噴霧凍結乾燥法による多孔性微粒子の設計と 粒子密度が粉末吸入特性に及ぼす影響

Design of Porous Microparticles by Spray Freeze-drying (SFD) Technique and Effect of Particle Density on Dry Powder Inhalation Behaviors

丹羽 敏幸*, 水谷 太祐, 檀上 和美

Toshiyuki Niwa, Daisuke Mizutani, Kazumi Danjo

Received 25 April 2012; Accepted 18 June 2012

The highly porous and lightweight microparticles were prepared by a novel spray freeze-drying technique (SFD) for applying dry powder inhalation (DPI). The aqueous latex dispersion of methacrylic acid - ethyl acrylate copolymer was used as a matrix former to obtain the porous but rigid spherical structure. Several types of SFD particles with preset particle density ranging in 0.04 to 0.15 g/cm³ could be successfully prepared by changing the solid concentration in the spray suspension. The methodology to measure the particle density accurately was newly established by using pseudo-SFD particles with mm-order in size. The SFD particles with around 10 μm in geometric mean diameter exhibited the excellent in vitro aerosol performance due to their low density. The particles with around 0.11 g/cm³ of density had the highest fine particle fraction, which was defined as percentage less than 4.7 μm in aerodynamic cut-off diameter. It was also suggested that the improvement of aerosol performance was attributed to cohesive behavior between particles in airflow.

Keywords: Spray freeze-drying, Inhalation, Particle density, Aerodynamic, Cohesive index

1. 緒 言

喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD）など呼吸器疾患の治療に多くの吸入医薬品が開発され、臨床現場で使用されている¹⁾。製剤的観点から見ると、オゾン層を破壊するなどの理由から CFC（chlorofluorocarbon：フロン）ガスの製造が中止となり、定量噴霧式吸入剤（MDI：metered dose inhaler）に替わって、粉末吸入剤（DPI：dry power inhaler）が経気道薬物療法の主流となってきた^{2~4)}。DPI 製剤の設計アプローチとしては、吸入時の患部への送達性を高めるため薬物粒子あるいは添加剤との複合粒子をシングルミクロンサイ

ズへと微細化することが基本である。そのため、吸入用微粒子の開発には、ジェットミルなどによる粉碎法や噴霧乾燥法が利用されてきた^{5~6)}。また微細な薬物粒子同士が凝集して十分な分散状態が得られない場合、乳糖などのキャリア粒子の表面に付着させる手法がとられている^{7~8)}。しかしながら薬物粒子の微細化にともない、粒子間の凝集や吸入器への付着は完全には回避できず、必ずしも満足する薬物送達を得られていないのが現状である。

こうした微細粒子の付着凝集問題の対策として、吸入粒子の粒子密度に着目した製剤設計が盛んに行われるようになってきた^{9~11)}。これは中空や多孔性粒子を設計し、粒子密度を低下させることで幾何学的には大きな粒子でありながら、空気力学的な観点から吸入に適した粒子を設計しようという試みである。

著者等はこれまでに、噴霧凍結乾燥法（spray freeze-drying：SFD 法）にて球形・多孔質な微細粒子を設計

名城大学 薬学部 製剤学研究室
(〒468-8503 名古屋市天白区八事山150)
Faculty of Pharmacy, Meijo University
(150, Yagotoyama, Tempaku-ku, Nagoya 468-8503, Japan)
* 連絡先 niwat@meijo-u.ac.jp

Table 1 Formulation of spray suspension to be supplied to spray freeze drying process in this study

Material	(unit)	E4%	E7%	E10%	E12%	E14%	E16%
Eudragit L30-D55 ¹⁾	(g)	3.8	6.65	9.5	11.4	13.3	15.2
Fluorescein sodium	(g)	0.2	0.35	0.5	0.6	0.7	0.8
Water	(mL)	ad.	ad.	ad.	ad.	ad.	ad.
Total spray volume	(mL)	100	100	100	100	100	100
Solid concentration ²⁾	(g/mL)	0.04	0.07	0.10	0.12	0.14	0.16

¹⁾ Mass as solid component

²⁾ Solid concentration in spray suspension

し、吸入製剤へ適用することについて研究してきた¹²⁾。本研究では得られる軽質微粒子の粒子密度を正確に計測する方法を確立し、加えて粒子密度を調製時の処方により任意に調節できることを見出した。そこで粒子径分布は同等で、粒子密度が段階的に異なる一連の粒子群を調製し、高い吸入到達性を達成するための粒子密度に関する設計指針を得ることを試みた。また軽質粒子の飛散様式について新たな知見が得られたので、以下報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

粒子形成剤としてアクリル酸系水性ラテックス基剤である Eudragit L30-D55 (Eud-L, エポニック デグサ) を用いた。本品は、平均径 211 nm の粒子からなる懸濁型腸溶性コーティング基剤であり、医薬用吸入剤としての使用実績はない。しかし濃度を変えても懸濁液の粘度がほとんど変わらないため、種々の固形分濃度を持ち、かつ同程度の幾何学的粒子径分布を持つスプレーストが得られ易いといった点から採用した。加えて、吸入時の空気流によって破碎されない頑丈な粒子が形成でき、粒子密度とエアロゾル特性との関係を定量的に評価するには最適な添加剤であった。定量用試薬としてフルオレセインナトリウム (Fls, 和光純薬) を用いた。

2.2 SFD 粒子の調製

多孔性粒子の調製を SFD 法にて行った。本法の製造装置と粒子が形成する過程を Fig. 1 に示す。室温下、Eud-L と Fls を含む水性懸濁液を噴霧乾燥機 (SD-1000, 東京理化器械) に付属した 2 流体ノズルにて液体窒素 (LN₂) 表面に噴霧した。凍結した液滴を凍結乾燥機 (FD-550, 東京理化器械) へ移し、乾燥して SFD 粒子を得た。SFD 粒子の形成機構は既に報告したが^{13~14)}、本稿への理解を深めるため以下に概説する。噴霧液滴は LN₂ 内で直ちに凍結するため、液滴

Fig. 1 Schematic diagram of spray freeze-drying equipment and particle formation process
V: Pressure valve C: Compressor
P: Feeding pump

の形状・サイズを保ったまま氷粒となる。その後の乾燥過程では、氷が融解することなく昇華していくため、氷晶部分が消失し空洞となったポーラスな粒子が生成する。すなわち SFD 粒子は、液滴に由来する微小球形であり、凍結乾燥ケーキ様の多孔質内部構造を有する形態的特徴を兼ね備えている。本研究では噴霧液として Table 1 に示す 6 処方にて調製を行った。Eud-L と Fls の質量割合を 19:1 に固定し、固形分濃度を 0.04 から 0.16 g/mL へと段階的に変更した。調製条件として、液供給速度 20 mL/min、噴霧圧 160 kPa で噴霧し、その後凍結粒子を -30℃ の設定温度にて液体窒素を除去後、減圧を開始し、24 時間後に 40℃ に昇温させ 5 Pa まで減圧乾燥した。得られた SFD 粒子は、各物性評価に供するまでシリカゲルデシケーター中に保管し、水分管理した (水分値 1.0% 以内)。

2.3 粒子密度の測定

Table 1 の各噴霧液をピペットにて LN₂ 表面に滴下

Fig. 2 Photograph of pseudo-SFD particles and schematic diagram of their preparation process

し、上記条件にて凍結乾燥して数 mm 程度の直径を有する真球に近い擬似 SFD 粒子を調製した (Fig. 2)。得られた粒子 20 個を画像解析 (Luzex-AP, ニレコ) して得た Heywood 径 (d_i) から真球を仮定して体積 (V_i) を求め、別に秤量した総質量 (W) から Eq. (1) にて粒子密度 (ρ) を算出した。

$$\rho = \frac{W}{\sum_{n=1}^{20} v_i}, v_i = \frac{\pi d_i^3}{6} \quad (1)$$

2. 4 SFD 粒子の形態特性の評価

SFD 粒子をプラチナ蒸着 (JFC-1600, 日本電子) し、走査型電子顕微鏡 (JSM-6060, 日本電子) により、粒子形態及び表面状態を観察した。本映像を画像解析 (Luzex-AP, ニレコ) して粒子 500 個程度の Heywood 径を計測し、体積基準の累積粒子径分布図を作成した。分布曲線から累積 50% 粒子径を読み取り、幾何学的平均径 (geoD50) とした。また、軽質粒子が気流にて飛散する際の幾何学的粒子径と空気力学的粒子径との関係を表す Eq. (2) に従い^{11, 15)}、空気力学的平均径理論値 (MMADt, theoretical) を算出した。

$$\text{MMADt} = \text{geoD50} \times \sqrt{\rho} \quad (2)$$

2. 5 吸入特性の評価

アンダーセン式カスケードインパクト (AN-200, 柴田科学) を用い、in vitro 吸入特性を評価した。SFD 粒子 3 mg を HPMC カプセル 2 号 (クオリカプス) に充填し、DPI 用吸入器 (ジェットヘラー, 日立オートモティブシステムズ) に装着して、吸引速度 28.3 L/min で 5 秒間吸引した。以上の操作を 5 回繰り返したのちに、カプセル、吸入器、スロート、ステージ 0 ~ 7 に捕集された粒子を 10 mL のリン酸緩衝液 (pH 7.4) で洗い込み、得られた溶液の 490 nm における吸光度を紫外可視分光光度計 (UV-160, 島津)

で測定した。

吸入特性を数値化するため、充填した全 Fls 量に対するカプセル及び吸入器から放出した Fls の割合を Emitted dose (ED), 放出した全 Fls 量に対するステージ 3 (カットオフ径 4.7 μm) 以降に回収された Fls 量の割合を Fine particle fraction (FPF) と定義し、それぞれ吸入器放出性、肺到達性の指標とした。また各ステージのカットオフ径と到達量から空気力学的平均径実測値 (MMADm, measured) を算出した。さらに MMADt に対する MMADm の比を凝集指数 (CI: Cohesive index) と定義し、吸入時における粒子の気中分散性の指標とした。

$$\text{CI} = \frac{\text{MMADm}}{\text{MMADt}} \quad (3)$$

上記定量評価とは別に、ステージ 2 及び 3 上の両面テープに付着した粒子を電顕観察した。

3. 結果と考察

3. 1 SFD 粒子の粒子密度

経肺適用される粉末は数 μm 程度の微細な粒子であり、その粒子密度を正確に測定することは困難である。そのため、多くの報告では粉末を容器に充填した際のタップ密度を近似的に用いている^{10, 16~17)}。しかし、この方法では粒子体積として粒子間空隙を含んだ粉体層の体積を計測するため、粒子密度を小さく見積もってしまう。また SFD 粒子では粒子内空隙体積を無視できないため、真密度に近似することもできない。そこで、粒子体積を正確に測定できるようほぼ真球でサイズの大きな擬似 SFD 粒子を調製し、画像解析法にて得た体積から粒子密度を算出した。種々の固形分濃度の供給液から得た粒子の密度は、固形分濃度に相当する値を得た (Fig. 3 右)。SFD 法では液滴が形状や大きさを維持したまま凍結・乾燥するため、生成した粒子の体積は液滴の体積、その重さは液滴内に存在する固形分の質量となるためである。ただし厳密に見ると、両者の値は一致せず、粒子密度は固形分濃度をわずかに下回る結果となった。これは凍結時における水の体積膨張に起因していると推察した。すなわち Fig. 4 に図示した通り、凍結粒子は液滴の 1.091 倍の体積になり、乾燥時には体積を維持するため、液滴の 1.091 倍の体積を持つ乾燥粒子になると推定した。このことは、固形分濃度 (X) と粒子密度 (Y) との相関関係が $Y=X$ の直線よりも、体積膨張分を補正した $Y=X/1.091$ に近似することからも検証された (Fig.

Fig. 3 Relationship between solid concentration in spray suspension and particle density of resultant pseudo-SFD particles

Fig. 4 Schematic image of freezing and drying of one droplet in the spray freeze drying process

3 左, プロットの相関直線: $Y=X/1.072$)。このように SFD 法では, 液滴がそのサイズを保ったまま凍結・乾燥されるため, 粒子密度は噴霧液の濃度により一義的に決定され, 粒子径には依存しないと考えられた。したがって, 擬似 SFD 粒子の粒子密度は実際の SFD 粒子のそれに相当しているものと結論した。

3. 2 SFD 粒子の形態特性

異なる噴霧液濃度から生成した SFD 粒子の電顕写真を **Fig. 5** に示す。いずれも球形多孔質という特徴的な構造を有していた。噴霧液の濃度が増すほど緻密な構造になっていることが外観像からも支持された。今回, 粒子形成剤として用いた Eud-L はサブミクロン粒子が懸濁したラテックス系コーティング基剤であり, 多数の微細粒子が部分的に融合したモザイク様構造を呈していることが観察された。粒子密度が 0.0388 g/cm^3 の最軽質な粒子 (E4%) であっても取扱い時に破砕することなく, 粒子構造を維持していた。

次に, SFD 粒子の粒子径分布を測定した。後述する空気力学的特性を考察する上で, 正確な幾何学径を得る必要があり, 画像解析法を採用した。**Fig. 6** には SFD 粒子 3 種を抜粋して累積粒子径分布曲線を示した。図示していない粒子を含めて, いずれも 3~20

Fig. 5 Scanning electron microphotographs of SFD particles with varying particle densities
A) E4% B) E10% C) E14%
1) low magnification 2) high magnification

Fig. 6 Cumulative particle size distribution of SFD particles with varying particle densities measured by image analysis

µm 範囲のほぼ同等な分布を有していた。geoD50 は $10 \sim 12 \mu\text{m}$ と差がなく (後述 Table 2 参照), 所期の目的である同等の粒子径分布を持ち, 粒子密度の異なる一連の粒子群を入手することができた。

3. 3 SFD 粒子の空気力学的特性

SFD 粒子の粉末吸入剤としての適性をカスケードインパクトにて評価した。**Fig. 7** に代表する 3 製剤の飛散挙動を, **Table 2** に全製剤の空気力学的指標値を示す。いずれの粒子もカプセルや吸入器への残留はほとんどなく, ED 値は 95% を越える良好な結果となった。一般に吸入用粉末は呼吸器官深部への到達・沈着を意識して数 µm 以下の微細粒子を設計するため, カプセルや吸入器内に残留しやすいという欠点を持っている。本 SFD 粒子は吸入至適径よりもやや大きく, かつ球形であるため, 付着性が低減したものと考察した。また, ステージ 3 以降への到達性は高く, 肺到達性の指標である FPF 値は 30% を越え, E12% 製剤で最高値 (35.5%) となった。これは SFD 粒子の粒子密度が低いため, 気流に沿って飛翔しやすく (慣性力が

Table 2 Morphological and aerodynamic parameters of SFD particles with varying particle densities

Parameters		(unit)	E4%	E7%	E10%	E12%	E14%	E16%
Morphological	geoD50 ¹⁾	(μm)	12.60	12.66	10.60	10.19	10.89	9.12
	Particle density ρ ²⁾	(g/cm^3)	0.0388	0.0660	0.0939	0.1120	0.1281	0.1505
	MMADt ³⁾	(μm)	2.480	3.254	3.248	3.409	3.897	3.539
Aerodynamic	ED ⁴⁾	(%)	98.2	96.6	94.8	95.8	97.7	96.8
	FPF ⁵⁾	(%)	25.9	28.0	30.9	35.5	29.4	27.8
	MMADm ⁶⁾	(μm)	7.00	6.40	5.90	5.20	5.80	5.90
	CI ⁷⁾	(—)	2.82	1.97	1.82	1.53	1.49	1.67

¹⁾ Geometric mean diameter

²⁾ Measured by image analysis of pseudo SFD particles

³⁾ $\text{MMADt} = \text{geoD50} \times \sqrt{\rho}$

⁴⁾ Emitted dose

⁵⁾ Fine particle fraction

⁶⁾ Calculated from cut-off diameters and deposition fractions on each stage of cascade impactor

⁷⁾ $\text{CI} = \text{MMADm}/\text{MMADt}$

Fig. 7 Cascade Impactor deposition profiles of the SFD particles with varying particle densities. The upper aerodynamic cut-off diameters of stage 1 to 7 are 11.0, 7.0, 4.7, 3.3, 2.1, 1.1, and 0.65 μm , respectively. From left bar to right bar : E4%, E10%, E14% particles.

小さく), 下部ステージまで到達することができたと推察した。このことを検証するため, インパクトの捕集板に付着した粒子 (E14%) を採取した。Fig. 8 にステージ2 (左) 及びステージ3 (右) に到達した粒子の電顕写真を示す。両ステージの空気力学的カットオフ径は, それぞれ 7.0~4.7 μm , 4.7~3.3 μm であり, カットオフ径上限の相当円を写真左上に白円で表記した。いずれのステージにおいても, 相当円と比較し明らかに大きな粒子が到達していることが確認された。すなわち SFD 粒子は低粒子密度ゆえ, 幾何学的には吸入剤として相応しくないやや大きな粒子でも, 空気輸送されて気管支や肺深部まで到達できるポテンシャルを有していることが示唆された。

3. 4 SFD 粒子の飛散様式の考察

空気力学的特性結果を SFD 製剤間で比較すると,

Fig. 8 Scanning electron microphotographs of SFD particles (E14%) trapped on stage 2 (left) and stage 3 (right) of Cascade Impactor. White circles printed in the upper left-hand corner indicate the corresponding particles with upper cut-off diameter.

Fig. 9 Aerodynamic parameters of SFD particles with varying particle densities
 $\text{CI} = \text{MMADm}/\text{MMADt}$

製剤群の中で最も軽質で理論上の空気力学的平均径 (MMADt) が最小になる E4% 製剤では FPF 値が小さく (25.9%), かって飛散しづらいという不整合な結果を与えた (Fig. 9 左)。つまり軽質であるほど高い肺到達性が得られる訳ではなく, 別の要因が働いていることが考えられた。そこで, 空気力学径の平均径の理論値 (MMADt) に対する実測値 (MMADm)

の比を算出し、グラフ化した (Fig. 9 右)。MMADt は粒子が完全分散し、個々に飛散する場合を想定している。一方 MMADm は、実際に飛散した際の粒子状態を反映しており、粒子間で凝集したまま飛散すれば、大きな値となって測定される。したがって両値の比を飛散時の粒子の凝集状態の指標と見なし、新たに凝集指数 (CI: Cohesive index) と定義した。つまり、この値は粒子の平均凝集個数を意味し、1 であれば気流中で粒子は完全分散していることとなる。E4% 製剤では最大値の 2.82 となり、約 3 個弱の粒子が凝集し、その状態で空気力学的振る舞いをしたと想定できる。E4% 製剤は軽質であることが粒子間脱離を抑制したものと推測した。凝集指数は E12%, E14% で最低となるものの、個々の粒子が完全に独立して飛散していないことが示唆された。以上、軽質粒子の肺到達性は、粒子密度に加え、粒子間凝集度合いも影響を及ぼし、これらの複合的要因が FPF 値に集約されるもの

と結論した。

4. 総 括

SFD 法により粉末吸入剤に適した軽質球形微粒子を設計した。噴霧液の固形分濃度を変え噴霧条件を統一することで、幾何学的に同等の粒子径分布を持ち、粒子密度のみ段階的に変えた一連の粒子群を調製した。SFD 粒子の粒子密度を正確に測定する方法を確立し、粒子密度が噴霧液中の固形分濃度を水が凝固する際の体積膨張比で除した値で近似できることを明らかにした。10 μm 程度の粒子径を持つ SFD 粒子は、吸入器からの放出性、インパクター下部ステージへの到達率がともに高く、優れた *in vitro* 吸入特性を有していた。特に、粒子密度が 0.11 g/cm³ 前後で粒子の慣性力と粒子間の脱着性がバランス良くとれ、吸入到達性が最大になることを示した。本研究結果は、DPI 製剤用粒子の設計指針になるものと期待する。

References

- 1) Shindo, C.: "Present and Prospective views of Transbrochial drug administration", *Kokyu*, **25** (4), 355-360 (2006)
- 2) Banno, M.: "Inhalation Dosage Form", *Gekkan-Yakuji*, **53** (12), 1891-1896 (2011)
- 3) Pilcer, G. and K. Amighi: "Formulation Strategy and Use of Excipients in Pulmonary Drug Delivery", *Int. J. Pharm.*, **392** (1-2), 1-19 (2010)
- 4) Islam, N. and M. J. Cleary: "Developing an Efficient and Reliable Dry Powder Inhaler for Pulmonary Drug Delivery - A Review for Multidisciplinary Researchers", *Med. Eng. & Phys.*, **34**, 409-427 (2012)
- 5) Chaubal, M. V. and C. Popescu: "Conversion of Nanosuspensions into Dry Powders by Spray Drying: A Case Study", *Pharm. Res.*, **25** (10), 2302-2308 (2008)
- 6) Louey, M. D., M. Van Oort and A. J. Hickey: "Aerosol Dispersion of Respirable Particles in Narrow Size Distributions Produced by Jet-milling and Spray-drying Techniques", *Pharm. Res.*, **21** (7), 1200-1206 (2004)
- 7) Louey, M. D., M. Van Oort and A. J. Hickey: "Aerosol Dispersion of Respirable Particles in Narrow Size Distributions using Drug-alone and Lactose-blend Formulations", *Pharm. Res.*, **21** (7), 1207-1213 (2004)
- 8) Inoue, K.: "Pharmaceutical Development of Anti-influenza Virus Product, Inavir", *Pharm Tech Japan*, **27** (8), 1557-1564 (2011)
- 9) Ungaro, F., R. Villa Bianca, C. Giovino, A. Miro, R. Sorrentino, F. Quaglia and M. La Rotonda: "Insulin-loaded PLGA/cyclodextrin large porous particles with improved aerosolization properties: In vivo deposition and hypoglycaemic activity after delivery to rat lungs", *J. Control. Release*, **135**, 25-34 (2009)
- 10) Ungaro, F., C. Giovino, C. Coletta, R. Sorrentino, A. Miro and F. Quaglia: "Engineering Gas-foamed Large Porous Particles for Efficient Local Delivery of Macromolecules to the Lung", *Eur. J. Pharm. Sci.*, **41**, 60-70 (2010)
- 11) Tsapis, N., D. Bennett, B. Jackson, D. A. Weitz and D. A. Edwards: "Trojan Particles: Large Porous Carriers of Nanoparticles for Drug Delivery", *PNAS*, **99** (19), 12001-12005 (2002)
- 12) Niwa, T., D. Mizutani and K. Danjo: "Spray Freeze-dried Porous Microparticles of a Poorly Water-soluble Drug for Respiratory Delivery", *Chem. Pharm. Bull.*, **60** (7), 870-876 (2012)
- 13) Niwa, T., H. Shimabara, M. Kondo and K. Danjo: "Design of Porous Microparticles with Single-micron Size by Novel Spray Freeze-drying Technique using Four-fluid Nozzle", *Int. J. Pharm.*, **382** (1-2), 88-97 (2009)
- 14) Niwa, T., H. Shimabara and K. Danjo: "Novel spray freeze-drying technique using four-fluid nozzle- Development of organic solvent system to expand its application to poorly water-soluble drugs", *Chem. Pharm. Bull.*, **52** (2), 195-200 (2010)
- 15) Gonda, I.: "Targeting by deposition", A. J. Hickey (ed.), *Pharmaceutical Inhalation Aerosol Technology*, pp. 61-82, Marcel Dekker, New York (1992)
- 16) Vanbever, R., J. D. Mintzes, J. Wang, J. Nice, D. Chen, R. Batycky, R. Langer and D. A. Edwards: "Formulation and Physical Characterization of Large Porous Particles for Inhalation", *Pharm. Res.*, **16** (11), 1735-1742 (1999)
- 17) Dellamary, L. A., T. E. Tarara, D. J. Smith, C. H. Woelk, A. Adrastas, M. L. Costello, H. Gill, G. Jeffry and A. Weers: "Hollow Porous Particles in Metered Dose Inhalers", *Pharm. Res.*, **17** (2), 168-174 (2000)