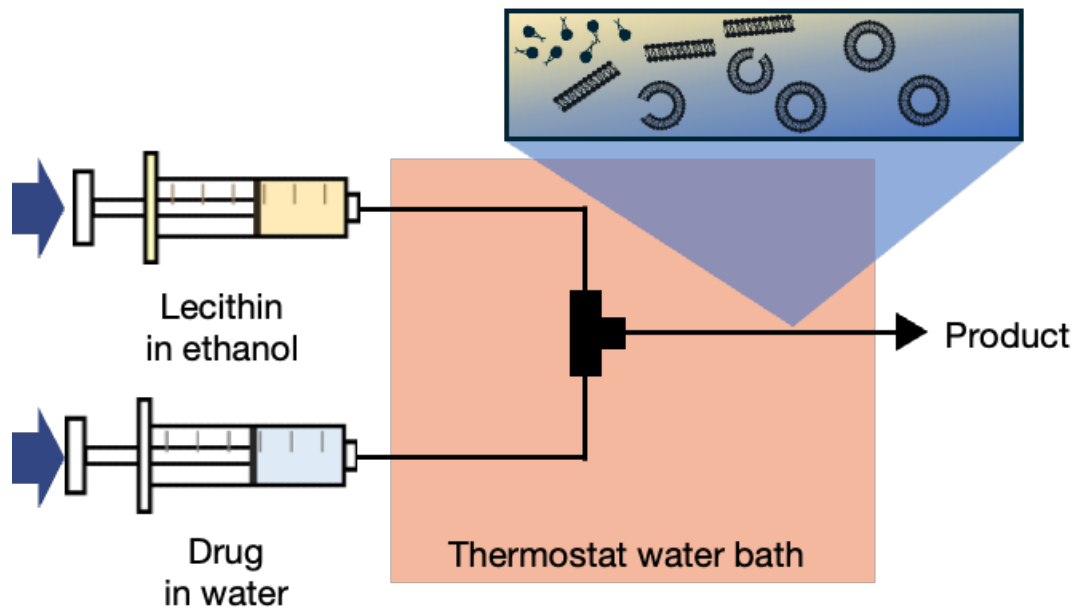


Fig.4.1 Schematic diagram of liposome formation using flow process

#### 4.2.4 評価方法

形成したリポソームの粒子径は得られた水溶液を動的光散乱法(DLS: Partica SZ-100-Z, 株式会社堀場製作所製)や粒子軌跡解析法(particle tracking analysis: PTA)を用いて 25 °Cで測定し決定した.

また透過型電子顕微鏡(transmission electron microscope: TEM, H-7650 Zero.A, 株式会社日立ハイテクノロジーズ製)を用い, ネガティブ染色法を用いてリポソームの生成確認と状態観察を行なった.

リポソームの生成効率は以下のように定義した[101, 146].

$$Yield(\%) = \left( \frac{W_{total} - W_{res}}{W_{total}} \right) \times 100 \quad (1)$$

ここで,  $W_{res}$  はリポソーム形成に使用されなかった Lecithin の重量であり,  $W_{total}$  は供給された Lecithin の総重量である. リポソーム溶液を 0.1  $\mu\text{m}$  のフィルター(PALL Co.,Ltd)に通してリポソームを除去した. ろ液を 110°Cの恒温槽で 1 時間乾燥させ, リポソーム形成に使用されなかった  $W_{res}$  を測定した.

### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 リポソーム形成の確認および薄膜水和法との比較

Fig.4.2 に示したように, 生成した溶液のチンダル現象を確認した. そのため何らかの粒子が生成できていることが示された. そこで TEM により溶液の観察を行い, Fig.4.3 のようなリポソームの TEM 像を得ることができた. これらのことから, 本手法によるリポソームの生成が可能であることがわかった.

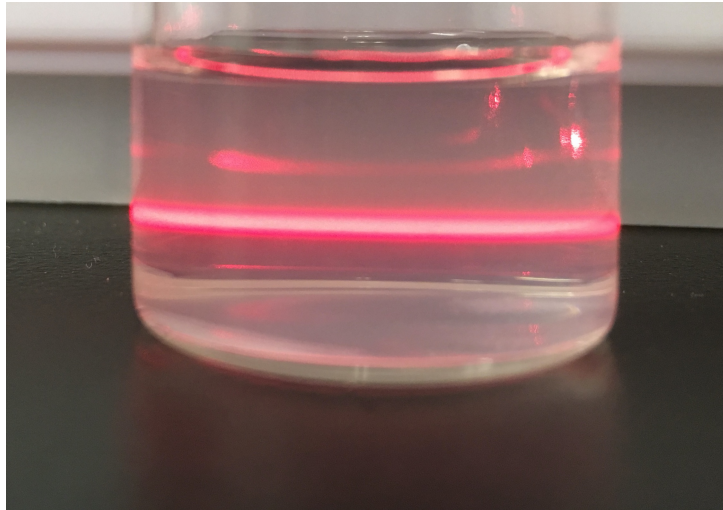


Fig.4.2 Confirmation of liposome formation by Tyndall phenomenon

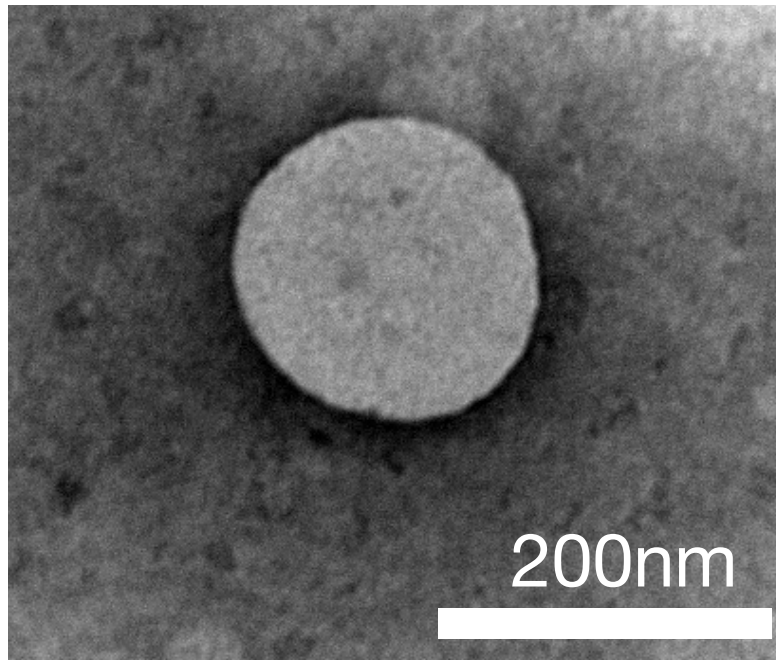


Fig. 4.3 TEM image of liposome

薄膜水和法と本手法により作製したリポソーム溶液の DLS での粒子径測定結果を Fig.4.4 に示した. 薄膜水和法では多分散であるのに対し, 本手法の粒子径分布は単分散であり本手法による均一なりポソームの形成が可能であることが示された. これは薄膜水和法では脂質壁を形成し水和することで脂質壁を砕き脂質膜とするため粒子径の制御性がないとされている. しかし本手法では前章で示したように Ethanol 濃度の減少により膜の生成からのリポソーム生成という機構であるため, 均一なりポソームが形成しやすいと考えられる.

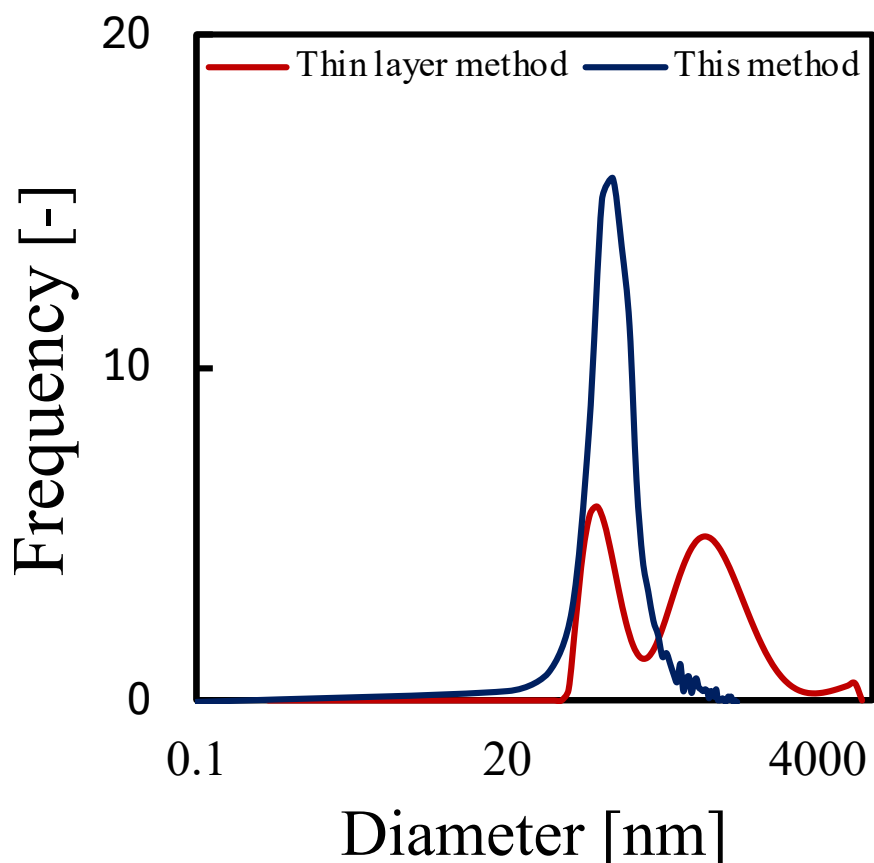


Fig.4.4 Particle size of liposome by thin layer method and this method (#4-4)

### 4.3.2 リポソーム形成の平衡論的条件

T字ミキサー（内径 1.3 mm）を長さ 25 cm のチューブ（内径 0.75 mm）に接続し、 $Q_W / Q_{EtOH}$  が収率と粒子濃度に及ぼす影響を調べることにより、Fig.4.5(a, b)に示すような平衡形成条件を抽出した。収率は  $Q_W / Q_{EtOH}$  の上昇とともに増加し、粒子濃度は  $Q_W / Q_{EtOH}$  が 10.0 のときに最大値を示した。この現象の要因を調べるため、Fig.4.5(c)に示すように、Lecithin 溶解度の  $V_W / V_{EtOH}$  依存性を測定した。Lecithin の溶解度は  $V_W / V_{EtOH}$  の上昇に伴い低下し、これはリポソーム収量とは逆の傾向であり、溶解度の低下に伴い収量が増加することが示唆された。しかし、粒子濃度は  $Q_W / Q_{EtOH}$  の上昇とともに増加するがある一定の値から減少した。Lecithin は Ethanol に溶解しているため、 $Q_W / Q_{EtOH}$  が増加すると混合溶液中の Lecithin 濃度が低下し、リポソーム濃度の低下に寄与する。これは Fig.4.5(d)に示した粒子径変化からも示唆される。粒子径が  $Q_W / Q_{EtOH}$  が 10.0 から 32.0 に変化した際に少し減少している。すなわちリポソーム一個に対して利用されるリン脂質量は減少することから、溶液内の Lecithin 量の低下による寄与が大きいと考えられる。したがって、 $Q_W / Q_{EtOH}$  の増加によりリポソーム収量が増加し、Lecithin 濃度の低下と競合するため、リポソーム濃度は  $Q_W / Q_{EtOH}$  の増加により最大値を示すことになる。

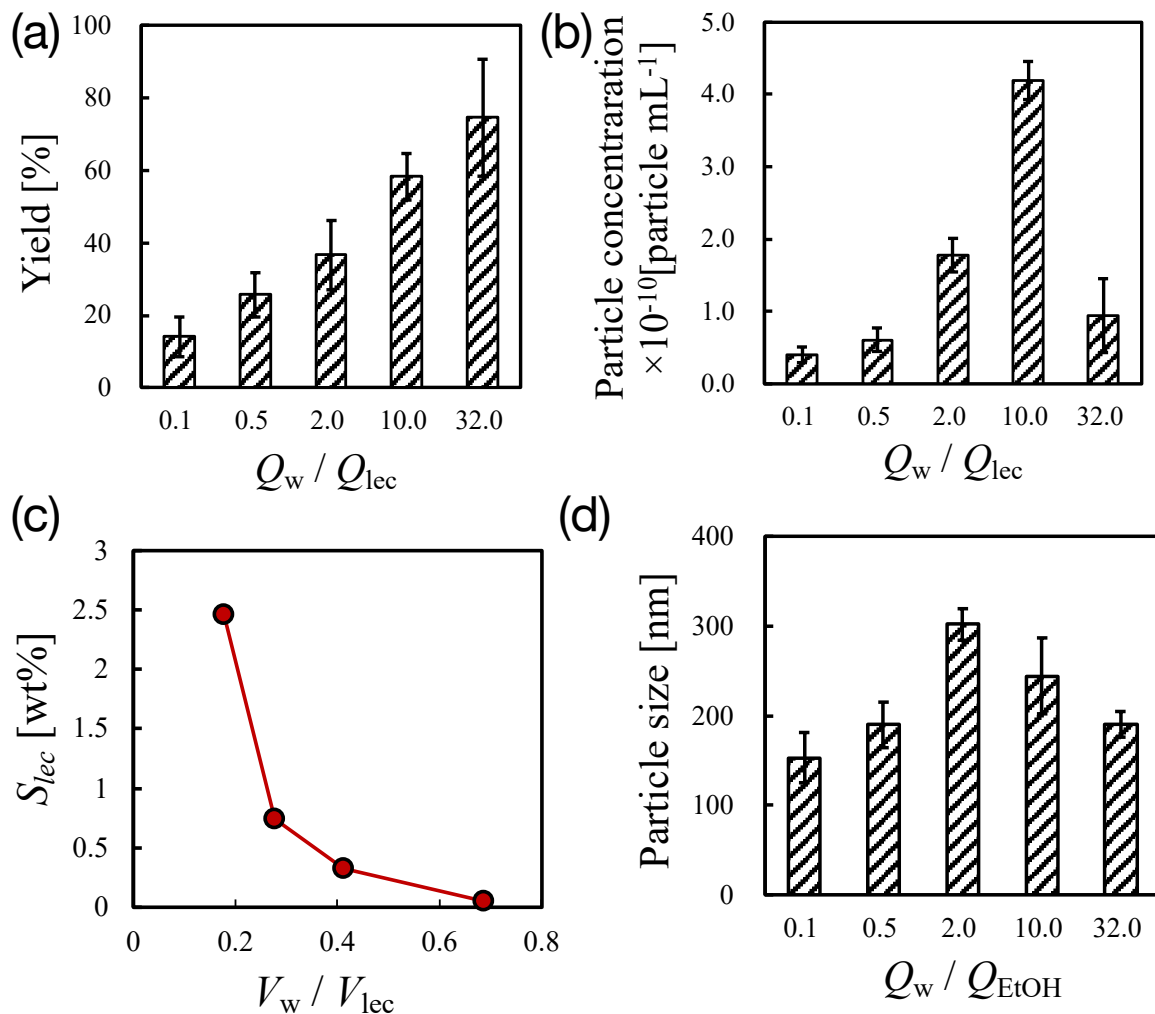


Fig.4.5 (a, b and c) Effect of the volume flow rate ratios  $Q_w / Q_{EtOH}$  on (a) yield, (b) particle concentration and (c) particle size. (d) Dependence of lecithin solubility on volume rate ratio of water/ethanol.

### 4.3.3 リポソーム形成の速度論的条件

$Q_{Total}$  および  $Q_w / Q_{EtOH}$  をそれぞれ  $6.6 \text{ mL h}^{-1}$  および  $10.0$  に設定し、さまざまなミキサーと長さ  $80 \text{ cm}$  のチューブを用いてリポソーム形成の完了時間を調べた。Fig.4.6 は、内径  $3.96 \text{ mm}$  の透明チューブの写真である。Fig.4.6(a)のように水とリン脂質溶液は混合直後に相分離を示し、Fig.4.6(c)のように混合チューブの中間点で均一相になった。この結果から、濁度が均一になる滞留時間をリポソーム形成完了時間と定義した。Fig.4.7 に完了時間とレイノルズ数(Re)のチューブ内径依存性を示した。このことは、内径が大きくなるにつれて、水と Ethanol の対流・拡散混合が遅くなり、その結果、生成時間が長くなることを示唆している。この生成時間の重要性は、滞留時間が十分な場合と不十分な場合に調製した生成物に TEM と PTA 分析を適用することによっても検証された。滞留時間は、チューブの内径、 $Q_{Total}$ 、 $Q_w / Q_{EtOH}$  をそれぞれ  $3.96 \text{ mm}$ 、 $6.6 \text{ mL h}^{-1}$ 、 $10.0$  に保ちながら、チューブの長さを変えることで制御した。Fig.4.8 は、 $4.48 \text{ min}$  と  $89.6 \text{ min}$  で得られた生成物の分析結果を示しており、これらの時間は、内径  $3.96 \text{ mm}$  の生成完了時間  $48.1 \text{ min}$  の前後を選択した。

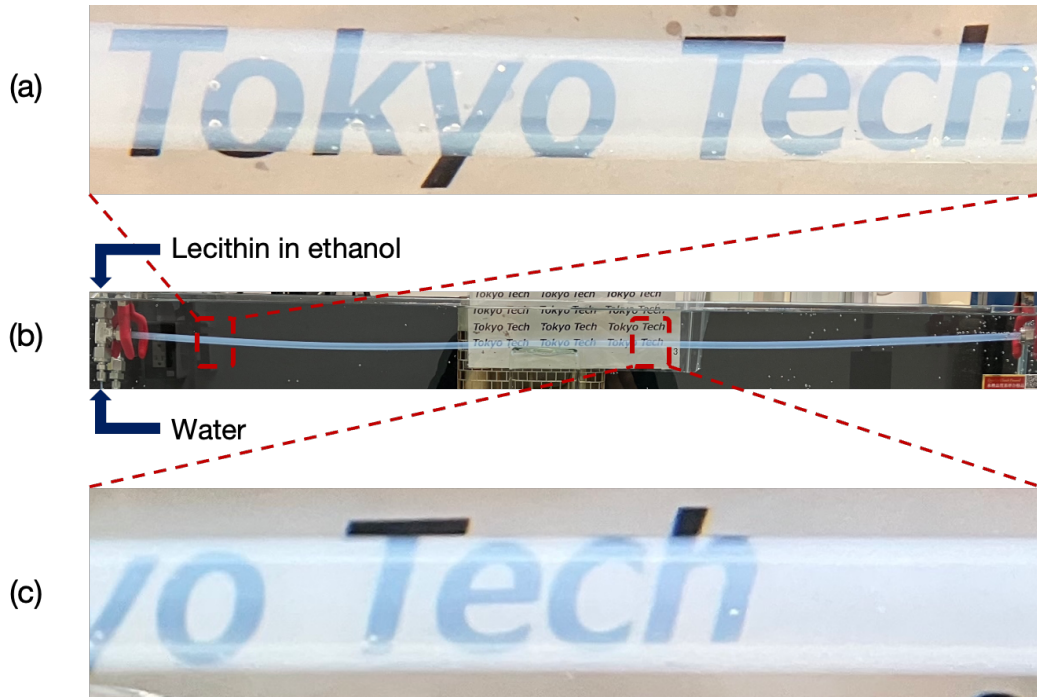


Fig.4.6 (a-c) Photographs of transparent tube with 3.96 mm I.D. for liposome preparation under steady-state condition.

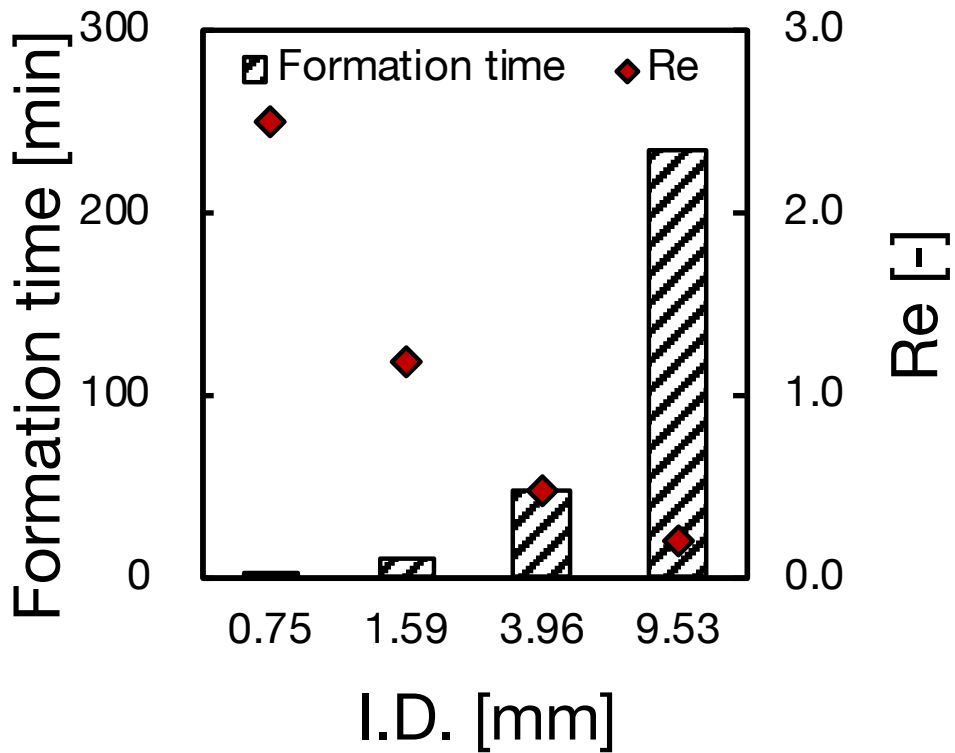


Fig.4.7 Effect of tube I.D. on  $Re$  numbers and completion time of liposome formation.

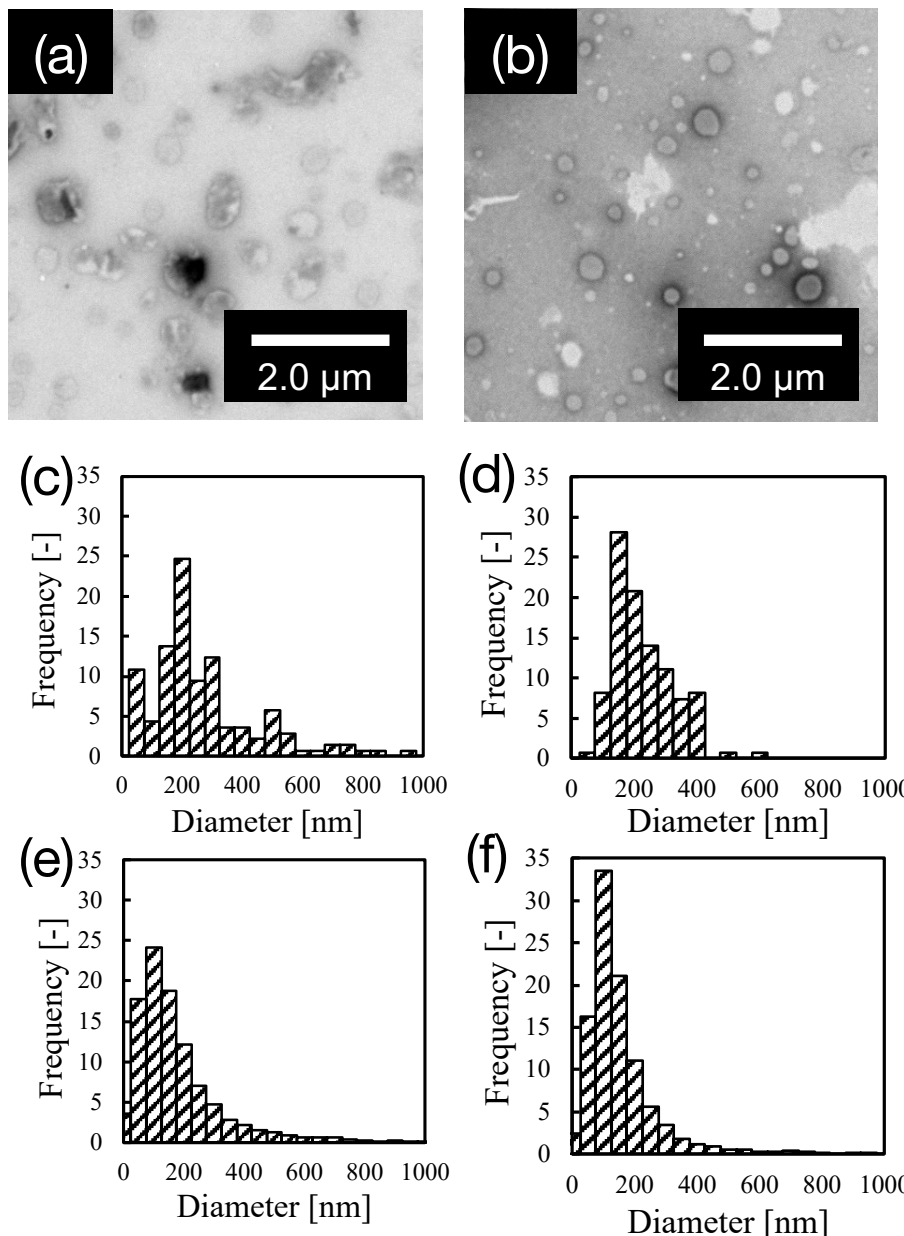


Fig.4.8 (a and b) Typical TEM images of product obtained at (a) 4.48 min and (b) 89.6 min. (c-f) Size distribution histograms obtained by (c) TEM at 4.48 min, (d) TEM at 89.6 min, (e) PTA at 4.48 min and (f) PTA at 89.6 min.

Fig.4.8(a, b)に示したように、89.6 min では明確な球状のリポソーム構造であったのに対し、4.48 min ではリポソーム構造だけでなく、脂質の凝集体と見られる不規則な形状の構造も観察された。さらに、TEM 分析により、4.48 min の平均サイズおよびサイズ分布（標準偏差）は、89.6 min の  $250.4 \pm 92.2$  nm よりも大きい  $297.1 \pm 179.7$  nm であった。PTA もまた、4.48 min で  $200.8 \pm 143.7$  nm と、89.6 min で  $157.5 \pm 81.5$  nm よりも大きな平均粒子径と粒子径分布を示した。これらの結果は、滞留時間が十分でない場合、リポソームだけでなく非リポソーム化脂質凝集体からなる広いサイズ分布が生じることを決定的に示している。滞留時間が形成完了時間を下回ると、制御された層流の流路内だけでなく、制御されていない乱流のバイアル内でも中間脂質膜とリポソームが形成される。Ethanol と水の乱流混合下では、カオス的で急峻な濃度勾配により脂

質膜が不規則に形成され、非リポソーム化脂質凝集体やリポソームを含む幅広いサイズ分布が形成される。滞留時間が形成完了時間を超えると、脂質膜とリポソームは、安定した対流拡散が緩やかな空間濃度勾配を形成する、制御された層流のある流路内のみで形成される。このような安定した濃度勾配は、脂質膜の規則的な形成と物質移動を可能にし、より狭いサイズ分布を持つリポソームを形成すると考えられる。これらの結果とメカニズムに見られるように、リポソーム形成の完了時間、特に  $Re$  との相関は、均一なリポソームを調製し、微小流路プロセスを設計するための重要な速度論的知識である。

#### 4.3.4 リポソームのサイズと流動状態の関係性

リポソームサイズと流動状態の関係を調べるため、 $Q_w / Q_{EtOH}$  を 10.0、チューブ長を 80cm とし、 $Q_{Total}$  とチューブ内径を変化させて得られた  $Re$  の相関を調べた。詳細な条件および相関結果をそれぞれ Table. 4 の #4-6 ~ #4-13 および Fig.4.9 に示した。Fig.4.9 よりリポソームサイズは、 $Re$  数が 0.19 から 50.1 まで増加するにつれて、230 から 160 nm の範囲で減少傾向を示した。前章にて示された形成メカニズムに基づけば、 $Re$  数が低いほど（流速が低いほど）、対流拡散混合が遅くなり、空間的な濃度勾配が緩やかになる。一方  $Re$  数が高くなると、対流拡散混合が速くなり、空間濃度勾配が急になるため、脂質膜の成長時間が短くなる。その結果、リポソームが小さくなる。この知見は、マイクロ流体プロセスを用いた過去の文献でも報告されている[99, 104]。しかし、本研究ではこの知見をミリ流体プロセスに拡大した条件のため、実用的な微小流路プロセスでリポソームサイズを制御するのに有益な知見となると考えられる。

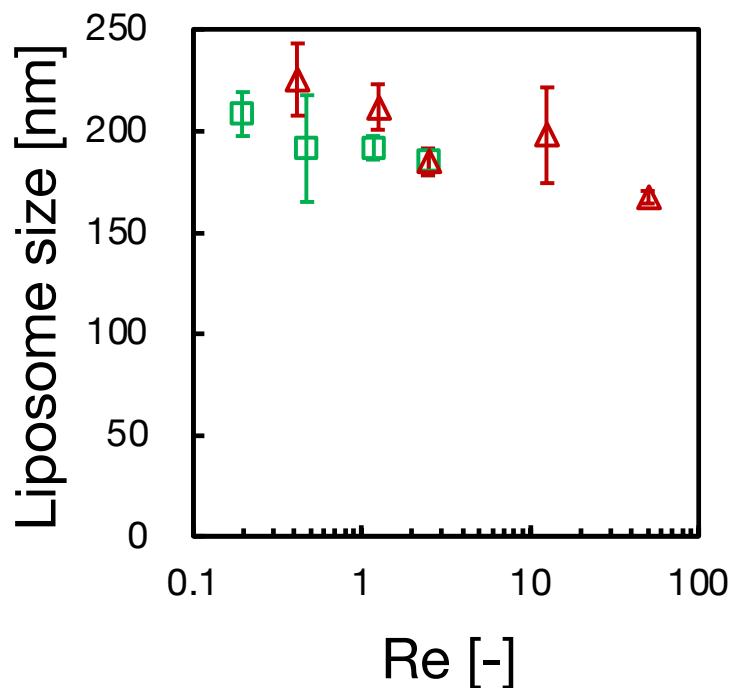


Fig.4.9 Relationship between liposome size and  $Re$  numbers obtained by changing tube I.D. and total flow rate.  $\square$ : Inner diameter change  $\triangle$ : Total flow rate change

#### 4.3.5 リポソームのサイズとリン脂質の関係性

操作因子を全て固定しリポソームサイズとリン脂質の関係を調べた。詳細な条件および粒子径をそれぞれ Table 5.の#4-14 ~ #4-17 および Fig.4.10 に示す。本実験は 55 °C にて生成を行った。この温度設定は利用したリン脂質の相転移温度を超える温度である。DPPC は 25 °C, DSPC は 40 °C にて生成実験を行ったが、配管の途中で沈殿物が配管壁面に生成し詰まり、生成した溶液も沈殿物が多く測定不能であった為である。Table 2.に示したように相転移温度が DMPC は 24 °C, DPPC は 41 °C, DSPC は 55 °C である。このことから、相転移温度近くまで温度を上げなければリポソームが生成しないと考えられる。本手法では Fig.4.1 のようにリン脂質は Ethanol 濃度が薄まることで溶解しなくなる際、脂質膜を形成すると考えている。しかし相転移温度より低い温度で生成を行うとリン脂質が硬さを持ったままであり、脂質がきれいに配列できず脂質塊になると考えられる。その為リポソームの生成ができないと考えられる。相転移温度を超えることでリン脂質に柔軟性が生まれ、脂質がきれいに配列可能となり脂質膜を生成でき、リポソームの生成が行われたと考えられる。

Fig.4.10 に示すように DMPC, DPPC, DSPC とリン脂質の炭化水素鎖が長くなることで粒子径が増大していることがわかる。これは相転移温度に依存していると考えられ、相転移温度と実験温度の差が大きくなることにより脂質の柔軟性が上がりリン脂質膜が柔らかくなることでリポソームを作るまでに必要な脂質膜の長さが短くなるためであると考えられる。Lecithin に関しては Table 2.に示したように炭化水素鎖の長さが 16 か 18 のもの混合物であるため DPPC と DSPC の間の粒子径を示したと考えられる。

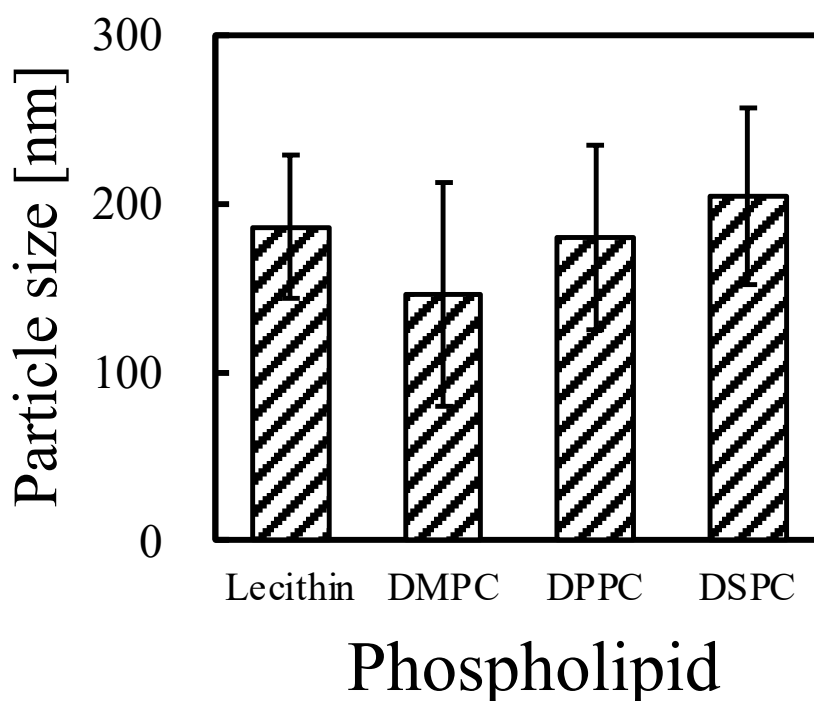


Fig.4.10 Effect of phospholipid on particle size.

#### 4.4 まとめ

本章では、以下を目的として研究を行った。

1. 微小流路を利用したリポソーム生成プロセスの構築
2. 本手法におけるリポソーム形成の知見の収集
3. 操作因子が粒子径に与える影響の確認

その結果として、以下の成果を得た。

1. TEM やレーザー照射により微小流路を利用した混合によるリポソームの生成が可能であることを確認した。
2. 既往法である薄膜水和法よりも均一な粒子の生成が可能なプロセスであることを確認した。
3. 収率や生成粒子濃度などから本手法におけるリポソーム生成に関する平衡論的条件に関する知見を得た。
4. 配管内部を確認および粒子径測定や TEM での観察により、リポソーム生成に関する速度論的条件に関する知見を得た。
5. 流量や内径の変動による粒子径と流動状態の関係性を確認した。
6. リン脂質の炭化水素鎖が粒子径に影響を与えることを確認した。

Table 4. Conditions of lecithin liposome at 25 °C

No.	Flow rate		Mixer	Tube		
	$\frac{Q_w}{Q_{EtOH}}$	$Q_{Total}$ [mL h <sup>-1</sup> ]	<i>I.D.</i> [mm]	<i>I.D.</i> [mm]	<i>Length</i> [cm]	<i>Re</i> [-]
#4-1	0.10	6.6	1.3	0.75	25	2.07
#4-2	0.50	6.6	1.3	0.75	25	2.19
#4-3	2.0	6.6	1.3	0.75	25	2.37
#4-4	10.0	6.6	1.3	0.75	25	2.50
#4-5	32.0	6.6	1.3	0.75	25	2.53
#4-6	10.0	6.6	1.3	0.75	80	2.50
#4-7	10.0	6.6	2.3	1.59	80	1.18
#4-8	10.0	6.6	4.8	3.96	80	0.47
#4-9	10.0	6.6	10.4	9.53	80	0.19
#4-10	10.0	1.1	1.3	0.75	80	0.42
#4-11	10.0	3.3	1.3	0.75	80	1.25
#4-12	10.0	33	1.3	0.75	80	12.5
#4-13	10.0	132	1.3	0.75	80	50.1

Table 5. Conditions of liposome formation

No.	Flow rate		Mixer	Tube			T [°C]
	$Q_w / Q_{EtOH}$	$Q_{Total}$ [mL h <sup>-1</sup> ]	<i>I.D.</i> [mm]	<i>I.D.</i> [mm]	<i>Length</i> [cm]	<i>Re</i> [-]	
#4-14	10.0	6.6	1.3	0.75	25	0.63	55
#4-15	10.0	6.6	1.3	0.75	25	0.63	55
#4-16	10.0	6.6	1.3	0.75	25	0.63	55
#4-17	10.0	6.6	1.3	0.75	25	0.63	55

## 第5章 微小流路を利用した二段階リポソームの形成

### 5.1 研究目的

第4章において一段階でのリポソーム形成プロセスの構築を行なった。一段階手法において粒径の制御性があり連続生成ができることが確認された。しかしながら、リポソームを実利用する際表面修飾や、リポソームに内包する薬品のロスを防ぐことなど一段階では拡張性が足りないことが考えられる。そのため微小流路を用いて二段階形成手法によるリポソームの形成を試みた。その際一段階目においてエマルジョンの形成を行う必要性があるため、前段階として微小流路を利用したエマルジョン形成の検討を行なった。

### 5.2 実験操作

#### 5.2.1 試料

本章ではリン脂質として Egg yolk Lecithin(Lecithin, 純度 95.0%以上)を使用した。油相として Oleic acid(OA, 純度 98.0%以上)を使用した。抽出用の有機溶媒として Ethanol(EtOH, 純度 99.5%以上)を使用した。Ethanol, Lecithin, Oleic acid は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

#### 5.2.2 微小流路を利用したエマルジョンの形成

二段階形成のため一段階目のエマルジョン形成に関して第一に検討した。微小流路を利用したエマルジョンの形成装置の概略図を Fig.5.1 に示す。リン脂質を油相に 0.5 wt% 溶かした。リン脂質溶液と水はシリンジポンプ(IC-3100, Kenis 社製)で供給した。T-union, Cross-union そして Swirl mixer を接合部として使用しこれら二つの溶液を接触させ、エマルジョンを形成させた。混合部の長さ、内径、流量、さらにリン脂質濃度を変更しこれら操作因子が粒子径やエマルジョンへの転化率へ与える影響を探索した。実験条件を Table 6. に示した。

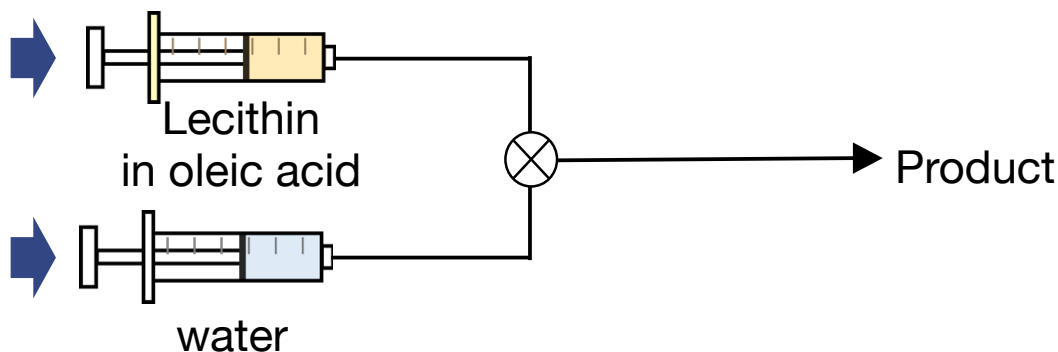


Fig.5.1 Schematic diagram of emulsion formation using flow process

#### 5.2.3 微小流路を利用したリポソームの形成

微小流路を利用したリポソームの形成装置の概略図を Fig.5.2 に示す。リン脂質を油相に 0.5 wt% 溶かした。抽出用のエタノール水溶液の濃度は 3.0, 30.0 wt% で調整し

た. リン脂質溶液と水はシリンジポンプ(IC-3100, Kenis 社製)で供給した. T-union と Swirl mixer を接合部として使用し, 内径 0.75 mm で長さ 30 cm の配管を利用して二つの溶液を接触させる. さらに内径 1.3 mm と 2.3 mm の T-union を接合部として使用し, 内径 0.75 mm で長さ 30 cm, 内径 1.59 mm で長さ 30 cm の配管を利用してエタノール水溶液を接触させリポソームを形成させた. リン脂質溶液は  $96.0 \text{ mL h}^{-1}$ , 水は  $48.0 \text{ mL h}^{-1}$  の流速で供給した. エタノール水溶液は  $144.0 \text{ mL h}^{-1}$  の流速で供給した. リポソーム形成部のミキサーに関し, ボードスルー(BT)を利用した際の影響も探索した. その際 BT の位置は Fig.5.3 に示すように 3 パターンで実験を行った. 実験条件を Table 6. に示した.

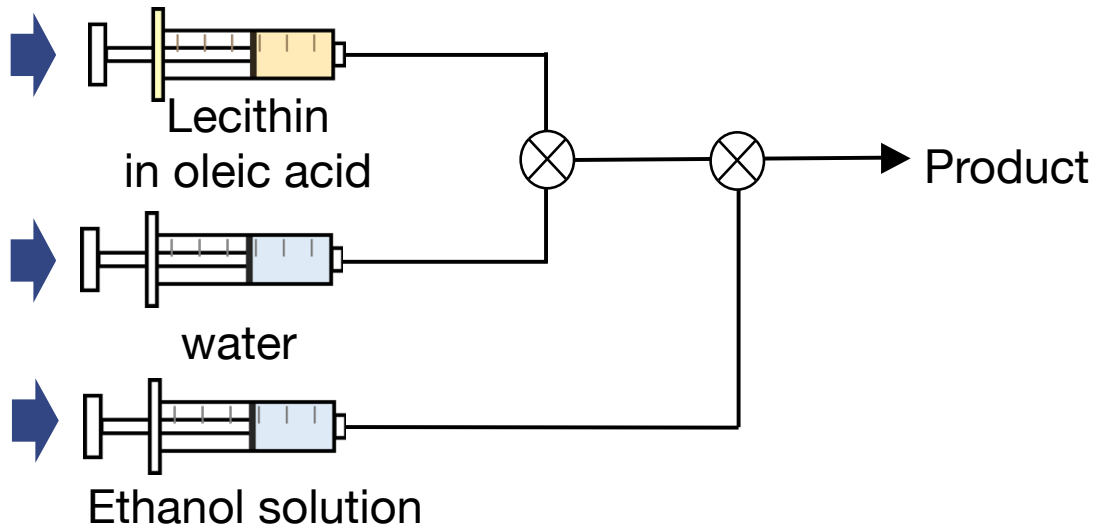


Fig.5.2 Schematic diagram of liposome formation using flow process

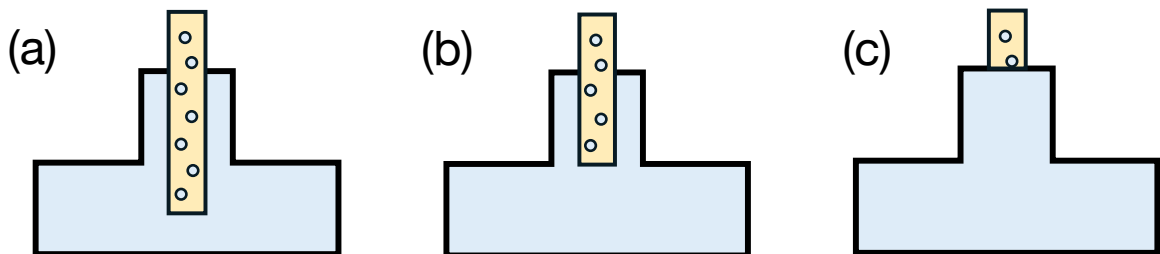


Fig.5.3 Schematic of BT's position within T-union (a)center, (b)border, (c)edge

#### 5.2.4 評価方法

形成したエマルションおよびリポソームの粒子径は得られた水溶液を動的光散乱法(DLS: Partica SZ-100-Z, 株式会社堀場製作所製)を用いて  $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$  で測定し決定した.

また生成物の状態確認のため光学顕微鏡(MS-300, 朝日光学製作所製)を用いて観察した.

本手法においては W/O エマルションの形成効率として水のエマルションへの転化率(Conversion rate)は以下のように定義した.

$$\text{Conversion rate} = \frac{H_{total} - H_{water}}{H_{total}} \quad (2)$$

$H_{total}$  は溶液全体の高さ,  $H_{water}$  水相の高さである.

## 5.3 結果と考察

### 5.3.1 エマルションの形成の確認

Table 6.の#5-1~#5-3 に示すように流速を変動し形成の確認を行なった。できた溶液は Fig.5.4 のようになっており、その粒子径に関しては Fig.5.5 に結果を示した。ここからわかるように、流速が遅い場合はミセルと思われる粒子径となり、流速が上がるにつれエマルションが生成され  $Q_T = 144.0 \text{ mL h}^{-1}$  の時には全てエマルションであると考えられる。このことから高流量にすることで油相に水を取り込ませナノオーダーのエマルションが形成可能であると示された。配管内の流動状態が遅くなることでエマルションの生成が起こらなくなることも示された。

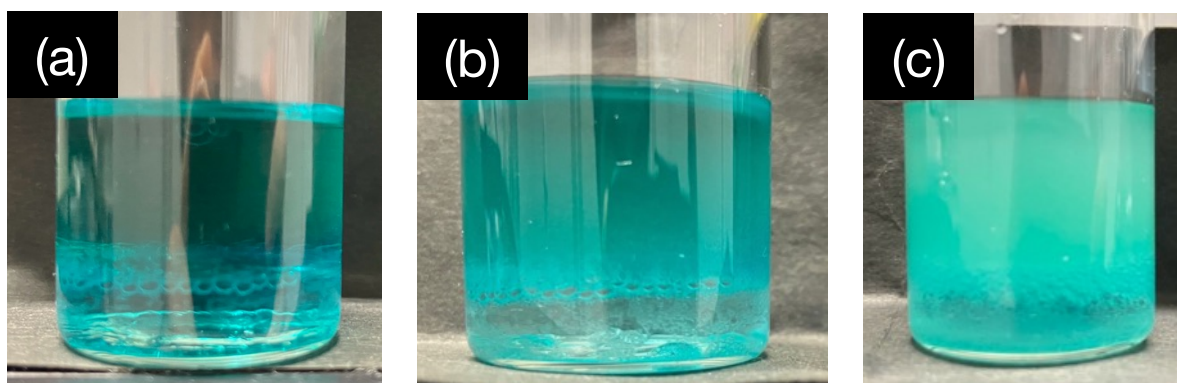


Fig.5.4 Image of product changing total flow rate  
(a)  $36.0 \text{ mL h}^{-1}$  (#5-1), (b)  $72.0 \text{ mL h}^{-1}$  (#5-2), (c)  $144.0 \text{ mL h}^{-1}$  (#5-3)

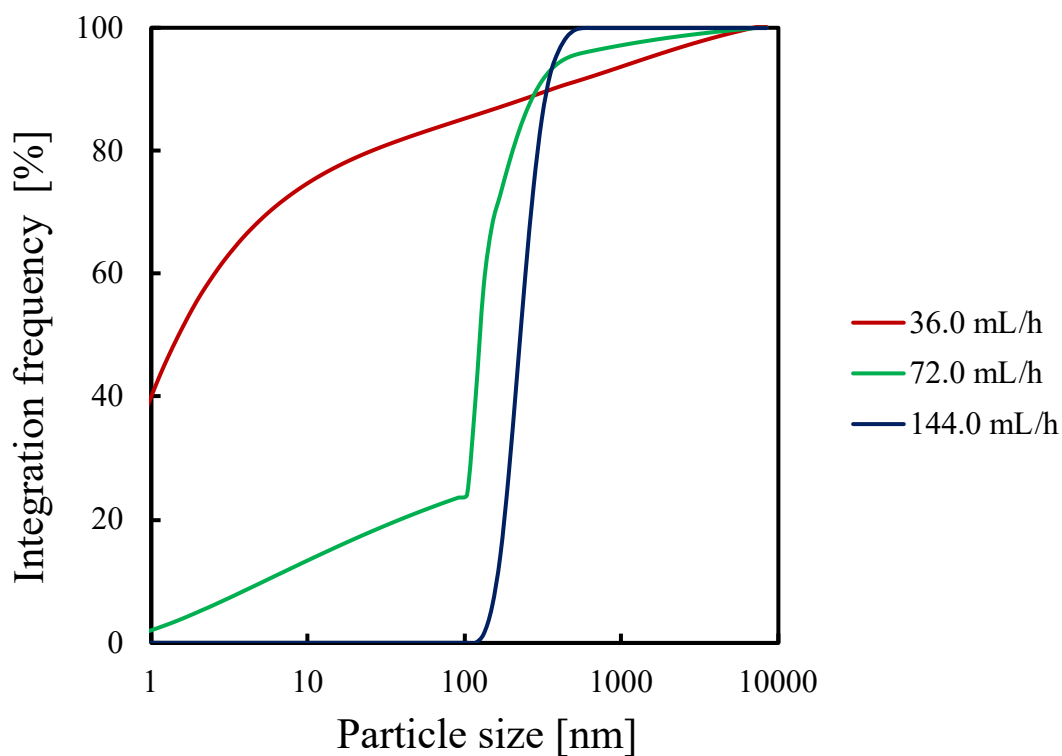


Fig. 5.5 Effect of total flow rate variation on particle size of emulsion

### 5.3.2 ミキサーの変更による粒子径および転化率への影響

Table 6.の#5-4～#5-15 に示すように条件を変更し実験を行った。Fig.5.6 にミキサー変更における粒子径と転化率の結果を示した。ミキサーに関して、T-union ではレイノルズ数(Re)が増大することにより粒子径が減少し転化率は増加した。しかし cross-union と Swirl mixer の場合、粒子径はある Re を超えると約 250nm で一定となり、転化率は Re が約 12 の時に最大値を取るような傾向を示した。T-union (T)では直接衝突混合させるため二相が連続に流れ、その油相と水相の界面から削られ、油相に水が取り込まれる機構に対し、cross-union (C)と Swirl-mixer (S)は、側面から水相を切断しながら取り込む機構となるため、Re が変動しても粒径が一定となると考えられる。ミキサー(C)と(S)の比較では、(C)が直角に真横から入れる構造であるのに対し、(S)は 60 度の角度から 中央の流路に軸をずらして入れる形になるため、混合が起りやすい。そのため粒子径を維持できる Re の限界値が低くなると示唆される。また混合の仕組みからミキサー(S)のほうが(C)より油相に水が取り込まれやすく、転化率が高くなっていると示唆される。粒子径を変動させ制御するには(T)を利用する必要があることがわかった。

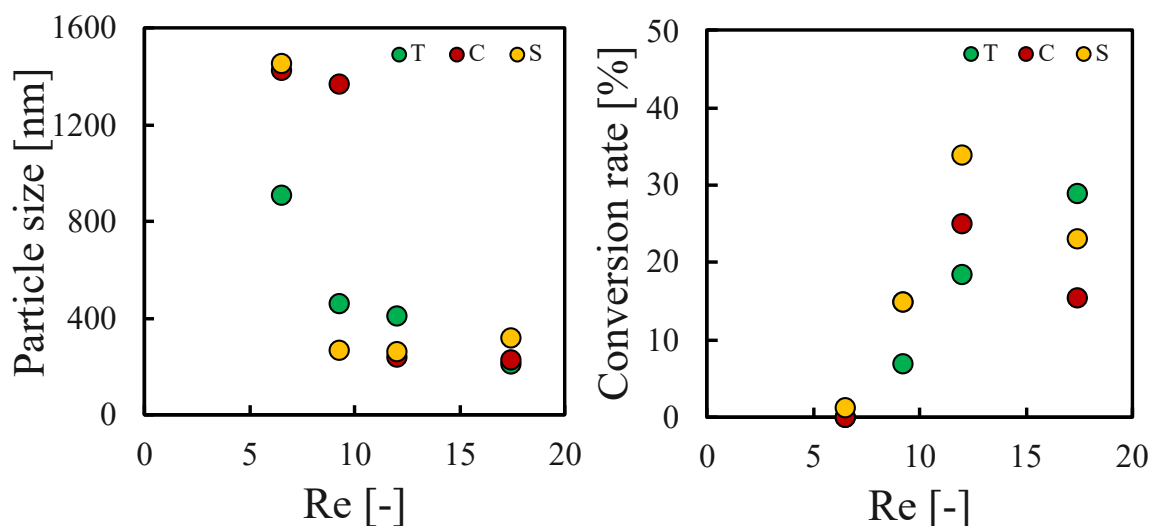


Fig.5.6 Relationship between emulsion size and Re numbers obtained by changing mixer and flow rate ratio.

### 5.3.3 混合部の長さや内径の変更による粒子径および転化率への影響

Table 6.の#5-5, #5-16～#5-19 に示すように条件を変更し実験を行った。Fig.5.7 と Fig.5.8 に長さを変更した際の溶液の様子と粒子径および転化率の結果を示した。0cm では溶液の油相の透明度と粒子径からもわかるようにエマルジョンが生成されていないことがわかる。このことからミキサー時点でのエマルジョン形成は起きていないことがわかる。また 15cm から油相が濁り粒子径および転化率は 25cm を堺にほぼ一定となっている。これらのことから混合部(T)においては 25cm になるまでに油相に水が取り込まれ、80cm 以降は Fig.5.7(e,f)からわかるように取り込まれなかった水相側も内径サイズに近い大きな水滴となっていると考えられる。

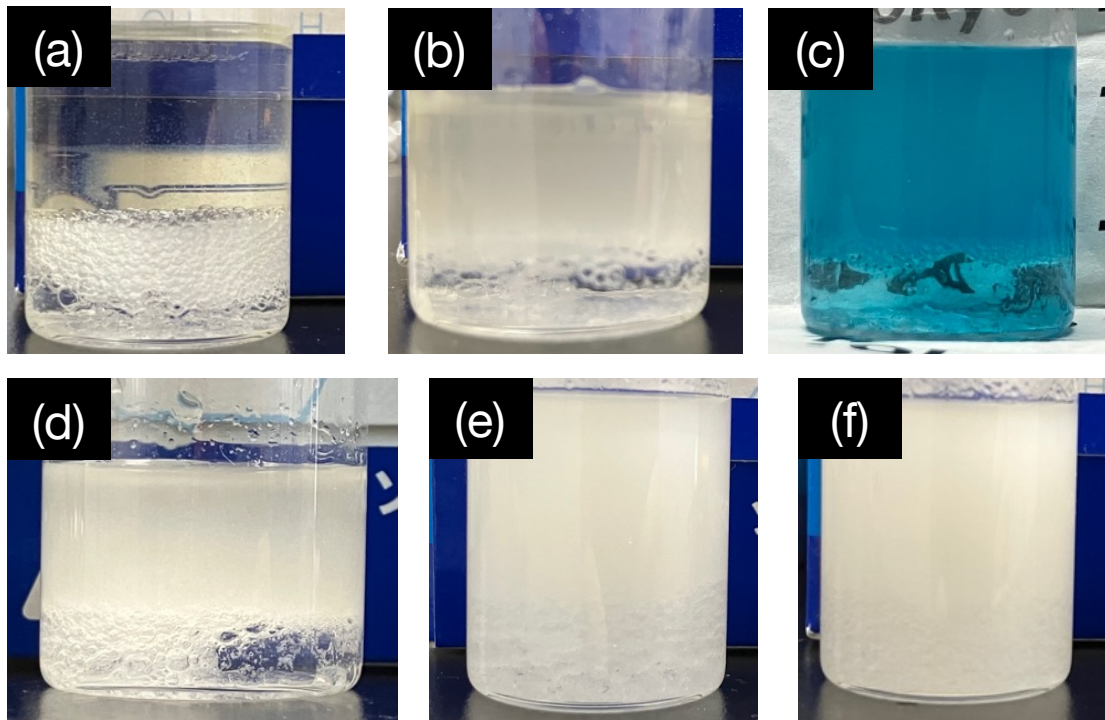


Fig.5.7 Image of product changing length  
 (a)0 cm (#5-16), (b)15 cm (#5-17), (c)25cm (#5-3),  
 (d)30 cm (#5-5), (e)80 cm (#5-18), (f)110cm (#5-19)

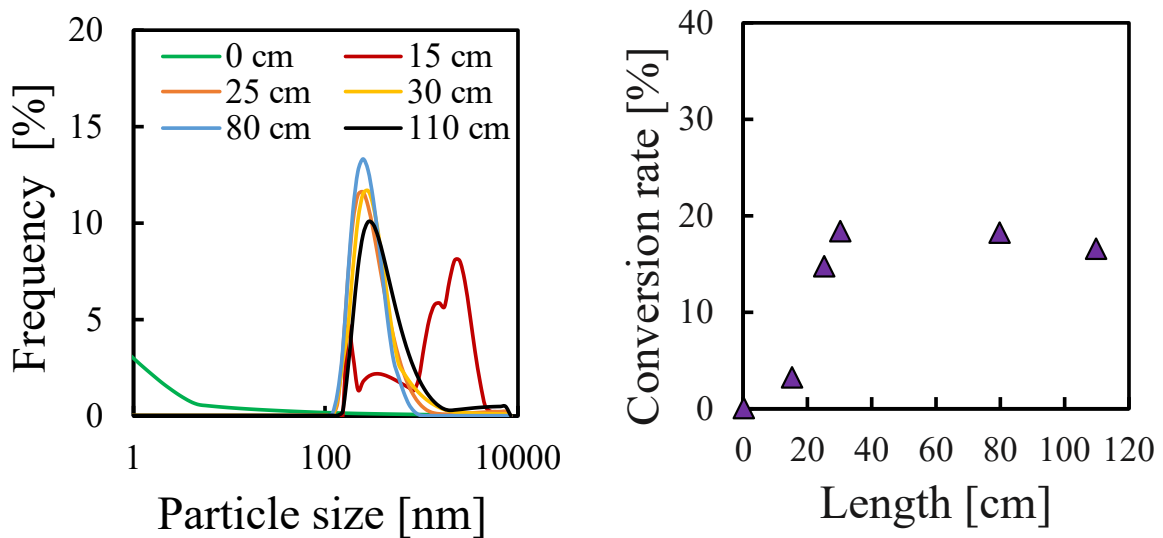


Fig.5.8 Effect of length on particle size distribution and conversion rate of emulsion

Table 6.の#5-5, #5-20, #5-21 に示すように条件を変更し実験を行った. Fig.5.9 に内径変更した際の溶液の様子を示す. 内径が 0.5 と 0.75mm の混合部の場合は平均粒子径が 352.9nm と 410.4nm であるのに対し, 内径が 1.59mm の際は 94.8nm とほぼミセルにピークがあり, Fig5.9(c)からもわかるように明らかに水が油相に取り込まれていない. このことから 5.3.1 でも示したように流動状態が遅くなる, すなわち  $Re$  が低下することでエマルションの生成が行われなくなり, 相界面での反応により Lecithin のミセルのみができていると考えられる.

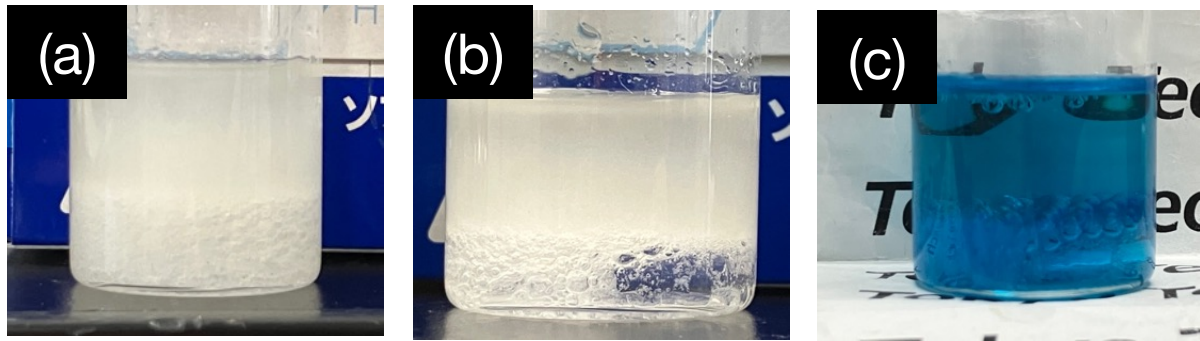


Fig.5.9 Image of product changing I.D.  
 (a)0.50 mm (#5-20), (b)0.75 mm (#5-5), (c) 1.59 mm (#5-21)

### 5.3.4 リン脂質濃度の変更による影響

ミキサー(T)と(S)において Table 6.の#5-5, #5-13, #5-22 ~ #5-25 に示すようにリン脂質濃度を変更し実験を行った. Fig.5.10 に混合部(T)での溶液の様子と Fig.5.11 に粒子径の結果を示した. (T)において平均粒子径は3条件ほぼ変化がないが, 標準偏差すなわち粒子径分布が濃度上昇とともに狭まっていくことがわかった. これは, 濃度上昇によりエマルションの安定性が増加し合一が起きづらいことやリン脂質濃度が高いことにより水が油相取り込まれやすくなったためと考えられる. また Fig.5.10(c)からもわかるように水相として分離せず大きな水滴としてエマルションが生成され沈澱することでも粒子径の均一性の向上が起きていることにつながっていると考えられる. (S)において平均粒子径は濃度上昇により増大するが, 粒子径分布が濃度上昇においてほぼ変化がないがわかった. この(T)と(S)の変化の違いは5.3.2にて説明した粒子の生成メカニズムが(T)と(S)において異なることに起因している. 上記で述べたように(T)においては混合部において相界面から水が削られるため, Lecithin の濃度が増えることで形成したエマルションの安定性の増加が起きる. しかし(S)においてはミキサーによる側面からの剪断による取り込みの際濃度が上昇することで油相に取り込むことができる水の量が増加する. そのため, 粒子径が増加したと考えられる.

Fig.5.12 に示すように下相の粒子径も測定したところ平均粒子径が 1495.8 nm で標準偏差が 449.8 nm であり下相も均一性があることがわかる. しかしながら転化率という面で見ると下相の扱いによるが水相とみなした場合, 転化率は濃度の増加により減少している. このことから均一性と転化率はどちらも向上させることは濃度の変化では難しいことがわかった.

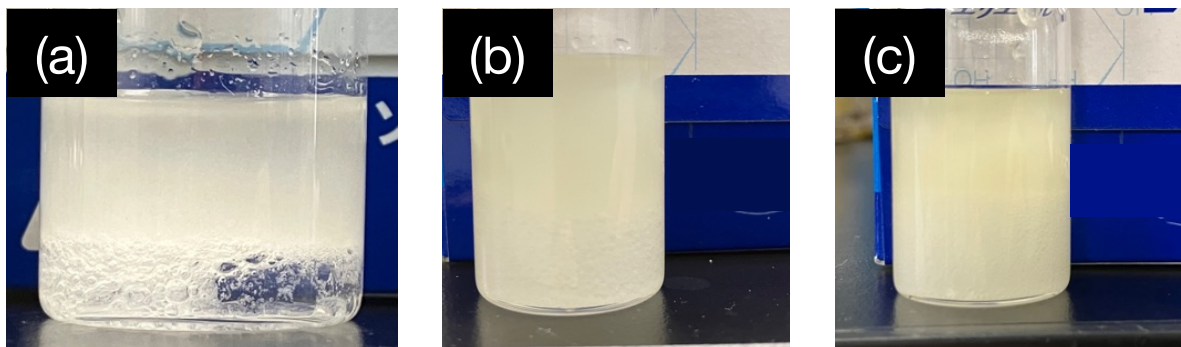


Fig.5.10 Image of product changing lecithin concentration (a)#5-5, (b)#5-22, (c)#5-23

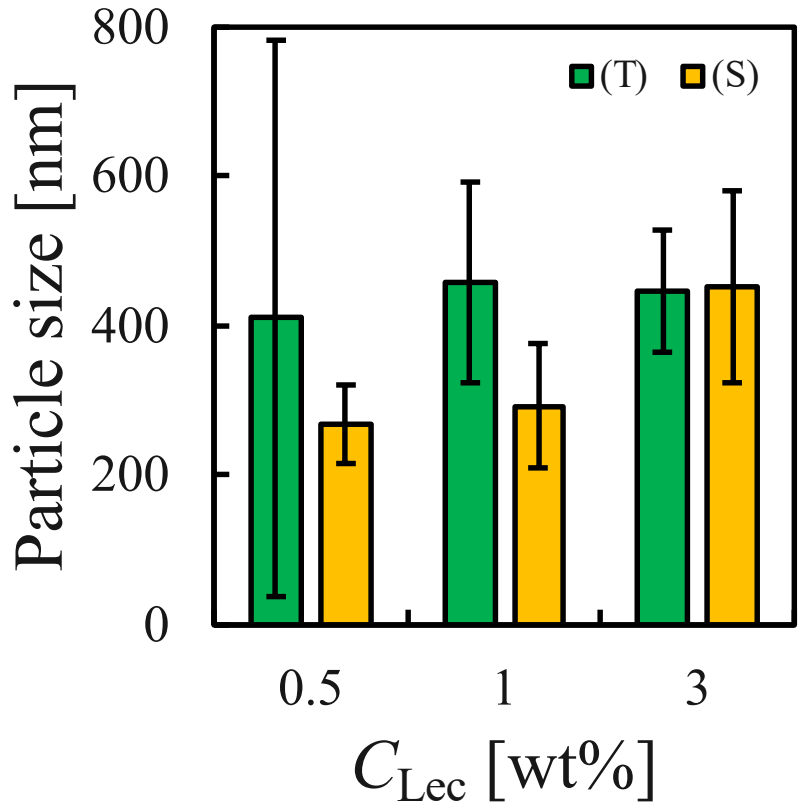


Fig.5.11 Effect of Lecithin concentration on particle size of emulsion

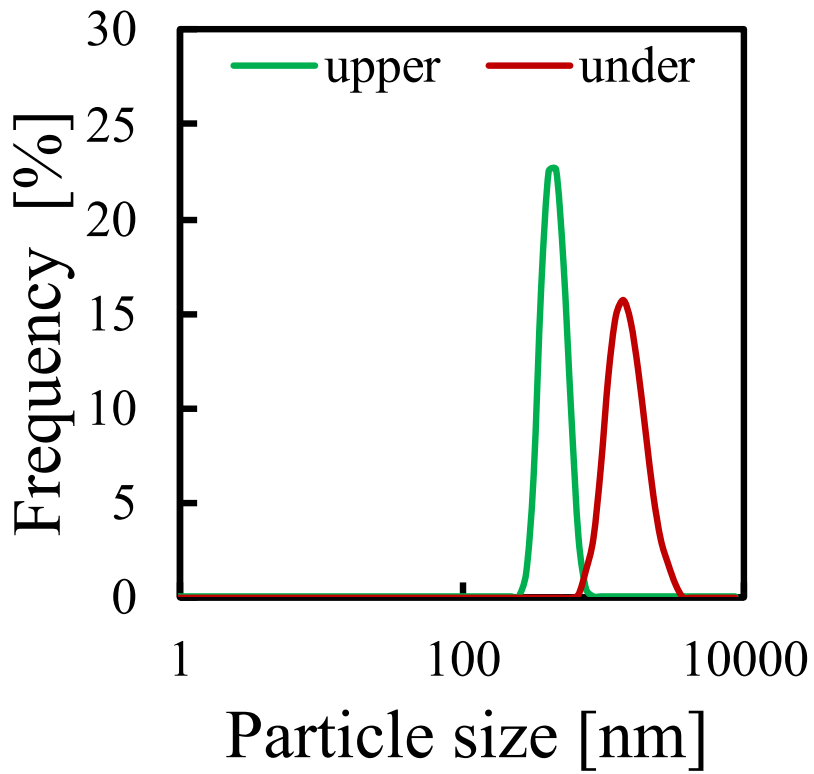


Fig.5.12 Difference in particle size between upper and lower layers

### 5.3.5 リポソームの形成の確認

#### 5.3.5.1 一段階目の影響

Table 7.の#5-26, #5-27 に示すように二段階目の混合部の内径を 0.75 mm とし, 一段階目の mixer を変更し実験を行った. Fig.5.13 に溶液の様子, Fig.5.14 に油相の粒子径を示した. Fig.5.13 からわかるように下層の水相に濁りなどが確認できず, DLS にて測定を行なっても粒子が確認できなかった. また Fig.5.14 からわかるように油相の粒子径に大きな変化はなかった. しかし一段階目の粒子径と比べるとどちらも大きくなっていることから, 二段階目においてさらにエタノール水溶液が油相に取り込まれてしまったと考えられる.

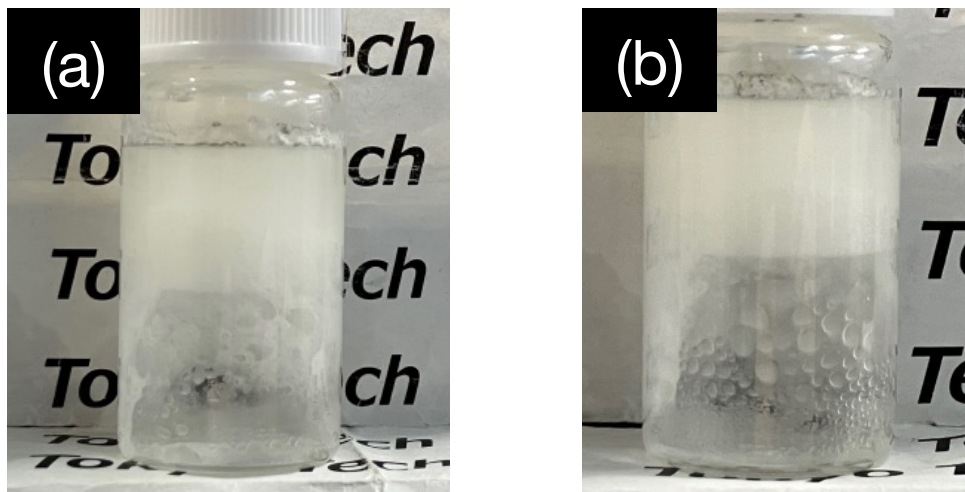


Fig.5.13 Image of product changing mixer1 (a)T-union (#5-26), (b)Swirl-mixer (#5-27)

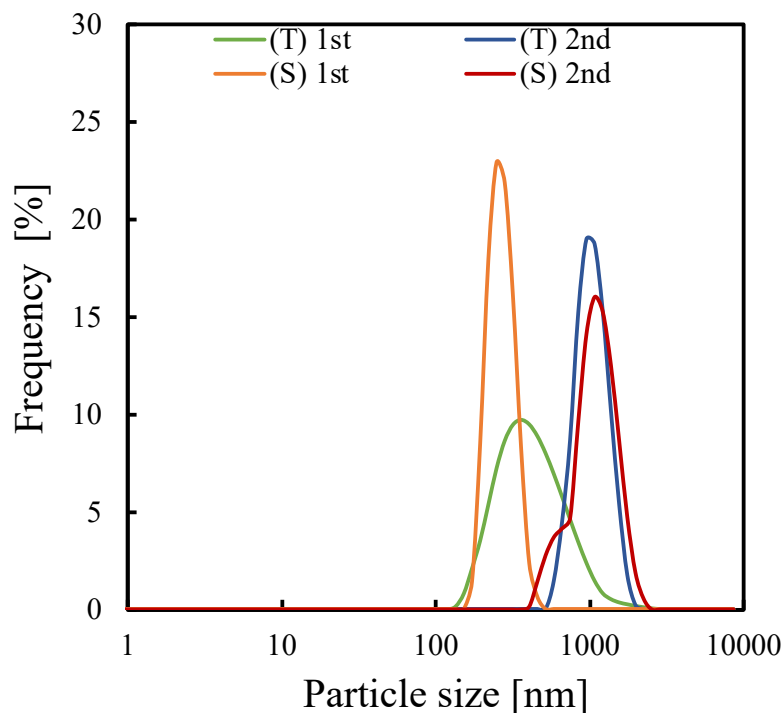


Fig.5.14 Effect of changing Mixer1 on particle size of oil phase (T) 1st (#5-5), (T) 2nd (#5-26), (S) 1st (#5-13), (S) 2nd (#5-27)

### 5.3.5.2 二段階目のミキサーの変更

Table 7.の#5-28, #5-29 に示すように二段階目の混合部の内径を 0.75 mm, Lecithin 濃度を 3.0 wt%とし, 二段階目の mixer にて主流を変更し実験を行った. Fig5.15 に溶液の様子, Fig5.16 に油相の粒子径を示した. 濃度を増加したが DLS にて測定を行なっても水相に粒子が確認できなかった. Fig.5.16 に示す通り, 油相の粒子径が一段階目の粒径とくらべ大きくなっていることにも違いは生じなかった. しかし Fig5.15(a)にて相が三相になっていることがわかる. 上層が油相, 中層が W/O/W エマルション相, 下層が水相であると考えられる. リポソームや W/O/W エマルションが水相に存在しなかったのは Fig.5.17 に示すように配管内での挙動と生成機構が想定異なり, スラッグのように交互に流れるような形ではなく, 環状流のようになり油相と水相の界面付近でのみ W/O/W エマルションが生成しエタノールによる溶媒抽出もほとんど発生しなかったため上記のような三相構造になったと考えられる.

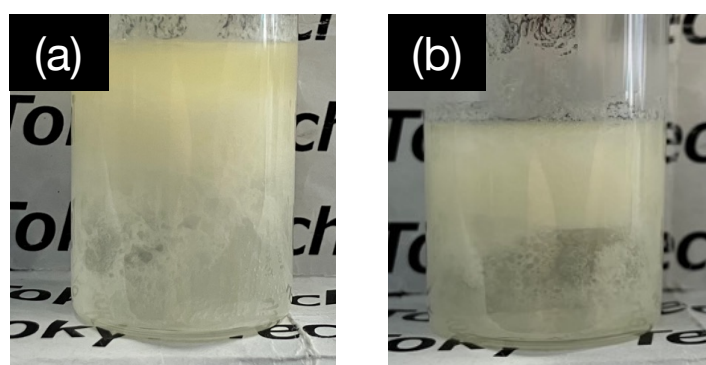


Fig.5.15 Image of product changing main flow of mixer2  
(a)Emulsion (#5-28), (b)Ethanol solution (#5-29)

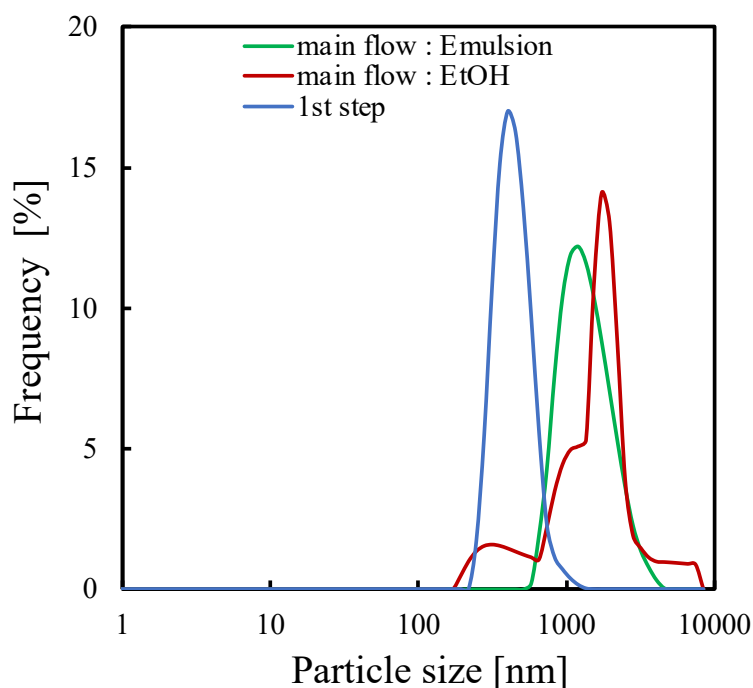


Fig.5.16 Effect of changing main flow of mixer2 on particle size of oil phase  
Emulsion (#5-28), Ethanol solution (#5-29), 1st step (#5-25)

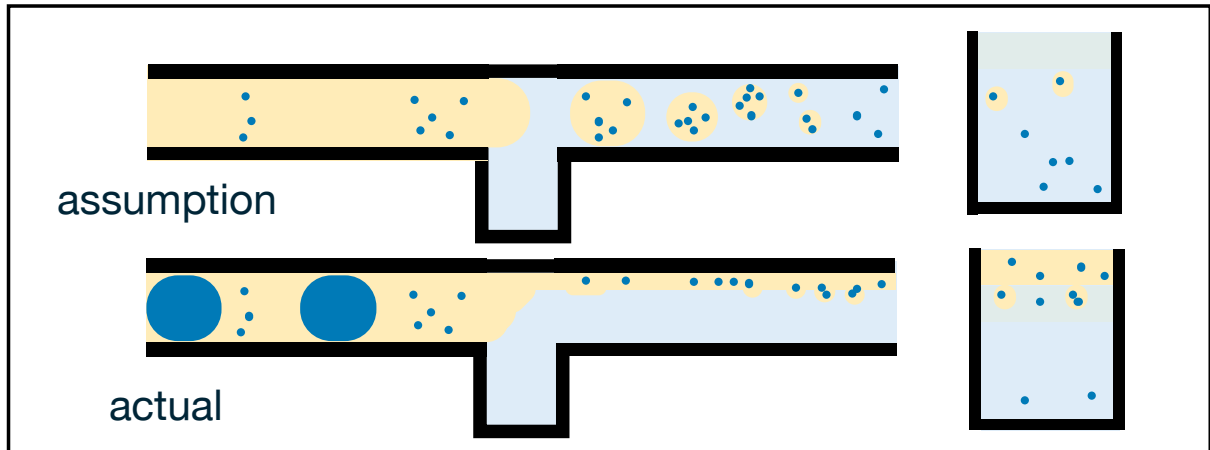


Fig.5.17 Image of inner flow and mechanism of making liposome

Table 7.の#5-30, #5-31, #5-32 に示すように二段階目の混合部の内径を 1.59 mm とし、ボアードスルーを利用し Fig.5.3 に示すように位置を変更して実験を行った。Fig.5.18 に各溶液の画像を示した。さらに#5-30 の溶液および光学顕微鏡像を Fig.5.19 に示す。ボアードスルーの位置に関わらず内径 0.75 mm とは異なり溶液が二相の状態になっている。また Fig.5.18(c,e)からわかるようにこの下層ボアードスルーの位置がミキサーの中心から接合部に近づくにつれ、大きな液滴のようになっていくように見られる。これは Fig.5.20 に示すように配管内での形成機構が想定と異なり、水の中に W/O/W エマルションが生成されていくが、エマルション同士の間隙にある水を囲ってしまうような状態になっており、さらにボアードスルーの位置によって油滴の大きさが変わり油滴間隙が大きくなっていると考えられる。このことから生成に関してはミキサー内まで入っているボアードスルーがリポソーム形成に関して向いていると考えられる。また中央位置にある場合は Fig.5.19(a)のように下層の部分では数分の静置により二相に分離する。他二つの位置の場合は分離するまでに 1 週間の時間を有した。分離した相を光学顕微鏡で確認したところ上層は W/O/W エマルションとなっており、下層にはリポソームの存在も確認できた。

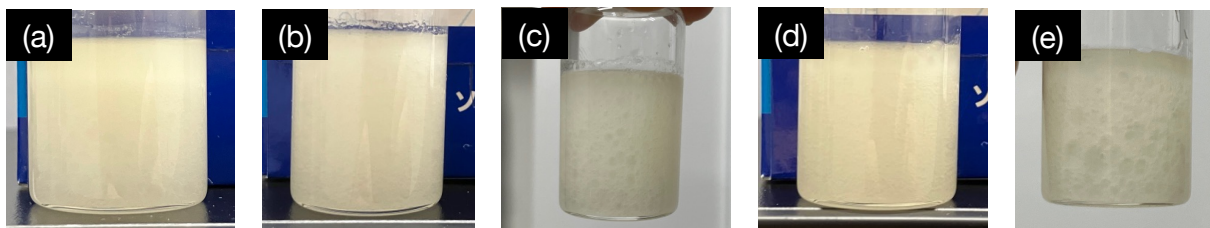


Fig.5.18 Image of product changing BT position  
 (a)center (#5-30), (b, c)border (#5-31), (d, e)edge (#5-32)

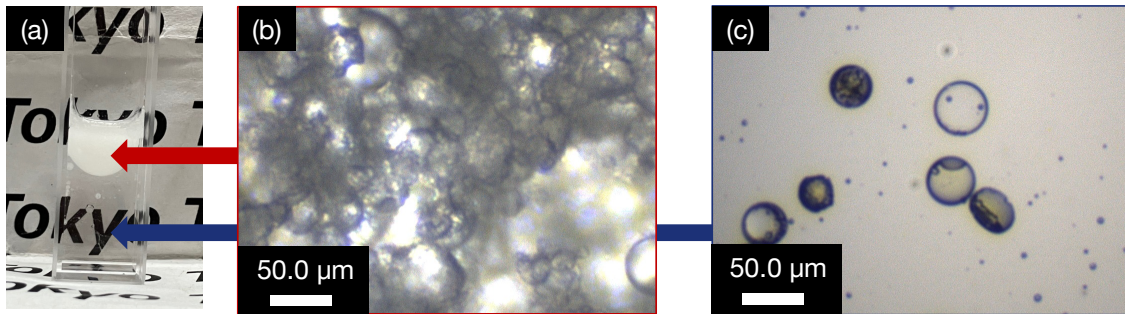


Fig.5.19 Image of product (#5-30) by microscope  
(a)product, (b)W/O/W phase, (c)water phase

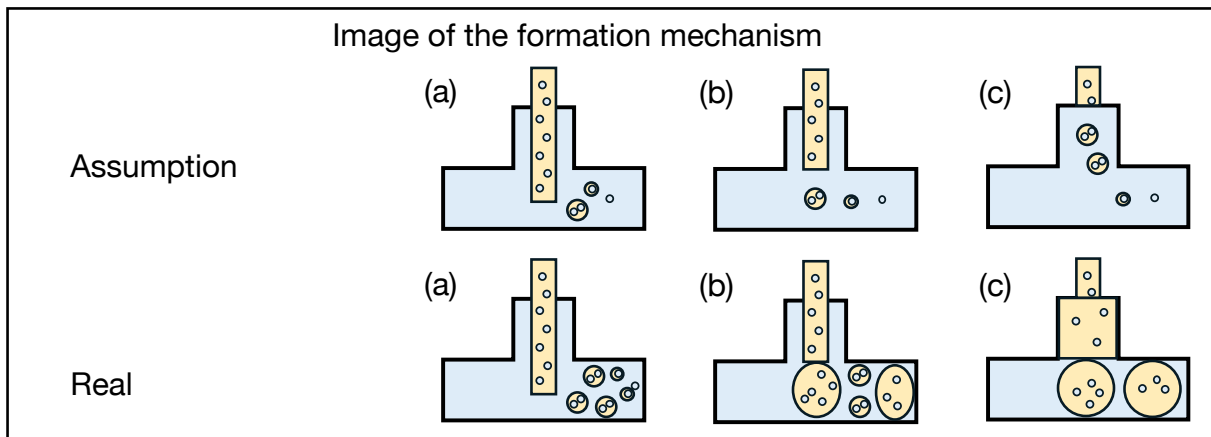


Fig.5.20 Image of formation mechanism by using BT

### 5.3.5.3 Lecithin 濃度および Ethanol 濃度の変更

Table 7.の#5-30, #5-33~#5-37 に示すように Lecithin 濃度と, mixer の主流を変更して実験を行った. Fig.5.21 に生成溶液の様子を示した. Fig.5.22 に示した一段階のエマルションとの粒子径の比較からわかるように, 水相において DLS にて初めて粒子径を計測できさらにエマルションサイズに非常に近い粒子径であることがわかった. このことから, #5-34 の条件にてナノオーダーのリポソームの形成が可能であることが示された. 各濃度での粒子径分布の比較を主流が EtOH の場合を Fig.5.23 に, 主流が emulsion の場合を Fig.5.24 に示した. 主流が EtOH の場合は, Lecithin 濃度が低い場合に一番リポソーム形成が起こりやすいことがわかった. これは濃度上昇により二段階目に投入した水を油滴間の隙間で取り込むようになり根本 W/O/W エマルションの形成が起きづらくなったためと考えられる. 前項 5.3.3.2 で示したように, 取り込まれた状態から時間経過で分離はするがその際は粒径が大きなもの生成しか起きておらず DLS においても粒子が計測されていないと思われる. 主流が emulsion の場合は, 濃度が低い場合は W/O/W は形成されているが抽出が仕切れず粒径が少し大きくなっているが, 水が主流であるエマルションに滴下する機構から濃度上昇により水が再度エマルションとして取り込まれる機構になる. そのため 1.0 wt%の中濃度では Fig.5.21(e) のように完全に取り込まれず歪な大きさの液滴となる. 濃度がさらに上昇し 3.0 wt% となることで Fig.5.21(f) のように完全に取り込まれる形となるがその際取り込まれる際にも水内に油相も取り込まれているため, EtOH 水溶液と接触する面積が 0.5 wt%の

時より増えるため抽出が起きやすく一段階のエマルションの粒径に近い粒子径が測定されたと考えられる。1.0 wt%と 3.0 wt%で粒子径が異なるのは 1.0 wt%では一部の取り込まれた水において 3.0 wt%と同様の事項が起きていると考えられ、水相にはリポソームが存在しなかったためと思われる。

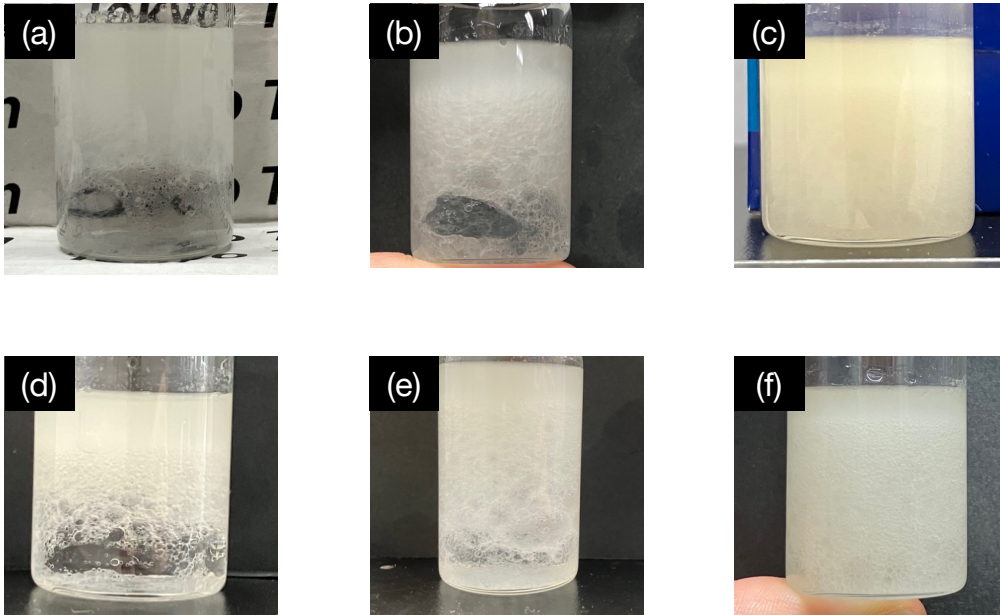


Fig.5.21 Image of product changing lecithin concentration and main flow  
 main flow: EtOH (a)0.5 wt% (#5-34), (b)1.0 wt% (#5-35), (c)3.0 wt % (#5-30),  
 main flow: emulsion (d)0.5 wt% (#5-36), (e)1.0 wt% (#5-37), (f)3.0 wt% (#5-38)

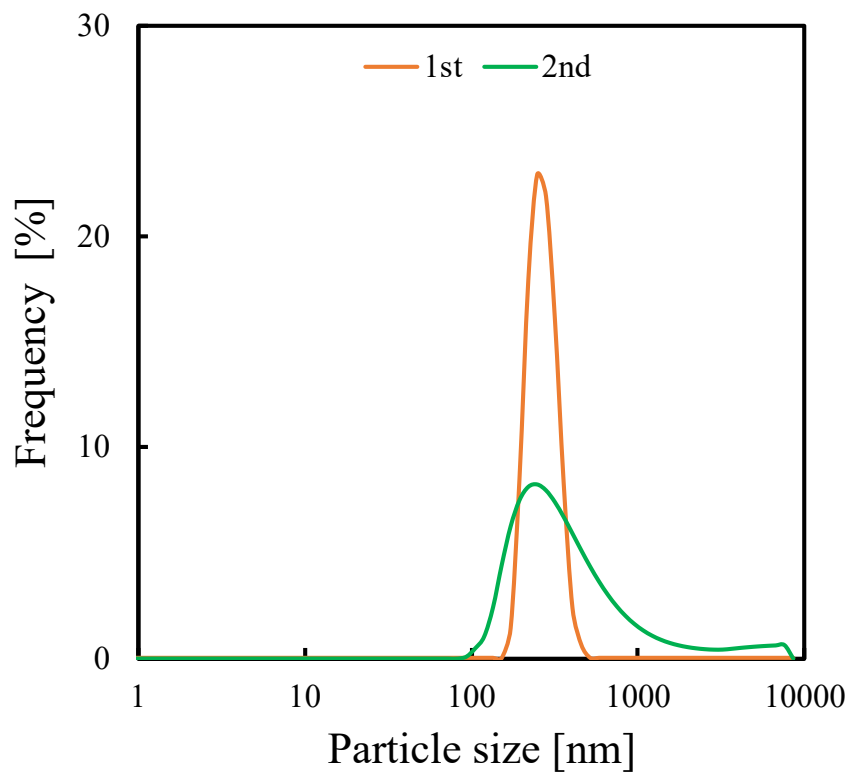


Fig.5.22 Comparison of particle size between one-step and two-step (1st: #5-13, 2nd: #5-33)

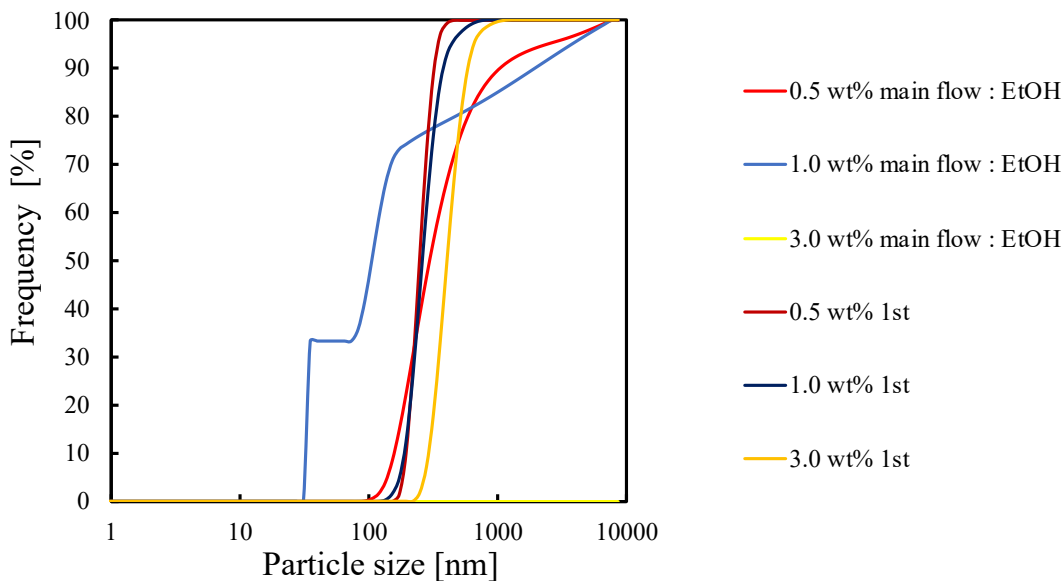


Fig.5.23 Effect of changing lecithin concentration on particle size distribution  
(main flow: EtOH)

2nd: 0.5 wt % (#5-33), 1.0 wt% (#5-34), 3.0 wt% (#5-30)

1st: 0.5 wt % (#5-13), 1.0 wt% (#5-24), 3.0 wt% (#5-25)

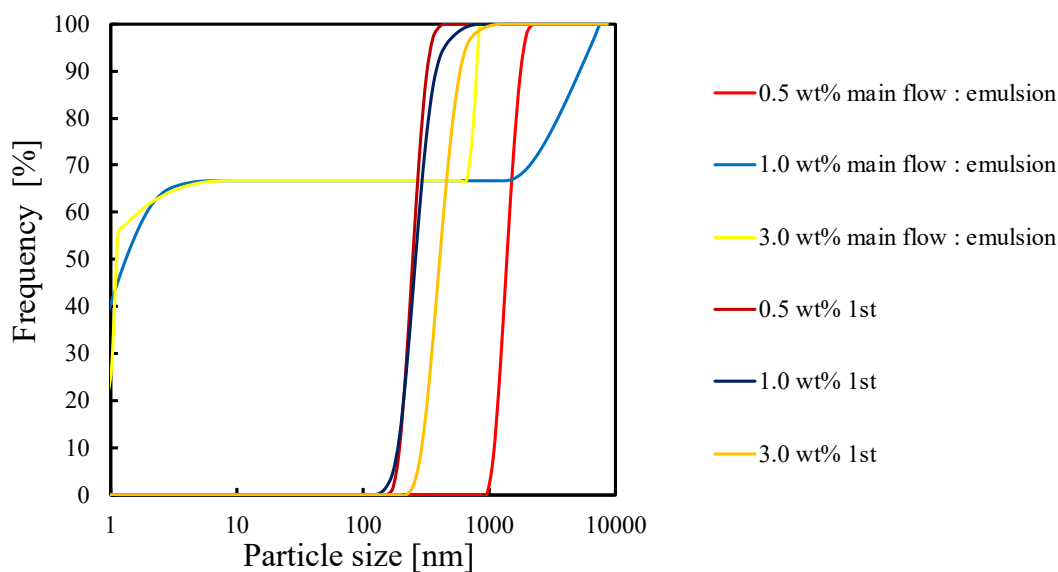


Fig.5.24 Effect of changing lecithin concentration on particle size distribution  
(main flow: emulsion)

2nd: 0.5 wt % (#5-35), 1.0 wt% (#5-36), 3.0 wt% (#5-37)

1st: 0.5 wt % (#5-13), 1.0 wt% (#5-24), 3.0 wt% (#5-25)

Table 7.の#5-34, #5-36, #5-38, #5-39 に示すように Ethanol 濃度と, mixer の主流を変更して実験を行った. Fig.5.25 に生成溶液の様子, Fig.5.26 に粒子径を示した. 溶液は Fig.5.25 からわかるように EtOH 濃度の上昇により中間にあった巨大な液滴相が消え油相と W/O/W エマルション相と水相になっている. また粒子径も 3.0 wt%の時は Fig.5.26 に示したようにミセルサイズや非常に大きなサイズが測定されていたところから, 30.0 wt%では一段階目のエマルションの粒子径と非常に近い粒子径を示している. このことから, Ethanol 濃度の上昇によりオレイン酸の抽出が促進されリポソームの形成が行われやすくなったと考えられる.

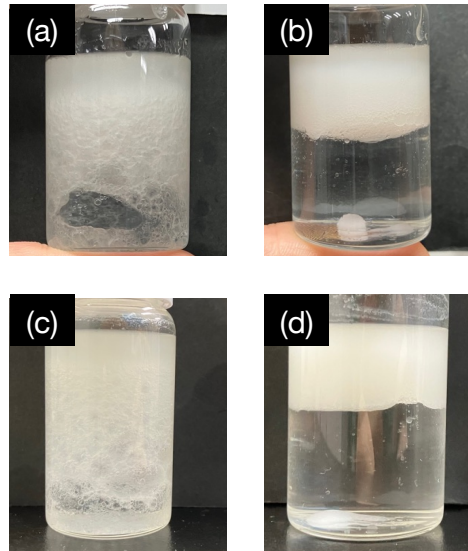


Fig.5.25 Image of product changing EtOH concentration and main flow  
 main flow: EtOH (a)3.0 wt% (#5-34), (b)30.0 wt% (#5-38)  
 main flow: emulsion (c)3.0 wt% (#5-36), (d)30.0 wt% (#5-39)

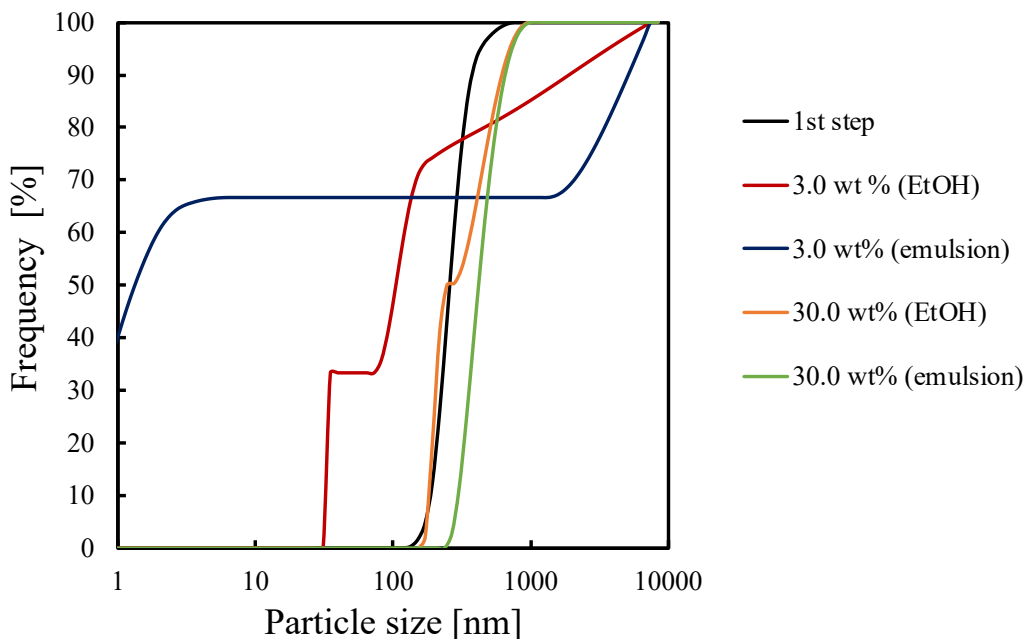


Fig.5.26 Effect of changing EtOH concentration on particle size distribution  
 1st step (#5-24), 3.0wt % (EtOH) (#5-34), 3.0wt % (emulsion) (#5-36),  
 30.0wt % (EtOH) (#5-38), 3.0wt % (emulsion) (#5-39)

## 5.4 まとめ

本章では、以下を目的として研究を行った。

1. 微小流路を利用したエマルジョンおよびリポソーム生成プロセスの構築
2. 操作因子がエマルジョンの粒子径と転化率に与える影響の確認
3. 操作因子がリポソーム形成に与える影響の確認

その結果として、以下の成果を得た。

1. 微小流路を利用した混合によるエマルジョンおよびリポソームの生成が可能であることを確認した。
2. 流量変更及びリン脂質濃度変更の粒子径と転化率への影響を確認した。
3. ミキサーや濃度変更によりリポソームの形成可能条件の知見を得た。

Table 6. Conditions of emulsion formation

No.	$C_{Lec}$ [wt%]	Flow rate		Mixer		Tube	
		$Q_O / Q_W$	$Q_{Total}$ [mL h <sup>-1</sup> ]	<i>I.D.</i> [mm]	<i>Type</i>	<i>I.D.</i> [mm]	<i>Length</i> [cm]
#5-1	0.5	2	36.0	1.3	T	0.75	25
#5-2	0.5	2	72.0	1.3	T	0.75	25
#5-3	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	25
#5-4	0.5	1	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-5	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-6	0.5	3	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-7	0.5	5	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-8	0.5	1	144.0	1.3	C	0.75	30
#5-9	0.5	2	144.0	1.3	C	0.75	30
#5-10	0.5	3	144.0	1.3	C	0.75	30
#5-11	0.5	5	144.0	1.3	C	0.75	30
#5-12	0.5	1	144.0	0.5	S	0.75	30
#5-13	0.5	2	144.0	0.5	S	0.75	30
#5-14	0.5	3	144.0	0.5	S	0.75	30
#5-15	0.5	5	144.0	0.5	S	0.75	30
#5-16	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	0
#5-17	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	15
#5-18	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	80
#5-19	0.5	2	144.0	1.3	T	0.75	110
#5-20	0.5	2	144.0	1.3	T	0.50	30
#5-21	0.5	2	144.0	2.3	T	1.59	30
#5-22	1.0	2	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-23	3.0	2	144.0	1.3	T	0.75	30
#5-24	1.0	2	144.0	0.5	S	0.75	30
#5-25	3.0	2	144.0	0.5	S	0.75	30

Table 7. Conditions of liposome formation

No.	$C_{Lec}$ [wt%]	$C_{EtOH}$ [wt%]	Mixer1	Mixer2			Tube2	
			Type	I.D. [mm]	Type (main flow)	BT	I.D. [mm]	Length [cm]
#5-26	0.5	3.0	T	1.3	T (Emulsion)	×	0.75	30
#5-27	0.5	3.0	S	1.3	T (Emulsion)	×	0.75	30
#5-28	3.0	3.0	S	1.3	T (Emulsion)	×	0.75	30
#5-29	3.0	3.0	S	1.3	T (EtOH)	×	0.75	30
#5-30	3.0	3.0	S	2.3	T (EtOH)	a	1.59	30
#5-31	3.0	3.0	S	2.3	T (EtOH)	b	1.59	30
#5-32	3.0	3.0	S	2.3	T (EtOH)	c	1.59	30
#5-33	0.5	3.0	S	2.3	T (EtOH)	a	1.59	30
#5-34	1.0	3.0	S	2.3	T (EtOH)	a	1.59	30
#5-35	0.5	3.0	S	2.3	T (Emulsion)	a	1.59	30
#5-36	1.0	3.0	S	2.3	T (Emulsion)	a	1.59	30
#5-37	3.0	3.0	S	2.3	T (Emulsion)	a	1.59	30
#5-38	1.0	30.0	S	2.3	T (Emulsion)	a	1.59	30
#5-39	1.0	30.0	S	2.3	T (EtOH)	a	1.59	30

## 第 6 章 超臨界と微小流路を利用したリポソームの形成

### 6.1 研究目的

第 1 章及び第 2 章で述べたように、従来の形成法は有機溶媒を大量に用いるため、有機溶媒の削減もしくは代替となるものを使用する必要がある。そこで本研究では、超臨界二酸化炭素を利用して有機溶媒の使用量を低減し、微小流路を利用することで製造効率を向上させながら、粒子径制御性の獲得と高い薬物効率なリポソームを生成することを目的とした。また、本手法を利用し PEG 化リポソームの作製にも取り組んだ。

### 6.2 実験操作

#### 6.2.1 試料

本章では有機溶媒として Ethanol(EtOH, 純度 99.5 %以上)を使用した。リン脂質として Egg yolk Lecithin(Lecithin, 純度 95.0 %以上), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine(DSPC, 純度 95.0 %)を使用した。PEG 脂質として 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amine(polyethylene glycol)-2K] (DSPE-PEG, 平均分子量 2000)を使用した。リポソームに内包する新水性薬物として Timolol Maleate(TM, 純度 98.0 %以上)を使用した。内包率の測定を行うために, Methanol(MeOH, 純度 99.8 %以上)及び Acetic Acid(純度 99.9 %以上)を使用した。Ethanol, Lecithin, Timolol maleate, Methanol, Acetic Acid は富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。DSPC は東京化成工業株式会社から購入した。

#### 6.2.2 リポソームの形成

scCO<sub>2</sub>を利用したリポソームの形成装置の概略図を Fig.6.1 に、リポソームの生成の概図を Fig.6.2 に示す。Lecithin を Ethnaol に 0.3 wt% 溶かし、Timolol maleate を水に 0.5 wt% 溶かした。CO<sub>2</sub> と Lecithin 溶液はそれぞれ HPLC ポンプ (P<sub>1</sub>) (PU-4386, 日本分光株式会社) と HPLC ポンプ (P<sub>2</sub>) (PU-4180, 日本分光株式会社) で供給した。恒温槽(BK 30 Constant Temperature Water Bath, Yamato Science Co, Ltd., 設定温度: 40 °C) 内の T 字型接合部でこれら二つの溶液を混合し、均一相を形成させた。CO<sub>2</sub> の流量は、定量弁 (V<sub>7</sub>) と流量計 (GF1010, ジーエルサイエンス株式会社) を用いて、大気圧で 1000 mL min<sup>-1</sup> となるように制御した。圧力は、背圧調整器 (26-1700 Series, テスコム電機株式会社) を用いて 10.0 MPa に制御した。Lecithin / Ethanol / scCO<sub>2</sub> 溶液と Timolol maleate 水溶液を HPLC ポンプ (P<sub>3</sub>) (PU-4180, 日本分光株式会社) を用いて供給しながら混合した。混合は、マイクロスワールミキサー (4-1/16YSM-0.8-0.5-S, 杉山商事株式会社) を用いて行い、W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンを効率よく形成した。HPLC ポンプ (P<sub>4</sub>) (PU-2000, 日本分光株式会社) で水を供給し、T 型混合機で W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンを水に混合させた。W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンと水は、長さ 2.0 m, 内径 500 μm のマイクロチャネル (C<sub>5</sub>) 内でスラグ流を形成し、W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンの水滴が他の水相に輸送されてリポソームを形成することができる。マイクロチャネルを通過した水相

は、分離セルに収納された.30分保存後、バルブ (V<sub>5</sub>) と定量バルブ (V<sub>6</sub>) を開き、リポソーム溶液を回収した。

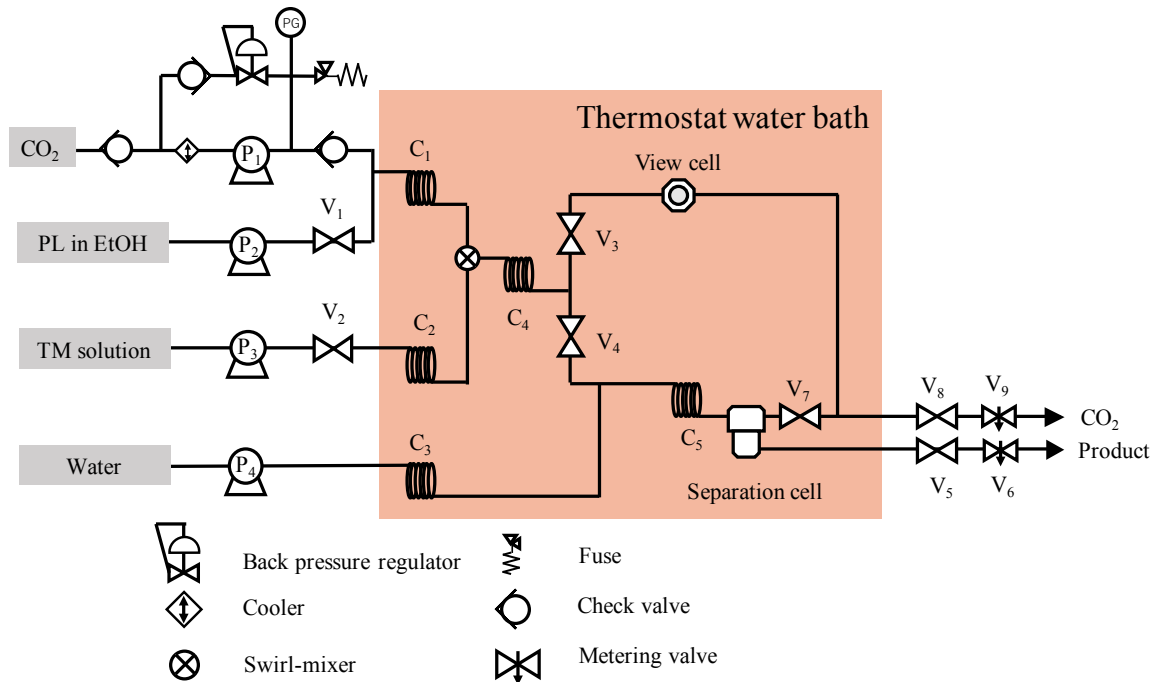


Fig.6.1 Schematic diagram of experimental equipment for liposome formation using scCO<sub>2</sub>

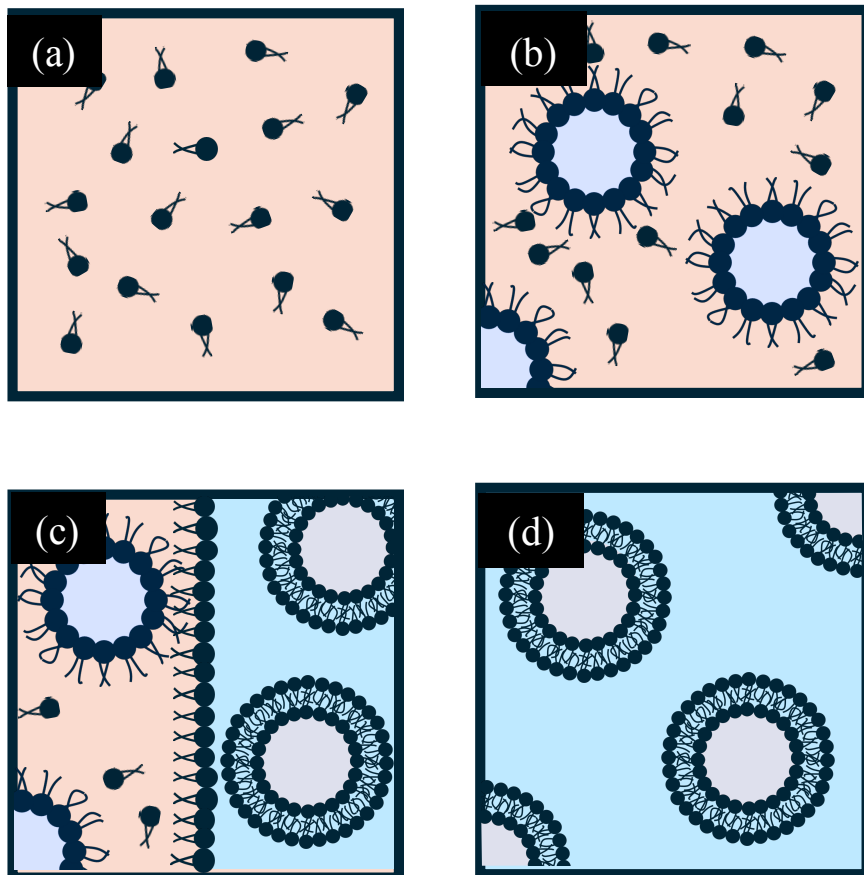


Fig.6.2 Scheme of liposome production using supercritical microfluidic method  
 (a) Phospholipid in scCO<sub>2</sub>, (b) Water in scCO<sub>2</sub> emulsion,  
 (c) Phase transfer formation of liposome, (d) Liposome

本実験では 1. Lecithin 溶液の流量の影響, 2. Timolol maleate 溶液の流量の影響, 3. H<sub>2</sub>O の流量影響(長さ 1.0 m, 内径 500  $\mu$ m のコイル (C<sub>4</sub>) の追加による影響), 4. コイル追加後の Lecithin 溶液の流量の影響, 5. リポソーム生成過程である長さ 2.0 m, 内径 500  $\mu$ m のマイクロチャンネル (C<sub>5</sub>) の長さの変更を行った. これら各実験の流量などの実験条件を Table 8-12. に示した.

さらに脂質を Lecithin から DSPC に変更して実験を行った. その際は Table 13. に示すような濃度, 流量, 温度の条件で行った.

### 6.2.3 PEG 化リポソームの形成

DSPC を Ethnaol に 0.15 ~ 0.27 wt% 溶かし, Timolol maleate を水に 0.5 wt% 溶かした. CO<sub>2</sub> と DSPC 溶液はそれぞれ HPLC ポンプ(P<sub>1</sub>) (PU-4386, 日本分光株式会社) と HPLC ポンプ(P<sub>2</sub>) (PU-4180, 日本分光株式会社) で供給した. 恒温槽 (BK 30 Constant Temperature Water Bath, Yamato Science Co, Ltd., 設定温度: 40 °C) 内の T 字型接合部でこれら二つの溶液を混合し, 均一相を形成させた. CO<sub>2</sub> の流量は, 定量弁 (V<sub>7</sub>) と流量計 (GF1010, ジーエルサイエンス株式会社) を用いて, 大気圧で 1000 mL min<sup>-1</sup> となるように制御し, DSPC/EtOH 溶液の流量は 0.10 mL min<sup>-1</sup> に調整した. 圧力は, 背圧調整器 (26-1700 Series, テスコム電機株式会社) を用いて 10.0 MPa に制御した. DSPC / Ethanol / scCO<sub>2</sub> 溶液と Timolol maleate 水溶液を HPLC ポンプ (P<sub>3</sub>) (PU-4180, 日本分光株式会社) を用いて 0.01 mL min<sup>-1</sup> の流量で供給しながら混合した. 混合は, マイクロスワールミキサー (4-1/16YSM-0.8-0.5-S, 杉山商事株式会社) を用いて行い, 長さ 1.0 m, 内径 500  $\mu$ m のコイル (C<sub>4</sub>) に導入し W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンを効率よく形成した. HPLC ポンプ(P<sub>4</sub>) (PU-2000, 日本分光株式会社) で水を供給し, T 型混合機で W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンを水に混合させた. W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンと水は, 長さ 2.0 m, 内径 500  $\mu$ m のマイクロチャンネル (C<sub>5</sub>) 内でスラグ流を形成し, W / scCO<sub>2</sub> エマルジョンの水滴が他の水相に輸送されてリポソームを形成することができる. マイクロチャンネルを通過した水相は, 分離セルに収納された. 30 分保存後, バルブ (V<sub>5</sub>) と定量バルブ (V<sub>6</sub>) を開き, リポソーム溶液を回収した. これらの操作は, DSPE-PEG を含まないリポソームを形成するための標準的な条件であり, Pre-tube と Post-tube という 2 通りの方法で供給された. DSPE-PEG は DSPC/EtOH 混合液に 0.03 wt%溶解して Pre-tube 用システムに供給し, DSPE-PEG は W/scCO<sub>2</sub> エマルジョンと混合する水相に 0.03 ~ 0.09 wt.%溶解して Post-tube 用システムに供給した. 各実験の条件は Table 14, 15. に示した.

### 6.2.4 薄膜水和法による PEG 化リポソームの形成

比較実験のため薄膜水和法によるリポソームの形成を行なった.

50 mL のバイアルに DSPC を 20 g の Ethanol に溶解させ DSPC/Ethanol 溶液を調製した. この溶液を 60 °C の水浴で 24 時間 500 rpm で加熱しながら攪拌し, 溶媒を蒸発させた. その後デシケーターで一晩かけ溶媒を完全に除去した. これにより, バイアルの壁面にリン脂質の膜を生成した. 0.5 wt% の Timolol maleate 水溶液を 10 g 添加し, 24 時間攪拌することでよりリポソーム溶液を生成した. これらの操作は, DSPE-PEG

を添加しないリポソームを形成するための標準的な条件であり, Pre-mix と Post-insertion の 2 通りの方法で行った. DSPE-PEG を DSPC/Ethanol 水溶液に添加したのが Pre-mix で, DSPE-PEG を TM 水溶液に添加したのが Post-insertion である. どちらの手順でも, DSPC と DSPE-PEG の重量比は, DSPC/Ethanol 溶液の重量比と同じになるように調整した. DSPC と DSPE-PEG の総重量は 0.025 g とした. 実験条件は Table 16. にまとめた.

### 6.2.5 評価方法

形成したリポソームの粒子径と ζ 電位は得られた水溶液を動的光散乱法(DLS: Partica SZ-100-Z, 株式会社堀場製作所製)を用いて 25 °C で測定し決定した.

またリポソームの Timolol maleate 内包率(カプセル化効率, Encapsulation Efficiency: EE)は以下のように定義した.

$$EE = \frac{W_{\text{inside}}}{W_{\text{total}}} \quad (3)$$

$W_{\text{inside}}$  はリポソーム内の Timolol maleate の量,  $W_{\text{total}}$  は Timolol maleate の総供給量である. リポソーム内の Timolol maleate の量を算出するために, Fig.6.3 のようにリポソーム水溶液を透析膜 Float-A-Lyzer G2 (G235073, Spectrum Laboratories, Inc. 製)を用いて約 18 時間透析し, 透析後の外液を高速液体クロマトグラフ(High Performance Liquid Chromatography: HPLC)によって Timolol maleate 濃度を測定した. 0.2 wt% Acetic Acid 水溶液と Methanol を重量比 7:3 で混合し移動相として利用した. カラムとして Unifinepak C18(03100-3M, 内径 3.0 mm, 長さ 100 mm, 日本分光株式会社製)を使用し, 273 nm の波長で Timolol maleate の検出を行った. 計測に使用した機器は, 液体ポンプ (PU-4580, 日本分光株式会社製), オープン (CO-4060, 日本分光株式会社製), UV-vis 検出器 (UV-4570, 日本分光株式会社) である.

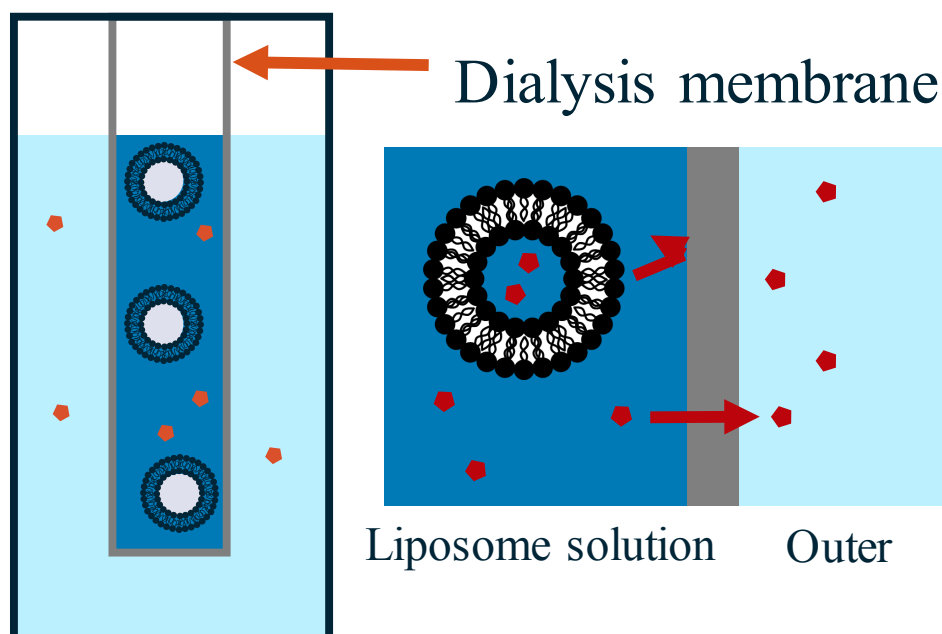


Fig.6.3 Schematic diagram of dialysis

リポソームの構造は、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ズ製)を用い、ネガティブ染色法を用いて観察した。

リポソームのゼータ電位から算出した表面固定水相(fixed aqueous layer thickness : FALT)を用いて、リポソームのPEG化状態を評価した。ゼータ電位 $\zeta$ は *Gouy-Chapman* 理論[147]により以下のように定義されている：

$$\ln \zeta = A - KL \quad (3)$$

ここで、 $A$  は定数、 $K$  は *Debye-Huckel* パラメータ ( $K=C^{0.5}/0.3$ ,  $C$  は NaCl の体積モル濃度 mol L<sup>-1</sup>),  $L$  はリポソーム表面からスリップ面までの厚さである。 $L$  は先行研究[148]に基づき FALT とみなした。NaCl 濃度を 12.5 ~ 50.0 mmol L<sup>-1</sup> の間で変化させながら、DLS を用いてリポソームのゼータ電位を測定しその値を元に FALT を算出した。

## 6.3 結果と考察

### 6.3.1 Lecithin リポソームの粒子径及びカプセル化効率

#### 6.3.1.1 Lecithin 溶液及び Timolol maleate 溶液の流量の影響

Lecithin 溶液の流量変更による粒子径とカプセル化効率への影響を Fig.6.4. 及び Table 8.に示した。Lecithin 溶液の流量が大きくなること粒子径は増加することがわかった。これは流量増加によりエマルションの生成の過程において Timolol maleate 溶液の液滴に対して攪拌が強くなるため合一が起きやすくなるためと考えられる。これは Timolol maleate 溶液の流量変化の影響からも分かる。Timolol maleate 溶液の流量変更による粒子径とカプセル化効率への影響を Fig.6.4 及び Table 9. に示した。Timolol maleate 溶液の流量が増えることによって粒子径は小さくなることがわかる。Timolol maleate 溶液が多くなることでエマルションの生成の過程において液滴の攪拌が鈍くなり合一が起きづらいためと考えられる。しかしながら Timolol maleate 溶液の流量を増やすと基準となる液滴が大きくなるため粒子径の減少率は低くなっている。

カプセル化効率に関しては、どちらにおいても流量による影響は見られない。これはどちらの流量に関してもエマルション生成においてのできた粒子の合一の起こりやすさのみ影響するため、カプセル化効率は変動していないと考えられる。

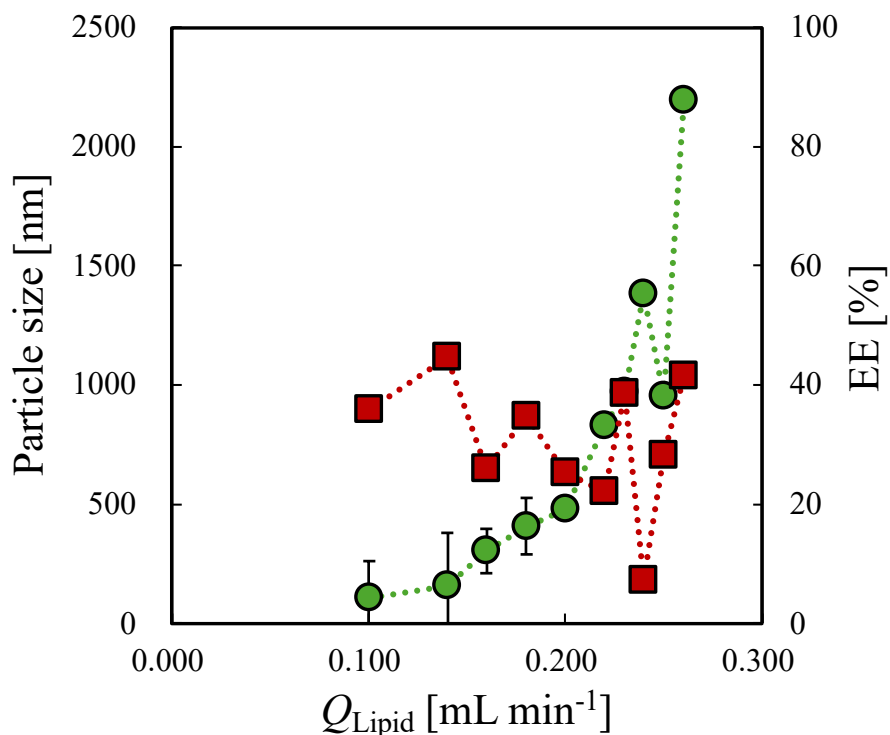


Fig.6.4 Effect of Lecithin/EtOH flow rate on particle size and EE of lecithin liposome  
 ●: Particle size, ■: EE

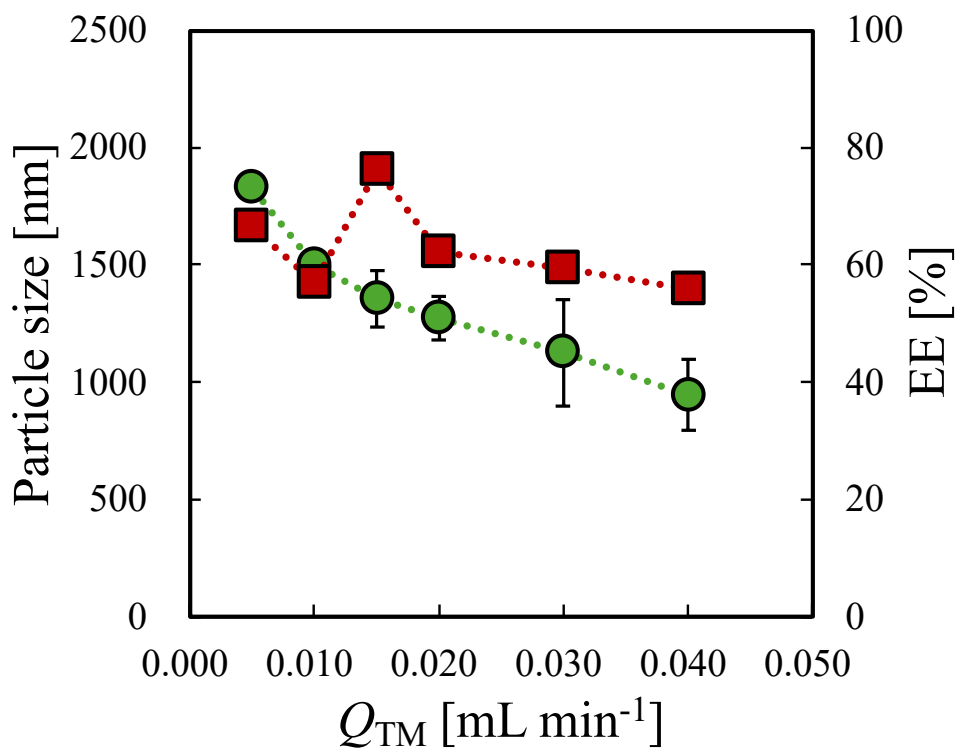


Fig.6.5 Effect of TM/H<sub>2</sub>O flow rate on particle size and EE of lecithin liposome  
 ●: Particle size, ■: EE

### 6.3.1.2 H<sub>2</sub>O の流量の影響及びコイル追加による影響

次に H<sub>2</sub>O の流量による影響及びコイル追加による影響について述べる. Fig.6.7 及び Table 10. に示すように H<sub>2</sub>O 流量の増加により粒子径は減少する.

Fig.6.6 に示すようにエマルション生成のラインに長さ 1.0 m, 内径 500  $\mu\text{m}$  のコイル (Fig.6.1 の C<sub>4</sub>) を追加する. 実験時可視化窓付セルを利用しエマルションが生成していることを確認してから実験を行っていたが, その可視化セルに辿りつくまでのラインの長さには比べ H<sub>2</sub>O との合流ラインは短かった. Fig.6.6 に示したように, 1 cm ほどしかなかった. コイル (C<sub>4</sub>) を追加し影響を確認した. Fig.6.7 に示したようにコイルを追加することで H<sub>2</sub>O 流量による粒子径への影響は無くなった. このことから, リポソーム生成過程そのものによる影響ではないことが示された. エマルション生成ラインを延長することで起きる影響はエマルションの生成の安定である. 生成ラインの長さによりエマルション生成が仕切る前に水相と接触しリポソームを生成していたため, リポソーム生成時にエマルションとして生成されきっていない粒子が存在しそれがリポソーム生成過程でエマルションに取り込まれ粒子径が大きくなっていると考えられる. H<sub>2</sub>O の流量が大きいと相移動にかかる時間が長くなるため実質エマルション形成に使える時間が取れ, コイルの追加による粒子径への影響がないと考えられる.

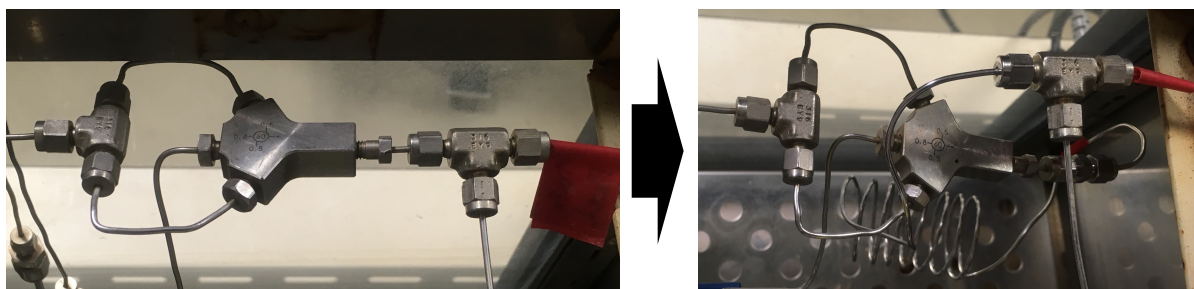
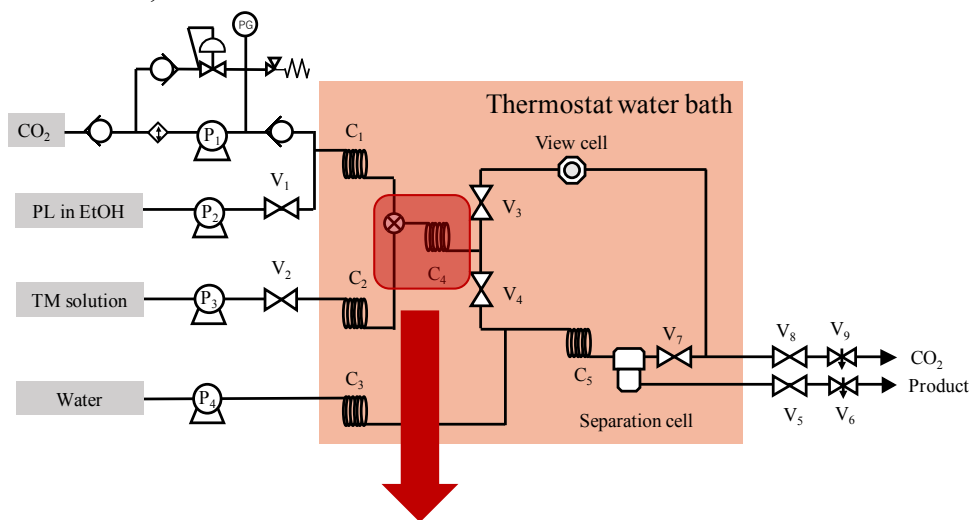


Fig.6.6 Images before and after adding the coil

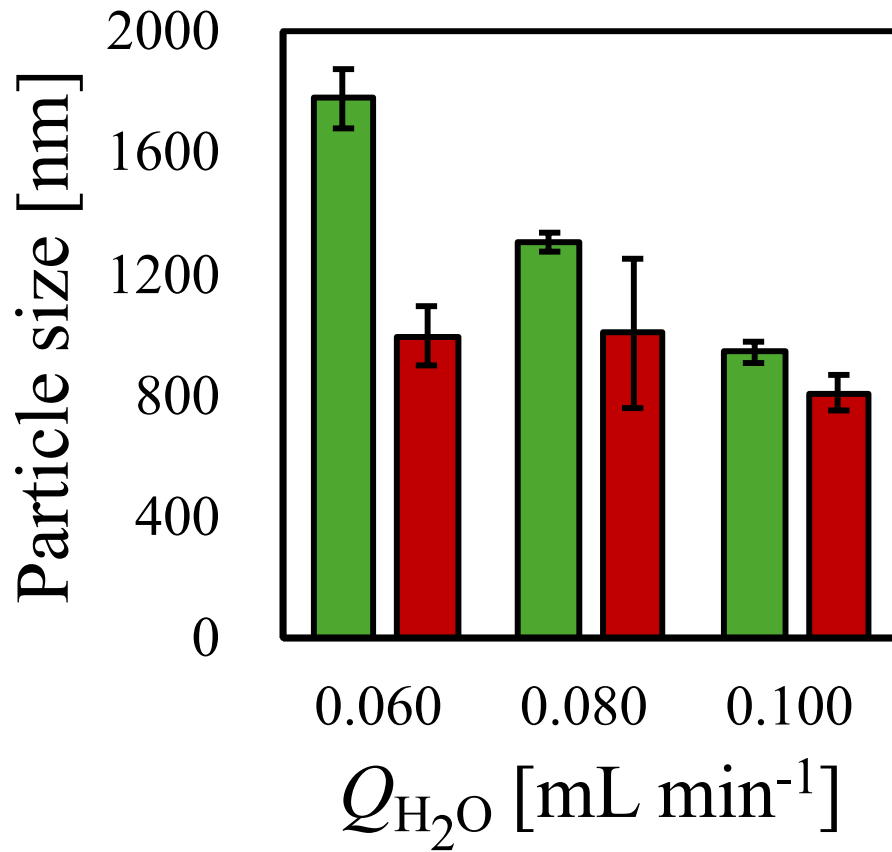


Fig.6.7 Comparison of the effect of H<sub>2</sub>O flow rate with or without the coil on particle size of lecithin liposome ■: Without coil, ■: With coil

### 6.3.1.3 コイル追加後の Lecithin 溶液の流量の影響

コイル追加後の Lecithin 溶液の流量変更による粒子径と EE への影響を Fig.6.8 及び Table 11. に示した. 6.3.1.1 での結果と同様に流量増加による粒子径の増加が起きている. 原理も同様にエマルションの合一によるものであると考えられるが, カプセル化効率が約 70 %とコイル導入前に比べ格段に上昇し, 流量によるばらつきも抑えられている. これはコイル導入によるエマルション生成の安定がうまくいっていることを示している. 追加前はエマルションの生成が完成しきる前にリポソーム生成を行ったためカプセル化効率が悪く, 粒子径制御にブレが生じていた. 粒子径自体は 6.3.1.2 でも述べたようにコイル設置前と後で差はないことから, エマルションサイズそのものにはコイルは影響しておらず, 生成の完了のみへの影響と考えられる.

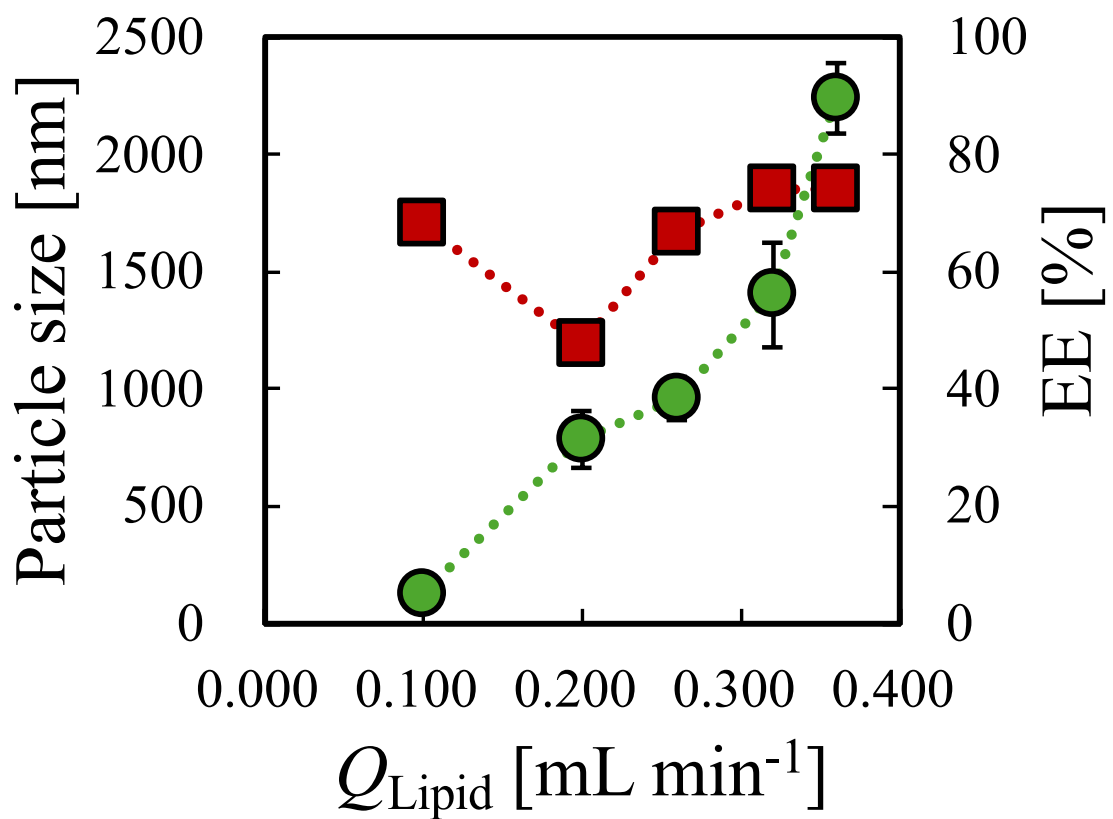


Fig.6.8 Effect of Lecithin / EtOH flow rate on particle size and EE of lecithin liposome

●: Particle size, ■: EE

#### 6.3.1.4 コイル追加後のマイクロチャネル (C<sub>5</sub>) の長さの変更の影響

マイクロチャネル(C<sub>5</sub>)の長さの変更による粒子径とカプセル化効率への影響を Fig.6.9 及び Table 12. に示した. 長さを伸ばすことで粒子径にはあまり影響はなくカプセル化効率が大きく減少した. このことから, リポソーム形成後に時間をかけすぎるとリポソームが崩壊していることが分かる. そのためリポソーム生成過程は短い方が良いと考えられる. しかしながら, 短すぎるとリポソームの生成が完了しないと考えられる. 今回は 2.0 m が最短であるため, 2.0 m 以上であれば 2.0 m が一番効率は良いと思われる.

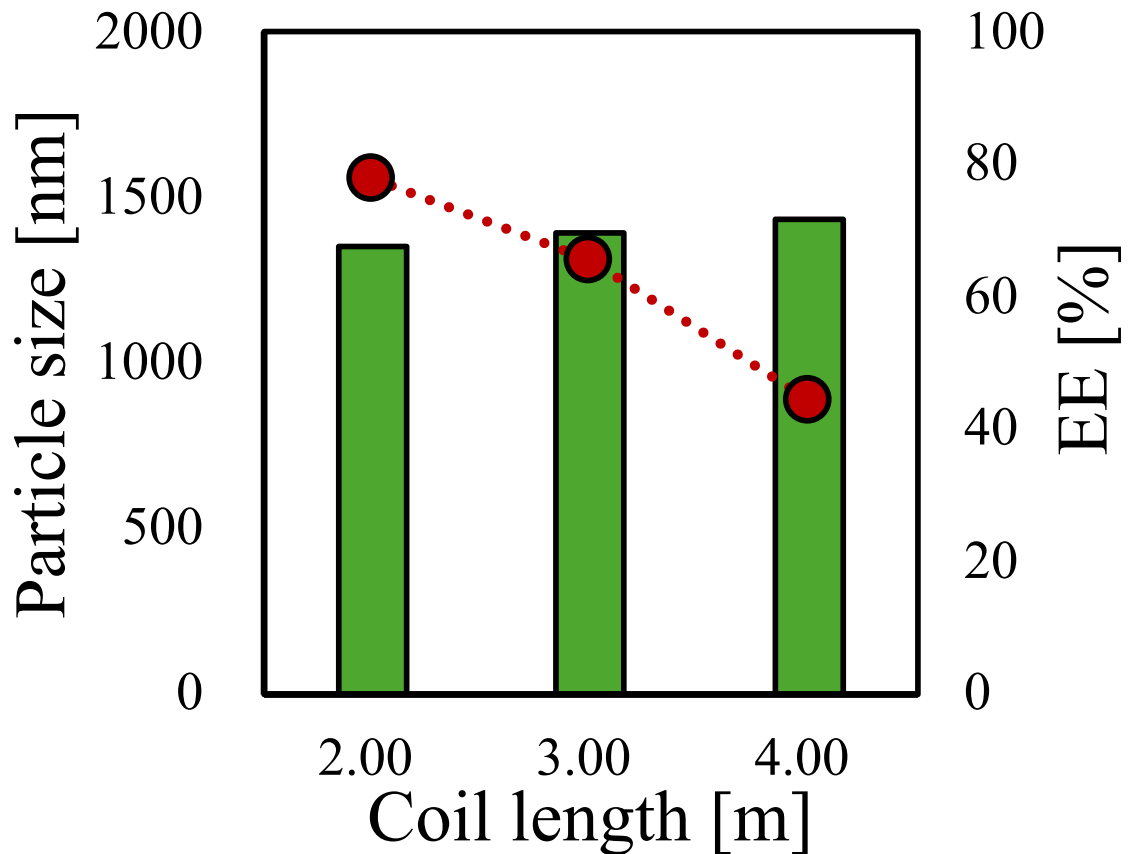


Fig.6.9 Effect of coil length on particle size and EE ■: Particle size, ■: EE

### 6.3.2 DSPC リポソームの粒子径及びカプセル化効率

Table 13.に結果をまとめた。EE が Lecithin の時と比べ悪くなっている。これはリポソームの生成がうまくいっていないためである。Fig.6.10 に示すようにリポソームの生成はできているが、Fig.6.11(a)に示すように沈殿物が大量に生成してしまった。そのためリポソームとなるリン脂質が足りずカプセル化効率が悪くなっている。Fig.6.11(b, c)のように可視化セルにおいてのエマルジョンの確認の際の時点で沈殿物が大量にできている。よってエマルジョン生成に使えず脂質のミセルもしくは脂質塊になっていると考えられる。#3-1, #3-5 において沈殿物は生成されていなかった。これは#3-1 に関しては Timolol maleate 溶液の流量が少ないため、水相との接触による溶解度低下による析出を抑えられたためと考えられる。#6-35 に関しては DSPC 濃度が薄いためリン脂質のロスが少なくなり析出が起きなかったと考えられる。

#6-36 に関しては、温度 50 °C であり、その際は Fig.6.11(d)のようにエマルジョン生成段階での析出がみられず、生成物においても沈殿物が存在しなかった。これは DSPC の相転移温度に近づいたためエマルジョン生成がうまく行えたことと、溶解度そのものも上昇し、エマルジョン生成に使えた脂質も増えていると考えられる。実際カプセル化効率が向上していることからこの考えは正しいと思われる。

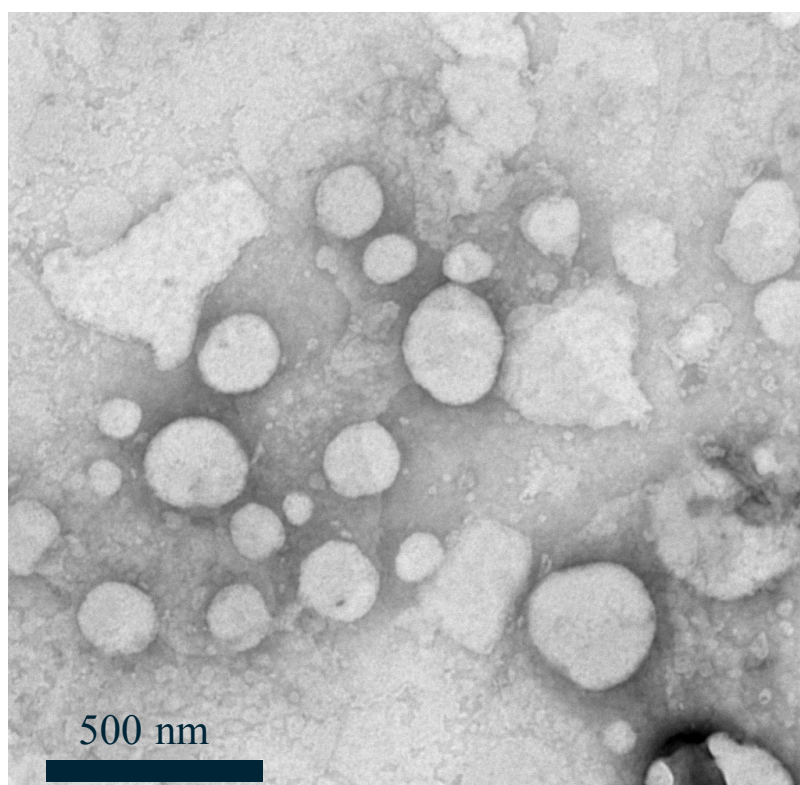


Fig.6.10 TEM images of DSPC liposome at DSPC concentration of 0.27 wt% (#3-1)

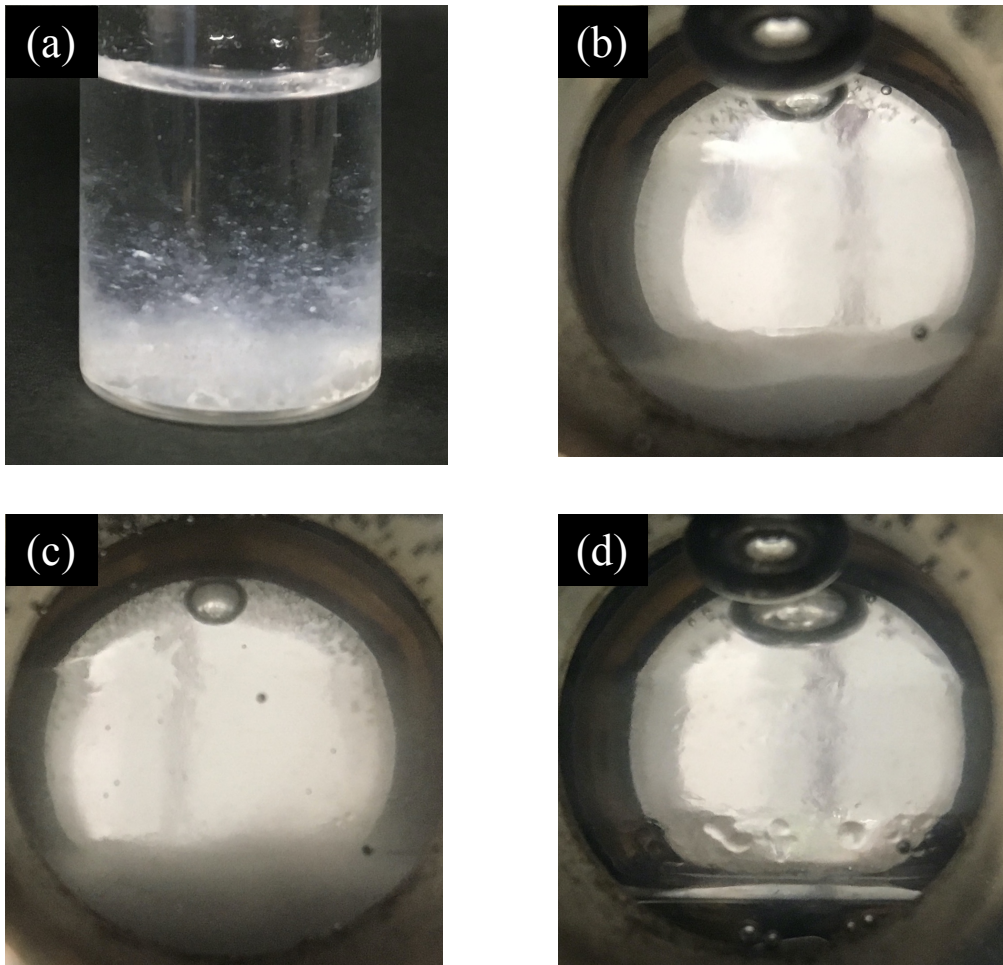


Fig.6.11 Image of DSPC liposome solution and image of state in view cell  
 (a) DSPC liposome solution, (b-d) State of view cell (#6-33, #6-34, #6-36)

### 6.3.3 PEG 化リポソームの形成

#### 6.3.3.1 PEG 脂質投入ラインの影響

DSPC と DSPE-PEG の重量比を 10:0, 9:1, 8:2 とし, LipTube プロセスを用いてリポソーム作製における DSPE-PEG の供給ラインの影響を調べた. 詳細な実験条件は Table 14. の#6-37 ~ #6-42 に示す. DSPE-PEG を使用しない場合, 生成物は均一な濁度を示した. しかし, DSPE-PEG を DSPC/EtOH/scCO<sub>2</sub> 溶液とともにエマルジョン形成ミキサーに供給した場合 (Pre-tube 条件) には, Fig.6.12(a) に示すように, 作製した溶液に沈殿物が多量に観察された. 一方, DSPC/DSPE-PEG の比率が同じで, エマルジョン形成ミキサー後に DSPE-PEG 水溶液を供給した場合 (Post-tube 条件) には, Fig.6.12(b) に示すように, 均一な濁りがありチンダル現象も確認された. これらの結果は, W/scCO<sub>2</sub> エマルジョン形成後に PEG 源を供給することが, 沈殿のないリポソームを作製するための重要な因子であることを明確に示している. さらに, 水溶液中での PEG や他のリン脂質の拡散過程では, リン脂質の二重層形成よりもミセル形成の方が速く起こることが報告されている[109]. 文献に基づくと, Pre-tube 条件下での沈殿現象は, エマルジョン形成ミキサー内で DSPE の PEG 源と DSPC のリン脂質が同時に水と接触するため, ミセルが形成され, その結果マイクロチャンネル内にて凝集体が蓄積したためと考

えられる。

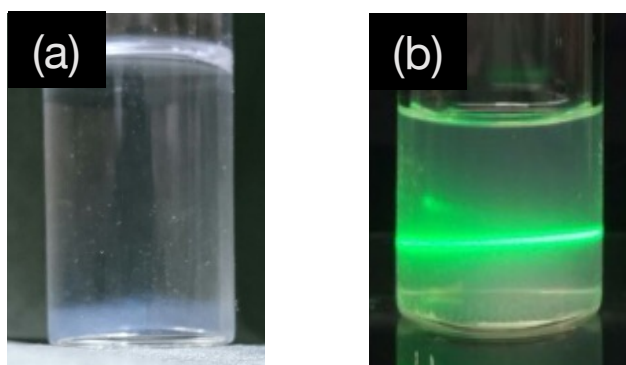


Fig.6.12 The optical images of product solutions fabricated from (a) Pre-tube and (b) Post-tube conditions in the weight ratio of DSPC: DSPE-PEG 9:1.

### 6.3.3.2 リポソームの粒子径分布と EE に対する作製法の影響

Fig.6.13 に DSPC/DSPE-PEG 9:1 の重量比で薄膜水和法 (Pre-mix と Post-insertion) と LipTube 法 (Post-Tube) を用いて作製したリポソーム溶液の DLS 結果と EE を示した。詳細な条件は Table 14.の#6-40, Table 16.の#6-48, #6-49 に示す。いずれの条件においても、一様なサイズ分布を持つリポソームが得られた。また, LipTube 法では, 薄層法 (Pre-mix 法および Post-insertion 法) で作製したリポソームよりもサイズが小さく, サイズ分布が狭いリポソームが得られた。これらの結果から, LipTube 法は, DSPE-PEG の添加方法によらず, 薄膜水和法よりも平均粒子径および粒子径分布を小さくできる手法であることが示された。また, LipTube 法 (Post-tube) では, 薄層法 (Pre-mix および Post-insertion) よりも高い EE 値が得られた。これは, リポソーム形成のための水相の添加方法に起因すると考えられる。薄層法ではリポソームの内水相と外水相を同時に添加したが, LipTube 法では二相を別々に添加した。したがって, LipTube 法では Timolol maleate 溶液をリポソーム内部のみに内包しやすくなっていると考えられる。

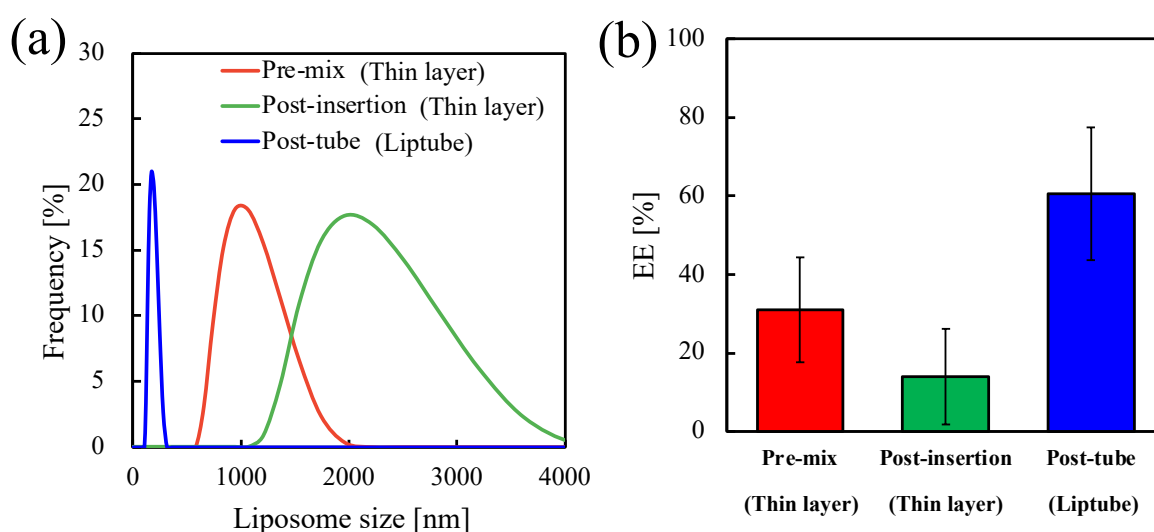


Fig.6.13 (a) The DLS results and (b) EE of liposome fabricated from Pre-mix (#6-48), Post-insertion (#6-49) and Post-tube (#6-40) conditions in the weight ratio of DSPC: DSPE-PEG 9:1.

### 6.3.3.3 リポソームの粒子径と EE に対する DSPC および DSPE-PEG 濃度の影響

Fig.6.14 に DSPC/DSPE-PEG の重量比が 9:1, 8:1, 7:3, DSPE-PEG 濃度が 0.00 ~ 0.05 wt.%,  $C_{\text{DSPC}} = 0.15$  wt.% の LipTube プロセス (Post-tube) で作製したリポソームの平均サイズを示す. 詳細な条件は Table 14. の #6-40 ~ #6-42, Table 15. の #6-43 ~ #6-46 に示す. DSPC/DSPE-PEG を 9:1 から 7:3 まで変化させた結果, リポソームサイズが大きくなり, さらに DSPE-PEG 濃度の増加とともにリポソームサイズは増加傾向を示した. W/scCO<sub>2</sub> エマルション中の水滴はリポソームの鋳型として機能し, DSPE-PEG 濃度の変動はリポソームサイズを増大させた. DSPE-PEG 濃度の変動は乳化過程および水滴サイズに影響を及ぼさない. したがって, DSPE-PEG 濃度が高いほど DLS サイズが大きくなる理由は, リポソームの接着現象にあると考えられる. Fig.6.15 は,  $C_{\text{DSPE-PEG}} = 0.0, 0.05$  wt.% と  $C_{\text{DSPC}} = 0.15$  wt.% で得られたリポソームの TEM 像である. いずれの条件でも, ほぼすべてのリポソームが一層構造をとっており, これはエマルション中の水滴が鋳型として機能していることを示している. また,  $C_{\text{DSPE-PEG}} = 0.0$  wt.% では単離されたリポソームが大半を占め,  $C_{\text{DSPE-PEG}} = 0.05$  wt.% ではリポソームのほとんどが互いにくっついていくことがわかる. これらの結果から, DLS 測定による見かけの大きさは, PEG 化リポソームの接着により DSPE-PEG 濃度が増加するにつれて大きくなることを示された.

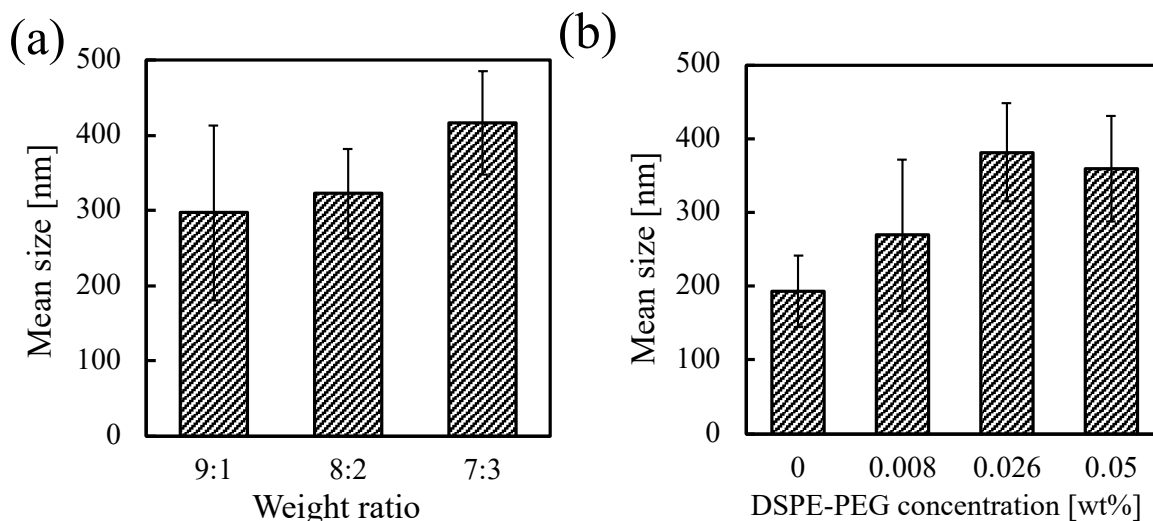


Fig.6.14 Effect of (a) the weight ratios of DSPC: DSPE-PEG and (b) DSPE-PEG concentration on the mean size of liposome.

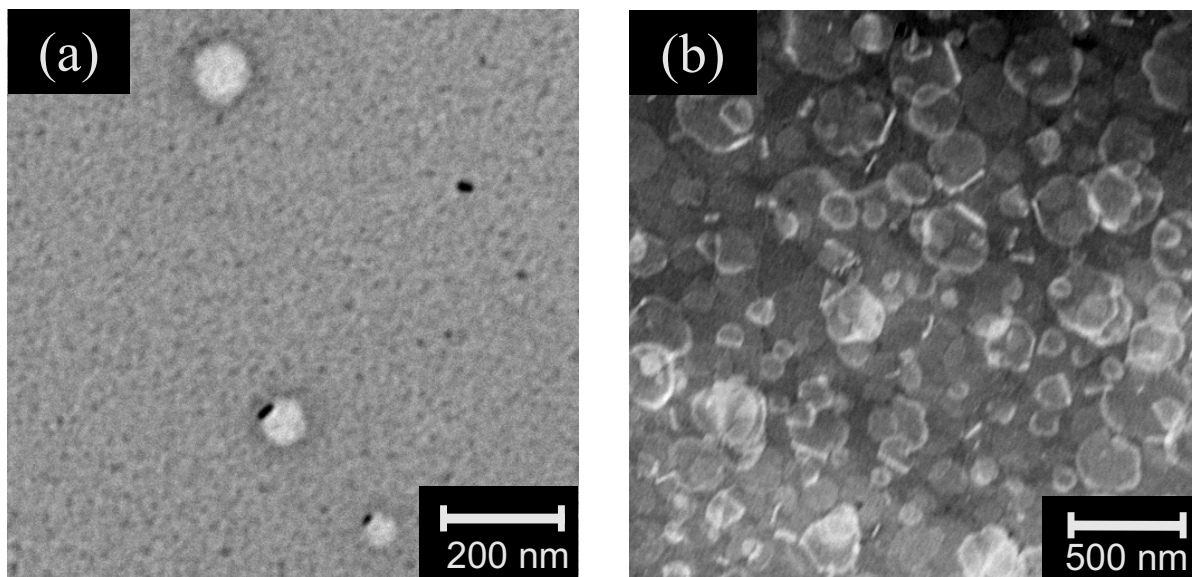


Fig.6.15 The TEM images of liposomes fabricated from Post-tube conditions at DSPE-PEG concentration of (a) 0.0 wt% (#6-43) and (b) 0.050 wt% (#6-46) and at  $C_{\text{DSPC}} = 0.15$  wt%.

Fig.6.16 に、DSPC/DSPE-PEG の重量比を 9:1, 8:1, 7:3, DSPE-PEG 濃度を 0.00 ~ 0.05 wt.% ( $C_{\text{DSPC}} = 0.15$ wt.%) とした LipTube プロセス (Post-tube) で作製したリポソームの EE を示す。DSPE-PEG 濃度は、Fig.6.15(b)に示すように、EE に大きな影響を与えなかった。しかし Fig.6.15(a)に示すように DSPC/DSPE-PEG を 9:1 から 7:3 に変化させると、リポソームの EE が低下した。この結果は、DSPC 濃度の低下が EE の低下につながることを示している。Post-tube 条件では、DSPC/EtOH/scCO<sub>2</sub> 溶液は TM 水溶液と混合され、W/scCO<sub>2</sub> エマルジョンを形成する。したがって、DSPC の濃度が低下すると水滴の形成収率が低下し、その結果リポソームの形成率も低下する。よって DSPC 濃度の低下が EE の低下を引き起こすと示された。

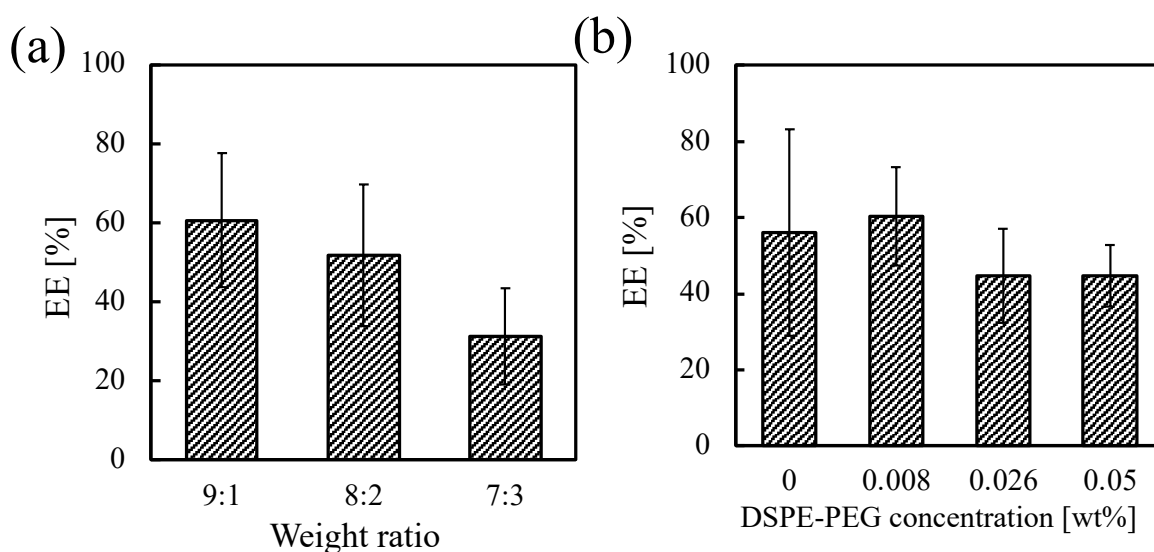


Fig.6.16 Effect of (a) the weight ratios of DSPC: DSPE-PEG and (b) DSPE-PEG concentration on the EE of liposome.

### 6.3.3.3 PEG 化リポソームの FALT の確認

Fig.6.17 に, DSPC/DSPE-PEG の重量比が 10:0, 9:1, 8:2 の LipTube プロセス (Post-tube) で作製したリポソームのゼータ電位を示す. DSPC/DSPE-PEG を 10:0 から 9:1 に変化させると, ゼータ電位はマイナスからプラスに変化し, さらに 9:1 から 8:2 に変化させると, ゼータ電位はプラスに上昇した. DSPC リポソームの表面は一般に負に帯電しており[149], DSPE-PEG を用いた PEG 化によって表面電位が負から正に変化するためである[150]. このことから PEG 化リポソームの形成が行われていることが示される.

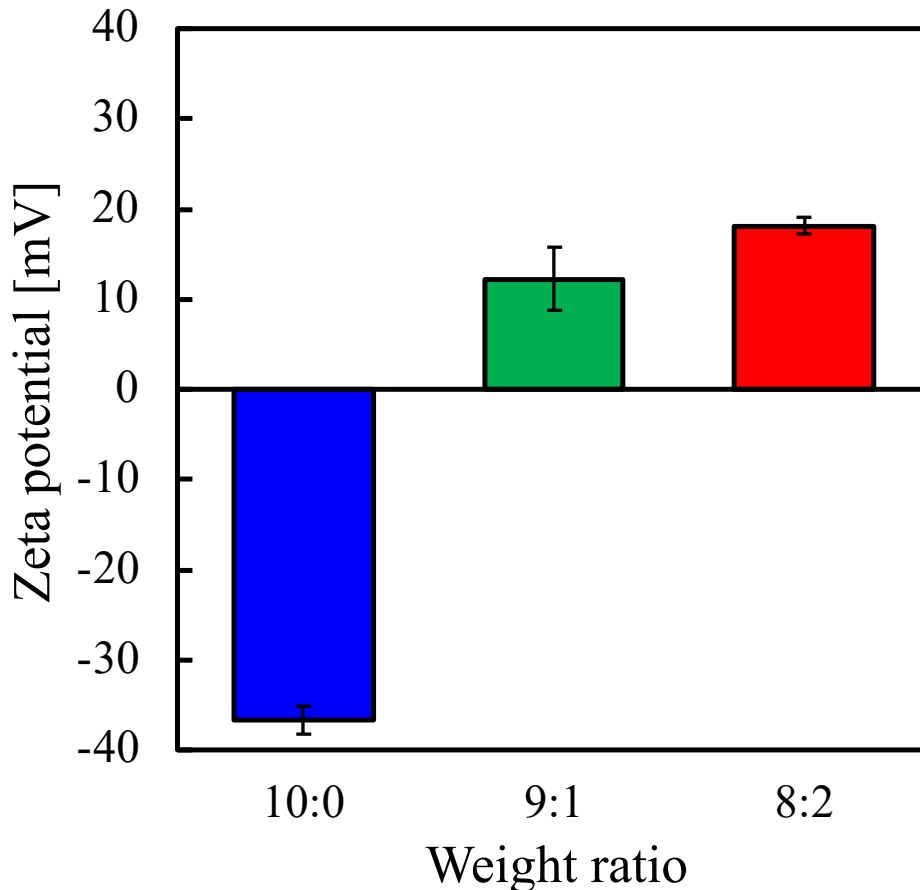


Fig.6.17 Effect of the weight ratios of DSPC: DSPE-PEG on the zeta potential of liposome.

Fig.6.17(a)に, DSPC/DSPE-PEG の重量比が 10:0, 9:1, 8:2 のリポソーム溶液の  $\ln\zeta$  と *Debye-Huckel* パラメータ  $K$  の関係を示す. この  $\ln\zeta$  と  $K$  の間の直線の傾きから FALT を算出する. Fig.6.17(b)に示すように, FALT は DSPE-PEG 濃度の増加とともに増加した. リポソームの PEG 化は一般的に FALT の増加につながるため[148], PEG 化リポソームの形成をさらに裏付けている. この結果は, LipTube プロセス (Post-tube) は DSPE-PEG 濃度を変えることでリポソームの PEG 化状態を制御できる可能性があることを示している.

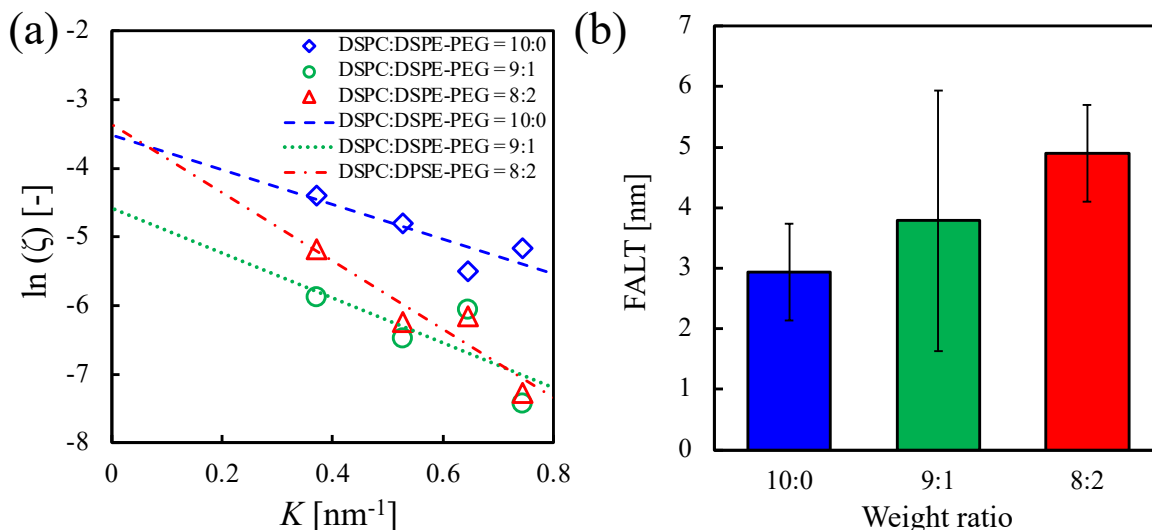


Fig.6.17 (a) The relationship between  $\ln \zeta$  and Debye-Huckel parameters  $K$  and (b) the FALT for the liposome solution fabricated from Post-tube conditions where the weight ratios of DSPC: DSPE-PEG were 10:0 (#6-37), 9:1 (#6-40) and 8:2 (#6-41).

#### 6.4 まとめ

本章では、以下を目的として研究を行った。

1. 操作因子が粒子径とカプセル化効率に与える影響の確認
2. 脂質変更による影響の確認
3. PEG 化リポソームの形成と操作因子の与える影響の確認

その結果として、以下の成果を得た。

1. 動的光散乱法による粒子径測定及び液体クロマトグラフを利用した成分濃度確認によるカプセル化効率の測定から流量変更及びリン脂質変更が粒子径とカプセル化効率への影響を確認し、本プロセスによる高効率リポソームの生成が可能かつ粒子径制御が可能であることを示した。
2. DSPC に変更する際は物性が異なるため、プロセス構築において温度変更や濃度の限界などがあることが示せた。
3. 手法の変更やゼータ電位や FALT の計測などから PEG 化リポソームの形成が可能であることを示し、さらにその制御の可能性も示した。

Table 8. Conditions and results of effect lecithin solution flow rate

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Lecithin}}$ [wt%]	Particle size [nm]	EE [%]
#6-1	0.100	0.020	0.100	0.3	108.3±2.2	35.8
#6-2	0.140	0.020	0.100	0.3	154.0±28.7	44.5
#6-3	0.160	0.020	0.100	0.3	302.3±20.5	25.8
#6-4	0.180	0.020	0.100	0.3	406.6±58.2	34.7
#6-5	0.200	0.020	0.100	0.3	479.5±45.1	25.2
#6-6	0.220	0.020	0.100	0.3	825.6±20.1	22.2
#6-7	0.230	0.020	0.100	0.3	965.9±60.2	38.6
#6-8	0.240	0.020	0.100	0.3	1381.8±11.41	7.1
#6-9	0.250	0.020	0.100	0.3	953.6±72.3	28.2
#6-10	0.260	0.020	0.100	0.3	2193.6±305.8	41.4

Table 9. Conditions and results of effect TM solution flow rate

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Lecithin}}$ [wt%]	Particle size [nm]	EE [%]
#6-11	0.260	0.040	0.100	0.3	944.5±98.0	55.9
#6-12	0.260	0.030	0.100	0.3	1125.4±75.4	59.4
#6-13	0.260	0.020	0.100	0.3	1273.5±197.7	62.2
#6-14	0.260	0.015	0.100	0.3	1355.8±232.7	76.2
#6-15	0.260	0.010	0.100	0.3	1502.3±182.7	57.1
#6-16	0.260	0.005	0.100	0.3	1830.6±173.8	66.7

Table 10. Conditions and results of effect H<sub>2</sub>O flow rate with or without the coil

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Lecithin}}$ [wt%]	Particle size [nm]	Coil
#6-17	0.260	0.040	0.060	0.3	1179.5±85.1	None
#6-18	0.260	0.040	0.080	0.3	1306.9±147.6	None
#6-19	0.260	0.040	0.100	0.3	944.5±98.0	None
#6-20	0.260	0.040	0.060	0.3	998.0±94.6	Exist
#6-21	0.260	0.040	0.080	0.3	1007.6±248.0	Exist
#6-22	0.260	0.040	0.100	0.3	809.9±56.4	Exist

Table 11. Conditions and results of effect lecithin solution flow rate

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Lecithin}}$ [wt%]	Particle size [nm]	EE [%]
#6-23	0.100	0.040	0.100	0.3	127.6±0.6	68.3
#6-24	0.200	0.040	0.100	0.3	785.8±117.9	47.8
#6-25	0.260	0.040	0.100	0.3	961.1±93.8	66.8
#6-26	0.320	0.040	0.100	0.3	1402.1±226.3	74.1
#6-27	0.360	0.040	0.100	0.3	2238.1±149.8	74.2

Table 12. Conditions and results of effect the coil length

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{Lecithin}}$ [wt%]	Coil length [m]	Particle size [nm]	EE [%]
#6-28	0.320	0.040	0.100	0.3	2.00	1347.9±227.5	77.9
#6-29	0.320	0.040	0.100	0.3	3.00	1388.2±112.2	65.5
#6-30	0.320	0.040	0.100	0.3	4.00	1433.1±229.6	44.3

Table 13. Conditions and results for DSPC liposome fabrication

No.	$Q_{\text{lipid}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{TM}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$Q_{\text{H}_2\text{O}}$ [mL min <sup>-1</sup> ]	$C_{\text{DSPC}}$ [wt%]	Particle size [nm]	EE [%]	$T$ [°C]
#6-31	0.100	0.010	0.100	0.27	145.4±18.2	43.2	40
#6-32	0.100	0.040	0.100	0.3	420.0±92.4	40.34	40
#6-33	0.100	0.040	0.100	0.27	280.3±67.7	59.95	40
#6-34	0.100	0.040	0.100	0.20	241.1±71.0	32.1	40
#6-35	0.100	0.040	0.100	0.15	301.0±22.3	90.2	40
#6-36	0.100	0.040	0.100	0.15	361.7±139.5	96.8	50

Table 14. Conditions for the liposome fabrication by Liptube process.

No.	Method	Supplying line of DSPE-PEG	$C_{\text{DSPC}}$ [wt%]	$C_{\text{DSPE-PEG}}$ [wt%]	$C_{\text{DSPC}}: C_{\text{DSPE-PEG}}$
#6-37	No PEG	—	0.27	0.00	10:0
#6-38	Pre-tube	DSPC/EtOH	0.27	0.03	9:1
#6-39		solution line	0.24	0.06	8:2
#6-40	Post-tube	Water line after emulsification	0.27	0.03	9:1
#6-41			0.24	0.06	8:2
#6-42			0.21	0.09	7:3

Table 15. Conditions for the liposome fabrication by Liptube process at  $C_{\text{DSPC}} = 0.15 \text{ wt}\%$ .

No.	Method	Supplying line of DSPE-PEG	$C_{\text{DSPC}}$ [wt%]	$C_{\text{DSPE-PEG}}$ [wt%]
#6-43				0.000
#6-44	Post-tube	Water line after emulsification	0.15	0.008
#6-45				0.026
#6-46				0.050

Table 16. Conditions for the liposome fabrication by thin layer method.

No.	Method	Dissolved solution of DSPE-PEG	$W_{\text{DSPC}}$ [mg]	$W_{\text{DSPE-PEG}}$ [mg]	$W_{\text{DSPC}}: W_{\text{DSPE-PEG}}$
#6-47	No PEG	—	25.0	0.0	10:0
#6-48	Pre-mix	DSPC/EtOH solution	22.5	2.5	9:1
#6-49	Post-insertion	TM aqueous solution	22.5	2.5	9:1

## 第7章 結言

### 7.1 結言

本研究では、リポソームの形成機構の確認とリン脂質の溶解度データを収集するための溶解度測定システムの構築及び溶解度測定を行った。その結果以下のような結論を得た。(3章)

- 1.可視光レーザーを利用した溶液の状態確認と TEM による生成物の状態確認により、リポソームの形成機構を明らかにした。
- 2.本研究で作製した可視光レーザーを利用した溶解度測定法という既往法に比べ簡易的で迅速な溶解度測定法を提案し、その妥当性の検証を行ったところ、既往の文献値データと近い値を示したところから、本手法の妥当性を示せた。
- 3.本手法を利用することで、未知であったリン脂質の有機溶媒に対する溶解度の知見を得た。リン脂質は炭化水素鎖が長い方が溶解度は低いことが示された。

微小流路を利用することで既存プロセスに比べ粒子径制御可能なリポソームの生成することおよびその制御を目指した。その結果以下のような結論を得た。(4章)

- 1.TEM やレーザー照射により微小流路を利用した混合によるリポソームの生成が可能であることを確認した。
- 2.既往法である薄膜水和法と比較することで、微小流路を利用することで粒子径の制御が可能であることを示した。
- 3.収率や生成粒子濃度などから本手法におけるリポソーム生成に関する平行条件に関する知見を得た。
- 4.配管内部を確認および粒子径測定や TEM での観察により、リポソーム生成に関する速度論的条件に関する知見を得た。
- 5.流量や内径の変動による粒子径と流動状態の関係性を確認した。
- 6.リン脂質の種類の違いによる物性の違いが粒子径に影響を与えることを確認した。

微小流路を利用することでエマルションを形成し、二段階でのリポソームの生成することおよびその制御を目指した。その結果以下のような結論を得た。(5章)

- 1.微小流路を利用した混合によるナノオーダーサイズのエマルションの生成が可能であることを確認した。

- 2.流量変更や濃度変更，ミキサーの変更といった操作因子の変動により粒子径と転化率の制御が可能であることを示した.
- 3.微小流路を利用した混合によるナノオーダーサイズのリポソームの生成が可能であることを確認した.
- 4.ミキサーや濃度変更によりリポソームの形成可能条件の知見を得た.

超臨界二酸化炭素と微小流路を利用することで粒子径制御可能な高効率なりポソームを生成すること，また本手法による表面修飾リポソームに形成を目指した.その結果以下のような結論を得た.(6章)

- 1.流量の変更による粒子径の変更に成功した.流量変更のみで約 100 - 2500 nm の範囲のリポソームが生成可能であることを示した.
- 2.配管の長さの増加によるカプセル化効率の減少した.このことから，リポソーム生成後に時間をかけるとリポソームの崩壊が起こることを示した.
- 3.DSPC にリン脂質を変更しリポソームの生成に成功した.また，リン脂質の性質によりプロセスの変更の必要性を示し，温度変更もしくは濃度変更が必要なことを示した.
- 4.手法の変更やゼータ電位や FALT の計測などから PEG 化リポソームの形成が可能であることを示し，さらにその制御の可能性も示した.

これらより第 3 章にて形成機構の確認及びリン脂質の溶解度の知見を得ることができ，その機構をもとに第 4 章にて微小流路を利用した一段階プロセスの構築に成功した.そこでさらに薬物内包率の上昇し拡張性のあるプロセスを求めて第 5 章にて微小流路を利用した二段階プロセスの構築を行い，リポソームの形成の確認まで達成した.第 6 章では，有機溶媒の使用量削減と薬物内包率の上昇を目指しプロセスの構築を行い，高効率で粒径制御のできるリポソーム形成プロセスの開発に成功した.

## 7.2 将来展望

本研究において微小流路を利用することで追加処理などを必要とせず粒子径の均一なりポソームの形成が可能であることがわかった.特に超臨界二酸化炭素を利用した微小流路によって粒子径のばらつきを抑え，有機溶媒の使用量削減ができるだけでなく，流量変更のみでの粒子径制御可能かつ高効率なりポソーム生成が可能であることを示せた.しかしながら超臨界二酸化炭素を利用する方法は本研究にてリン脂質変更の際生成が上手くいかなくなった点のように，少しの条件変更によって反応条件が大きく変わってしまうため，製品製作するためにプロセスの変更や条件の変更など必

要となる知見が多く、完成するまでに多くの時間とコストがかかってしまう。さらに、現在存在するリポソーム製剤及びリポソームを利用した化粧品はどれもが薄膜水和法により製造されている。これはアメリカ食品医薬品局(Food and Drug Administration: FDA)による認可の問題である。FDA の規定にてリポソームの製造に関しては現在認可されている方法である薄膜水和法以外での生成法の認可には様々な問題が存在する。例をあげると制御性があること無毒であることスケールアップによる影響まで確認することなどがある。これらのことからリポソームの製造法において、実際に製造として用いられている新手法が存在せず、あくまで研究段階のままになっている。

そこでそもそもの切り口を変える必要がある。新規の治療薬やワクチンなどが必要になる状況というものが近年特に問題になった。これらの開発に時間がかかった理由として何が効くかがわからないという点があったがそもそも新規薬品の製品化にはものすごく時間が必要であるという点である。それは生成の為のプロセス構築などに時間がかかる為である。そのため開発段階のものは迅速に簡単に大量に作れる必要がある。この点において今回自分が研究している微小流路によるリポソームの生成というものはマッチしている。微小流路である為即時的に連続生産が可能であり、制御性のありと高効率なものが作れることを目指していけばいい。その為本研究においても行った微小流路を利用した一段階生成プロセスは制御性やエタノールのみ利用による無毒性、さらには内径変更によりスケールアップの可能性も示せた。さらに制御指針が本研究によりある程度わかり、今後他物質の利用などの知見を集めることでターゲットとなるリポソームが決まり次第条件を決定すれば作れるようになる。そのためには大量のスクリーニング作業が必要になるが、今回研究しているような配管を利用した製造法は拡張性があり、簡単に作ることができ、またリポソームそのものの生成も簡単かつ迅速に作ることのできる方法である。これにより様々な条件で簡単かつ迅速に生成が可能でありデータの収集には適している。

さらには、二段階生成手法においては改良の余地ありではあるが現状生成が難しく既往の文献があまり存在しない微小流路を利用したナノオーダーのエマルジョンの形成に成功し、そのリポソーム化まで確認できた。この手法が更なる効率の良いものとなることで、安全かつ拡張性の高い手法として利用可能となると考えられる。

## 参考文献

- [1] Allen, T. M., Cullis, P. R. (2004). Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, 303(5665), 1818-1822.  
<https://doi.org/10.1126/science.1095833>
- [2] Jain, K. K. (2008). Drug delivery systems-an overview. *Drug delivery systems*, 1-50.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-210-6_1)
- [3] Tiwari, G., et al., (2012). Drug delivery systems: An updated review. *International journal of pharmaceutical investigation*, 2(1), 2.  
<https://doi.org/10.4103/2230-973X.96920>
- [4] Liechty, W. B., et al., (2010). Polymers for drug delivery systems. *Annual review of chemical and biomolecular engineering*, 1(1), 149-173.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-073009-100847>
- [5] Cortesi, R., et al., (2006). Cationic liposomes as potential carriers for ocular administration of peptides with anti-herpetic activity. *International journal of pharmaceuticals*, 317(1), 90-100.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.02.050>
- [6] Wilczewska, A. Z., et al., (2012). Nanoparticles as drug delivery systems. *Pharmacological reports*, 64(5), 1020-1037.  
[https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70901-5](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70901-5)
- [7] 菊池寛. (2022). 特集 脂質ナノ粒子製剤の研究と展望について. *薬剤学*, 82(2), 63-70.  
<https://doi.org/10.14843/jpstj.82.63>
- [8] Kaialy, W., Al Shafiee, M. (2016). Recent advances in the engineering of nanosized active pharmaceutical ingredients: promises and challenges. *Advances in colloid and interface science*, 228, 71-91.  
<https://doi.org/10.1016/j.cis.2015.11.010>
- [9] Iqbal, M. A., et al., (2012). Nanostructured lipid carriers system: recent advances in drug delivery. *Journal of drug targeting*, 20(10), 813-830.  
<https://doi.org/10.3109/1061186X.2012.716845>
- [10] Wijakmatee, T., et al., (2022). Integrated micro-flow process of emulsification and supercritical fluid emulsion extraction for stearic acid nanoparticle production. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 61(26), 9274-9282.  
<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.1c0506>
- [11] Yih, T. C., Al-Fandi, M. (2006). Engineered nanoparticles as precise drug delivery

- systems. *Journal of cellular biochemistry*, 97(6), 1184-1190.  
<https://doi.org/10.1002/jcb.20796>
- [12] Gelperina, S., et al., (2005). The potential advantages of nanoparticle drug delivery systems in chemotherapy of tuberculosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 172(12), 1487-1490.  
<https://doi.org/10.1164/rccm.200504-613PP>
- [13] Kingsley, J. D., et al., (2006). Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1, 340-350.  
<https://doi.org/10.1007/s11481-006-9032-4>
- [14] Blagden, N., et al., (2007). Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates. *Advanced drug delivery reviews*, 59(7), 617-630.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.05.011>
- [15] Tatsumi, Y., et al., (2022). Lipid-mediated cocrystallization for pharmaceutical compounds. *Crystal Growth & Design*, 22(9), 5176-5181.  
<https://doi.org/10.1021/acs.cgd.2c00139>
- [16] Tatsumi, Y., et al., (2023). Itraconazole cocrystal formation using fatty acid media under high pressure CO<sub>2</sub>. *The Journal of Supercritical Fluids*, 201, 106022.  
<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2023.106022>
- [17] Hu, C., et al., (2021). Evaluation of Drug Dissolution Rate in Co-amorphous and Co-crystal Binary Drug Delivery Systems by Thermodynamic and Kinetic Methods. *AAPS PharmSciTech*, 22, 1-9.  
<https://doi.org/10.1208/s12249-020-01864-0>
- [18] Witika, B. A., et al., (2021). Nano co-crystal embedded stimuli-responsive hydrogels: A potential approach to treat HIV/AIDS. *Pharmaceutics*, 13(2), 127.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13020127>
- [19] Sun, C. C. (2013). Cocrystallization for successful drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 10(2), 201-213.  
<https://doi.org/10.1517/17425247.2013.747508>
- [20] Nakashima, T., et al., (2000). Particle control of emulsion by membrane emulsification and its applications. *Advanced drug delivery reviews*, 45(1), 47-56.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(00\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(00)00099-5)
- [21] Fontana, F., et al., (2016). Microfluidics as a cutting-edge technique for drug delivery applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 34, 76-87.  
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.01.010>

- [22] 田原義朗, 後藤雅宏. (2019). Solid-in-oil-in-water (S/O/W) 型多層エマルションと DDS への応用. *オレオサイエンス*, 19(5), 191-196.  
<https://doi.org/10.5650/oleoscience.19.191>
- [23] Buyukozturk, F., et al., (2010). Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *Journal of controlled release*, 142(1), 22-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.005>
- [24] Washington, C. (1996). Stability of lipid emulsions for drug delivery. *Advanced drug delivery reviews*, 20(2-3), 131-145.  
[https://doi.org/10.1016/0169-409X\(95\)00116-O](https://doi.org/10.1016/0169-409X(95)00116-O)
- [25] Collins-Gold, L. C., et al., (1990). Parenteral emulsions for drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 5(3), 189-208.  
[https://doi.org/10.1016/0169-409X\(90\)90016-L](https://doi.org/10.1016/0169-409X(90)90016-L)
- [26] Varde, N. K., Pack, D. W. (2004). Microspheres for controlled release drug delivery. *Expert opinion on biological therapy*, 4(1), 35-51.  
<https://doi.org/10.1517/14712598.4.1.35>
- [27] Pereswetoff-Morath, L. (1998). Microspheres as nasal drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 29(1-2), 185-194.  
[https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(97\)00069-0](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(97)00069-0)
- [28] Mathiowitz, E., et al., (1997). Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems. *Nature*, 386(6623), 410-414.  
<https://doi.org/10.1038/386410a0>
- [29] Arifin, D. Y., et al., (2006). Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems. *Advanced drug delivery reviews*, 58(12-13), 1274-1325.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2006.09.007>
- [30] Lengyel, M., et al., (2019). Microparticles, microspheres, and microcapsules for advanced drug delivery. *Scientia Pharmaceutica*, 87(3), 20.  
<https://doi.org/10.3390/scipharm87030020>
- [31] Mitra, A., Dey, B. (2011). Chitosan microspheres in novel drug delivery systems. *Indian journal of pharmaceutical sciences*, 73(4), 355.  
<https://doi.org/10.4103/0250-474X.95607>
- [32] Wagner, A., et al., (2006). GMP production of liposomes—a new industrial approach. *Journal of liposome research*, 16(3), 311-319.

<https://doi.org/10.1080/08982100600851086>.

[33] Barenholz, Y. (2001). Liposome application: problems and prospects. *Current opinion in colloid & interface science*, 6(1), 66-77.

[https://doi.org/10.1016/S1359-0294\(00\)00090-X](https://doi.org/10.1016/S1359-0294(00)00090-X)

[34] Orita, Y., et al., (2023). Acoustic-responsive carbon dioxide-loaded liposomes for efficient drug release. *Ultrasonics Sonochemistry*, 94, 106326.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2023.106326>

[35] 石井文由. (2001). リポソームの化学. *オレオサイエンス*, 1(3), 275-282.

<https://doi.org/10.5650/oleoscience.1.275>

[36] Akbarzadeh, A., et al., (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale research letters*, 8, 1-9.

<https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>

[37] Bangham, A.D., et al., 1965. (1965). Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of molecular biology*, 13(1), 238-IN27.

[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(65)80093-6)

[38] Bangham, A.D., et al., (1967). Osmotic properties and water permeability of phospholipid liquid crystals. *Chemistry and physics of lipids*, 1(3), 225-246.

[https://doi.org/10.1016/0009-3084\(67\)90030-8](https://doi.org/10.1016/0009-3084(67)90030-8)

[39] Varona, S., et al., (2011). Liposomal incorporation of lavender essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. *Industrial & engineering chemistry research*, 50(4), 2088-2097.

<https://doi.org/10.1021/ie102016r>

[40] Zhang, H. (2017). Thin-film hydration followed by extrusion method for liposome preparation. *Liposomes: Methods and protocols*, 17-22.

[https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6591-5_2)

[41] Ghanbarzadeh, S., et al., (2013). Application of response surface methodology in development of sirolimus liposomes prepared by thin film hydration technique. *BioImpacts: BI*, 3(2), 75.

<https://doi.org/10.5681/bi.2013.016>

[42] Bhatia, A., et al., (2004). Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *J Pharm Pharm Sci*, 7(2), 252-259.

[43] Bhattacharjee, A., et al., (2020). Development and optimization of besifloxacin hydrochloride loaded liposomal gel prepared by thin film hydration method using 32 full

factorial design. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 585, 124071.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2019.124071>

[44] Maruyama, K., et al., (1994). Biodistribution and antitumor effect of adriamycin encapsulated in long-circulating liposomes containing amphipathic polyethylene glycol or ganglioside GM1. *Journal of Liposome Research*, 4(1), 701-723.

<https://doi.org/10.3109/08982109409037067>

[45] Papahadjopoulos, D., Miller, N., (1967). Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 135(4), 624-638.

[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(67\)90094-6](https://doi.org/10.1016/0005-2736(67)90094-6)

[46] Lapinski, M. M., et al., (2007). Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir*, 23(23), 11677-11683.

<https://doi.org/10.1021/la7020963>

[47] Yamaguchi, T., et al., (2009). Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. *Chemistry and physics of lipids*, 160(1), 58-62.

<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2009.04.002>

[48] Putri, D. C. A., et al., (2017). Optimization of mixing temperature and sonication duration in liposome preparation optimasi suhu pencampuran dan durasi sonikasi dalam pembuatan liposom. *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*, 14(2), 79-85.

<https://doi.org/10.24071/jpsc.00728>

[49] Silva, R., Ferreira, H., Little, C., & Cavaco-Paulo, A. (2010). Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrasonics sonochemistry*, 17(3), 628-632.

<https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2009.10.010>

[50] Kagawa, Y., Racker, E., (1971). Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation: XXV. Reconstitution of vesicles catalyzing  $^{32}\text{P}_i$ —adenosine triphosphate exchange. *Journal of Biological Chemistry*, 246(17), 5477-5487.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61930-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61930-1)

[51] Peschka, R., et al., (1998). Cross-flow filtration—an improved detergent removal technique for the preparation of liposomes. *International journal of pharmaceuticals*, 162(1-2), 177-183.

[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00424-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00424-9)

[52] Schubert, R. (2003). Liposome preparation by detergent removal. In *Methods in*

*enzymology* (Vol. 367, pp. 46-70). Academic Press.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(03\)67005-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)67005-9)

[53] Jiskoot, W., et al., (1986). Preparation of liposomes via detergent removal from mixed micelles by dilution: The effect of bilayer composition and process parameters on liposome characteristics. *Pharmaceutisch Weekblad*, 8, 259-265.

<https://doi.org/10.1007/BF01960070>

[54] Wacker, M., Schubert, R. (1998). From mixed micelles to liposomes: critical steps during detergent removal by membrane dialysis. *International journal of pharmaceutics*, 162(1-2), 171-175.

[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(97\)00425-0](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(97)00425-0)

[55] Batzri, S., Korn, E.D., (1973). Single bilayer liposomes prepared without sonication. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 298(4), 1015-1019.

[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90408-2](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90408-2)

[56] Deamer, D., Bangham, A.D., (1976). Large volume liposomes by an ether vaporization method. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Nucleic Acids and Protein Synthesis*, 443(3), 629-634.

[https://doi.org/10.1016/0005-2787\(76\)90527-X](https://doi.org/10.1016/0005-2787(76)90527-X)

[57] Wagner, A., et al., (2002). The crossflow injection technique: an improvement of the ethanol injection method. *Journal of liposome research*, 12(3), 259-270.

<https://doi.org/10.1081/LPR-120014761>

[58] Jaafar-Maalej, C., et al., (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of liposome research*, 20(3), 228-243.

<https://doi.org/10.3109/08982100903347923>

[59] Gouda, A., et al., (2021). Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 102174.

<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102174>

[60] Pons, M., et al., (1993). Liposomes obtained by the ethanol injection method. *International journal of pharmaceutics*, 95(1-3), 51-56.

[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(93\)90389-W](https://doi.org/10.1016/0378-5173(93)90389-W)

[61] Szoka, F. Jr., Papahadjopoulos, D., (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 75(9), 4194-4198.

<https://doi.org/10.1073/pnas.75.9.4194>

- [62] Nagata, T., et al., (1981). Delivery of tobacco mosaic virus RNA into plant protoplasts mediated by reverse-phase evaporation vesicles (liposomes). *Molecular and General Genetics MGG*, 184, 161-165.  
<https://doi.org/10.1007/BF00272899>
- [63] Pidgeon, C., et al., (1987). Multilayered vesicles prepared by reverse-phase evaporation: liposome structure and optimum solute entrapment. *Biochemistry*, 26(1), 17-29.  
<https://doi.org/10.1021/bi00375a004>
- [64] Chen, G., et al., (2014). Deformable liposomes by reverse-phase evaporation method for an enhanced skin delivery of (+)-catechin. *Drug development and industrial pharmacy*, 40(2), 260-265.  
<https://doi.org/10.3109/03639045.2012.756512>
- [65] Taylor, K. M. G., et al., (1990). Drug entrapment and release from multilamellar and reverse-phase evaporation liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 58(1), 49-55.  
[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(90\)90286-D](https://doi.org/10.1016/0378-5173(90)90286-D)
- [66] Berger, N., et al., (2001). Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 223(1-2), 55-68.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00721-9](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00721-9)
- [67] Ong, S. G. M., et al., (2016). Evaluation of extrusion technique for nanosizing liposomes. *Pharmaceutics*, 8(4), 36.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics8040036>
- [68] Karn, P.R., et al., (2013). Liposomal drug products and recent advances in the synthesis of supercritical fluid-mediated liposomes. *Nanomedicine*, 8(9), 1529-1548.  
<https://doi.org/10.2217/nmm.13.131>
- [69] Swaay, D. V., DeMello, A., (2013). Microfluidic methods for forming liposomes. *Lab on a Chip*, 13(5), 752-767.  
<https://doi.org/10.1039/c2lc41121k>
- [70] Phapal, S. M., Sunthar, P., (2013). Influence of micro-mixing on the size of liposomes self-assembled from miscible liquid phases. *Chemistry and physics of lipids*, 172, 20-30.  
<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.04.006>
- [71] Carugo, D., et al., (2016). Liposome production by microfluidics: potential and limiting factors. *Scientific reports*, 6(1), 1-15.  
<https://doi.org/10.1038/srep25876>
- [72] Balbino, T, A., et al., (2017). Integrated microfluidic devices for the synthesis of nanoscale

liposomes and lipoplexes. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 152, 406-413.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.01.030>

[73] Yu, B., et al., (2009). Microfluidic methods for production of liposomes. *Methods in enzymology*, 465, 129-141.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)65007-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)65007-2)

[74] Shah, V. M., et al., (2019). Liposomes produced by microfluidics and extrusion: A comparison for scale-up purposes. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 18, 146-156.

<https://doi.org/10.1016/j.nano.2019.02.019>

[75] Zook, J. M., Vreeland, W. N. (2010). Effects of temperature, acyl chain length, and flow-rate ratio on liposome formation and size in a microfluidic hydrodynamic focusing device. *Soft matter*, 6(6), 1352-1360.

<https://doi.org/10.1039/B923299K>

[76] Woo, S. W., et al., (2021). High-throughput synthesis of liposome using an injection-molded plastic micro-fluidic device. *Micromachines*, 12(2), 170.

<https://doi.org/10.3390/mi12020170>

[77] Gómez, S. C., et al., (2021). Design and Manufacture of a Low-Cost Microfluidic System for the Synthesis of Giant Liposomes for the Encapsulation of Yeast Homologues: Applications in the Screening of Membrane-Active Peptide Libraries. *Micromachines*, 12(11), 1377.

<https://doi.org/10.3390/mi12111377>

[78] Rebollo, R., et al., (2022). Microfluidic manufacturing of liposomes: development and optimization by design of experiment and machine learning. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(35), 39736-39745.

<https://doi.org/10.1021/acsami.2c06627>

[79] Andar, A. U., et al., (2014). Microfluidic preparation of liposomes to determine particle size influence on cellular uptake mechanisms. *Pharmaceutical research*, 31, 401-413.

<https://doi.org/10.1007/s11095-013-1171-8>

[80] Otake, K., et al., (2001). Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *langmuir*, 17(13), 3898-3901.

<https://doi.org/10.1021/la010122k>

[81] Otake, K., et al., (2006). Preparation of liposomes using an improved supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir*, 22(6), 2543-2550.

<https://doi.org/10.1021/la051654u>

[82] Sakai, H., et al., (2008). Preparation and properties of liposomes composed of various

phospholipids with different hydrophobic chains using a supercritical reverse phase evaporation method. *Journal of oleo science*, 57(11), 613-621.

<https://doi.org/10.5650/jos.57.613>

[83] Aburai, K., et al., (2011). Preparation of liposomes modified with lipopeptides using a supercritical carbon dioxide reverse-phase evaporation method. *Journal of oleo science*, 60(5), 209-215.

<https://doi.org/10.5650/jos.60.209>

[84] Camparadelli, R., et al., (2016). Efficient encapsulation of proteins in submicro liposomes using a supercritical fluid assisted continuous process. *The journal of supercritical fluids*, 107, 163-169.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.007>

[85] Trucillo, P., et al., (2017). Supercritical CO<sub>2</sub> assisted liposomes formation: Optimization of the lipidic layer for an efficient hydrophilic drug loading. *Journal of Co<sub>2</sub> utilization*, 18, 181-188.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.09.007>

[86] Imura, T., et al., (2003). Control of physicochemical properties of liposomes using a supercritical reverse phase evaporation method. *Langmuir*, 19(6), 2021-2025.

<https://doi.org/10.1021/la020589a>

[87] Frederiksen, L., et al. (1997). Preparation of liposomes encapsulating water-soluble compounds using supercritical carbon dioxide. *Journal of pharmaceutical sciences*, 86(8), 921-928.

<https://doi.org/10.1021/js960403q>

[88] Jash, A., et al., (2020). Phosphatidylcholine solubility in supercritical carbon dioxide: Experimental data, thermodynamic modeling, and application in bioactive-encapsulated liposome synthesis. *The Journal of Supercritical Fluids*, 158, 104720.

<https://doi.org/10.1016/j.supflu.2019.104720>

[89] Jung, J., Perrut, M., (2001). Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. *The Journal of supercritical fluids*, 20(3), 179-219.

[https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(01\)00064-X](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(01)00064-X)

[90] Ding, L., et al., (2020). Changes in protein structure and physicochemical properties of egg white by super critical carbon dioxide treatment. *Journal of Food Engineering*, 284, 110076.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110076>

[91] Gentine, P., et al., (2013). Modified and derived ethanol injection toward liposomes: development of the process. *Journal of liposome research*, 23(1), 11-19.

<https://doi.org/10.3109/08982104.2012.717298>

[92] Shi, N. Q., Qi, X. R. (2021). Preparation of drug liposomes by reverse-phase evaporation. *Liposome-Based Drug Delivery Systems*, 37-46.

[https://doi.org/10.1007/978-3-662-49320-5\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-662-49320-5_3)

[93] Kawamura, J., et al., (2020). Size-controllable and scalable production of liposomes using a v-shaped mixer micro-flow reactor. *Organic Process Research & Development*, 24(10), 2122-2127.

<https://doi.org/10.1021/acs.oprd.0c00174>

[94] Jahn, A., et al., (2010). Microfluidic mixing and the formation of nanoscale lipid vesicles. *ACS nano*, 4(4), 2077-2087.

<https://doi.org/10.1021/nn901676x>

[95] Balbino, T. A., et al., (2013). Microfluidic devices for continuous production of pDNA/cationic liposome complexes for gene delivery and vaccine therapy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 203-210.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.04.003>

[96] Hong, J. S., et al. (2010). Microfluidic directed self-assembly of liposome– hydrogel hybrid nanoparticles. *Langmuir*, 26(13), 11581-11588.

<https://doi.org/10.1021/la100879p>

[97] Balbino, T. A., et al., (2013). Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chemical engineering journal*, 226, 423-433.

<https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.053>

[98] Wi, R., et al., (2012). Formation of liposome by microfluidic flow focusing and its application in gene delivery. *Korea-Australia rheology journal*, 24, 129-135.

<https://doi.org/10.1007/s13367-012-0015-0>

[99] Jahn, A., et al., (2004). Controlled vesicle self-assembly in microfluidic channels with hydrodynamic focusing. *Journal of the American Chemical Society*, 126(9), 2674-2675.

<https://doi.org/10.1021/ja0318030>

[100] Mijajlovic, M., et al., (2013). Microfluidic hydrodynamic focusing based synthesis of POPC liposomes for model biological systems. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 104, 276-281.

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.12.020>

[101] Kastner, E., et al., (2015). Microfluidic-controlled manufacture of liposomes for the solubilisation of a poorly water soluble drug. *International journal of pharmaceuticals*, 485(1-2),

122-130.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.02.063>

[102] Joshi, S., et al., (2016). Microfluidics based manufacture of liposomes simultaneously entrapping hydrophilic and lipophilic drugs. *International journal of pharmaceutics*, 514(1), 160-168.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.027>

[103] Bottaro, E., et al., (2017). Analysis of the diffusion process by pH indicator in microfluidic chips for liposome production. *Micromachines*, 8(7), 209.

<https://doi.org/10.3390/mi8070209>

[104] Kastner, E., et al., (2014). High-throughput manufacturing of size-tuned liposomes by a new microfluidics method using enhanced statistical tools for characterization. *International journal of pharmaceutics*, 477(1-2), 361-368.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.10.030>

[105] Amrani, S., Tabrizian, M., (2018). Characterization of nanoscale loaded liposomes produced by 2D hydrodynamic flow focusing. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(2), 502-513.

<https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.7b00572>

[106] Jahn, A., et al., (2007). Microfluidic directed formation of liposomes of controlled size. *Langmuir*, 23(11), 6289-6293.

<https://doi.org/10.1021/la070051a>

[107] Aghaei, H., Solaimany Nazar, A. R., (2019). Continuous production of the nanoscale liposome in a double flow-focusing microfluidic device. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(51), 23032-23045.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b04079>

[108] Christov, I. C., et al., (2018). Flow rate–pressure drop relation for deformable shallow microfluidic channels. *Journal of Fluid Mechanics*, 841, 267-286.

<https://doi.org/10.1017/jfm.2018.30>

[109] Fendler, J. H., (1994) The colloidal domain: Where physics, chemistry, biology, and technology meet, in: D. Fennell Evans and Hakån Wennerström. *VCH Publishers*, New York.

<https://doi.org/10.1002/adma.19960080318>

[110] Zhao, L., Temelli, F. (2015). Preparation of liposomes using supercritical carbon dioxide via depressurization of the supercritical phase. *Journal of Food Engineering*, 158, 104-112.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.03.004>

- [111] 今村仁, 酒井裕二. (2005). 乳化機について. *色材協会誌*, 78(1), 28-33.  
<https://doi.org/10.4011/shikizai1937.78.28>
- [112] 高木和行. (1996). エマルション製造のスケールアップ技術 ホモミキサーから  
高圧ホモナイザーまで. *日本化粧品技術者会誌*, 30(1), 36-46.  
<https://doi.org/10.5107/sccj.30.36>
- [113] 森田正道, 片田順規. (1991). 高圧ホモジナイザーによる O/W エマルションの  
調製. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 40(1), 58-63.  
<https://doi.org/10.5650/jos1956.40.58>
- [114] 岡本亨. (2010). エマルションの粒子サイズ制御と化粧品機能. *日本化粧品技術  
者会誌*, 44(3), 199-207.  
<https://doi.org/10.5107/sccj.44.199>
- [115] Schultz, S., et al., (2004). High-pressure homogenization as a process for emulsion  
formation. *Chemical Engineering & Technology: Industrial Chemistry-Plant Equipment-  
Process Engineering-Biotechnology*, 27(4), 361-368.  
<https://doi.org/10.1002/ceat.200406111>
- [116] Flourey, J., et al., (2002). Effect of ultra-high-pressure homogenization on structure and  
on rheological properties of soy protein-stabilized emulsions. *Journal of food science*, 67(9),  
3388-3395.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb09595.x>
- [117] 堀内照夫. (2010), 乳化基礎理論, *J.Soc.Comet.Chem.Jpn.* 44(1), 2-22  
<https://doi.org/10.5107/sccj.44.2>
- [118] 國枝博信, 荒牧賢治. (2001). エマルションと HLB. *オレオサイエンス*, 1(2), 179-  
186.  
<https://doi.org/10.5650/oleoscience.1.179>
- [119] Shinoda, K., & Saito, H. (1969). The stability of O/W type emulsions as functions of  
temperature and the HLB of emulsifiers: the emulsification by PIT-method. *Journal of colloid  
and interface science*, 30(2), 258-263.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9797\(69\)80012-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9797(69)80012-3)
- [120] Saito, H., & Shinoda, K. (1970). The stability of W/O type emulsions as a function of  
temperature and of the hydrophilic chain length of the emulsifier. *Journal of Colloid and  
Interface Science*, 32(4), 647-651.

[https://doi.org/10.1016/0021-9797\(70\)90158-X](https://doi.org/10.1016/0021-9797(70)90158-X)

[121] Sagitani, H. (1981). Making homogeneous and fine droplet O/W emulsions using nonionic surfactants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(6), 738-743.

<https://doi.org/10.1007/BF02899466>

[122] Benton, W. J., Miller, C. A., & Jr, T. F. (1982). Spontaneous emulsification in oil-water-surfactant systems. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 3(1), 1-44.

<https://doi.org/10.1080/01932698208943623>

[123] 鷺谷広道., et al., (1983). 界面活性剤 (D) 相乳化法による微細な乳化滴をもつ O/W エマルションの作製. *日本化学会誌 (化学と工業化学)*, 1983(10), 1399-1404.

<https://doi.org/10.1246/nikkashi.1983.1399>

[124] 鷺谷広道., et al., (1991). D 相乳化法による微細 O/W エマルションの調製法開発と工業化. *油化学*, 40(11), 988-994.

<https://doi.org/10.5650/jos1956.40.988>

[125] 遠藤正行, 鷺谷広道. (1991). D 相乳化法によるトリグリセリド O/W エマルションの作製. *油化学*, 40(2), 133-139.

<https://doi.org/10.5650/jos1956.40.133>

[126] 坂本馨子, et al., (2017). サーファクチンナトリウムを用いた D 相乳化法による界面被覆型エマルションの調製. *科学・技術研究*, 6(2), 131-134.

<https://doi.org/10.11425/sst.6.131>

[127] 紺野義一, et al., (1999). 転相温度 (PIT) 乳化法による微細エマルションの調製. *日本化粧品技術者会誌*, 33(1), 59-65.

<https://doi.org/10.5107/sccj.33.59>

[128] Izquierdo, P., et al., (2005). The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *Journal of colloid and interface science*, 285(1), 388-394.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2007.04.027>

[129] 鈴木敏幸., et al., (1985). エタノールを含有する安定な低粘度 O/W エマルションの生成機構. *油化学*, 34(11), 938-945.

<https://doi.org/10.5650/jos1956.34.938>

[130] 金井俊光. (2018). マイクロ流体デバイスを用いたエマルション調製. *オレオサイエンス*, 18(6), 269-274.

<https://doi.org/10.5650/oleoscience.18.269>

[131] Wang, W. E. I., et al., (2014). Functional polymeric microparticles engineered from controllable microfluidic emulsions. *Accounts of chemical research*, 47(2), 373-384.

<https://doi.org/10.1021/ar4001263>

[132] Vladisavljević, G. T., et al., (2017). Microfluidic production of multiple emulsions. *Micromachines*, 8(3), 75.

<https://doi.org/10.3390/mi8030075>

[133] Kanai, T., et al., (2011). Preparation of monodisperse PNIPAM gel particles in a microfluidic device fabricated by stereolithography. *Polymer journal*, 43(12), 987-990.

<https://doi.org/10.1038/pj.2011.103>

[134] Black, S., et al., (2013). On the measurement of solubility. *Organic process research & development*, 17(3), 486-492.

<https://doi.org/10.1021/op300336n>

[135] Bauer, J., et al., (2001). Ritonavir: an extraordinary example of conformational polymorphism. *Pharmaceutical research*, 18, 859-866.

<https://doi.org/10.1023/A:1011052932607>

[136] Jarring, K., et al., (2006). Thermodynamic stability and crystal structures for polymorphs and solvates of formoterol fumarate. *Journal of pharmaceutical sciences*, 95(5), 1144-1161.

<https://doi.org/10.1002/jps.20571>

[137] Zhu, H., Grant, D. J. W., (1996). Influence of water activity in organic solvent+ water mixtures on the nature of the crystallizing drug phase. 1. Theophylline. *International Journal of Pharmaceutics*, 135(1-2), 151-160.

[https://doi.org/10.1016/0378-5173\(95\)04466-3](https://doi.org/10.1016/0378-5173(95)04466-3)

[138] Parsons, A. R., et al., (2003), Automated Measurement of Metastable Zones for Pharmaceutical Compounds, *Transactions of the Institution of Chemical Engineers*, 81, 700-704.

<https://doi.org/10.1205/026387603322150552>

[139] Brandreth, D. A., Johnson, R. E., (1971). Solubility of stearic acid in some halofluorocarbons, chlorocarbons, ethanol, and their azeotropes. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 16(3), 325-327.

<https://doi.org/10.1021/je60050a022>

[140] Calvo, B., et al., (2009). Solubilities of palmitic acid in pure solvents and its mixtures. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 54(1), 64-68.

<https://doi.org/10.1021/je8005979>

- [141] Chen, W., et al., (2018). Determination of the main phase transition temperature of phospholipids by nanoplasmonic sensing. *Scientific reports*, 8(1), 14815.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33107-5>
- [142] Attwood, S. J., et al., (2013). Preparation of DOPC and DPPC supported planar lipid bilayers for atomic force microscopy and atomic force spectroscopy. *International journal of molecular sciences*, 14(2), 3514-3539.  
<https://doi.org/10.3390/ijms14023514>
- [143] Koster, K. L., et al., (1994). Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1193(1), 143-150.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2736\(94\)90343-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(94)90343-3)
- [144] 奈良部均. (1992). リン脂質-工業的生産の現状と将来. *Journal of Japan Oil Chemists' Society*, 41(9), 897-902.  
<https://doi.org/10.5650/jos1956.41.897>
- [145] Bulbake, U., et al., (2017). Liposomal formulations in clinical use: an updated review. *Pharmaceutics*, 9(2), 12.  
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>
- [146] Suzuki, H., et al., (2008). Size characteristics of liposomes formed in a micro-tube. *Journal of chemical engineering of Japan*, 41(8), 739-743.  
<https://doi.org/10.1252/jcej.07we307>
- [147] Israelachvili, JN. (1985) *Intermolecular and Surface Force*, London: Academic Press.
- [148] Sadzuka, Y., et al., (2002). Effects of mixed polyethyleneglycol modification on fixed aqueous layer thickness and antitumor activity of doxorubicin containing liposome. *International journal of pharmaceutics*, 238(1-2), 171-180.  
[https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00075-3](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00075-3)
- [149] Alinaghi, A., et al., (2014). The influence of lipid composition and surface charge on biodistribution of intact liposomes releasing from hydrogel-embedded vesicles. *International journal of pharmaceutics*, 459(1-2), 30-39.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.11.011>
- [150] Deng, H., et al., (2015). Reactive oxygen species (ROS) responsive PEG-PCL nanoparticles with pH-controlled negative-to-positive charge reversal for intracellular delivery of doxorubicin. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(48), 9397-9408.

<https://doi.org/10.1039/C5TB01939G>

## 業績

### 成果一学術論文(査読あり)

1. **Ryunosuke Akiyama**, Yuya Murakami, Keita Inoue, Yasuhiko Orita, Yusuke Shimoyama, “Fabrication of PEGylated liposome in microfluidic flow process using supercritical CO<sub>2</sub>”, Journal of Nanoparticle Research, 24(12), 257, (2022).
2. Yuya Murakami, Keita Inoue, **Ryunosuke Akiyama**, Yasuhiko Orita, Yusuke Shimoyama, “Liptube: Liposome formation in the tube process using supercritical CO<sub>2</sub>”, Industrial & Engineering Chemistry Research, 61(39), 14598-14608, (2022).

### 成果一国際会議における発表 (3,4 は査読あり)

3. **Ryunosuke Akiyama**, Yasuhiko Orita, Yusuke Shimoyama. Fabrication of PEGylated liposome using supercritical flow process in tube system, 18<sup>th</sup> European Meeting on Supercritical fluids (EMSF2021), NP44, online, May 2021. (ポスター)
4. Yuya Murakami, Keita Inoue, **Ryunosuke Akiyama**, Yusuke Shimoyama. Flow Production of Functionalized Liposome Using Supercritical Fluid Carbon Dioxide and Micro-fluidic system, 18<sup>th</sup> Asia Pacific Confederation of Chemical Engineers Congress (APCChE 2019), F413, Sapporo, September 2019. (口頭発表)
5. Yuya Murakami, Keita Inoue, **Ryunosuke Akiyama**, Yusuke Shimoyama. Flow production of Liposome in Microchannel Using Supercritical Carbon Dioxide, 7<sup>th</sup> UK-Japan Engineering Education League Workshop (UKJEEL 2019), London, September 2019. (口頭発表)

### 成果一国内学会・シンポジウムにおける発表 (全て査読なし)

6. 井上溪汰, **秋山龍之介**, 村上裕哉, 下山裕介. 超臨界二酸化炭素による界面フロープロセスを利用したリポソーム生成, A105, 神奈川, 2019年8月. (口頭発表)
7. **秋山龍之介**. 超臨界フロープロセスによるリポソーム形成と粒径制御, 第17回超臨界流体ミニワークショップ, No.30, 茨城, 2019年9月. (ポスター発表)
8. **秋山龍之介**, 井上溪汰, 村上裕哉, 下山裕介. 超臨界セグメントフローを利用したリポソームサイズの制御, 第22回化学工学会学生発表会(東京大会), E30, 東京, 2020年3月. (口頭発表)
9. **秋山龍之介**, 織田耕彦, 下山裕介. 可視光レーザーを利用した医薬物質溶解度の迅速測定, 化学工学会第86年会, PD337, オンライン, 2021年3月. (ポスター発表)
10. 織田耕彦, 井上溪汰, **秋山龍之介**, 下山裕介. 超臨界CO<sub>2</sub>とマイクロ流路を利用したPEG化リポソームのフロー合成, 化学工学会第86年会, L116, オンライン, 2021年3月. (口頭発表)
11. **秋山龍之介**, 織田耕彦, 下山裕介. エタノール中の脂質溶解度によるリポソーム形成でのサイズ制御, 化学工学会第87年会, PC220, 兵庫, 2022年3月. (ポスター発表)
12. **秋山龍之介**, 織田耕彦, 下山裕介. 物性に基づくマイクロ流路でのリポソーム形成プロセスの設計, 化学工学会第88年会, G319, 東京, 2023年3月. (口頭発表)
13. **秋山龍之介**, 久下稔, 織田耕彦, 下山裕介. マイクロ流動を利用したエマルション・リポソーム形成における操作因子の影響, 化学工学会第55秋季大会, R124, 北海道, 2024年9月. (口頭発表)
14. 久下稔, **秋山龍之介**, 織田耕彦, 下山裕介. マイクロ流路での溶媒抽出を用いたリポソーム形成フロープロセス, S8-1, 島根県, 2024年12月. (ポスター発表)

### 成果一受賞, 注目公演

15. **秋山龍之介**. 化学工学会第87年会, 学生奨励賞, 2022年3月.
16. **秋山龍之介**, 化学工学会第88年会, 注目公演, 2023年3月.(760件中20件)

## 謝辞

本研究を完遂するにあたり，終始ご指導ご鞭撻を賜りました，東京科学大学物質理工学院 下山裕介 教授，織田耕彦 助教に心より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，東京科学大学物質理工学院松本秀行教授，原田琢也准教授，森伸介准教授，和田裕之准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，研究の遂行にあたり，日頃より有益なご討論をしていただ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科学大学リサーチインフラ・マネジメント機構コアファシリティセンター 分析部門の皆様には，厚く御礼申し上げます。

本研究は，JST 次世代研究者挑戦的研究プログラム JPMJSP2106・JPMJSP2180 の支援を受けたものです。

令和7年3月