

《様式B》

研究テーマ

「肺内ナノ粒子構築型吸入粉末剤の創製を実現する処方・製造技術の基盤確立」

研究責任者	所属機関名	名城大学薬学部		
	官職又は役職	准教授		
	氏名	奥田 知将	メールアドレス	tokuda@meijo-u.ac.jp
共同研究者	所属機関名			
	官職又は役職			
	氏名			

(令和2年度募集) 第33回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要 (1, 000字程度)

※産業技術として実用化の可能性や特許出願 (予定も含む) の有無についてもご記載ください。

本研究では、独自の発想に基づく「肺内ナノ粒子構築型吸入粉末剤」の実用化に向けて、「エアロゾル性能に優れ、かつ水中で粒子径が小さく均一で細胞内移行性が高いナノ粒子を形成する粉末微粒子」の創製を達成する処方・製造条件の適用範囲について、網羅的に検証した。具体的には、噴霧急速凍結乾燥 (SFD)法および噴霧乾燥 (SD)法を基に、ナノ粒子成分 (脂質、ポリエチレングリコール (PEG)誘導体など)の組成・含量、賦形剤の種類、噴霧時の成分溶液の濃度・溶媒組成が異なる種々の粉末微粒子を製造し、粉体物性 (粒子構造・エアロゾル性能)ならびに溶解後に形成するナノ粒子の物性 (粒子径分布・ゼータ電位)および細胞結合/取り込み能をそれぞれ評価・比較した。その結果、SFD 法、SD 法のいずれの製造法においても、ナノ粒子成分として多種多様な脂質を適用できることを明らかにした。脂質の電荷によりナノ粒子の細胞結合/取り込み能が大きく異なった結果を基に、カチオン性脂質の適用により内封薬物の細胞内移行性を高める、あるいは、その他の脂質の適用により細胞上で内封薬物の徐放性を発揮 (→ 作用持続化)するなど、内封薬物に応じた機能付与へと今後展開していく。また、PEG 誘導体および賦形剤として、PEG 化コレステロールとロイシン誘導体 (LeuD)を適用することで、カチオン性脂質を含むナノ粒子の細胞結合/取り込み能をさらに向上できることを見出した。特に、LeuD を用いて SFD 法により製造したスポンジ状の粉末微粒子について、ナノ粒子成分が高含量でも、既存の市販吸入粉末剤と同等以上の肺送達性ならびに良好なナノ粒子形成能および高い細胞結合/取り込み能を発揮する有用性を明らかにした。

上記の成果は、開発を進めている「肺内ナノ粒子構築型吸入粉末剤」の適用性・機能性の高さを裏付ける貴重な基礎的情報であり、これまでに検討してきた核酸医薬品や脂溶性薬物を含めた多種多様な薬物を有効に吸入粉末剤として開発するための基盤製造技術として実用化に繋

げたいと考えている。本研究で得られた成果を基に、現在、特許出願の準備中である。今後は、マウス肺内投与後のナノ粒子の体内動態の比較や種々の薬物への適用へと研究を展開していく方向で計画を立てている。また、本研究に関連した製造技術を基に、他大学・研究機関との共同研究により、新型コロナウイルス治療用の吸入粉末剤の開発を現在進めている。

## 2. 実施内容および成果の説明 (A 4 で、5 ページ以内)

### [1] 目的

本研究では、独自の発想に基づく「肺内ナノ粒子構築型吸入粉末剤」の実用化に向けて、「エアロゾル性能に優れ、かつ水中で粒子径が小さく均一で細胞内移行性が高いナノ粒子を形成する粉末微粒子」の創製を達成する処方・製造条件の適用範囲について、網羅的に検証した。

### [2] 方法

#### 1) 粉末微粒子の製造

ナノ粒子成分 (主脂質、ポリエチレングリコール (PEG)誘導体、コレステロール、蛍光脂質または薬物)を有機溶媒に、賦形剤を水にそれぞれ溶解後に混合することで調製した成分溶液を噴霧し、液体窒素中で瞬間凍結後に昇華により溶媒を除去する「噴霧急速凍結乾燥 (SFD)法」および高温気流中で蒸発により溶媒を除去する「噴霧乾燥 (SD)法」を基に、目的の粉末微粒子 (SFD 微粒子および SD 微粒子)を製造した。主脂質としてカチオン性脂質 (DOTMA)、イオン化脂質 (DODMA)、双性イオン性脂質 (DPPC、EPC、SM)、PEG 誘導体として PEG 化コレステロール (PEG-Chol)および PEG 化リン脂質 (PEG-DSPE)、賦形剤としてロイシン (Leu)およびロイシン誘導体 (LeuD)、蛍光脂質としてニトロベンゾオキサジアゾール化リン脂質 (NBD-DPPE)、薬物としてパルミチン酸デキサメタゾン (PDEX)、有機溶媒として SFD 法では tert-ブチルアルコール (TBA)および SD 法ではエタノール (EtOH)をそれぞれ用いた。また、粉末微粒子に占めるナノ粒子成分含量 (w/w)ならびに成分溶液中の水と有機溶媒の混合比 (v/v)を変化させた。

#### 2) 粉末微粒子溶解後に形成するナノ粒子の物性評価

粉末微粒子を水に溶解後、形成したナノ粒子の粒子径分布およびゼータ電位について、動的・電気泳動光散乱法により測定した。平均粒子径として 300 nm、多分散性指数 (PDI)として 0.420 を基準値とし、両解析値ともに基準値以下であった場合に「良好なナノ粒子形成能を有する」と判断した。

#### 3) 粉末微粒子溶解後に形成するナノ粒子の細胞結合/取り込み能評価

粉末微粒子を緩衝液に溶解することで形成したナノ粒子を含む分散液を、マイクロプレートに播種したヒト肺がん (NCI-H441)細胞に添加した。その 2 時間後に回収した細胞溶解液の蛍光強度測定を基に、ナノ粒子の細胞結合/取り込み量を算出した。

#### 4) 粉末微粒子の物性評価

粉末微粒子の粒子構造評価は、走査型顕微鏡 (SEM)観察により行った。粉末微粒子のエアロゾル性能評価では、粉末微粒子を詰めたカプセルを吸入器に装填後、空気力学的粒子径分級装置であるマルチステージリキッドインピンジャーに接続して真空ポンプで吸引した。得られた沈着パターンを基に、吸入器からの放出性指標値 (OE)、肺治療域到達性指標値 (FPF)、肺深部到達性指標値 (UPF)をそれぞれ算出した。

### [3] 結果・考察

#### 1) 粉末微粒子溶解後に形成するナノ粒子の物性 (表 1)

始めに、ナノ粒子成分含量を 10%、賦形剤を Leu に固定しつつ電荷や相転移温度が異なる種々の主脂質を変えて粉末微粒子 (SFD#1 ~ 6; SD#1 ~ 6)を製造し、溶解後に形成するナノ粒子の物性を評価・比較した。その結果、平均粒子径が 80 ~ 150 nm、PdI が 0.170 ~ 0.400 のとおり、総じて両方とも基準値以下であり、主脂質の種類に依らず、良好なナノ粒子形成能が得られた。また、PEG 誘導体の種類、成分溶液の濃度および溶媒組成についても、平均粒子径、PdI に明確な違いを生じなかった。同組成の SFD 微粒子と SD 微粒子の比較においても、形成するナノ粒子の平均粒子径、PdI は同様であった。一方、主脂質の電荷に対応してゼータ電位は-35 ~ +60 mV を示し、表面電荷が異なる種々のナノ粒子を形成できることを確認した。

続いて、ナノ粒子成分を固定しつつ賦形剤の種類およびナノ粒子含量を変えて粉末微粒子 (SFD#3'', 7~11; SD#3', 7~11)を製造し、溶解後に形成するナノ粒子の物性を比較した。SFD 微粒子の結果について、Leu を賦形剤に用いた場合には、ナノ粒子成分含量が 20%までは平均粒子径、PdI ともに基準値以下であったが、ナノ粒子成分含量が 40%になると平均粒子径、PdI ともに基準値を超え、ナノ粒子形成能を損失したと判断した。一方、LeuD を賦形剤に用いた場合には、ナノ粒子成分含量が 40%でも平均粒子径、PdI ともに基準値以下であり、良好なナノ粒子形成能が得られた。次に、SD 微粒子の結果について、Leu を賦形剤に用いた場合ではナノ粒子成分含量が 20%以上、LeuD を賦形剤に用いた場合ではナノ粒子成分含量が 40%で平均粒子径、PdI の一方または両方が基準値を超え、同組成の SFD 微粒子と比べてナノ粒子形成能を損失しやすい傾向が窺えた。これらの結果より、ナノ粒子成分が高含量でも良好なナノ粒子形成能を得られる利点から、LeuD を賦形剤に用いて SFD 法により製造することの優位性が明らかとなった。

また薬物として PDEX を適用した場合 (SFD#12)にも、良好なナノ粒子形成能が得られた。

#### 2) 粉末微粒子溶解後に形成するナノ粒子の細胞結合/取り込み能 (図 1)

製造した粉末微粒子のうち、良好なナノ粒子形成能が認められたものに絞り、形成したナノ粒子の細胞結合/取り込み能の評価・比較を行った。

主脂質を変えて製造した粉末微粒子 (SFD#1 ~ 6; SD#1 ~ 6)で比較したところ、DOTMA を含む場合に添加量に対して 15%以上の細胞結合/取り込み量を示し、その他の主脂質を含む場合の細胞結合/取り込み量は添加量に対して 2%未満であった。DOTMA を含む場合には、形成するナノ粒子の表面が生理的 pH で正電荷を帯びていることにより、負電荷を帯びた細胞膜との静電的相互作用により細胞結合/取り込み能を増大したと考えている。さらに PEG 誘導体として、PEG-DEPE と比べて PEG-Chol を用いた場合に、DOTMA を含むナノ粒子の細胞結合/取り込み能をより高められることを見出した。実験時の温度を 37°C から 4°C に変更することで、細胞結合/取り込み能が顕著に低下した結果 (#3' と #3' (4°C)の違い)より、このナノ粒子がエンドサイトーシスを一部介して、細胞内に取り込まれている可能性が示唆された。

賦形剤の種類およびナノ粒子成分含量を変えて製造した粉末微粒子 (SFD#3'', 7, 9 ~ 11; SD#3', 9)で比較したところ、Leu を賦形剤に用いた場合には、ナノ粒子成分含量が 10%から 20%に増

えた際に細胞結合／取り込み能が低下する傾向が見られた。一方、LeuD を賦形剤に用いた場合には、Leu を用いた際よりも細胞結合／取り込み能が高く、またナノ粒子成分含量が 40%でも細胞結合／取り込み能が比較的高かった。この LeuD によるナノ粒子の細胞内結合／取り込み促進効果の理由は不明であるが、ナノ粒子の機能向上に繋がる大変興味深い発見と考えている。

同組成の SFD 微粒子と SD 微粒子の比較において、形成したナノ粒子の細胞結合／取り込み能に明確な違いは認められず、主に粉末微粒子の組成によりナノ粒子の細胞結合／取り込み能が決定付けられ、製造法による影響は比較的小さいことが示された。

### 3) 粉末微粒子の物性 (図2・3)

SEM 観察において、直径が約 10 ~ 20  $\mu\text{m}$  でスポンジ状の SFD 微粒子と直径が約 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  のより小さな SD 微粒子で明確な粒子構造の違いを確認できた。一方、両微粒子ともに、ナノ粒子成分の組成および含量による明確な粒子構造の違いは見られなかった。賦形剤の効果に関する興味深い知見として、SFD 微粒子において Leu と LeuD を含む場合で粒子構造の明確な違いは認められなかったのに対し、SD 微粒子において Leu を含む場合には表面が凹凸に富むいびつな粒子構造を有し、LeuD を含む場合には表面が滑らかで球形度の高い粒子構造を有するという明確な違いが見られた。

製造した粉末微粒子のうち、ナノ粒子成分含量が比較的高くても良好な物性・細胞結合／取り込み能を示すナノ粒子を形成できた SFD#10 と SFD#11 について、エアロゾル性能評価を行った。その結果、両微粒子ともに、カプセルからスロートまでの沈着量は比較的少なく、大部分はステージまで到達する一方、ナノ粒子成分含量がより少ない SFD#10 の方がより高ステージ側での沈着量が多い傾向が認められた。解析した指標値としても、両微粒子ともに OE が 90%以上と良好な放出性を確認できた。FPF/UPF としては、SFD#10 で約 42%/21%、SFD#11 で約 33%/13%の値が得られ、ナノ粒子成分含量の増加に伴う肺送達性の低下傾向が認められたものの、両微粒子ともに市販吸入粉末剤の肺送達性 (FPF で 20 ~ 40%) と比べて同等以上であり、吸入剤としての実用化が十分に見込めるエアロゾル性能であった。

## [4] 結論

本研究より、肺内ナノ粒子構築型吸入粉末剤の開発に際し、検討した SFD 法、SD 法のいずれの製造法においても、ナノ粒子成分として多種多様な脂質を適用できることを明らかにした。脂質の電荷によりナノ粒子の細胞結合／取り込み能が大きく異なった結果を基に、カチオン性脂質の適用により内封薬物の細胞内移行性を高める、あるいは、その他の脂質の適用により細胞上で内封薬物の徐放性を発揮 (→ 作用持続化) するなど、内封薬物に応じた機能付与へと今後展開していく。また、PEG 誘導体として PEG-Chol および賦形剤として LeuD を適用することで、カチオン性脂質を含むナノ粒子の細胞結合／取り込み能をさらに向上できることを見出した。特に、LeuD を用いて SFD 法により製造したスポンジ状の粉末微粒子について、ナノ粒子成分が高含量でも、既存の市販吸入粉末剤と同等以上の肺送達性ならびに良好なナノ粒子形成能および高い細胞結合／取り込み能を発揮する有用性を明らかにした。

表1. 製造した粉末微粒子の処方および溶解後に形成したナノ粒子の物性: (a) SFD微粒子, (b) SD微粒子  
(mean ± S.D., n = 3)

(a)

Product name	Sample solution for powder production (solvent: Water/TBA)					NP formation after powder dissolution						
	NP composition				Excipient	Conc. (mg/mL) [Ratio**]	Mean particle size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)			
	Main lipid	PEG derivative	Others	NP amount*								
SFD#1	DODMA	PEG-Chol	NBD -DPPE + Chol	10%	Leu	16.7 [8/1]	116 ± 3	0.320 ± 0.007	+21.2 ± 0.6			
SFD#2	DOTMA	PEG-DSPE					10%	Leu	16.7 [8/1]	102 ± 9	0.349 ± 0.058	+53.5 ± 4.5
SFD#3												
SFD#3'									88.4 ± 1.3	0.211 ± 0.004	+55.0 ± 2.7	
SFD#4	DPPC								145 ± 2	0.293 ± 0.032	-28.1 ± 0.7	
SFD#5	EPC								124 ± 1	0.251 ± 0.008	-18.1 ± 0.2	
SFD#6	SM						149 ± 1	0.345 ± 0.019	-26.6 ± 0.4			
SFD#3''	DOTMA	PEG-Chol				Leu	12.5 [1/1]	104 ± 2	0.255 ± 0.009	+48.6 ± 0.6		
SFD#7					20%					89.2 ± 1.3	0.293 ± 0.025	+49.5 ± 0.4
SFD#8					40%					473 ± 30	0.725 ± 0.075	+45.4 ± 1.1
SFD#9					10%					70.2 ± 0.2	0.275 ± 0.036	+34.3 ± 3.3
SFD#10					20%				LeuD	94.9 ± 0.6	0.339 ± 0.005	+32.3 ± 3.7
SFD#11		40%			164 ± 3	0.383 ± 0.008	+46.8 ± 0.6					
SFD#12	DOTMA + DODMA		PDEX + Chol	27.5	Leu	10 [8/1]	144 ± 1	0.122 ± 0.012	+26.4 ± 3.0			

(b)

Product name	Sample solution for powder production (solvent: Water/TBA)					NP formation after powder dissolution						
	NP composition				Excipient	Conc. (mg/mL) [Ratio**]	Mean particle size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)			
	Main lipid	PEG derivative	Others	NP amount*								
SD#1	DODMA	PEG-Chol	NBD -DPPE + Chol	10%	Leu	5 [8/1]	129 ± 3	0.230 ± 0.009	+47.3 ± 1.0			
SD#2	DOTMA	PEG-DSPE					10%	Leu	5 [8/1]	118 ± 1	0.178 ± 0.008	+44.5 ± 0.4
SD#3												
SD#3'									83.5 ± 3.4	0.190 ± 0.024	+42.6 ± 1.5	
SD#4	DPPC								145 ± 2	0.293 ± 0.032	-28.1 ± 0.7	
SD#5	EPC								139 ± 3	0.365 ± 0.010	-30.2 ± 0.6	
SD#6	SM						112 ± 1	0.247 ± 0.007	+5.38 ± 0.77			
SD#7	DOTMA	PEG-Chol			20%	Leu	5 [1/1]	327 ± 53	0.439 ± 0.061	+39.0 ± 2.1		
SD#8					40%				912 ± 167	0.741 ± 0.102	+66.0 ± 17.9	
SD#9					10%				83.4 ± 0.7	0.176 ± 0.013	+41.5 ± 1.3	
SD#10					20%				LeuD	121 ± 5	0.386 ± 0.006	+56.0 ± 1.4
SD#11					40%					135 ± 3	0.421 ± 0.022	+54.1 ± 2.7

- ✓ 表中のNPはナノ粒子の略記である。
- ✓ 表中の\*は粉末微粒子に占めるナノ粒子成分含量 (w/w)、\*\*は成分溶液中の水と有機溶媒の混合比 (v/v)をそれぞれ示している。
- ✓ Product name中で同じ#番号のSFD微粒子とSD微粒子は、同組成である。
- ✓ SFD#3、SFD#3'、SFD#3''、SD#3、SD#3'は、同組成であるが、成分溶液の濃度または水と有機溶媒の混合比が異なる。
- ✓ ナノ粒子の物性で基準値を超えた結果について、背景を灰色で示している。

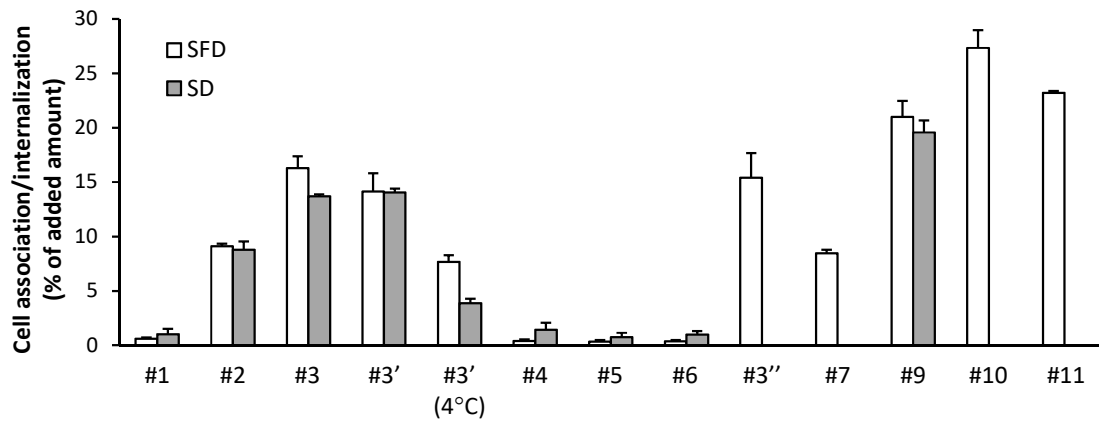


図1. 粉末微粒子の溶解後に形成したナノ粒子の細胞結合／取り込み量 (mean ± S.D., n = 3 ~ 4)

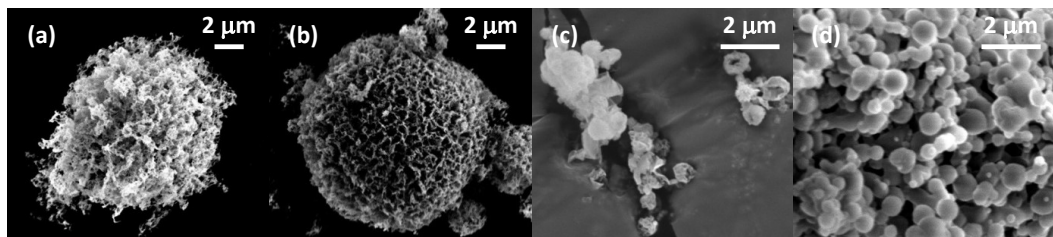


図2. 粉末微粒子のSEM画像: (a) SFD#7, (b) SFD#10, (c) SD#7, (d) SD#10

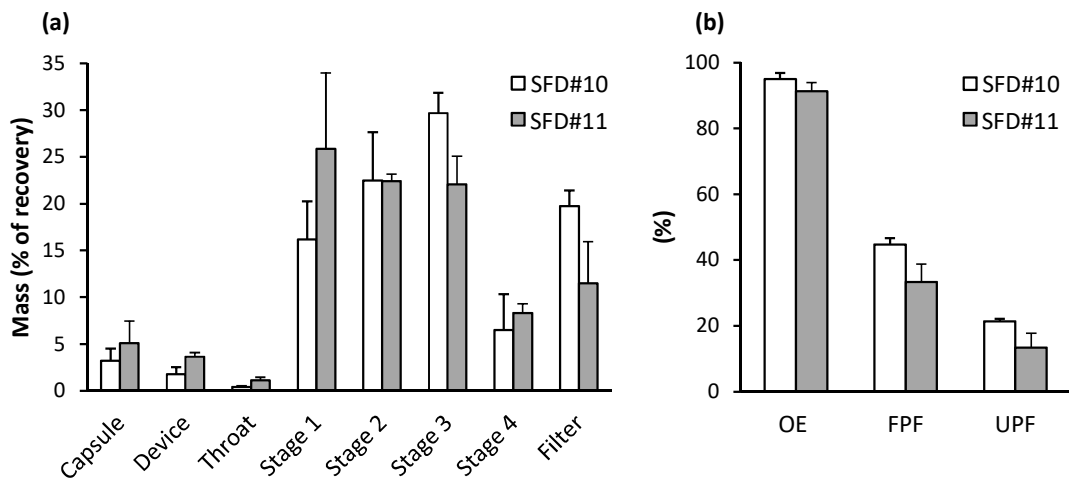


図3. 吸引した粉末微粒子の(a) 沈着パターンおよび(b) エアロゾル性能指標値 (mean ± S.D., n = 3)