

多機能リポソーム自動製造装置

吉村哲郎*・橋本正敏

株式会社リポソーム工学研究所/三重大学大学院工学研究科/財団法人名古屋産業科学研究所
〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577
橋本電子工業株式会社
〒515-0104 三重県松阪市高須町 3866-12

Automated Multi-functional Liposome Manufacturing Equipment

Tetsuro Yoshimura* and Masatoshi Hashimoto

Liposome Engineering Laboratory, Inc./Graduate School of Engineering, Mie University/
Nagoya Industrial Science Research Institute
1577, Kurimamachiya-cho, Tsu, Mie 514-8507, Japan
Hashimoto Electronic Industry, Co., Ltd.
3866-12, Takasu-cho, Matsusaka, Mie 515-0104, Japan

Recently, we developed simple vortex-mixing procedures for preparation of MLV, LUV, SUV and GUV, and succeeded in constructing "automated multi-functional liposome manufacturing equipment" adopting these novel procedures. This unique, easy-to-operate device possesses conventional vortex-mixing and ultrasonic parts and allows even unskilled users to prepare desired types of liposomes overnight with a single touch of a button. In addition to MLV, LUV, SUV and GUV, various functional liposomes, such as charged liposomes, sensitized liposomes, surface-modified liposomes, and reconstituted liposomes, can be prepared. Comprising conventional parts, the fully automated machine operates under oxygen-/germ-free conditions and is also applicable for concentration of a solute in a solution by removal of organic solvent, biochemical reactions (as bioreactors), ultrasonic disruption of bacteria, etc.

Key words : liposome / automatic preparation / one touch / oxygen-/germ-free / bioreactor

1. はじめに

リポソームは, drug delivery systemにおけるキャリアーとして, また, 細胞内遺伝子導入の武器としても多用され, リポソーム医薬品だけでなく, 化粧品や食品にも利用価値が高い人工脂質ナノ粒子である. リポソームには, 多重層リポソーム (MLV), 大きな一枚膜リポソーム (LUV), 小さな一枚膜リポソーム (SUV), 巨大な一枚膜リポソーム (GUV) 等があり, ボルテックス処理, 超音波処理, エクストル

ーダー処理等によって作製できる. しかし, 作製には幾種類もの装置を必要とし, 手作業であるため職人的技術も必要である. そこで, これらの4種類のリポソームを, ボルテックス処理のみによって作製する技術を開発した¹⁾. MLVは元々ボルテックス処理によって作製できるリポソームであるが, SUVも特殊な有機溶媒に脂質を溶かせ, 有機溶媒注入法を用いて作製できることが判った. LUVも逆相蒸発法の原理を巧みに利用して作製でき, GUVも糖含有脂質薄膜水和方法²⁾を基につくることが可能となった. 我々はさらに, ボルテックス処理と減圧処理による有機溶媒除去法をも開発し, 多機能リポソーム自動製造装置として結実している. 本稿では, 多機能リポソーム自動製造装置 (Fig. 1) とそれ以後ニーズに応じて開発した付随装置について紹介する.

* Corresponding author
Tel: 059-231-5326
Fax: 059-231-5328
E-mail: tyoshi@eng.mie-u.ac.jp



Fig. 1 Automated multi-functional liposome manufacturing equipment.

2. 装置の構成と特徴

2.1 装置の構成

本装置は、外寸約760 W×490 D×690 Hmm、重量約95 kgの実験机上に置くサイズで、電源はAC100 V, 15 A, 50/60 Hz, ボルテックスミキサー、ボルテックスミキサー試験管、超音波破碎装置、熱風送風機、放射温度計、シリンジポンプ、試料ボトル、タッチパネル、ユーティリティラック（オプション）等からなる。1回につき、2～30 ml/のリポソームが作製でき、自動繰り返し設定を10回にすることにより最大300 mlの作製が可能である。

ボルテックスミキサーは、回転数0～2,500 rpm・振幅9 mmの強力なミキシング能を有し、熱風送風と放射温度計によって試験管表面温度を一定に制御しながら試験管を減圧することにより、高効率なエバポレータとして使用できる。

超音波破碎装置は、水冷連続式破碎アダプターを搭載し、破碎・乳化・反応・分散処理、連続・バッチ・循環処理も行える。加振中の注入も可能である。

シリンジポンプは、ストローク60 mmを24,000分解能で制御でき、1, 5, 10 mlシリンジの選択が可能である。6台のシリンジポンプは個別の速度で同時運転が可能で、混合タイミングの同期化・精密送液を可能とし、分注機としても利用できる。試料ボトル

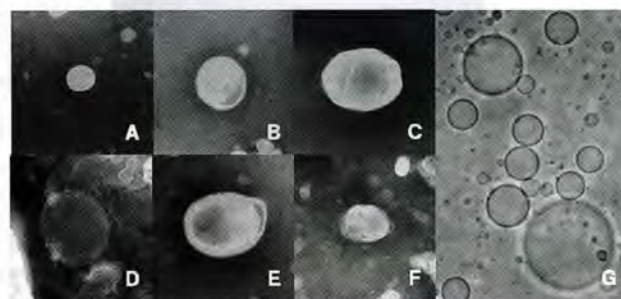


Fig. 2 TEM images of SUV (A), LUV (B), MLV (C), protein-bound liposomes (D), recombinant proteoliposomes (E) and liposome vaccines (F) and phase-contrast microscopic image of giant liposomes (G).

には、40 ml円錐底瓶と250 ml瓶がある。

オプションとして、①有機溶媒回収ユニット、②真空ポンプ、③冷却水循環装置、④コンプレッサー、⑤吸着カートリッジ、⑥クリーンエアシステム、が備わっている。

操作はタッチパネル方式で、リポソーム自動作製プログラムが12種類あり、各10種の作製条件が登録可能である。それ以外に、装置を構成する各機能をユーザーが自由に組み合わせ、15種類のプログラムを登録できるバイオリアクター機能があり、まさに“多機能”である。さらに、自動洗浄・乾燥プログラムも備わっている。



Fig. 3 Automated liposome manufacturing equipment.



Fig. 4 Automated size-controlled liposome manufacturing equipment.

2.2 装置の機能的特徴

装置の機能的特徴として、

- ① 素人でも、ワンタッチで、あらゆる種類のリポソームを、僅か40分で再現性よく作製できること、
 - ② エーテルあるいはクロロホルムを用いて、窒素気流下で作製可能であり、無酸素状態で作製できること、
 - ③ 有機溶媒除去操作において、突沸を防げること、
 - ④ 脂質の相転移温度以上のほぼ恒温で作製できること、
 - ⑤ 純水とアルコールによる自動洗浄可能であり、殺菌状態が維持できること、
- が挙げられる。

2.3 作製可能なリポソーム

本装置では、

- ① MLV, SUV, LUV, GUV, 多重層からなる, SMV, LMV, GMV,

- ② 医薬品、遺伝子、核酸、抗体、酵素等の高効率封入リポソーム、
- ③ 温度、pH、磁気、超音波等の感受性リポソーム、
- ④ PEG、糖鎖等の表面修飾リポソーム、
- ⑤ タンパク質、ペプチド、核酸等の膜表面結合リポソーム、
- ⑥ プロテオリポソーム³⁾、ヴィロゾーム等の再構成リポソーム、
- ⑦ 水溶性抗原及び脂溶性抗原封入リポソームワクチン、菌体膜及びウイルスエンベロープ混在リポソームワクチン⁴⁾、

が作製可能である。装置で作製したリポソームの顕微鏡像を、Fig. 2に示す。

3. 付随装置

本装置は、ボルテックス処理と減圧処理により有機溶媒除去を行うが、この原理に基づき、ニーズに応じて、簡易型リポソーム自動製造装置を開発した (Fig. 3)。手動装置も製作可能である。さらに、リポソームの作製にはサイジングが必須であり、そのために、リポソーム自動整粒化装置を開発した (Fig. 4)。

4. おわりに

以上、多機能リポソーム自動製造装置の概略を紹介した。人工細胞モデル研究等の基礎研究のみならず、核酸医薬等のリポソーム医薬品や化粧品及び機能性食品などの開発研究に役立つことを期待したい。

本装置はまた、手動で行っている通常のリポソーム作製を自動化したところに特徴がある。その再現性は、手動では実現できない。逆にみれば、手動では見つけることができないリポソームの形成原理が明らかになる可能性がある。事実、逆相蒸発法は、全て遷移現象からなることが目で確認できる。リポソーム作製技術の普遍化に繋がることも期待したい。

文 献

- 1) 吉村哲郎：JST地域イノベーション創出総合支援事業成果集, p. 36 (2012)
- 2) Tsumoto K, Matsuo H, Tomita M, Yoshimura T: *Colloids Surf. B. Biointerf.*, **68**, 98-105 (2009)
- 3) Tsumoto K, Yoshimura T: *Methods Enzymol.*, **465**, 95-109 (2009)
- 4) Yasumoto S, Kuzuya Y, Yasuda M, Yoshimura T, Miyazaki T: *Fish Pathol.*, **41**, 141-145 (2006)

(Received 7 May 2012;

Accepted 14 May 2012)