

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：33919

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08258

研究課題名(和文) ナノ粒子の再分散/肺送達に適した吸入粉末製剤化及び体内動態/安全性の包括的評価

研究課題名(英文) Comprehensive investigations on development, biodistribution, and safety of nanoparticle-loaded dry powder formulations for inhalation with high nanoparticle redispersibility and aerosol performance

研究代表者

奥田 知将 (Okuda, Tomoyuki)

名城大学・薬学部・准教授

研究者番号：20513857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：「ナノ粒子の再分散性と肺送達性の双方に優れた吸入粉末製剤化」を実現する処方・製造条件の基礎的情報を集約した結果、トレハロースとロイシンから成る混合賦形剤を用いた噴霧急速凍結乾燥技術の優位性が明らかとなった。ナノ粒子の再分散性について、官能基・ポリエチレングリコール(PEG)修飾により向上できる一方、粒子径による影響は小さいことが示唆された。また、ナノ粒子の官能基・PEG修飾および粒子径が吸入後の肺内動態を制御する重要因子であることに加え、粉末剤ではナノ粒子の再分散性および局所的な高濃度曝露によって液剤とは異なる肺内動態を示す可能性が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リポソームなどの医療用ナノ粒子を応用することで、徐放性あるいは滞留性などのドラッグデリバリー機能を付与した新たな吸入粉末剤の開発が強く望まれている。本研究で得られた知見は、このような製剤を効率的に開発するための極めて有用な情報源となる。特に、吸入粉末製剤化に伴うナノ粒子の再分散が及ぼす肺内動態への影響を動物実験で実証したのは、本研究が初めてと思われる。吸入粉末製剤化は、ナノ粒子とともに生体内安定性に乏しい医薬品候補の臨床応用を実現する方略として有望であり、難治性・致死性の肺疾患に対する画期的な治療法の確立に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, effective excipients and powderization techniques were comprehensively investigated for successful development of nanoparticle-loaded dry powder formulations for inhalation with high nanoparticle redispersibility and aerosol performance, demonstrating the superiority of combination of trehalose and leucine through spray-freeze drying. Moreover, surface modification of nanoparticles with functional groups or polyethylene glycol could significantly improve their redispersibility, whereas their particle size did not affect it. Pharmacokinetic studies in vitro and in vivo showed that distribution or membrane association and permeation of nanoparticles in the lungs after inhalation can be affected by their redispersion and local, highly concentrated exposure in dry powder formulations besides their surface modification and particle size, resulting in their different pharmacokinetics between dry powder and dispersion formulations.

研究分野：薬物送達学、製剤学、薬剤学

キーワード：ナノ粒子 吸入粉末剤 再分散 粉末微粒子設計 エアロゾルデリバリー 噴霧急速凍結乾燥法

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬物の内封・徐放化・標的指向化を達成する機能的ナノ粒子の医療応用が期待されて久しいが、静脈内注射による全身投与の試みが主流で、標的臓器への移行量が不十分である、生体成分との相互作用により、内封薬物が速やかに放出される、などの理由により、実用化は未だ困難な状況にある。肺疾患治療を対象とする新戦略として、「ナノ粒子の吸入粉末製剤化」により、標的臓器の肺内へ直接かつ非侵襲的に送達できる、生体成分が少ない肺内では相互作用を軽減できる、水中で凝集・沈殿しやすいナノ粒子の保存安定性を改善できる、などの実用的な利点を獲得することができる。一方、有用な「ナノ粒子の吸入粉末製剤化」に向けては、製剤溶解後に元のナノ粒子に再分散（または再構築）できるとともに、肺送達に適した粉体物性を制御できる粉末製剤化技術の基盤構築が必要不可欠である。しかし、未だ検討例が極少数であることから「ナノ粒子の吸入粉末製剤化」に有用な基礎的情報が不十分であることに加えて、吸入後のナノ粒子の体内動態および安全性については不明な点が依然多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、「ナノ粒子の再分散性と肺送達性の双方に優れた吸入粉末製剤化」を実現する処方・製造条件（ナノ粒子の物性・含量、賦形剤の組成、粉末製剤化法の選択）の基礎的情報を集約するとともに、その条件を基に製造した粉末製剤を用いてナノ粒子の体内動態および安全性を評価し、ナノ粒子の物性および曝露状態（分散液との違い）の影響について検証した。

### 3. 研究の方法

#### (1) ナノ粒子含有粉末製剤の製造

モデルナノ粒子として、蛍光・無蛍光ポリスチレンナノ粒子の未修飾体（NP）・カルボキシ基修飾体（COOH-NP）・アミノ基修飾体（NH<sub>2</sub>-NP）・ポリエチレングリコール（PEG）修飾体（PEG-NP）を使用した。PEG修飾は、NP分散液に種々のPEG誘導体（表1中でハイフンの前にPEG部分の分子量（ $\times 10^3$ ）、後に脂溶性部分の化学構造（コレステロール（Chol）またはジステアロイルホスファチジルエタノールアミン（DSPE））をそれぞれ表記）を添加後、超音波処理を行うことで施した。各ナノ粒子分散液にトレハロース（Tre）やロイシン（Leu）などの賦形剤を加えて、凍結乾燥（FD）法・噴霧急速凍結乾燥（SFD）法・噴霧乾燥（SD）法により各粉末製剤を製造した。

#### (2) ナノ粒子の再分散性

各粉末製剤を水に溶解して再分散したナノ粒子について、平均粒子径および多分散性指数（PdI）をそれぞれ動的光散乱法により解析した。粉末製剤化前のナノ粒子の結果と比較して各値の変化が小さい場合に「再分散性に優れている」と判断した。

#### (3) ナノ粒子含有粉末製剤の物性

各粉末製剤の粒子形状・吸湿性・結晶性・吸入特性を走査型電子顕微鏡（SEM）観察・動的水蒸気吸着測定（DVS）・粉末X線回折測定（PXRD）・アンダーセンカスケードインパクト（ACI）法によりそれぞれ評価した。DVSでは、25℃で相対湿度（RH）を25→95%に段階的に増加させて得られた吸着等温線から「保存環境での吸湿性」を、また37℃でRHを15→95%に急激に増加させた際の質量増加（吸着量）-時間推移から「肺内環境での吸湿成長性」をそれぞれ評価した。同様にPXRDでも、37℃でRHを15→95%に増加させながら連続的に測定を行った。ACI法では、得られた粉末製剤の沈着パターンを基にして、吸入器からの放出性（OE）・肺への送達性（FPF）・肺深部への送達性（UFPF）の各吸入特性指標値を算出した。

#### (4) ナノ粒子の細胞毒性・細胞層透過性（in vitro）

マイクロプレートに播種したヒト肺がん細胞株（NCI-H441細胞）に各ナノ粒子を添加後、MTTアッセイにより細胞毒性を評価した。また、トランスウェルのメンブランインサートにNCI-H441細胞を播種後、気液界面培養により細胞層を構築して透過実験に用いた。代表者らが開発した粉末分散添加デバイスを用いて、各粉末製剤を細胞層上に添加後、経時的にウェルからサンプリングを行った。240分のサンプリング終了後に膜抵抗値（TEER）を測定し、続いて細胞層もサンプルとして回収した。これらのサンプルの蛍光強度測定により、ナノ粒子の細胞層透過量および結合量を算出した。比較対照として同曝露量となるように各ナノ粒子分散液を添加し、同様の評価を行った。

#### (5) ナノ粒子の肺内動態・肺障害性（in vivo）

各粉末製剤をマウスに肺内投与し、所定の時間に麻酔・解剖して気管支肺胞洗浄液（BALF）の細胞成分（肺胞マクロファージ（AM）のサンプルとして使用）および液性成分（BALFのサンプルとして使用）、肺組織、血液をそれぞれ回収・摘出した。動態実験では、これらのサンプルの蛍光強度測定により、ナノ粒子の分布量を算出した。障害性実験では、マーカーとしてBALF中の乳酸脱水素酵素（LDH）漏出量・有核細胞数・無核細胞数をそれぞれ測定した。比較対照として各ナノ粒子分散液をマウスに肺内投与し、同様の動態実験および障害性実験を行った。また、障害性実験の陰性対照として未処置および水の肺内投与を、また陽性対照としてドデシル硫酸ナトリウム（SDS）およびリポ多糖（LPS）の肺内投与をそれぞれ行い、比較に用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) ナノ粒子の再分散性および粉末製剤の物性

多数の製剤を簡便に製造可能なFD法により、ナノ粒子の再分散に適した賦形剤のスクリーニ

ングを行った結果、Tre が最適であることを見出したが、得られる粉末製剤の気中分散性が乏しく、また吸湿しやすい点が吸入剤応用に向けた大きな課題として認められた。そこで、これらを解決する賦形剤として Leu で Tre の一部を置換することを試みたところ、Tre と同量まで Leu で置換した場合でも、比較的良好なナノ粒子の再分散性が得られた (表 1)。その他、ナノ粒子の再分散に適した処方・製造条件に関して、官能基・PEG 修飾することでナノ粒子の再分散性を改善できること、ナノ粒子の粒子径による再分散性への影響は小さいこと、粉末製剤化法としては「FD 法 ≈ SFD 法 > SD 法」の順でナノ粒子の再分散性が優れていること、粉末製剤中のナノ粒子含量が 50%でも、比較的良好なナノ粒子の再分散性が得られること、をそれぞれ明らかにした (表 1)。SEM 観察において、SFD・SD 製剤はともにミクロンサイズの球形粒子であったが、SFD 製剤が多孔質な中空構造を有するのに対し、SD 製剤は粒子表面が凹凸に富む構造を有するという特徴が見られた (図 1)。

上記の結果を基に、SFD 製剤に絞って物性評価を進めた。吸入特性評価の結果において、Leu の含量増加に伴って各指標値が増加する傾向が見られた (表 2)。特に Leu の含量が 25%以上の SFD 製剤で、OE > 70%・FPF > 40%・UFPF > 12%の良好な吸入特性を示した。一方、ナノ粒子の含量増加に伴って、UFPF が減少する傾向が見られたものの、50%の含量でも比較的良好な吸入特性が得られた。保存環境における SFD 製剤の吸湿性について、高湿度条件下 (RH = 95%)では吸湿により充填量に対して 55%以上の顕著な質量増加が認められたが、一般的な湿度条件下 (RH < 65%)では質量増加が充填量に対して 7%未満に抑えられた。肺内環境における SFD 製剤の吸湿成長性について、全ての SFD 製剤で比較的速度やかな吸湿による質量増加が認められ (図 2)、吸入後の肺内沈着性を高めることにつながると考えられる。各 SFD 製剤の PXRD パターンについて、加湿前 (RH = 15%)の測定で認められなかった各賦形剤原末に対応する結晶性ピークが加湿後 (RH = 95%)の測定で現れたことから (図 3)、一般的な環境下で各 SFD 製剤が非晶質化していることが示唆された。また、加湿後の各 SFD 製剤を用いてナノ粒子の再分散性を評価したところ、加湿前に認められた良好な再分散性が損なわれていた (表 1)。このような SFD 製剤の吸湿に伴う結晶性およびナノ粒子の再分散性の変化は、Leu の含量が多いほど小さい傾向にあった。これらの結果をまとめると、SFD 製剤が有する吸湿性・結晶性・ナノ粒子の再分散性は密接な相互関係をもつと考えられる。

表 1. 各粉末製剤の処方および再分散したナノ粒子の粒子径解析値 (n = 3, Mean ± S.D.)

Formulation	Composition (%)	PEG derivative	Tre/Leu ratio	Size distribution of reconstituted NP	
				Mean particle size (nm)	PdI
FD#1	50 nm NP (100)	-	-	1035 ± 571	0.682 ± 0.090
FD#2	50 nm NP (10)/Tre (45)/Leu (45)	-	50/50	470 ± 178	0.465 ± 0.108
FD#3	50 nm COOH-NP (100)	-	-	514 ± 115	0.545 ± 0.085
FD#4	50 nm COOH-NP (10)/Tre (90)	-	100/0	65.2 ± 1.4	0.128 ± 0.030
FD#5	50 nm COOH-NP (10)/Leu (90)	-	0/100	2073 ± 308	0.907 ± 0.060
FD#6	50 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	73.8 ± 0.8	0.230 ± 0.015
FD#7	50 nm COOH-NP (50)/Tre (37.5)/Leu (12.5)	-	75/25	69.5 ± 0.3	0.170 ± 0.003
FD#8	50 nm PEG-NP (30)/Tre (35)/Leu (35)	PEG2-Chol	50/50	108 ± 1	0.249 ± 0.003
<b>SFD#1</b>	50 nm NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	211 ± 70	0.465 ± 0.079
<b>SFD#2</b>	50 nm NP (10)/Tre (45)/Leu (45)	-	50/50	289 ± 134	0.689 ± 0.112
<b>SFD#3</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (81)/Leu (9)	-	90/10	101 ± 3	0.240 ± 0.006
<b>SFD#3 (humidified)</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (81)/Leu (9)	-	90/10	509 ± 116	0.851 ± 0.085
<b>SFD#3*</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (80.1)/Leu (8.9)/FINa (1)	-	90/10	No data	No data
<b>SFD#4</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	112 ± 1	0.294 ± 0.024
<b>SFD#4 (humidified)</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	406 ± 46	0.712 ± 0.059
<b>SFD#4*</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (66.75)/Leu (22.25)/FINa (1)	-	75/25	No data	No data
<b>SFD#5</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (45)/Leu (45)	-	50/50	154 ± 1	0.411 ± 0.046
<b>SFD#5 (humidified)</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (45)/Leu (45)	-	50/50	329 ± 50	0.454 ± 0.099
<b>SFD#5*</b>	50 nm COOH-NP (10)/Tre (44.5)/Leu (44.5)/FINa (1)	-	50/50	No data	No data
<b>SFD#6*</b>	50 nm COOH-NP (20)/Tre (59.25)/Leu (19.75)/FINa (1)	-	75/25	No data	No data
<b>SFD#7*</b>	50 nm COOH-NP (50)/Tre (36.75)/Leu (12.25)/FINa (1)	-	75/25	No data	No data
SFD#8	200 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	216 ± 3	0.0620 ± 0.0139
SFD#9	750 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	850 ± 36	0.194 ± 0.070
<b>SFD#10</b>	50 nm NH <sub>2</sub> -NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	121 ± 1	0.223 ± 0.010
<b>SFD#11</b>	50 nm PEG-NP (30)/Tre (35)/Leu (35)	PEG2-Chol	50/50	109 ± 1	0.183 ± 0.010
SFD#11 (humidified)	50 nm PEG-NP (30)/Tre (35)/Leu (35)	PEG2-Chol	50/50	554 ± 6	0.506 ± 0.028
SFD#12	50 nm PEG-NP (60)/Tre (20)/Leu (20)	PEG2-Chol	50/50	93.3 ± 0.8	0.150 ± 0.007
<b>SFD#13</b>	50 nm PEG-NP (30)/Tre (35)/Leu (35)	PEG2-DSPE	50/50	104 ± 1	0.151 ± 0.007
<b>SFD#14</b>	50 nm PEG-NP (60)/Tre (20)/Leu (20)	PEG5-DSPE	50/50	109 ± 1	0.148 ± 0.004
<b>SD#1</b>	50 nm NP (10)/Tre (45)/Leu (45)	-	50/50	302 ± 41	0.711 ± 0.073
SD#2	50 nm COOH-NP (10)/Tre (67.5)/Leu (22.5)	-	75/25	272 ± 20	0.474 ± 0.041
SD#3	50 nm PEG-NP (30)/Tre (35)/Leu (35)	PEG2-Chol	50/50	229 ± 12	0.456 ± 0.012

※太字で示した製剤を以下の評価で使用した。また\*がついた製剤は吸入特性評価用で、定量用の蛍光ラベルとしてフルオレセインナトリウム (FINa)を1%の含量となるように添加した。

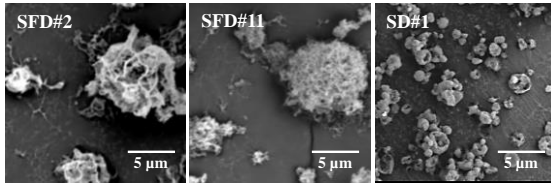


図1. SFD 製剤および SD 製剤の SEM 画像

表2. 各 SFD 製剤の吸入特性指標値 (n = 3, Mean ± S.D.)

Formulation	OE (%)	FPF (%)	UFPF (%)
SFD#3*	74.7 ± 13.4	25.5 ± 4.7	11.3 ± 1.9
SFD#4*	73.8 ± 11.9	45.0 ± 16.5	23.4 ± 9.4
SFD#5*	87.9 ± 5.7	60.9 ± 4.1	37.5 ± 4.9
SFD#6*	85.1 ± 9.9	60.9 ± 5.4	15.7 ± 4.6
SFD#7*	78.2 ± 10.4	42.2 ± 6.3	12.4 ± 2.7

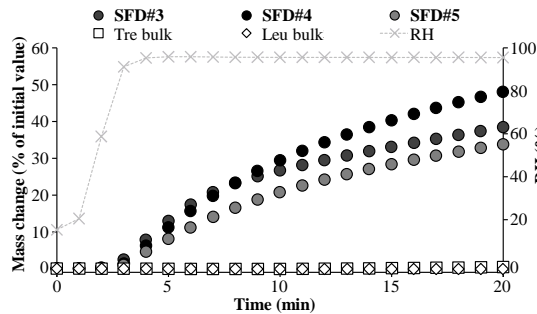


図2. 各 SFD 製剤の加湿による質量増加-時間推移

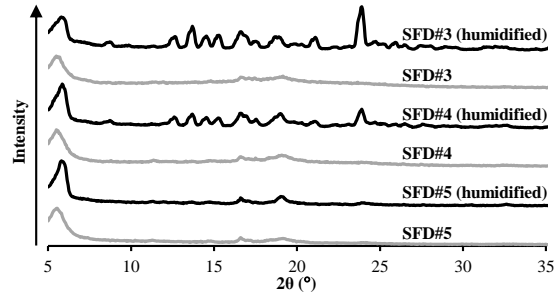


図3. 各 SFD 製剤の加湿前後の PXRD パターン変化

## (2) ナノ粒子の細胞毒性・細胞層透過性 (in vitro)

ナノ粒子の細胞毒性について、NP および COOH-NP では評価した濃度範囲で細胞生存率の低下が見られなかったのに対し、NH<sub>2</sub>-NP および一部の PEG-NP では濃度依存的な細胞生存率の低下が見られた。正電荷を帯びた NH<sub>2</sub>-NP は、負電荷を帯びた細胞膜との静電的相互作用を介して、細胞膜の不安定化や流動性変化などの理由により細胞死を生じたと考えられる。一方、PEG-NP の細胞毒性は、ナノ粒子自身に由来するものではなく、修飾に用いた PEG 誘導体に起因することが明らかとなった。また、PEG 部分の分子量が大きく、さらに脂溶性部分が Chol よりも DSPE から成る PEG 誘導体を用いた方が、PEG-NP の細胞毒性が低いことを見出した。

分散液として細胞層に添加した際のナノ粒子の透過量について、NP・COOH-NP・PEG-NP では極めて少なかったのに対し、NH<sub>2</sub>-NP ではこれらのナノ粒子よりも顕著に多かった (表3)。同様に、細胞層結合量についても、NH<sub>2</sub>-NP でより多い傾向が見られた。一方、ナノ粒子の種類に依らず、分散液よりも粉末製剤として添加した方がナノ粒子の細胞層結合量・透過量ともに多い結果となった (表3)。これまでに低分子および高分子化合物でも同様の結果が得られており、粉末製剤が細胞層上で溶解した際に生じる局所的なナノ粒子の高濃度曝露が細胞結合性・透過性の亢進に寄与していると推察される。また、透過実験時の温度を下げることで、粉末製剤添加後のナノ粒子の細胞層結合量・透過量が有意に減少したことから、ナノ粒子の細胞層輸送にエンドサイトーシスおよびトランスサイトーシスが一部関与していることが示唆された。なお、COOH-NP については、ウェルの培地中に含まれるカルシウム・マグネシウムとの共存下で凝集体を形成することを確認しており、これにより透過性評価用サンプルの定量性が低下したために粉末製剤添加時の細胞層透過量の増加が不明瞭になったと考えられる。一方、PEG2-Chol を用いた PEG-NP の分散液および粉末製剤添加でのみ細胞毒性に起因すると考えられる TEER の低下が認められた (表3)。

表3. 添加 240 分後のナノ粒子の細胞層結合量・透過量および TEER 変化 (n = 3, Mean ± S.D.)

Formulation	Associated amount (% of estimated exposure dose)	Permeated amount (% of estimated exposure dose)	TEER (% of no treatment)
50 nm NP dispersion	5.70 ± 0.14	0.205 ± 0.010	101 ± 7
SFD#1	37.5 ± 4.4	0.687 ± 0.018	95.4 ± 9.2
50 nm COOH-NP dispersion	3.01 ± 0.02	0.204 ± 0.036	98.0 ± 13.9
SFD#4	20.7 ± 1.5	0.295 ± 0.065	92.7 ± 1.6
50 nm NH <sub>2</sub> -NP dispersion	9.96 ± 1.42	14.6 ± 2.8	81.8 ± 8.4
SFD#10	17.0 ± 2.7	26.8 ± 3.4	88.6 ± 8.6
50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-Chol)	3.73 ± 0.54	0.240 ± 0.269	40.6 ± 3.6
SFD#11	12.0 ± 1.4	0.690 ± 0.191	52.3 ± 6.0
50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-DSPE)	4.34 ± 0.11	0.152 ± 0.024	130 ± 13
SFD#13	11.9 ± 2.0	0.367 ± 0.170	125 ± 23

## (3) ナノ粒子の肺内動態・肺障害性 (in vivo)

分散液として投与した際のナノ粒子の肺内動態を比較することで、官能基・PEG 修飾および粒子径の効果について検証した。官能基修飾の有無に依らず、NP は投与後速やかに気道内 (BALF) から肺組織へと移行し、AM 中および血中での分布量は極わずかであった。肺組織中での分布量に関して、NP および COOH-NP では長時間にわたり維持されるのに対し、NH<sub>2</sub>-NP では経時

的に減少する傾向が見られた。正電荷を帯びた NH<sub>2</sub>-NP は、負電荷を帯びた気道上皮細胞膜との静電的相互作用によりエンドサイトーシスを介した細胞内取り込みが亢進した結果、エンドソームからリソソームへと移行する過程でナノ粒子中の蛍光物質が分解あるいは pH 低下に伴って蛍光性を消失したと推察される。また、PEG-NP では、NP と比べて気道内 (BALF) から肺組織への移行が遅延する傾向が見られ、ナノ粒子表面に形成する水和層の効果が窺えた (図 4)。一方、粒子径が異なる COOH-NP の肺内動態に関して、粒子径が増大するにつれて AM 中での分布量が増加するとともに、肺組織中での分布量が減少する傾向が見られた。この結果は、シングルマイクロンサイズの粒子が AM による貪食を受けやすいという特徴を支持している。

再分散性が異なる NP および PEG-NP 含有 SFD 製剤を投与した際のナノ粒子の肺内動態について、分散液の結果とそれぞれ比較した (図 4)。再分散性に乏しい NP 含有 SFD 製剤では、分散液と比べて AM 中での分布量が多く、肺内で溶解後に NP の凝集体を形成して AM による貪食を受けやすくなったと考えられる。一方、再分散性に優れた PEG-NP 含有粉末製剤では、分散液と同様に AM 中での分布量が少なく、肺内での NP の凝集体形成が抑制されたと推察される。また、PEG2-Chol よりも PEG2-DSPE および PEG5-DSPE を用いた PEG-NP の方が、分散液と SFD 製剤の投与による肺内動態の差異が小さいことを見出した。この理由について詳細は不明であるが、脂溶性部分が DSPE よりも Chol から成る PEG 誘導体の方が、肺内で SFD 製剤が溶解する際にナノ粒子から引き抜かれやすいためと思われる。

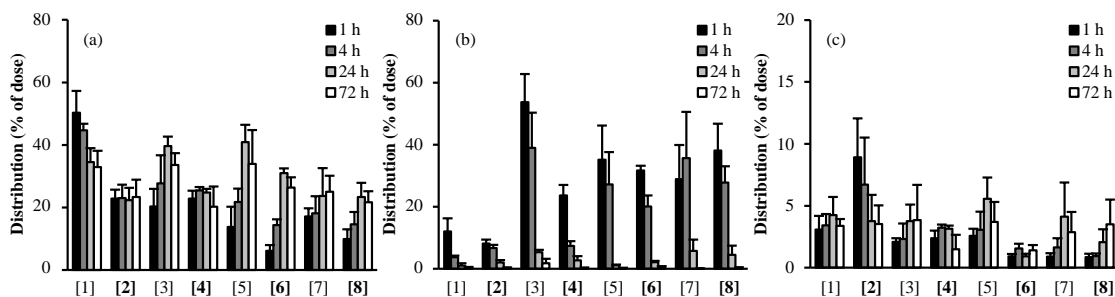


図 4. 肺内投与後のナノ粒子の肺内分布-時間推移: (a) 肺組織, (b) BALF, (c) AM (n = 3-5, Mean + S. D.)

[1] 50 nm NP dispersion, [2] SFD#2, [3] 50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-Chol), [4] SFD#11, [5] 50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-DSPE), [6] SFD#13, [7] 50 nm PEG-NP dispersion (PEG5-DSPE), [8] SFD#14

マウスでの肺障害性評価の結果に関して、陰性対照群と比べて PEG2-Chol を用いた PEG-NP の投与群では、LDH 漏出量の明確な差が認められなかったものの、有核細胞数・無核細胞数とともに陽性対照群と同様の高値を示し、出血・炎症を伴う肺障害を生じることが窺えた (表 4)。一方、その他のナノ粒子投与群では、LDH 漏出量・有核細胞数・無核細胞数の全てにおいて陰性対照群と明確な差が認められなかった。これらの結果は、培養細胞での細胞毒性および TEER 変化の結果と一致しており、評価したナノ粒子の多くは肺障害性が比較的軽微であると考えられる。また、興味深いことに、分散液と比べて SFD 製剤として投与した場合には、肺障害性がより低い傾向が見られた。この理由について詳細は不明であるが、曝露状態の違いが影響していると考えられる。

表 4. 肺内投与 24 時間後の BALF 中の LDH 漏出量・有核細胞数・無核細胞数 (n = 3-14, Mean ± S. D.)

Treatment	LDH elution (U/mL)	Nucleated cell number (× 10 <sup>4</sup> cells)	Anucleated cell number (× 10 <sup>4</sup> cells)
No treatment (negative control)	1.81 ± 0.54	4.13 ± 2.99	1.44 ± 8.7
Water (negative control)	3.02 ± 1.08	9.55 ± 4.26	28.9 ± 28.0
SDS (positive control)	10.6 ± 1.5	24.3 ± 4.2	151 ± 80
LPS (positive control)	4.75 ± 1.72	66.1 ± 27.4	60.6 ± 38.5
50 nm NP dispersion	2.04 ± 0.45	26.5 ± 15.7	28.3 ± 31.9
SFD#2	1.73 ± 0.05	7.49 ± 1.89	2.44 ± 2.54
50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-Chol)	4.05 ± 0.83	68.6 ± 88.4	104 ± 103
SFD#11	2.49 ± 0.33	20.1 ± 11.0	3.52 ± 2.55
50 nm PEG-NP dispersion (PEG2-DSPE)	3.95 ± 1.90	11.2 ± 3.7	64.7 ± 68.5
SFD#13	1.48 ± 0.30	13.1 ± 8.5	0.610 ± 0.165

以上の結果より、ナノ粒子の官能基・PEG 修飾により粉末製剤化後の再分散性を向上できる一方、ナノ粒子の粒子径による再分散性への影響は小さいことが示唆された。特に、ナノ粒子の再分散性と肺送達性の双方に優れた吸入粉末製剤化において、Tre と Leu から成る混合賦形剤を用いた SFD 技術の優位性が明らかとなった。また、ナノ粒子の官能基・PEG 修飾および粒子径は吸入後の肺内動態を制御する重要因子であることに加え、吸入粉末剤ではナノ粒子の再分散性および局所的な高濃度曝露によって液剤とは異なる肺内動態を示す可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 坂本一樹、奥田知将、須田冴香、岡本浩一
2. 発表標題 粉末製剤溶解後のナノ粒子の再分散性・細胞毒性に及ぼすPEG誘導体の効果
3. 学会等名 第65回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 照屋利歩、奥田知将、石田絵里衣、岡本浩一
2. 発表標題 ナノ粒子の物性および再構築性が及ぼす気道内投与後の肺内分布挙動への影響
3. 学会等名 第35回日本DDS学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田知将
2. 発表標題 肺内でナノ粒子を構成するドラッグデリバリーシステム型吸入粉末剤の開発とその評価
3. 学会等名 日本薬剤学会第34年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂本一樹、奥田知将、伊藤優香、岡本浩一
2. 発表標題 吸入用粉末微粒子に充填したナノ粒子の気液界面細胞培養系での透過特性
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoyuki Okuda, Fumika Santo, Hirokazu Okamoto
2. 発表標題 Comprehensive information for efficient development of nanoparticle-loaded dry powder inhalation formulations
3. 学会等名 2018 Controlled Release Society Annual Meeting & Exposition (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田知将
2. 発表標題 噴霧急速凍結乾燥技術を基盤とした肺深部送達型吸入粉末剤の開発とその応用
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 伊藤優香、奥田知将、坂本一樹、岡本浩一
2. 発表標題 ナノ粒子搭載型吸入粉末剤の開発を指向したナノ粒子の表面修飾の効果
3. 学会等名 日本薬剤学会第33年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田知将、山東史佳、岡本浩一
2. 発表標題 ナノ粒子の再分散に適した噴霧急速凍結乾燥微粒子の粉体特性
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木健太郎、伊藤優香、奥田知将、岡本浩一
2. 発表標題 ナノ粒子のin vitro粘膜吸収評価を指向した基礎的検討
3. 学会等名 第63回日本薬学会東海支部大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山東史佳、奥田知将、岡本浩一
2. 発表標題 肺での沈着とナノ粒子の再構築に適した吸入粉末剤の開発に向けた基礎研究
3. 学会等名 日本薬剤学会第32年会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	岡本 浩一  (Okamoto Hirokazu)  (00308941)	名城大学・薬学部・教授    (33919)	