

〈一般研究課題〉 安全な亜臨界 DME 流体によるリポソーム製剤の創出

助成研究者 名古屋大学 王 淳



## 安全な亜臨界DME流体によるリポソーム製剤の創出

王 淳  
(名古屋大学)

## Innovative Liposome Preparation via Subcritical Dimethyl Ether Fluid Technology

Tao Wang  
(Nagoya University)

### Abstract :

Liposomes were prepared from hydrogenated soybean phosphatidylcholine in a batch reactor using sonication and a mixture of subcritical/supercritical carbon dioxide (SC-CO<sub>2</sub>) and liquefied dimethyl ether (DME) instead of organic solvents. The operating pressure, temperature, and mixing ratio of liquefied DME were varied in the range of 6–10 MPa, 40–60 °C, and 0–4.44 wt.%, respectively. Transmission electron microscopy revealed spherical liposomes of 120±25 nm in size. The  $\zeta$ -potential suggested that soybean phosphatidylcholine-based liposomes showed good stability. On the other hand, the operating pressure was significantly lower than 10 MPa when liposomes were prepared with pure SC-CO<sub>2</sub>, i.e., the operating pressure could be significantly reduced by mixing liquefied DME.

### 1. はじめに

リン脂質、特にホスファチジルコリンからなる二重膜で構成された球状の小胞は、一般にリポソームまたは小胞と呼ばれ、機能性成分のキャリアとして広く利用されている[1]。この利用は、リポソームが親水性および疎水性の薬物を内包する能力を持つことに基づいており、医薬品、化粧品、食品分野における多様な応用が注目されている[2]。しかし、従来のリポソーム調製法では、有毒な有機溶媒の使用、複雑な多段階プロセスの必要性、高いエネルギーコストといった課題が存在していた[3]。これらの課題を解決するため、新たな調製技術の開発が求められている。

有害な溶媒の使用を減らし、環境負荷を低減するための代替溶媒として、グリーン溶媒である超臨界二酸化炭素(SC-CO<sub>2</sub>)の利用が注目されている。CO<sub>2</sub>は臨界温度が31.1°Cと低く、高温で分解しやすい化学物質の取り扱いに適した穏やかな操作温度を提供する特長がある。また、標準状態では気体であるため、リポソームからの分離が容易で、プロセス全体の効率化にも寄与する。我々の以前の研究では、SC-CO<sub>2</sub>と超音波処理を組み合わせることで、有機溶媒を使用せず100 nm以下のマルチラメラリポソームを製造するプロセスを提案した[4]。しかしながら、SC-CO<sub>2</sub>を用いたリポソーム調製法には、操作圧力が10-30 MPaと非常に高いという課題があり、このため装置コストの増加や安全性のリスクが懸念される[4]。これらの課題を克服するため、新たな技術革新が求められている。

作動圧力が上昇する主な理由は、CO<sub>2</sub>の臨界圧が高い(7.38 MPa)ことに加え、低圧下ではSC-CO<sub>2</sub>中へのリン脂質と水の溶解度が低いことに起因する。この現象は、リン脂質と水が極性溶質である一方、SC-CO<sub>2</sub>は非極性溶媒であるため、溶質と溶媒間の分子間相互作用が十分でないこによつて説明される。これを踏まえ、水、リン脂質、SC-CO<sub>2</sub>間の分子間相互作用を強化する媒体をSC-CO<sub>2</sub>に混合することで、操作圧力を低減させる方法を着想した。このアプローチにより、リポソーム調製法のコスト削減と安全性向上が期待される。

過去の研究では、SC-CO<sub>2</sub>に対するリン脂質と水の溶解度を向上させる目的で、SC-CO<sub>2</sub>とエタノールを混合するリポソーム調製法が提案されている[5]。しかし、この方法では、リポソームや水相にエタノールが残留する問題があり、その使用量は制限されている。その結果、操作圧力は純粋なSC-CO<sub>2</sub>を使用した場合とほぼ同じ10-17.5 MPaに留まる[5]。さらに、地域や文化によっては食品加工におけるエタノールの使用が規制されている場合があり、その代替溶媒の検討が必要とされている。

エタノールに代わる媒体としては、両親媒性であること、低い沸点を持つこと、容易に除去可能であること、さらには毒性がないことが求められる。これらの条件を満たす候補物質として、ジメチルエーテル(DME)に着目した。DMEはその特性から、安全性と効率性を兼ね備えた新しいリポソーム調製法の基盤となる可能性がある。

DMEはエーテルの一種であり、その特性から新しいグリーン溶剤として注目されている。DMEは強い水素結合を形成せず、標準沸点が-24.8 °Cと非常に低い[6]。その臨界温度は127 °C、臨界圧力は5.34 MPaであり[6]、同じ温度下におけるSC-CO<sub>2</sub>よりも蒸気圧が低い。この特性により、液化DMEを用いた抽出プロセスでは、残渣に溶媒が残留しないという利点がある[6]。

液化DMEはSC-CO<sub>2</sub>と任意の割合で混合可能であり、適切な割合で混合すれば不燃性となる[6]。また、DMEの分子構造は水分子のように曲がった形をしており、わずかに極性を持つため、弱い静電引力を形成する[6]。そのため、液化DMEは水と部分的に混合可能であり、SC-CO<sub>2</sub>との相互作用により溶解性の向上が期待される。さらに、DMEは炭素-炭素結合を含まず、自己酸化が穏やかで、生成する酸化物は重合しないため、他のアルキルエーテルよりも安全性が高い[6]。DMEは歐州連合で抽出媒体として認められているほか、食品医薬品局(FDA)によって「一般に安全と認められている」(GRAS)とされており、毒性は非常に低い[6]。また、オゾン層破壊係数ゼロ、地球温暖化係数ゼロといった環境負荷の少ない特性を持つ[6]。

DMEとSC-CO<sub>2</sub>を混合することで、SC-CO<sub>2</sub>中でのリン脂質の溶解が促進され、SC-CO<sub>2</sub>圧を低

下させてもリポソームを調製できることが期待される。また、DMEで抽出可能な機能性物質は、SC-CO<sub>2</sub>と混合したDMEによりリポソームへの内包効率が向上する可能性がある。

本研究では、液化DMEとSC-CO<sub>2</sub>を混合した媒体を用い、超音波アシスト法によりホスファチジルコリン水溶液からリポソームを調製した。この方法は、従来のSC-CO<sub>2</sub>を用いたリポソーム調製法で課題となっていた高圧の問題を解決するものである。また、この方法で得られたリポソームの特性を、純粋なSC-CO<sub>2</sub>を使用して得られたリポソームと比較し、残存DME量や保存安定性についても検討した。

## 2. 試料および実験方法

Fig 1に超音波処理、SC-CO<sub>2</sub>および液化DME混合媒体によるリポソーム調製に用いた装置を示す。リポソーム調製装置の反応容器に蒸留水(60 mL)、DME、クルクミン、リン脂質の一種である水素添加大豆ホスファチジルコリン(60 mg)と所定の圧力の亜臨界/超臨界CO<sub>2</sub>を封入し、超音波装置の上部で超音波を一時間照射した。その後背圧弁から大気圧に減圧されたCO<sub>2</sub>とDMEを大気に放出してリポソーム分散液を得た。操作圧力は6-10 MPa、温度は40-60 °C、DME/蒸留水比は0-4 wt%、クルクミン/蒸留水比は0-0.004 wt%、超音波周波数は28, 45, 100 kHz、超音波発生装置と反応容器底部の距離は0-12 cmとした。クルクミンの内包量を高速液体クロマトグラフィー(High performance liquid chromatography: HPLC、日本分光)または、紫外可視光分光光度計(UV-Vis V550、日本分光)を用いて、425 nmの検出波長で定量した。粒度分布、多分散性指数(PDI)、およびゼータ電位は、動的光散乱(DLS)を使用してZetasizer Pro(Malvern Panalytical、ウスター・シャー、英国)で測定した。高分解能透過型電子顕微鏡(HRTEM, JEM-2100Plus、日本電子、東京、日本)により、リポソームのラメラ性を観察した。

### 2.1 リポソーム調製

Fig 1に示す装置を用いて、超音波処理、SC-CO<sub>2</sub>、および液化DME混合媒体によるリポソーム調製を行った。反応容器には、以下の試料を封入した：蒸留水(60 mL)、液化DME、水素添加大豆ホスファチジルコリン(60 mg)、およびクルクミン(Curcumin)。所定の圧力の亜臨界または超臨界CO<sub>2</sub>を加え、反応容器を密閉した。次に、反応容器を超音波装置上部に配置し、40-60 °Cの温度条件下で1時間超音波を照射した。超音波処理後、背圧弁を通じてCO<sub>2</sub>およびDMEを減圧し、大気中に放出することでリポソーム分散液を得た。

実験の操作条件は以下の通りである：操作圧力6-10 MPa、温度40-60 °C、DME/蒸留水比0-4 wt%、クルクミン/蒸留水比0-0.004 wt%、超音波周波数28, 45, 100 kHz、超音波発生装置と反応容器底部の距離0-120 mmとした。

### 2.2 分析方法

クルクミンの内包量は、高速液体クロマトグラフィー(High Performance Liquid Chromatography: HPLC、日本分光)または紫外可視光分光光度計(UV-Vis V550、日本分光)を用いて測定した。HPLC分析では、検出波長425 nmを使用した。リポソームの粒度分布、多分散性指数(Polydispersity Index: PDI)、およびゼータ電位は、動的光散乱(Dynamic Light Scattering:

DLS)法を用いて測定した。測定には、Zetasizer Pro(Malvern Panalytical, ウスター・シャー、英國)を使用した。リポソームのラメラ性および形態を観察するため、高分解能透過型電子顕微鏡(High-Resolution Transmission Electron Microscope: HRTEM, JEM-2100Plus, 日本電子、東京、日本)を使用した。

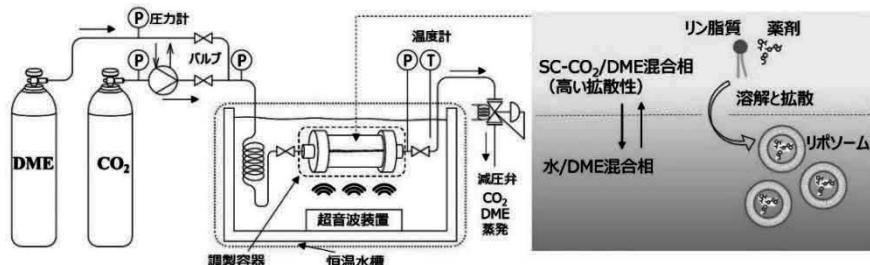


Fig. 1 DMEをSC-CO<sub>2</sub>の補助溶媒として使用するリポソームの新規調製技術の研究概要図

### 3. 実験結果および考察

Fig. 2に、異なる操作圧力下で調製したリポソームのTEM画像を示す。操作圧力が6 MPaの場合、リポソームの典型的な脂質二重層構造は観察されず、完全なリポソームが形成されないことが明らかとなった(Fig. 2a)。一方、操作圧力を7 MPa(Fig. 2b, c)、7.4 MPa(Fig. 2d)、および8 MPa(Fig. 2e)に設定した場合には、直径100–200 nmのリポソームナノ粒子が確認され、操作圧力7 MPa以上でリポソームが形成されることが示唆された。これにより、DME/SC-CO<sub>2</sub>超音波法ではCO<sub>2</sub>の臨界圧力条件未満の7 MPaにおいてもリポソームの形成が可能であることが明らかになりました、これは画期的な発見である。

さらに、Fig. 2cに示す操作圧力7 MPaで調製したリポソームの拡大TEM画像では、一層あたり約4 nmの脂質二重膜構造が確認された。また、操作圧力7 MPaでクルクミンを内包させたリポソーム(Fig. 2f)においても、リポソームの特徴的な脂質二重層構造が観察された。

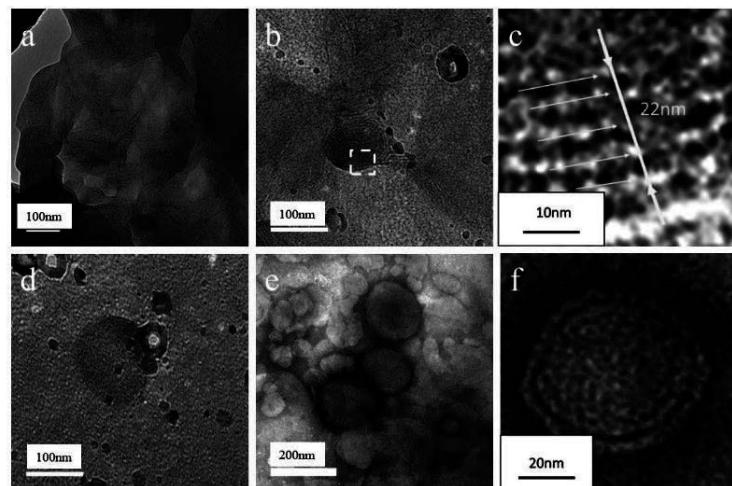


Fig. 2 DME/SC-CO<sub>2</sub>法で調製したリポソームのTEM画像。操作圧力が(a) 6 MPa、(b, c) 7 MPa、(d) 7.4 MPa、(e) 8 MPaで得られたリポソーム、ならびに操作圧力7 MPaでクルクミンを内包させたリポソームのTEM画像

圧力6.0–10.0 MPaの範囲で調製したリポソームの粒径分布とゼータ電位をFig. 3に示す。Fig. 3aに示すように、各操作圧力で調製したリポソームの粒径は、6.0 MPaで $88 \pm 21$  nm、7.0 MPaで $120 \pm 25$  nm、7.4 MPaで $179 \pm 10$  nm、8.0 MPaで $165 \pm 9$  nm、10.0 MPaで $156 \pm 11$  nmであった。特に、臨界圧7.38 MPa付近の7.4 MPaの条件までは、圧力が高いほど粒径が大きくなる傾向が観察された。一方、操作圧力6.0 MPaでは粒径が小さく、完全なリポソームが形成されていないことが示唆され、この結果はFig. 2のTEM画像と一致した。この理由として、DMEを混合しても圧力が臨界点を大きく下回る6.0 MPaではリン脂質の溶解性が不十分であり、CO<sub>2</sub>相へのリン脂質の移動が制限されるため、リポソームが十分に形成されないと考えられる。

Fig. 3bに示したゼータ電位の測定結果によると、各操作圧力で得られたりポソームのゼータ電位は、6.0 MPaで $-71.4 \pm 0.5$  mV、7.0 MPaで $-67.2 \pm 1.3$  mV、7.4 MPaで $-64.6 \pm 0.4$  mV、8.0 MPaで $-67.8 \pm 2.0$  mV、10.0 MPaで $-74.5 \pm 0.6$  mVであった。一般的に、分散系の安定性はゼータ電位が $-30$  mV以下または $30$  mV以上である場合に高いとされるため、本研究で調製したリポソームはいずれも高い分散安定性を有していることがわかった。

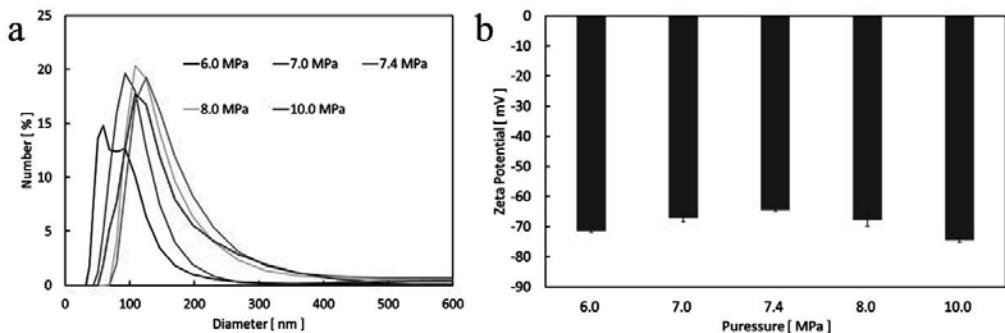


Fig. 3 DME/SC-CO<sub>2</sub>超音波照射法で調製したリポソームの(a) 粒径および(b) ゼータ電位の圧力依存性

圧力7.4 MPa、温度40、50、60 °C、周波数45 kHz、超音波発生装置からの距離120 mm、DME/蒸留水2.22 wt.%の条件で調製したリポソームの粒径分布をFig. 4aに示す。各反応温度で調製したリポソームの平均粒子径は、40 °Cで $75 \pm 19$  nm、50 °Cで $161 \pm 44$  nm、60 °Cで $179 \pm 10$  nmであった。特に40 °Cと50 °Cでは、粒径分布に2つのピークが確認された。これは、反応容器からCO<sub>2</sub>を放出する際の減圧膨張により、CO<sub>2</sub>界面付近の水が急激に冷却され、一時的に温度の低い水相と高い水相が発生することに起因すると考えられる。この温度差により、異なる粒径を持つリポソームが生成されたと推測される。また、リン脂質のガラス転移温度が約30 °Cであることから、40 °Cでは局所的にガラス転移温度を下回る可能性があり、このことがリポソーム形成の不完全性に寄与している可能性が示唆される。

圧力7.4 MPa、温度60 °C、周波数28、45、100 kHz、超音波発生装置からの距離120 mm、DME/水2.22 wt.%の条件で調製したリポソームの粒径分布をFig. 4bに示す。平均粒子径は、28 kHzで $115 \pm 27$  nm、45 kHzで $179 \pm 10$  nm、100 kHzで $1454 \pm 1172$  nmであった。100 kHzでは他の周波数条件と比較して粒径分布が著しく広く、粒径が大きい傾向が観察された。超音波の周波数を下げるにキャビテーション現象が起こりやすくなり、CO<sub>2</sub>やDMEの微小気泡が圧壊する際に大きなエネルギーを放出する。このエネルギーがリポソームを破壊する可能性がある。一方、周波数が

高い場合、超音波の波長が短くなり、キャビテーションバブルが負圧に位置する時間が短くなるため、生成する気泡の大きさが小さく、圧壊時のエネルギーも小さくなる。その結果、周波数が高いほど得られる粒径が大きくなる傾向が示されたと考えられる[5]。

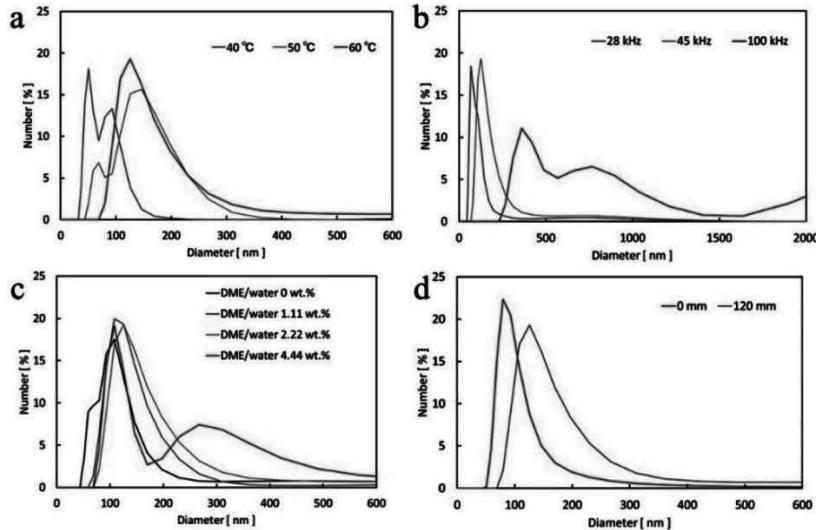


Fig. 4 DME/SC-CO<sub>2</sub>超音波照射法で調製したリポソームの粒径の依存性:(a) 操作温度、(b) 超音波周波数、(c) DME添加量、(d) 反応容器と超音波発生装置との距離

DMEの混合量をDME/水比で0、1.11、2.22、4.44 wt.%と変化させた場合のリポソームの粒径分布をFig. 4cに示す。他の条件は圧力7.4 MPa、温度60 °C、周波数45 kHz、超音波発生装置からの距離120 mmで一定とした。各条件で得られたリポソームの平均粒径は、0 wt.%で133±29 nm、1.11 wt.%で154±16 nm、2.22 wt.%で179±10 nm、4.44 wt.%で209±78 nmであった。DMEを混合すると粒径が大きくなる傾向が見られ、分布も広がった。DMEの混合によりリン脂質の溶解性が向上したが、DMEの添加により水とCO<sub>2</sub>相間の界面張力が低下し、水がCO<sub>2</sub>相に移動しやすくなることで、大きな水滴が形成され、その結果粒径が大きくなると考えられる。

また、超音波発生装置からの距離を0 mmおよび120 mmに設定した場合のリポソームの粒径分布をFig. 4dに示す。平均粒子径は0 mmで107±6 nm、120 mmで179±10 nmであった。装置直上(0 mm)に置いた場合、粒径とその分布が小さくなる傾向が確認された。これは、恒温槽の体積が大きい場合、超音波が拡散および減衰を起こしやすいため、装置から距離を置かない方が強い超音波を照射できるためと考えられる。

Fig. 5aに、60 °C、7.4 MPa、45 kHz、DME/水2.22 wt.%の条件で調製したリポソーム溶液の写真を示す。この溶液は白濁しており沈殿は観察されなかった。また、溶液に横からレーザー光を当てるときの光の軌跡が観察され、レイリー散乱が確認された。これにより、リポソームが水中に分散していることが示唆された。

さらに、クルクミン1.2 mgを添加したリポソームの写真をFig. 5bに示す。クルクミンは疎水性を有するため、リポソームに内包されない場合は水面に浮く。しかし、この条件下では目視でクルクミンが水中に分散していることが確認され、リポソームに内包されたことが示唆された。また、レーザー光のレイリー散乱も観察され、リポソームが十分に分散していることが分かった。

クルクミンを1.2 mgおよび1.8 mg添加したリポソームの粒径分布をFig. 5cに示す。クルクミン

を添加しないリポソームと比較すると、少量添加(1.2 mg)の条件では粒径が大きくなる一方、多量添加(1.8 mg)の場合は粒径が小さくなる傾向が見られた。各条件での平均粒子径は、1.2 mgで195±12 nm、1.8 mgで153±25 nmであった。クルクミン添加量が増加することでリポソームの形成が促進され、より安定した分散系が得られた可能性が示唆される。

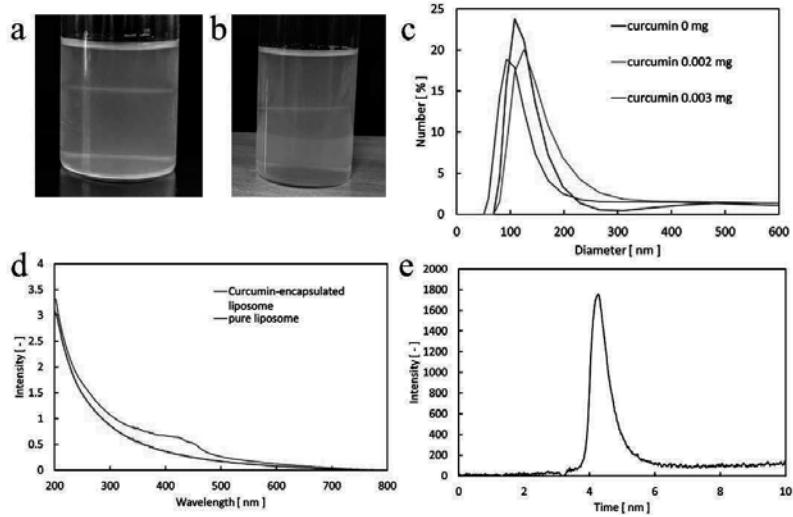


Fig. 5 (a) DME/SC-CO<sub>2</sub>超音波照射法で調製したリポソームの水溶液の外観、(b) クルクミンを内包したリポソームの水溶液の外観、(c) クルクミン内包リポソームの粒径分布、(d) クルクミンを内包したリポソームのUV-visスペクトル、(e) クルクミンを内包したリポソームのHPLCクロマトグラム

7.4 MPa、60 °C、DME/水2.22 wt.%、45 kHz、超音波装置からの距離120 mm、クルクミンを内包させたリポソームのUV-Vis測定結果をFig. 5dに示す。UV-Visスペクトルでは、425–450 nmの範囲でクルクミン特有の光吸収が観察された。この吸収ピークを利用し、HPLCを用いて内包量を測定した。Fig. 5eに示すように、7.4 MPa、60 °C、DME/水2.22 wt.%、45 kHz、超音波装置からの距離120 mm、クルクミン添加量24 mgの条件で調製したクルクミン内包リポソームにおいて、425 nmでの吸光度をHPLCで測定した結果、クルクミンの濃度は0.0043 mg/mLとなり、リポソーム内に内包されたクルクミンの量は0.26 mgであることが分かった。この結果から、クルクミンの添加量が増加することで、リポソームに内包されるクルクミンの量も増加することが確認された。

#### 4. 総括

本研究では、低毒性で残留の懸念がない液化DMEを混合することで、7.0 MPaの亜臨界CO<sub>2</sub>条件下でリポソームの調製に成功した。このアプローチにより、従来のSC-CO<sub>2</sub>(臨界点7.38 MPa)を溶媒として使用したリポソーム調製法における、10.0 MPaを超えない調製が困難という課題を解決した。また、操作圧力、温度、超音波周波数、液化DMEの混合量、および反応容器と超音波発生装置の距離といった重要なパラメータの最適化を行い、リポソーム形成における物理化学的条件の詳細が明らかになった。

さらに、抗酸化作用を持つクルクミンを内包したリポソームの調製にも成功し、リポソームが高い分散安定性を示す結果が得られた。これにより、DME/SC-CO<sub>2</sub>超音波法は、操作圧力の低減だけでなく、低沸点・低毒性の溶媒を使用することで装置コストの削減および安全性の向上という課

題を克服し、新たなリポソーム調製技術としての可能性を示した。今後は、医薬品や化粧品分野をはじめとする幅広い応用に向けた研究が期待される。

## 参考文献

- [1] Large, D. E.; Abdelmessih, R. G.; Fink, E. A.; Auguste, D. T. Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2021**, *176*, 113851. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113851>.
- [2] Nsairat, H.; Khater, D.; Sayed, U.; Odeh, F.; Al Bawab, A.; Alshaer, W. Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications. *Helijon* **2022**, *8* (5), e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>.
- [3] Panahi, Y.; Farshbaf, M.; Mohammadhosseini, M.; Mirahadi, M.; Khalilov, R.; Saghfi, S.; Akbarzadeh, A. Recent advances on liposomal nanoparticles: synthesis, characterization and biomedical applications. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* **2017**, *45* (4), 788–799. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1282496>.
- [4] Kanda, H.; Oya, K.; Irisawa, T.; Wahyudiono; Goto, M. Tensile Strength of Porcine Aorta Decellularized with Liquefied Dimethyl Ether and DNase. *ACS Omega* **2022**, *7* (38), 34449–34453. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c04103>.
- [5] Trucillo, P.; Campardelli, R.; Reverchon, E. Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids. *Processes* **2020**, *8* (9), 1022. <https://doi.org/10.3390/pr8091022>.
- [6] Wang, T.; Zhu, L.; Mei, L.; Kanda, H. Extraction and Separation of Natural Products from Microalgae and Other Natural Sources Using Liquefied Dimethyl Ether, a Green Solvent: A Review. *Foods* **2024**, *13* (2), 352. <https://doi.org/10.3390/foods13020352>.