

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：23701

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15263

研究課題名（和文）エレクトロスピンニング技術を用いた吸入粉末剤新規調製法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel preparation method for inhalation powders using electrospinning technique

研究代表者

伊藤 貴章 (Ito, Takaaki)

岐阜薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：20878160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：既存の吸入粉末剤（DPI）調製法は、高温処理するため熱に弱い薬物に適用できない問題がある。本研究は、エレクトロスピンニング（ES）法を新規吸入粉末剤調製法として応用するため、ES法DPI調製技術の有用性を証明し、実用化への道筋をつけることを最終目標とした。タンパク質をモデル薬物として用い、ES法DPIを調製した。その結果、タンパク質の活性を95%維持しつつ、製剤化することに成功した。対照群としてネブライザー処理したタンパク質吸入液剤は、活性が60%未満まで低下した。この結果は、ES法が熱やせん断ストレスに弱い医薬品に対する有用な製剤化技術であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エレクトロスピンニング（ES）法は装置のノズルから放出された試料溶液が、コレクターに捕集される過程でナノファイバー固化するため、熱を必要とせずあらゆる薬物を粉末固化できる。微粒子化方法は、凍結粉碎やジュールトムソン効果を利用したジェットミルなど、熱が発生しない技術が確立されている。以上の点から、ES法ファイバーマットの微粒子化は抗体医薬や核酸医薬など熱に弱い薬物との親和性が高い。吸入粉末剤（DPI）におけるES法の利用価値を実証できれば、抗体医薬や核酸医薬に対するDPI開発のブレイクスルーが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Dry powder inhalers (DPIs) have excellent storage stability. However, some conventional DPI formulation processes require heating, which may damage high molecular weight drugs such as proteins. In this study, we developed a novel DPI preparation process that avoids the use of heat using the electrospinning technique. Dry powders were prepared by cryomilling nanofiber mats containing a protein as the model drug. As a result, cryomilled nanofiber mats containing the protein exhibited greater enzymatic activity than a nebulized protein solution. This novel DPI formulation process may facilitate the efficient inhalation therapy of protein drugs.

研究分野：薬剤学

キーワード：エレクトロスピンニング 電界紡糸法 吸入治療 吸入粉末剤 バイオ医薬 核酸医薬 製剤設計

1. 研究開始当初の背景

ペプチドや核酸は作用特異性に優れることから、従来難治性だった疾患に対する有望な治療モダリティとして、近年急速に開発が進んでいる。その一方でこれらモダリティは、注射による液体投与が一般的で、投与に侵襲を伴うほか熱や液体中で不安定であるため、保存に特殊な冷蔵設備が必要となる。呼吸器疾患の場合、吸入剤は侵襲性が低く全身性の副作用を軽減できる合理的な投与手段といえる。加えて、これら薬物の粉末製剤化は、後進国などコールドチェーンの整っていない地域への流通、大規模自然災害時の安定的保存に絶大な貢献が期待できる。すなわち、吸入粉末剤 (DPI) は、ペプチドや核酸の吸入製剤化における第一選択といえる。

一方で、ペプチドや核酸の DPI 開発には、製剤設計の観点からいくつかの課題が存在する。例えば、既存の DPI 調製法の多くは、薬物を粉末固化するために熱を用いるため、熱に弱い薬物の分解または失活が懸念される。また、ペプチドや核酸に限らず、肺深部に薬物粒子を送達するには空気力学的粒子径を 1~6 μm と微細に制御する必要があるが、シングルミクロン以下の粒子は微粒子同士または吸入デバイスとの付着凝集が大きくなるため、薬剤放出効率が治療効果を大きく左右する。付着凝集を防ぐ製剤設計として、キャリア乳糖を用いた造粒物の形成が一般的だが、この方法では投与時に薬物をキャリア乳糖から脱着させるために「強く吸う」必要がある。すなわち、既存の DPI は、高齢者や呼吸器感染症など吸入能力が衰えた患者にとって、薬物を確実に肺深部へ送達させることが難しい。

申請者は、高分子ポリマー溶液を室温以下で固化可能なエレクトロスピンニング (ES) 法に着目し、薬物含有ナノファイバーマットを微粒化するこことで、DPI に応用することを着想した。装置のノズルから放出された試料溶液は、コレクターに捕集される過程で溶媒が蒸発するため、熱を必要とせずあらゆる薬物を粉末固化できる。さらにファイバー形状を維持しつつ微粒化することで、造粒を省略できる。すなわち、「強く吸う」必要がない、患者背景に依存しない吸入療法を達成できる。

2. 研究の目的

ES 法 DPI の肺送達性と薬物安定性は、ファイバー材料の物理学的性質や ES 法の調製条件、微粒化方法に強く影響を受ける。本研究は、「ES 法を新規 DPI 調製法として応用するための製剤設計基盤構築」を目的に、製剤組成と微粒化方法が ES 法 DPI の肺送達性と薬物安定性に及ぼす影響を解析し、ES 法 DPI の最適な調製条件を見出す、物理学的性質の異なる様々な薬物を用いて DPI を調製し、薬物安定性と薬効に基づいた ES 法 DPI 調製技術の汎用性および有用性を実証することを試みた。

3. 研究の方法

ES 法 DPI の製剤設計

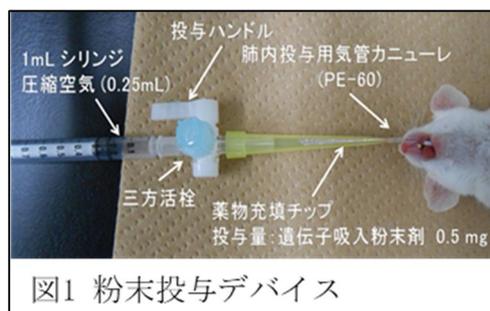
モデル薬物に α -キモトリプシン (α -Chy)、賦形剤に生分解性ポリマーであるポリビニルアルコール (PVA)、粉碎補助剤にマンニトール (Man) を用いた。(1) 印加電圧などファイバー調製条件、(2) 微粒化条件を変化させ ES 法 DPI を調製した。調製した ES 法 DPI の形状を観察するため、走査型電子顕微鏡 (SEM) を用い、微粒子の幾何学的粒子径はレーザー回折式光散乱装置 (LDSA) を用いて算出した。

ES 法 DPI の調製条件の最適化

肺送達性と薬物安定性の観点から ES 法 DPI の調製条件を最適化した。肺送達性評価にはアンダーセン型カスケードインパクターを用いて、ES 法 DPI の肺到達率 (FPF) を測定した。その他、肺沈着挙動を累積百分率-対数正規分布表にプロットし、空気力学的粒子径 (MMAD) を算出した。薬物安定性は α -Chy の基質である *p*-ニトロフェニル酢酸を添加し、吸光度計を用いて加水分解物を定量することで α -Chy 含有 ES 法 DPI の活性を評価した。

ES 法 DPI 調製技術の汎用性評価

モデル薬物にホタルルシフェラーゼをコードするプラスミド DNA (pDNA) を用い、ES 法 DPI を調製した。pDNA 含有 ES 法 DPI の遺伝子発現活性を評価するためルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。マウス気管支にポリエチレンチューブを挿入したのち、専用の肺内投与デバイス (図 1) を用いてマウス肺内に ES 法 DPI を分散投与した。その後、*in vivo* イメージングシステム (IVIS) を用いて、マウス肺におけるルシフェラーゼ発光を経時的に検出した。



4. 研究成果

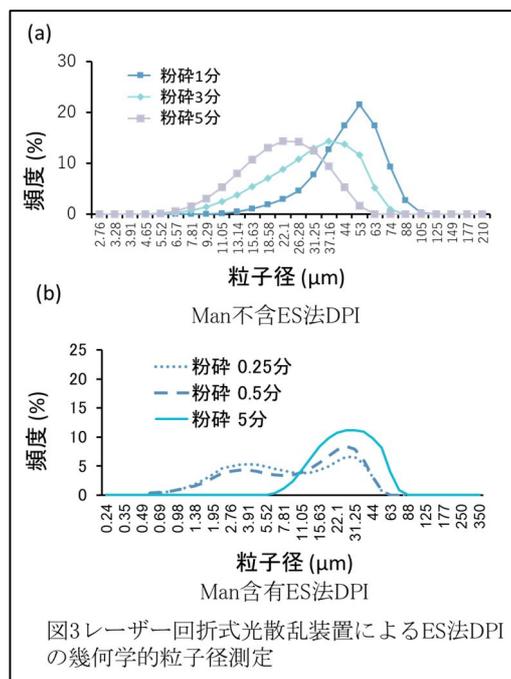
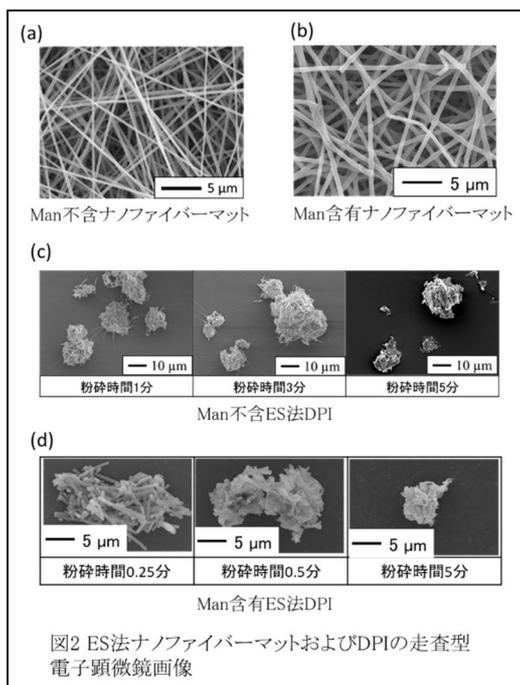
ES 法 DPI の製剤設計

PVA 水溶液に α -Chy を添加したのち、ES 法を用いてナノファイバーマット化した (図 2 (a))。ナノファイバーマットは直径数百ナノメートルの極細繊維構造を有していた。印加電圧やコレクターまでの距離を変化させた結果、ナノファイバーマットの直線性や平均繊維径が変化した (表 1)。さらに、粉碎補助剤として Man を添加した結果、ナノファイバーマットの柔軟性は低下し、直線性の高いナノファイバーマットが得られた (図 2 (b))。

調製した ES 法ナノファイバーマットを、凍結粉碎により微細化した。Man を含まないナノファイバーマットはナノファイバーマットの繊維構造を維持しつつ中空多孔に微細化している様子が認められた (図 2 (c))。DPI の幾何学的粒子径を、LDSA を用いて測定した結果、粉碎時間の増加に伴い、幾何学的粒子径が低下した (図 3 (a))。一方、Man を添加したナノファイバーマットは極めて短時間の粉碎時間 (0.25 分, 0.5 分) で 1~5 μm の短い繊維が凝集した粒子を形成していた (図 2 (d))。さらに、LDSA を用いて算出した幾何学的粒子径は Man を含まない ES 法 DPI と異なり二峰性のピークを示した。(図 3 (b))

表 1 ES 法調製条件がナノファイバーマットに及ぼす影響

変更したパラメータ	ファイバー形成	ファイバー直線性	平均繊維径
基準条件 (0.5 mL/h, 10 kV, 15 cm)	○	△	308.5 ± 59.8 nm
流速	1.0 mL/h	○	342.5 ± 50.5 nm
	2.0 mL/h	△	309.8 ± 91.3 nm
電圧	5 kV	×	394.0 ± 119.6 nm
	7.5 kV	○	282.1 ± 51.6 nm
	12.5 kV	○	358.0 ± 56.7 nm
距離	5 cm	×	No data
	10 cm	○	311.4 ± 60.8 nm
	20 cm	○	423.8 ± 82.8 nm



ES 法 DPI の調製条件の最適化

アンダーセン型カスケードインパクターを用いて、ES 法 DPI の肺送達性を評価した。Man を含まない ES 法 DPI のデバイス放出率 (OE) はいずれの製剤も 80% 程度であった (表 2 (a))。粉碎時間 3 分および 5 分の DPI は空気力学的質量中央径 (MMAD) は 1 μm ~ 6 μm であり、肺に効率的に送達できるとことが推測された。一方、肺到達率 (FPF) は粉碎時間 3 分でピークを示し、粉碎時間 5 分では低下した。これは、ある程度の粉碎時間までは繊維構造を維持した状態で幾何学的粒子径が低下することで MMAD が低下するが、過剰な粉碎により繊維構造が潰れ、密度が増加することにより MMAD が増大したためであると考えられる。次に、Man 含有 ES 法 DPI の肺送達性を評価した結果、短時間の粉碎で優れた FPF を達成した (表 2 (b))。一方、粉碎時間 5 分では MMAD が 11 μm よりも大きく、FPF は低下した。Man の添加によって優れた肺送達性が

達成されたメカニズムを検証すべく、アンダーセン型カスケードインパクトの各ステージに沈着した粒子を回収しSEMを用いて観察した。その結果、Man含有ES法DPIは、ステージ深部に進むにつれ、凝集した繊維が解砕していく様子が観察された。以上の結果よりMan含有製剤は分散性が良く、吸入により凝集物が解砕することで肺深部へ到達することが示唆された。

表2 ES法調製条件がナノファイバーマットに及ぼす影響

(a) Man不含ES法DPI

	デバイス放出率 (%)	FPF3 (%)	MMAD (μm)
粉碎時間1分	83.27 \pm 2.89	1.34 \pm 0.16	> 11
粉碎時間3分	80.23 \pm 1.79	21.62 \pm 2.26	3.23 \pm 0.29
粉碎時間5分	79.72 \pm 0.25	13.92 \pm 1.54	4.05 \pm 0.53

(b) Man含有ES法DPI

	デバイス放出率 (%)	FPF3 (%)	MMAD (μm)
粉碎時間0.25分	72.64 \pm 1.48	32.52 \pm 3.73	5.35 \pm 0.70
粉碎時間0.5分	78.98 \pm 0.97	25.14 \pm 2.19	4.95 \pm 0.50
粉碎時間5分	77.84 \pm 4.88	8.65 \pm 1.62	> 11

ES法DPI調製条件がタンパク質の安定性に与える影響を評価するために、DPI中の α -Chy活性を評価した。その結果、粉碎時間に依存して部分的に活性が低下したものの、ES法DPI中の α -Chy酵素活性が保持されていることが確認された(図4(a))。ES法DPIの室温における α -Chy保存安定性を評価した結果、2か月間保存したES法DPIの活性は調製直後と同程度(96.4%)に維持できることが分かった(図4(b))。対照群として保管した α -Chy水溶液は、2か月の保管後に酵素活性が79%まで低下した。以上より、室温保存におけるES法DPIの有用性を実証することができた。さらに、Manを添加することで短時間の微粒化に成功し、 α -Chyの安定性が向上した(図4(c))。Manを含み、0.25分間粉碎したナノファイバーマットは、 α -Chy溶液と同等の酵素活性を維持した。対照群である、メッシュ型ネブライザーでエアロゾル化した α -Chy水溶液は活性が57%まで減少したことから、メッシュでの振動とせん断応力がタンパク質を不活性化する可能性があることが示唆された。

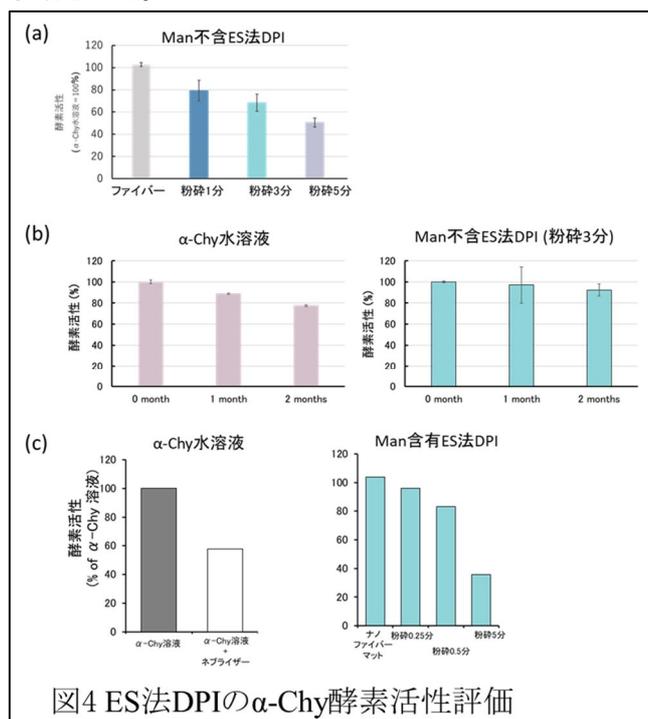


図4 ES法DPIの α -Chy酵素活性評価

ES法DPI調製技術の汎用性評価

ES法DPI調製技術の汎用性を評価すべく、薬物をpDNAに変えてES法DPIを調製し、その有用性を検証した。マウス肺内にpDNA含有ES法DPIを投与した結果、マウス肺局所的にルシフェラーゼ由来の発光が検出された。以上の結果より、ES法DPI調製技術は幅広い薬物モダリティに応用可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ito Takaaki, Yamazoe Eriko, Tahara Kohei	4. 巻 27
2. 論文標題 Dry Powder Inhalers for Proteins Using Cryo-Milled Electrospun Polyvinyl Alcohol Nanofiber Mats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 5158 ~ 5158
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules27165158	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田寛生, 伊藤貴章, 山添絵理子, 田原耕平
2. 発表標題 吸入粉末剤調製を志向した電界紡糸ナノファイバーマットの粉碎条件の検討
3. 学会等名 日本薬剤学会 第37年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 貴章, 奥田 寛生, 山添 絵理子, 田原 耕平
2. 発表標題 エレクトロスピンニング技術を用いたバイオ医薬用吸入粉末剤の製剤設計
3. 学会等名 省エネルギーに貢献する粒子設計・粉体プロセスの薬工連携研究会 2022年度若手研究者討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 貴章, 玉城 慎太郎, 山添 絵理子, 田原 耕平
2. 発表標題 電界紡糸ファイバーを用いた造粒工程を省略できる新規吸入粉末剤調製法
3. 学会等名 第39回製剤と粒子設計シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤 貴章
2. 発表標題 電界紡糸技術を用いた低安定性薬物の吸入粉末製剤化
3. 学会等名 国際粉体工業展 東京 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 玉城 慎太郎, 伊藤 貴章, 山添 絵理子, 田原 耕平
2. 発表標題 D-マンニトールを添加した電界紡糸(エレクトロスピンニング)吸入粉末剤の調製
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
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
---------------------------	-----------------------	----

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