

## 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24年 6月 4日現在

機関番号：33919

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790051

研究課題名（和文） 非侵襲的な肺内送達量評価に基づくテララーメイド型抗癌剤粉末吸入療法確立

研究課題名（英文） DEVELOPMENT OF PERSONALIZED ANTICANCER THERAPY BY INHALABLE DRY POWDER BASED ON NONINVASIVE LUNG DEPOSITION MONITORING

研究代表者

奥田 知将（OKUDA TOMOYUKI）

名城大学・薬学部・助教

研究者番号：20513857

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺内送達量を簡便かつ非侵襲的に評価可能な近赤外蛍光ラベル化抗癌剤粉末吸入製剤の開発を進め、肺内送達量評価としての妥当性とともにより癌治療効果との相関性について検討した。調製した製剤をマウス肺内に投与したところ、近赤外蛍光イメージングによる肺内送達量評価とその直後に摘出した肺での抗癌剤分布量評価との間に有意な相関性が得られ肺内送達量評価の妥当性を確認するとともに、肺内送達量評価と癌治療効果との間にも有意な相関性が得られた。

研究成果の概要（英文）：In this study, a novel inhalable dry anticancer powder containing doxorubicin (DOX) was prepared, labeled with a near-infrared fluorescent probe (indocyanin green; ICG) for easily and noninvasively evaluating lung deposition. Following pulmonary administration of the powder into mice, it was suggested that the *in-vivo* fluorescence intensity in the lungs derived from ICG was significantly correlated not only with the *ex-vivo* fluorescence intensity in the excised lungs derived from DOX, but also with the anticancer effect in the lungs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：粉末吸入製剤、近赤外蛍光ラベル、*in vivo* イメージング、肺癌治療、肺内送達、テララーメイド医療、噴霧急速凍結乾燥法、多孔性微粒子

## 1. 研究開始当初の背景

吸入製剤は主薬を肺内へ直接送達可能であることから、肺局所性疾患の治療法として最適な投与形態を有し、既に喘息等を対象として臨床応用されているが、根治が困難な肺癌に対してもその応用が強く望まれている。とりわけ粉末吸入製剤は、ネブライザーなどの溶液吸入製剤と比較して取り扱いの

簡便さ・保存時の高い安定性など利点が多く、今後の適用拡大が期待されている。しかし治療域の狭い抗癌剤を粉末吸入製剤として臨床応用する上では、製剤の物理化学的性質・患者の健康状態・吸入パターンの違いなどの諸条件による吸入後の患者個々の肺内送達量のばらつきを十分に考慮する必要がある。一方、これまでの粉末吸入製剤の研究・開発

では分散性など製剤の物理化学的性質について評価することが主流であり、生体内投与後の薬理効果・毒性について評価がなされた報告は少ない。この大きな要因として、小動物を用いた検討で粉末吸入製剤投与時における呼吸との同調が困難なため肺内送達量にばらつきが生じ易いことが挙げられ、その結果薬理効果が不明瞭となるケースも多い。これらの点から抗癌剤粉末吸入製剤の臨床応用に向けては、個々の患者あるいは実験動物の肺内送達量を非侵襲的かつ簡便に評価し、治療効果と毒性の評価・解析に外挿するとともに投与設計に役立てるテーラーメイド型吸入療法の実現が望まれる。

このような方法として当研究室ではこれまでに肺内送達量を非侵襲的に評価可能な近赤外蛍光ラベル化遺伝子粉末吸入製剤を調製することに成功し、マウス肺内投与後の肺内送達量と肺内遺伝子発現効果が高い相関性を示すことを明らかにしている。近赤外蛍光指示薬が励起・検出される長波長側 (650-900 nm) の光は、赤血球や水による吸収が少ないため組織透過性が高く、また生体が放つ自家蛍光が少ないことから、高感度 CCD カメラを利用した蛍光イメージング技術により、その体内分布を非侵襲的に評価することが可能となる。

本研究は肺内送達量の正確な把握が課題である抗癌剤粉末吸入製剤の開発ならびに実用化に向けて、この技術を応用したものである。

## 2. 研究の目的

本研究の主目的は、簡便かつ非侵襲的に肺内送達量を評価可能な近赤外蛍光ラベル化抗癌剤粉末吸入製剤を新たに開発するとともに、従来の癌治療効果・毒性の結果に肺内送達量の結果を外挿した評価・解析を試み、肺内送達量のばらつきが問題となる抗癌剤粉末吸入製剤の新規評価・解析法としての有用性について検討することである。

まず粉末吸入製剤としての実用化に向けて、優れた吸入特性を発揮し得るための組成最適化を進めた。最適化した製剤について、マウスに肺内投与し、*in vivo* 近赤外蛍光イメージングにより製剤の肺内送達量を評価・解析するとともに、その後の抗癌剤の組織分布について評価した。さらに個々のマウスについて肺内投与後の肺内送達量・癌治療効果・毒性の3項目を評価・解析するとともに、肺内送達量と癌治療効果・毒性との相関性を評価することで本製剤の有用性について検討した。また吸入製剤の *in vivo* での作用をより反映した *in vitro* 評価系として気-液界面培養評価系を応用して、製剤分散添加後の抗癌剤の膜透過性ならびに抗癌作用について評価を行い、肺内投与後の抗癌剤の体内動

態ならびに癌治療効果の結果と照らし合わせることで、本製剤の生体内での作用をより詳細に解明することを試みた。

これら一連の検討を通じて、将来的には患者個々の製剤肺内送達量に基づくテーラーメイド型抗癌剤粉末吸入療法への展開を目指していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 製剤の調製および粒子形状評価

近赤外蛍光指示薬、抗癌剤、およびキャリアーとしてインドシアニンググリーン (ICG)、ドキシソルビシン塩酸塩 (DOX)、およびマンニトールをそれぞれ選択し、製剤を噴霧急速凍結乾燥法により調製した。具体的には成分を含む試料溶液を液体噴霧器 (MicroSprayer® IA-IC Type, PennCentury 社; 液滴粒子径 16-22  $\mu\text{m}$ ) で液体窒素中に噴霧することで液滴を瞬時に凍結し、凍結した液滴を凍結乾燥機に移した後、水分を昇華することで目的の製剤を得た。吸入特性の向上を目的として、分散補助剤である L-ロイシン (Leu) を種々の割合で添加して製剤を調製した。吸入特性評価用の製剤については、ヒトへの DOX の飛散曝露を配慮し、DOX の代わりに定量用蛍光色素としてフルオレセインナトリウムを添加して調製した。調製した各製剤の粒子形状・粒子径は走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察・評価した。

### (2) 製剤の吸入特性評価

調製した各製剤の吸入特性をアンダーセン型カスケードインパクター (ACI) を用いて評価し、Leu 添加による吸入特性への影響について検討した。得られた沈着パターンを元に Output Efficiency (OE; 分散性の指標)、Fine Particle Fraction (FPF; 肺内到達性の指標)、空気力学的粒子径 (MMAD; 吸入剤として 1-6  $\mu\text{m}$  が最適) の各吸入特性パラメータを算出した。

### (3) 製剤の抗癌活性評価

調製した製剤の再溶解液を 96-well マイクロプレートに播種したマウス由来結腸癌細胞 (CT-26 細胞) に添加し、添加 48 時間後の抗癌活性を MTT assay により評価した。同組成の試料溶液と抗癌活性を比較することで、製剤化の過程で DOX の抗癌活性を損失していないか確認した。また DOX を抜いた試料溶液についても同様の検討を行い、DOX 以外の製剤成分による細胞毒性を評価した。

### (4) 近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価

調製した製剤 1 mg (DOX として 30  $\mu\text{g}$ ) を当研究室が開発した粉末分散投与デバイスを用いて ICR マウスの肺内に分散投与し、

投与 15 分後に in vivo イメージングシステム (IVIS<sup>®</sup>)を用いてマウスにおける ICG 由来の蛍光 (in vivo)を検出し、その肺内蛍光強度を解析することで肺内送達量として評価した。さらに、その 5 分後 (投与 20 分後)に肺を摘出し、IVIS<sup>®</sup>を用いて摘出肺における DOX 由来の蛍光 (ex vivo)を検出し、その蛍光強度を解析することで、実際の DOX の肺内分布量として評価した。ICG (in vivo)および DOX (ex vivo)の蛍光強度をそれぞれプロットして相関性を解析することで、近赤外蛍光イメージングによる肺内送達量評価の妥当性を検討した。

(5) 製剤肺内投与後の DOX の組織分布

調製した製剤 1 mg (DOX として 30  $\mu$ g) を ICR マウスの肺内に分散投与後、所定の時間に各臓器を摘出し、IVIS<sup>®</sup>を用いて各臓器中の DOX 由来の蛍光 (ex vivo)を検出し、その蛍光強度を解析することで、DOX の組織分布量として評価した。比較対照として DOX 溶液 (DOX として 30  $\mu$ g) を静脈内投与し、同様の検討を行った。

(6) 製剤の肺癌治療効果および毒性評価

CT-26 細胞を Balb/c マウスに尾静脈内投与で播種することにより、肺転移癌モデルマウスを作成した。

播種後所定の日に、調製した製剤 0.5 mg (DOX として 30  $\mu$ g) を肺転移癌モデルマウスの肺内に分散投与し、投与 15 分後に IVIS<sup>®</sup>を用いてマウスにおける ICG 由来の蛍光 (in vivo)を検出し、その肺内蛍光強度を解析することで肺内送達量として評価した。1 回投与では播種後 3 日目、2 回投与では播種後 3・6 日目、3 回投与では播種後 3・6・9 日目に投与を行い、肺内送達量は各投与日に得られた ICG 由来の肺内蛍光強度の値の総和として算出した。

播種後 14 日目に体重測定ならびに採血をした後、肺を摘出して重量を測定し、未処理の肺転移癌モデルマウスの肺重量と比較することで、癌治療効果を評価した。同様に、体重ならびに採血した血液中のクレアチンホスホキナーゼ (CPK) およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性について、未処理の肺転移癌モデルマウスの測定値と比較することで毒性を評価した。CPK および AST はともに心筋に豊富に存在しており、DOX により引き起こされる心毒性のマーカーとして用いた。比較対照として DOX 溶液 (DOX として 30  $\mu$ g) を 3 回静脈内投与 (播種後 3・6・9 日目)し、同様の検討を行った。

(7) 気-液界面培養評価系の作成および製剤分散添加後の DOX の膜透過性および抗癌作用評価

ヒト気道上皮癌細胞 (Calu-3 細胞) をトランスウェル<sup>®</sup>の半透膜上に播種し、粘膜側の培地を除去して基底膜側の培地のみで培養することにより気-液界面培養評価系を作成した。分化の指標として膜抵抗値を経日に測定し、実験で用いる最適培養日数を検討した。また細胞を播種していないトランスウェル<sup>®</sup>の半透膜上に当研究室が開発した粉末分散添加デバイスを用いて製剤 0.5 mg (DOX として 30  $\mu$ g) を分散添加した後、半透膜上に沈着した製剤を回収し DOX を定量することで、実際の曝露量を評価した。

作成した気-液界面培養評価系について、粘膜側に当研究室が開発した粉末分散添加デバイスを用いて製剤 0.5 mg (DOX として 30  $\mu$ g) を分散添加した後、所定の時間に基底膜側の培地をサンプリングし、サンプル中の DOX を定量して膜透過量を算出した。製剤添加 48 時間後に細胞膜にトリプシン-EDTA 溶液を加えることで細胞懸濁液を作成し、トリパンブルーで染色することで抗癌活性を評価した。比較対照として実際の曝露量に相当する製剤の再溶解液を用いて、同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) 製剤の粒子形状および吸入特性

SEM 観察より、調製した製剤は Leu の添加量に依らず、中空多孔で直径が 15-30  $\mu$ m の球状微粒子であることを確認した (図 1)。

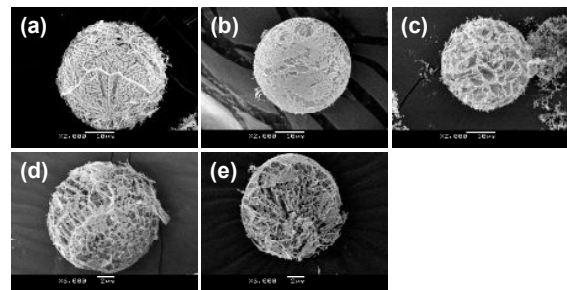


図1. Leu 添加量 (w/w)を変えて調製した各製剤の SEM 画像  
(a) 0% (b) 5% (c) 10% (d) 20% (e) 30%

これらの製剤の吸入特性について ACI を用いて評価したところ、Leu の添加量に依って沈着分布がステージ下側へとシフトした (図 2)。この結果を元に算出した OE 値および FPF 値についても、Leu の添加量に依ってそれぞれの値が著しく上昇し、分散性および肺内到達性の飛躍的な改善効果が示された。中でも Leu を 20% (w/w) 添加した製剤において OE 値で約 95%、FPF 値で約 65%と、ともに最高値が得られた。肺深部に相当するステージから回収した製剤を SEM で観察したところ、元の形状を維持しておらず、 $\mu$ m サイズの細かな断片であった。この結果から、調製した製剤は吸入時の気流によって構造

が崩壊し、細かな断片となることで肺深部に到達することが示唆された。また Leu を 20 % (w/w) に固定して DOX を 0-12 % (w/w) の添加量で調製した製剤を SEM で観察したところ、DOX の添加量による粒子形状・粒子径への影響は認められず、Leu の添加による優れた吸入特性が担保されていると考えられた。

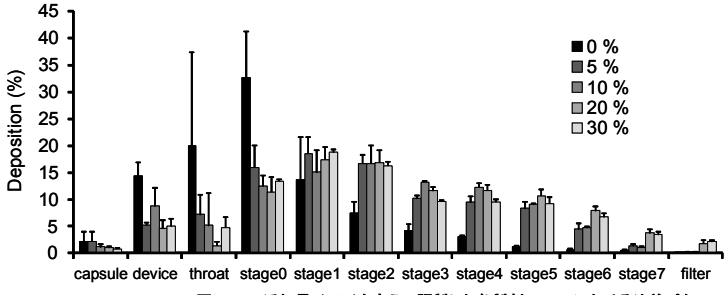


図2. Leu 添加量 (w/w) を変えて調製した各製剤の AGI における沈着パターン (n = 3, mean ± S.D.)

Leu (w/w)	0 %	5 %	10 %	20 %	30 %
OE (%)	83±1	93±2	90±3	94±2	94±1
FPF (%)	21±3	55±5	64±1	68±4	61±1
MMAD (μm)	10.5±1.0	4.8±0.6	4.4±0.4	3.4±0.5	3.7±0.1

表1. Leu 添加量 (w/w) を変えて調製した各製剤の吸入特性パラメータ (n = 3, mean ± S.D.)

## (2) 製剤の抗癌活性

調製した製剤の再溶解液を用いて、抗癌活性を評価した (図3)。再溶解液の濃度-細胞生存率曲線は、製剤化前の試料溶液と同様であり、製剤化後も抗癌活性が十分に保持されていることが確認できた。また DOX を除いた試料溶液では細胞生存率への影響は認められず、DOX 以外の製剤成分による細胞毒性は極めて小さいことが示唆された。

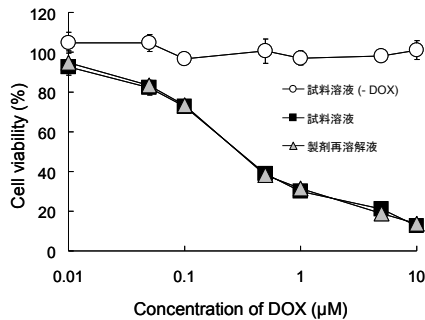


図3. 製剤再溶解液の濃度-細胞生存率曲線 (n = 4, mean ± S.D.)

## (3) 近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価の妥当性

近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価の妥当性について検討することを目的として、製剤を肺内投与した個々のマウスについて、ICG の in vivo 蛍光イメージング (図4 (a)) から得られる肺内蛍光強度 (近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価) と、その直後に摘出した肺での DOX の ex vivo 蛍光イメージング (図4 (b)) から得られる肺内蛍光強度 (実際の

DOX の肺内分布量評価) をそれぞれ解析し、それらの相関性について評価した (図4 (c))。個々のマウスならびに摘出肺について、それぞれ蛍光強度のバラツキが観察されたが、これは前述した肺内送達量のバラツキに起因するものと考えられる。一方、ICG (in vivo) と DOX (ex vivo) の肺内蛍光強度の間に有意な相関関係が得られたことから、近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価の妥当性を確認することができた。

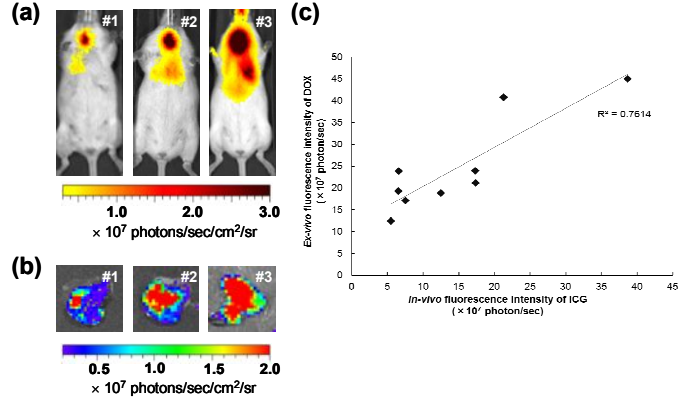


図4. 近赤外蛍光イメージングによる肺内送達量評価

(a) ICG の in vivo 蛍光イメージング画像 (マウス)

(b) DOX の ex vivo 蛍光イメージング画像 (肺)

(c) ICG の肺内蛍光強度 (in vivo) と DOX の肺内蛍光強度 (ex vivo) との相関性

## (4) 製剤肺内投与後の DOX の組織分布

調製した製剤をマウス肺内に投与した後の DOX の組織分布について、静脈内投与の場合と比較検討した (図5)。肺内送達量に起因した分布量のバラツキが認められるものの、投与初期においては静脈内投与よりも製剤肺内投与の方が DOX の肺内分布量が多いことが確認できた。しかし、その分布は一時的であり、DOX は比較的速やかに肺から吸収されて全身へと移行することが明らかとなった。一方、肺以外の臓器については製剤肺

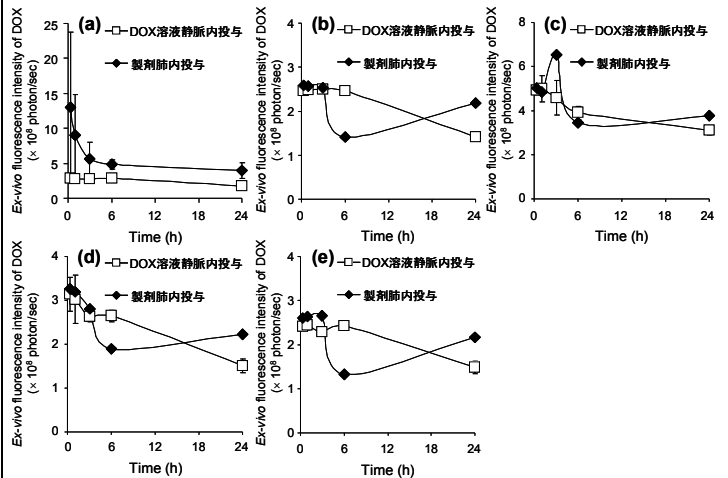


図5. 製剤肺内投与および DOX 溶液静脈内投与後の DOX の体内動態

(n = 3, mean ± S.D.)

(a) 肺 (b) 心臓 (c) 肝臓 (d) 腎臓 (e) 脾臓

内投与と静脈内投与で分布挙動に大きな変化は認められなかった。

(5) 製剤の肺癌治療効果および毒性

癌を播種していない健常マウスと比較して肺転移癌モデルマウスでは癌の増殖に伴い、播種後 14 日目で肺重量が約 5 倍まで増加していた (図 6 (a))。一方、製剤を投与したマウスでは投与回数に依存して肺重量の増加が抑制され、癌治療効果が認められた。この結果と近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価の結果を合わせてプロットしたところ、肺内蛍光強度と肺重量に有意な相関性が認められた (図 6 (b)) ことから、肺内送達量に依存した癌治療効果が示唆された。一方、体重ならびに各血液マーカー (CPK および AST) についても、同様のプロットを行ったが、肺内蛍光強度との相関性は認められず (図 7-9)、製剤の肺内投与の安全性が示唆された。これらの結果から、近赤外蛍光イメージングによる製剤の肺内送達量評価を組み込むことで、より詳細な抗癌剤粉末吸入製剤の癌治療効果・毒性を評価・解析できる可能性が示唆された。

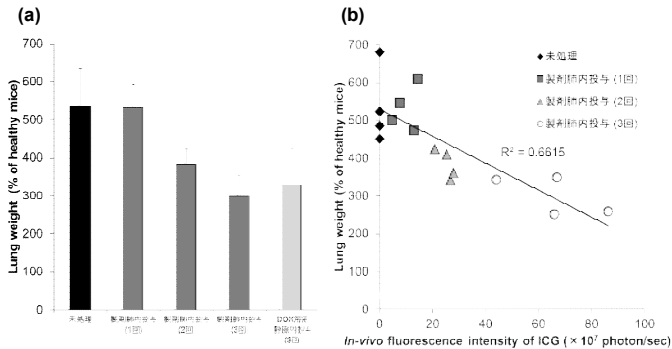


図6. 肺転移癌モデルマウスへの製剤肺内投与による癌治療効果  
(a) 従来の解析 (n = 4, mean ± S.D.)  
(b) 肺内送達量評価を組み合わせた解析

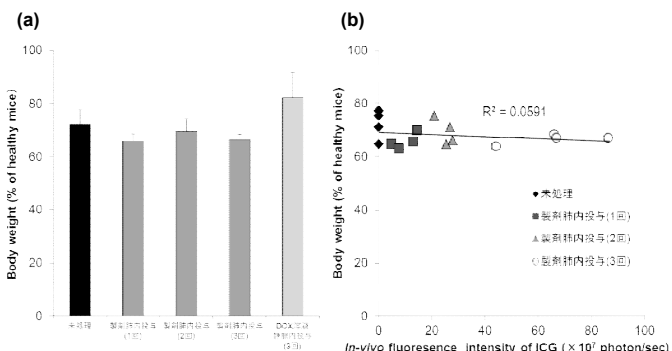


図7. 肺転移癌モデルマウスへの製剤肺内投与による体重への影響  
(a) 従来の解析 (n = 4, mean ± S.D.)  
(b) 肺内送達量評価を組み合わせた解析

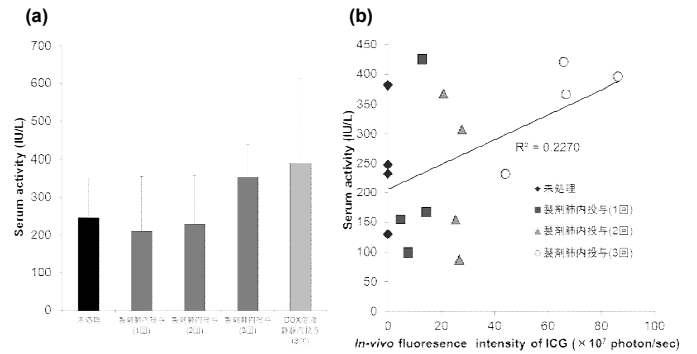


図8. 肺転移癌モデルマウスへの製剤肺内投与によるCPKへの影響  
(a) 従来の解析 (n = 4, mean ± S.D.)  
(b) 肺内送達量評価を組み合わせた解析

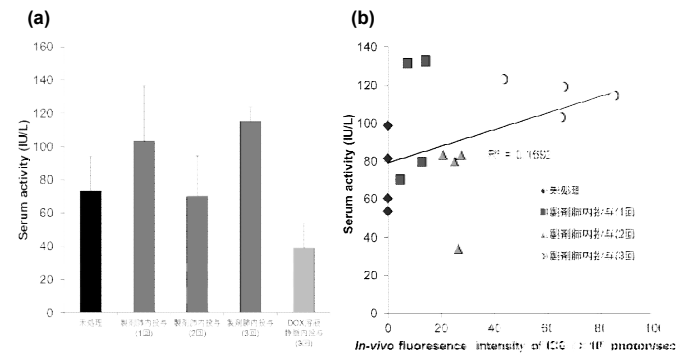


図9. 肺転移癌モデルマウスへの製剤肺内投与によるASTへの影響  
(a) 従来の解析 (n = 4, mean ± S.D.)  
(b) 肺内送達量評価を組み合わせた解析

(6) 気-液界面培養評価系における製剤分散添加後のDOXの膜透過性および抗癌作用

膜抵抗値を経日的に測定したところ、播種 12-19 日目に約  $400 \Omega \times \text{cm}^2$  の安定した値が得られたため、この期限内のものを実験に用いることにした。また実際の製剤曝露量を評価したところ、充填した製剤のうち約 30% (DOX として約  $9 \mu\text{g}$ ) であることが示された。

製剤を分散添加した場合には、製剤の再溶解液 (DOX として約  $9 \mu\text{g}$ ) よりも添加 8 時間後の時点で約 6 倍以上高い DOX の膜透過性が認められた (図 10)。このような製剤分散添加による膜透過性亢進作用は DOX 以外の薬物でも確認しており、製剤が細胞膜に直接接触することで生じる薬物高濃度条件に起因することを明らかにしている。

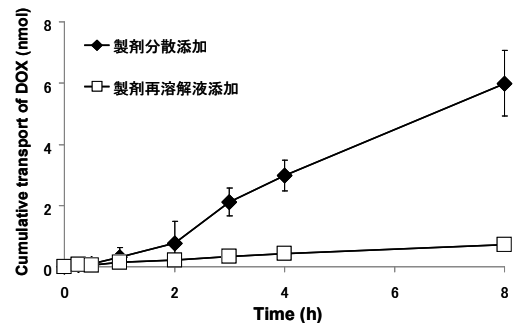


図10. DOXの膜透過量の経時変化 (n = 3, mean ± S.D.)

またトリパンブルー染色により抗癌作用を確認したところ、製剤の再溶解液よりも製剤を分散添加した方でより多くの癌細胞が染色されていた（図11）ことから、製剤分散添加の方がより高い抗癌作用を發揮する可能性が示唆された。この理由として、先述の膜透過性亢進作用に起因することが考えられる。

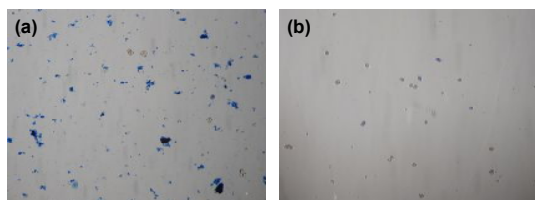


図11. Calu-3 細胞のトリパンブルー染色画像  
(a) 製剤分散添加 (b) 製剤再溶解液添加

以上、吸入特性に優れた近赤外蛍光ラベル化抗癌剤粉末吸入製剤の開発に成功し、近赤外蛍光イメージングによる肺内送達量評価の妥当性を明らかにできた。また肺内送達量評価に基づいた癌治療効果・毒性の評価・解析法の有用性が示された。現在のところ、近赤外蛍光イメージングによる体内分布評価は小動物実験に限定されたものであるが、蛍光強度に優れた指示薬ならびに感度に優れた検出機器が今後創製されることで、ヒトを対照とした診断技術として本研究成果を応用・展開することも十分に期待できる。

さらに粉末吸入製剤と溶液吸入製剤とで肺内送達後の全身移行性ならびに抗癌作用が異なる可能性が示唆され、今後この点についても検証していきたいと考えている。

## 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)

[学会発表] (計4件)

- ① 早野旭彦、右納 寛、向山直樹、奥田知将、岡本浩一、噴霧急速凍結乾燥抗癌剤粉末微粒子の肺内投与後の体内動態および癌治療効果、第28回日本DDS学会学術集会(2012年7月4日、札幌コンベンションセンター)
- ② 早野旭彦、右納 寛、向山直樹、奥田知将、岡本浩一、肺癌治療への応用を目指した近赤外蛍光ラベル化吸入用抗癌剤粉末微粒子の開発、日本薬剤学会第27年会(2012年5月24日、神戸国際会議場)
- ③ 早野旭彦、加藤沙紀、柳本真弥、奥田知将、岡本浩一、非侵襲性肺内送達量評価を可能とする抗癌剤粉末吸入製剤の開発、第57回日本薬学会東海支部総会・大会(2011年7月9日、金城学院大学)
- ④ Tomoyuki Okuda、Non-invasive lung deposition monitoring of inhalable dry

powder by near-infrared fluorescent labelling、APSTJ Global Education Seminar West 10-2 (2010年12月21日、京都大学)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

奥田 知将 (OKUDA TOMOYUKI)  
名城大学・薬学部・助教  
研究者番号：20513857

### (2) 研究分担者

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

なし

研究者番号：

### (4) 研究協力者

岡本 浩一 (OKAMOTO HIROKAZU)  
名城大学・薬学部・教授  
研究者番号：00308941