コンポジット化による製剤ナノ粒子の機能発現

Functional Expression of Pharmaceutical Nanoparticulates by Composition

川島 嘉明

Yoshiaki Kawashima

Keywords : Composite nanoparticle, Pulmonary delivery, Insulin, Spherical crystallization, Dry powder composing system, Spray fluidized bed system

1. 緒 言

最近の新薬の製剤開発における話題の一つは、候補化合物としてしばしば開発ステージに上がってくる超難溶性薬物の製剤化への対処である。今一つは、ペプチド・タンパク性薬物の経粘膜投与型製剤の開発であろう。

ナノ粒子は、これらの課題克服に深く関わっている。前者にあっては、薬物粒子のナノ化による、溶解性改善を取り上げることが出来る。固体の溶解度は、粒子径がサブミクロンになると、そのサイズ効果が現れるようになり有意に増大するからである。これに加えて、粒子を非晶質化すれば、表面エネルギーが増大し、溶解度が更に増すことになる¹⁾。後者では、高分子等のナノ粒子キャリアーによる、吸収改善を取り上げることが出来る。薬物キャリアーをサブミクロン化すると、薬物の酵素分解からの保護、薬物の放出制御などの、通常のキャリアーの機能に加えて、粘膜などの生体膜付着性の発現による組織滞留性の向上、それに起因する、薬物の局所濃度の増大、更には、生体膜を直接透過する機能などが付加されることが明らかに

なりつつあるからである²⁾。

ここで問題は、これらのナノ粒子を製剤化した時、その機能が生体で期待通り発揮されないことが多いことである。その原因の一つは、製剤化中や、製剤化後保存中に、製剤内でナノ粒子が凝集、融合し、その機能を失うことである。更には、吸収（ターゲット）部位で、製剤からオリジナルのナノ粒子が再生されないことによる。この問題を解決すべく、著者らは、通常製剤として取り扱うことのできる、ナノ粒子を分散した状態で包含したミクロンサイズのコンポジット体の開発に取り組んでいる。それにより、ナノ粒子を通常製剤の方法で吸収部位まで送達し、局所で高濃度のオリジナルなナノ粒子をコンポジット体から再構築する仕組みを提案している。その具体例として、コンポジット化ナノ粒子による、経肺投与型 DDS の設計・開発を紹介する。

2. 難溶性抗喘息薬のコンポジットナノ粒子化と粉末吸入製剤の設計

抗喘息薬は、経肺投与が有効であるといわれている。気管支などの薬物の作用組織（部位）に直接薬物を送達し、局所での有効薬物濃度を増大させることが出来るからである。それにより、少量の薬物投与で静脈注射と同等またはそれ以上の効果を発揮させ、しかも、血中濃度を抑制することができ、副作用の防止も期待できる。

経肺投与は、従来から定量吸入法（Metered Dose Inhalation, MDI）が主流であったが、噴射剤として使用されるフロン（CMC）の全廃を受けて、代替フロンの開発と共に、粉末吸入法（Dry Powder Inhalation, DPI）の開発が注目されている。DPI の設計ポ

2004年3月11日受付

岐阜薬科大学製剤学教室

(〒502-8585 岐阜市三田洞東5-6-1) TEL 058-237-8574

< 著者紹介 >

昭和44年京都大学大学院薬学研究所博士課程修了、岐阜薬科大学助手、助教授を経て、昭和58年から同大学教授、薬学博士。専門：製剤学、DDS開発のための微粒子設計工学。球形晶析法を中心とした晶析造粒、難溶性やペプチド性薬物、遺伝子封入高分子ナノスフェアの開発と経口、経肺投与型送達システムへの展開。

イントは、吸入気流中での空気力学径が、0.5～7 μm の粒子のみが気管支や肺胞に到達し、目的部位に沈着するところにある。気流中にナノ粒子を分散させることが出来ても、肺内に沈着することなく、呼吸と共に排出されてしまう。その意味でも、ナノ粒子を標的部位に沈着させるには、コンポジット化が必要になる。粒子径が数 μm の微小粒子を製剤プロセス（例えば、カプセル充填）に供することは、その強い付着凝集性から一般に難しい。

そこで、薬物粒子を造粒物としておき、気流中では崩壊させて目的のサイズの粉末にする方法（造粒法）や、粗大（20～30 μm ）キャリアー粒子（乳糖など）表面に薬物粒子を吸着させておき、気流中でキャリアー粒子より分離・分散させる方法（キャリアー法）が採られる。我々は、コンポジット化したナノ粒子をキャリアー法でDPI製剤とした。

2.1 薬物ナノ粒子のコンポジット化とその物性

モデル薬物として、ヒスタミン拮抗作用や抗ヒスタミン遊離作用を持った、難溶性の新規薬物（YK113）を使用した。ナノ粒子化には、水中溶媒拡散法（球形晶析法）に基づいた、ビルトアップ法を採用した³⁾。その理由は、薬物の結晶形をも晶析時に同時制御することを企図したからである。それによって、溶解性の改善も図る狙いである。具体的には、薬物の良溶媒飽和溶液（メタノール：水＝16：5の混合溶媒）をPVAや、HPCなどの水溶性高分子溶液中に注ぎ、晶析をさせる。ここで高分子は、晶析粒子表面に吸着し、表面改質剤とコンポジット化剤として働く。本法によって、粒子径が250～400nmのサブミクロン一次粒子を得ることが出来た。未吸着高分子を洗浄・除去後、凍結乾燥して、高分子コンポジットナノ粒子を

表1 薬物ナノ粒子径と各種水溶性高分子との凍結乾燥コンポジット体の薬物含量と再水和後の粒子径

	Drug content (%)	Particle size (nm)	
		Before F.D.	After F.D.*
PVA205 (1%)	89.9	293.0	515.8
PVA405 (1%)	82.7	270.5	799.1
PVAL-8 (1%)	77.5	252.2	974.5
HPC-L (1%)	76.9	405.8	573.9
Pluronic (1%)	93.9	401.5	N.D.
Dextran (0.2%)	97.1	328.2	512.6

Before F.D.: 凍結乾燥（コンポジット）前の平均粒子径

After F.D.: 凍結乾燥（コンポジット）粒子を水中に再分散したときの平均粒子径

*: 水中での再分散可能 N.D.: 水中での再分散不可

得た。コンポジット粒子は針状粒子の凝集物で、気中分散時に、約8.6 μm の平均粒子径を示した。コンポジット粒子中の薬物は、非晶質化することが判明した。これは、晶析時、薬物が過飽和状態から急激に析出するため、結晶配列が不規則になったためである。

コンポジット粒子中の薬物含量と、これを水中に再分散した時に得られる懸濁液の粒子径を表1⁴⁾に示す。プルロニックを使用した場合を除いて、いずれのコンポジット粒子とも容易に水中に再分散することができ、その平均粒子径はナノオーダーであり、コンポジット化前のナノ粒子を再構築できることが分った。また、疎水基の寄与率が高い高分子ほど薬物粒子への吸着量が高いことが示された。

コンポジット粒子の日本薬局方第2液中への溶解性を調べた結果を図1に示す。いずれのコンポジット

図1 コンポジットナノ粒子の溶解性

溶媒: 0.05% Tween80 含有日本薬局方 (XIV) 第2液,

溶媒量: 20ml, 試料量: 4mg, 温度: 37℃

粒子とも、薬物原末（平均粒子径、 $11.0\mu\text{m}$ ）に比べて高い溶解性を示した。特に、けん化度の高いPVA 205 コンポジット粒子にその効果が高いことが分った。これは、コンポジット粒子中の薬物粒子が非晶質化していること、コンポジット化高分子の表面改質効果により、薬物粒子の濡れ性が改善されたことによる。コンポジット粒子の表面の濡れ性改善効果は、原末結晶（ $571\mu\text{g}/\text{m}^2$ ）よりもコンポジット粒子の高い水分吸着性（ $846\mu\text{g}/\text{m}^2$ ）からも分る。これらのコンポジット粒子は、それが肺内に吸入・沈着された時、薬物原末に比べ速やかに薬物を溶解させ、組織（作用部位）中の薬物濃度を高めるものと思われる。

2.2 コンポジットナノ粒子 DPI の吸入特性と薬理効果

乳糖を用いたキャリアー法により、薬物原末及びコンポジット粒子を DPI 化した。薬物及びコンポジット粒子の乳糖粒子表面への付着・固定化には、タッチミキサーまたは高速楕円ローター型粉体複合化装置（シータコンポーザー）を用いた。

In vitro 吸入特性は、ツインインピンジャーを用いて評価した。ツインインピンジャーは、空気力学径に依存した慣性力の違いを利用した分級装置であり、ステージ1とステージ2から構成されている。ステージ1とステージ2間の50%分離粒子径は $6.4\mu\text{m}$ で、ステージ2に到達する粒子が肺内に到達するとみなされている。その割合を RF (%) で表した。タッチミキサーにより製したコンポジット粒子のキャリアー型

図2 コンポジットナノ粒子のキャリアー型 DPI の in vitro 吸入特性

NP: コンポジットナノ粒子 (PVA205)

θ-NP: シータコンポーザーで製した DPI
(キャリアー: コンポジットナノ粒子 = 10:1)

PM-NP: タッチミキサーで製した DPI
(キャリアー: コンポジットナノ粒子 = 10:1)

図3 コンポジットナノ粒子 DPI の薬理効果 (n=2~4)

DPI の RF 値は、コンポジット粒子単独の場合と同等であった。シーターコンポーザーによる、薬物原末及びコンポジットの RF 値は、低くなることが判った。シーターコンポーザーでは、せん断力が強くかかり、薬物原末やコンポジット粒子のキャリアー粒子への固定化が強固になるため、キャリアーからの分離が難しくなるためと思われる（図2）。なお、図中横軸のカプセルはカプセル内の残留%, デバイスは吸入デバイス内壁への付着%, スロートはツインインピンジャーの導入部への付着%を表す。

In vivo 実験には Hartley 系雄性モルモットを用いた。吸入粒子の肺内分布は、経気管支投与後、気管、気管支、細気管支、肺胞を取り出し、沈着した薬物量を定量して求めた。In vitro 吸入特性に優れる、コンポジット粒子のキャリアー DPI は、In vivo 吸入特性も優れ、肺深部（肺胞）に薬物がよく送達された。

薬理効果の評価は、粒子を経気管支投与後、一定時間ごとにヒスタミンを投与し、気管支収縮を惹起させ、気道抵抗を測定することにより行った。キャリアーで運ばれたコンポジット粒子では、原末の粉碎粒子を用いた場合に比べ、薬理効果が有意に短時間で発現し、また、ヒスタミンに対する拮抗作用も高い値を示した（図3）⁵⁾。これは、コンポジット粒子の肺胞への送達量が多いこと、沈着後速やかに薬物ナノ粒子を放出し溶解させ、薬物の局所濃度を高めるためと思われる。

3. ペプチド封入 PLGA ナノスフェアのコンポジット化と経肺投与

我々は、ペプチドの経粘膜投与を目指したポリ乳

酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) ナノスフェアを開発している⁶⁾。カルシトニンを封入した PLGA ナノスフェアをモルモットやマウスの気管支や胃内に直接投与すると、薬物溶液よりも血中カルシウム濃度が有意に減少し、それが持続することを明らかにしている。現在、本ナノスフェアをインスリンに適用し経肺投与型 DDS を開発中である。以下にその経緯を紹介する。

3. 1 インスリン封入 PLGA ナノスフェアコンポジットを利用した DPI の設計

インスリン封入 PLGA ナノスフェアは、水中溶媒拡散法 (高分子球形晶析法) により製した。インスリンの塩酸溶液と PLGA のアセトン溶液の混液を、PVA 水溶液と、水酸化ナトリウム水溶液の混液中に撹拌下添加し、PLGA マトリックス中にインスリンが分散したナノスフェアを得た。溶媒の留去、水洗後凍結乾燥により、粉末化した。本ナノスフェアのコンポジット化は、以下の 2 方法によった。

3. 1. 1 噴霧乾燥式流動層造粒装置 (アグロマスター AGM-SD) による方法⁷⁾

PLGA ナノスフェアを、マンニトールの水溶液中に懸濁させ、これをアグロマスター装置内に噴霧し、乾燥と造粒を同時に行い、マンニトール中に PLGA ナノスフェアが分散したコンポジット体を得た。装置の吸気温度が高い (80℃) 場合には、平均約 4μm の球形の一次粒子が緩やかに凝集した造粒物であったが、吸気温度が低い場合 (55℃) には、一次粒子が融合した造粒物であった。そのため、気流中の分散性は、前者の造粒物の方が高く DPI として望ましいことが分った。

そこで、前者の条件で、6-クマリンで標識したナノスフェアを 10% 含有したコンポジット体を調製した。これを 200mg 採り、水を滴下した所、わずか 0.9ml で標識粒子がコンポジット体から分離し、分散することが観察された。分散粒子の粒子径は、約 260 nm で、オリジナルなナノスフェアが再構築されることが確認された。この結果は、肺内に吸入され沈着したコンポジット粒子は、肺胞表面の少ない水分によってもナノスフェアを再生し、薬物がナノスフェアから放出され吸収されるものと思われる。ナノスフェアの含有率が 10% 以上になると、ナノスフェア同士がコンポジット内で接触するようになり、調製温度が PLGA のガラス転移点よりも高い場合には、融着が生じ、オリジナルなナノスフェアが再構築されなくなることが判明した。

インナーピースとローター部を上から見た図

図4 メカノフュージョンの原理と構造

3. 1. 2 乾式粒子複合化装置 (メカノフュージョン・ミニ) による方法⁸⁾

先の方法で調製した、PLGA ナノスフェアと吸入用グレードの乳糖 (325M, DMV) を 1 : 4 の組成割合で装置内 (図4) に採り、種々のクリアランスとローターの回転速度、処理時間でコンポジット体を調製した。ここで、乳糖粒子は、キャリアとしてもコンポジット化剤としても働く。クリアランスを狭く、ローターの回転数を速く、処理時間を長くすると、PLGA ナノスフェアの固定化効率が上がるが、PLGA が融着し、乳糖表面でフィルム状になることが分った。そのため、コンポジット粒子を水中に再分散させるとき、オリジナルなナノスフェアを再構築できなかった。最適なクリアランスを選ぶと、回転速度に関係なく、ナノスフェアを再生することができた。

3. 2 インスリン封入 PLGA ナノスフェアコンポジットの吸入特性と薬理効果

アグロマスターにより製した造粒物型コンポジットの *in vitro* 吸入特性を、ツインインピンジャーで調べた (表2)。対照として、PLGA ナノスフェアの凍結乾燥粉体を使用した。対照品は、流動性が悪いため、吸入デバイスの種類に関係なく、カプセルからの放出量 (OE 値) が少なく肺内到達率 (RF 値) が低い。ここで、OE 値は 100% からカプセル内の残留%を引いた値であり、RF 値はステージ2への到達%を表わす。一方、コンポジット体は、流動性が改善され、吸入デバイスからの OE 値が増大し、RF 値も有意に増大した。使用した吸入デバイスは、Spinhaler[®], Jethaler[®], E-haler[®] の3種類である。

表2 造粒物型コンポジット体の in vitro 吸入特性

	Device	O.E. (%)	R.F. (%)
Freeze-dried nanosphere powder	Spinhaler®	58.8 ± 2.0	14.5 ± 2.4
	Jethaler®	60.3 ± 1.7	18.8 ± 2.0
Composite granule	Spinhaler®	85.2 ± 2.9	26.3 ± 2.3
	Jethaler®	83.2 ± 1.7	38.3 ± 1.5
	E-haler®	91.3 ± 1.0	45.0 ± 1.1

図5 キャリア型コンポジット体の in vitro 吸入特性の及ぼす混合化処理時間の影響
処理時間：(□) 5分, (▨) 15分, (■) 30分, (▤) 60分

Spinhaler® は、カプセル内に充填した粉末を、吸気によりカプセル表面に使用時穿孔された細孔より放出させる機構を有している。Jethaler® は、吸入空気がカプセル内にも導入され、粉末がカプセル内でも流動化するように改良されたものである。E-haler® は、デバイス内に攪拌ミル機構を内蔵しており、凝集粉末の解砕機能を持つ。特に、E-haler® を使用した場合には、造粒物は一次粒子まで崩壊しやすくなり、吸入特性が増大した。

キャリア型のコンポジット体のそれは、複合化装置のクリアランス幅、ローターの回転速度、処理時間の影響を受けた(図5)。これらのパラメーターを最適化(クリアランス 5mm, 回転速度 370rpm, 処理時間 15分)すると、RF 値は Spinhaler® を用いた吸入で、44.5% に達した。

これらのコンポジット体を、シリンジ法により、ラットに経気管投与し、PLGA ナノスフェアの肺内沈着分布を調べた(図6)。肺胞、細気管支への沈着率は、ツインインピンジャーによる、RF 値とほぼ対応することが分った。

インスリンを封入した、PLGA ナノスフェアの凍結乾燥粉末及びそのコンポジット体をシリンジ法で、経気管投与し、その薬理効果を評価した。キャリ

図6 キャリア型コンポジット PLGA ナノスフェアの肺内沈着分布

ア型のコンポジット体の結果を図7に示す。インスリン溶液の経肺及び静脈投与群では、薬理効果が速やかに現れるが、8時間後には、グルコースは、元の血中濃度に戻った。一方、コンポジット体投与群は、6時間後に、最も低い血中グルコース濃度を示し、24時間後に元の血中濃度に戻る、持続的な薬理効果

図7 キャリア型コンポジット体の薬理効果(血糖降下作用)
(△): コントロール(経気管投与 saline),
(◇): インスリン含有 PLGA ナノスフェアコンポジット体, (○): 静注インスリン溶液,
(□) 経気管投与インスリン溶液, インスリン投与量: 2.91U/rat. n=6
有意差 危険率 * 5%, ** 1%, *** 0.1%

を示した。血中グルコース濃度下面積を比較すると、コンポジット体は、溶液の経気管支投与の3.38倍、静脈投与の1.6倍に当たり、高い薬理効果と持続性が示された。これは、インスリンをPLGA ナノスフェアに封入して徐放化できたこと、更に、これをコンポジット体にすることによって、効果的に肺胞部に送達し局所で再生できたことによる。

4. 結 言

薬物そのものを、また、それを封入した、キャリアをナノサイズ化する技術とその評価法に関しては多くの研究が有り、ナノ粒子システムの生体に対する

新しい相互作用や機能が明らかにされつつある。これらの機能を発揮させるナノ粒子DDSを開発し工業化するには、ナノ粒子の製造のスケールアップと共に、ナノ粒子を如何にして製剤化するかが課題である。そのためには、ナノ粒子生来の物性を損なうことなく、粉体物性を改質する必要がある。著者らが提案する、コンポジット体化のコンセプトは、その解決法を提示するものである。

〔謝辞〕本研究の一部は、新エネルギー・産業技術総合開発機構基盤技術研究促進事業（民間基盤技術研究支援制度 13K293）の支援による。

引用文献

- 1) 川島嘉明：“粒子設計工学”，粉体工学会編，pp. 1-12，産業図書（1999）
- 2) Takeuchi, H., H. Yamamoto and Y. Kawashima : Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Delivery Revs.*, **47**, 39-54 (2001)
- 3) 川島嘉明：“生体内分解性高分子微粒子によるDDS開発”，*PHARM TECH JAPAN*, **20**, 25-40 (2004)
- 4) 平岡祥吾，山本浩充，竹内洋文，川島嘉明：“吸入特性及び難溶解性改善を目指した水中溶媒拡散法による新規喘息治療薬ナノパーティクルの調製”，第20回製剤と粒子設計シンポジウム講演要旨集，pp. 167-170 (2003)
- 5) Hiraoka, S., H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kawashima : “Nanoparticulate system with improved solubility and aerodispersibility for dry powder inhalation system of poorly soluble antiasthmatic drug”, 第2回世界薬学会講演要旨集，印刷中
- 6) Kawashima, Y., H. Yamamoto, H. Takeuchi and Y. Kuno : Mucoadhesive DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres coated with chitosan to improve oral delivery of elcatonin. *Pharm. Dev. Technol.*, **5**, 77-85 (2000)
- 7) 山本浩充，保科 亘，倉嶋 誉，竹内洋文，川島嘉明，横山豊和，辻本広行：“噴霧乾燥式流動層造粒装置による粉末吸入インスリンポリ乳酸グリコール酸ナノコンポジット粒子の設計” 粉体工学会誌へ投稿中
- 8) 山本浩充，倉嶋 誉，片桐大介，楊明世，竹内洋文，川島嘉明，横山豊和，辻本広行：“粒子複合化装置メカノフュージョンを用いた粉末吸入インスリン製剤用PLGA ナノコンポジット粒子の設計” 薬剤学へ投稿中