

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460040

研究課題名(和文) 経肺投与型機能性ナノ粒子製剤の開発によるナノ医薬品の適応拡大を目指したDDS研究

研究課題名(英文) Nanoparticle-based pulmonary drug delivery system to extend the nanomedicine

研究代表者

尾関 哲也 (Tetsuya, Ozeki)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：60277259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに多くの研究者により、ナノメディシン(ナノ医薬品)と呼ばれる機能性ナノ粒子に関する研究・開発が行われてきた。しかし、機能性ナノ粒子の大部分は注射剤によるものがほとんどであり、ナノメディシンの実用化の障壁となってきた。筆者は、これまで培ってきたスプレードライ技術を用い、吸入剤用のナノコンポジット粒子(ナノ粒子含有マイクロ粒子)の開発を行った。これらのナノコンポジット粒子は、肺組織に直接薬物送達できるだけでなく、肺組織深部の肺泡領域を通過して、血液中にも送達される可能性があるため、全身性疾患にも期待できる。極小の金ナノ粒子およびナノクルクミンを含むナノコンポジット粒子を用いて検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Various kinds of nanoparticle-based formulations, which are termed as nanomedicine, have been developing among researchers. However, most of nanomedicine is applied for intravenous injection and the administration route is a limitation for the principal use of nanomedicine. I have been developing various nanocomposite particles (microparticles containing functional nanoparticles) by using spray drying technology. The functional nanoparticles are expecting for not only lung-related diseases but also systemic diseases by passing through alveolar endothelial cells layer which is in the deepest lung tissue. I developed the composite particles containing ultra small gold nanoparticles or curcumin as poorly water soluble compound and then the nanocomposite particles were evaluated.

研究分野：製剤学、薬剤学、薬物送達学

キーワード：ナノコンポジット粒子 経肺投与 ドラッグデリバリーシステム

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに、ドラッグデリバリーシステムの領域において機能性ナノ粒子の開発が行われてきた。機能性ナノ粒子は、従来の低分子医薬品にはできなかった、様々な機能を付与することができる。治療効果を増大し、副作用を減少させることができるだけでなく、医療機器を用いてイメージングすることにより、薬物の効果をコントロール・予測するようなものまで登場しており、「次世代のナノ医薬品」として期待されている。しかし、機能性ナノ粒子の多くは、投与経路が制限されており（多くは注射剤である）、実用面において劣っていることが課題とされている。

## 2. 研究の目的

筆者のグループは、これまでに培ってきたスプレードライ技術を用い、経肺投与型製剤・吸入剤として有用なナノコンポジット粒子（ナノ粒子含有マイクロ粒子）に関する研究を行ってきた（引用文献<sup>1)~4)</sup>。吸入剤を調製する場合、吸入に適した粒子径に製剤粒子をコントロールする必要があり、空気動力学径がシングルミクロンになるように調製する必要がある。調製したマイクロサイズのナノコンポジット粒子を吸入すると、まず肺組織部位に分布する。ナノコンポジット粒子外殻の糖アルコールが水分により溶解し、内部にある機能性ナノ粒子が露出し、効果を発揮することが想定される。機能性ナノ粒子は、肺疾患に対し、治療効果を発揮するだけでなく、全身性疾患にも効果を発揮することが期待できる。ナノコンポジット粒子の一部は肺組織最深处である肺泡領域に到達し、肺胞上皮細胞を透過して、血液に到達し、血液循環することにより、効果を発揮することが報告されている。

以上の研究背景より、本研究は、極小の金ナノ粒子を含むナノコンポジット粒子および抗酸化物質であるクルクミンを含むナノコンポジット粒子に主に焦点をあて、評価および考察を行った。

## 3. 研究の方法

【金ナノ粒子の調製】: 塩化金酸水溶液と、1-オクタデカンチオールを溶解したクロロホルム溶液を混合し、その後テトラヒドロホウ酸ナトリウムを添加し、還元剤条件下で攪拌することで1-オクタデカンチオール修飾金ナノ粒子を調製した（引用文献<sup>5)</sup>）。

【金ナノ粒子を含むナノコンポジット粒子に関する評価】: 賦形剤および分散安定剤からなる水溶液に金ナノ粒子を分散し、凍結

乾燥を行った。その後、再び水に溶解した後、金ナノ粒子が再分散しているかどうか、動的光散乱法を用いて、粒子径を測定し、安定性に関する簡易評価を行った。さらに、スプレードライ、スプレーフリーズドライによるナノコンポジット粒子の調製を行った。ナノコンポジット粒子の吸入特性は、アンダーセンカスケードインパクトにより評価を行った。また、調製したナノコンポジット粒子形状について、電子顕微鏡による観察を行った。

【クルクミンナノコンポジット粒子の調製とその評価】: 当研究室が独自に保有する2液混合型スプレーノズルを搭載したスプレードライヤーを用いてクルクミンナノコンポジット粒子の調製を行い、評価を行った。スプレードライ条件を変化させることにより、異なるクルクミンナノコンポジット粒子を調製した。

調製したクルクミンナノコンポジット粒子の形状および大きさは、電子顕微鏡により評価を行った。また、ナノコンポジット粒子の外殻の糖アルコールを水溶液で溶解し、露出したクルクミンナノ粒子の粒子径を動的光散乱法により測定した。クルクミンナノコンポジット粒子の吸入特性をアンダーセンカスケードインパクトを用いて評価を行った。

【クルクミンナノコンポジット粒子の殺細胞効果の評価】

A549細胞、B16BL6細胞、Raw細胞をそれぞれ96ウェルプレートに播種し、24時間培養後、クルクミンナノコンポジット粒子を添加し4時間内容した。培地を新鮮なものに交換した後、さらに44時間培養を行った。その後、WSTアッセイにより評価を行った。

## 4. 研究成果

本研究は、主に2つのナノコンポジット粒子に焦点を当て調製を行った。まず1つ目は、金ナノ粒子からなるナノコンポジット粒子である。金ナノ粒子は、リポソーム(100 nm)やミセル(30 nm)などの他のキャリアにはできない小さいサイズに調製が可能であること、チオール基と共有結合を形成するため他の分子(リガンド、治療分子)との表面化学修飾が可能であるという特徴をもつ。金ナノ粒子は、医療分野において、光温熱療法、セラノスティクス(診断と治療の融合研究)、イメージング研究、そしてドラッグデリバリーシステムの機能性ナノキャリアとして注目されている。そこで、金ナノ粒子をキャリアとした経肺投与型製剤をスプレードライヤーにより調製し、その評価を行った。

基礎的な検討として、金ナノ粒子を含有し

たナノコンポジット粒子を調製する場合、賦形剤および分散安定剤が与える影響について、評価を行った。金ナノ粒子が分散した水溶液を凍結乾燥し、水に再懸濁して、凍結乾燥前後の粒子径変化を検討した。その結果、界面活性剤として、ポリビニルアルコールを用いた場合（いくつかの濃度を検討した）、いずれの場合においても凝集することがわかった。これに対し、ブロックコポリマーである Pluronic F127 を 1%以上添加した場合において、凝集を抑制することがわかり、凝集抑制に成功した。

次に、吸入特性の評価を行った。スプレードライしたものとスプレーフリーズドライしたのものについて、検討・比較を行ったところ、スプレーフリーズドライして調製した金ナノ粒子ナノコンポジット粒子の方が、高い吸入特性を示した。電子顕微鏡で確認したところ、ナノコンポジット粒子は、多孔性の形状であり、このことより、スプレーフリーズドライで調製したナノコンポジット粒子は、密度が低く、解砕しやすいことから、高い吸入特性につながったと考えられる。

機能性金ナノ粒子のモデルとして、善玉コレステロールを模倣した金ナノ粒子の調製を行っている。本計画では、特に金ナノ粒子の物理化学的性質・光学的性質に焦点を当てて評価を行った。

2 つ目の主な検討として、クルクミンナノコンポジット粒子について研究を行った（図 1）。クルクミンは、ウコンに含まれる薬効成分であり、抗炎症作用、抗酸化作用などの多様な薬理作用を有する化合物である。そのため、肺組織に到達したクルクミンは、炎症性肺疾患や肺がんの効果を示すと考えられる。また、一部のクルクミンは肺組織深部より、血中に到達し、全身性の炎症性疾患にも効果を発揮することが期待できる。

クルクミンナノコンポジット粒子の調製において、2 液混合型ノズルを用いて、スプレードライすることにより調製を行った。工程の解説としては次の通りである。1)まずクルクミンをエタノールに溶解した溶液とマンニトール水溶液を別々の流路より、スプレーノズル部分に送液を行う。2)送液された 2 つの溶液は、スプレーノズル内の混合部において混合され、溶解度の変化に伴い、クルクミンの結晶化が始まる。3)クルクミンの結晶成長が進む前にスプレードライすることにより、ナノ化されたクルクミンがマイクロ粒子に分散された、クルクミンナノコンポジット粒子が得られる。

スプレードライ条件を変更し、スプレードライ条件がナノコンポジット粒子に与える影響について評価を行った。スプレードライ

条件は、マンニトール濃度、クルクミン濃度、入り口温度、マンニトール送液速度、クルクミン送液速度の影響を受けた。クルクミンナノコンポジット粒子内に含まれるクルクミンナノ粒子の粒子径もスプレードライ条件の影響を受けた。条件検討した一つのサンプルをピックアップし、吸入特性を評価したところ、クルクミン原末よりも吸入特性が改善していた。

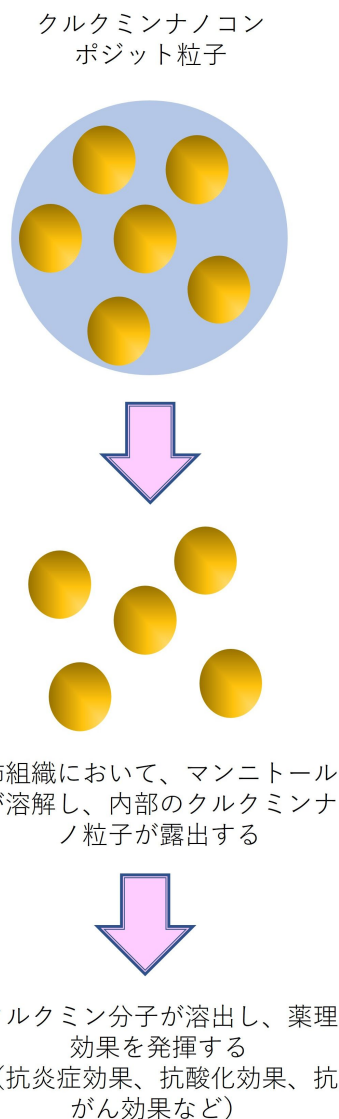


図 1：経肺投与型クルクミンナノコンポジット粒子。クルクミンナノコンポジット粒子は、肺組織内で溶解し、内部のクルクミンナノ粒子が露出し、治療効果を発揮する。クルクミンは多様な薬理効果を有している。製剤の粒子設計が必要であるが、肺組織到達部位を調節することで、目的とする治療を選択できる。

また、クルクミンナノコンポジット粒子の溶出挙動についても評価を行った。クルクミンなどの難溶性薬物の溶出性を高めて効果を高める方法として、微細化・ナノ化が有効であることが知られている。クルクミンナノコンポジット粒子は、クルクミン原末よりも

顕著に溶出が改善していることを確認した。

クルクミンナノコンポジット粒子の生物活性を確認する方法として、複数のがん細胞株を用いて殺細胞効果を評価した。その結果、いずれの細胞株に関しても、クルクミンナノコンポジット粒子が、コントロール(クルクミン原末および同量のマンニトール)と比較して顕著な殺細胞効果を示すことがわかり、ナノ化されたクルクミンの効果を確認することができた。

以上、「経肺投与型機能性ナノ粒子製剤の開発によるナノ医薬品の適応拡大を目指したドラッグデリバリーシステム研究」について、検討を行った。2液混合型スプレーノズルによる、ナノコンポジット粒子の開発の利点は、クルクミンナノ粒子のような、機能性ナノ粒子をマイクロ粒子内に保存することができることである。ナノ粒子を液中保存した場合、粒子どうしが容易に付着する性質があり、凝集した粒子は、ナノ粒子としての有用な性質を失ってしまう。また、液中保存は分解しやすい。これに対し、ナノコンポジット粒子は保存にむいており、さらにマイクロサイズで取り扱うことが可能である。そのように有用な性質を有するナノコンポジット粒子を、2液混合型スプレーノズルは、単一工程で調製することができる。このため、本技術はコスト面・生産面においても優れている。

調製したナノコンポジット粒子は、肺組織に対する疾患だけでなく、今後も検討の余地は残されているものの、肺組織深部に到達することにより全身性疾患にも有効である可能性があると考えている。肺組織から血中に吸収された薬物が効果を示している知見・報告が他の研究者からも集まってきている。例えば、インスリン吸入による超速効型のインスリン製剤が該当する。我々の提案する、ナノコンポジット粒子の調製に関する情報は、そういった、新しい今後のドラッグデリバリーシステム研究の発展に寄与するものと考えている。

#### <引用文献>

1) Taki M, Tagami T, Ozeki T. Preparation of polymer-blended quinine nanocomposite particles by spray drying and assessment of their instrumental bitterness-masking effect using a taste sensor. *Drug Dev Ind Pharm.* (2017) 43(5): 715-722.

2) Ozeki T, Tagami T. Drug/polymer nanoparticles prepared using unique spray nozzles and recent progress of inhaled formulation. *Asian J Pharm Sci.* (2014) 9(5):236-43. Review.

3) Nishino Y, Kanazawa T, Takashima Y, Ozeki T, Okada H. Improved intestinal absorption of a poorly water-soluble oral drug using mannitol microparticles containing a nano-solid drug dispersion, *J Pharm Sci.* (2012) 101(11), 4191-4200.

4) Ozeki T, Akiyama Y, Takahashi N, Tagami T, Tanaka T, Fujii M, Okada H. Development of a novel and customizable two-solution mixing type spray nozzle for one-step preparation of nanoparticle-containing microparticles. *Biol Pharm Bull.* (2012) 35(11):1926-31.

5) Hoshikawa A, Tagami T, Morimura C, Fukushige K, Ozeki T. Ranibizumab biosimilar/polyethyleneglycol-conjugated gold nanoparticles as a novel drug delivery platform for age-related macular degeneration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* (2017) 38:45-50.

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Taki M, Tagami T, Fukushige K, Ozeki T. Fabrication of nanocomposite particles using a two-solution mixing-type spray nozzle for use in an inhaled curcumin formulation. *Int J Pharm.* (2016) 11(1):104-10.

〔学会発表〕(計3件)

瀧 萌子, 田上 辰秋, 尾関 哲也. 2液混合型スプレーノズルによるスプレードライ条件がクルクミンナノコンポジット粒子の粒子形成に与える影響, 平成 27 年度粉体工学会 機能性ナノ・マイクロ粒子の設計とプロセス制御に関するワークショップ, 岐阜県大垣市, 2015 年 8 月 27~28 日(口頭発表)

石亀貴欣, 田上辰秋, 尾関哲也: 経肺投与型金ナノ粒子製剤の調製と肺組織内分散安定性に関する検討, 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎県長崎市, 2015 年 5 月 21 日~23 日(口頭発表)

星川晃宏, 田上辰秋, 尾関哲也: 金ナノ粒子を基盤とした人工 HDL 製剤における核粒子物性の評価, 日本薬剤学会第 30 年会, 長崎県長崎市, 2015 年 5 月 21 日~23 日(口頭発表)

〔図書〕(計1件)

田上 辰秋, 尾関 哲也. 「剤形の進歩: 経

肺投与経路を利用したインスリン吸入製剤  
と DDS 技術」Drug Delivery System. (2016)  
31(5):432-439

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾関 哲也 (OZEKI Tetsuya)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：60277259

(2) 研究分担者

田上 辰秋 (TAGAMI Tatsuaki)  
名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師  
研究者番号：10609887

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：

(4) 研究協力者

なし