

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：34311

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16460

研究課題名（和文）新規生体膜透過機構を基盤とするシプロフロキサシン粉末吸入製剤の開発

研究課題名（英文）Development of the ciprofloxacin powder formulation for inhalation based on a new drug transport mechanism

研究代表者

木村 峻輔（Kimura, Shunsuke）

同志社女子大学・薬学部・助手

研究者番号：70792274

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：肺内薬物量改善を目指した新規膜透過機構を基盤とするシプロフロキサシン（CPFX）粉末吸入製剤の開発を行った。CPFX非晶質製剤は、アミノ酸をコフォーマーとしてボール粉砕法により作製した。各種粉末製剤からの累積膜透過量に関しては、結晶製剤よりも非晶質製剤の方が高く、特にCPFX/ASP製剤が最も高値を示した。同様に、in vivo体内動態評価では、CPFX/ASPを経気道内投与後の肺内薬物量が投与直後で最も高くなり、かつ溶液製剤よりも血漿中薬物濃度に対し相対的に高い薬物量を示した。得られた結果は、新規機構を基盤とする粉末吸入製剤が肺内薬物量を効率的に増大させるのに有用であることを示している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の肺炎に対する薬物療法では、肺への薬物到達効率の低さが問題であり、治療効率の低下だけでなく、副作用リスクの増大も懸念された。その点、本研究で開発された新規粉末吸入製剤の有用性が高いことは明らかである。特に、本製剤システムは、これまで吸入製剤化の課題であった溶解性や膜透過性について考慮する必要がないことが大きな利点である。さらに、肺炎に限らず、吸入製剤の選択肢が限られる他の呼吸器疾患に対しても応用可能であり、吸入製剤開発における画期的なアプローチとなり得る。

研究成果の概要（英文）：To improve the drug content of lung, the new ciprofloxacin (CPFX) powder inhalation system based on a solubility-independent drug membrane transport mechanism was developed. The amorphous formulations of CPFX were prepared by ball milling with amino acids as the co-former. The cumulative membrane transport amount from the amorphous formulations was higher than the crystalline formulation, especially for CPFX/ASP was the highest among them. Similarly, in vivo pharmacokinetic studies, it was showed that the intratracheal administration of CPFX/ASP enabled the higher CPFX content of lung in a short time than any other formulation. In addition, the pulmonary drug content relative to the plasma level was also higher than that of the CPFX solution. The findings suggest that the new powder inhalation system using the amorphous formulation is superior in improving the CPFX content of lung.

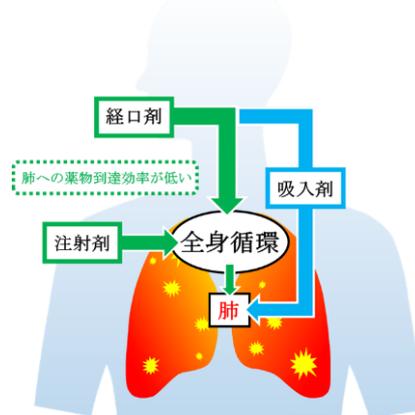
研究分野：薬物動態学

キーワード：非晶質製剤 経肺投与 肺炎 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

肺炎は、肺内で主に細菌感染によって引き起こされる病気であり、近年の主要死因別死亡者数において癌、心血管疾患に次いで上位を占めている。現在行われる標準的治療は、抗菌薬を用いた薬物療法であるが、より強力な抗菌作用を有する医薬品の開発も進んでおり、症状によっては外来通院による治療も可能である。また、一部の原因菌に対しては、予防または重症化を防ぐ目的としてワクチンの定期接種も行われるなど肺炎に対する危機意識は高まっている。しかしながら、ほとんどの症例は薬物療法によって完治が見込まれるものの、依然として死因別死亡者数が上位に位置していることは、現在の薬物療法にも限界があることを示唆している。

現行の薬物療法における問題点の一つとして、投与された薬物の肺への到達効率の低さが挙げられる。現在使用される抗菌薬は、ほとんどが注射もしくは経口製剤に限られることから、右図に示す通り、投与された薬物が全身循環に移行した後肺へと到達することになる。ゆえに、一部の薬物では肺組織移行率が良好とも言われているが、一旦全身循環に移行すれば血流量の多い腎臓や肝臓への移行は不可避であり、代謝・体外への排出の影響により肺への薬物到達率が低下することになる。加えて、全身循環への薬物移行は、全身性の副作用リスクを増大させることにも繋がるため、肺への到達効率を改善する新たなドラッグデリバリーシステムの開発が必要である。一方で、気管支喘息などの他の呼吸器疾患では、既に局所薬物送達を目的とする吸入製剤を用いた効率的な薬物治療が行われている。



同様に、肺炎治療に対しても吸入製剤の有用性は高いと考えられるが、現在国内で承認されている抗菌薬吸入製剤は長らくトーバイ® (トブラマイシン) の1種類のみである【※ 2021年3月にアリケイス® (アミカシン) が承認されて2種類】。ただし、同製剤は適応症が限定されるため、更なる新規吸入製剤の開発も期待されるが、抗菌薬吸入製剤の開発には課題が多い。特に、既存の抗菌薬の中には、溶解性や膜透過性が低いものも少なくなく、吸入製剤化には両物性の改善が重要な鍵となる。

研究代表者は、既存抗菌薬の吸入製剤化に対して以前の研究で明らかにした溶解度に依存しない新規生体膜透過機構の応用を試みた。同機構のポイントは、「溶解した薬物」ではなく、未溶解固体が吸収粘膜に直接接触することで膜透過が促進されることである。既に、固体と膜の接触が比較的容易な経肺投与との組み合わせが有用であることを明らかにしており、吸入製剤化への応用も十分に可能であると考えに至った。加えて、新規膜透過機構を示すモデル薬物を探索する中で、肺炎治療にも使用されるニューキノロン系抗菌薬のシプロフロキサシン (CPF_X) を見出した。特に、CPF_X は溶解性及び膜透過性が共に低い薬物に分類されるが、新規膜透過機構を基盤とする製剤設計が可能となれば、従来行われてきた溶解性改善を考慮する必要がなく、かつ膜透過性改善も見込めることから、CPF_X 粉末吸入製剤化の可能性が高まる。

2. 研究の目的

従来とは異なる機構に基づく膜透過を促進させるために、薬物の非晶質化が必要となる。まず始めに、各種 CPF_X 非晶質製剤の作製を行い、種々の物性評価および新規機構に基づく *in vitro* 膜透過性評価を行った。さらに、実験動物を用いた *in vivo* 体内動態評価により、既存の投与方法との比較、および異なる吸入製剤間での各臓器移行性に関する比較検討を行い、肺内薬物量の増大を目的とする新規吸入製剤の有用性を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) CPF_X 非晶質製剤作製及び各製剤物性評価

全ての非晶質製剤は、過去の方法を一部改良したボール粉砕法によって作製した。CPF_X 結晶原末に対して等量の各種アミノ酸 (アルギニン: ARG、システイン: CYS、アスパラギン酸: ASP) を混合し、15 mm ステンレスボール 1 個と共に 60 分間粉砕した。各粉砕製剤の物性評価は、粉末 X 線回折 (PXRD)、示差走査熱量 (DSC)、赤外線分光 (IR) および走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて行った。

(2) *In vitro* 脂質人工膜透過性評価

細胞透過実験用インサート上に 20 w/v% レシチンを含むドデカン溶液を滴下し、脂質人工膜を作製した。膜形成の有無は、膜電気抵抗値が一定値以上 ($\geq 10 \text{ k}\Omega \cdot \text{cm}^2$) を示すことにより確認した。ドナー側である脂質膜上に各種粉末を噴霧し、レセプター側 (5w/v% BSA 含むリン酸緩衝液) より経時的にサンプリングした。各サンプル中 CPF_X 量を HPLC にて定量し、累積膜透過量を算出した。

(3) 経気道内投与後の血漿中 CPF_X 濃度変化の評価

Wistar/ST 雄性ラットに対して、予め気道内に挿入したビニルチューブを介して、一定量の

各種粉末製剤を噴霧投与した後、頸静脈より経時的に採血を行った。同様に、比較対照として溶液製剤をネブライザーを用いて気道内投与、及びバイオアベイラビリティ (BA) 算出のために静脈内投与を行い、各種薬物動態学的パラメータを算出した。

(4) 各種製剤投与後の主要臓器移行性評価

各種製剤投与後の主要臓器 (心臓、肺、肝臓、腎臓) 及び気管支-肺胞洗浄液 (BALF) 中の薬物移行量を評価した。さらに、静脈内投与と経気道内投与 (溶液、CPFX 結晶原末及び CPFX/ASP 非晶質製剤) に関しては、経時的な肺内薬物量変化に評価した。

(5) 各サンプル中 CPFX 定量

各サンプルは、予め除タンパク処理を行い、逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて定量を行った。

4. 研究成果

(1) CPFX 非晶質製剤作製及び各製剤物性評価

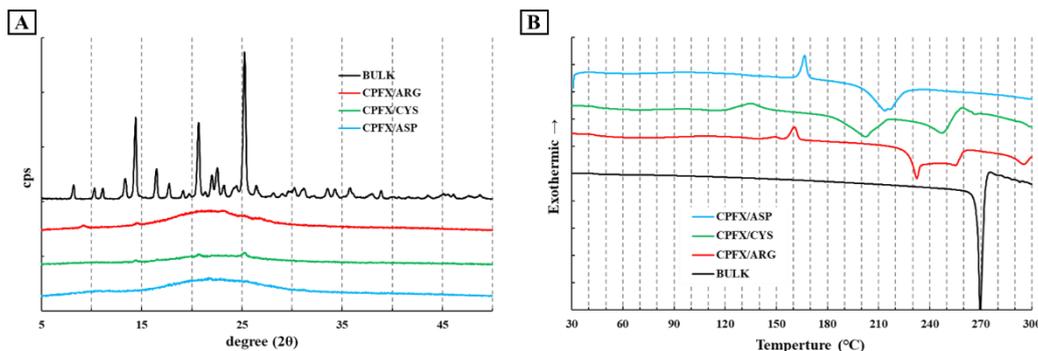


図1 各粉碎製剤物性評価結果 (A) XRPD (B) DSC

図1には、各種物性評価のうちXRPD及びDSCの各結果を示す。XRPD結果より、各種粉碎製剤において非晶質特有のハローパターンを示したが、一部CPFX/CYSにおいてCPFX結晶原末 (BULK) と同様の結晶ピークが僅かに観察された。次に、DSC結果より、BULKの場合、昇温開始後ほとんど変化がなく、270°C付近に唯一の吸熱ピークが生じた。これは、既に報告されているCPFXの融点とほぼ一致しており、融解による熱量変化と考えられる。一方、各種粉碎製剤では、3製剤において70~80°C付近に緩やかな吸熱変化、130~180°C付近に発熱変化、その後複数の発熱変化が同様に観察された。XRPD結果を基に考察すると、いずれの熱量変化も非晶質特有のものと考えられる。最初に観察された吸熱変化はガラス転移、続く発熱変化は再結晶化、最後の吸熱変化は融解に伴う熱量変化によるものと考えられる。したがって、全ての粉碎製剤中CPFXは、非晶質状態であることが確認された。

(2) *In vitro* 脂質人工膜透過性評価

図2には、各種粉末製剤からの脂質膜累積透過量プロファイルを示す。BULKの膜透過量と比較して、非晶質である各粉碎製剤の膜透過量はいずれも増大した。特に、酸性アミノ酸であるASPをコフォーマーとするCPFX/ASPにおいて顕著に高かったが、非晶質製剤間で異なる結果が得られたことは非常に興味深い。CPFX/ASPに関しては、物性評価結果より他の非晶質製剤と比較して製剤中CPFXの存在状態は異なることが示唆され、新規機構による膜透過に影響を及ぼしたものと推察される。また、3種類のアミノ酸以外のアミノ酸を用いて同様の検討を行ったが、酸性アミノ酸をコフォーマーとする製剤において膜透過量増大の程度も大きいことが明らかとなり、製剤物性と膜透過性の関係に関して今後より詳細な検討が必要である。

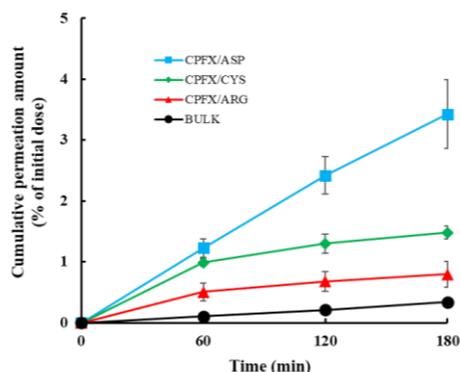


図2 脂質膜累積透過量プロファイル 平均値±標準偏差 (n=4)

(3) 経気道内投与後の血漿中CPFX濃度変化の評価

図3及び表1には、各種粉末製剤及び溶液製剤を経気道内投与後の血漿中CPFX濃度プロファイル及び各薬物動態学的パラメータを示す。各種粉末製剤間を比較すると、CPFX/ASP投与後では速やかに血漿中濃度が上昇し、結晶であるBULKよりも吸収性は顕著に改善された。特に、平均滞留時間 (MRT) がほぼ同値を示したのに対してBAに2倍以上の差があったことは、*in vivo*においても非晶質化に伴う新規機構による膜透過促進が有用であることを示している。一方で、他の非晶質製剤に関しては、BULKとほぼ同様のプロファイルを示し、*in vitro*とは異なる結果となった。また、溶液製剤の場合、CPFX/ASPと同様の血漿中濃度の上昇を示したが、MRTは短くなる結果となった。従来の膜透過の場合、粉末製剤では溶解過程が存在することから、吸収

時間は遅くなり、溶液製剤よりも MRT が長くなるのは当然の結果と言えるが、溶液製剤に匹敵する早期の血中濃度上昇と高い吸収率を考慮すると、新規機構に基づく膜透過性改善の寄与が大きく、溶解性・膜透過性が低い CPFX の粉末吸入製剤化も十分可能であることを示している。

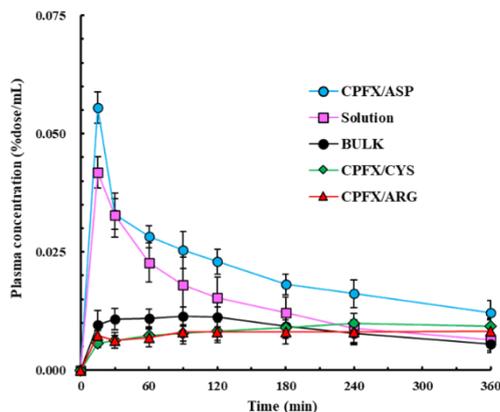


図3 経気道内投与後の血漿中 CPFX 濃度プロファイル
 平均値±標準偏差 (n=5-6)

表1 経気道内投与後の各薬物動態学的パラメータ

	BULK	CPFX/ARG	CPFX/CYS	CPFX/ASP	Solution
AUC (%dose·min/mL)	5.13±1.75	2.76±0.64*	3.06±0.43*	12.2±1.77	7.13±2.00
MRT (min)	356±101	-	-	356±52.2	266±73.6
BA (%)	36.1±12.3	-	-	85.6±10.2	55.1±17.3

* 360分までのデータを用いて算出

(4) 各種製剤投与後の主要臓器移行性評価

各種製剤投与 1 時間後の主要臓器移行性は、肺を除いて血漿中濃度プロファイルと一定の相関性を示した (図 4A)。一方で、肺内薬物量に関しては、静脈内投与及び経口投与と比較して、経気道内投与では高値を示したが、粉末製剤間では明らかな差が観察されなかった。そこで、静脈内投与および経気道内投与 (BULK、CPFX/ASP 及び溶液製剤) 後の経時的な肺内薬物量変化を評価したところ、経気道内投与した全ての製剤において投与直後 (10 分) に肺内薬物量が高値を示し、特に CPFX/ASP において最も高いことが明らかとなった (図 4B)。一方、溶液製剤の場合、CPFX/ASP と同様の血漿中濃度の上昇を示したにも関わらず、肺内薬物量は約半分程度に留まった。これは、上皮組織内への薬物移行性に加えて肺内滞留性も異なる可能性があり、溶液製剤では CPFX/ASP と同等の薬物量に到達することは困難なことが示唆される。また、結晶製剤である BULK の場合、BALF 中薬物量が高いにも関わらず、経時的な肺内薬物量の増加は観察されなかった。したがって、肺内薬物量を増大させるには、少なくとも上皮組織内への薬物移行性を改善する必要があり、非晶質製剤を用いた新規機構に基づく膜透過促進の有用性は非常に高いことが示された。

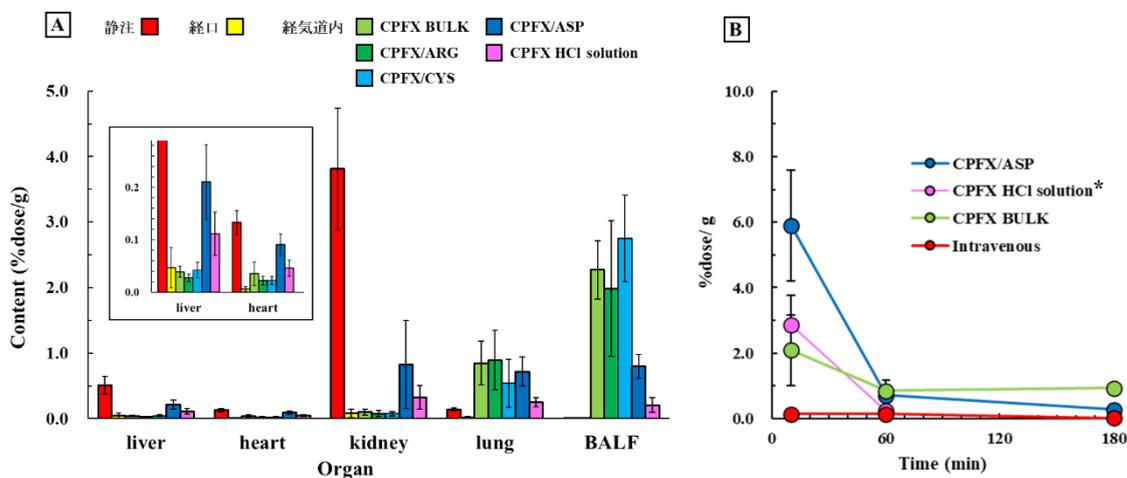


図4 (A) 各投与 1 時間後の主要臓器移行性及び (B) 経時的肺内薬物量プロファイル
 平均値±標準偏差 (n=4-5)

* 溶液製剤は投与 180 分後のデータ採取せず

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川北 美帆、宮田 侑季、犬伏 紗和子、木村 峻輔、山下 修吾、坂根 稔康、喜里山 暁子
2. 発表標題 新規生体膜透過機構に基づくシプロフロキサシン粉末吸入製剤化に関する検討 - 非晶質製剤作製および in vitro 膜透過性評価 -
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮田 侑季、川北 美帆、犬伏 紗和子、木村 峻輔、山下 修吾、坂根 稔康、喜里山 暁子
2. 発表標題 新規生体膜透過機構に基づくシプロフロキサシン粉末吸入製剤化に関する検討 - In vivo ラット体内動態評価 -
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木村 峻輔、宮田 侑季、川北 美帆、犬伏 紗和子、山下 修吾、喜里山 暁子
2. 発表標題 34. 新規生体膜透過機構を基盤とするシプロフロキサシン粉末吸入製剤に関する検討
3. 学会等名 日本薬剤学会第35年会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------