

#### 4.操作手順

		<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
1 日目			
10:45	1	使用器具(葉さじ、ナスフラスコ)はアセトン→純水→アセトンの順で洗浄し、完全に乾燥させる。	
	2	秤量に用いる電子天秤の補正を行う。	
	3	凍結乾燥機の電源を入れ、冷却機能を ON にする。30分後、真空ポンプを作動させ、真空状態にする。	手順 3~4 は脂質の秤量と並行して行う。
	4	t-BuOH を加温し、液状にする。	
12:30	5	各脂質をシリカゲルが入ったデシケーターに入れ、常温に戻す。	
	6	各脂質を秤量し、ナスフラスコに入れる。	秤量誤差は±0.5 mg 以内にする。
	7	t-BuOH をパスツールピペットで加え、ソニケーションによって各脂質を溶解させる。	H12 は熱に弱いため、ドライヤー等による加熱は控える。
	8	洗面器にアセトンを入れ、ドライアイスで氷冷する。	
	9	氷冷したアセトン中でナスフラスコを回転させ、各脂質が溶解した t-BuOH を凍結させる。	
	10	ナスフラスコを凍結乾燥機に接続し、アルミホイルで遮光、遮熱する。	
1 日目			
9:00	11	ナスフラスコを外し、混合脂質を回収する。	混合脂質は細かい粉末状に崩して回収する。

工程 No. 1-3	工程	水和
------------	----	----

### 1. 概要

混合脂質を ADP 溶液中で攪拌分散させ、ADP を内包させたリポソームを製造する。

### 2.原料

原料	量	入手先
1-2 で調合した混合脂質	200mg	WASEDA
ADP	40mg	SIGMA
PBS	500ml	Invitrogen

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
電子天秤	1	XS205	メラー・トレド株式会社
薬さじ	1		
薬包紙	1	2022	HAKUAI
スターラー	1		
ナスフラスコ	1		
攪拌機	1	SW-M60	日神理化
ナス台	1		
ピペットマン	1		GILSON
チップ	1		

#### 4.操作手順

		<u>準備工程</u> なし <u>調製工程</u>	<u>注意事項</u>
2日目			
9:00	1	秤量に用いる電子天秤の補正を行う。	
	2	洗浄した薬さじ、薬包紙を用いて電子天秤で混合脂質を 200mg、ADP を 40mg 秤量する。	秤量誤差は±0.5mg 以内にする。
	3	秤量した混合脂質とADPをクリーンベンチに運ぶ。 (クリーンベンチ内に入れるものは、必ず表面に70%エタノールで噴霧滅菌してから入れ、この際必ず手にも70%エタノールにて滅菌する。)	クリーンベンチの使い方は以下の操作もすべて同様にする。
9:50	4	(以下、クリーンベンチ内での操作) オートクレーブバックをクリーンベンチに入れ、オートクレーにかけた器具類を取り出す。	
	5	使用する器具(ピンセット、ナスフラスコ、スターラー、薬さじ)を PBS で置換をし、キムワイプでふきとる。	PBSは新品のものをクリーンベンチ内で開封する。
	6	ADPをPBSに溶解させ、濃度を1mMに調整する。	ADP溶液は、水だけでなく器具の洗浄にも使用するため、50ml 調製する。
	7	水和時に必要なナスフラスコ、スターラーを1mMADP溶液で置換し、ナスフラスコの口をキムワイプでふきとる。	混合脂質を入れる際に、口に接着しないようにするため。
	8	ピンセットでスターラーをナスフラスコ内に入れ、このナスフラスコに秤量した混合脂質を全て入れる。	

	9	ピペットマンを用いて10mlの1mMADP溶液をナスフラスコに入れる。	壁面についた混合脂質を底面に落とすように入れる。
10:50	10	攪拌機上にナス台を固定し、攪拌速度(ダイヤル3)、常温(25℃)で3時間攪拌をする。このときナスフラスコの口をパラフィルムで覆う。	30分おきに水和の状態を確認し、混合脂質のかたまりなどがないよう注意する。

工程 No. 1-4	工程	エクストルージョン
------------	----	-----------

### 1.概要

水和して得られたリポソームの粒子径を制御する。

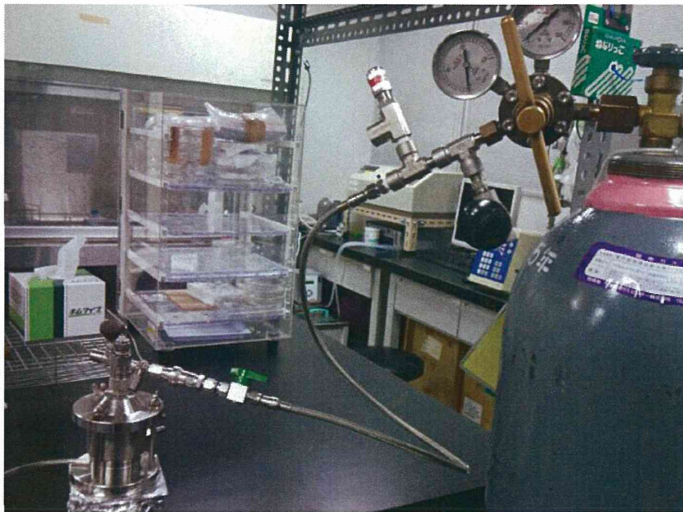
### 2.原料

原料	量	入手先
2-1 で得られた水和溶液	10ml(全量)	—

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
エクストルーダー	1		
パスツールピペット	1	1K-PAS-9P	IWAKI
Φ=0.45 フィルター	1	HAWP02500	MILLIPORE
Φ=0.22 フィルター	1	GSWP02500	MILLIPORE
Φ=0.2 フィルター	1	110606	Whatman
15ml ファルコンチューブ	1	352196	BD
ピンセット	1		
窒素ボンベ	1		
スポイトゴム	1		

#### 4.操作手順

		<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
2 日目 13:50	1	オートクレーブバックから取り出した使用器具(エクストルーダー等)を PBS で洗浄したのち、1mM ADP 水溶液で置換する。	
		<u>調製工程</u>	
13:55	1	Φ = 0.45 フィルターを 1mM ADP 水溶液で置換し、上が表になるようにピンセットを用いてセットし、エクストルーダーを組み立てる。	
	2	エクストルーダーと窒素ポンペを以下の Fig. 1 のようにつなげる。	操作の際は、ゴム手袋着用。 フィルターの裏表を間違えないように注意する。
			3 つのねじは均等にしっかりとしめる。 カチッと音がするまで閉める
		<p align="center"><b>Fig. 1</b> エクストルーダーと窒素ポンベ接続</p>	
	3	窒素ポンベの栓をゆるめる。	
	4	エクストルーダーに 2-1 で得られた水和液を、パスツールピペットを用いて入れる。	
	5	エクストルーダーのふたを開め、エクストルーダー下部のゴムチューブに 15ml ファルコンチューブをセットする。に	

	6	窒素ポンベのハンドルをゆっくり右に回していき、エクストルーダー内に圧をかけ、水和液をフィルターに透過させる。	少しずつ回すことで、均一な大きさのリポソームをつくる。(圧力 0.5~1 MPa)
	7	フィルターを透過した水和液は、エクストルーダー下部のゴムチューブより 15 ml ファルコンチューブで回収する。	
	8	4 から 7 の操作をもう一度繰り返す。	
	9	使用器具を純水で洗う。	
	10	$\Phi = 0.22$ フィルターをピンセットを用いてセットし、エクストルーダーを組み立てる。	
	11	2 から 7 の操作を行う。	圧力 15~20 MPa
	12	4 から 7 の操作を 2 回繰り返す。	
	13	使用器具を純水で洗う。	
	14	$\Phi = 0.2$ フィルターをピンセットを用いてセットし、エクストルーダーを組み立てる。	
	15	新しい 15ml ファルコンチューブをエクストルーダー下部のゴムチューブにセットする。	圧力 20~40 MPa
15:00	16	2 から 7 の操作を行う。	

工程 No. 1-5	工程	超遠心分離・再分散
------------	----	-----------

### 1.概要

外水相中の ADP やリポソームを構成していない脂質等を除去、精製する。

### 2.原料

原料	量	入手先
2-2 で製造したリポソーム分散液	10ml(全量)	

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
超遠心機	1	Optima LE-80k Ultracentrifuge	BECKMAN COULTER
超遠心用チューブ	6	361623	BECKMAN COULTER
パスツールピペット	1	1K-PAS-9P	IWAKI
DPBS	1		Invitrogen
ピペットマン			GILSON
チップ	1		



#### 4.操作手順

		<u>調製工程</u>	<u>注意事項</u>
2日目			
15:00	1	1-4 で得られたエクストルージョン後のリポソーム分散液を6本の超遠心用チューブに1.5mlずつ分注する。	エクストルージョン時の損失を考慮し、 $1.5\text{ml} \times 6 = 9\text{ml}$ で記述した。9ml以上ある場合は均等に分注する。
	2	超遠心用チューブにほぼ満水までPBSを追加する。	
	3	チューブ内に空気が入らないようにキャップをしめる。	
	4	超遠心機にて33000rpm,4°Cの条件で30分遠心をする。	クリーンベンチから超遠心機まで運ぶ際は、表面をアルミホイルで包んで運ぶ。
15:50	5	遠心が終わったらチューブを取り出し、上澄みのPBSをパスツールピペットを用いて除去する。	
	6	6本中、3本の遠心用チューブに1mlずつPBSを加え、リポソームペレットをパスツールピペットを用いて再分散させる。	リポソームペレットは丁寧になるべく弱い力で再分散させる。
16:30	7	再分散液を、まだ分散していない遠心チューブ内にそれぞれ加え、さらに再分散させる。	
	8	再分散液を1つの遠心チューブにまとめ、PBS500 $\mu\text{L}$ を用いて空になった遠心チューブ全てを洗浄し、洗浄後の液は再分散液に加える。	リポソームの回収率を上げるため。

工程 No. 1-6	工程	ゲルろ過・精製
------------	----	---------

### 1.概要

遠心分離で除去しきれなかった外水相中の ADP、脂質等を除去し、リポソームを精製する。

### 2.原料

原料	量	入手先
2-3 で得た再分散液	4ml	-
PBS	125ml	

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
Sephadex G25	4	17-0851-05	GE Healthcare
パスツールピペット	1	1K-PAS-9P	IWAKI
セラムチューブ(4ml)	1	MS-4604	住友ベークライト株式会社
10ml 用ピペットマン	1		GILSON
10ml 用チップ	1		

#### 4.操作手順

		<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
3日目 9:00	1	<p><b>ゲルろ過準備</b></p> <p>Sephadex G25 の先端をはさみで切り、下図のようにセットする。もともと入っている溶液を全て下部より排出した後、上部よりPBS5mlを加え、ゲルを置換する。この操作は計4回行う。</p>	操作の際は、ゴム手袋着用。
		<p><b>調製工程</b></p>	
9:45	1	<p>PBS で置換し終わった Sephadex G25 を Fig. 2 のようにセットする。</p>	
		 <p style="text-align: center;"><b>Fig. 2 ゲル濾過</b></p>	
	2	<p>上部より、2-3 で得たリポソームサンプルを 1ml 加える。</p>	
	3	<p>加えたサンプルが全てゲルに吸収されたら、上部より PBS5ml を加える。</p>	
11:20	4	<p>セラムチューブに排出された溶液が約 3ml 溜まったところで、新しいセラムチューブに交換し、リポソームが存在している白濁液をおよそ 1.5ml 回収する。</p>	リポソームのロスをなるべく少なくするよう気をつける。

工程 No. 1-7	工程	濃度の決定
------------	----	-------

### 1.概要

工程 No. 1-6 で作成したサンプルのリポソーム濃度を測定する。

### 2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したサンプル	約 6.5ml	
可溶化剤 (1M Octyl $\beta$ -D-glucopyranodide)		
DPBS		invitrogen

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
1.5 mL チューブ	1		
15mL ファルコン	7	352196	BD Falcon
ピペットマン	1		GILSON
チップ			
テフロンテープ			
リン脂質 C-テストワコー		433-36201	和光純薬工業株式会社

#### 4.操作手順

3 日目 12:30	<u>測定工程</u>		<u>注意事項</u>		
	1	1.5 mL チューブに各試薬を以下の Table1 に示すような分量で加える。	リポソームサンプルを入れる際、チップの表面はキムワイプでさっと拭き取り、ピペッティングをして、必ず正確な量を入れる。		
	<b>Table.1 可溶化サンプル</b>				
	<b>(<math>\mu</math>L)</b>	<b>4 倍希釈</b>		<b>6 倍希釈</b>	<b>8 倍希釈</b>
	Liposome sample	20		20	20
<b>PBS</b>	20	40		60	
	可溶化剤	40	60	80	
	2	1.5 mL チューブのふたを閉め、15 秒 Vortex にて攪拌する。			
	3	15mL ファルコンに以下の Table2 に示すような分量で検量線サンプルを作成する。			
	<b>Table.2 検量線サンプル</b>				
	<b>基準濃度</b>	<b>基準液</b>	<b>DPBS</b>	<b>発色剤</b>	
4	<b>(mg/mL)</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>	<b>(mL)</b>	
	<b>0</b>	0	20	3	
	<b><math>1.5 \times \frac{734}{774}</math></b>	10	10	3	
	<b><math>3 \times \frac{734}{774}</math></b>	20	0	3	
	<b><math>5.96 \times \frac{734}{774}</math></b>	40	0	3	
	5	15mL ファルコン 3 本にそれぞれ発色剤を 3mL ずつ入れ、調製工程 1-3 で作成した各可溶化サンプルを Vortex した後、20 $\mu$ L ずつ加え、Vortex する。	リン脂質定量キットは通常血清中のリン脂質を測定するのに用いられており、DPPC 量を測定するにあたり補正が必要なため、血清中のリン脂質の平均分子量;774と DPPC の分子量;734 を用いて補正係数 $\frac{734}{774}$ を検量線基準値にかけている。		
		37 $^{\circ}$ C に加温した恒温槽に、各検量線サンプルと製造工			

14:00	6	程 5 で作成した各可溶化サンプルを入れ、10 分静置する。	恒温槽に入れる前に、一度 Vortex をする。(約 2 秒)
	7	調製工程 6 で作成した各サンプルを 96well プレートに 1well に 200 $\mu$ L ずつ 3well 入れる。	
	8	マイクロプレートリーダーで 600nm の波長での吸光度を測定する。	
14:10		<u>解析</u>	発生した泡は、火で消す(チャッカマン等を使用)
	1	測定された検量線サンプルの吸光度を用いて、検量線を作成する。	
	2	作成した検量線に各可溶化サンプルの吸光度を代入すると、可溶化液中の DPPC 濃度が算出されるので、その濃度よりリポソーム濃度を算出する。  <計算式> A: 検量線より得られた DPPC の濃度(mg/mL) B: 希釈倍数 a: DPPC の分子量(mol/L) b: Cholesterol の分子量(mol/L) c: DHSG の分子量(mol/L) d: PEG-DSPE の分子量(mol/L) e: H12-PEG-Glu2C18 の分子量(mol/L)  リポソーム濃度(mg/mL) =  $A \times B \times \frac{(5a+5b+c+0.033d+0.033e)}{5a}$	

工程 No. 2-1	工程	粒子径の測定
------------	----	--------

### 1.概要

光散乱法を用いて、作成したリポソームサンプルの粒子径を測定する。

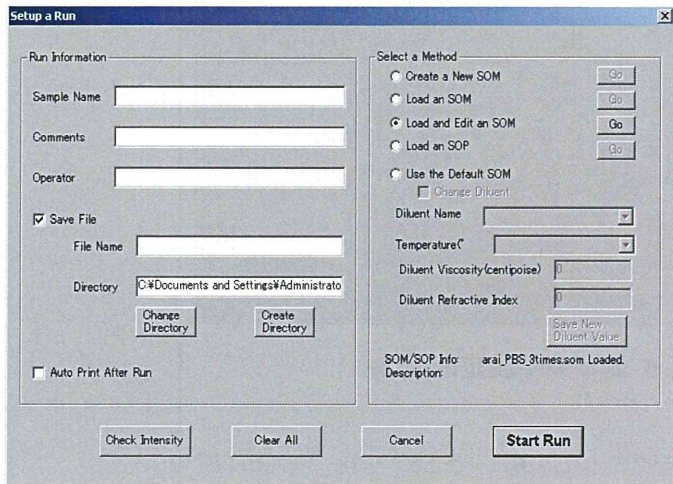
### 2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したリポソームサンプル	3 $\mu$ L	-
DPBS	約 1mL	invitrogen

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
粒子径測定器(N4 PLUS)	1		BECKMAN COULTER
ディスプレイセル	1	01961-001	
0.2 $\mu$ m フィルター	1	25CS020AS	ADVANTEC
1mL シリンジ	1	SS-01T	TERUMO
ピペットマン	1		GILSON
チップ	1		
エアダスター	1	A301J-30	JOINTEX

#### 4. 操作手順

	準備工程	注意事項
1	<p><b>ディスポセルの清掃</b></p> <p>ディスポセルの内部のホコリなどをエアダスターで飛ばす。</p>	<p>操作の際はゴム手袋着用。</p> <p>汚れの有無は目視でも確認すること。</p>
	<p><b>調製工程</b></p>	
1	ディスポセルに 1mL シリンジを用いて孔径 0.2 $\mu$ m フィルターを通した PBS を約 1mL 加える。	セルの底から約 1cm まで加える
2	1 に 2-4 で作成したリポソームサンプルを 3 $\mu$ L 加える。	セルを軽くたたく
3	粒子径測定機にディスポセルをセットし、測定を行う。	
	<p><b>解析</b></p>	
1	解析アプリ『PCS Control』をひらく。	
2	アプリを開いたら、『123』をクリックして、以下の Fig.3 の画面を得る。	
		
	<p>Fig. 3 解析開始画面</p>	



- 3 『Sample name』を入力し、『Save file』を選択する。
- 4 『Select a Method』の『Create a new SOM』で測定条件を以下の Fig.4 と Fig.5 のように設定する。(Repetition で測定回数を設定)

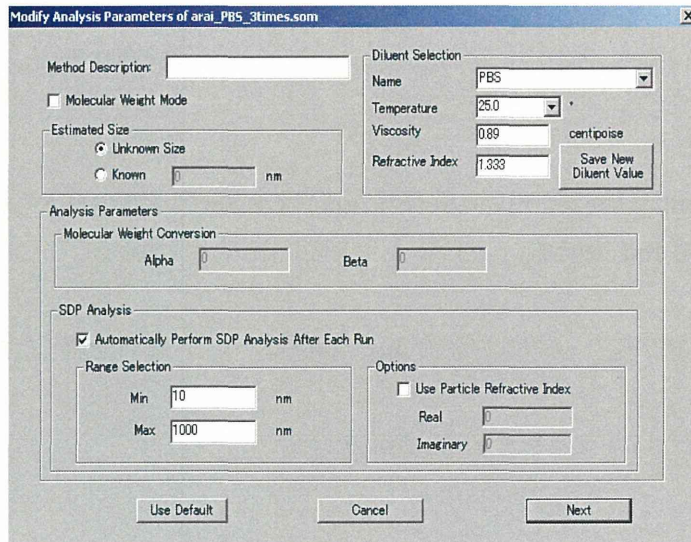


Fig. 4 測定条件設定画面(1)

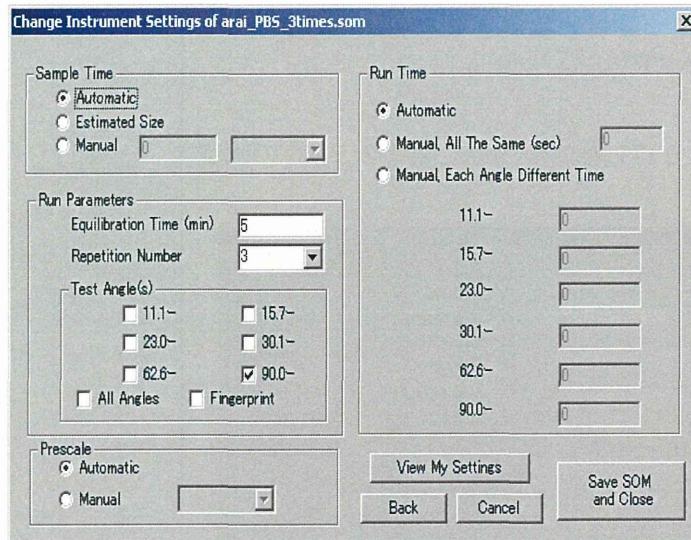


Fig. 5 測定条件設定画面(2)

- 5 『Check intensity』をクリックし、90° で  $5e^{+4} \sim 1e^{+6}$  の間に収まっているか確認をする。

6 『Start Run』をクリックし測定を開始する。

7 測定が終了すると、以下の Fig. 6 のような測定結果画面を得る。

**Sample Name:**

Comments:

Operator:

Temperature:

Start Time:

SOM / SOP name:

Diluent:

End Time:

Angle:

Run Time:

PI-SD:

90.0 °

200 s

0.046

**Unimodal Results Summary**

Rept.#	Mean (nm)	Std.Dev (nm)	Baseline Error	P.I.	Counts/s	Diff.Coeff (m <sup>2</sup> /s)	Overflow
Rept.1	144.9	59.4	0.01%	-0.256	5.48e+05	3.39e-12	0
Rept.2	145.3	61.1	0.02%	-0.301	5.52e+05	3.37e-12	0
Rept.3	143.3	44.2	0.10%	-0.077	5.52e+05	3.42e-12	0
Rept.4	141.8	56.2	0.02%	-0.211	5.44e+05	3.46e-12	0
Rept.5	142.4	50.6	0.02%	-0.128	5.46e+05	3.45e-12	0
Average	143.6	54.31		-0.195			

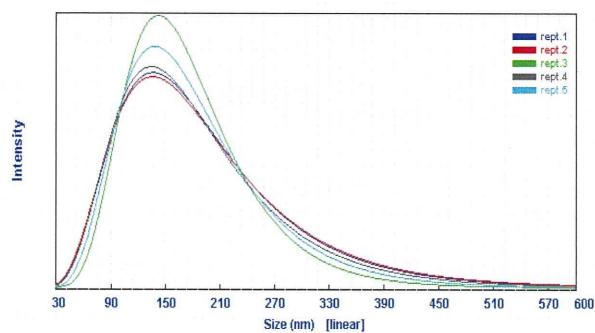


Fig. 6 測定結果画面

工程 No. 2-2	工程	ゼータ電位の測定
------------	----	----------

### 1.概要

作成したリポソームサンプルのゼータ電位を測定する。

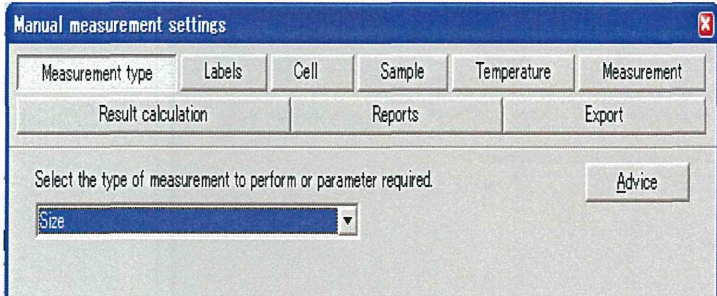
### 2.原料

原料	量	入手先
2-4 で作成したリポソームサンプル	リポソームサンプル濃度による	-
PBS	約 1.5mL	

### 3.使用器具

器具名	数量	規格(コード番号)	購入先
ゼータ電位測定器	1	Zetasizer Nano Z	Malvern
セル	1	DTS 1060	Malvern
0.2 $\mu$ m フィルター	1	25CS020AS	ADVANTEC
1.5mL チューブ	1		
1mL シリンジ	1	SS-01T	TERUMO
ピペットマン	1		GILSON
チップ	1		

#### 4.操作手順

	<u>準備工程</u>	<u>注意事項</u>
	<p><b>セルの洗浄</b></p> <p>測定に使用するセルは、水道水で洗った後、純水で洗い、PBSで置換する。</p>	<p>操作の際はゴム手袋着用。</p> <p>汚れの有無は目視でも確認すること。</p>
	<p><b>調製工程</b></p>	
1	1.5mL サンプルチューブにリポソームサンプルを全量が 1.5mL になるように、PBS で 0.1mg/mL の濃度へ希釈をする。	セルの底から約 1cm まで加える。
2	1mL シリンジに 1 で作成したサンプルを 1mL とり、最初はセルを逆さにして入れ、最上部までサンプルが到達した後、セルの向きを変えて入れる。	空気が入らないようにする。
	<p><b>解析</b></p>	
1	解析アプリ『PTS(nano)』を開き、user name を入力し OK を押す。	
2	アプリを開いたら、『Measure』→『Manual』の順に進み、以下の Fig. 7 の画面を得る。	
		
	<p><b>Fig.7 『Measure』→『Manual』</b></p>	
3	『Measurement type』で『Zeta-potential』を選択する。	