＜リポソーム Q&A 集＞

目次				内容
1	リポソーム概要	1-1	リポソームとは	リポソームとは何か、どのように利用されているのか等、リポソームの概要に関する質問
2	リポソームができるまで	2-1	調製方法	リポソームの調製方法に関する質問
		2-2	粒子径調整方法	リポソームのサイズ調整に関する質問
		2-3	未内包物除去方法	化合物のリポソーム内包化後の未内包物の除去方法に関する質問
		2-4	評価方法	リポソームのサイズ、電荷、脂質濃度等の物性評価に関する質問
3	リポソーム安定性	3-1	保管方法	冷蔵や冷凍、凍結乾燥等のリポソーム保管状態に関する質問
4	応用編	4-1	その他、アプリケーション	リポソームの特性、機能付加、スケールUP等に関する質問

1-1. リポソームとは	質問	回答
1	リポソームとは？	リポソームを一言で表現すると「細胞もどき」です。細胞は体の設計図であるゲノムや化学反応を行うためのタンパク質、栄養物など様々な化合物を有しており、それらは1枚の膜に包まれ存在しています。一方でリポソームは細胞の外側の膜だけが存在する中身が空っぽの人工カプセルであり、リポソームには様々な種類の化合物を包むことができるという特徴をもっています。 また、近年ではリポソームの「細胞もどき」の特徴を活かし、実際の細胞膜の構造や膜タンパク質、糖鎖など様々な生体内分子の機能解明の為のツールとして利用されています。他にも高感度なバイオセンサーとして利用する為の人工細胞や自ら動くリポソームナノロボット等、リポソームを身近な生活に活かすべく幅広い研究が盛んに行われています。
2	リポソームの構成成分は？	生物がもつ細胞膜と同じ脂質から構成されています。脂質にも様々な種類が存在しますが、主な構成成分はリン脂質です。また、糖脂質やセラミド、コレステロール、合成脂質等、脂質の組み合わせと組成比を変えることで特性を変えることができます。
3	リポソームは何に使われていますか？	主にリポソームに薬剤を内包して癌や炎症部位等の目的の細胞・組織に届ける為のキャリアとして利用されています。それ以外にも近年では、疑似細胞としてリポソーム内で遺伝子やタンパク質の合成を行ったり、膜相互作用を研究したり等、様々な分野で研究されています。 キーワード：DDS、微小反応場、人工細胞、

2-1. 合成方法	質問	回答
1	（一般的には）リポソームの調製方法にはどうのような方法がありますか？	広く知られている調製方法の1つにバンガム法という方法があります。バンガム法は脂質の薄膜に水溶液を添加し水和することで、脂質が自己組織化を起こしリポソームが形成されるという方法です。内包したい化合物が脂溶性の場合は予め脂質と一緒に混合しておき、水溶性の場合は水和する水溶液に溶かしておくことで化合物を内包することができます。形成されたリポソームは異なるサイズの集合体なので、目的に応じてエクストルーダーや超音波でサイズ調整する必要があります（「2-2 粒子径調整」参照）。また、リポソームに内包されなかった未内包物を除去する場合は、透析や限外ろ過を行う必要があります（「2-3 粒子径調整」参照）。
2	1の調製方法で水和の際の水溶液の組成（塩、糖、その他）や時間、温度で留意するポイントはありますか？	【組成】 水和溶液には生化学実験で用いられる一般的な緩衝溶液を使用しています。緩衝液のpHや種類は、内包する化合物への影響、脂質組成や使用用途を考慮して選択する必要があります。また、浸透圧の影響によるリポソームのバースト・収縮を防ぐ為、リポソーム内外の浸透圧を合わせる必要があります。弊社では塩化ナトリウムやスクロースを加え浸透圧を調整しています。 【時間・温度】 再水和の攪拌・静置時間や温度はリポソームの脂質組成と脂質の相転移温度によって異なります（相転移温度に関しては下記の質問9を参照）。
3	調製に必要な器具・試薬にはどのようなものがありますか？	必要な器具・試薬は調製方法によって異なりますが、上記のバンガム法では一般的に下記のような物を使用します。 【器具類】 ナス型フラスコ、恒温槽、エバポレーター、超音波洗浄機、エクストルーダー、透析膜等 【必要試薬】 クロロホルム、メタノール、各種緩衝液等
4	1以外にどのような調製方法がありますか？	リポソーム調製方法には以下のような方法があります。 コール酸除去法、逆相蒸発法、マイクロリアクター法、リモートローディング法、凍結融解法等
5	3の調製方法の選択基準はありますか？	調製方法の選択は最終的なリポソームの出来上がり要件によって決まります。リポソームのサイズや表面電荷、内包化合物の特性、内包率、使用できる原材料等を考慮する必要があります。特に内包する化合物や脂質組成によっては、調製方法の違いにより出来上がるリポソームの物性が全く異なる場合があるので調製方法の検討が必要です。
6	内包物に応じてリポソーム調製法を変えますか？	内包する化合物の安定性、分子量、溶解性等、化合物特性に合わせて調製方法を変えています。例えば、タンパク質等の熱や溶媒に不安定な化合物はコール酸除去法を用いてタンパク質の変性を防ぎなから内包化します。また、同じ化合物でもリポソームの調製方法を変えることでリポソームの粒子径や内包率等、リポソームの物性が大きく変化するので最適な調製方法を検討する必要があります。
7	内包物に応じ、リポソームの脂質組成を変えますか？	多くは使用目的を基軸に内包率及び粒子径等の物性を見ながら、脂質組成を変え検討していきます。例えば、医薬品、OTC医薬品、化粧品で使用されるようなリポソームは、それぞれの分野で使用される脂質材料が制限されます。使用できる脂質の組合せ、配合量はリポソームに内包される化合物量、リポソームの物性に大きく影響します。使用目的に合わせて脂質を選択しその上で高い内包率が得られるよう組成比と調製方法を変えていく必要があります。
8	脂質には「飽和タイプ」と「不飽和タイプ」がありますが、使い分けをする必要がありますか？	脂質には相転移温度（その温度以上で脂質の流動性・液晶性が増す温度）があり、飽和脂質では相転移温度が高く、不飽和脂質では相転移温度が低いという特徴があります。化合物の内包化、サイズ調整は、リポソームを構成する脂質の相転移温度以上で行う為、調製時の温度における内包化合物への影響を考慮する必要があります。また、相転移温度以上でリポソームを放置すると、膜の状態が不安定である為、内包物が漏出する可能性があります。リポソームを構成する脂質は、内包物、使用用途や操作環境に合わせて選択する必要があります。
9	ナノカプセルには他にどうのようなものがありますか？ 機能性脂質を使ってもリポソームを調製できますか？	同じナノカプセルとして、生分解性ポリマーから成るミセルやベシクルが存在しますが、構成成分の観点から全く異なるカプセルとして分類されています。しかし、脂質にポリマー等の別の化合物を結合させた機能性脂質を用いてリポソームを調製することもでき、温度感受性やpH応答性等の新たな機能を付加したリポソームを作ることが可能です。

2-2. 粒子径調整方法	質問	回答
1	商品化リポソームは、サブミクロンオーダにサイズダウンした物が多いですが、それは何故ですか？	リポソームの使用用途及び安定性を考慮してサイズダウンをしています。DDS用途としてのリポソームは、一般的に数十nm～数百nmで使用されており（①細胞間隙を通るサイズ、②免疫システムの回避）、凝集体を形成しない範囲でサイズ調整されています。近年では、DDS用途以外にも細胞モデルとしてリポソームを利用した研究が行われており、細胞サイズのマイクロオーダーのリポソームがあります。
2	サイズダウンによる安定性とはどういったものですか？	サイズダウンにより分散性が向上することで安定になります。最適な保存状態の場合、大きいサイズでも安定ではありますが、リポソームを取り巻く環境によっては壊れやすくなることもあります。DDS用途について言えば、リポソームの血中半減期はサイズの小さいリポソームのほうが大きいリポソームよりも長いと言われています（小さい方が免疫細胞による貪食を回避しやすい為）。
3	サイズ調整は段階的に行うものですか？	リポソームの調製はまず最初にサイズの大きなものを作ってから、目的のサイズに調整していきます。調製方法によって異なりますが、多くは1μm以上の大きなリポソームを作り、その後、超音波やエクストルーダーを用いてサイズを調整していきます。
4	サイズダウンの方法を教えてください	超音波またはエクストルージョン、もしくはその両方でサイズ調整しています。超音波によるサイズ調整では、リポソーム溶液に高い出力の超音波を照射すると、次第にサイズが小さくなります。一方のエクストルージョンでは、リポソーム溶液を目的のサイズに応じた孔径のメンブレンフィルターに加圧して押し出すことで、サイズが小さくなります。両方法とも1度の処理で目的のサイズにならないこともあり、その場合は何度か処理を繰り返し目的のサイズに調整していきます。
5	超音波装置はどのタイプを使用していますか？ 温度や処理時間、周波数については？ （バス型 or チップ型）	超音波処理は浴槽型とチップ型のどちらでも使用できます。 【浴槽型】メリット：温度調整が可能、デメリット：威力が弱く処理時間が長い 【チップ型】メリット：威力が強く処理時間が短い、デメリット：熱が発生し温度調整がしにくい・コンタミしやすい 温度や処理時間は脂質組成を考慮し都度粒子径を測定しながら調整する必要があります。
6	4以外のサイズダウンの方法はありませんか？	他には、高圧ホモジナイザーでリポソームをせん断しサイズを調整する方法があります。この方法は溶媒を使用しないでリポソーム調製ができるという特徴があります。

2-3. 未内包物除去方法	質問	回答
1	リポソームの調製後の未内包物除（緩衝液交換）にはどのような方法がありますか？	リポソームの外液の交換方法には遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、透析が挙げられます。
2	遠心分離、限外濾過、ゲル濾過、各々のメリット＆デメリットを教えて下さい	【透析】 メリット：サンプルはほとんど希釈されない、 急激なバッファー変化がない為サンプルへのダメージが少なく特別な装置は必要ない為操作が簡便 デメリット： 時間がかかる、 使用するバッファー液量が多い 【ゲルろ過】 メリット：簡便で少量のバッファーでも交換可能 デメリット：カラムへの非特異的な吸着が起こることがある。 【限外濾過】 メリット：簡便で低分子除去と同時にサンプル濃縮が可能、比較的大量のサンプル処理も可能 デメリット：膜への非特異的な吸着が起こることがある。 【遠心分離】 メリット：異なるサンプルを同時に操作できる デメリット：遠心分離を繰り返す必要がある
3	限外濾過やゲル濾過ではフィルターが目詰まりしますか？	目詰まりします。限外濾過の場合、濾過膜にリポソームが詰まり緩衝液が溶出しにくくなります。その場合、撹拌やピペッティングによりリポソームを分散させる必要があります。また、ゲルろ過の場合、カラム担体の目詰まりや非特異的な吸着により、分離精製が上手くいかないことがあります。リポソームのサイズや表面電荷、表面修飾を考慮して充填剤を選択する必要があります。
4	外液交換の前にサイズダウンしますか？	緩衝液の交換は、リポソームのサイズ調製を行った後に行って下さい。リポソームのサイズ調製は物理的な力を加え、破壊・再構築を繰り返すことで目的の粒子径にしています。その為、緩衝液交換後のサイズ調製は内包物が漏出し外液交換の意味がなくなってしまいます。
5	リポソームの内外で異なるバッファーを用いるとき浸透圧以外に考慮するこはありますか？	リポソーム内外の浸透圧及びpHを考慮して緩衝液の交換を行って下さい。内水相の浸透圧が高い場合、リポソーム内に水分子が入り込み破裂の原因となります。逆に内水相の浸透圧が低い場合、リポソーム外に水分子が移動し収縮や内包物の漏出の原因となります。pHに関しては、化合物によっては漏れやすくなる場合もありますので注意が必要です。
6	リポソームが安定化する浸透圧はありますか？ また、浸透圧はNaClやKClで調整してもいいですか？	リポソーム内外の浸透圧が同じであれば安定と考えられます。また、NaClやKClで調整できますが、CaイオンやMgイオンのような二価の金属イオンを含む溶液で浸透圧を調整するのは推奨できません。CaイオンやMgイオンのような金属イオンはリン酸基が脱水和を引き起こし、これによりリポソームを不安定な状態にすることが示唆されています。浸透圧の調整はリポソームの物性にできるだけ影響を与えない溶液を選択する必要があります。

2-4. 評価方法	質問	回答
1	内包物＆漏洩物の定量的評価法を教えて下さい	内包物の定量は、リポソームを界面活性剤や溶媒を用いて崩壊させて定量しています（弊社ではUV定量が可能な化合物等、定量方法が確立されている化合物に限り品質検査と共に報告しています）。また、定量の際の注意点としては、事前に未内包物を十分に取り除くことが重要となります。漏出物の定量は、溶液からリポソームを取り除き溶液中の化合物を定量します。溶液からリポソームを取り除く方法としては、超遠心分離法やゲルろ過クロマトグラフィー、透析、限外濾過等が挙げられます。
2	内包物定量の方法を具体的に教えて下さい	リポソームの内包物の評価は、リポソーム膜を崩壊させてから行います。膜の崩壊はクロロホルムやメタノール等の溶媒やSDS、Triton等の界面活性剤を用います。弊社では、混合溶媒を用いる際は、クロロホルム/メタノール（v/v, 1/1）を使用しています。また、アニオン性界面活性剤であるSDSを使用する場合は、SDSを添加しさらにボイルする必要があります。非イオン性界面活性剤であるTritonは、SDSに比べ脂質を分散させやすいので加熱の必要ありません。リポソームの崩壊に使用する試薬は、内包物や定量方法への影響を考慮して選択する必要があります
3	製品のリポソームの形状を電顕などで確認していますか？	弊社製品や受託製造の品質検査項目には含んでおらず電顕による確認は行っていません。ただし、お客様の御要望に応じて対応させていただくことは可能です。

3-1. 保管方法	質問	回答
1	製品で凍結乾燥したリポソームがありますが、どのようにして凍結乾燥していますか？	凍結乾燥は凍結したサンプルを真空ポンプで減圧し（凍結したサンプルの沸点を下げる）、低い温度でサンプルの水分を昇華させ乾燥させる方法です。昇華の際には熱が必要であり棚を加熱し昇華熱を補う必要があります。その為、十分な凍結乾燥を行うには圧力、棚温度を時間単位で正確に制御できる凍結乾燥機が必要になります。また、リポソームをそのままの状態で凍結乾燥するとリポソームが収縮・破壊してしまう恐れがあるので、予めリポソーム溶液に凍結保護材としてスクロースやトレハロースを添加してから凍結乾燥を行います。
2	どのような時に凍結乾燥が望まれますか？	凍結乾燥することにより、脂質の酸化を防ぐことができるので長期保存したい場合は凍結乾燥が推奨されます。使用時は再水和に用いる溶液の種類及びリポソームの濃度を実験系に合わせて調節できるのもメリットの1つです。
3	凍結乾燥が良くない場合もありますか？	脂質組成や内包物によっては、凍結乾燥することで内包物が漏出したり、再水和してもリポソームに戻らなかったりする場合があります。
4	凍結乾燥後のリポソームはどのような状態ですか？	凍結乾燥を行うと壊れたリポソームや球状を維持したリポソーム等、様々な状態のリポソームが存在していると考えられます。形状を保ったリポソームに関しては内包物を保持しており、リポソームとしての機能を果たしていると考えられます。しかし、壊れてしまったリポソームに関しては内包物が漏出してしまっている可能性があります。

4-1.その他 アプリケーション	質問	回答
1	脂質膜を通過しやすい化合物、または通過しにくい化合物の情報はありますか？	一般的にオクタノールへの分配係数が極端に低いものと高いものが安定にリポソームに留まり、分配係数が100～1000前後のものはリポソームに保持されにくいと考えられています。ただし、ある程度の脂溶性を有するもの、分子量が大きいものはリポソーム内に保持されやすく、その逆に水溶性物質でも分子量の小さいものはリポソームに保持されにくい傾向にあります。
2	脂質膜からイオンや分子を通過させなくする為にはどうしたら良いですか？	1つは飽和脂質（相転移温度の高い脂質）を用いてリポソームを調製すること、2つ目はコレステロールを添加することです。相転移温度以下の場合、脂質のゲル化により物質の漏出は抑えられますが、相転移温度以上の場合、脂質の液晶化により物質の漏出が起きやすい状態にあります。そこで、コレステロールや少量の不飽和脂質を添加することで、物質の膜透過性を抑えることができます。コレステロールは、不飽和脂質膜では脂質分子間相互作用を強め流動性と膜透過性の減少を引き起こし、飽和脂質膜では逆に相転移を消失させゲル相でも流動性を有する膜を作ります（飽和脂質膜におけるコレステロールの存在は、相転移における劇的な流動性変化が消失する為、結果として相転移温度以上では流動性が減少し、相転移温度以下では流動性の増加が観察されます）
3	脂質相転移温度以下になるとリポソームからの化合物漏出はなくなりますか？	上記質問2にあるように、相転移温度以下の場合、脂質のゲル化により物質は漏出しにくい状態にあります。しかし、相転移温度以下であってもリポソームを構成する脂質組成が均一に分散していなければ、脂質の局在に偏りができ漏出の原因となる可能性があります。リポソームを設計する際は脂質の分散性にも留意し各脂質が均一に分散するように調製する必要があります。
4	工業レベルでリポソームを合成する場合、どれぐらいの量になりますか？	食品、化粧品、医薬品によって要求量が異なりますが、数10キロから数100キロになります。
5	リポソームの一般的な寿命はどれぐらいですか？ （壊れずに内包物を保持し続ける期間は？）	凍結乾燥品リポソームと溶液リポソームでは寿命が異なります。また、化合物および脂質組成によっても異なります。弊社のGLYCOLIPO（溶液）の場合は1年となります（蛍光物質内包で in vivo 試験の確認済）。
6	寿命を短くしてしまう要因は何がありますか？	温度、酸素、光等が挙げられます。いずれもリポソーム膜を形成する脂質に影響を与える要素です。特に不飽和脂質は酸素や紫外線により分解を受けやすく、リポソームが壊れる原因になります。また、サイズが大きいリポソームや表面電荷が中性のリポソームでは、凝集体を形成しやすくなります。凝集したリポソームは撹拌によって分散する場合もありますが、膜同士が融合してしまい分散しないこともあります。
7	寿命を長くするための工夫はありますか？	溶液リポソームに関しては、不活性化ガス(窒素ガスやArガス等)で置換し、遮光、冷蔵下で保存するのが望まれます。凍結乾燥リポソームに関しては、脱気してある為、短期間で空気に触れるこはないと考えられますが、保存温度は4°C以下の方が良いでしょう。
8	リポソーム表面のPEG修飾にはどのような効果がありますか？	リポソーム表面にPEGを修飾することにより、マイナスチャージ及び親水性のリポソームになります。
9	その場合のPEGの分子量（長さ）、PEG入り脂質の含有率はどのように設定すれば良いですか？	リポソーム表面のPEGは水分子を抱き込むことにより膜表面に水の層が形成され、それによりステルス性を有することができます。その為、分子量が小さいPEGでは十分なステルス性を得ることができません。しかし、分子量が大きすぎると逆にリポソーム上での不安定化を招き、むしろステルス性が減少する可能性もあります。DDS用途のリポソーム調製において一般的には、分子量2000～5000のPEGが選択されます。含有率に関しては、弊社ではモル比で5%に設定しています。比率が5%以下の場合、十分なマイナスチャージ及び親水性が得られません。逆に5%以上添加してもそれ以上の電荷、親水性は望まれずリポソームに組み込まれないと考えられます。
10	DDSでPEGは重要と思われますが、体内に入れないアプリの場合もPEG修飾は効果がありますか？	体内に入れない場合でも、分散性、安定性、非特異的な結合の予防の観点からも有効です。