16107

ナノクリスタルを基盤とした機能性吸入粉末剤の創製

Development of Functional Dry Powder Formulations
for Inhalation, Based on Nanocrystals

研究代表者 Research leader: 奥田 知将 Tomoyuki OKUDA

名城大学薬学部 准教授

Faculty of Pharmacy, Meijo University, Associate Professor

E-mail: tokuda@meijo-u.ac.jp

抄 録

本研究では、難水溶性抗癌剤であるパクリタキセル（PTX）にポリエチレングリコール誘導体を添加することで調製した徐放性・滞留性を発揮する機能性ナノ結晶（nPTX）を吸入剤として医療応用すべく、噴霧急速凍結乾燥（SFD）法による粉末製剤化を試み、その有用性について検証した。賦形剤としてロイシン（Leu）を用いることで、粉末製剤化後も nPTX の粒子物性・PTX の徐放性・抗癌活性が十分に保持されるとともに、優れた肺送達性を発揮する nPTX SFD 微粒子の開発に成功した。この nPTX SFD 微粒子は、従来の PTX 製剤である Taxol と比較して、肺内投与後に PTX をより長時間に渡り肺内に滞留するとともに、肺組織障害性がより軽微であることを明らかにした。また、nPTX SFD 微粒子の肺内投与後に再構築した nPTX が速やかに肺組織へ移行することを見出した。肺転移癌モデルマウスを用いた治療評価において、nPTX SFD 微粒子の肺内投与による癌治療効果の可能性が示唆された。

ABSTRACT

For application of functional nanocrystals (nPTX) composed of paclitaxel (PTX) and polyethylene glycol derivatives with sustained release and pulmonary retention abilities to inhalation therapy, nPTX-loaded dry powders were newly produced by spray freeze drying (SFD) and their utility as inhaled formulations was investigated in the present study. The nPTX-loaded SFD powders produced with leucine as an excipient were demonstrated to allow reconstruction of nPTX with almost the same particle size distribution, sustained PTX release ability, and anticancer activity as the original ones after their dissolution and to have high aerosol performance for pulmonary delivery through inhalation. Furthermore, the nPTX-loaded SFD powders were clarified to show both more prolonged retention of PTX and milder irritation in the lungs after pulmonary delivery, compared with Taxol, a conventional liquid formulation of PTX. After dissolution of the nPTX-loaded SFD powders on the respiratory epithelium, reconstituted nPTX were found to be rapidly transferred to the lung tissue, followed by prolonged pulmonary retention. In therapeutic evaluation with lung metastasis mice, the nPTX-loaded SFD powders were suggested to exhibit anticancer effects in the lungs after pulmonary delivery. These results strongly indicate that the nPTX-loaded SFD powders are promising to apply to inhalation therapy against lung cancer.

研究背景と目的

ナノサイズの薬物結晶核の表面を界面活性剤で被覆した「ナノクリスタル」は、難水溶性薬物の溶解性を改善する製剤技術として近年注目されている。一方、筆者はモデル薬物として難水溶性抗癌剤のパクリタキセル (PTX)、界面活性剤としてポリエチレングリコール (PEG) 誘導体を用いて調製したナノクリスタル (nPTX) が、生体内で徐放性・滞留性の機能を発揮する可能性を見出している。この様な「機能性ナノクリスタル」が生体内で十分な効果を発揮するとともにナノ粒子としての保存安定性を向上するための製剤戦略として、肺疾患部位に直接送達可能な吸入粉末製剤化を考案した。しかし、その実現に向けては、粉末製剤化後もナノ粒子としての構造・機能を保持するとともに、吸入剤応用に適した粉体設計を達成しなければならない。そこで本研究では、筆者らが吸入剤応用を指向して処方・製造条件の最適化を進めてきた噴霧急速凍結乾燥 (SFD) 法 (Otake H. et al., 2016a, 2016b) を応用して、nPTX を搭載した中空多孔性粉末微粒子 (nPTX SFD 微粒子) を調製し、nPTX の構造・機能を保持するとともに肺送達性に優れた機能性吸入粉末剤の創製を目指した。

研究方法

1. nPTX 分散液の調製および粉末製剤化

PTX と PEG 誘導体をクロロホルムに溶解後、減圧留去により薄膜を形成した。薄膜に水を添加後、超音波・遠心・フィルター処理することで nPTX 分散液を調製した。nPTX 分散液に賦形剤 (乳糖 (Lac)・マンニトール (Man)・トレハロース (Tre)・ロイシン (Leu)・フェニルアラニン (Phe)) を添加し、凍結乾燥 (FD) 法または SFD 法により粉末製剤化した。

2. nPTX の再構築性評価 (1) : 粒子物性

各粉末製剤を水に溶解することで再構築した

nPTX の平均粒子径と多分散性指数 (Pdl) を動的光散乱法により解析し、元の nPTX (nPTX 分散液) の値と比較した。

3. nPTX SFD 微粒子の粒子構造評価

走査型電子顕微鏡 (SEM) を用いて、製造した各 nPTX SFD 微粒子の粒子構造を観察した。

4. nPTX の再構築性評価 (2) : PTX の放出性

メンブランフィルター (孔径 0.025 μm) を含む拡散セルを評価に用い、ドナー側とレセプター側にウシ血清アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝液を加えた。PTX 溶液 (溶剤としてエタノールを使用)・Taxol (溶剤としてエタノールとクレモホル EL を使用)・nPTX 分散液・nPTX SFD 微粒子の再溶解液をドナー側に添加後、レセプター側から経時的にサンプルを採取し、終了時点でドナー側からもサンプルを採取した。サンプル中の PTX を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量することで、PTX の透過率および回収率を算出した。

5. nPTX の再構築性評価 (3) : 抗癌活性

96-well マイクロプレートに播種したヒト肺癌 (A549) 細胞に PTX 溶液・nPTX 分散液・nPTX SFD 微粒子再溶解液を添加後、MTT assay を行うことで抗癌活性を評価した。

6. nPTX SFD 微粒子の吸入特性評価

nPTX SFD 微粒子を充填したカプセルを含む吸入器をアンダーセン型カスケードインパクターに装着した後、ポンプを用いて吸引を行った。各パーツに沈着した微粒子を回収・定量して得られたステージ沈着パターンを基にして、カプセルからの放出性の指標値として output efficiency (OE)、肺送達性の指標値として空気力学的粒子径が 4.7 μm 以下の fine particle fraction (FPF)、肺深部送達性の指標値として空気力学的粒子径が 2.1 μm 以下の ultrafine particle fraction (UFPF)、空気力学的質量中位

径 (MMAD) をそれぞれ算出した。

7. nPTX SFD 微粒子肺内投与後の PTX の肺内分布評価

nPTX SFD 微粒子を健常マウスの肺内に分散投与後、所定の時間に切開した気管から氷冷したリン酸緩衝液を注入・回収することで気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取し、その後に肺を摘出した。BALF は遠心処理により、液性画分と細胞画分に分離した。肺および BALF (液性画分・細胞画分) 中の PTX を HPLC により定量することで PTX の分布量を算出した。

8. nPTX SFD 微粒子肺内投与による肺組織障害性評価

nPTX SFD 微粒子を健常マウスの肺内に分散投与した 24 時間後に 7 と同様の方法で BALF を回収し、液性画分と細胞画分に分離した。肺組織障害性マーカーとして、液性画分中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 漏出量ならびに細胞画分中の細胞数に着目し、定量用キットおよびイメージベースサイトメーターを用いてそれぞれ測定した。

9. nPTX SFD 微粒子肺内投与による肺癌治療評価

ルシフェラーゼ安定発現マウス大腸癌 (colon26/Luc) 細胞を健常マウスに尾静脈内投与することで樹立した肺転移モデル担癌マウスを評価に用いた。colon26/Luc 細胞の播種後 4・8 日目に nPTX SFD 微粒子をマウス肺内に分散投与し、播種後 7・9・11 日目にルシフェラーゼ発現に由来する発光をリアルタイム in vivo イメージングシステムを用いて検出し、肺内発光強度 (癌細胞数に相当) を定量解析した。播種後 11 日目の発光検出終了後に、副作用の指標として体重を測定してから肺を摘出し、肺重量 (癌細胞数に相当) を測定した。

研 究 成 果

1. 粉末製剤化後の nPTX の粒子物性

PEG 誘導体の脂溶性部分の構造がリン脂質よりもトコフェロールあるいはコレステロールの方が、また PTX と PEG 誘導体の重量比を 1 に設定することで、粒子径がより小さくまた均一性がより高い nPTX を得られることを見出した。肺内投与後の nPTX の肺内滞留作用について、PEG 誘導体の PEG 部分の分子量が 1000 よりも 2000 あるいは 5000 の方が、また PEG 誘導体の脂溶性部分の構造がトコフェロールよりもコレステロールの方がそれぞれ効果的であることを明らかにした。さらに FD 法による賦形剤の検討結果から、糖 (Lac・Man・Tre) よりも疎水性アミノ酸 (Leu・Phe) の方が粉末製剤化後に nPTX の粒子径をより長期に渡り維持できることが示唆された。これらの結果より、「PEG 誘導体：PEG 部分の分子量が 2000 で脂溶性部分の構造がコレステロールのもの、PTX に対する PEG 誘導体の重量比：1、賦形剤：Leu」の処方を基にして、nPTX SFD 微粒子の製造を進めた。

nPTX 含量を 10-40% の範囲で変化させて製造した nPTX SFD 微粒子について、溶解後に再構築した nPTX の平均粒子径および Pdl の値が nPTX 含量によらず粉末製剤化前の値と同様であったことから (表 1)、少なくとも nPTX 含量が 40% までは粉末製剤化後に nPTX の粒子物性を保持できることが明らかとなった。

Table 1 Particle property of nPTX constituted before and after powderization by SFD.

Formulation name	Mean particle size (nm)	Pdl
nPTX SL	171 ± 2	0.160 ± 0.012
nPTX (10%) DPSL	187 ± 3	0.166 ± 0.004
nPTX (20%) DPSL	185 ± 1	0.151 ± 0.019
nPTX (40%) DPSL	166 ± 2	0.147 ± 0.015

SL: solution (or dispersion), DPSL: SFD powder solution.
Each value represents the mean ± S.D. (n = 3).

Fig. 1 Scanning electron microscope images of nPTX-loaded SFD powders: (a) nPTX (10%) DP, (b) nPTX (20%) DP, (c) nPTX (40%) DP. DP: SFD powder.

2. nPTX SFD 微粒子の粒子構造

上記の nPTX SFD 微粒子について SEM 観察したところ、nPTX 含量による大きな違いは認められず、直径が 10–20 μm で SFD 法特有の中空多孔性に富む球状微粒子であることを確認できた (図 1)。ただし、nPTX 含量が 40% の nPTX SFD 微粒子は保存時に吸湿しやすい傾向が見られたため、以下の評価では、nPTX 含量が 10% あるいは 20% の nPTX SFD 微粒子を用いた。

3. SFD 法による粉末製剤化後の nPTX からの PTX 放出性

添加後 180 分における PTX 透過率 (図 2(a)) について、PTX 単独溶液および Taxol で約 5% であったのに対し、nPTX 分散液および nPTX SFD 微粒子の再溶解液で約 1% と低く、nPTX からの PTX 徐放性が示唆された。また回収率について、PTX 単独溶液で 10% 以下、Taxol で 20% 以下と低く、試験液中に存在する遊離 PTX の析出あるいはフィルター・攪拌子・試験容器への吸着の影響と考えられたのに対し、nPTX 分散液で約 120%、nPTX SFD 微粒子の再溶解液で約 70% と前者よりも顕著に高く、BSA を

含む試験液中でも nPTX の構造が維持されていることが窺えた。これらの結果より、粉末製剤化後も nPTX の構造安定性ならびに PTX 徐放性が保持されることが明らかとなった。

4. SFD 法による粉末製剤化後の nPTX の抗癌活性

nPTX 分散液添加後の細胞生存率–処理濃度パターンは PTX 単独溶液添加後の結果と異なり、PTX 単独溶液と比較した殺細胞作用が低処理濃度側ではより弱いのにに対し、高処理濃度側ではより強い傾向を示した (図 2(b))。nPTX がこのような細胞生存率–処理濃度パターンを示した理由として、nPTX からの PTX の徐放性が寄与するものと推察される。また、nPTX SFD 微粒子の再溶解液添加後についても、nPTX 分散液添加後と同様の細胞生存率–処理濃度パターンが得られ、nPTX 含量が 10% と 20% で大きな違いは見られなかった。これらの結果より、nPTX 含量が少なくとも 20% までは粉末製剤化後も nPTX 特有の抗癌活性が保持されることが明らかとなった。

5. nPTX SFD 微粒子の吸入特性

吸入特性の指標値の解析結果 (表 2) におい

Fig. 2 (a) PTX release and (b) anticancer activity of nPTX constituted before and after powderization by SFD. PEG: polyethylene glycol derivative, SL: solution (or dispersion), DPSL: SFD powder solution. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ((a) $n = 3$, (b) $n = 4$). The value shown below each PTX formulation name in (a) is PTX recovery (% of added amount). In (b), the data for PEG SL were plotted as PTX concentration in nPTX SL with the same PEG concentration.

Table 2 Aerosol performance of nPTX-loaded SFD powders for inhalation.

Formulation name	OE (%)	FPF (%)	UFPF (%)	MMAD (μ m)
Leu DP	91.7 $\pm$ 4.4	68.9 $\pm$ 3.4	49.4 $\pm$ 4.0	0.83 $\pm$ 0.15
nPTX (10%) DP	90.5 $\pm$ 5.0	68.7 $\pm$ 4.2	44.7 $\pm$ 4.2	1.22 $\pm$ 0.13
nPTX (20%) DP	92.1 $\pm$ 4.8	54.5 $\pm$ 3.2	25.8 $\pm$ 1.7	2.68 $\pm$ 0.19

DP: SFD powder. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 3$).

て、nPTX 含量が 10% の nPTX SFD 微粒子では、OE で約 90%、FPF で約 70%、UFPF で約 45%、MMAD で約 1 μ m の値が得られ、賦形剤として

用いた Leu のみから成る SFD 微粒子と同様の優れた吸入特性を示した。一方、nPTX 含量が 20% の SFD 微粒子では、nPTX 含量が 10% の SFD 微粒子と比較して、FPF および UFPF がより低値、また MMAD がより高値を示し、肺送達性が劣る結果となった。これらの結果より、nPTX 含量を 10% に留めることで、肺送達に適した nPTX SFD 微粒子が得られることが明らかとなった。

6. nPTX SFD 微粒子肺内投与後の PTX の肺内分布

予備検討において、Taxol の投与では肺から PTX が速やかに消失し 8 時間後には検出できなかったのに対し、nPTX 分散液の投与では PTX がより長時間肺内に滞留し 72 時間後でも

肺内で PTX を検出できた。肺内での PTX の分布をより細かく評価したところ、投与 1 時間後に Taxol の投与では BALF の液性画分と肺組織に PTX がほぼ同程度分布していたのに対し、nPTX 分散液の投与では BALF の液性画分への PTX の分布は極微量で大部分の PTX が肺組織に移行していた (図 3)。その後も nPTX 分散液の投与では、PTX が長時間に渡り肺組織に分布していた。BALF の細胞画分については、Taxol よりも nPTX 分散液の投与の方が PTX の分布量が多いものの、投与 1 時間後で投与量の約 5% 程度と微量であった。nPTX SFD 微粒子の投与でも、nPTX 分散液および nPTX SFD 微粒子の再溶解液と同様に、PTX が長時間に渡

り肺組織に分布していた。これらの結果より、nPTX が有する肺組織移行性ならびに滞留性の機能が粉末製剤化後も保持されることが明らかとなった。

7. nPTX SFD 微粒子肺内投与による肺組織障害性

BALF 中の LDH 漏出量 (図 4) に関して、Taxol・nPTX 分散液・nPTX SFD 微粒子投与群ともに PTX の投与量増加に伴ってより高値を示す傾向が見られたものの、ネガティブコントロールの未処理群と有意な差はなく、またポジティブコントロールのドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 投与群と比較して有意に低値であった。一方、PTX として 50 μ g の投与量における BALF 中の細胞数 (図 4) に関して、Taxol 投与群では SDS 投与群よりも高値を示したのに対し、nPTX 分散液および nPTX SFD 微粒子投与群では未投与群と同様の値であった。これら

Fig. 3 Pulmonary PTX distribution after intratracheal administration of nPTX-loaded SFD powders into healthy mice: (a) lung tissue, (b) BALF (supernatant fraction), (c) BALF (cell fraction). SL: solution (or dispersion), DPSL: SFD powder solution, DP: SFD powder, n.d.: not detected. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 5-8$).

Fig. 4 Pulmonary injury caused by intratracheal administration of nPTX-loaded SFD powders into healthy mice: (a) LDH elution, (b) cell count. N.T.: no treatment, SL: solution (or dispersion), DP: SFD powder. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 3-6$). The value shown below each PTX formulation name is PTX dose.

Fig. 5 Therapeutic effects of intratracheal administration of nPTX-loaded SFD powders in lung metastasis mice: lung weight and body weight on Day 11 after inoculation. N.T.: no treatment, DP: SFD powder, HM: healthy mice, LMM: lung metastasis mice. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n = 3-5$).

の結果より、nPTX 分散液と同様に nPTX SFD 微粒子の肺内投与は、Taxol の肺内投与よりも肺組織障害性が低く比較的軽微であることが明らかとなった。

8. nPTX SFD 微粒子肺内投与による肺癌治療効果

担癌マウスにおける肺内発光強度の経日推移について、日数経過に伴った肺内発光強度の増加傾向が見られ、肺内での癌細胞の増殖を確認できた。マウス個体間の肺内発光強度のばらつきが大きいため、nPTX SFD 微粒子の投与の有

無で結果に明確な差は認められなかったものの、播種後 11 日目の肺内発光強度の値が nPTX SFD 微粒子投与群で全体的に小さい傾向が見られ、肺癌治療効果の可能性が窺えた。播種後 11 日目の肺重量測定の結果（図 5）において、健常マウスと比較して担癌マウスでは癌細胞の増殖により肺重量が約 350 mg 増加したのに対し、nPTX SFD 微粒子の投与によりその増加が有意に抑えられたことから、肺内発光強度の結果と同様に肺癌治療効果の可能性が示唆された。一方、担癌マウスの体重（図 5）について、nPTX SFD 微粒子の投与による顕著な変化は見られなかったことから、副作用は比較的軽微であることが示唆された。

参考文献

- [1] Otake H., Okuda T., Hira D., Kojima H., Shimada Y., Okamoto H., Inhalable spray-freeze-dried powder with L-leucine that delivers particles independent of inspiratory flow pattern and inhalation device, *Pharmaceutical Research*, 33 (2016a) 922-931.
- [2] Otake H., Okuda T., Okamoto H., Development of spray-freeze-dried powders for inhalation with high inhalation performance and antihygroscopic property, *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 64 (2016b) 239-245.

外部発表成果

口頭・ポスター発表

1. Okuda T., Ito T., Niwa N., Okamoto H., "Development of functional paclitaxel nanocrystals and its application to dry powder formulation for inhalation", 6th FIP Pharmaceutical Sciences World Congress 2017 (Stockholm, Sweden, May 21-24, 2017) P-B-034.
2. 成田 幹也, 奥田 知将, 山岸 千恵, 岡本 浩一, "肺内投与後の機能性パクリタキセルナノ結晶の体内動態評価および吸入粉末製剤化の検討", 第 33 回日本 DDS 学会 (Kyoto, Jul. 6-7, 2017) 1-E-5.
3. 奥田 知将, 成田 幹也, 山岸 千恵, 岡本 浩一, "噴霧急速凍結乾燥法を基盤としたナノ結晶吸入粉末剤の開発", 第 34 回日本 DDS 学会 (Nagasaki, June 21-22, 2018) 2-E-6.