

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22300171

研究課題名（和文）薬を肺に飛ばして結核を治す DDS の開発

研究課題名（英文）Inhalation of antitubercular agents for efficient treatment of tuberculosis

研究代表者

寺田 弘 (Hiroshi Terada)

東京理科大学・総合研究機構・教授

研究者番号：00035544

研究成果の概要（和文）：

抗結核薬を含有した微粒子製剤を経気道投与装置を用いて結核の疾患部位である肺胞に直接ピンポイント送達することが肺結核の治療にとって有用であることを明らかにした。このためには、乳酸とグリコール酸の共重合体である PLGA を基剤として用いて、マクロファージに貪食されやすく、抗菌活性が高くしかも肺結核の疾患部位である肺胞にまで送達可能な微粒子製剤を調製することが必要であり、これらの目標を達成した。また、肺の総体積が数ミリリットルと小さなラットに微粒子製剤を肺全域に均一に送達可能にする経気道投与装置を Venturi 効果を利用して開発することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

We found that intratracheal administration apparatus was beneficial to local delivery of antituberculosis agent formulated into dry powder microparticles to the lung of laboratory animals. The dry powders consisted of poly(glycolic-co-lactic) acid (PLGA) and the antitubercular agent rifampicin showed high antituberculosis activity in intracellularly residing *Mycobacterium bovis* BCG by their efficient taken up by the macrophages in such a way that the powders were distributed widely in the alveoli region. We succeeded in developing the intratracheal administration apparatus based on Venturi effect and homogeneous delivery of the dry powders into the lung of rats, the volume of which was in a range of only several milliliters.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ドラッグデリバリー

 1. 研究開始当初の背景  
 未だ完治療法の開発されていない慢性

 難治性感染症である結核に対する有効な  
 治療法を構築するためには、肺結核の病巣

である肺胞に直接抗結核薬を送達することが有効である。結核菌は肺胞中で主として貪食細胞であるマクロファージ内に取り込まれ、そこで分解を受けることなく増殖している。したがって、抗結核薬は結核菌感染マクロファージを標的として送達する必要がある。

本研究開始当時において、このアイデアに基づいて結核菌感染マクロファージに対する抗結核薬含有微粒子製剤の効果が試験管内において我々を含めいくつかの研究グループによって調べられていた。いずれのグループも微粒子製剤はマクロファージに感染した結核菌に対して非常に高い抗菌活性を示すことを見いだしていた。しかし、マクロファージの微粒子製剤に対する貪食活性の特性、貪食されやすい微粒子製剤の調製などに関しては殆ど明らかにされていないばかりか、肺結核ラットなどにおける *in vivo* の効果に関する研究されていない状況にあった。

## 2. 研究の目的

本研究は、1) マクロファージに貪食されやすく、しかもマクロファージに対して無害な微粒子製剤の調製、2) 肺胞にまで効率的に到達し、しかも肺内に均一に分布可能な微粒子製剤の調製、3) 微粒子製剤を肺胞にまで送達させる経気道投与装置の開発を主として行うとともに、これらの研究成果に基づいて、4) 微粒子製剤の抗結核作用をラットなどの小動物において調べることを目的としている。

## 3. 研究の方法

1) マクロファージに貪食されやすく、無害な微粒子製剤の調製：乳酸とグリコール酸の共重合体である PLGA を基剤として用いた種々の微粒子製剤を調製し、これに対する肺胞マクロファージの貪食活性を種々の条件下で調べた。その際、その存在を確認しやすい赤色を呈するリファンピシンを抗結核薬として用いた。2) 肺胞にまで効率的に到達し、肺内全域に均一に分布可能な微粒子製剤の調製：PLGA 微粒子製剤の肺胞への到達性を経気道投与装置を用いて調べた。3) 経気道投与装置の開発：微粒子製剤をラットなどの小動物肺全域に均一に分布させるために、主として Venturi 効果に基づいて小型送達装置の開発に取り組んだ。

## 4. 研究成果

本研究の概要は図 1 に示すとおりである。すなわち、肺胞マクロファージ内に感染した結核菌に対する抗結核薬の作用を効率的に発現するために微粒子製剤を調製して経気道投与装置を用いて肺胞にまでピンポ

イント送達させることである。その際に、マクロファージに対して効率よく貪食さ

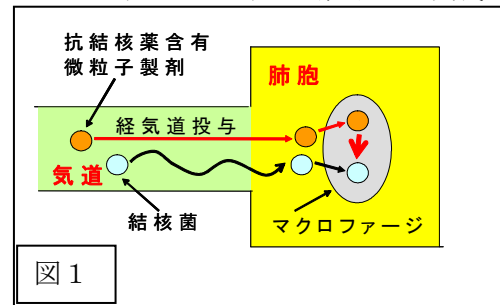


図 1

れ得る微粒子製剤の性質を明らかにする必要がある。

研究の結果、以下に記す成果をあげることができた。

### 1) 肺胞マクロファージの貪食能と微粒子製剤

- A) 粒子径 3  $\mu\text{m}$  程度の粒子が最も貪食されやすく、抗結核菌作用も高かった。
- B) PLGA 微粒子製剤は肺胞マクロファージの機能に対して全く無害であった。これは、貪食に際して一酸化窒素やサイトカイン産生を促さないためであった。
- C) ポリスチレンラテックス粒子は、貪食関連レセプターとシグナル伝達レセプターに認識され、PLGA 粒子は貪食関連レセプターのみにより認識されていたことが示唆された。
- D) PLGA 微粒子製剤はマクロファージ膜中に存在するラフトドメインを介して貪食された。
- E) PLGA 微粒子製剤のマクロファージへの取り込みは、マクロファージの貪食能を活性化した。
- F) 肺胞マクロファージの微粒子製剤応答性に加えて、これまで十分に研究されていなかった肺間質マクロファージの性状とその生理的役割を明らかにした。

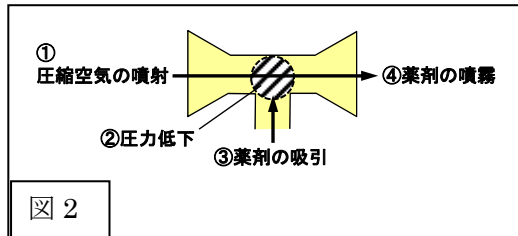
### 2) 肺胞マクロファージへの微粒子送達

- A) 肺内の様な高湿度下でも安定なエアロゾル特性を示す PLGA のナノコンポジット粒子をロイシンとアルギニンを賦形剤として用いることによって調製することが可能になった。
- B) 小動物において抗結核活性を測定するために必要な肺結核モデルラットは、フロイント完全アジュバントにより感作したラットに BCG を感染させることによって作出することに成功した。このモデルラットは慢性的結核感染ラットとして有用である。
- C) PLGA 微粒子製剤の結核感染ラットに対する抗結核効果を経気道投与によって調べた結果、顕著な抗結核作用を示した。この結果は、肺結核治療

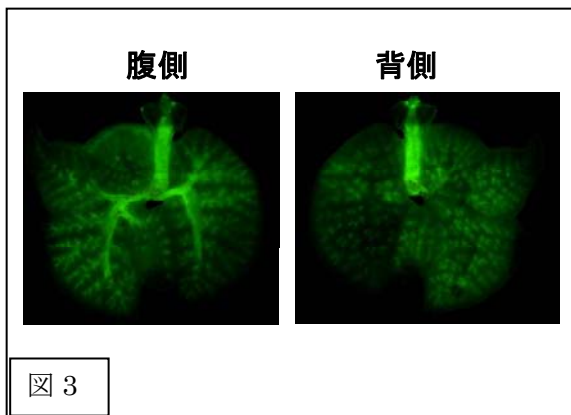
において経気道投与の有用性を示した世界で始めてのものである。

3) 経気道投与装置の開発

- A) ベルヌーイの定理を活用し、Venturi 効果を生ずることのできるラット用経気道投与装置の開発に成功した。その原理を図 2 に示す。



- B) 本装置を用いてラット肺に PLGA 微粒子製剤を送達した結果、図 3 に示すようにラット肺全域に微粒子製剤が分布していた。



- C) この装置の開発は特許申請中である。  
種類：特許、特願  
番号：2010-114759  
出願年月日：2010 年 5 月 18 日

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Keiji Hirota, Tadafumi Kawamoto, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Distribution and deposition of respirable PLGA microspheres in lung alveoli, Colloids and Surfaces B-Biointerfaces 査読有 105 巻, 2013, 92-97.
2. Keiji Hirota, Hiroshi Terada, Endocytosis of particle formulations

by macrophages and its application to clinical treatment molecular regulation of endocytosis 査読有 16 巻, 2012, 413-428.

3. Keiji Hirota, Taizo Hasegawa, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino Hiroshi Terada, Phagostimulatory effect of uptake of PLGA microspheres loaded with rifampicin on alveolar macrophages Colloids and Surfaces B-Biointerfaces, 査読有 87 巻, 2011, 293-298.
4. Yoshihiro Uto, Syota Yamamoto, Ryota Takeuchi, Yoshinori Nakagawa, Keiji Hirota, Hiroshi Terada, Shinya Onizuka, Eiji Nakata, Hitoshi Hori, Effect of the Gc-derived macrophage-activating factor precursor (preGcMAF) on phagocytic activation of mouse peritoneal macrophages, Anticancer Research, 査読有 31 巻 7 号, 2011, 2489-2492.
5. Amit Misra, Anthony J. Hickey, Carlo Rossi, Gerrit Borchard, Hiroshi Terada, Kimiko Makino, P. Bernard Fourie and Paolo Colombo, Inhaled drug therapy for treatment of tuberculosis Tuberculosis, 査読有 91 巻, 2011, 71-81.
6. Goshi Nagao, Kazuo Ishii, Keiji Hirota, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Role of lipid rafts in innate immunity and phagocytosis of polystyrene latex microspheres, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 査読有 84 巻, 2011, 317-324.
7. Goshi Nagao, Kazuo Ishii, Keiji Hirota, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Role of lipid rafts in phagocytic uptake of polystyrene latex microspheres by macrophages, Anticancer Research, 査読有 30 巻, 2010, 3167-3176.
8. Tomoya Onoshita, Yuta Shimizu, Naomitsu Yamaya, Masakazu Miyazaki, Mihoko Yokoyama, Naruyoshi Fujiwara, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada, Makoto Haga, The behavior of PLGA microspheres containing rifampicin in alveolar macrophages, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

- 査読有 76 卷, 2010, 151-157.
9. Keiji Hirota, Taizo Hasegawa, Takehisa Nakajima, Hiroyuki Inagawa, Chie Kohchi, Gen-Ichiro Soma, Kimiko Makino Hiroshi Terada, Delivery of rifampicin-PLGA microspheres into alveolar macrophages is promising for treatment of tuberculosis, J. Controlled Release, 査読有142巻, 2010, 339-346.

〔学会発表〕(計 39 件)

1. 福原いづみ, 慢性結核モデルラットに対する微粒子製剤の肺内投与による治療効果, 日本薬学会第133年会, 2013年03月27日~2013年03月30日, パシフィコ横浜
2. 廣田慶司, マクロファージによるナノ微粒子およびマイクロ微粒子の取り込み活性, 日本薬学会第133年会, 2013年03月27日~2013年03月30日, パシフィコ横浜
3. 山田莉世, 慢性肺結核モデルマウスにおける肉芽腫内結核菌への微粒子製剤の送達性, 日本薬学会第133年会, 2013年03月27日~2013年03月30日, パシフィコ横浜
4. 牧野公子, 新しい医療ニーズを目指した新しい治療法について, 第4回粉末吸入剤研究会シンポジウム, 2012年11月16日, ANAクラウンラザホテル富山
5. Riyo Yamada, Delivery of Nano- and Micro-particles to the Lung of Chronic Tuberculosis Model Mice, 4th Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2012年10月29日, Tokyo Morito Hall
6. Keita Yaginuma, Size-dependent Uptake of Polystyrene Latex Particles by Alveolar Macrophages, 4th Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2012年10月29日, Tokyo Morito Hall
7. Keiji Hirota, Venturi Insufflator Optimizes Mycobactericidal Effect of Rifampicin-incorporated PLGA Dry Powders, 4th Indo-Japanese International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2012年10月29日, Tokyo Morito Hall
8. Keiji Hirota, Effect of particle size on endocytic uptake by alveolar macrophage cells, 39th Annual Meeting of the

- Controlled Release Society, 2012年07月15日~2012年07月18日, Quebec Canada
9. 廣田慶司マクロファージの微粒子取り込みに対するサイズの影響, 第28回日本DDS学会学術集会, 2012年07月04日~2012年07月05日, 2012札幌コンベンションセンター
  10. 向井大貴, 1s1sおよび22型Gc proteinの脱ガラクトース体におけるマクロファージ活性化能の評価, 日本薬学会第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学
  11. 新井優子, 簡便な結核菌数測定法の開発, 日本薬学会第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学
  12. 廣田慶司, 粉末微粒子製剤を肺へ均一に噴霧できるVenturi型デバイスの開発と肺結核治療への応用, 日本薬学会第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学
  13. 竹前秀紀, 肺結核治療における新たな標的細胞としての肺間質マクロファージ, 日本薬学会第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学
  14. 松本嵩史, ビスベンジルイソキノリン誘導体の立体構造とラジカル消去活性の相関, 薬学会第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学
  15. 山本武範, プロテオミクスで解き明かすミトコンドリアからのシトクロムc放出機構, 薬学会第132年会, 2012年3月29日, 北海道大学
  16. Kimiko Makino, Effective drug delivery system to overcome intractable infectious diseases, Japan-India Joint Workshop on Biomedical Research, 2012年2月28日~2月29日, Center for Advanced Biomedical Sciences, Waseda University, Twins, Tokyo
  17. 宇都義浩,  $\beta$ -ガラクトシダーゼによる糖鎖修飾を受けた1s1sおよび22型Gcグロブリンのマクロファージ活性化能の評価, 第15回バイオ治療法研究会, 2011年12月3日, 福岡大学病院 福大メディカルホール
  18. 福原いづみ, 肉芽腫を伴う慢性結核モデルラットに対する抗結核薬含有微粒子製剤の吸入による結核治療, 第2回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム・第9回東京理科大学薬学部 DDS研究センターシンポジウム, 2011年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
  19. 新井優子, 迅速的な結核菌数測定法の確立, 第2回東京理科大学総合研究

- 機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム・第9回東京理科大学薬学部 DDS研究センターシンポジウム, 2011年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
20. 竹前秀紀, 肺における結核菌の感染部位に関する検討, 第2回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム・第9回東京理科大学薬学部 DDS研究センターシンポジウム, 2011年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
21. 廣田慶司, 微粒子製の肺への送達による結核治療法の展開と問題点, 第2回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム・第9回東京理科大学薬学部 DDS研究センターシンポジウム, 2011年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
22. 白井俊太郎, 難治性肺炎患の薬物療法を目指した微粒子製剤の条件検討, 第2回東京理科大学総合研究機構 戦略的物理製剤学研究基盤センターシンポジウム・第9回東京理科大学薬学部 DDS研究センターシンポジウム, 2011年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
23. 牧野公子, 肺胞マクロファージによる粒子取り込みに与える表面物性の影響, 第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9月7日～9月9日, 京都大学吉田キャンパス
24. Keiji Hirota, Potent antituberculosis activity by pulmonary delivery of PLGA microspheres loaded with the antituberculosis agent rifampicin, The 38th Annual Meeting and Exposition of the Controlled Release Society, August 1～2 2011, National Harbor, Maryland U. S. A. Gaylord National Hotel
25. 廣田慶司, ベンチュリ効果を利用した微粒子製剤のエアロゾル化と肺胞への送達, 第27回日本DDS学会学術集会, 2011年6月9日～6月10日, 東京大学本郷キャンパス
26. Keishiro Tomoda, Pulmonary drug delivery system for efficient treatment of tuberculosis, Third Indo-Japan International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2010年12月13日～12月14日, 東京理科大学森戸記念館
27. Keiji Hirota, Potent anti-tuberculosis activity achieved by inhalation of rifampicin-loaded PLGA microspheres with a use of Venturi-type insufflators, Third Indo-Japan International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2010年12月13日～12月14日, 東京理科大学森戸記念館
28. Shun-Ichi Kimura, Gene expressions of alveolar macrophages induced by phagocytosis of artificial microspheres, Third Indo-Japan International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2010年12月13日～12月14日, 東京理科大学森戸記念館
29. Sinichi Fukunaga, Inhalable nanocomposite particles for cure for tuberculosis, Third Indo-Japan International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2010年12月13日～12月14日, 東京理科大学森戸記念館
30. Hideki Takemae, Development of pulmonary tuberculosis model with granulomas in a short term using bacille calmette-guerin, Third Indo-Japan International Joint Symposium on Overcoming Intractable Infectious Diseases Prevalent in Asian Countries, 2010年12月13日～12月14日, 東京理科大学森戸記念館
31. 廣田慶司, 肺胞マクロファージの活性化による抗結核菌作用の誘導, 第14回バイオ治療法研究会学術集会, 2010年12月11日, 福岡大学七隈キャンパス
32. Hiroshi Terada, Uptake of PLGA microspheres by alveolar macrophages in association with tuberculosis therapy, 6th International Symposium on Innovations in Pharmaceutical Sciences and Technology, November 26～28, 2010, Hotel Cambay Grand, India
33. 友田敬士郎, 蓄肺投与を目的としたナノ粒子製剤, オレオナノサイエンスシンポジウム2010, 2010年11月4日, 東京理科大学森戸記念館
34. 廣田慶司, 人工呼吸式蓄肺投与でバイスを用いた肺結核治療, 第8回東京理科大学DDS研究センターシンポジウム, 2010年10月15日, 東京理科大学森戸記念館
35. 木村俊一, 肺胞マクロファージの微粒子貪食による誘導される遺伝子の発現解析, 第8回東京理科大学DDS研究センターシンポジウム, 2010年10月15日, 東京理科大学森戸記念館
36. 竹前秀紀, 結核菌感染モデルラット

- 作成に関する検討, 第8回東京理科大学  
DDS研究センターシンポジウム, 2010年  
10月15日, 東京理科大学森戸記念館
37. 寺田 弘, ナノDDS: 最近の進歩と今後の  
課題, 日本油化学会第49回年会ランチョ  
ンセミナー, 2010年9月16日, 北海道大  
学函館キャンパス
38. 廣田慶司, 経肺投与による肺結核治療に  
おける新たな標的細胞, 第26回日本DDS  
学会, 2010年6月17日, 大阪国際交流セ  
ンター
39. Hiroshi Terada, Phagocytosis of PLGA  
particles by alveolar macrophages for  
application to clinical treatment, for  
tuberculosis, First World Conference  
on Nanomedicine and Drug Delivery  
(WCN-2010),  
April 16~18, 2010, Windsor  
Castele Hotel Kottayam India

[図書] (計1件)

牧野公子・寺田 弘, シーエムシー出版,  
難吸収性薬物の吸収性改善と新規 投与  
製剤の開発, 2012, 7

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 経肺薬剤投与器具および経肺 薬  
剤投与装置  
発明者: 寺田弘、廣田慶司、牧野公  
子、中嶋武尚、平井裕  
権利者: 同上  
種類: 特許、特願  
番号: 2010-114759  
出願年月日: 2010年5月18日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/telabo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺田 弘 (Hiroshi Terada)  
東京理科大学・総合研究機構・教授  
研究者番号: 00035544

(2) 研究分担者

- ① 廣田 慶司 (Keiji Hirota)  
東京理科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 50516359

② 友田 敬士郎 (Keishiro Tomoda)  
東京理科大学・薬学部・助教  
研究者番号: 70516400