

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04531

研究課題名(和文)自己乳化現象の制御による「超低密度」多孔質粒子の作製と経肺投与DDSへの応用

研究課題名(英文)Preparation of "ultra-low-density" porous particles by controlling self-emulsification phenomenon and their application to pulmonary DDS

研究代表者

村上 義彦 (Murakami, Yoshihiko)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00339748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：経肺投与の薬物送達システム(DDS)は、薬物(あるいは、薬物の入れ物である薬物キャリア)を吸入して肺へ薬物を送達する手法であり、「表面積が大きく毛細血管が多い肺胞を利用するため、薬物の吸収効率が高い」「患部に薬物を直接送達することができるため肺疾患の治療効果が高い」「痛みをともなわない」などの利点から、投薬方法としてのさらなる発展が期待されている。本申請課題では、自己乳化現象を詳細に評価することによって、所望の孔径・空孔数を有する多孔質微粒子を作製した。カスケードインパクター(模擬肺)によって多孔質微粒子の空気道力学的特性を評価したところ、肺深部へ容易に到達する多孔質微粒子の作製に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本技術では、多孔質粒子を形成するために必要な乳化操作は「1回」のみである。そのため、「2回」の乳化操作が必要となる従来の多孔質粒子作製技術と比較すると、プラントの工程数・必要電力が削減され、コストやエネルギーの低減につながる(特に、医療用材料のコスト低減は、加速する高齢化社会の医療費削減につながり、社会的な波及効果が高い)。また不明な点が多かった現象である自己乳化現象について、影響を及ぼす因子を詳細に検討することによって、現象を利用して材料を開拓する際の指針が得られたことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary drug delivery system (DDS) is a method of delivering drugs (or drug carriers) to the lungs by inhalation. The advantages of this method include a high drug absorption efficiency due to the use of alveoli having a large surface area and many capillaries and no pain. In this project, porous microparticles with desired pore diameter and number of pores were prepared by detailed evaluation of the self-emulsification phenomenon. The aerodynamic properties of the porous microparticles were evaluated using a cascade impactor (simulated lung), and we succeeded in producing porous microparticles that can easily reach deep into the lungs.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：多孔質粒子

1. 研究開始当初の背景

経肺投与の薬物送達システム(DDS)は、薬物(あるいは、薬物の入れ物である薬物キャリア)を吸入して肺へ薬物を送達する手法であり、「表面積が大きく毛細血管が多い肺胞を利用するため、薬物の吸収効率が高い」「患部に薬物を直接送達することができるため肺疾患の治療効果が高い」「痛みをともなわない」などの利点から、投薬方法としてのさらなる発展が期待されている。経肺投与に適した薬物キャリアは、(1) 粒子径が $1\sim 3\mu\text{m}$ 程度である($1\mu\text{m}$ 以下: 呼吸によって排出されてしまう、 $3\mu\text{m}$ 以上: 気道に沈着してしまう)、(2) 粒子が軽く(=タップ密度が低く)吸気の流れに乗りやすい、(3) 肺胞に到達後は薬物を迅速に放出する、などの条件を満たす必要がある。しかし、これらの条件をすべて満たす粒子の調製は難しく、経肺投与DDSのさらなる発展を妨げる大きな一因となっている。特に、肺アスペルギルス感染症に有効な抗真菌薬については、経肺投与DDSの実現は一例も報告されていない。

前述の条件(1)(3)は粒子の作製条件(粒子を形成する高分子の組成や、粒子調製時の攪拌速度など)の制御によって容易に達成できるが、条件(2)の達成は容易ではない。条件(2)を満たす粒子として有望な材料形態は「多孔質」であり、経肺投与DDSの薬物キャリアとしての応用を目指し、現在までにさまざまな多孔質粒子が報告されている。しかし、「空孔数や空孔径の制御が極めて難しいため表面形態や内部構造が不均一になる」「タップ密度が $0.1\sim 0.3\text{ g/cm}^3$ 程度である」など、実用化に向け解決すべき課題が極めて多いのが現状である。

現在までに本研究代表者は、「高分子乳化剤の存在下で水と油を接触させるだけで、自然に乳化が進行する(自己乳化現象)ことを発見し、この自己乳化現象を粒子形成のプロセスにおいて保持する独自の材料設計アプローチに立脚して、『1回のみ』の乳化操作で『多孔質』粒子が形成する」という新技術を提案した^{1,2)}。現在までに、この新技術によってタップ密度が極めて低い(0.05 g/cm^3)「超低密度」多孔質粒子を作製できること、得られた「超低密度」多孔質粒子は空気力学特性に優れており、肺胞まで到達可能であることなどを明らかにしている³⁾。

2. 研究の目的

(1) 高分子乳化剤による自己乳化現象の解明、および(2) 自己乳化現象を巧みに利用した「1回のみ」の乳化操作で『超低密度』の『多孔質』粒子が形成する」新技術の確立に挑戦することによって、抗真菌薬分野では初めての経肺投与DDSシステムの実現を目指す。

3. 研究の方法

高分子乳化剤(両親媒性ブロック共重合体。親水部: ポリエチレングリコール(PEG)、疎水部: ポリ乳酸(PLA)など)の組成、有機溶媒の種類などのさまざまな因子が、界面における高分子乳化剤の吸着挙動や分子運動性、界面張力の変化、界面揺らぎに及ぼす影響を評価した。熱測定(吸着にともなう発熱・吸熱を評価)、蛍光寿命測定(吸着層に導入した微量の蛍光プローブによって、高分子乳化剤の存在状態を評価)、小角散乱測定(高分子乳化剤が形成するミセル構造の凝集状態を評価)などによって界面吸着挙動及び分子運動性を解析することによって自己乳化現象に影響を及ぼす支配的因子を評価した。さらに、自己乳化現象を利用して作製した多孔質粒子のタップ密度・空孔径・空孔数に影響を及ぼす因子を評価した。粒子形成用の疎水性高分子はポリ乳酸-ポリグリコール酸共重合体(PLGA)を用いた。「水と接触した際の、w/o エマルションの安定性」に影響を及ぼす因子(高分子乳化剤の組成、有機溶媒の種類など)の影響を明らかにすることによって、所望のタップ密度・空孔径・空孔数を得る技術の確立を目指した。最後に、タップ密度、空孔径や空孔数に由来する粒子の気流中の挙動、粒子表面に存在する高分子鎖に由来する表面電荷、などが「超低密度」多孔質粒子の空気力学特性に及ぼす影響を評価した。

4. 研究成果

自己乳化現象の評価に焦点を絞って研究成果を簡潔に述べる。

純水の添加所要時間を変化させて作製した粒子について、純水の添加所要時間が空孔径に及ぼす影響をまとめた(Fig. 1)。純水の添加所要時間が8秒の場合は、水の添加開始と同時に溶液全体が白濁した(添加終了から約10分後の時点においても、溶液全体が白濁したままだった)。添加所要時間が200秒の場合は、有機溶液と純水が接触した界面部分が白濁した。試験管の底部(U字構造)において液量の増加にともない溶液全体が白濁したが、U字構造より高い領域まで溶液が達してからは、白濁した部分は底に留まり、白濁が見られない透明な液体量が増加した。また、底部に留まった白濁した部分からは、直径が1mm程度の白濁した液滴が分離して浮上する様子が見られた。添加所要時間が500秒の場合は、純水の添加直後、有機溶媒相のうち純水と

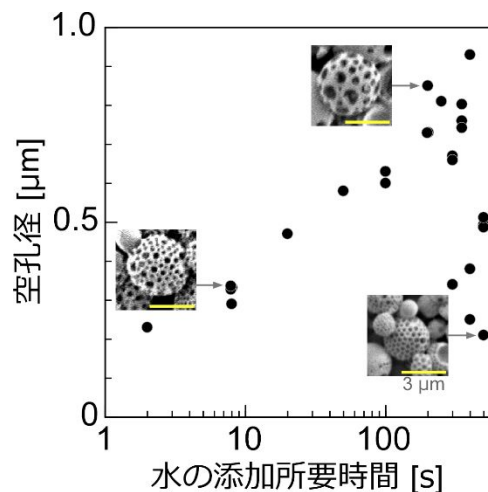
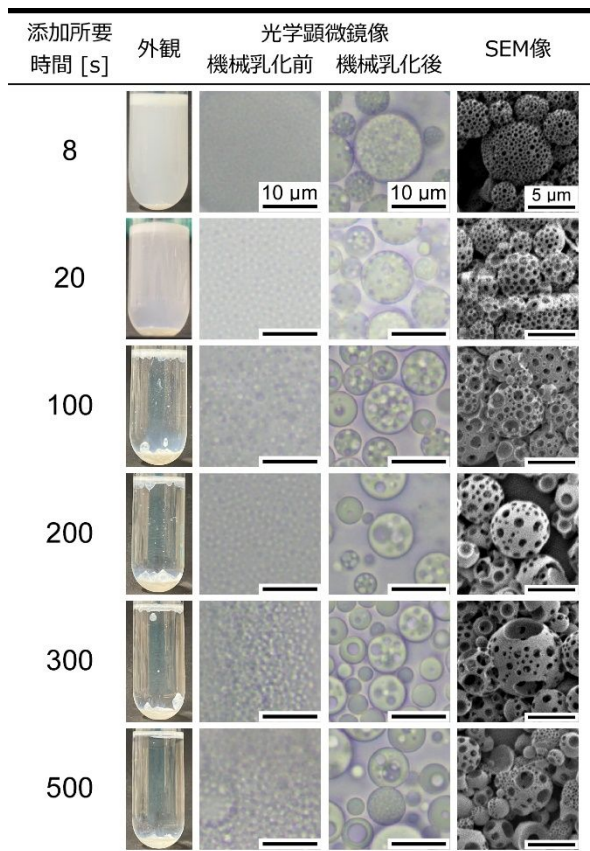


Fig. 1 水の所要添加時間が（左）自己乳化エマルジョン溶液の外観・粒子のSEM像および（右）空孔径に及ぼす影響

触れた上部付近には白濁が見られたが、有機溶媒相の下部には純水が入り込まず、濁度が低い部分が底にとどまった。以上の観察結果より、有機溶媒相では、自己乳化エマルジョンが多く存在する領域と存在しない領域に分かれていることが示唆された。

機械乳化前の光学顕微鏡の観察には、溶液上部に浮いている白濁部の溶液を使用した。純水の添加所要時間が8秒の場合、他の条件と比較して粒径が小さい自己乳化エマルジョンが得られることが明らかになった。添加所要時間が200秒まで増加するのにもない、大きな内部水滴の割合が増加した。機械乳化前に対して機械乳化後の内部水滴がより大きくなったことから、添加所要時間が長い場合（200秒以上）は、自己乳化エマルジョンが合一化しやすいことが示唆された。添加時間が500秒の場合、大きな内部水滴とともに、純水の添加所要時間が8秒の場合に得られた内部水滴と同等かそれよりも小さい内部水滴が観察された。したがって、純水の添加所要時間が200秒より長くなると、性質の異なる自己乳化エマルジョンが生成されると考えられる。

得られた粒子のSEM像からは、機械乳化後の光学顕微鏡像で見られた内部水滴の大きさの傾向と符合するように、純水添加所要時間が8秒の場合の粒子の空孔径が最も小さく、添加所要時間の増加にともない空孔径が大きくなった。また、添加所要時間が500秒の場合、大きな空孔径とともに、非常に小さな空孔を有する粒子が得られた。このことから、機械乳化後の時点でのw/o/wエマルジョンの内部水滴径の大小関係が、粒子作製における溶媒除去過程を経ても維持されることが示唆された。本多孔質粒子の作製方法において、使用する溶媒種や溶媒の除去過程における各種条件を変化させることによって、w/o/wエマルジョンの内部水滴の安定性が変化し、多孔質粒子の内部構造や表面形態を制御可能であることがすでに報告されている。そのため、報告されている知見と今回得られた知見を組み合わせることで、より広範に多孔質粒子の表面形態や内部構造を自在に制御可能になることが期待される。また、純水の添加時間を2秒から200秒の間で変化させることによって、空孔径を制御可能なことが示唆された。

純水の添加所要時間が空孔径の平均値に及ぼす影響については、純水の添加時間が2秒から200秒の場合、添加所要時間（の対数）に比例するように空孔径が大きくなった。しかし、添加所要時間が300秒から500秒の範囲では、空孔径の平均値が飽和値に達した。さらに、空孔径の最大値も3μm程度で飽和となった。これは、空孔径と粒子の粒径が近くなったことで、それ以上に大きい内部水滴が形成したとしても、粒子の大きさによって上限が定められてしまうためであると考えられる。また、純水の添加所要時間が300秒から500秒の場合、同一条件で調製し

た粒子の空孔径の平均値の偏差が大きくなった。さらに、添加所要時間の増加にともない、直径0.2~0.3 μm の空孔の割合が大きくなった。

自己乳化現象を詳細に評価することによって、所望の空孔径・空孔数を有する多孔質微粒子の作製が容易になった。カスケードインパクター（模擬肺）によって多孔質微粒子の空気道力学的特性を評価したところ、肺深部へ容易に到達する多孔質微粒子の作製に成功した。

<参考文献>

- 1) Takami, T., Murakami, Y., "Unexpected and successful "one-step" formation of porous polymeric particles only by mixing organic solvent and water under "low-energy-input" conditions", *Langmuir*, 30, 3329-3336 (2014)
- 2) Nishimura, S., Murakami, Y., "Precise control of the surface and internal morphology of porous particles prepared using a spontaneous emulsification method", *Langmuir*, 37, 3075-3085 (2021)
- 3) Nishimura, S., Takami, T., Murakami, Y., "Porous PLGA microparticles formed by "one-step" emulsification for pulmonary drug delivery: the surface morphology and the aerodynamic properties", *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 159, 318-326 (2017)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura, S., Murakami, Y.	4. 巻 37
2. 論文標題 Precise control of the surface and internal morphology of porous particles prepared using a spontaneous emulsification method	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Langmuir	6. 最初と最後の頁 3075-3085
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.langmuir.0c03311	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura, S., Murakami, Y.	4. 巻 614
2. 論文標題 Facile preparation of porous polymeric sheets with different sizes of pores on both sides using spontaneous emulsification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.	6. 最初と最後の頁 126149
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.colsurfa.2021.126149	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato, T., Murakami, Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Temperature-responsive polysaccharide microparticles containing nanoparticles: release of multiple cationic/anionic compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Materials	6. 最初と最後の頁 4717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ma15134717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato, T., Saito, H., Murakami, Y.	4. 巻 76
2. 論文標題 Thermoresponsive polysaccharide particles: control of dissolution and release properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J. Drug Deliv. Sci. Technol.	6. 最初と最後の頁 103793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jddst.2022.103793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田口諒, 西村真之介, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した「超低密度」多孔質バイオマテリアルの作製 ~ 経肺投与DDSへの応用を目指した薬物放出制御 ~
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森口香帆, 村上義彦
2. 発表標題 経肺投与DDSを指向した水性二相分配系を用いたエマルションおよび微粒子の作製
3. 学会等名 第70回高分子学会年次大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田口諒, 西村真之介, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した「超低密度」多孔質バイオマテリアルの作製 ~ 経肺投与DDSへの応用を目指した薬物放出制御 ~
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森口香帆, 村上義彦
2. 発表標題 経肺投与DDSを指向した水性二相分配系を用いたエマルションおよび微粒子の作製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西村真之介, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した多孔質シート作製のための新技術
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤拓未, 村上義彦
2. 発表標題 多糖のゾル-ゲル転移を利用した温度応答性マイクロ粒子の開発 ~ 経肺投与DDSへの応用 ~
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡部美咲, 西村真之介, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した「超低密度」多孔質バイオマテリアルの作製 ~ 経肺投与DDSへの応用 ~
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森口香帆, 村上義彦
2. 発表標題 経肺投与DDSを指向した水性二相分配系を用いたエマルションおよび微粒子の作製
3. 学会等名 第69回高分子学会年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sato, T., Murakami, Y.
2. 発表標題 Development of temperature-responsive microparticles formed via sol-gel transition for pulmonary delivery
3. 学会等名 47th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishimura, S., Murakami, Y.
2. 発表標題 Novel method for preparing porous sheets by using spontaneous emulsification
3. 学会等名 47th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田口諒, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した「超低密度」多孔質マイクロ粒子の作製 ~ 経肺投与DDSへの応用を目指して ~
3. 学会等名 第71回高分子学会年次大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田口諒, 村上義彦
2. 発表標題 自己乳化現象を利用した多孔質マイクロ粒子の作製 ~ 経肺投与DDSへの応用に向けて ~
3. 学会等名 第44回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2022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
研究 分担 者	村上 智亮 (Murakami Tomoaki) (10728447)	東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授 (12605)	

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
---------	---------