

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5741442号
(P5741442)

(45) 発行日 平成27年7月1日(2015.7.1)

(24) 登録日 平成27年5月15日(2015.5.15)

(51) Int.Cl.		F 1
A 6 1 K 9/127	(2006.01)	A 6 1 K 9/127
A 6 1 K 47/24	(2006.01)	A 6 1 K 47/24
A 6 1 K 47/12	(2006.01)	A 6 1 K 47/12
A 6 1 K 47/18	(2006.01)	A 6 1 K 47/18
A 6 1 K 47/28	(2006.01)	A 6 1 K 47/28

請求項の数 9 (全 31 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-541911 (P2011-541911)
 (86) (22) 出願日 平成22年11月15日(2010.11.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/070274
 (87) 国際公開番号 W02011/062132
 (87) 国際公開日 平成23年5月26日(2011.5.26)
 審査請求日 平成25年10月28日(2013.10.28)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-265653 (P2009-265653)
 (32) 優先日 平成21年11月20日(2009.11.20)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000001270
 コニカミノルタ株式会社
 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人 S S I N P A T
 (72) 発明者 磯田 武寿
 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノ
 ルタテクノロジーセンター株式会社内
 (72) 発明者 元杭 康之
 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノ
 ルタテクノロジーセンター株式会社内
 (72) 発明者 和田 武志
 東京都日野市さくら町1番地 コニカミノ
 ルタテクノロジーセンター株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リポソームの製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記工程(1)~(3)を有することを特徴とする、リポソームの製造方法：

(1) 一次乳化工程：揮発性有機溶媒である有機溶媒(O)、水性溶媒(W1)、および混合脂質成分(F1)を乳化することにより、W1/Oエマルションを調製する工程；

(2) 二次乳化工程：上記工程(1)により得られたW1/Oエマルションを、
 空気中での水との接触角が0°以上42°以下となるよう親水性薬剤による表面処理が施された孔膜を用いて水性溶媒(W2)中に分散させることにより、W1/O/W2エマルションを調製する工程；

(3) 前記W1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒(O)を除去することにより、単胞リポソームを形成する工程；

ここで、

前記孔膜は多孔質ガラス膜であり、

前記混合脂質成分(F1)は、リン脂質、ステロール類、糖脂質、グリコール、脂肪族アミンおよび長鎖脂肪酸から選ばれる1以上の混合脂質成分であり、

前記工程(2)は、前記水性溶媒(W2)に、重量平均分子量が1000~100000の分散剤をさらに添加した状態で行われる。

【請求項2】

前記工程(1)において、前記水性溶媒(W1)に内包対象物質をさらに添加した状態で乳化が行われる請求項1に記載の製造方法。

【請求項 3】

前記工程(1)において、前記有機溶媒(O)が100未満の沸点を有する有機溶媒である請求項1または2に記載の製造方法。

【請求項 4】

前記親水性薬剤が、シリカ前駆体モノマー、または表面に親水性基を有するシランカップリング剤である請求項1～3のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 5】

前記シランカップリング剤が、親水性基として、ポリオール構造、ポリエーテル構造、ポリアミン構造、3級アミン構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともいずれか1つを有する請求項4に記載の製造方法。

10

【請求項 6】

前記シランカップリング剤が、親水性基として、ポリオール構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともいずれか1つを有する請求項4に記載の製造方法。

【請求項 7】

前記分散剤が、タンパク質、多糖類および非イオン性界面活性剤からなる群より選択される1種以上である請求項1～6のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 8】

前記孔膜がSPG膜である、請求項1～7のいずれか1項に記載の製造方法。

【請求項 9】

前記工程(1)において、前記水性溶媒(W1)に内包対象物質をさらに添加した状態で乳化が行われ、且つ、

20

前記内包対象物質として医療用の薬剤類を用い、かつ得られるリポソームの体積平均粒径を50～300nmとする、請求項1～8のいずれか1項に記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、医薬品、化粧品、食品などの分野で用いられるリポソームの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

リポソームは、単層または複数層の脂質二重膜からなる閉鎖小胞体であり、内水相および脂質二重膜内部にそれぞれ水溶性および疎水性の薬剤類を保持できることが知られている。また、リポソームの脂質二重膜は生体膜に類似しているため生体内での安全性が高いことなどから、たとえばDDS(ドラッグ・デリバリー・システム)用の医薬品などの、各種用途が注目され、研究開発が進められている。

【0003】

これまでにリポソームの製造方法は数多く提案されてきたが、医薬品として承認されるリポソームを製造できる、コスト的・工業的に優れた汎用的な技術は少ない。水溶性薬剤はリポソームの内水相に含ませることができるが、従来の良いとされるリポソーム製造方法でも内包率(最終的に得られたリポソーム懸濁液(リポソームおよび外水相)に含まれる薬剤類の総質量に対する、リポソームに内包された薬物類の質量の割合)は40%程度であり、多くの場合、内包されない薬剤はロスとなる。これよりも内包率の高くなるリポソーム製造方法など、たとえば逆相蒸発法、は再現性が悪く、工業的に適さない。また、近年では核酸医薬など注目されているが、そのような医薬は単体では生体内で不安定なため、これらを安定化させるキャリアが望まれている。このため、水溶性薬剤を効率的に内包させることができ、かつナノサイズ(好ましくは静脈注射に適する300nm以下)の平均粒径を有するリポソームを製造できる方法が望まれている。

40

【0004】

このようなナノサイズのリポソームを製造する方法として、これまでに、様々な方法が試みられてきた。例えば、特許文献1には、疎水化表面処理を施したマイクロチャンネル

50

に水溶性薬剤を含む水系溶液を通過させることにより、乳化剤を含む油相に分散させてW/Oエマルションを製造する工程と、このW/Oエマルションを凍結させた状態で乳化剤を含む油相部分を除去し、脂質を含む油相に置換し、その後油相溶媒を除去する工程とを含むリポソームの製造方法が記載されている。しかし、特許文献1に記載の方法では、製造されたリポソームに内包された内包物質の内包率は6～45%に留まる。

【0005】

また、リポソームの製造方法として、二段階乳化法を用いるものも知られている。

【0006】

例えば、非特許文献1では、二段階で乳化したW/O/Wエマルションを液中乾燥し、リポソームを形成するマイクロカプセル化法が提案されている。また、特許文献2には、
2段階の乳化工程を含む多胞リポソーム製剤の製造方法において、リポソームの脂質成分
として炭素数がより大きな脂質を用いることにより、薬剤類の内包率を向上させることが
できることが記載されている。さらに、特許文献3には、形成したW/O/Wエマルシ
オンから多胞リポソームを製造する方法であって、溶媒をエマルション中から除去しクロ
スフローろ過にかける方法が記載されている。さらに、非特許文献2には、W/Oエマル
ションを分散相、トリス塩酸緩衝液を外水相としてマイクロチャンネル乳化法によりW/O/
Wエマルションを作製する際に、その外水相にカゼインナトリウムを乳化剤として配合す
ることにより、リポソーム(脂質カプセル)へのカルセインの内包率を80%程度に高め
ることができたことが記載されている。しかし、これらの方法には、均一なナノサイズの
単胞のリポソームを得ることが困難であるという問題点がある。

【0007】

近年、二段階乳化法を利用したエマルションの製造方法について、使用するマイクロ
チャンネル基板の親水性及び疎水性に着目した研究もなされている。例えば、特許文献4
では、幅が5 μ mおよび15 μ mの2種類のマイクロチャンネルにより隔てられた3つの
スペースを有するエマルション製造装置が開示されている。このエマルション製造装置
において、各スペースの内壁とマイクロチャンネルが連続相のみに濡れるように、疎水
性薬剤による疎水性表面処理を行った領域と酸素プラズマによる親水性表面処理を行
った領域とが組み合わされている。この特許文献4には、このエマルション製造装置
を用いてW/O/Wエマルションを製造したことが記載されているが、この装置をリ
ポソーム製造に使用することについては何ら具体的に記載されていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特許第4009733号公報

【特許文献2】特表2001-505549号公報

【特許文献3】特表2001-522870号公報

【特許文献4】特開2003-71261号公報

【特許文献5】特開昭52-46382号公報

【非特許文献】

【0009】

【非特許文献1】J Dispers Sci Technol, 9(1), 1-15 (1988)

【非特許文献2】黒岩崇, 中嶋光敏, 市川創作「多相エマルションを基材とした脂質カ
プセル作製における水相組成の影響」化学工学会 第74回年会(2009年3月)要旨集

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

しかしながら、上記従来技術においては表面張力が低い有機溶媒をO相に用いてW/O/Wエマルションを製造し、なおかつ水溶性薬剤の内包率の高さと、均一なナノサイズとの両方を兼ね備えたりポソームを得ることが未だ困難であるという問題点がある。そこで、本発明は、ナノサイズの粒径を有しかつ水溶性薬剤の内包率が高い単胞リポソームを得

10

20

30

40

50

ることができるリポソームの製造方法を提供することを課題とする。

【0011】

本発明において、「単胞リポソーム」(ULV、単核リポソームと同義である)は、単一の内水相を有するリポソーム構造物を指し、通常は体積平均粒径の範囲が約20~500nmである。これに対して、「多胞リポソーム」(MVL: multivesicular liposomes)は、複数の非同心円状の内水相を包囲する脂質膜を含んでなるリポソーム構造物を指し、また「多重膜リポソーム」(MLV)は、複数の「タマネギの皮」のような同心円状の膜を有し、その間に殻様の同心円状の水系コンパートメントがあるリポソーム構造物を指す。多胞リポソームおよび多重膜リポソームの特徴は、体積平均粒径がマイクロメートルの範囲であり、通常は0.5~25 μ mである。

10

【0012】

孔膜を用いてW/OエマルションからW/O/Wエマルションを製造する場合、W/Oエマルションを含む油相と外水相と孔膜をはさんで隔離された系が用いられる。ここで、W/Oエマルションは、油相と外水相との間に設けられた圧力差によって、孔膜に形成された孔に進入し、この孔を通過することによって孔膜を透過する。孔の出口に達し外水相と接したW/Oエマルションは、その後液滴を形成し、この液滴が孔の出口から外水相に向けて成長する。そして、この液滴が成長するにつれて、この液滴が孔の出口付近で次第にくびれてゆき、しまいにはこの液滴が孔膜から分離して外水層中に分散する。このようにW/Oエマルションからなる液滴がくびれて孔膜から分離する現象は、液滴と外水相と孔膜表面との間に働く表面張力などの相互作用によって生じると考えられる。この観点から考えれば、ヒマワリ油などの表面張力が高い溶媒からなるO相の場合にはくびれて孔膜から分離しやすく、表面張力が低い有機溶媒をO相に用いた場合にはこの現象が起こりにくい傾向に傾くことが当然予想できる。実際、上述の特許文献4には、ヒマワリ油をO相に用いてW/O/Wエマルションを製造したことが記載されている。また、特許文献5には、軽質流動パラフィンを用いて攪拌乳化を行うことによりW/O/Wエマルションを製造したことが記載されている。

20

【0013】

ところが、従来公知のマイクロチャネル基板等の孔膜を用いてW/O/Wエマルションを製造する場合、W/Oエマルションが連続流出するために液滴の粒径が大きくなり、所期の粒径を有するW/Oエマルションが分散したW/O/Wエマルションを作成できない場合があるという問題点がある。その理由として、外水相に接する部分の孔膜表面における親水性が充分ではないために、W/Oエマルションからなる液滴が孔膜表面に沿って拡大することが挙げられる。このような現象が生じると、外水相に放出される液滴の巨大化を招き、あるいは、互いに隣接し合う複数の孔の出口からの液滴が合体することにより外水相に接する部分の孔膜表面にW/Oエマルションからなる層が生成し、外水相への液滴の放出が起こらなくなる場合がある。

30

【0014】

一方、W/O/Wエマルションの形成を通じてリポソームを製造する際にもう一つ留意すべきこととして、得られるW/O/WエマルションからO相を構成する媒質を除去することが必要となるという点が挙げられる。ここで、W/O/Wエマルション製造方法を用いてリポソームを製造する際には、W/O/Wエマルションからの除去が容易である観点からO相を構成する溶媒として揮発性有機溶媒が用いられることが多い。ところが、揮発性有機溶媒は概して表面張力が低いことから、上述したようなW/Oエマルションの連続流出による問題点が顕在化するおそれがある。ここで、O相を構成する溶媒として表面張力の高い溶媒を用いれば、W/Oエマルションの連続流出による問題点を軽減することはできるものの、表面張力の高い溶媒は概して高い沸点を有する傾向にあることから、W/O/Wエマルションからの除去が困難になるおそれがある。この点、上記特許文献4記載の発明では、O相の具体的な例としてヒマワリ油を用いたW/O/Wエマルションの製造が示されており、非揮発性のヒマワリ油を除去することはできないのでリポソームへの転換はできない。また、同様の理由から、W/O/Wエマルションの形成を通じてリポソ-

40

50

ムを製造する際に、上記特許文献5に記載の軽質流動パラフィンをO相として用いることも現実的ではない。

【0015】

ここで、外水相に接する部分の孔膜表面、少なくとも、孔の出口およびその周辺部における孔膜表面に十分な親水性を付与すれば、外水相に接する部分の孔膜表面の全体が外水相に濡れることとなり、これによって、W/Oエマルションからなる液滴が孔膜表面に沿って拡大することなく孔膜から分離しやすくなる。さらに、孔膜における孔の内部の親水性も高ければ、外水相とW/Oエマルションからなる液滴との界面が孔の出口を超えて孔の内部に達しやすくなり、これによりW/Oエマルションからなる液滴がくびれやすくなり、結果、W/Oエマルションからなる液滴が孔膜からさらに分離しやすくなると考えられる。

10

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明者は鋭意検討した結果、空気中での水との接触角が所定の範囲となるよう親水性薬剤による表面処理を施した孔膜を用いてW/O/Wエマルションを製造することにより、上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成させるに至った。

【0017】

すなわち、本発明に係るリポソームの製造方法は、下記工程(1)~(3)を有することを特徴とする：

(1)一次乳化工程：揮発性有機溶媒である有機溶媒(O)、水性溶媒(W1)、および混合脂質成分(F1)を乳化することにより、W1/Oエマルションを調製する工程；

20

(2)二次乳化工程：上記工程(1)により得られたW1/Oエマルションを、空気中での水との接触角が0°以上42°以下となるよう親水性薬剤による表面処理が施された孔膜を用いて水性溶媒(W2)中に分散させることにより、W1/O/W2エマルションを調製する工程；

(3)前記W1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒(O)を除去することにより、単胞リポソームを形成する工程；

ここで、

前記孔膜は多孔質ガラス膜であり、

前記混合脂質成分(F1)は、リン脂質、ステロール類、糖脂質、グリコール、脂肪族アミンおよび長鎖脂肪酸から選ばれる1以上の混合脂質成分であり、

30

前記工程(2)は、前記水性溶媒(W2)に、重量平均分子量が1000~100000の分散剤をさらに添加した状態で行われる。

【0018】

ここで、前記工程(1)において、前記水性溶媒(W1)に内包対象物質をさらに添加した状態で乳化を行ってもよい。

【0019】

また、W1/O/W2エマルション調製後に有機溶媒(O)の除去が容易になる観点から、前記有機溶媒(O)が100未満の沸点を有する有機溶媒であることが望ましい。

【0020】

40

前記工程(2)で行われる表面処理の典型的な態様において、用いられる親水性薬剤は、シリカ前駆体モノマー、または表面に親水性基を有するシランカップリング剤である。このとき用いられるシランカップリング剤は、典型的には、親水性基として、ポリオール構造、ポリエーテル構造、ポリアミン構造、3級アミン構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともいずれか1つを有する。ここで、特に好適な態様において用いられるシランカップリング剤の例として、親水性基として、ポリオール構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともいずれか1つを有するものが挙げられる。

【0021】

また、前記分散剤が、タンパク質、多糖類および非イオン性界面活性剤からなる群より選択される1種以上であることが好ましい。

50

【 0 0 2 2 】

本発明において、前記孔膜は、典型的には S P G 膜 である。

【 0 0 2 4 】

また、前記工程 (1) において、前記水性溶媒 (W 1) に内包対象物質をさらに添加した状態で乳化を行うときには、上記内包対象物質として医療用の薬剤類を用い、かつ得られるリポソームの平均粒径を 5 0 ~ 3 0 0 n m とすることが好ましい。

【 0 0 2 7 】

なお、本明細書において、「平均粒径」とは体積平均粒子径を指す。

【発明の効果】

【 0 0 2 8 】

本発明の製造方法によれば、医薬品用としても好適なナノサイズの平均粒径および良好な単分散性を有するリポソームを効率的に製造できるようになる。特に二次乳化工程において S P G 膜またはマイクロチャネル基板を用いることにより、コストが安く処理量が多い、工業的に有利な方法とすることができる。また、一次乳化工程をさらにリポソームに内包させるべき物質 (特に水溶性の薬剤類) を添加した上で行った場合には、リポソームに上記のような性状を賦与しつつ従来よりも高い内包率 (たとえば 8 0 % 以上) を達成することができる。このような本発明のリポソームの製造方法を利用することにより、各種の用途に好適なりポソームの生産性を著しく改善することができる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 9 】

〔製造原料〕

混合脂質成分 (F 1)

本発明の具体的な実施の形態の一つにおいては、一次乳化工程において混合脂質成分 (F 1) が用いられる。この混合脂質成分 (F 1) は主としてリポソームの脂質二重膜を構成する。

【 0 0 3 0 】

これらの混合脂質成分の配合組成は特に限定されるものではないが、一般的にはリン脂質 (動植物由来のレシチン; ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルグリセロール、ホスファチジリンイノシトール、ホスファチジン酸またはそれらの脂肪酸エステルであるグリセロリン脂質; スフィンゴリン脂質; これらの誘導体等) と、脂質膜の安定化に寄与するステロール類 (コレステロール、フィトステロール、エルゴステロール、これらの誘導体等) とを中心に構成され、さらに糖脂質、グリコール、脂肪族アミン、長鎖脂肪酸 (オレイン酸、ステアリン酸、パルミチン酸等)、その他各種の機能性を賦与する化合物が配合されていてもよい。特に、上記リン脂質としてジパルミトイルホスファチジルコリン (D P P C)、ジオレイルホスファチジルコリン (D O P C)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (D P P G) 等の中性リン脂質が慣用される。混合脂質成分の配合比は、脂質膜の安定性やリポソームの生体内での挙動などの性状を考慮しながら、用途に応じて適切に調整すればよい。

【 0 0 3 1 】

また、本発明の具体的な実施の形態の一つとしては、上記混合脂質成分 (F 1) のほか、必要に応じて、二次乳化工程において混合脂質成分 (F 2) を用いてもよい。混合脂質成分 (F 2) は主として外膜を構成する。混合脂質成分 (F 1) および (F 2) は、同一の組成であっても、異なる組成であってもよい。混合脂質成分 (F 2) に含まれる成分として、上記混合脂質成分 (F 1) と同様の成分を用いることができる。また、混合脂質成分 (F 2) には P E G 化リン脂質など D D S としての機能性の付与に必要な脂質成分を含むことで、リポソーム表面に効率的な修飾が可能となる。混合脂質成分の配合比も、脂質膜の安定性やリポソームの生体内での挙動などの性状を考慮しながら、用途に応じて適切に調整すればよい。

【 0 0 3 2 】

水性溶媒 (W 1) ・ (W 2)、有機溶媒 (O)

10

20

30

40

50

水性溶媒(W1)および(W2)ならびに有機溶媒(O)は公知の一般的なものを用いることができる。W1/O/W2エマルジョンにおいて、この水性溶媒(W1)と水性溶媒(W2)はそれぞれ内水相及び外水相を構成する溶媒であり、有機溶媒(O)はこの内水相と外水相との中間に位置する油相を構成する溶媒である。

【0033】

水性溶媒としては、純水や、浸透圧調整やpH調整に適した塩類や糖類、その他の化合物を添加したものが挙げられる。このような水性溶媒の例として、トリス-塩酸緩衝溶液などの各種緩衝溶液が挙げられる。また、リポソームの用途に合わせて、水性溶媒(W1)にはゼラチンなどのゲル化剤、デキストランなどの増粘多糖類、キチン/キトサンやポリ-L-リジンなどの荷電性高分子といった物質を封入してもよい。

10

【0034】

有機溶媒としては、たとえばヘキサン(n-ヘキサン：沸点69)やペンタン(沸点36)、シクロヘキサン(沸点80.7)、トルエン(沸点110.6)、酢酸エステル(酢酸メチル(沸点57)、酢酸エチル(沸点77.1)、酢酸イソプロピル(沸点89)、酢酸ブチル(沸点126)など)、ギ酸エチル(沸点54)、クロロホルム(沸点61.2)、塩化メチレン(沸点39.75)、エーテル(ジエチルエーテル(沸点34.6)、t-ブチルメチルエーテル(沸点55))、1,2-ジクロロエテン(cis体：沸点60, trans体：沸点48)、1,1,2-トリクロロエテン(沸点87)などの水と混和しにくいものが挙げられ、それらのうち、ヘキサン(n-ヘキサン)、ペンタン、シクロヘキサン、クロロホルム、塩化メチレン、酢酸メチル、酢酸エチル、酢酸イソプロピル、ギ酸エチル、ジエチルエーテル、t-ブチルメチルエーテルが好ましい。これらの水と混和しにくい有機溶媒を1種単独で使用してもよいし、2種以上を混合して使用してもよい。あるいは、アセトニトリル(沸点81.6)やエタノール(沸点78.3)、メタノール(沸点64.65)、2-プロパノール(沸点82.4)、アセトン(沸点56)、メチルエチルケトン(沸点80)、THF(沸点66)、1,2-ジメトキシエタン(沸点85)など水と混和しやすい有機溶媒を、1種単独でもしくは2種以上を組み合わせて、上記の水と混和しにくい有機溶媒と混合して使用してもよい。このような水と混和しやすい有機溶媒として、アセトニトリル、エタノール、メタノール、2-プロパノール、アセトン、メチルエチルケトンなどが好ましい。なお、上記以外のエーテル、炭化水素、ハロゲン化炭化水素、ハロゲン化エーテル、エステル類もまた、有機溶媒(O)として用いることができる。また、水よりも沸点の低い揮発性有機溶媒、すなわち、100未満の沸点を有する揮発性有機溶媒を有機溶媒(O)として使用することが好ましい。そのような有機溶媒(O)を用いれば、W1/O/W2エマルジョンからリポソームを製造する工程において、この有機溶媒(O)の除去が容易となるからである。

20

30

【0035】

より好ましい混合有機溶媒の態様としては、たとえば、ヘキサン：クロロホルム=60：40~90：10、ヘキサン：ジクロロメタン=60：40~90：10、ヘキサン：酢酸エチル=50：50~90：10、ヘキサン：エタノール=70：30~99：1(いずれも体積比、合計を100とする)からなるものが挙げられる。このような混合有機溶媒の一つの態様として、例えば、ヘキサンを主成分(50体積%以上)とするものは、得られるナノサイズの水/Oエマルジョンの単分散性を向上させるなどの効果に優れるため好ましい。

40

【0036】

なお、使用する有機溶媒(O)として、3種以上の有機溶媒を組み合わせてもよいが、条件設定の容易さの観点からは2種の有機溶媒の組み合わせとすることが好ましい。必要に応じて、さらに各種の機能性成分を混合有機溶媒に添加してもよい。

【0037】

内包対象物質

本発明において、エマルジョンまたはリポソームに内包させるべき物質(以下「内包対

50

象物質」と称する。)は特に限定されるものではなく、リポソームの用途に応じて医薬品、化粧品、食品などの分野で知られている各種の物質(以下「薬剤類」と総称する。)を用いることができる。

【0038】

このような薬剤類のうち医療用の水溶性のものとしては、たとえば、造影剤(X線造影用の非イオン性ヨード化合物、MRI造影用のガドリニウムとキレート化剤とからなる錯体等)、抗がん剤(アドリアマイシン、ビラルピシン、ピンクリスチン、タキソール、シスプラチン、マイトマイシン、5-フルオロウラシル、イリノテカン、エストラサイト、エピルピシン、カルボプラチン、イントロン、ジェムザール、メソトレキセート、シタラピン、アイソボリン、テガフル、シスプラチン、エトポシド、トポテシン、ビラルピシン、ネダプラチン、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド、テストパミン、ニムスチン、ラニムスチン、ダカルバチン、エノシタピン、フルダラピン、ペントスタチン、クラドリピン、ダウノマイシン、アクリルピシン、アムルピシン、アクチノマイシン、タキソテル、トラスツブマブ、リツキシマブ、ゲムツズマブ、レンチナン、シゾフィラン、インターフェロン、インターロイキン、アスパラギナーゼ、ホスフェストロール、ブスルファン、ボルテゾミブ、アリムタ、ベバシズマブ、ネララビン、セツキシマブ等)、抗菌剤(マクロライド系抗生物質、ケトライド系抗生物質、セファロスポリン系抗生物質、オキサセフェム系抗生物質、ペニシリン系抗生物質、ベータラクタマーゼ配合剤、アミノグリコシド系抗生物質、テトラサイクリン系抗生物質、ホスホマイシン系抗生物質、カルバペネム系抗生物質、ペネム系抗生物質)、MRSA・VRE・PRSP感染症治療剤、ポリエ

10

20

【0039】

水溶性薬剤を内包させる目的は、水溶性薬剤を内水相(W1)に溶解することによって達成される。したがって水溶性の高い薬剤類を内包対象物質として内包するときには、内水相(W1)に高濃度で溶解すれば、エマルジョンまたはリポソームに内包される薬剤の絶対量を増やすことができる。一方、内水相(W1)の量は適宜変えることができ、所定の粒径の粒子(W1/O)を作成しようとするれば、それに必要な脂質の量(個数)は計算できる。たとえば、100 nmのW1/Oエマルジョン(粒子体積 $0.0005 \mu\text{m}^3$)を形成する場合、W1相(内水相)1.0 mLで製造したときに生成するW1/O粒子の量は 2.0×10^{15} 個と算出できる。一方、W1/Oエマルジョンの表面積に着目すると、リン脂質としてレシチンを用いた場合には、レシチン1分子あたりの表面積 0.7 nm^2 として、100 nmのW1/Oナノエマルジョン(粒子表面積 $4 \times 2500 \text{ nm}^2$)を構成するリン脂質分子の数は 0.4×10^5 個と計算される。したがって、薬液1.0 mLの1次乳化に必要な脂質量は、 $(2.0 \times 10^{15} \text{ 個}) \times (0.4 \times 10^5 \text{ 個}) = 0.8 \times 10^{20}$ 個、すなわち 0.132 mmol である。レシチン以外の脂質分子も、その表面積はおおよそ 0.7 nm^2 として差し支えないため、脂質類の総量として 0.132 mmol が100 nmのW1/Oナノエマルジョンを作成するのに必要最少量と考えられる。リポソームを作成するには、その倍の 0.264 mmol が必要であり、代表的なリン脂質のDPPCで分子量換算すると 193 mg が必要である。

30

40

【0040】

そこで、薬剤を1.0 mLの水に溶解し、100 nmのリポソームを作製する場合を考えると、薬局法記載の通りシタラピンは1.0 mLの水に対して $0.1 \sim 1.0 \text{ g}$ 溶解するので、薬剤重量比 $0.1 \text{ g}/0.193 \text{ g} \sim 1.0 \text{ g}/0.193 \text{ g}$ 、イオヘキソール(造影剤)は1.0 mLの水に対して 1.0 g 以上溶解するので、薬剤重量比 $1.0 \text{ g}/0.193 \text{ g}$ 以上である。ここで、薬剤重量比は、リポソ

50

ーム作製に用いられる薬剤とリン脂質との重量比を表す。このような高い薬剤重量比は、脂質量を低減して効率的に薬剤を内包できることを意味し、脂質の投与量を減らすことができる点、臨床上有意義である。このようにして、本手法により薬剤重量比0.5~5が達成できる。さらに、より多くの薬剤を溶解すると、一般的に飽和状態に近づき粘度が上昇する。本手法により、内水相の粘度として10 mPa・sまで内包可能である。

【0041】

また、100 nmより大きいリポソーム粒子を製造する場合には、脂質の必要量はそれより少なくても済むので、より効率的ということになる。

分散剤

本発明では、製造されるエマルジョンおよびリポソームを安定化させることを目的として、必要に応じて、二次乳化工程において分散剤を含有する外水相が用いられる。この場合、本発明の二次乳化工程は、水性溶媒(W2)に分散剤をさらに添加した状態で行われる。

【0042】

本発明で好ましく用いられる分散剤としては、通常、自己による分子集合体を形成しない分散剤、または自己による分子集合体を形成するがその体積平均粒径が10 nm以下である分散剤が挙げられる(このような分散剤を、以下「特定分散剤」と呼ぶ場合がある)。分散剤としてこのような特定分散剤が用いられると、濾過工程によりリポソームと分散剤とを分離する上で好都合である。本発明における好適な態様では、二次乳化工程においてこのような特定分散剤を含有する外水相が用いられる。

【0043】

本明細書において「自己による分子集合体を形成しない分散剤」を含有する外水相とは、濃度をいくら高めても分子集合体(典型的にはミセル)を形成することのない物質が分散剤として外水相に配合されている場合、および一定の濃度以上で分子集合体を形成する物質(典型的には臨界ミセル濃度を有する界面活性剤)がそれに達しない濃度で分散剤として外水相に配合されている場合、これら両方の場合を指す。また、「自己による分子集合体を形成するがその体積平均粒径が10 nm以下である分散剤」を含有する外水相とは、分子集合体を形成しうるもののその体積平均粒径が10 nm以下である物質が「分散剤」として外水相に配合された場合を指す。

【0044】

また、分散剤は、作用の面から大きく2つのタイプに分類することもできると考えられる。一つは、多糖類のように、W1/Oエマルジョンと外水相(W2)からなる外水相の界面への配向性が比較的小さいため外水相(W2)全体に分布し、W1/O/W2エマルジョン同士がくっつかないようにすることでリポソームを安定化する作用を有するものである。もう一つは、タンパク質や非イオン性界面活性剤のように、W1/O/W2エマルジョンの界面への配向性が比較的高く、保護コロイドのようにエマルジョンを取り囲むことで安定化する作用を有するものである。

【0045】

W1/O/W2エマルジョン同士が合一して粒径が大きくなると、液中乾燥法等による溶媒除去が不均一になり内包薬剤が漏れ出しやすくなるなど、リポソームが不安定化してしまうが、分散剤はそのような不安定化を抑制することができ、単胞リポソームの形成効率および薬剤の内包率の向上に寄与する。また、W1/O/W2エマルジョンの界面に分散剤が配向すれば、溶媒の除去にともないリポソームが形成されてゆく際に個々のリポソームが解けやすくなり、やはり単胞リポソームの形成効率および薬剤の内包率の向上に寄与する。特許文献2および特許文献3は、こうした効果を有する分散剤を使用していないために、均一なナノサイズの単胞リポソームを得ることができず、多胞リポソームが得られているものと推測される。

【0046】

なお、分散剤は上記のようにリポソーム形成の際に所定の機能を果たすが、水和能を持

10

20

30

40

50

つリン脂質を中心として構成される混合脂質成分は自己組織能力を有するため、リポソーム形成後は分散剤がなくても分散状態を維持することができる。

【 0 0 4 7 】

本発明で用いることのできる分散剤としては、代表的には、タンパク質、多糖類および非イオン性界面活性剤が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、分散剤としての所定の機能を有するその他の物質を用いてもよい。なお、分散剤がこれまでに医薬品等における添加物として認可されている（体内に投与しても人体に重大な影響を及ぼさないことが保証されている）物質であれば、濾過工程によっても一部がリポソーム分散液中に残存したとしても臨床上実質的な問題はない。

【 0 0 4 8 】

上記タンパク質としては、たとえばゼラチン（コラーゲンを加熱により変性させた可溶性のタンパク質）やアルブミンが挙げられる。ゼラチンは通常、数千～数百万の分子量分布を有するが、たとえば重量平均分子量が5千～10万であるものが好ましい。医療用ないし食品用として市販されているゼラチンを用いることができる。アルブミンには、卵アルブミン（分子量約45000）、血清アルブミン（分子量約66000...ウシ血清アルブミン）、乳アルブミン（分子量約14000...ラクトアルブミン）などが含まれ、たとえば卵アルブミンである乾燥脱糖卵白が好ましい。

【 0 0 4 9 】

上記多糖類としては、デキストラン、デンプン、グリコーゲン、アガロース、ペクチン、キトサン、カルボキシメチルセルロースナトリウム、キサントガム、ローカストビーンガム、グァーガムなどが挙げられ、たとえば重量平均分子量が1万～10万のデキストランが好ましい。

【 0 0 5 0 】

また、上記非イオン性界面活性剤は、水中で解離しない水酸基やエーテル結合などを親水基として持っている界面活性剤である。非イオン性界面活性剤は、大きくポリアルキレングリコール系と、多価アルコール系の二つに分類され、前者の代表例としては「プルロニック F-68」（BASF、ポリオキシエチレン（160）ポリオキシプロピレン（30）グリコール、数平均分子量9600）などの製品や、重量平均分子量が1000～8000のポリエチレングリコールなどが挙げられる。ポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールの共重合体として開発されたプルロニック型非イオン性界面活性剤にはその重合度により多くの種類が存在し、プルロニックと総称されている。前者の代表例としては「Tween 80」（東京化成工業株式会社、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレアート、分子量1309.68）が挙げられる、前者と同じポリアルキレングリコール系化合物にグリセリンやソルビタンと言った水酸基を有する化合物を反応して得られた界面活性剤である。こちらもその重合度により多くの種類が知られている。

【 0 0 5 1 】

分散剤が外水相中で自己による分子集合体を形成しているか否か、または形成されている分子集合体の体積平均粒径が10nm以下であるかどうか（つまり、外水相に添加した物質が分散剤としての要件を満たしているか否か）は、たとえば動的光散乱式の粒度分布計や、透過型電子顕微鏡（TEM）を用いた凍結断面法などにより確認することが可能である。

【 0 0 5 2 】

分散剤の外水相への添加量（分散剤の濃度）は、種類に応じて適切な範囲で調整すればよい。ある濃度で自己による分子集合体（体積平均粒径が10nmを超えるもの）を形成する物質を分散剤として添加する場合、添加量はその濃度に達しない範囲で調節される。また、分散剤の種類によっては、濃度が高すぎると粒度分布計による測定に支障をきたすこともあるので、そのような支障をきたさない低めの範囲で濃度を調整することが好ましい。例えば、分散剤として上述のPluronic F-68、カゼイン等を用いる場合、外水相として用いられる水性溶媒（W2）における分散剤の好適な濃度は、0.0001～5%であり、好ましくは0.001～0.5%であり、さらに好ましくは0.01～0.1%であ

10

20

30

40

50

る。

【0053】

リポソームと分散剤を濾過工程により分離することを考慮すれば、分散剤の自己による分子集合体ないしそれらの集合物の体積平均粒径はリポソームの体積平均粒径の1/10以下が好ましく、1/100以下がより好ましい。

【0054】

分散剤の分子量は、小さすぎると脂質膜中に混入しやすくなってリポソームの形成を阻害するおそれがあり、逆に大きすぎるとW1/O/W2エマルジョンの外水相中への分散や界面への配向の速度が遅れてリポソームの合一や多胞リポソームの形成につながるおそれがある。そのため、分散剤の重量平均分子量は1,000~100,000の範囲内にあることが好ましい。

10

【0055】

〔孔膜〕

本発明で用いる孔膜は、本発明に係るW1/O/W2エマルジョンの製造方法における二次乳化工程において、W1/Oエマルジョンを水性溶媒(W2)中に分散させてW1/O/W2エマルジョンを形成させる目的で用いられる。本発明における孔膜は、W1/Oエマルジョンからなる液滴が孔膜表面に沿って広がることなく確実に孔膜から分離して水性溶媒(W2)中に分散できるよう、水性溶媒(W2)に濡れやすい表面を有している。

【0056】

具体的には、本発明における孔膜は、空気中での水との接触角が0°以上42°以下になるよう親水性薬剤による表面処理が施されている。本発明における孔膜は、典型的には、原料となる孔膜(以下、「基礎孔膜」と、この基礎孔膜の表面を覆う親水性薬剤由来の親水性表面処理層とを有し、且つ、表面における空気中での水との接触角が0°以上42°以下である構造を有している。

20

【0057】

本発明における孔膜は、空気中での水との接触角が小さいほど、水性溶媒(W2)に濡れやすくなり、また、通常の場合、有機溶媒(O)に濡れにくくなる。そのため、空気中での水との接触角が小さいほど、W1/Oエマルジョンからなる液滴が孔膜表面に沿って拡大することなく孔膜から分離しやすくなり、水性溶媒(W2)中に分散しやすくなる。そのため、本発明で用いられる孔膜は、空気中での水との接触角が0°以上42°以下、好ましくは0~40°、より好ましくは0~35°になるよう親水性薬剤による表面処理が施されている孔膜である。

30

【0058】

また、本発明における孔膜は、W1/Oエマルジョンを水性溶媒(W2)中に分散させてW1/O/W2エマルジョンを形成させるために用いられるが、孔膜表面の材質及び構造によっては、使用前においては十分な親水性を有していても、使用するにつれてW1/Oエマルジョンに含まれる諸成分が表面に付着し、親水性が経時劣化することがある。例えば、プラズマによる表面処理のみを行ったシリコン製のマイクロチャンネルを孔膜として用いる場合、空気中での水との接触角は、酸処理を行った直後では30°程度であるが、W1/O/W2エマルジョン形成に用いると、汚れの付着により3時間程度で70~80°程度にまで増大することがある。また、シラス多孔質ガラス膜などの多孔質ガラス製の多孔質膜を孔膜として用いる場合、空気中での水との接触角は、酸処理を行った直後では25°程度であるが、使用により汚れの付着が進行すると80°前後にまで増大することがある。このような汚れの付着による接触角の増大は、水道水に浸漬しただけでも生じる傾向にある。このような現象が生じると、孔膜が水性溶媒(W2)に濡れにくくなるとともに、W1/Oエマルジョンからなる液滴が孔膜表面に沿って拡大しやすくなり、その結果、液滴が孔膜から水性溶媒(W2)中に分離しにくくなる。この点を考慮すると、本発明に用いる孔膜では、使用前における空気中での水との接触角のみならず、一定時間(数週間程度)使用後における空気中での水との接触角もまた上記の角度であるような表面処理がなされていることが望ましい。すなわち、本発明で用いられる好適な孔膜は、使用前

40

50

における空気中での水との接触角のみならず、使用後における空気中での水との接触角もまた 0° 以上 42° 以下、好ましくは $0 \sim 40^\circ$ 、より好ましくは $0 \sim 35^\circ$ であるような表面処理が施されている孔膜である。

【0059】

本発明における「接触角」は、実際に $W1/O/W2$ エマルション形成に使用する孔膜と同じ材質の平面基板、すなわち、実際に使用する孔膜を構成する基礎孔膜と同じ材質の基板に対して、実際に使用する孔膜を作成したときと同様の親水性薬剤を用いた表面処理を施すことにより得られる等価表面処理基板における、空気中での水との接触角を θ 法などの方法により測定することによって評価することができる。

【0060】

本発明で用いる孔膜は、その態様が特に限定されるものではないが、典型的には、シラス多孔質ガラス膜（以下、「SPG膜」）またはマイクロチャネル基板の態様で用いられる。

【0061】

また、本発明の孔膜における孔の大きさは、形成しようとする $W1/O/W2$ エマルションのサイズに応じて適宜調整することができる。例えば、孔膜としてマイクロチャネル基板が用いられる場合にはマイクロチャネル基板のテラス長、チャネル深さおよびチャネル幅を、SPG膜が用いられる場合にはSPG膜の細孔径を、それぞれ形成しようとする $W1/O/W2$ エマルションのサイズに応じて適宜調整することができる。たとえばSPG膜の細孔径は通常は $0.1 \sim 100 \mu\text{m}$ である。

【0062】

基礎孔膜

本明細書において「基礎孔膜」は、本発明の孔膜の原料となる孔膜、すなわち、本発明の孔膜の基材となる孔膜である。この基礎孔膜は、本発明の孔膜の骨格構造を構成するものである。本発明において基礎孔膜として用いることのできる孔膜は、所要の孔の大きさを有し、かつ親水性薬剤による表面処理によっても孔膜としての機能を損なわない限り、特に限定されることはない。ただ、従来公知の $W1/O/W2$ エマルションの製造方法において広く用いられている点から、本発明で用いられる基礎孔膜として、通常、シラス多孔質ガラス膜（以下、「SPG膜」）などの多孔質ガラス膜、並びに、シリコン、樹脂、金属などの素材で作成されたマイクロチャネル基板が挙げられる。ここで、マイクロチャネル基板として用いることができる樹脂として、アクリル系樹脂、シクロオレフィン系樹脂、スチレン系樹脂、アクリル・スチレン系共重合体、ポリカーボネート系樹脂、ポリエチレンテレフタレート等のポリエステル系樹脂、エチレン・ビニルアルコール共重合体、オレフィン系・スチレン系・ウレタン系等の熱可塑性エラストマー、塩化ビニル系樹脂、フッ素系樹脂、ポリジメチルシロキサン等のシリコン系樹脂等の熱可塑性樹脂、エポキシ系樹脂、フェノール系樹脂、ウレタン系樹脂、不飽和ポリエステル系樹脂等の熱硬化性樹脂、多官能アクリル系樹脂等の光硬化性樹脂などが挙げられる。また、マイクロチャネル基板として用いることができる金属として、ニッケル、白金、銀、金、銅、アルミニウムなどが挙げられる。

【0063】

親水性薬剤

本発明において「親水性薬剤」は、孔膜表面の親水性を高めるために用いられる。この親水性薬剤は、上記基礎孔膜が有する孔膜としての機能を損なうことなく、且つ、その表面の親水性を向上させることができるものであれば、特にその種類が限定されるものではない。「親水性薬剤」は、上記基礎孔膜に表面処理を行ったときに、空気中での水との接触角が 0° 以上 42° 以下、好ましくは $0 \sim 40^\circ$ 、より好ましくは $0 \sim 35^\circ$ である親水性表面を孔膜に形成する薬剤である。

【0064】

さらに、「親水性薬剤」は、使用による親水性の経時劣化が少ない親水性表面を孔膜上に形成することのできる薬剤であることがより好ましく、数週間程度経過後も、表面にお

10

20

30

40

50

ける空気中での水との接触角が上記範囲、すなわち 0° 以上 42° 以下、好ましくは $0 \sim 40^\circ$ 、より好ましくは $0 \sim 35^\circ$ を維持できる孔膜を与えることのできる薬剤であることが好ましい。

【0065】

また、本発明で用いる孔膜は、W1/Oエマルションの乳化処理を行う条件下で、表面処理による親水性が消失しないことが望ましい。その点から、親水性薬剤は、上記基礎孔膜表面の官能基と化学結合を形成できるような官能基を有する親水性分子であるか、あるいは、親水性構造を有する不溶性塗布膜を基礎孔膜表面に形成するような薬剤であることが望ましい。このような親水性薬剤は、一分子中に親水性構造と上記基礎孔膜表面に結合する構造とを有する薬剤であってもよいし、あるいは、親水性構造を有する薬剤と上記基礎孔膜表面に結合する構造を有する薬剤との組み合わせであってもよい。

10

【0066】

基礎孔膜表面の官能基と化学結合を形成できるような官能基を有する親水性分子（以下、「親水性分子」ともいう。）の典型例として、表面に親水性基を有するシランカップリング剤が挙げられる。本発明における好適な実施態様では、このようなシランカップリング剤として、非イオン性の親水性基と陽イオン性の親水性基とのうち少なくともともいづれか一方を有するシランカップリング剤、具体的には、親水性基として、ポリオール構造、ポリエーテル構造、ポリアミン構造、3級アミン構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともともいづれか1つを有するシランカップリング剤が用いられる。これらのうち、ポリオール構造およびポリエーテル構造は、非イオン性の親水性基に包含される。また、ポリアミン構造、3級アミン構造および4級アンモニウム構造は、それぞれ対応するアンモニウム型の構造をとることで陽イオン性の親水性基として機能する。このようなシランカップリング剤の例として、N-(3-トリエトキシシリルプロピル)グルコンアミドに代表される、糖類縁体構造を有するシランカップリング剤；ポリエチレングリコール構造を有するシランカップリング剤；Gelest社からカタログ番号SSP-060で販売されているトリメトキシシリルプロピル修飾ポリエチレンイミンに代表される、ポリエチレンイミン構造を有するシランカップリング剤；N-トリメトキシシリルプロピル-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリドに代表される、トリメチルアンモニオ基などの低級アルキルアンモニウム構造を有するシランカップリング剤；ジエタノールアミノ基などの低級ヒドロキシアルキルアミン構造を有するシランカップリング剤が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0067】

また、本発明の典型的な実施態様において、「表面に親水性基を有するシランカップリング剤」は、上記親水性基を含む親水性部分と、基礎孔膜表面に存在する官能基と結合可能な珪素系官能基を含む反応性官能基部分とを有し、この親水性部分と反応性官能基部分とが、直接的に、あるいは適当な鎖長のスペーサー部分を介して間接的に結合している構造を有している。

【0068】

ここで、「糖類縁体構造を有するシランカップリング剤」は、「ポリオール構造を有するシランカップリング剤」の好適な例として挙げられるものである。この「糖類縁体構造を有するシランカップリング剤」においては、糖由来のポリオール部分が、親水性基として機能する。このような「糖類縁体構造を有するシランカップリング剤」の好適な例として、糖を酸化して得られるカルボン酸を構成するカルボキシル基が、アミド結合又はエステル結合を介して反応性官能基部分またはスペーサー部分と結合してなるものが挙げられ、このとき用いられる「糖を酸化して得られるカルボン酸」の例として、グルコン酸などのアルドン酸、グルクロン酸などのウロン酸が挙げられる。ただ、「糖類縁体構造を有するシランカップリング剤」は、これらに限られるものではなく、例えば、糖由来のポリオール部分と、反応性官能基部分またはスペーサー部分とが炭素-炭素結合など他の種類の結合によって結合しているものであっても良い。また、親水性を損なわず、W/O/Wエマルションの形成を妨げず、また上記内包対象物質の損失を引き起こさない限り、糖由来

40

50

のポリオール部分を構成する水酸基の一部が、修飾されていても良いし、あるいは他の官能基で置換されていても良い。さらに、ポリオール部分の骨格を構成する糖についても、当該ポリオール部分全体としての親水性を損なわない限り単糖に限られるものではなく、二糖以上であってもよく、例えばオリゴ糖であっても良い。このように「ポリオール構造を有するシランカップリング剤」の好適な例として、「糖類縁体構造を有するシランカップリング剤」を挙げたが、脂環式ポリオールなど糖類縁体ではないポリオールに由来するポリオール構造を有するシランカップリング剤を、「ポリオール構造を有するシランカップリング剤」として用いても良い。

【0069】

また、「陽イオン性の親水性基を有するシランカップリング剤」について、陽イオン性の親水性基として機能する親水性基の例として挙げた3級アミン構造および4級アンモニウム構造について補足すると、3級以下のアミンでは、酸塩基平衡により、遊離アミン型の構造を有するものと、その共役酸であるアンモニウム型の構造を有するものとが一定の割合をもって存在する。ここで、3級アミン構造は、対応するアンモニウム型の構造をとることで陽イオン性の親水性基として機能するのである。ただ、アミン全体におけるアンモニウム型の構造を有するアミンの比率は、溶媒の液性、並びに中心窒素原子に結合している置換基の電子的性質および親水性によって左右される場合がある。同様のことは、ポリアミン構造についても当てはまる。一方、4級アンモニウム塩は、狭義のアンモニウム(NH_4^+)を構成する水素原子が4つともアルキル基などの置換基により置換されていることから、通常のW/O/Wエマルジョン形成条件下では周囲に存在する溶媒の液性にかかわらずアンモニウム型の構造を維持する。この観点からは、「表面に親水性基を有するシランカップリング剤」における親水性基の例として挙げられる3級アミン構造および4級アンモニウム構造の中では、4級アンモニウム構造が特に好ましい。ただ、アンモニウム型の構造による親水性は、その中心窒素原子に結合する置換基によっても影響を受けうることから、中心窒素原子に結合する置換基には、シランカップリング剤として機能するために必要な官能基を除いて、可能な限り親水性を損ねるような官能基を存在させないことが好ましい。その意味で、陽イオン性の親水性基を有するシランカップリング剤の特に好適な例として、中心窒素原子と結合している置換基の1つが、基礎孔膜表面に存在する官能基と結合可能な珪素系官能基を含む反応性官能基部分を有するアルキル基であり、残りの3つの置換基が、メチル基、エチル基などの低級アルキル基であるような4級アンモニウム構造を有するシランカップリング剤が挙げられる。

【0070】

このような親水性分子は、重合反応可能な不飽和二重結合部分を有するシランカップリング剤と、重合反応可能な不飽和二重結合部分を有する親水性化合物とを共重合させることによって形成させてもよく、例えば、(3-トリメトキシシリルプロピル)メタクリレートなどの(メタ)アクリレート系シランカップリング剤またはp-(トリメトキシシリル)スチレンなどのスチレン系シランカップリング剤を、ポリエーテル基を有する(メタ)アクリレートモノマー(例えば、日油株式会社からブレンマー(登録商標)PME-400で販売されているメトキシポリエチレングリコール-メタクリレート)など親水性基を有するモノマーと共重合して得られる共重合体型の親水性分子であってもよい。

【0071】

より好適な実施態様において、シランカップリング剤に含まれる親水性基は、非イオン性の親水性基と陽イオン性の親水性基とのうち少なくともいずれか一方であり、特に好ましくは、ポリオール構造、ポリエーテル構造、ポリアミン構造、3級アミン構造および4級アンモニウム構造のうち少なくともいずれか1つである。

【0072】

これらのような親水性分子を親水性薬剤として用いると、基礎孔膜表面に、容易に単分子層の形で親水性表面処理層を形成することができるので、本発明の孔膜として、もとの基礎孔膜に設けられた孔とほとんど大きさの変わらない孔を有する孔膜を得ることができる利点がある。これらの親水性分子は、1種単独で用いてもよく、また2種以上を組み合

10

20

30

40

50

わせてもよい。

【0073】

また、親水性構造を有する不溶性塗布膜を基礎孔膜表面に形成するような薬剤（以下、「親水性塗布膜形成剤」ともいう。）としては、基礎孔膜表面にシリカ等の親水性無機化合物からなる層を形成可能な化合物が挙げられる。このうち、本発明においては、化学的に安定であり、且つ、基礎孔膜表面に形成される親水性構造がW1/Oエマルションを構成する成分を変質させない点から、通常、シリカからなる親水性層を形成可能な化合物が用いられる。このような化合物として、テトラアルキルシラン、ハロゲン化珪素、ポリシラザンなどのシリカ前駆体モノマーが挙げられる。ここで、テトラアルキルシランの例としては、テトラエトキシシラン等の低級アルキルシランが挙げられる。

10

【0074】

本発明で用いる親水性塗布膜形成剤は、シリカからなる親水性層を形成可能な化合物に限られず、例えば、チタニアからなる親水性層を形成可能な化合物であってもよい。そのような化合物として、テトラアルキルチタン、ハロゲン化チタンなどのチタニア前駆体モノマーが挙げられる。さらに、親水性塗布膜形成剤は、これらの親水性無機化合物からなる層を形成可能な化合物に限定されるものではなく、フッ素系のポリマー被膜、PEG、MPC（ホスファチジルコリン）等の親水性構造を表面にグラフトした構造を形成可能な化合物であってもよい。

【0075】

これらの親水性塗布膜形成剤は、1種単独で用いてもよく、また2種以上を組み合わせてもよい。

20

【0076】

これらのような親水性塗布膜形成剤を親水性薬剤として用いると、基礎孔膜表面に安定性の高い親水性表面処理層を形成することができる利点がある。ただし、不溶性塗布膜の形成条件によっては基礎孔膜に設けられた孔の表面に形成した親水性表面処理層の厚さが大きくなる場合があることから、親水性表面処理層の厚さによる孔の縮小分を考慮して、得られる孔膜における孔が所要の大きさを有するよう、基礎孔膜に形成しておく孔を予め大きめに設定する必要がある場合がある。

【0077】

本発明で用いる親水性薬剤として、上記「親水性分子」と上記「親水性塗布膜形成剤」とは、いずれか一方のみを用いてもよいし、二者を組み合わせ用いてもよい。

30

【0078】

表面処理

本発明で用いる孔膜は、上記基礎孔膜に対して、空気中での水との接触角が所定の角度となるように、上記親水性薬剤による表面処理を適宜施すことによって得ることができる。例えば、SPG膜やマイクロチャネル基板の形態を有する孔膜は、基礎孔膜である原料SPG膜や原料マイクロチャネル基板に対して、親水性薬剤による表面処理を施すことにより、それぞれ得ることができる。

【0079】

例えば、親水性薬剤として上記「親水性分子」を用いる場合、必要に応じてプラズマ処理等により上記基礎孔膜に反応性官能基を導入した後、必要に応じてエタノール等の適当な溶媒に希釈した「親水性分子」を当該基礎孔膜と反応させることにより表面処理を行うことができる。

40

【0080】

ここで、この親水性分子が、重合反応可能な不飽和二重結合部分を有するシランカップリング剤と、重合反応可能な不飽和二重結合部分を有する親水性化合物とを共重合させることによって形成される場合には、まず、(i)必要に応じてプラズマ処理等により基礎孔膜に反応性官能基を導入し、(ii)必要に応じてエタノール等の適当な溶媒に希釈した「重合反応可能な不飽和二重結合部分を有するシランカップリング剤」を当該基礎孔膜と反応させることによって、不飽和二重結合性官能基を基礎孔膜に導入し、その後、(iii)「重

50

合反応可能な不飽和二重結合部分を有する親水性化合物」との共重合反応を行うことにより、親水性官能基をさらに導入することにより表面処理を行うことができる。

【0081】

親水性薬剤として上記「親水性塗布膜形成剤」を用いる場合、必要に応じてプラズマ処理等により上記基礎孔膜に反応性官能基を導入した後、当該基礎孔膜を直接「親水性塗布膜形成剤」で処理することにより表面処理を行うことができる。また、「親水性塗布膜形成剤」による表面処理は、基礎孔膜の表面に適当なバインダー層を形成しておいてから、このバインダー層に対して「親水性塗布膜形成剤」による表面処理を施すことによって行ってもよい。

【0082】

〔W1/O/W2エマルションの製造方法〕

本発明の実施の形態に係るW1/O/W2エマルションの製造方法は、下記工程(1)~(2)を有する。

【0083】

(1)一次乳化工程

一次乳化工程は、有機溶媒(O)、水性溶媒(W1)、および混合脂質成分(F1)を乳化することにより、W1/Oエマルションを調製する工程である。

【0084】

W1/Oエマルションの調製方法は特に限定されるものではなく、超音波乳化機、攪拌乳化機、膜乳化機、高圧ホモジナイザーなどの装置を用いて行うことができる。膜乳化では、あらかじめ大きな粒径のW1/Oエマルションを調製した後に、孔径の小さな膜を通過させることでより小さな粒径のW1/Oエマルションを調製するようなプレミックス膜乳化法を用いてもよい。

【0085】

水性溶媒(W1)のpHは通常3~10の範囲であり、混合脂質成分に応じて好ましい範囲に調整することができる。たとえば、混合脂質成分にオレイン酸を用いる場合、pHは6~8.5とすることが好ましい。pHの調整には適切な緩衝液を用いればよい。

【0086】

一次乳化工程における、W1/Oエマルションの平均粒子径、有機溶媒(O)に添加する混合脂質成分(F1)の割合、有機溶媒(O)と水性溶媒(W1)の体積比、その他の操作条件は、続く二次乳化工程の条件や最終的に調製するリポソームの態様などを考慮しながら、採用する乳化方法に応じて適宜調整することができる。通常、混合脂質成分(F1)の割合は有機溶媒(O)に対して1~50質量%であり、有機溶媒(O)と水性溶媒(W1)の体積比は100:1~1:2である。

【0087】

なお、リポソームに水溶性薬剤類を内包させるために、(i)一次乳化工程の水性溶媒(W1)に水溶性薬剤類をあらかじめ溶解または懸濁させておき、二次乳化工程終了時点でそれを内包するリポソームが得られるようにする方法、(ii)水溶性薬剤類を内包しない(空の)リポソームを得た後に、そのリポソームの分散液に水溶性薬剤類を添加し、あるいは一旦凍結乾燥粉末化したものを水性溶媒に再分散させる際に水溶性薬剤類を添加し、攪拌するなどして、リポソームにそれを取り込ませる方法、いずれを用いることもできる。脂溶性薬剤類についても、上記(i)のように一次乳化工程の時点であらかじめ添加しておくか、上記(ii)のように空のリポソームを得た後に添加することにより、リポソームに内包させることができる。

【0088】

(2)二次乳化工程

二次乳化工程は、上記工程(1)により得られたW1/Oエマルションを、上記孔膜を用いて水性溶媒(W2)中に分散させることにより、W1/O/W2エマルションを調製する工程である。

【0089】

10

20

30

40

50

この二次乳化工程において、分散剤を含有する外水相を用いることが望ましい。この場合、通常は、外水相をなす水性溶媒（W2）と分散剤とを混合して外水相を先に調製しておき、そこにW1/Oエマルションを分散させるようにする。

【0090】

二次乳化工程でW1/O/W2エマルションを調製するための方法として、上記孔膜を用いた膜乳化法（マイクロチャネル乳化法、SPG膜を用いた乳化法など）が挙げられる。特に、マイクロチャネル乳化法およびSPG膜を用いた乳化法は、乳化処理に大きな機械的剪断力を必要としないため、乳化操作時の液滴の崩壊および液滴からの内包物質の漏出を抑えることができる観点から好適である。

【0091】

なお、膜乳化法では、あらかじめ大きな粒径のW1/O/W2エマルションを調製した後に、孔径の小さな膜を通過させることでより小さな粒径のW1/O/W2エマルションを調製するようなプレミックス膜乳化法（膜透過法）を用いてもよい。プレミックス膜乳化法は、必要とされるエネルギーが小さく、また処理量が多く、リポソームの調製を迅速化することができるため好適である。

【0092】

上記水性溶媒（W2）、W1/Oエマルション、分散剤および必要に応じて用いられる混合脂質成分（F2）の混合態様（添加順序等）は特に限定されるものではなく、適切な態様を選択すればよい。たとえばF2が主として水溶性脂質からなる場合、あらかじめそのようなF2および特定分散剤をW2に添加しておき、それにW1/Oエマルションを添加して乳化処理を行うことができる。一方、F2が主として脂溶性脂質からなる場合、あらかじめ（W1/Oエマルション調製後）そのようなF2をW1/Oエマルションの油相に添加しておき、それを特定分散剤が添加されているW2に添加して乳化処理を行うことができる。この場合における、水性溶媒（W2）ないしW1/Oエマルションの有機溶媒（O）に添加する混合脂質成分（F2）の割合は、最終的に調製するリポソームの用途などを考慮しながら適宜調節することができる。

【0093】

二次乳化工程における、W1/O/W2エマルションの体積平均粒子径、水性溶媒（W2）の割合、W1/Oエマルションと水性溶媒（W2）の体積比、その他の操作条件は、最終的に調製するリポソームの用途などを考慮しながら適宜調節することができる。

【0094】

〔リポソームの製造方法〕

本発明のリポソームの製造方法は、上記工程（1）～（2）に加えて、さらに下記工程（3）を含み、必要に応じて工程（4）、（5）等、その他の工程を適宜組み合わせることができるものである。

【0095】

すなわち、本発明のリポソームの好ましい製造方法は、上記工程（1）～（2）を経て得られるW1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒（O）を除去することにより、リポソームを形成する工程を含んでいる。

【0096】

（3）溶媒除去工程

溶媒除去工程は、上記二次乳化工程（2）により得られたW1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒相（O）を除去し、リポソームを形成させる工程である。溶媒除去の方法としては、たとえばエバポレータで蒸発させる方法や液中乾燥法が挙げられる。

【0097】

液中乾燥法は、W1/O/W2エマルションを回収し、開放容器内に移して静置あるいは攪拌することで、W1/O/W2エマルションに含まれる有機溶媒（O）を蒸発除去する方法であり、このような操作により、混合脂質成分（F1）からなる脂質膜を内水相の周囲に形成し、リポソームの分散液を得ることができる。この際、さらに加温や減圧によって溶媒の留去を促進することができる。温度条件や減圧条件は、常法に従って、用い

10

20

30

40

50

る有機溶媒の種類などに応じて適宜調整すればよい。温度条件は、溶媒が突沸することのない範囲に設定され、たとえば0～60の範囲が好ましく、0～25がより好ましい。また、減圧条件は溶媒の飽和蒸気圧～大気圧の範囲内に設定されることが好ましく、溶媒の飽和蒸気圧の+1%～10%の範囲内に設定されることがより好ましい。異なる溶媒を混合して用いる場合、より飽和蒸気圧の高い溶媒種に合わせた条件が好ましい。これらの除去条件は、溶媒が突沸しない範囲で組み合わせてもよく、例えば、熱に弱い薬剤を使用する際は、より低温側でかつ減圧条件で溶媒を留去することが好ましい。また、溶媒除去の際にW1/O/W2エマルジョンを攪拌すれば、より均一に溶媒除去が進む。上記工程(2)において攪拌乳化法によりW1/O/W2エマルジョンを調製した後、攪拌をさらに継続して溶媒を除去するといったように、工程(2)および(3)を連続的に行うこともできる。

10

【0098】

ここで、本発明の製造方法により得られるリポソームには、W1/O/W2エマルジョン由来の多胞リポソームがある程度の割合含まれることがあるが、これを減じるために、攪拌または減圧、好ましくはそれらを組み合わせで行うことが効果的である。重要なのは、溶媒の大半が抜ける時間より長く減圧と攪拌を行なうことにある。このことによりリポソームを構成する脂質の水和が進み、多胞リポソームが解けて、単胞のリポソーム状態にばらばらになると考えている。また、本法で副生する、あるいは残存する多胞リポソームはその内部がW1/Oエマルジョン由来の粒子径の水滴を多く含む構造であるので、上述の減圧及び攪拌に加えて、あるいは上述の減圧及び攪拌に代えて、W1/Oエマルジョンの粒子径よりもわずかに大きな孔径のフィルターを通過させることで、W1/Oエマルジョン由来の粒子径と同程度の単胞リポソームへ変換することも可能である。さらに驚くべきことに、これらの操作をおこなっても内包物の漏出は起こらない。このような操作をしても残った多胞リポソームがある場合には、フィルターにより除去することもできる。

20

【0099】

以上のような製造方法(必要により後述する整粒工程を用いてもよい)により最終的に得られるリポソームの体積平均粒径は特に限定されるものではないが、医療用のリポソーム製剤として用いる場合は、好ましくは50～1,000nmであり、より好ましくは50～300nmである。このようなサイズのリポソームは、毛細血管を閉塞するおそれがほとんどなく、またがん組織近辺の血管にできる間隙を通過することもできるため、医薬品等として人体に投与されて使用する上で好都合である。たとえば粒子径が50～300nmの間にある値であるW1/Oエマルジョンを用いればその値と同程度の単胞リポソームを製造できることになる。

30

【0100】

(4)分離工程

分離工程は、分散剤とリポソームとを分離し、リポソーム分散液中から分散剤を除去するための工程である。たとえば、精密濾過膜(MF膜、孔径50nm～10 μ m程度)または限外濾過膜(UF膜、孔径2～200nm程度)を用いれば、リポソームと自己による分子集合体(たとえば体積平均粒径10nm以下)を形成した分散剤とを効率よく分離することができる。なお、製品の用途に鑑みて、分散剤とリポソームとを分離しなくとも問題がない場合には、この分離工程は設けなくともよい。

40

【0101】

(5)その他の工程

必要に応じて行われるその他の工程としては、たとえば整粒工程や乾燥粉末化工程が挙げられる。

【0102】

整粒工程により、調製されたリポソームの粒径を所望の範囲に調整することができる。たとえば、孔径0.1～0.4 μ mのポリカーボネート膜またはセルロース膜をフィルターとして装着した静圧式押し出し装置(日油リポソーム社製「エクストルーダー」、野村マイクロサイエンス社製「リポナイザー」など)を用いることにより、中心粒径が50～5

50

00nm程度のリポソームが効率よく得られる。上記「エクストルーダー」等を用いれば、W1/O/W2エマルジョンから副次的に形成された多胞リポソームをばらして単胞リポソームにすることができる。

【0103】

また、リポソームの分散液を凍結乾燥などにより乾燥粉末化し、使用するまでの間の保管に適した形態にすることも望ましい。凍結乾燥は従来のリポソームを製造する場合と同様の手段や装置を用いて行うことができる。たとえば、間接加熱凍結方法、冷媒直膨方法、熱媒循環方法、三重熱交換方法、重複冷凍方法などに従い、適切な条件下（温度：-120～-20、圧力：1～15Pa、時間：16～26時間など）で凍結乾燥を行えばよい。このようにして得られた凍結乾燥物を水中に投入すれば、再びリポソームの分散液を調製することができる。

10

【実施例】

【0104】

（粒度分布の測定方法）

以下に述べる実施例および比較例の一次乳化工程で得られたW1/Oエマルジョンの体積平均粒径およびCV値は、下記の方法に従って測定した。

【0105】

W1/Oエマルジョンをクロロホルム/ヘキサン混合溶媒（体積比：4/6、内水相と比重を同じくした）で10倍に希釈し、動的光散乱式ナノトラック粒度分析計（UPA-EX150、日機装株式会社）を用いて粒度分布を測定し、これに基づき体積平均粒径およびCV値（ $= (\text{標準偏差} / \text{体積平均粒径}) \times 100 [\%]$ ）を算出した。

20

【0106】

また、リポソームの体積平均粒径は、同装置を用いて、作製したリポソーム懸濁液をそのまま測定した。

【0107】

（乳化挙動の評価）

二次乳化工程でのW1/O/W2エマルジョンの乳化挙動を目視で評価した。

：通過孔からの分散相の連続流出は無く、きれいに液滴を形成し、形成後の合一も無く、安定だった。

：わずかながら分散相の連続流出が見られるものの、きれいに液滴を形成し、形成後の合一も無く、安定だった。

30

×：通過孔からの分散相の連続流出が発生し、W1/O/W2エマルジョンを形成できなかった。

【0108】

（内包率の評価）

実施例および比較例で得られたリポソームに内包された薬剤の内包率を、下記の方法に従って測定した。

【0109】

（i）カルセインの内包率の測定方法

リポソーム水溶液（3mL）全体の蛍光強度（ F_{total} ）を分光光度計（U-3310、日本分光株式会社）により測定した。次に0.01M、 $CoCl_2$ トリス塩酸緩衝液30 μ Lを加えて外水相に漏出したカルセインの蛍光を Co^{2+} により消光することで、リポソーム内の蛍光強度（ F_{in} ）を測定した。さらに、カルセインを加えないでサンプルと同じ条件でリポソームを作製し、脂質自身が発する蛍光（ F_l ）を測定した。内包率は下記式より算出した。

40

【0110】

$$\text{内包率 } E (\%) = (F_{in} - F_l) / (F_{total} - F_l) \times 100$$

（ii）シタラビンの内包率の測定方法

超遠心装置で固形分（リポソーム）を分離（デカント）し、上澄および固形分に含まれるシタラビンの量をそれぞれHPLCで定量した。HPLCカラムとしてVarian Polaris C18

50

-A (3 μm, 2 × 40 mm) を用いてアッセイされた。内包されていない当該化合物と内包されている当該化合物の絶対値から、シタラピンの内包率を算出した。

【 0 1 1 1 】

(多胞リポソームの観察方法)

くぼみのあるスライドガラスを用いてリポソーム水溶液 25 μL のプレパラートを作成し、正立顕微鏡 (Axio Imager . A 1、カールツァイス社製) の明視野条件で観察し、多胞リポソームの個数を測定した。

【 0 1 1 2 】

なお、以下においては、「孔膜」を「乳化膜」と、「内包対象物質」を「内包薬剤」とそれぞれ呼ぶ場合がある。

【 0 1 1 3 】

[調製例 1 : ポリシラザン処理 S P G 膜の調製]

S P G テクノ社から購入した直径 10 mm、長さ 20 mm、細孔径 10 μm の円筒形 S P G 膜を有機溶媒 (エタノールなど) により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、パーヒドロポリシラザン系処理液 (アクアミカ (登録商標) NL110A) でディップ処理し、50 で 5 分加熱乾燥させ、24 時間以上放置した。その後、純水で洗浄し、50 で 30 分加熱乾燥させることにより、ポリシラザン処理 S P G 膜を調製した。

【 0 1 1 4 】

[調製例 2 : グルコンアミド修飾 S P G 膜の調製]

S P G テクノ社から購入した直径 10 mm、長さ 20 mm、細孔径 10 μm の円筒形 S P G 膜を有機溶媒 (エタノールなど) により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、20 倍重量のエタノールで希釈した N - (3 - トリエトキシシリルプロピル) グルコンアミド液 (Gelest 社製 : カタログ番号 SIT8189.0) に浸漬させ、50 で 2 時間反応させ、その後、100 で 3 時間加熱乾燥させることにより、グルコンアミド修飾 S P G 膜を調製した。

【 0 1 1 5 】

[調製例 3 : グルコンアミド修飾マイクロチャネル基板の調製]

シリコン製のマイクロチャネル (テラス長約 60 μm、チャネル深さ約 11 μm およびチャネル幅は約 16 μm) に対して、まず、酸素プラズマによる表面処理を施し、さらに、酸処理を行った。なお、マイクロチャネルの酸処理は、希硝酸につけ置きすることにより行った。

【 0 1 1 6 】

このような前処理を行ったマイクロチャネルを、次いで、20 倍重量のエタノールで希釈した N - (3 - トリエトキシシリルプロピル) グルコンアミド液 (Gelest 社製 : カタログ番号 SIT8189.0) に浸漬させ、50 で 2 時間反応させた。その後、100 で 3 時間加熱乾燥させることにより、グルコンアミド修飾マイクロチャネルを調製した。

【 0 1 1 7 】

[調製例 4 : 4 級アンモニウム修飾 S P G 膜の調製]

S P G テクノ社から購入した直径 10 mm、長さ 20 mm、細孔径 10 μm の円筒形 S P G 膜を有機溶媒 (エタノールなど) により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、10 倍重量のエタノールで希釈した N - トリメトキシシリルプロピル - N , N , N - トリメチルアンモニウムクロリド液 (Gelest 社製 : カタログ番号 SIT8415.0 ; 50 % メタノール溶液) に浸漬させ、50 で 2 時間反応させ、その後、100 で 1 時間加熱乾燥させることにより、4 級アンモニウム修飾 S P G 膜を調製した。

【 0 1 1 8 】

[調製例 5 : エチレンジアミン三酢酸修飾 S P G 膜の調製]

S P G テクノ社から購入した直径 10 mm、長さ 20 mm、細孔径 10 μm の円筒形 S P G 膜を有機溶媒 (エタノールなど) により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、10 倍重量のエタノールで希釈した N - (トリメトキシシリルプロピル) エチレンジアミン三酢酸三ナトリウム液 (Gelest 社製 : カタログ番号 SIT8402.0 ; 45 % 水溶液) に浸漬

10

20

30

40

50

させ、50 で2時間反応させ、その後、100 で2時間加熱乾燥させることにより、エチレンジアミン三酢酸修飾SPG膜を調製した。

【0119】

[調製例6：ジオール修飾SPG膜の調製]

SPGテクノ社から購入した直径10mm、長さ20mm、細孔径10 μ mの円筒形SPG膜を有機溶媒(エタノールなど)により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、10倍重量のエタノールで希釈したビス(2-ヒドロキシエチル)-3-アミノプロピル-トリエトキシシラン液(Gelest社製：カタログ番号SIB1140.0；62%エタノール溶液)に浸漬させ、50 で2時間反応させ、その後、100 で1時間加熱乾燥させることにより、ジオール修飾SPG膜を調製した。

10

【0120】

[調製例7：ジシリル修飾SPG膜の調製]

SPGテクノ社から購入した直径10mm、長さ20mm、細孔径10 μ mの円筒形SPG膜を有機溶媒(エタノールなど)により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、20倍重量のエタノールで希釈したビス(トリエトキシシリル)エタン(Gelest社製：カタログ番号SIB1817.0)に浸漬させ、50 で2時間反応させ、その後、100 で1時間加熱乾燥させることにより、ジシリル修飾SPG膜を調製した。

【0121】

[調製例8：オクタデシル修飾SPG膜の調製]

SPGテクノ社から購入した直径10mm、長さ20mm、細孔径10 μ mの円筒形SPG膜を有機溶媒(エタノールなど)により脱脂、超純水にて洗浄および乾燥させた後、オクタデシルトリエトキシシランのヘキサン溶液に浸漬させ、室温で2時間反応させ、その後、加熱乾燥でヘキサンを揮発させることにより、オクタデシル修飾SPG膜を調製した。

20

【0122】

[調製例9：オクタデシル修飾マイクロチャネル基板の調製]

シリコン製のマイクロチャネル(テラス長約60 μ m、チャネル深さ約11 μ mおよびチャネル幅は約16 μ m)に対して、まず、酸素プラズマによる表面処理を施し、さらに、酸処理を行った。なお、マイクロチャネルの酸処理は、希硝酸につけ置きすることにより行った。

30

【0123】

このような前処理を行ったマイクロチャネルを、次いで、オクタデシルトリエトキシシランのヘキサン溶液に浸漬させ、室温で2時間反応させ、その後、加熱乾燥でヘキサンを揮発させることにより、オクタデシル修飾マイクロチャネル基板を調製した。

【0124】

[実施例1]

(一次乳化工程によるW1/Oエマルションの製造)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社)1.5g、およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)0.25gを含む混合溶媒(ヘキサン/ジクロロメタン=7/3)15mLを有機溶媒相(O)とし、カルセイン(0.4mM)を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)5mLを内水相用の水分散相(W1)とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置(UH-600S、株式会社エスエムテ)により、25にて15分間超音波を照射し(出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約190nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は33%であった。

40

【0125】

(二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造)

上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相として、SPG乳化法

50

によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。SPG膜乳化装置（SPGテクノ社製、商品名「外圧式マイクロキット」）に、上記調製例1で調製したポリシラザン処理SPG膜を接続し、装置出口側に外水相溶液（W2）である0.1%のプルロニックF68を含むトリス-塩酸緩衝液（pH7.4、50mmol/L）を満たしておき、装置入口側から上記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションを製造した。

【0126】

このとき、SPG膜より連続流出などは起こらず、きれいに液滴が形成され、乳化後もこのエマルションは安定であった。

【0127】

（有機溶媒相の除去によるリポソームの製造）

上記二次乳化工程により得られたW1/O/W2エマルションを密閉容器に移し替え、500mbarの減圧室温条件下で約4時間攪拌し、次いで180mbarの減圧室温条件下で約18時間攪拌し、溶媒を揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。得られたリポソームの室温下での平均粒径は188nmだった。リポソームのカルセイン内包率を表1に示す。

【0128】

[実施例2]

卵黄レシチン「COATSOME NC-50」の代わりにジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）を用いることを除いては、実施例1と同様にリポソームを作製した。この過程で、W1/O/W2エマルションの乳化挙動は良好で、SPG膜からの連続流出は無く、きれいに液滴が形成された。また、得られたリポソームの室温下での平均粒径は202nmだった。リポソームのカルセイン内包率を表1に示す。

【0129】

[実施例3]

二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造において、ポリシラザン処理SPG膜の代わりに上記調製例2で調製したグルコンアミド修飾SPG膜を用いることを除いては、実施例1と同様にリポソームを作製した。

【0130】

このとき、SPG膜より連続流出などは起こらず、きれいに液滴が形成され、乳化後もこのエマルションは安定であった。また、得られたリポソームの室温下での平均粒径は198nmだった。リポソームのカルセイン内包率を表1に示す。

【0131】

[実施例4]

卵黄レシチン「COATSOME NC-50」の代わりにジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）を用い、且つ二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造において、ポリシラザン処理SPG膜の代わりに上記調製例2で調製したグルコンアミド修飾SPG膜を用いることを除いては、実施例1と同様にリポソームを作製した。この過程で、W1/O/W2エマルションの乳化挙動は良好で、SPG膜からの連続流出は無く、きれいに液滴が形成された。また、得られたリポソームの室温下での平均粒径は175nmだった。リポソームのカルセイン内包率を表1に示す。

【0132】

[実施例5]

（一次乳化工程によるW1/Oエマルションの製造）

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」（日油株式会社）1.5g、およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）0.25gを含む混合溶媒（ヘキサン/ジクロロメタン=7/3）15mLを有機溶媒相（O）とし、カルセイン（0.4mM）を含むトリス-塩酸緩衝液（pH8、50mmol/L）5mLを内水相用の水分散相（W1）とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプロブをセットした超音波分散装置（UH-600S、株式会社エスエムテ）により、25にて15分間超音波を照射し（出力5.5）、乳化処理を行った。

10

20

30

40

50

上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約190nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は33%であった。

【0133】

(二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造)

続いて、上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相とし、実験用デッドエンド型マイクロチャネル乳化装置モジュールを使用して、マイクロチャネル乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。

【0134】

上記調製例3により調製されたグルコンアミド修飾マイクロチャネル基板にガラス板を圧着させてチャネルを形成し、このチャネルの出口側に外水相溶液(W2)である0.1%のプルロニックF68を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)を満たしておき、チャネルの入口側から前記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションを製造した。このとき、チャネルより連続流出などは起こらず、きれいに液滴が形成され、乳化後もこのエマルションは安定であった。

10

【0135】

(有機溶媒相の除去によるリポソームの製造)

次上記二次乳化工程により得られたW1/O/W2エマルションを密閉容器に移し替え、500mbarの減圧室温条件下で約4時間攪拌し、次いで180mbarの減圧室温条件下で約18時間攪拌し、溶媒を揮発させた。微細なリポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはカルセインが含まれていることが確認された。得られたリポソームの室温下での平均粒径は195nmであった。リポソームのカルセイン内包率を表1に示す。

20

【0136】

[実施例6~19]

表1に記載のように変更する以外は、実施例1と同様にして、リポソームを作製した。W/O/Wの乳化挙動及びリポソーム内包率を表1に示す。なお、実施例7~10, 13, 15における、ヘキサソククロホルムの混合比は7:3で実施した。

【0137】

ここで、実施例3, 4, 7, 8, 12, 13, 16においては上記調製例2で調製したグルコンアミド修飾SPG膜を、実施例5, 6, 9~11, 14, 15においては上記調製例3で調製したグルコンアミド修飾マイクロチャネル基板を、実施例17~19においては上記調製例4で調製した4級アンモニウム修飾SPG膜を、それぞれ乳化膜として使用した。

30

【0138】

[実施例20(プレミックス法)]

二次乳化工程によって得られたW1/O/W2エマルションについて、有機溶媒除去工程に先立ち、親水化処理されていないSPG膜を用いた膜処理を行ったことを除き、実施例13と同じ方法でリポソームを作製した。

【0139】

すなわち、実施例13で得られたW1/O/W2エマルションを分散相として、親水化処理されていないSPG膜を用い、装置出口側に外水相溶液(W2)である3%のカゼインナトリウムを含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)を満たしておき、装置入口側から上記W1/O/W2エマルションを供給して膜処理を行い、最終的なW1/O/W2エマルションを製造した。有機溶媒相の除去は実施例13と同様に実施した。

40

【0140】

得られたリポソームの平均粒径は199nmであり、カルセイン内包率は84%であった。また、W/O/W乳化挙動については、通過孔からの分散相の連続流出は無く、きれいに液滴を形成し、形成後の合流も無く、安定だった。

【0141】

50

[実施例 2 1 (シタラビン)]

(一次乳化工程による W 1 / O エマルションの製造)

ホスファチジルコリン含量が 9 5 % である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社製) 0 . 3 g、コレステロール (Chol) 0 . 1 5 2 g およびオレイン酸 (OA) 0 . 1 0 8 g を含む混合溶媒 (ヘキサン : ジクロロメタン = 8 : 2) 1 5 m L を有機溶媒相 (O) とし、シタラビン (4 m M) を含むトリス - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 4、5 0 m m o l / L) 5 m L を内水相用の水分散相 (W 1) とした。5 0 m L のビーカーにこれらの混合液を入れ、実施例 1 と同様の乳化処理を行った。得られた W 1 / O エマルションの室温下での平均粒径は 2 0 7 n m であった。

【 0 1 4 2 】

(二次乳化工程による W 1 / O / W 2 エマルションの製造)

上記一次乳化工程により得られた W 1 / O エマルションを分散相として、S P G 乳化法による W 1 / O / W 2 エマルションの製造を行った。S P G 膜乳化装置 (S P G テクノ社製、商品名「外圧式マイクロキット」) にグルコンアミド処理した直径 1 0 m m、長さ 2 0 m m、細孔径 1 0 . 0 μ m の円筒形 S P G 膜を用い、装置出口側に外水相溶液 (W 2) である 3 % のカゼインナトリウムを含むトリス - 塩酸緩衝液 (p H 7 . 4、5 0 m m o l / L) を満たしておき、装置入口側から上記 W 1 / O エマルションを供給して、W 1 / O / W 2 エマルションを製造した。

【 0 1 4 3 】

(有機溶媒相の除去によるリポソームの製造)

上記二次乳化工程により得られた W 1 / O / W 2 エマルションを密閉容器に移し替え、5 0 0 m b a r の減圧室温条件下で約 4 時間攪拌し、次いで 1 8 0 m b a r の減圧室温条件下で約 1 8 時間攪拌し、溶媒を揮発させた。微細なりポソーム粒子の懸濁液が得られ、この粒子内にはシタラビンが含まれていることが確認された。得られたリポソームの室温下での平均粒径は 2 1 2 n m、シタラビン内包率は 3 5 % であり、多胞リポソームは確認されなかった。

【 0 1 4 4 】

W / O / W 乳化挙動については、通過孔からの分散相の連続流出は無く、きれいに液滴を形成し、形成後の合一も無く、安定だった。

【 0 1 4 5 】

以上の実施例のいずれの場合も多胞リポソームは確認されなかった。

【 0 1 4 6 】

[比較例 1 ~ 9]

表 1 に記載のように変更する以外は、実施例 1 と同様にして、リポソームを作製した。W/O/W の乳化挙動及びリポソーム内包率を表 1 に示す。

【 0 1 4 7 】

比較例 1 ~ 3 においては上記調製例 5 で調製したエチレンジアミン三酢酸修飾 S P G 膜を、比較例 4 においては上記調製例 6 で調製したジオール修飾 S P G 膜を、比較例 5 においては上記調製例 7 で調製したジシリル修飾 S P G 膜を、比較例 6 および 8 においては上記調製例 8 で調製したオクタデシル修飾 S P G 膜を、比較例 7 および 9 においては上記調製例 9 で調製したオクタデシル修飾マイクロチャンネル基板を、それぞれ乳化膜として使用した。

【 0 1 4 8 】

なお、上記実施例および比較例 1 ~ 9 において、表 1 中「表面処理の種類」欄に記載の「ポリシラザン」は、ポリシラザンによる表面処理を行ったことを意味し、「グルコンアミド」、「4 級アンモニウム」、「エチレンジアミン三酢酸」、「ジオール」、「ジシリル」、および「オクタデシル」は、それぞれ、上記調製例 2 ~ 9 で上述したように、それぞれ、表面処理剤として、グルコンアミド構造を有するシランカップリング剤、4 級アンモニウム構造を有するシランカップリング剤、エチレンジアミン三酢酸構造を有するシランカップリング剤、ジオール構造を有するシランカップリング剤、ジシリル構造を有する

10

20

30

40

50

シランカップリング剤およびオクタデシルトリエトキシシランを用いて、SPG膜またはマイクロチャネルの表面処理を行ったことを意味する。また、乳化膜としてマイクロチャネルを用いた全ての実施例および比較例7, 9において、酸素プラズマによる表面処理を予め施してから前記表面処理剤による表面処理を施したマイクロチャネルを使用した。

【0149】

[比較例10]

(一次乳化工程によるW1/Oエマルションの製造)

ホスファチジルコリン含量が95%である卵黄レシチン「COATSOME NC-50」(日油株式会社)1.5g、およびジパルミトイルホスファチジルグリセロール(DPPG)0.25gを含む混合溶媒(ヘキサン/ジクロロメタン=7/3)15mLを有機溶媒相(O)とし、カルセイン(0.4mM)を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)5mLを内水相用の水分散相(W1)とした。50mLのビーカーにこれらの混合液を入れ、直径20mmのプローブをセットした超音波分散装置(UH-600S、株式会社エスエムテ)により、25にて15分間超音波を照射し(出力5.5)、乳化処理を行った。上記方法に従って測定したところ、この一次乳化工程で得られたW1/Oエマルションは体積平均粒径約190nmの単分散W/Oエマルションであることが確認され、CV値は33%であった。

10

【0150】

(二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造)

上記一次乳化工程により得られたW1/Oエマルションを分散相として、SPG乳化法によるW1/O/W2エマルションの製造を行った。SPG膜乳化装置(SPGテクノ社製、商品名「外圧式マイクロキット」)に直径10mm、長さ20mm、細孔径10μmの円筒形SPG膜を用い、装置出口側に外水相溶液(W2)である0.1%のプルロニックF68を含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4、50mmol/L)を満たしておき、装置入口側から上記W1/Oエマルションを供給して、W1/O/W2エマルションの製造を試みた。尚、SPG膜は特に表面処理などを行わずに使用した。

20

【0151】

このとき、どうしてもSPG膜より分散相が連続流出してしまい、うまくW1/O/W2エマルションを作製できなかった。

【0152】

[比較例11~15、19~20]

表1に記載のように変更する以外は、比較例1と同様にリポソームの作製を検討した。なお、比較例14,15における、ヘキサンとクロロホルムの混合比は7:3で実施した。いずれも二次乳化工程によるW1/O/W2エマルションの製造において、連続流出が発生し、うまくW1/O/W2エマルションを作製できなかった。

30

【0153】

なお、比較例11~20を通じて、特に指定のない限り、SPG膜については特に表面処理を行わないものを使用し、マイクロチャネルについては酸素プラズマによる表面処理のみを施したものを使用した。

【0154】

具体的には、比較例10, 11, 14, 17, 19においては、SPGテクノ社から購入した直径10mm、長さ20mm、細孔径10μmの円筒形SPG膜を、購入したままの状態に乳化膜として使用した。一方、比較例12, 13, 15, 16, 18, 20においては、シリコン製のマイクロチャネル(テラス長約60μm、チャネル深さ約11μmおよびチャネル幅は約16μm)に対して、まず、酸素プラズマによる表面処理を施し、さらに、酸処理を行ったほかには特段の表面処理を施さない状態のものを乳化膜として使用した。

40

【0155】

[比較例16~18]

表1に記載のように変更する以外は、比較例1と同様にリポソームの作製を検討した。

50

いずれも連続流出はないものの、乳化挙動がやや劣化し、内包率は本発明の対応する実施例 1 1、1 2、1 4 に対して、内包率が低下した。

【 0 1 5 6 】

[比較例 2 1]

二次乳化工程で用いる円筒形 S P G 膜として、S P G 膜乳化装置にグルコンアミド処理しないものを用いたことを除いては、上記実施例 2 0 と同じ方法でリポソームを作製した。得られたリポソームの平均粒径は 2 2 0 n m、カルセイン内包率は 6 6 % であり、多胞リポソームは確認されなかった。

【 0 1 5 7 】

W / O / W 乳化挙動については、きれいに液滴を形成し、形成後の合一も無く、安定だった一方で、わずかながら分散相の連続流出が見られた。

10

【 0 1 5 8 】

[比較例 2 2]

二次乳化工程で用いる円筒形 S P G 膜として、S P G 膜乳化装置にグルコンアミド処理しないものを用いたことを除いては、上記実施例 2 1 と同じ方法でリポソームを作製した。得られたリポソームの平均粒径は 2 0 2 n m、シタラピン内包率は 2 7 % であり、多胞リポソームは確認されなかった。

【 0 1 5 9 】

W / O / W 乳化挙動については、きれいに液滴を形成し、形成後の合一も無く、安定だった一方で、わずかながら分散相の連続流出が見られた。

20

【 0 1 6 0 】

以上の実施例および比較例についての結果を下記表 1 に示す。

【 0 1 6 1 】

【 表 1 - 1 】

< 表 1 (その 1) >

実施例	乳化膜	表面処理の種類	接触角(°) (表面処理直 後)	内包薬剤	脂質組成	油相溶媒	外水相分散剤	W/O/W エマルジョンの 膜処理	W/O/W 乳化挙動	リポソームへ の薬剤内包率 (%)
実施例1	SPG	ポリシラザン	17	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	80
実施例2	SPG	ポリシラザン	17	カルセイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	85
実施例3	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	85
実施例4	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	83
実施例5	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	84
実施例6	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	ブルロニック F68	なし	○	82
実施例7	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	ブルロニック F68	なし	○	82
実施例8	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	ブルロニック F68	なし	○	82
実施例9	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	ブルロニック F68	なし	○	83
実施例10	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	ブルロニック F68	なし	○	83
実施例11	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン	ブルロニック F68	なし	○	88
実施例12	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	○	88
実施例13	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	カゼイン Na	なし	○	87
実施例14	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	○	89
実施例15	マイクロチャネル	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロ ロホルム	カゼイン Na	なし	○	87
実施例16	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	精製ゼラチン	なし	○	80

【 0 1 6 2 】

10

20

30

40

50

【 表 1 - 2 】

< 表 1 (その2) >

	乳化膜	表面処理の種類	接触角(°) (表面処理直 後)	内包薬剤	脂質組成	油相溶媒	外水相分散剤	W/O/W エマルジョンの 膜処理	W/O/W 乳化挙動	リポソームへ の薬剤内包率 (%)
実施例17	SPG	4級アンモニウム	42	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	○	85
実施例18	SPG	4級アンモニウム	42	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	精製ゼラチン	なし	○	83
実施例19	SPG	4級アンモニウム	42	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	○	85
実施例20	SPG	グルコンアミド	35	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロロ ホルム	カゼイン Na	あり	○	84
実施例21	SPG	グルコンアミド	35	シタラビン	卵黄レシチン /Chol/オレイン酸	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	○	35
比較例1	SPG	エチレンジアミン三 酢酸	43	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	△	49
比較例2	SPG	エチレンジアミン三 酢酸	43	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	精製ゼラチン	なし	×	44
比較例3	SPG	エチレンジアミン三 酢酸	43	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	△	70
比較例4	SPG	ジオール	51	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	△	41
比較例5	SPG	ジニリル	80	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	×	-
比較例6	SPG	オクタデシル	126	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	×	-
比較例7	マイクロチャネル	オクタデシル	126	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニック F68	なし	×	-
比較例8	SPG	オクタデシル	126	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	×	-
比較例9	マイクロチャネル	オクタデシル	126	カルセイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	×	-

【 0 1 6 3 】

10

20

30

40

【表 1 - 3】

比較例	乳化膜	表面処理の種類	接触角(°) (表面処理直 後)	内包薬剤	脂質組成	油相溶媒	外水分分散剤	W/O/W エマルジョンの 膜処理	W/O/W 乳化挙動	リポソームへ の薬剤内包率 (%)
比較例10	SPG	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニックF68	なし	x	-
比較例11	SPG	未処理		カルゼイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニックF68	なし	x	-
比較例12	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニックF68	なし	x	-
比較例13	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	DPPC/DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	プルロニックF68	なし	x	-
比較例14	SPG	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロロ ホルム	プルロニックF68	なし	x	-
比較例15	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロロ ホルム	プルロニックF68	なし	x	-
比較例16	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン	プルロニックF68	なし	△	59
比較例17	SPG	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	△	80
比較例18	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	△	81
比較例19	SPG	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	精製ゼラチン	なし	x	-
比較例20	マイクロチャネル	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/ジクロ ロメタン	精製ゼラチン	なし	x	-
比較例21	SPG	未処理		カルゼイン	卵黄レシチン /DPPG	ヘキサン/クロロ ホルム	カゼイン Na	あり	△	66
比較例22	SPG	未処理		シトラピン	卵黄レシチン /Chol/オレイン酸	ヘキサン/ジクロ ロメタン	カゼイン Na	なし	△	27

<表 1 (その3) >

【0164】

これらの薬に、ポリシラザンによる表面処理を行った実施例(実施例1, 2)、水酸基または陽イオン性基を親水性基として有するシランカップリング剤による表面処理を行っ

10

20

30

40

50

た実施例による表面処理を行った実施例（実施例 3 ~ 19）においては、膜乳化装置の通過孔と水との接触角が 0° 以上 42° 以下であることにより、二次乳化工程による W1/O/W2 エマルションの製造において、連続流出がなく、きれいに液滴が形成し、良好な乳化挙動を示し、さらには、リポソームの内包率も 80% 以上の高内包率を維持できることがわかった。これに対して、表面処理剤による表面処理を行っていても膜乳化装置の通過孔と水との接触角が 0° 以上 42° 以下とならないような膜乳化装置を用いた場合、および表面処理剤による表面処理を行っていない膜乳化装置を用いた場合では、ほとんどの比較例において W1/O/W2 エマルション自体を形成することができず、リポソームを得ることができなかつた。リポソームを形成することのできた比較例においても、分散剤としてブルロニック F68 を用いたときには、内包率が低下した（比較例 16）。分散剤としてカゼイン Na を用いた場合には、リポソームの形成自体は良好であったものの、表面処理剤による表面処理を施した膜乳化装置を用いた対応実施例（実施例 12 および 14）と比較すると、連続流出が生じる傾向が認められた（比較例 17 および 18）。カゼイン Na 自体が注射剤として認可されておらず、それを用いずとも、リポソームの内包率も 80% 以上の高内包率を維持できることはリポソーム DDS の実現に大きく寄与すると思われる、非常に大きな効果であると考えられる。さらには、溶媒種によらず、効果があることも特筆すべき効果であった。また、エチレンジアミン三酢酸表面処理をした場合の接触角（43°）は、4 級アンモニウム表面処理をした場合の接触角（42°）とほぼ同じであるにもかかわらず、前者には連続流出が生じる傾向が認められ、期待したリポソームが得られなかつた（比較例 1 ~ 3）。これは、アミンの効果に対してカルボキシル基による効果が勝っていると考えられ、期待した 4 級アンモニウムと同様の効果が十分現れなかつたためと推測している。

【0165】

また、プレミックス法を適用した場合、すなわち、二次乳化工程によって得られた W/O/W エマルションをさらに膜処理した場合について検討したところ、表面処理剤による表面処理を行った孔膜を用いた場合には、作製した W/O/W エマルションをさらに膜処理を行っても高い内包率を維持した（実施例 20）。この内包率の値は、対応する W/O/W エマルションの膜処理を行わない場合（実施例 13）と同等のものである。これに対して、表面処理剤による表面処理を行わなかつた孔膜を用いた場合には、内包率が低下し、対応する W/O/W エマルションの膜処理を行わない場合（比較例 17）と比較してもなお低い値となった。

【0166】

内包対象物質とする薬剤を カルセイン からシタラピンに代えた場合についても検討した場合にも、表面処理剤による表面処理を行った孔膜を用いたときには（実施例 21）、表面処理剤による表面処理を行わなかつた孔膜を用いたとき（比較例 22）と比べて良好な内包率を示した。

【0167】

なお、比較例 21 及び 22 とともに連続流出の傾向が見られた。

【0168】

また、実施例には示さないが、有機相（O）を構成する溶媒としてヒマワリ油を用いたときには、この有機溶媒の除去が困難であり、リポソームを得ることができなかつた。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
A 6 1 K	47/10	(2006.01)	A 6 1 K	47/10	
B 0 1 J	13/04	(2006.01)	B 0 1 J	13/02	A
B 0 1 F	3/08	(2006.01)	B 0 1 F	3/08	A
A 6 1 K	47/42	(2006.01)	A 6 1 K	47/42	
A 6 1 K	47/36	(2006.01)	A 6 1 K	47/36	

審査官 伊藤 清子

- (56)参考文献 特開平05 - 220382 (JP, A)
 特開2005 - 279326 (JP, A)
 特開2009 - 084293 (JP, A)
 特開2000 - 190416 (JP, A)
 特表2008 - 523806 (JP, A)
 特開平02 - 095433 (JP, A)
 特開2007 - 056177 (JP, A)
 特開2003 - 071261 (JP, A)
 市川創作ほか, 多相エマルションを基材とした高内包率脂質ベシクルの調整, 膜シンポジウム2009要旨集, 日本, 日本膜学会, 2009年11月10日, 37 - 40頁

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9 / 1 2 7
 A 6 1 K 4 7 / 1 0
 A 6 1 K 4 7 / 1 2
 A 6 1 K 4 7 / 1 8
 A 6 1 K 4 7 / 2 4
 A 6 1 K 4 7 / 2 8
 A 6 1 K 4 7 / 3 6
 A 6 1 K 4 7 / 4 2
 B 0 1 F 3 / 0 8
 B 0 1 F 1 3 / 0 2
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)