片山化学工業株式会社

Lipocapsulater を用いた薬剤内包検討例

【製品使用のフローチャート】

脂溶性化合物＆水溶性化合物のアプリケーション

「リポソームの調製が面倒、検討方法が難しい」

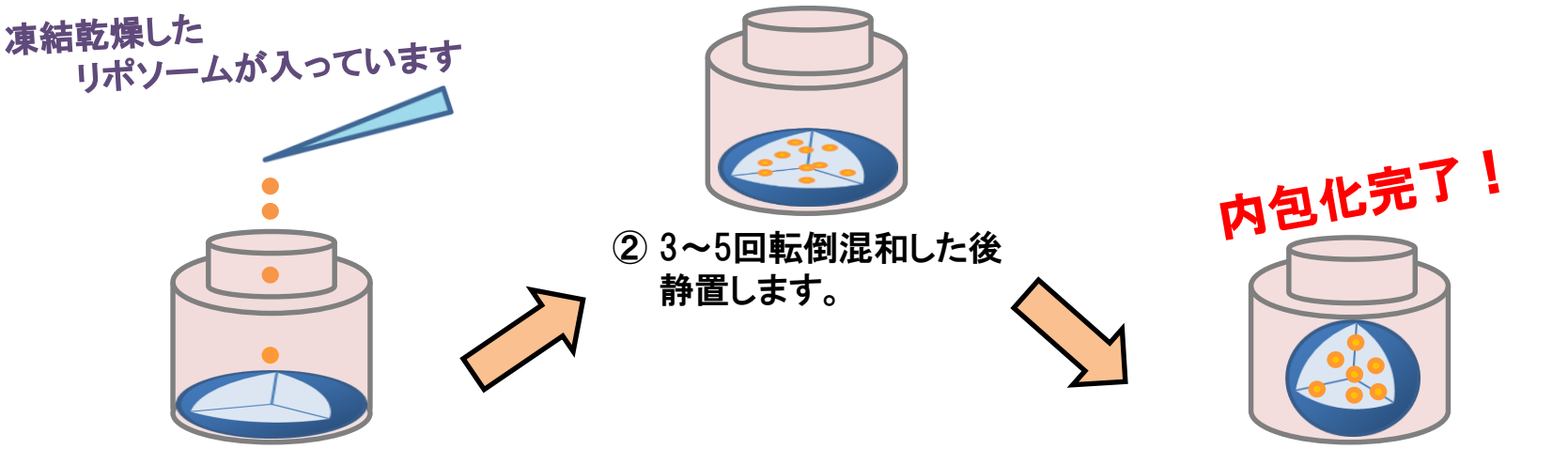
そんな悩みを解決できる、この一冊！

薬剤内包検討用リポソームカプセル化キット
Lipocapsulater『リポカプセレーター』とは？

こんな事思ったことありませんか？

- ✓ どんな薬剤でもリポソーム化できるのか？
- ✓ 気になっているけど、よく分からないものに時間・コストはかけらない

本製品は、そんなお客様の為に「簡便かつ低コスト」に
薬剤のリポソーム化検討を行っていただける製品になっております



Lipocapsulater ラインナップ

	飽和脂質 S タイプ	不飽和脂質 U タイプ
PE タイプ（PEG あり）	**FD-S PE** DSPC:Chol:DSPE-mPEG200 （57:38:5, mol比）	**FD-U PE** DOPC:Chol:DOPE-mPEG200 （57:38:5, mol比）
PL タイプ（PEG なし）	**FD-S PL** DSPC:Chol（70：30, mol比）	**FD-U PL** DOPC:Chol（70：30, mol比）

『どんな特徴があるの？』

Q1. PEGにはどのような効果がある？

A. PEGを修飾することで、親水性を向上させリポソーム自身を負電荷にしています

Q2. 脂質タイプの違いは？

A. 不飽和脂質から成るリポソームは飽和脂質から成るリポソームに比べ膜の流動性が高いと言われています。その為、徐放性（内包物が漏れ出やすい）リポソームには不飽和脂質が選ばれています。

脂質略称

【Chol】 Cholesterol

【DSPC】 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phoshocholine

【DSPE-mPEG2000】 N-(methoxy-polyethyleneglycolcarbamyl)-distearoyl-phosphatidylethanolamine

【DOPC】 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

【DOPE-mPEG2000】 Dioleoyl phosphatidylethanolamine-polyethylene glycol2000

Lipocapsulater の使用の流れ

お手持ちの化合物の水への溶解性は？

脂溶性化合物の場合

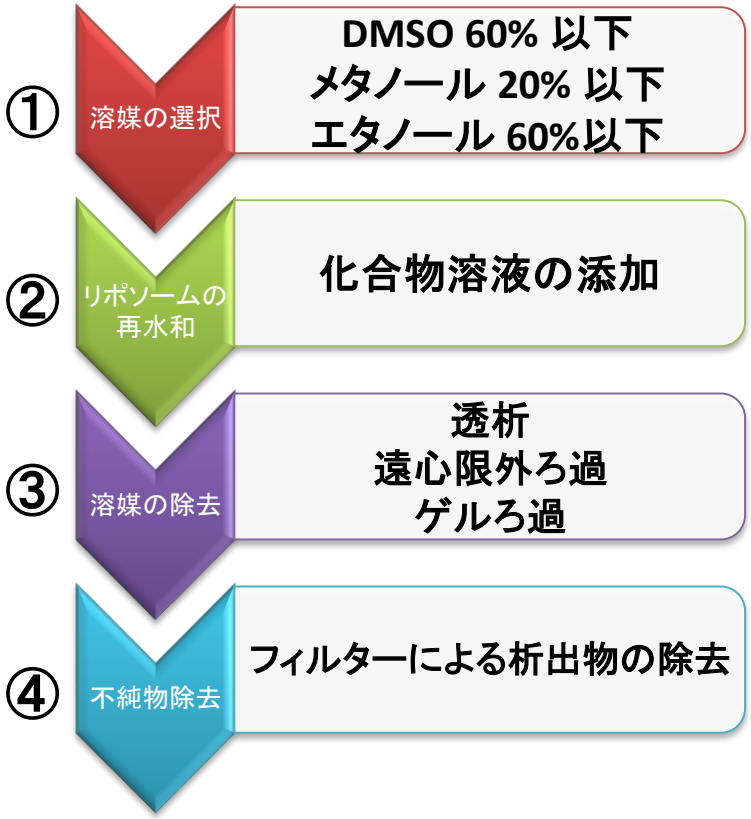
溶媒の選択 ※1	DMSO 60% 以下 メタノール 20% 以下 エタノール 60% 以下
リポソームの再水和	化合物溶液の添加
溶媒の除去	透析 遠心限外ろ過 ゲルろ過
不純物除去	フィルターによる析出物の除去

水溶性化合物の場合

溶液調製	精製水または緩衝液を用いて化合物を溶解
リポソームの再水和	化合物溶液の添加
未内包物の除去	透析 遠心限外ろ過 ゲルろ過
不純物除去	フィルターによる析出物の除去

※1 溶媒の種類・濃度はリポソーム化を保証するものではありません。上記溶媒を使用すると溶媒除去の際に一部凝集体が見られる場合があります。凝集体はフィルターで取り除くことが可能ですが、若干のリポソームのロスが生じる可能性があります。

脂溶性化合物の使用方法



【① 内包したい化合物の溶解性を確認】

リポソームが完全に壊れない濃度であれば左記以外の溶媒も使用可能です。

【② 化合物溶液を添加】

転倒混和でリポソームに化合物を内包化します。

【③ 溶媒及び未内包物の除去】

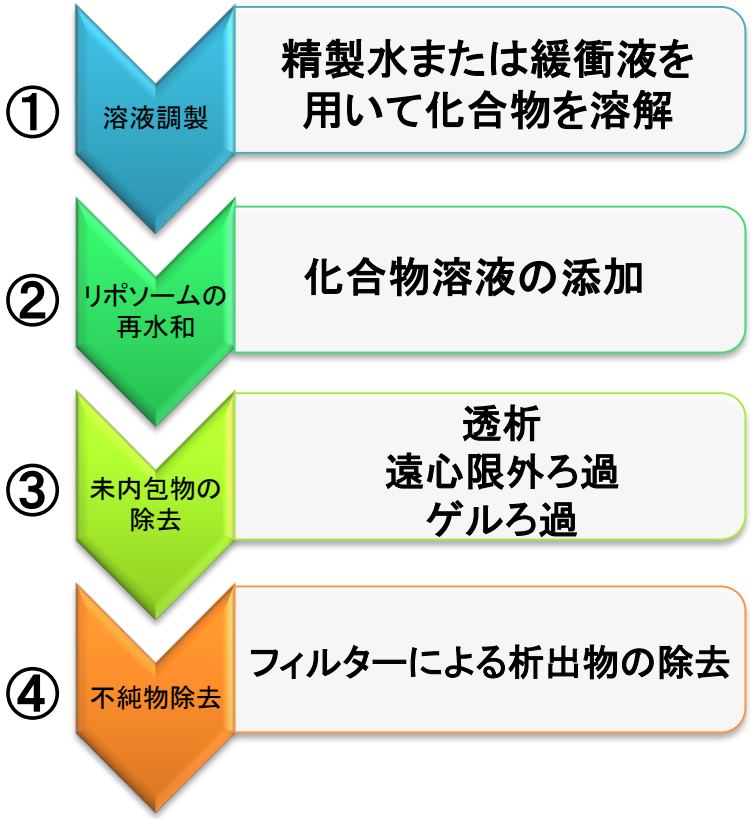
生理食塩水（または同等の浸透圧をもつ溶液）で溶液交換を行います。

【④ フィルター濾過による不純物の除去】

0.22 μm または 0.45 μm のフィルター濾過を行い、リポソーム凝集体や析出物を除去します。

リポソームの物性、リポソームに内包された化合物量、脂質定量の分析を行い完成！

水溶性化合物の使用方法



【① 内包したい化合物を精製水または緩衝液で溶解】

内包される量は化合物によって異なりますので、何点か濃度をふって検討する必要があります。

【② 化合物溶液を添加】

転倒混和でリポソームに化合物を内包化します。

【③ 未内包物の除去】

生理食塩水（または同等の浸透圧をもつ溶液）で溶液交換を行います。

【④ フィルター濾過による不純物の除去】

0.22 μm または 0.45 μm のフィルター濾過を行い、リポソーム凝集体を除去します。

リポソームの物性、リポソームに内包された化合物量、脂質定量の分析を行い完成！

検討例＆次のステップの紹介

脂溶性化合物

①クルクミン・・・p.7

②γ-オリザノール・・・p. 16

③スピロピラン・・・p. 24

上記化合物いずれもリポソーム化することが可能

✓ もっと内包率を改善したい

水溶性化合物

①塩化セチルピリジニウム・・・p. 32

②ミノキシジル・・・p. 38

ミノキシジルはリポソーム化が難しいことがわかった

✓ ミノキシジルはリポソーム化できない？

内包化できなかった化合物、内包率の低い化合物も調製方法や脂質組成を変えることにより改善される場合がございます。

『さらなる検討をしてみたい』『リポソームについてもっと知りたい』
そんな方はお気軽に弊社に御相談下さい！

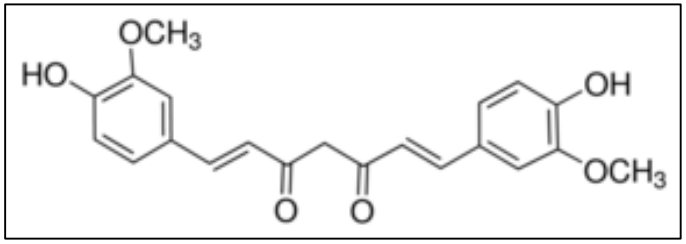
Lipocapsulater FD-S PE を用いた クルクミンのリポソーム内包化検討

Lipocapsulater FD-S PE を用いたクルクミンの内包化検討

クルクミン

ウコンの黄色色素であり、抗炎症作用や抗酸化作用を
もっており、健康食品としても利用されている脂溶性化合物

使用メーカー	sigma-aldrich, C1386-10G
分子式	$[HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO]_2CH_2$
分子量	368.38
最大吸収波長	426 nm
溶解性	エタノールに可溶（10 mg/mL） DMSOに可溶（11 mg/mL） 0.5 M NaOH に可溶



クルクミン構造式

検討ステップ概略

Step 1　　Step 2　　Step 3

化合物の溶解（溶媒の選択） ⇒ 化合物の内包化 ⇒ 溶媒の除去・不純物の除去

検討内容

異なる濃度のクルクミン溶液を添加し *Lipocapsulater* に内包されるクルクミン量の違いを確認する。

クルクミンの内包化

ステップ 1 化合物の溶解

1. クルクミンを秤量し 4 mg/mL クルクミン溶液となるように DMSO を添加した。
2. 調製したクルクミン溶液に等量の精製水を添加、2.0 mg/mL クルクミン溶液※1を調製した。

※1 DMSO 濃度が終濃度で 50% となるように溶液を調製。

ステップ 2 内包化

1. *Lipocapsulater FD-S PE* を室温に戻した。
2. ステップ 1 で調製した 2.0 mg/mL クルクミン溶液を 50% DMSO ※2で希釈し 0, 100, 300, 500, 700 μg/mL のクルクミン溶液を調製した。
3. 室温に戻しておいた *Lipocapsulater* に各濃度のクルクミン溶液を 1 mL 添加し室温で 1 時間静置した(15 分毎に転倒混和)。

※2 50% DMSO ： DMSOに等量の精製水を添加した。

未内包物及び溶媒の除去

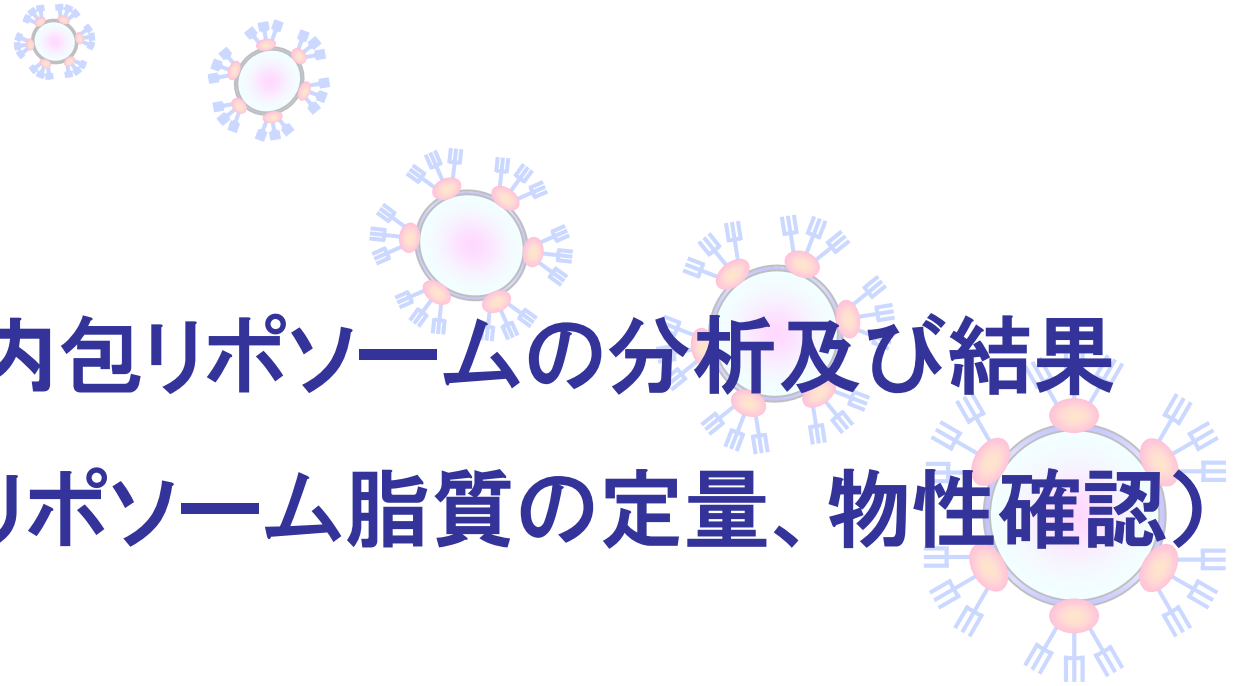
ステップ 3 透析膜を用いた未内包物及び溶媒の除去

1. セルロースチューブを適当な長さにカットし、沸騰した精製水に入れ 30 分間煮沸した。
2. 1 の後、セルロースチューブ内を精製水で満たし洗浄した。
3. 調製したサンプルをセルロースチューブに充填した。
4. 3 をサンプル容量の 200 倍の生理食塩水※ で 2 時間透析を行った。
5. ステップ 4 の後、新しい生理食塩水に交換し再度 2 時間透析を行った。
6. その後、サンプルを回収し 0.22 μm フィルターでろ過を行った。

※ 透析に用いる外液には、生理食塩水または同等の浸透圧をもつ溶液をご準備下さい。
また、本実験はあくまでも検討例であり、透析時間・外液量は実験系に合わせて調整して下さい。

【使用器具】

- 透析用セルロースチューブ　分画分子量 14,000
- 0.22 μm フィルター 親水性PVDF
- 回収後は遠心式限外ろ過ユニット(分画分子量 300 KDa 以下)を使用してボリュームを減らすことができます。
- 未内包物及び溶媒の除去には、透析以外にも限外ろ過、ゲルろ過をご利用いただけます。
- 0.22 μm フィルターろ過により、析出したクルクミンや凝集したリポソームを取り除くことができます。



クルクミン内包リポソームの分析及び結果

（クルクミン・リポソーム脂質の定量、物性確認）

クルクミン及び脂質の定量

クルクミンの定量

1. 内包化に用いたクルクミン溶液(2.0 mg/mL)を 50% DMSO で希釈し 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 標準溶液を調製した。
2. 標準溶液及びサンプル 30 μL にクロロホルム/メタノール(1:1, v/v)を 270 μL を加えボルテックスを用い十分に撹拌した。
3. 2 で調製した各溶液を分光光度計を用い波長 426 nm の吸光度を測定した。
4. 標準溶液の吸光度から検量線を作成しリポソームに含まれるクルクミン量を算出した。

脂質の定量

1. 酵素法を用いリポソームに含まれるコレステロールを定量した。
2. 本製品の脂質重量比をもとに、定量したコレステロール量からリポソームの総脂質を算出した。

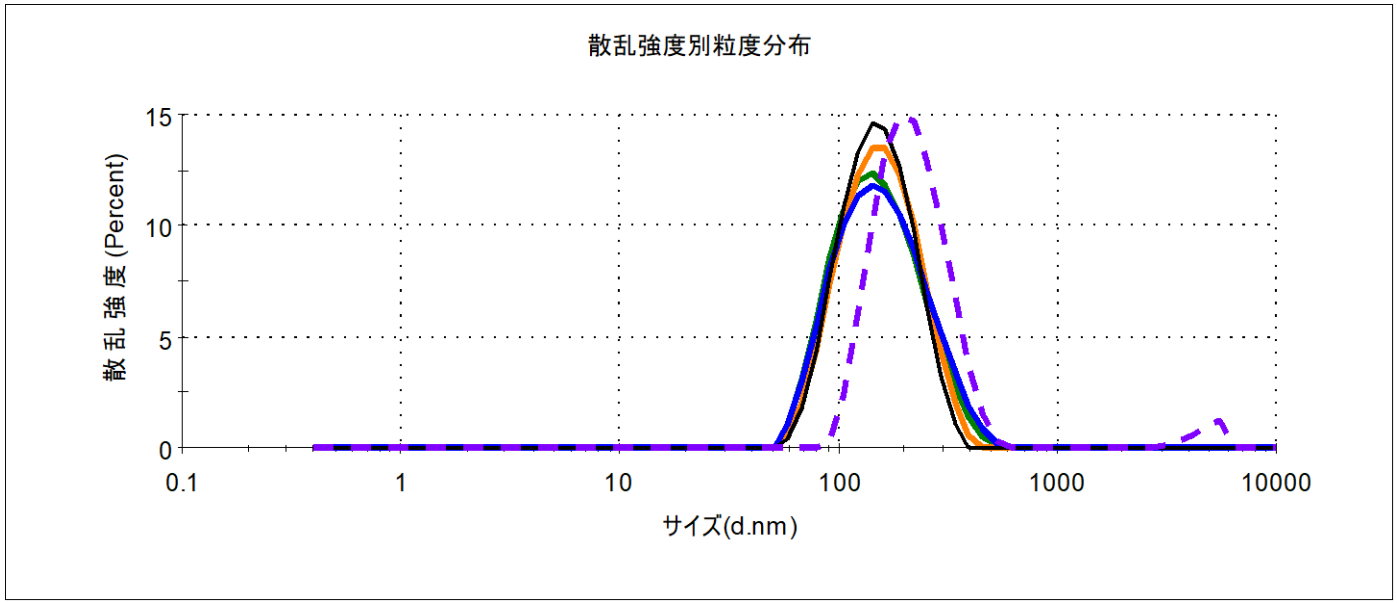
【ポイント】

- クロロホルム/メタノールを用いることでリポソームを破壊し、内包されている薬剤を溶解させることができます。
- 脂質定量では、リポソーム内部のコレステロールを正確に定量するために、SDS 溶液を終濃度 2% になるように添加し、90℃ で 15 分間煮沸処理を行いリポソームを破壊しています。

クルクミン内包 *Lipocapsulater* の物性確認及び定量結果

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

動的光散乱法を用い測定を行った。



クルクミン添加量（μg）	平均粒子径(nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
0	139.0	0.114	−26.0
100	140.5	0.161	−25.3
300	139.9	0.140	−25.6
500	138.2	0.164	−24.3
700	210.8	0.198	−26.4

※結果は社内評価におけるデータです

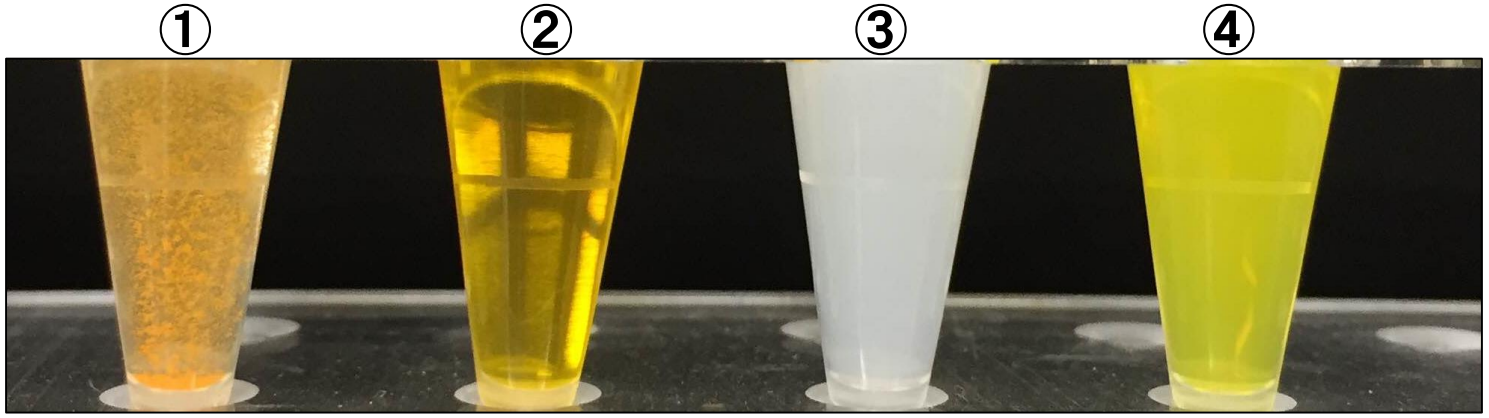
クルクミン内包リポソームの定量結果

クルクミン内包リポソームの定量結果

クルクミン添加量（μg）	リポソーム回収量（mL）	脂質濃度（mg/mL）	クルクミン濃度（μg/mL）	内包率（%）
0	1.2	4.61	0	0
100	1.2	4.21	44.9	54
300	1.2	4.15	114	45.3
500	1.6	5.62	228	73
700	2	6.32	230	65.7

※結果は社内評価におけるデータです

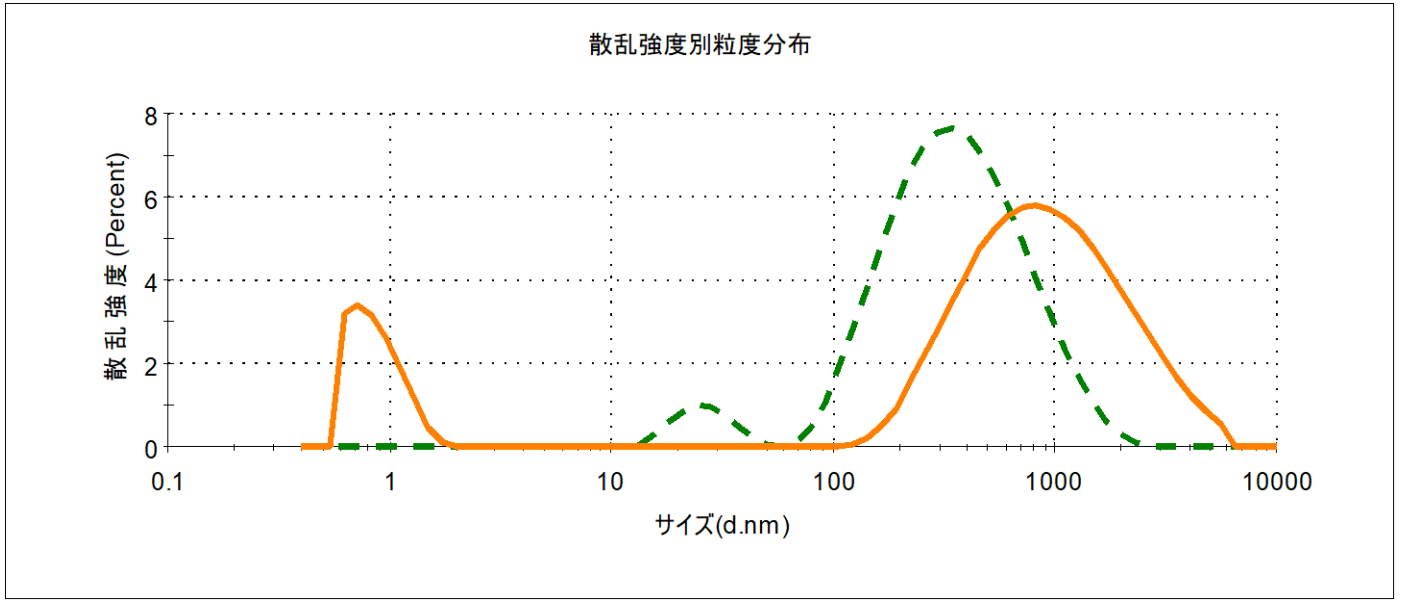
リポソームの外観



① 700 μg/mL クルクミン溶液を Lipocapsulater に添加せずに透析を行ったサンプル
② 700 μg/mL クルクミン溶液（50% DMSO）
③ 未内包 Lipocapsulater
④ クルクミン添加量 700 μg Lipocapsulater

参考データ

動的光散乱法を用いクルクミン単剤の粒度分布の測定を行った。



① 2.0 mg/mL クルクミン溶液(50% DMSO に溶解している状態) 20 μL に精製水 980 μL を添加し、十分にボルテックスを行った後、粒子径を測定した。

② ① の溶液 20 μL に精製水 980 μL を添加し、十分にボルテックスを行った後、粒子径を測定した。

溶液中にクルクミンの溶け残り(見た目上は溶解している)が存在している場合上の図のように粒度分布が乱れることがわかる。

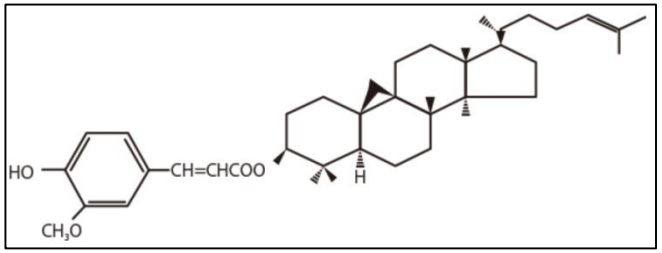
Lipocapsulater FD-S PE を用いた γ-オリザノールのリポソーム内包化検討

Lipocapsulater FD-S PE を用いたγ-オリザノール内包化検討例

γ-オリザノール

コメ胚芽や米ぬかに多く含まれる脂溶性化合物の総称であり、抗アレルギー作用や自律神経を整えたりなど、様々な効果が期待され医薬品、化粧品、食品と幅広く利用されている。

使用メーカー	TCI, O0172
分子式	$C_{40}H_{58}O_4$
分子量	602.89
最大吸収波長	326 nm
溶解性	水に難溶 エーテル、ベンゼン、クロロホルムに可溶 アルコールに微溶



γ-オリザノールの構成成分の1つである
シクロアルテノールフェルラ酸エステルの構造式

検討ステップ概略

Step 1　化合物の溶解（溶媒の選択）　⇒　Step 2　化合物の内包化　⇒　Step 3　溶媒の除去・不純物の除去

検討内容

異なる濃度のγ-オリザノール溶液を添加し、リポソームに内包される
γ-オリザノール量の違いを確認する。

γ-オリザノールの内包化

ステップ 1 化合物の溶解

1. γ-オリザノールを秤量し 4.0 mg/mL γ-オリザノール溶液となるように DMSO を添加。
2. γ-オリザノールが完全に溶解したことを確認した後、等量の 10% EtOH※1 を添加し 2.0 mg/mL γ-オリザノール溶液(50% DMSO/5% EtOH) を調製した。

※1 10% EtOH：EtOH に精製水を添加し調製

ステップ 2 内包化

1. *Lipocapsulater FD-S PE* を室温に戻した。
2. ステップ 1 で調製した 2.0 mg/mL γ-オリザノール溶液を 50% DMSO/5% EtOH 溶液※2で希釈し 0, 100, 300, 500, 700 μg/mL のγ-オリザノール溶液を調製した。
3. 室温に戻しておいた *Lipocapsulater* に各濃度のγ-オリザノール溶液を 1 mL 添加し室温で 1 時間静置した(15 分毎に転倒混和)。

※2 50% DMSO/5% EtOH 溶液：DMSO に等量の 10% EtOH を添加し調製

ステップ 3 未内包物及び溶媒の除去

p.10 と同様の方法で、透析により未内包物及び溶媒の除去を行った。

γ-オリザノール内包リポソームの分析及び結果

（γ-オリザノール・リポソーム脂質の定量、物性確認）

γ-オリザノール及び脂質の定量

γ-オリザノールの定量

1. 内包化に用いた γ-オリザノール溶液(2.0 mg/mL)を 50% DMSO/5% EtOH 溶液で希釈し 0, 62.5, 125, 250, 500 μg/mL 標準溶液を調製。
2. 標準溶液及びサンプル 30 μL にクロロホルム/メタノール(v/v, 1:1)を 270 μL を加えボルテックスを用い十分に撹拌した。
3. 2 で調製した各溶液を分光光度計を用い波長 326 nm の吸光度を測定した。
4. 標準溶液の吸光度から検量線を作成しリポソームに含まれるγ-オリザノール量を算出した。

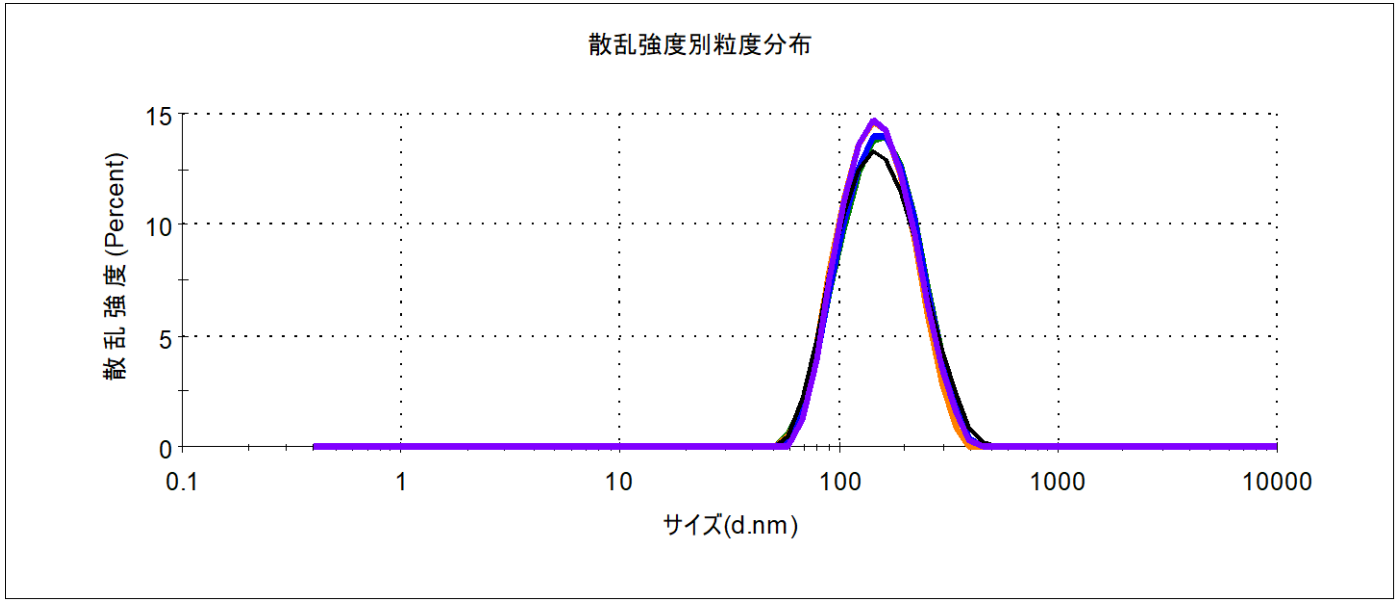
脂質の定量

1. 酵素法を用いリポソームに含まれるコレステロールを定量した。
2. 本製品の脂質重量比をもとに、定量したコレステロール量からリポソームの総脂質を算出した。

γ-オリザノール内包リポソームの物性確認

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

動的光散乱法を用い測定を行った。



γ-オリザノール添加量（μg）	平均粒子径（nm）	PDI	ゼータ電位（mV）
0	142.5	0.121	−26.7
100	143.8	0.153	−27.5
300	143.4	0.164	−26.8
500	142.8	0.120	−29.1
700	137.5	0.105	−29.8

※結果は社内評価におけるデータです

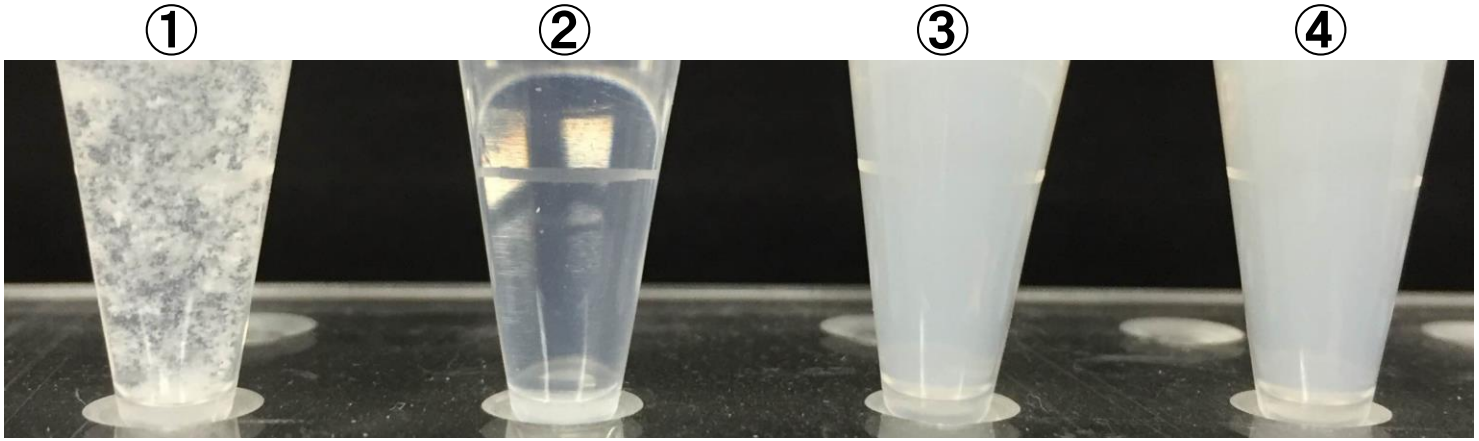
γ-オリザノール内包リポソームの定量結果

γ-オリザノール内包リポソームの定量結果

γ-オリザノール添加量（μg）	回収量（mL）	脂質濃度（mg/mL）	γ-オリザノール濃度（μg/mL）	内包率（%）
0	1.3	4.56	0	0
100	1.4	4.35	45.8	64.1
300	1.0	5.28	182	60.7
500	1.0	4.98	296	59.2
700	1.2	4.86	431	73.9

※結果は社内評価におけるデータです

リポソームの外観



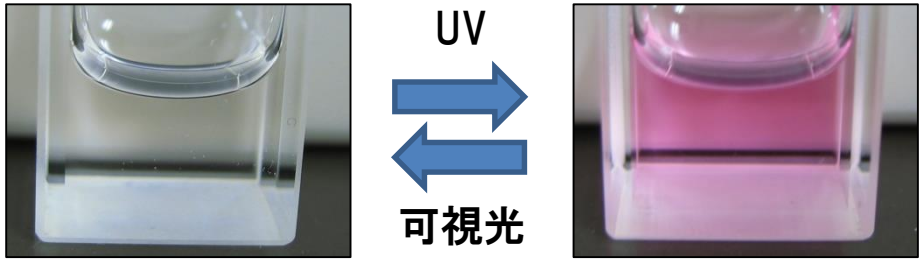
① 700 μg/mL γ-オリザノール溶液を *Lipocapsulater* に添加せずに透析を行ったサンプル
② 700 μg/mL γ-オリザノール溶液（50% DMSO/5% EtOH）
③ 未内包 *Lipocapsulater*
④ γ-オリザノール添加量 700 μg *Lipocapsulater*

Lipocapsulater FD-S, FD-U PL を用いた スピロピランのリポソーム内包化検討

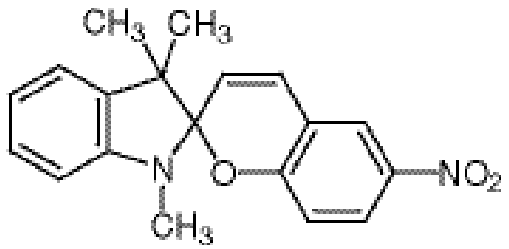
Lipocapsulater FD を用いたスピロピラン内包化検討例

スピロピラン

スピロピラン(フォトクロミック色素)は光照射により、フォトクロミズムを起こす化合物として知られています。フォトクロミズム現象を利用した調光材料、光記録材料、光スイッチ、機能性インクなど様々な分野で応用研究が進められています。



使用メーカー	TCI, T0366
分子式	$C_{19}H_{18}N_2O_3$
分子量	322.36
溶解性	水に難溶 DMSO、クロロホルムに可溶



1,3,3-Trimethylindolino-6'-nitrobenzopyrylospiran

検討ステップ概略

Step 1 化合物の溶解(溶媒の選択) ⇒ Step 2 化合物の内包化 ⇒ Step 3 溶媒の除去・不純物の除去

検討内容

スピロピランをリポソーム化し内包物の確認を行った。

スピロピランの内包化

ステップ 1　化合物の溶解

1. スピロピランを秤量し 0.5 mg/mL スピロピラン溶液となるように DMSO を添加した。
2. 調製したスピロピラン溶液と等量の 40 % MeOH を添加、0.25 mg/mL スピロピラン溶液を調製した。

ステップ 2　化合物の内包化

1. *Lipocapsulater FD-S PE* 及び *FD-U PL* を室温に戻した。
2. ステップ 1 で調製した 0.25 mg/mL スピロピラン溶液 1 mL を *Lipocapsulater* に添加し室温で 1 時間静置した(15 分毎に転倒混和)。

未内包物の除去

ステップ 3 透析膜を用いた未内包物及び不純物の除去

1. セルロースチューブを適当な長さにカットし、沸騰した精製水に入れ 30 分間煮沸した。
2. 1 の後、セルロースチューブ内を精製水で満たし洗浄した。
3. 調製したサンプルをセルロースチューブに充填、サンプル容量の 300 倍の生理食塩で 6 時間透析を行った。
4. その後、新しい生理食塩水に交換し 12 時間以上透析を行った。
5. 4 と同様の操作を再度行った後、サンプルを回収し 0.45 μm フィルターでろ過を行った。

※ 透析に用いる外液には、生理食塩水(または同等の浸透圧をもつ溶液)をご準備下さい。
また、本実験はあくまでも検討例であり、透析時間は実験系に合わせて調整して下さい。

【使用器具】

- 透析用セルロースチューブ　分画分子量 12,00 - 14,000
- 0.22 μm フィルター 親水性PVDF
- 回収後は遠心式限外ろ過ユニット(分画分子量 300 KDa 以下)を使用してボリュームを減らすことができます。
- 未内包物及の除去には、透析以外にも限外ろ過、ゲルろ過をご利用いただけます。

スピロピラン及び脂質の定量

スピロピランの定量

1. DMSO に溶解した 0.5 mg/mL スピロピラン溶液を DMSO で段階希釈し 0, 31.3, 62.5, 125, 250 μg/mL 標準溶液を調製した。
2. 標準溶液またはサンプル 30 μL にクロロホルム/メタノール(v/v, 1:1)を 270 μL を加えボルテックスを用い十分に撹拌した。
3. 2 で調製した各溶液を分光光度計を用い波長 348 nm の吸光度を測定した。
4. 標準溶液の吸光度から検量線を作成しリポソームに含まれるスピロピランを算出した。

脂質の定量

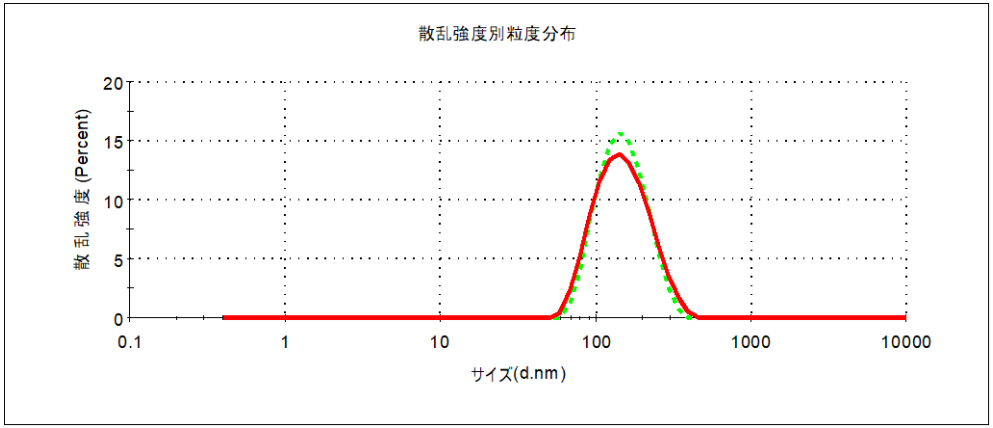
1. 酵素法を用いリポソームに含まれるコレステロールを定量した。
2. 本製品の脂質重量比をもとに、定量したコレステロール量からリポソームの総脂質を算出した。

スピロピラン内包リポソームの物性確認

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

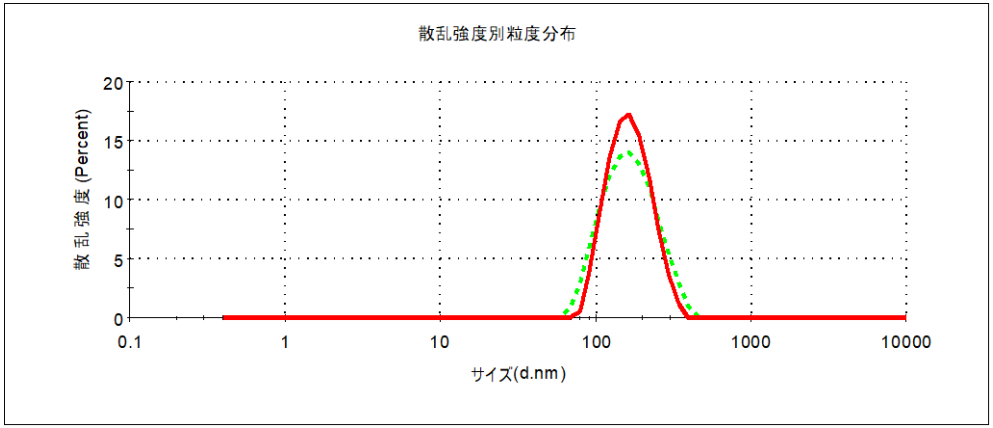
動的光散乱法により粒子径の測定を行った。

FD-U PL



添加量 0.25 mg
添加量 0 mg

FD-S PE



添加量 0.25 mg
添加量 0 mg

Lipocapsulater	スピロピラン添加量 (mg)	平均粒子径 (nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
FD U-PL	0(コントロール)	138.8	0.108	−2.67
	0.25	136.2	0.126	−2.99
FD S-PE	0(コントロール)	153.5	0.129	−27.1
	0.25	158.4	0.135	−27.6

※結果は社内評価におけるデータです

スピロピラン内包リポソームの定量結果

スピロピラン内包リポソームの定量結果

Lipocapsulater	スピロピラン添加量（mg）	回収量（mL）	脂質量（mg/mL）	スピロピラン濃度（ug/mL）	内包率（%）
FD U-PL	0（コントロール）	2.2	3.69	0	0
	0.25	2.5	5.03	1.22	1.2
FD S-PE	0（コントロール）	2.0	4.70	0	0
	0.25	1.7	5.46	ND	ND

※結果は社内評価におけるデータです

リポソームの外観

① 0.25 mg/mL スピロピラン溶液を *Lipocapsulater* に添加せずに透析を行ったサンプル
② *Lipocapsulater FD U-PL* 空
③ スピロピラン内包 *Lipocapsulater FD U-PL*
④ *Lipocapsulater FD S-PE* 空
⑤ スピロピラン内包 *Lipocapsulater FD S-PE*

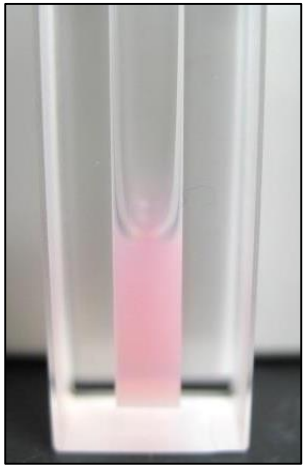
スピロピラン内包リポソームのUV照射による変化

◆スピロピランを内包したリポソーム溶液に UV（波長 254 nm）を照射し変化が見られるかを確認した

FD U-PL バージョン

未処理

3 分間
UV 照射



UV 照射後

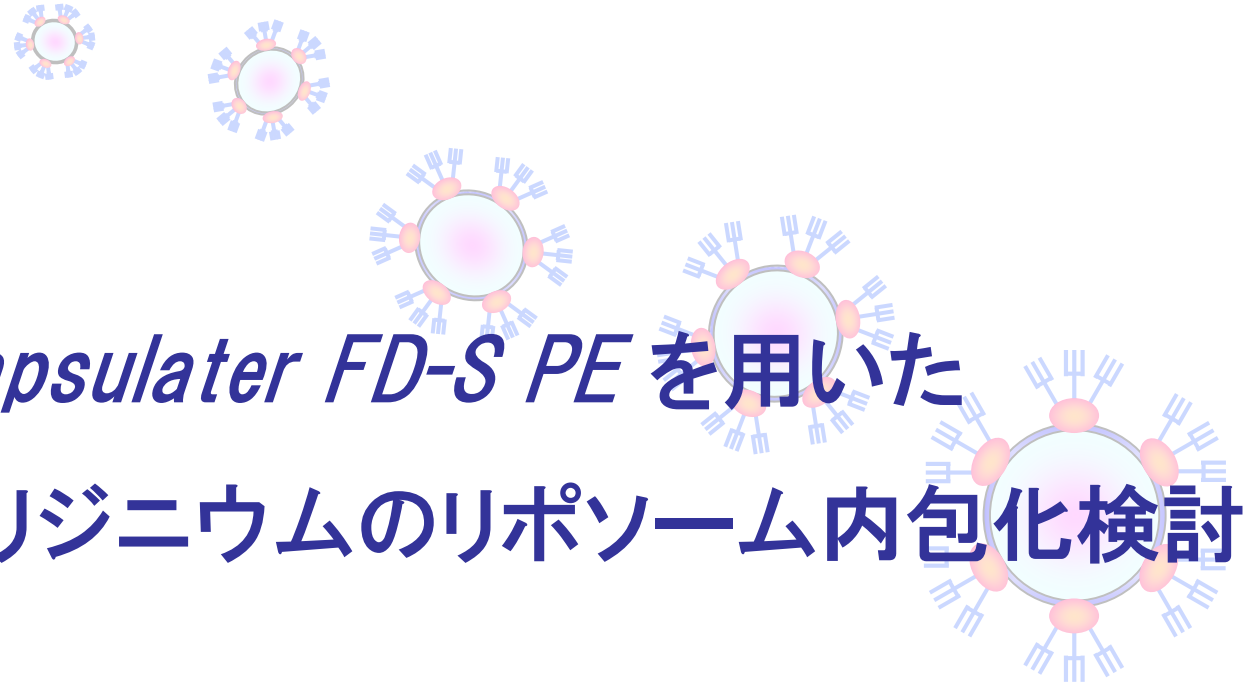
蛍光下
10 分静置

FD S-PE バージョン

未処理

3 分間
UV 照射

UV 照射後



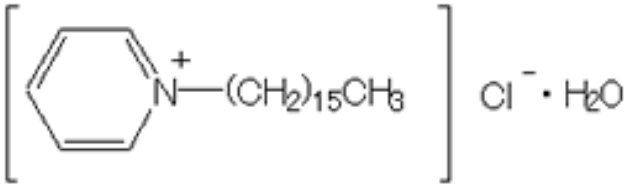
Lipocapsulater FD-S PE を用いた
塩化セチルピリジニウムのリポソーム内包化検討

Lipocapsulater FD-S PE を用いたCPC内包化検討例

塩化セチルピリジニウム(CPC)

CPC(塩化セチルピリジニウム)は、強い殺菌、抗カビ作用をもったカチオン界面活性剤。歯磨き、マウスウォシュ、ウェットティッシュ、のど飴、トローチの抗菌成分として使用されている他、医薬品、化粧品、トイレタリー関連、工業用と幅広い分野で使用されている。

使用メーカー	TCI, A5161
分子式	$C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$
分子量	339.99
吸収波長	259 nm
溶解性	水に可溶



CPC
(塩化セチルピリジニウム一水和物)

検討ステップ概略

Step 1　　Step 2

化合物の内包化　⇒　未内包物の除去・不純物の除去

検討内容

CPC をリポソーム化し内包物の確認を行った。

CPCの内包化

ステップ 1 化合物の内包化

1. *Lipocapsulater* FD-S PE を室温に戻した。
2. CPC を秤量、精製水で溶解し 4.0 mg/mL CPC 溶液を調製した。
3. 2 で調製した溶液を CPC 溶液で希釈し 0, 1.0, 2.0, 3.0 mg/mL CPC 溶液を調製した。
4. 室温に戻しておいた *Lipocapsulater*※1 に各濃度の CPC 溶液 0.5 mL を添加し室温で 1 時間静置した(15 分毎に転倒混和)。

※1 社内検討用として、脂質濃度 5 mg/vial の *Lipocapsulater* を使用しており、実際の製品は脂質濃度 10 mg/vial となっています。

未内包物の除去

ステップ 2 透析膜を用いた未内包物及び不純物の除去

1. セルロースチューブを適当な長さにカットし、沸騰した精製水に入れ 30 分間煮沸した。
2. 1 の後、セルロースチューブ内を精製水で満たし洗浄した。
3. 調製したサンプルをセルロースチューブに充填、サンプル容量の 300 倍の生理食塩水で 6 時間透析を行った。
4. その後、新しい生理食塩水に交換し 12 時間以上透析を行った。
5. 4 と同様の操作を再度行った後、サンプルを回収し 0.22 μm フィルターでろ過を行った。

※ 透析に用いる外液には、10% スクロース溶液または生理食塩水をご準備下さい。
また、本実験はあくまでも検討例であり、透析時間は実験系に合わせて調整して下さい。

【使用器具】

- 透析用セルロースチューブ　分画分子量 12,00 - 14,000
- 0.22 μm フィルター 親水性PVDF
- 回収後は遠心式限外ろ過ユニット(分画分子量 300 KDa 以下)を使用してボリュームを減らすことができます。
- 未内包物及の除去には、透析以外にも限外ろ過、ゲルろ過をご利用いただけます。

CPC及び脂質の定量

CPC の定量

1. 内包化に用いた 4.0 mg/mL CPC 溶液を精製水で希釈し 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.0 mg/mL 標準溶液を調製した。
2. 標準溶液またはサンプル 30 μL にクロロホルム/メタノール(v/v, 1:1)を 270 μL を加えボルテックスを用い十分に撹拌した。
3. 2 で調製した各溶液を分光光度計を用い波長 259 nm の吸光度を測定した。
4. 標準溶液の吸光度から検量線を作成しリポソームに含まれる CPC を算出した。

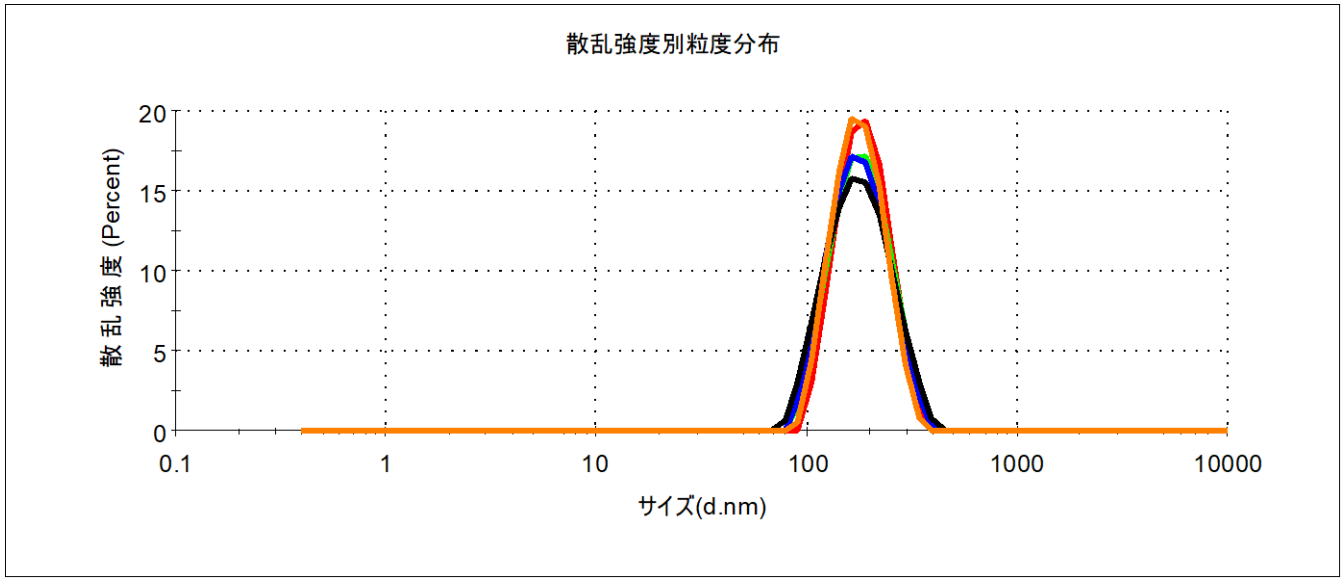
脂質の定量

1. 酵素法を用いリポソームに含まれるコレステロールを定量した。
2. 本製品の脂質重量比をもとに、定量したコレステロール量からリポソームの総脂質を算出した。

CPC 内包リポソームの物性確認

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

動的光散乱法を用い粒子径の測定を行った。



CPC 添加量 (mg)	平均粒子径(nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
0	178.2	0.055	−18.2
0.5	172.2	0.080	29.7
1.0	168.4	0.081	32.2
1.5	166.6	0.098	31.0
2.0	170.3	0.054	32.1

※結果は社内評価におけるデータです

CPC 内包リポソームの定量結果

CPC 内包リポソームの定量結果

CPC 添加量 (mg)	回収量(mL)	脂質量 (mg/mL)	CPC 濃度 (mg/mL)	内包率 (%)
0	0.42	6.96	0	0
0.5	0.42	6.99	0.69	58
1.0	0.43	7.04	1.14	48
1.5	0.43	7.39	1.60	46
2.0	0.43	6.12	1.33	28.5

※結果は社内評価におけるデータです

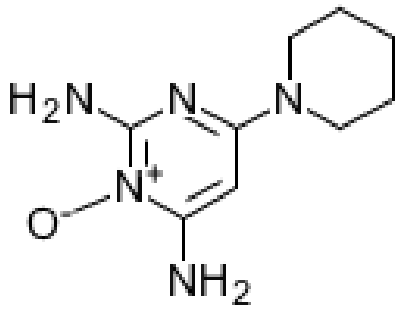
Lipocapsulater FD-S PE を用いた
ミノキシジルのリポソーム内包化検討

Lipocapsulater FD-S PE を用いたミノキシジル内包化検討例

ミノキシジル

血管拡張薬として開発され、後に発毛効果を有することから育毛剤として利用されている。血管平滑筋細胞膜のカリウムチャネルが開くことにより、血管拡張作用が得られることが明らかになっており、細胞膜・膜透過関連の研究試薬としての応用も期待される。

使用メーカー	TCI, M1389
分子式	$C_9H_{15}N_5O$
分子量	209.25
吸収波長	278 nm
溶解性	メタノールに可溶



Minoxidil
(2,6-Diamino-4-piperidinopyrimidine 1-Oxide)

検討ステップ概略

Step 1　　Step 2

化合物の内包化　⇒　未内包物の除去・不純物の除去

検討内容

ミノキシジルをリポソーム化し内包物の確認を行った。

ミノキシジルの内包化

ステップ 1 化合物の内包化

1. *Lipocapsulater FD-S PE* を室温に戻した。
2. ミノキシジルを秤量、20% EtOH 溶液※1で溶解し 2.0 mg/mL ミノキシジル溶液※2を調製した。
3. 2 で調製した溶液を 20% EtOH 溶液で希釈し 0.8, 1.2, 1.6 mg/mL ミノキシジル溶液を調製した。
4. 室温に戻しておいた *Lipocapsulater*※3 に各濃度のミノキシジル溶液 0.5 mL を添加し室温で 1 時間静置した(15 分毎に転倒混和)。

※1 20% EtOH：EtOH に精製水を添加し調製

※2 精製水のみでは溶解しにくかった為、今回は 20% EtOH を用いて溶解した。

※3 社内検討用として、脂質濃度 5 mg/vial の *Lipocapsulater* を使用しており、実際の製品は脂質濃度 10 mg/vial となっています。

未内包物の除去

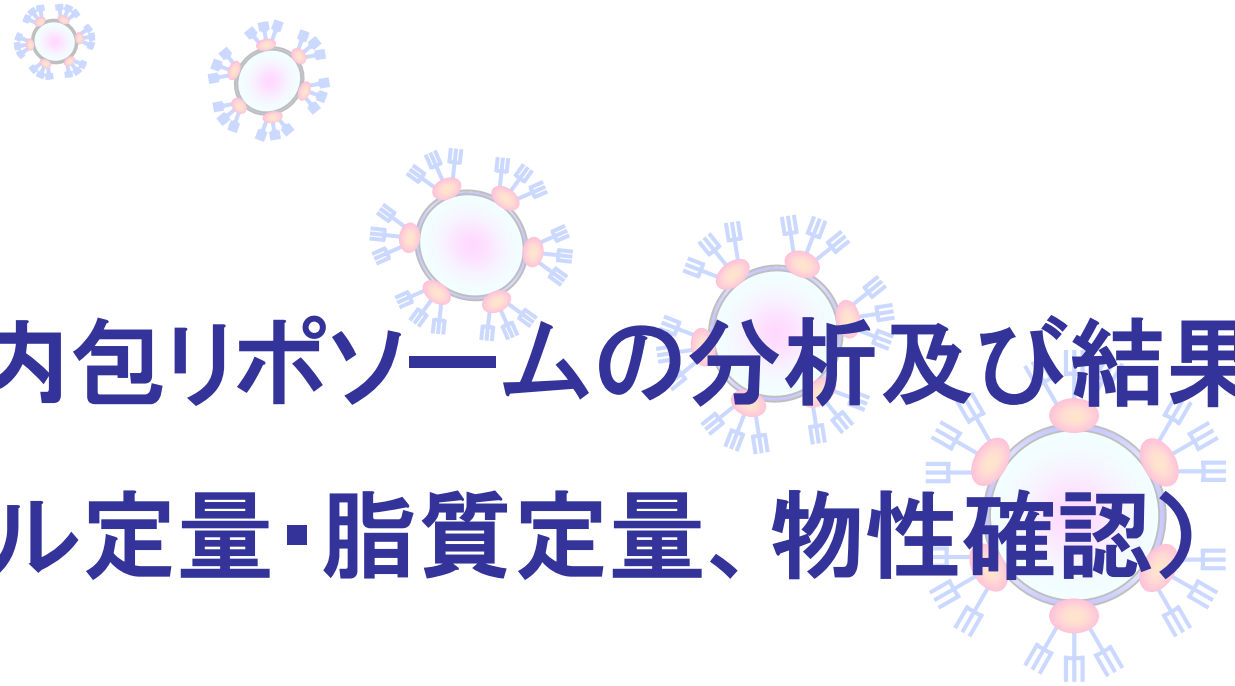
ステップ 2 透析膜を用いた未内包物及び不純物の除去

1. セルロースチューブを適当な長さにカットし、沸騰した精製水に入れ 30 分間煮沸した。
2. 1 の後、セルロースチューブ内を精製水で満たし洗浄した。
3. 調製したサンプルをセルロースチューブに充填、サンプル容量の 300 倍 の生理食塩水で 6 時間透析を行った。
4. その後、新しい生理食塩水に交換し 12 時間以上透析を行った。
5. 4 と同様の操作を再度行った後、サンプルを回収し 0.22 μm フィルターでろ過を行った。

※ 透析に用いる外液には、10% スクロース溶液または生理食塩水をご準備下さい。
また、本実験はあくまでも検討例であり、透析時間は実験系に合わせて調整して下さい。

【使用器具】

- 透析用セルロースチューブ　分画分子量 12,00 - 14,000
- 0.22 μm フィルター 親水性PVDF
- 回収後は遠心式限外ろ過ユニット(分画分子量 300 KDa 以下)を使用してボリュームを減らすことができます。
- 未内包物及の除去には、透析以外にも限外ろ過、ゲルろ過をご利用いただけます。



ミノキシジル内包リポソームの分析及び結果

（ミノキシジル定量・脂質定量、物性確認）

ミノキシジル及び脂質の定量

ミノキシジルの定量

1. 内包化に用いた 2.0 mg/mL ミノキシジル溶液を 20% EtOH 溶液で希釈し 0, 0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 mg/mL 標準溶液を調製した。
2. 標準溶液またはサンプル 30 μL にクロロホルム/メタノール(v/v, 1:1)を 270 μL を加えボルテックスを用い十分に撹拌した。
3. 2 で調製した各溶液を分光光度計を用い波長 278 nm の吸光度を測定した。
4. 標準溶液の吸光度から検量線を作成しリポソームに含まれるミノキシジルを算出した。

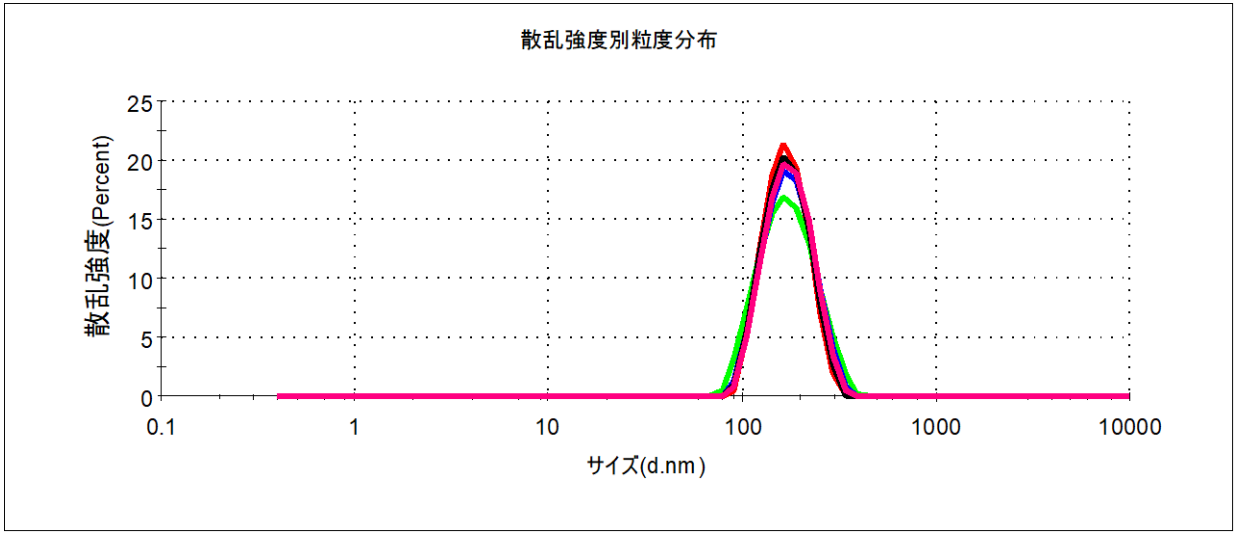
脂質の定量

1. 酵素法を用いリポソームに含まれるコレステロールを定量した。
2. 本製品の脂質重量比をもとに、定量したコレステロール量からリポソームの総脂質を算出した。

ミノキシジル内包リポソームの物性確認

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

動的光散乱法を用い粒子径の測定を行った。



ミノキシジル添加量 (mg)	平均粒子径(nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
0	163.0	0.048	−43.6
0.4	161.5	0.096	−42.6
0.6	166.7	0.062	−40.7
0.8	163.8	0.052	−41.0
1.0	167.1	0.051	−38.7

※結果は社内評価におけるデータです

ミノキシジル内包リポソームの定量結果

ミノキシジル内包リポソームの定量結果

ミノキシジル添加量（mg）	脂質量（mg/mL）	ミノキシジル濃度（mg/mL）	内包率（%）
0	4.41	0	0
0.4	5.57	ND	ND
0.6	6.12	ND	ND
0.8	5.77	ND	ND
1.0	5.77	ND	ND

※結果は社内評価におけるデータです

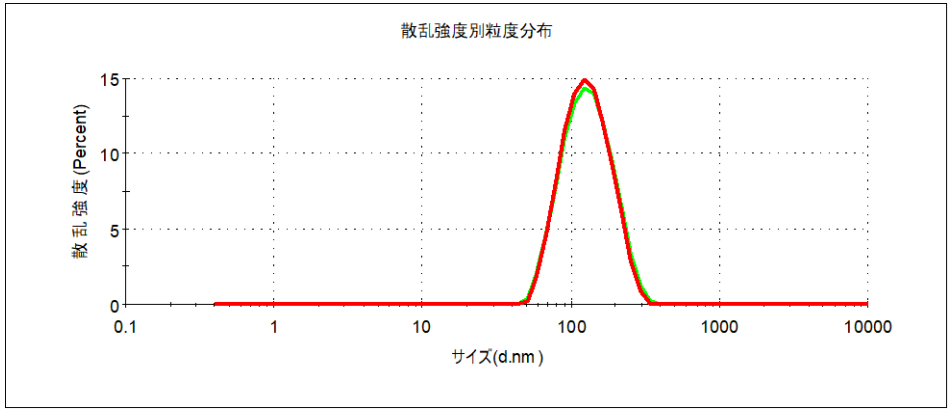
ミノキシジルは添加量に関係なくリポソームに内包されなかった

上記の結果を踏まえ、不飽和脂質鎖タイプ FD U-PLを用いて同様の実験を行った
使用した製品は FD U-PL 10 mg/vial、化合物 2.0 mg/mL を 1 mL 添加
（脂質あたりの化合物添加量は同じ）

FD U-PLミノキシジル内包リポソームの物性確認

粒子径、PDI、ゼータ電位の測定

動的光散乱法を用い粒子径の測定を行った。



ミノキシジル添加量 (mg)	平均粒子径(nm)	PDI	ゼータ電位 (mV)
0	118.9	0.120	−13.4
2.0	118.3	0.110	−10.6

※結果は社内評価におけるデータです

ミノキシジル内包リポソームの定量結果

ミノキシジル添加量 (mg)	回収量 (mL)	脂質量 (mg/mL)	ミノキシジル濃度 (mg/mL)	内包率 (%)
0	1.5	5.19	0	0
2.0	1.5	5.16	ND	ND

※結果は社内評価におけるデータです

FD U-PL に関しても同様にミノキシジルは内包されなかった