

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700484

研究課題名(和文) マウスにも使える画期的な粉末微粒子吸入装置の作製

研究課題名(英文) Development of a novel inhalable dry powder administrator based on a negative pressure ventilator for mice

研究代表者

廣田 慶司(Hirota, Keiji)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：50516359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：粉末吸入製剤の全身性および肺局所的な薬効を明らかにするためには、汎用実験動物のマウスの肺に粉末吸入製剤を確実に投与する必要がある。本研究では、粉末製剤を呼吸に同期させて投与する画期的な装置の開発に取り組み、以下の成果を得た。

1)胸腔の圧力を低下させることで人工的に呼吸を再現できるマウス用陰圧式人工呼吸器を完成させた。2)陰圧式人工呼吸器は、従来技術であるPenn-Century社製投与デバイスDP-4Mに比べ、粉末微粒子吸入製剤の送達効率を3倍高めた。3)肺結核の治療を目的として、抗結核薬のリファンピシンを製剤化し、肺へ投与した結果、十分な抗結核効果を得られる薬物量が肺へ送達されていた。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate systemic and local activity of inhalable dry powders in laboratory animals such as mice, it is strongly important to develop novel apparatus for achieving distinct deposition of powders in the lungs. In this study, we tried to manufacture negative-pressure type ventilator which enabled efficient administration of inhalable dry powders into the mice lungs and obtained following achievements.

1)We successfully developed a novel inhalable dry powder administrator based on a negative pressure ventilator for mice. 2)The inhalable dry powder administrator enhanced efficiency of deposition of inhalable dry powders into the mice lungs, the amount being 3 times as much as that obtained by a conventional insufflator for mice DP-4M distributed by Penn-Century, Inc. 3)We achieved to deliver sufficient amount of inhalable dry powders containing anti-tuberculosis agent rifampicin in the mice lungs which would exert anti-tuberculosis effect.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：経肺投与装置 人工呼吸器 経気道投与 粉末微粒子

1. 研究開始当初の背景

肺結核や肺がんなどの呼吸器疾患を治療するためには、治療薬を含有した微粒子製剤を肺胞まで送達させることが効果的である。特に、粉末製剤は懸濁製剤に比べ調製の手間が不要であり、また液体製剤に比べ安定性が高く、高濃度の薬物を送達できるメリットがある。例えば、抗結核薬のリファンピシン(RFP)を封入したポリ乳酸-グリコール酸(PLGA)微粒子は、RFP溶液に比べマクロファージ内へのRFP移行量を10倍以上増大させる。しかしながら、呼吸器疾患の治療に適した粉末微粒子製剤は未だ開発途上であるのが現状である。

2. 研究の目的

呼吸器疾患の一例である肺結核を粉末微粒子の吸入により治療する研究において、結核菌感染ネズミモデルに対して吸入剤が顕著な治療効果を示した例は皆無である。これは、小動物の呼吸頻度がヒトに比べて極めて早く、1回呼吸量も極めて少ない。さらに、小動物の肺胞へ薬物を効率よく送達できるデバイスが全くないことも原因である。ラットおよびマウスの鼻からチャンバーの中に浮遊した粉末微粒子を吸入させる装置が開発されているが、肺まで送達される量はわずかであり、多くの微粒子が鼻腔内で捕捉され、正確な投与量が分からないという重大な欠点があった。

これまでの研究で、圧縮空気により粉末微粒子を投与する唯一の市販デバイス(PennCentury社製)ではマウスの肺に効率よく微粒子を噴霧できていなかったためであった。吸入剤が最適な効果を発揮するための主要要素として微粒子のエアロゾル化が挙げられ、気流をコントロールすることが極めて重要である。しかし、マウスの1回あたりの呼吸量はわずか0.2 mLであり、このような微量の空気とともに微粒子を吸入させることは極めて難しく、マウスの肺へ粉末微粒子製剤を投与できる装置の開発が必要であるので、マウス用の噴霧装置を作製することにした。

3. 研究の方法

1. 「鉄の肺」の作製：動物を寝かせ、頭頸部が外に露出され、胸腔に圧力変化を与えることができるような密閉容器を作製した。さらに、密閉容器には真空ポンプを接続し、密閉容器の内圧の変化はマノメータにより測定した。

2. 吸入条件の検討：肺が損傷しない圧力変化、吸気時間と呼気時間の比を検討しながら、微粒子の吸入効率が最も高い条件を検討した。

3. マウスの肺に対する微粒子製剤の送達：モデル薬物として抗結核薬を含有した微粒子粉末をマウスに吸入させ、肺への送達度について検討した。

4. 研究成果

初年度に達成する目標は、マウスのような1回呼吸量がわずか0.2 mLの小動物に対して、エアロゾル化微粒子製剤を吸入させることができるよう、「鉄の肺」を作製することであった。プラスチックおよびコルク栓などを用いてマウスを収めることのできる密閉容器を工作した。さらに、真空ポンプおよびマノメータを接続させた。本装置により、マウスの胸腔部を任意の圧力差で減圧させることができ、肺の膨張を促すことができた。

続いて、密閉容器と真空ポンプの間に電磁弁および電磁弁開閉制御装置を組み込み、圧力差を周期的に発生させるようにした。鉄の肺へ収めたマウスは、麻酔下において呼吸数は低下していたが、1分間に100回程度の呼吸を10分間以上安定して繰り返していた。また、このときに鉄の肺へ発生させた圧力差は10 cmH₂Oであったが、麻酔からの覚醒率は100%であったことから、肺に負担の少ない呼吸を鉄の肺により再現できていたと考えられた。

作製した鉄の肺の有用性を評価するため、安価で粒径の小さな活性炭をマウスに吸入させ肺を摘出したところ、活性炭が肺全域へ送達されていることがわかった。さらにその肺の組織切片を作製したところ、図1に示したように、活性炭が肺胞部位にまで送達されていることが明らかとなった。従って、「鉄の肺」を用いて呼吸に同期させて粉末を吸入させることにより粉末を効率よく肺胞へ送達させることができると示唆された。

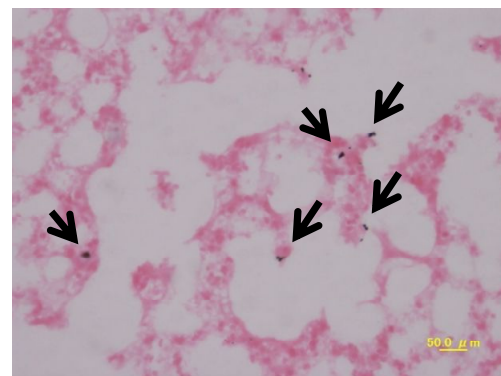
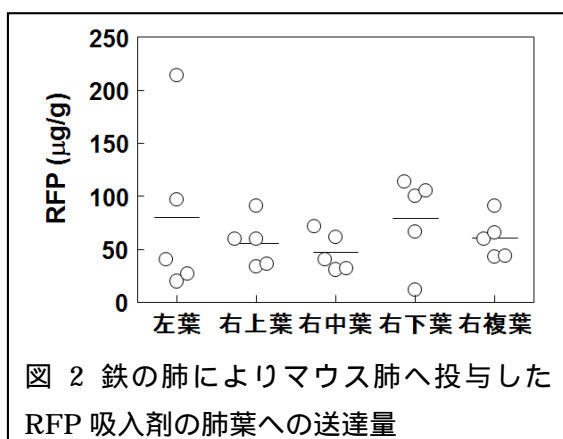


図1 肺胞へ送達された活性炭(矢印先端)

吸入型の抗結核治療薬として研究を進めている粉末微粒子、すなわち抗結核薬のリファンピシン(RFP)を20%内包したポリ(乳酸-グリコール酸)微粒子をマウスへ0.5 mg吸入させた。まず、マウスの肺へ投与するための既存の装置であるPenn-Century社製DP-4Mと本装置の肺への微粒子の送達量について比較したところ、「鉄の肺」はDP-4Mに比べ3倍以上高い肺への送達量を示し、乾燥肺組織重量あたり60 μgのRFPを送達できていたことが明らかとなった。さらに、微粒子の肺に

おける分布を明らかにするため、肺を五葉に分け、それぞれの葉へ送達された微粒子中のRFP量を定量した。図2に示したように、「鉄の肺」により吸入させた微粒子はマウスの各肺葉へ均等に送達されており、各肺葉へ送達されたRFP量は乾燥肺葉組織重量あたり平均47~80 µgであった。この量はRFPが効果的に抗結核作用を示す濃度である5 µg/mLを超えると考えられ、「鉄の肺」が肺への薬物送達において極めて有用な装置であると考えられた。



以上のことから、「鉄の肺」は粉末微粒子を小型実験動物のマウスの肺へ効率よくさらに肺全域へ投与することができる装置であることが明らかとなった。前年度からの研究を通して、マウスに対しても吸入させることのできる画期的な粉末微粒子吸入装置を完成することに成功した。

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 1 件)

1. Keiji Hirota, Tadafumi Kawamoto, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada. Distribution and deposition of respirable PLGA microspheres in lung alveoli. *Colloids Surf. B.* 105, 92-97 (2013).

[学会発表](計 9 件)

1. Keiji Hirota, Yutaka Hirai, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada. A novel device for pulmonary administration of dry powders to small animals based on the Venturi effect. *Inhaled Therapies for TB: Second Meeting--Tokyo2013*. 2013年10月2日, 東京
2. 福原 いづみ, 廣田 慶司, 中島 武尚, 牧野 公子, 寺田 弘, 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3月29日, 横浜

3. 廣田慶司, 白井俊太郎, 木村俊一, 寺田 弘, 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, 日本薬学会第133年会, 2013年3月29日, 横浜
4. Riyo Yamada, Izumi Fukuhara, Keiji Hirota, Hiroshi Terada. 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, 東京
5. Keita Yaginuma, Shuntaro Shirai, Shun-Ichi Kimura, Keiji Hirota, Hiroshi Terada. 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, 東京
6. Keiji Hirota, Yutaka Hirai, Takehisa Nakajima, Kimiko Makino, Hiroshi Terada. 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, 東京
7. 廣田慶司, 寺田 弘, 微粒子製剤の肺への送達による結核治療法の展開, 第3回東京理科大学総合研究機構戦略的物理解析学基盤センターシンポジウム・第10回東京理科大学薬学部DDS研究センターシンポジウム, 2012年8月22日, 東京
8. Keiji Hirota, Shuntaro Shirai, Shun-Ichi Kimura, Hiroshi Terada. Effect of particle size on endocytic uptake by alveolar macrophage cells. The 39th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, 2012年7月15日, Quebec-city (カナダ)
9. 廣田慶司, 白井俊太郎, 木村俊一, 寺田 弘, 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, 2012年7月4日, 札幌

[図書](計 2 件)

1. 廣田慶司, 寺田 弘, 応用が広がるDDS~人体環境から農業・家電まで~, エヌティーエス(東京) 2013, 6/578頁
2. Keiji Hirota and Hiroshi Terada,

Molecular Regulation of Endocytosis,
InTech (Rijeka, Croatia), 2012, 16/456
pages

〔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：廣田慶司、寺田 弘、牧野公子

権利者：東京理科大学

種類：特許

番号：特願 2014-063807

出願年月日：2014 年 3 月 26 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

廣田慶司 (HIROTA Keiji)

東京理科大学・薬学部・助教

研究者番号：50516359

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし