

平成 27 年度 学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

気液界面細胞培養系を応用した肺粘膜表面における吸入粉末剤の局所作用に関する研究

〈欧 文〉

A Study on Local Action of Dry Powder Inhalers on Lung Mucosal Surface Using Air-Liquid Interfaced Cell Culture

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

浅井 歩

目次

I	緒論	1
II	第一章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の新規評価系の確立	5
II.1	緒言	5
II.2	実験方法	5
II.2.1	試料	5
II.2.2	細胞培養	6
II.2.3	粉末微粒子製剤の調製	6
II.2.4	粉末微粒子製剤の粒子形状評価	7
II.2.5	新規粉末微粒子添加用デバイスの作成	8
II.2.6	Transwell®への分散添加方法の最適化	8
II.2.6.1	新規粉末微粒子添加用デバイスの充填量の検討	8
II.2.6.2	新規粉末微粒子添加用デバイスの圧縮空気量の検討	9
II.2.6.3	市販の粉末微粒子添加用デバイスの沈着効率評価	9
II.2.6.4	市販の液体噴霧器の沈着効率評価	9
II.2.7	気液界面細胞培養系の培養条件の最適化	9
II.2.8	薬物膜透過実験	9
II.2.9	統計解析	10
II.3	結果	10
II.3.1	粉末微粒子製剤の粒子形状評価	10
II.3.2	Transwell®への分散添加方法の最適化	10
II.3.3	気液界面細胞培養系の培養条件の最適化	11
II.3.4	薬物膜透過実験	13
II.4	考察	14
II.5	結論	15
III	第二章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の吸収特性評価	16
III.1	緒言	16
III.2	実験方法	16
III.2.1	試料	16
III.2.2	細胞培養	16
III.2.3	粉末微粒子製剤の調製	17
III.2.4	粉末微粒子製剤の粒子形状評価	17
III.2.5	Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価	17
III.2.6	薬物膜透過実験	17
III.2.6.1	薬物膜透過性/細胞内移行性評価	17
III.2.6.2	膜抵抗値 (TEER)の測定	18

III.2.6.3	タンパク質の定量	18
III.2.7	薬物透過経路の可視化	19
III.2.8	統計解析	19
III.3	結果	19
III.3.1	粉末微粒子製剤の粒子形状評価	19
III.3.2	Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価	20
III.3.3	薬物膜透過実験	21
III.3.3.1	試料の添加様式の影響	21
III.3.3.2	モデル薬物の分子量の影響	22
III.3.3.3	透過実験時の温度の影響	23
III.3.3.4	試料溶液の溶媒量の影響	24
III.3.4	薬物透過経路の可視化	25
III.4	考察	27
III.5	結論	29
IV	第三章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の安全性評価	31
IV.1	緒言	31
IV.2	実験方法	31
IV.2.1	試料	31
IV.2.2	細胞培養	32
IV.2.3	粉末微粒子製剤の調製	32
IV.2.4	粉末微粒子製剤の形状評価	32
IV.2.5	粉末微粒子製剤の粒子径評価	32
IV.2.6	Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価	33
IV.2.7	安全性評価	33
IV.2.7.1	MTT アッセイ	33
IV.2.7.2	LDH アッセイ	34
IV.2.7.3	PI 染色	34
IV.2.8	統計解析	34
IV.3	結果	34
IV.3.1	ALI における安全性評価法の確立	34
IV.3.2	粉末微粒子製剤の物理化学的性質評価	37
IV.3.3	従来の評価系における賦形剤溶液の安全性評価	39
IV.3.4	ALI における賦形剤溶液の安全性評価	41
IV.3.5	ALI の感受性低下の原因の検討	42
IV.3.6	ALI における粉末微粒子製剤の安全性評価	45
IV.4	考察	46

IV.5	結論	50
V	総括	51
VI	謝辞.....	53
VII	参考文献	54

I 緒論

医薬品が生体内で治療効果を発揮するためには、有効成分が作用部位へ十分に送達（薬物動態学）され、適切に薬理効果を発揮（薬力学）する必要がある。一方、有効成分はそれぞれに様々な性質を有しており、低膜透過性、難溶解性など有効成分ごとに個々の課題を有している。近年、医薬品の薬物動態を改善し、「必要な量の有効成分を必要な時間、適切な場所に届ける」ためのドラッグデリバリーシステム（DDS; Drug Delivery System）技術の研究が盛んに行われている。DDS 技術は主に、「放出制御」「吸収改善」「標的指向化」に大別され、有効成分の化学修飾、医薬品の剤形や投与経路の変更などの試みが行われている。

今日の薬物治療の投与経路は経口投与、静脈内投与が主流である。一方、経肺投与はこれまでのところ喘息や慢性閉塞性肺疾患（COPD; Chronic Obstructive Pulmonary Disease）のような呼吸器疾患に対する局所治療を目的としている。呼吸器系は気管、気管支、細気管支、終末気管支と分岐し、肺胞へと至る複雑な組織学的特徴を有しているものの、広い表面積（ $>100 \text{ m}^2$ ）、薄い上皮（ $<1 \text{ }\mu\text{m}$ ）、豊富な血流（約 $5,700 \text{ mL/min}$ ）、低い酵素活性など、特に消化管からは吸収されにくい高分子医薬の吸収部位としての利点を有する¹⁻³⁾。そのため、インスリン^{4,5)}、カルシトニン⁶⁾、ヘパリン⁷⁾のような消化管吸収性の低い高分子医薬品の全身循環系への作用を期待した投与経路としても注目されており、実際に 2006 年に Pfizer 社の Exubera[®]が承認されたものの、売り上げが伸びず 2007 年に販売中止となった。その後、2014 年に MannKind 社の Afrezza[®]が吸入型インスリンとして承認されており、今後さらなる発展が見込まれる全身作用薬投与部位である。

吸入剤はその構造的特徴から、吸入エアゾール剤（MDIs; Metered-Dose Inhalers）、吸入液剤（Inhalation Solutions）、吸入粉末剤（DPIs; Dry Powder Inhalers）の 3 種に分類されている。中でも DPIs は一般に薬物粉末が患者の吸入により気中分散され、呼吸器系治療域へ送達されるため、薬剤噴霧と吸入動作との同調及び噴射剤が不要で、服薬手技が比較的簡便であることや、溶液状態よりも薬物が熱や光に対して安定であることから保存安定性に優れるだけでなく、吸入器が比較的小さく携帯性が良好であるなどの利点を有することから、今後使用頻度が高まると考えられる⁸⁾。

市販吸入粉末剤では微細化した主薬粒子間での付着・凝集や吸入器内への付着による吸入特性の低下を防ぐ目的で、キャリアと呼ばれる担体に主薬微粒子を付着させる方法（キャリア結合型）⁹⁻¹¹⁾や主薬微粒子のみ、または同程度の粒子径の賦形剤を添加して造粒物（スフェロイド）¹²⁻¹⁴⁾を形成する方法（造粒型）が用いられる。また、主薬自身を加工して粉末微粒子を得る方法についても多くの検討が進められており¹⁵⁾、ウェットミルなどを用いたトップダウン法¹⁶⁾や、

噴霧乾燥法¹⁷⁻¹⁹⁾、凍結乾燥法²⁰⁾、噴霧急速凍結乾燥法²¹⁻²³⁾、超臨界二酸化炭素晶析法^{24,25)}等のボトムアップ法による粉末微粒子調製が行われ、低分子医薬品だけでなく、現在注目されているタンパク質や遺伝子などの高分子医薬への応用も進んでいる^{26,27)}。

吸入粉末剤の基礎研究においては、肺治療域に効率的に送達するための吸入粉末剤の粒子径や吸入特性といった物性評価が主流であり²⁸⁾、吸入粉末剤を肺治療域まで送達するためには吸入粉末剤の空気力学的粒子径 (MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter) を 1-6 μm に制御することが推奨されている²⁹⁻³¹⁾。一方、臨床応用に向けては有効性・安全性などの生物学的評価が必要であり、これらの評価には専ら小動物を用いた *in vivo* 実験及び肺組織切片を用いた *ex vivo* 実験が行われる^{32,33)}。しかし、小動物に吸入用粉末微粒子を投与し肺内送達を達成するためには、投与のタイミングを小動物の呼吸と同調させる手技が必要であり、投与量を厳密にコントロールすることが困難なため、実験結果が不明瞭となるケースも少なくない^{34,35)}。また、肺上皮細胞層からの薬物膜透過性評価や粘膜障害性など局所的な生物学的作用を評価することは難しく、詳細な作用解析についてはより簡便な培養細胞を用いた評価系の応用が好ましい³⁶⁾。

しかし、従来の培養細胞を用いた *in vitro* 評価系では細胞表面を液体培地で覆う必要があるため、粉末微粒子製剤を液体培地に再溶解して適用されてきた。一般的に吸入粉末剤は吸入後に以下の挙動を示すと考えられる：1) 分散、2) 呼吸器へ到達、3) 沈着、4) 呼吸器上皮表面の粘液で溶解、5) 吸収。それゆえ、液体培地で覆われた従来の細胞培養系 (SUB; Submerged Cell Culture) (Fig. 1a, b) は厳密に肺内環境を反映していないため、吸入された粉末微粒子製剤を正確に評価することができないことが問題であった。一方、近年、細胞表面が空気と接触したまま培養することが可能な気液界面細胞培養系 (ALI; Air-Liquid Interfaced Cell Culture) (Fig. 1c) に注目が集まっている。ALI は薬物膜透過実験で汎用される Transwell® (二層構造のウェル) を用いて樹立され、SUB では粘膜及び漿膜側の両方に培地を添加するものの、ALI では漿膜側のみに培地を添加し、粘膜側の細胞層が空気に接触した状態で培養を行う。これにより、細胞層の粘膜側へ粉末微粒子製剤等の直接添加が可能となるのみでなく、ALI で培養された細胞層は繊毛形成、粘液分泌作用の獲得など実際の肺内環境をより反映した評価モデルであると考えられる³⁷⁾。

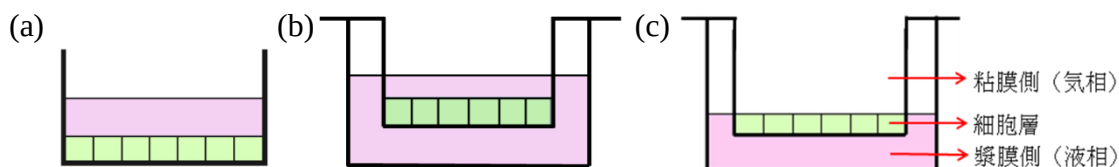


Fig.1 Schematic diagrams of SUB using a conventional-well plate (a), SUB using a Transwell® (b), and ALI (c).

しかし、粉末微粒子製剤の評価系としての ALI の応用に向けては、粉末微粒子製剤を細胞層に安定して分散添加する方法が必須であるものの、未だ確立されていない。その報告の多くはインパクターや真空ポンプなどの大がかりな機械を要するもの^{28,38-40)}であり、ウェルごとの曝露量がばらつく、ウェルごとに条件を変えて評価することが困難、一定量の微粒子を曝露するために大量の微粒子が必要、高気流量による細胞障害⁴¹⁾など様々な課題が残っているのが現状である。

また、これまでも ALI を応用した粉末微粒子製剤の薬物膜透過性^{28, 42)}や細胞障害性⁴³⁾が報告されているものの、詳細な検討は行われていない。

本論文は 3 章から構成されており、気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の評価系を構築し、それを用いて粉末微粒子製剤の薬物膜透過性及び細胞障害性を評価した。

第一章では粉末微粒子製剤を細胞層に簡便に直接かつ均一に分散添加可能な新規分散添加用デバイスを作製し、分散添加条件・気液界面細胞培養系の培養条件を最適化するとともに、市販の粉末微粒子分散添加用デバイスの Transwell® への粉末微粒子沈着効率と比較した。また、本評価系のエアロゾルへの適用を目指して、市販の液体噴霧器を改良して同様に Transwell® への沈着効率を評価することで、気液界面細胞培養系を応用した新規評価法を確立した。

第二章では第一章で構築した気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の評価系を用いて、細胞層への添加様式を変化させることにより、*in vitro* における粉末微粒子製剤の薬物吸収特性を評価した。その結果、粉末微粒子製剤は同組成溶液よりも高い薬物膜透過性を示したため、薬物の分子量の影響、膜透過実験時の温度の影響、試料溶液の溶媒量の影響、共焦点レーザー顕微鏡を用いた薬物膜透過経路の解明を行うことにより、粉末微粒子の吸収促進機構の解明を図った。

第三章では従来の培養細胞評価系及び気液界面細胞培養系における細胞障害

性評価を比較すると共に、感受性に影響を与える因子の検討を行った。また、第一章で構築した気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の評価系を用いて、各種賦形剤の粉末微粒子を気液界面培養細胞層へ曝露した際の細胞障害性について評価を行った。

なお、本論文は以下に示す既に公表された論文を総括したものである。

- i) A. Asai, T. Okuda, E. Sonoda, T. Yamauchi, S. Kato, H. Okamoto. Drug Permeation Characterization of Inhaled Dry Powder Formulations in Air-Liquid Interfaced Cell Layer using an improved, Simple Apparatus for Dispersion. *Pharm. Res.* (2016) 33:487-497.
- ii) A. Asai, T. Okuda, T. Yamauchi, Y. Sugiura, H. Okamoto. Safety Evaluation of Dry Powder Formulations by Direct Dispersion onto Air-Liquid Interface Cultured Cell Layer. *Biol. Pharm. Bull.* (2016) 39: in press.

II 第一章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の新規評価系の確立

II.1 緒言

粉末微粒子製剤の評価系としての ALI の応用に向けては、粉末微粒子製剤を細胞層に安定して分散添加する方法が必須であるものの、未だ確立されていない。また、その報告の多くはインパクターや真空ポンプなどの大がかりな機械を要するものである^{28,38-40)}。しかし、これらの報告の粉末微粒子製剤の細胞層への沈着効率は極めて低く、Hein らの報告の Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADD OCC) system では 0.5%²⁸⁾、Twin stage impinger (TSI) を用いた二つの Haghi らの報告及び Ong らの報告ではそれぞれ 2.6-4.3³⁸⁾、0.49-4.6³⁹⁾、1-2%⁴⁰⁾である。こうした低い沈着効率では大量の試料を要するため、生理活性ペプチドや機能性核酸など貴重な医薬品候補を試料として用いて検討するうえでは、改善が必要である。これに加えて、大掛かりな機械ではウェルごとの曝露量がばらつく、ウェルごとに条件を変えて評価することが困難、高気流量による細胞障害⁴¹⁾など様々な課題が残っているのが現状である。

そこで本章では粉末微粒子製剤を細胞層に簡便に直接かつ均一に分散添加可能な新規分散添加用デバイスを新たに作成し、分散添加条件・気液界面細胞培養系の培養条件を最適化するとともに、市販の粉末微粒子分散添加用デバイスを用いた際の Transwell®への粉末微粒子沈着効率と比較した。また、本評価系のエアロゾルへの適用を目指して、市販の液体噴霧器を改良して同様に Transwell®への沈着効率を評価することで、気液界面細胞培養系を応用した新規評価法を確立した。

II.2 実験方法

II.2.1 試料

粉末微粒子製剤のモデル薬物として蛍光物質である Fluorescein sodium salt (Fl-Na; 分子量 376, SIGMA-ALDRICH Co.)、賦形剤として D-(-)-Mannitol (Man; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、分散補助剤として L-Leucine (Leu; SIGMA-ALDRICH Co.)を用いた。定量実験の溶媒として Hanks' Balanced Salt solution (HBSS; SIGMA-ALDRICH Co.)を用いた。

細胞培養用試薬である Minimum Essential Medium Eagle (E-MEM)、Roswell Park Memorial Institute (RPMI)培地、ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum : FBS)、Penicillin-Streptomycin、Sodium pyruvate、L-Glutamine、継代培養で用いる Trypsin-EDTA にはいずれも SIGMA-ALDRICH Co.のものをを用いた。

気液界面細胞培養系には Transwell® (pore size: 0.4 μ m, 1.12 cm², Transwell® type 3460)を Corning Inc.から購入して用いた。

II.2.2 細胞培養

気液界面細胞培養系の培養細胞としてヒト由来気道上皮癌細胞である Calu-3 細胞を American Type Culture Collection より、ヒト肺上皮癌細胞である A549 細胞を CELL BANK (理化学研究所) より購入して用いた。

Calu-3 細胞の細胞培養液は E-MEM 培地、FBS (培地に対して 10%相当量)、Penicillin-Streptomycin (最終濃度 100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin)、Sodium pyruvate (100 mM, 5 mL)、L-Glutamine (200 mM, 5 mL)を用いて調製した。A549 細胞の細胞培養液は RPMI 培地、FBS (培地に対して 10%相当量)、Penicillin-Streptomycin (最終濃度 100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin)を用いて調製した。

細胞はインキュベータ (37°C、相対湿度：90%、CO₂ 濃度：5%) 内のセルカルチャーディッシュ (Falcon, 151.9 cm²) 上で培養した。Calu-3 細胞の培地は一週間に二回交換し、細胞は Trypsin-EDTA を用いて一週間に一回継代した。A549 細胞は Trypsin-EDTA を用いて一週間に二回継代した。

Calu-3 細胞は 5×10⁵ cells/well、A549 細胞は 2×10⁵ cells/well で Transwell®の粘膜側に播種し、粘膜側に 0.5 mL、漿膜側に 1.5 mL の培地を添加して 2 日間培養した。2 日後に粘膜側の培地を取り除き、2 日毎に漿膜側の培地を交換することで気液界面培養した。

II.2.3 粉末微粒子製剤の調製

粉末微粒子製剤は噴霧急速凍結乾燥 (Spray-Freeze-Drying) 法により調製した (Fig. 2 及び Table 1)。粉末微粒子製剤を調製するための試料溶液溶質は Fl-Na: Leu: Man=2: 5: 93 の質量比とし、全溶質量を 50 mg、試料溶液量を 2.5 mL とした。試料溶液を 5 mL/min で送液し、2 流体スプレーノズル (inner diameter: 0.4 mm, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)から 15 cm 下の液体窒素 (500 mL)中に、150 kPa で 30 sec 噴霧することで液滴を瞬時に凍結させた。得られた氷滴を凍結乾燥機 (FDU-2100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)を接続した角形ドライチャンバー (DRC-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)中で 24 時間昇華・乾燥することで目的の製剤を得た。

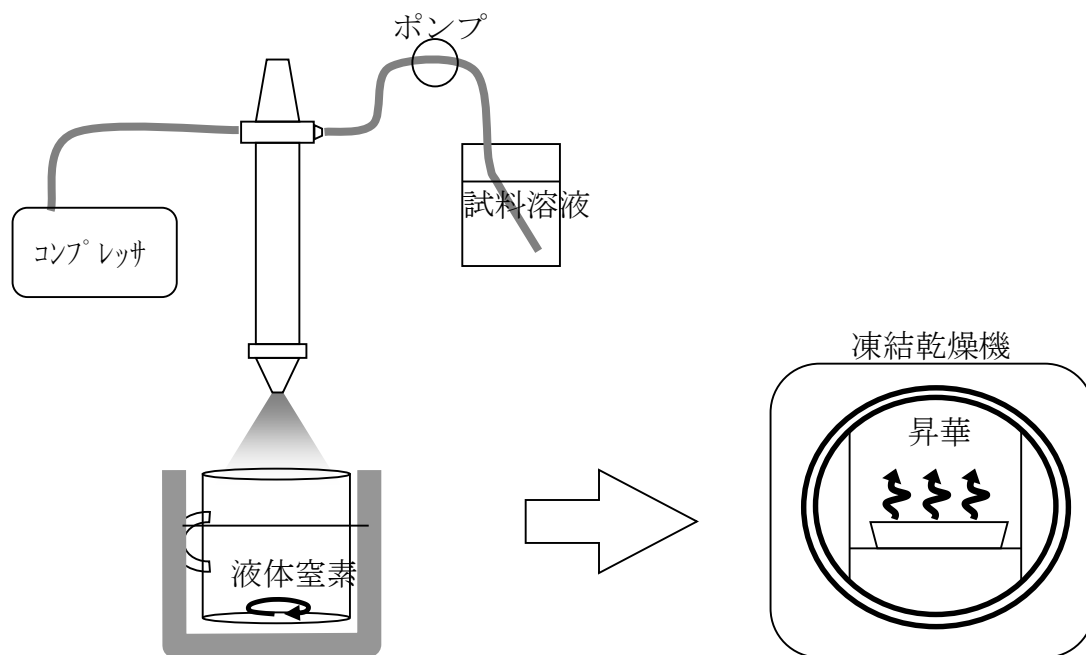


Fig. 2 Schematic diagram of SFD.

Table 1 Operating conditions of SFD apparatus

噴霧圧	150 kPa
試料溶液送液速度	5 mL/min
2 流体噴霧ノズル径	0.4 mm
乾燥時間	24 hr
最終真空度	≤ 2.0 Pa
最終棚温度	10°C

II.2.4 粉末微粒子製剤の粒子形状評価

三方活栓、1 mL シリンジ (TERUMO)および 100 μ L 用ディスポーザブルチップを組み合わせた粉末微粒子添加用デバイス (Fig. 3)の 100 μ L 用ディスポーザブルチップに調製した微粒子をマイクロスパーテルで少量充填し、圧縮した 0.2 mL の空気を三方活栓の操作により瞬時に開放し、試料台の上に分散添加した。その後、30 mA、90 sec プラチナコーティング処理 (JFC-1600, JEOL DATUM Solution Business Operations)を行い、粒子形状を走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-6060, JEOL DATUM Solution Business Operations)を用いて観察した。

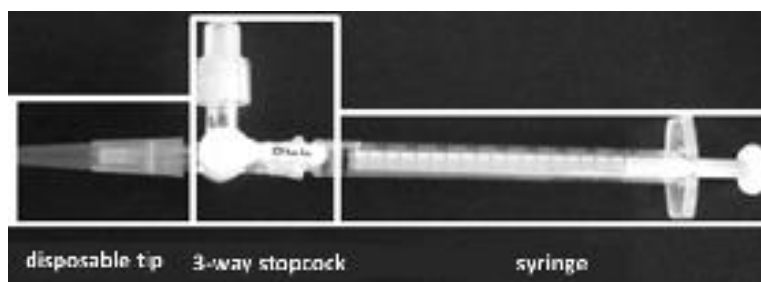


Fig. 3 The apparatus for dispersing the powders.

II.2.5 新規粉末微粒子添加用デバイスの作成

従来の粉末微粒子添加用デバイスに底部に穴を開けた 1.5 mL マイクロチューブ (inner diameter: 0.92 cm, height: 3.87 cm, NIPPON Genetics Co, Ltd.)を連結させた新規粉末微粒子添加用デバイスを新たに作成した (Fig. 4)。

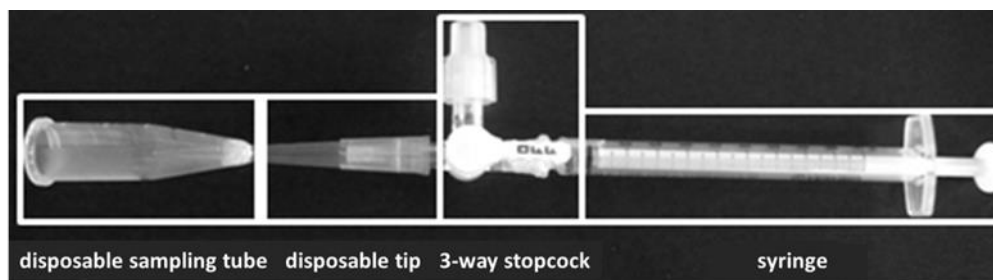


Fig. 4 The improved apparatus for dispersing the powders.

II.2.6 Transwell®への分散添加方法の最適化

II.2.6.1 新規粉末微粒子添加用デバイスの充填量の検討

細胞を播種していない Transwell®の粘膜側のウェル内に、予め HBSS 150 μ L を均一になるように敷いた。

新規粉末微粒子添加用デバイスに充填する粉末微粒子の量を 0.5 mg、1.0 mg、1.5 mg で変化させ、圧縮空気量 0.35 mL で 2 cm の高さから Transwell®の粘膜側内に分散添加した。添加直後のそれぞれの粘膜側の溶液を回収するとともに、新規粉末微粒子添加用デバイスのディスポーザブルチューブ、ディスポーザブルチップを HBSS で洗いこみを行った。蛍光分光光度計 (Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Devices Co.)で各試料中の Fl-Na 由来の蛍光を定量 (Ex; 490 nm, Em; 515 nm)し、充填量に対する各コンパートメント (Well:

Transwell®の粘膜側、Tube: 新規粉末微粒子添加用デバイスのディスポーザブルチューブ、Tip: 新規粉末微粒子添加用デバイスのディスポーザブルチップ)への沈着効率を算出し、充填量の最適化を図った。

II.2.6.2 新規粉末微粒子添加用デバイスの圧縮空気量の検討

新規粉末微粒子添加用デバイスに充填する粉末微粒子の量を 0.5 mg とし、圧縮空気量を 0.1, 0.2, 0.3 mL で Transwell®上の 2 cm の高さから分散添加し、II.2.6.1 と同様に沈着効率を算出し、圧縮空気量の最適化を図った。

II.2.6.3 市販の粉末微粒子添加用デバイスの沈着効率評価

Dry Powder Insufflator™ (Model DP-4, PENNCENTURY Co.)に底部に穴を開けた 1.5 mL マイクロチューブを連結させ、充填する粉末微粒子の量を 0.5, 1.0, 1.5 mg で変化させ、圧縮空気量を 0.2 mL で Transwell®上の 2 cm の高さから分散添加し、II.2.6.1 と同様に沈着効率を算出した。

II.2.6.4 市販の液体噴霧器の沈着効率評価

MicroSprayer® (Model IA-1C, PENNCENTURY Co.)に底部に穴を開けた 1.5 mL マイクロチューブを連結させ、25 µL の試料溶液を Transwell®上の 2 cm の高さから噴霧し、II.2.6.1 と同様に沈着効率を算出した。

II.2.7 気液界面細胞培養系の培養条件の最適化

Calu-3 細胞の気液界面培養時の漿膜側の培地を 0.75, 1.0, 1.5 mL と変化させ、細胞増殖の指標として、それぞれ経日的に膜抵抗値 (TEER; Transepithelial electrical resistance)を測定して、気液界面細胞培養系の培養条件の最適化を図った。TEER 測定の際には、粘膜側に培地 500 µL を添加し、30 min 後に Millicell®-ERS (MILLIPORE Co.) で測定を行った。

また、上記で最適化した条件を基に ALI で培養した Calu-3 細胞層、SUB で培養した Calu-3 細胞層、ALI で培養した A549 細胞層の TEER を測定することにより、細胞層の堅固性の比較及び実験に用いる期間の検討を行った。

さらに、粘液の存在を確認するために、実際に用いる期間 ALI で培養した Calu-3 細胞層及び SUB で培養した Calu-3 細胞層に 10 倍希釈した Alcianblue 8GX®溶液 (SIGMA-ALDRICH Co.)を添加し、3 回 HBSS で洗浄して倒立顕微鏡 (ECLIPSE TS100-F, Nikon Co.)で観察を行った。

II.2.8 薬物膜透過実験

粉末微粒子製剤の薬物膜透過性は、新規粉末微粒子分散添加デバイスを用い

て充填量を 0.5 mg、圧縮空気量を 0.1, 0.2, 0.3 mL で気液界面培養された Calu-3 細胞層上に分散添加を行い、経時的に漿膜側から 100 μ L をサンプリングしたものを薬物膜透過量として定量し、新たに漿膜側に HBSS 100 μ L を補充した。モデル薬物の薬物膜透過量は蛍光分光光度計(Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Devices Co.)を用いてモデル薬物由来の蛍光を検出(Ex; 490 nm, Em; 515 nm)し、定量した。

II.2.9 統計解析

一元配置分散分析法 (ANOVA) により $p < 0.05$ で有意差ありとなったものについて、最小有意差法により各平均値間の有意差の検定を行い、 p 値が 0.05 未満のとき有意差ありとした。

II.3 結果

II.3.1 粉末微粒子製剤の粒子形状評価

調製された微粒子は中空多孔な球状構造をしており、直径は 10 μ m 前後であった (Fig. 5)。

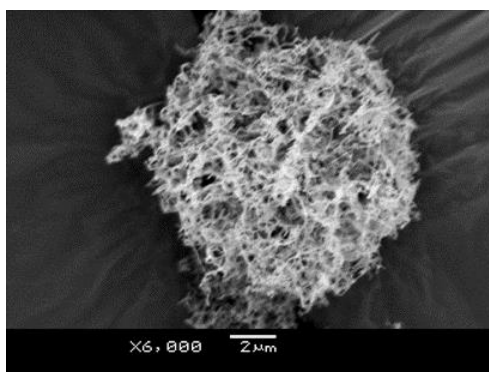


Fig. 5 Scanning electron micrograph of prepared FI-Na dry powder.

II.3.2 Transwell®への分散添加方法の最適化

新規粉末微粒子添加用デバイスを用いて粉末微粒子の充填量を 0.5-1.5 mg で変化させたところ、充填量依存的に粉末微粒子の沈着量は増加した (0.5 mg: 0.21 ± 0.06 mg, 1.0 mg: 0.39 ± 0.12 mg, 1.5 mg: 0.5 ± 0.24 mg)が、沈着効率は低下した (0.5 mg: $41 \pm 11\%$, 1.0 mg: $39 \pm 12\%$, 1.5 mg: $33 \pm 16\%$) (mean $\pm$ S.D., $n=4$) (Fig. 6a)。一方、沈着効率に対する圧縮空気量の影響はほとんどなかった (Fig. 6b)。

市販の粉末微粒子添加用デバイスである Dry Powder Insufflator™を用いて、粉

末微粒子の充填量を 0.5-1.5 mg で変化させたところ、新規粉末微粒子添加用デバイスと同様に充填量の増加に伴って沈着効率は低下した (0.5 mg: $11 \pm 8\%$, 1.0 mg: $8 \pm 10\%$, 1.5 mg: $4 \pm 6\%$) (mean $\pm$ S.D., n=3)。

市販の液体噴霧器である MicroSprayer[®]を用いて、25 μ L の試料溶液を噴霧したところ、沈着効率は $59.2 \pm 1.6\%$ (mean $\pm$ S.D., n=3)であった。

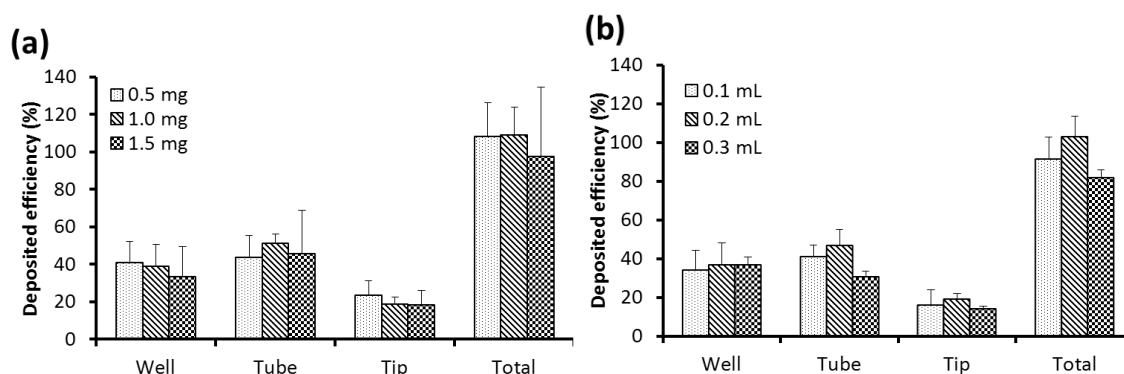


Fig. 6 Optimization for dispersing the powders onto the cell layer: effect of (a) loading dose and (b) compressed air volume. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).

II.3.3 気液界面細胞培養系の培養条件の最適化

気液界面細胞培養系の漿膜側の培地の量を 0.75, 1.0, 1.5 mL で変化させたところ、漿膜側の培地量の増加に伴い、TEER は低下したものの、いずれも播種後 10 日目以降に TEER が $300-400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ で安定した (Fig. 7)。

また、細胞種/培養法を変化させたところ、ALI で培養された Calu-3 細胞層は播種後 10 日目以降に TEER が約 $300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ で安定したものの、SUB で培養された Calu-3 細胞層は播種後 8-14 日目の間で TEER が $700-800 \Omega \cdot \text{cm}^2$ で安定し、ALI で培養された A549 細胞層は播種後 2 日目以降で TEER が $40-50 \Omega \cdot \text{cm}^2$ で安定した (Fig. 8)。

さらに、Alcianblue 8GX[®]溶液によって、Calu-3 細胞層の粘液の有無を評価したところ、SUB は染色されなかったのに対して、ALI は粘液分泌を表す青色に染色された (Fig. 9)。

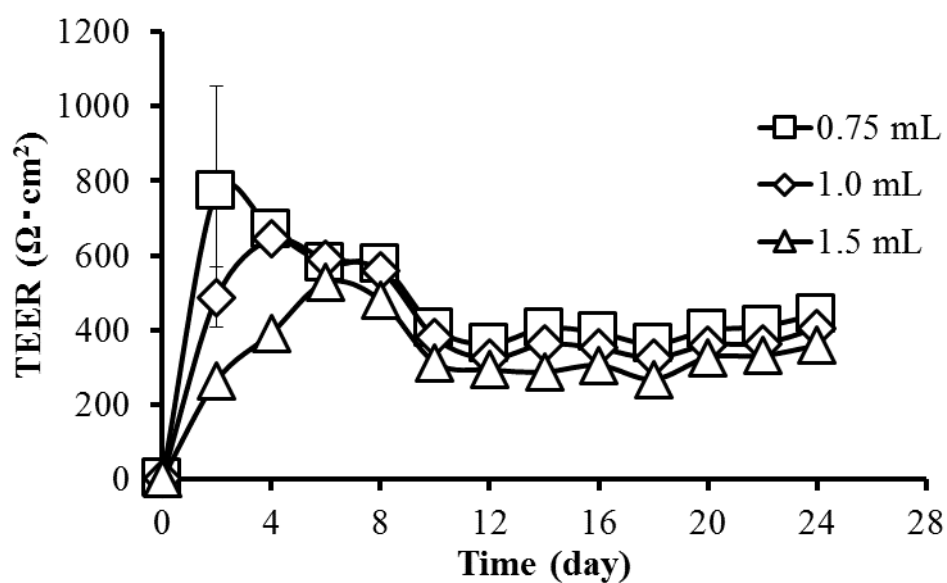


Fig. 7 Change of TEER with changing the volume of medium in basolateral chamber in ALI. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4).

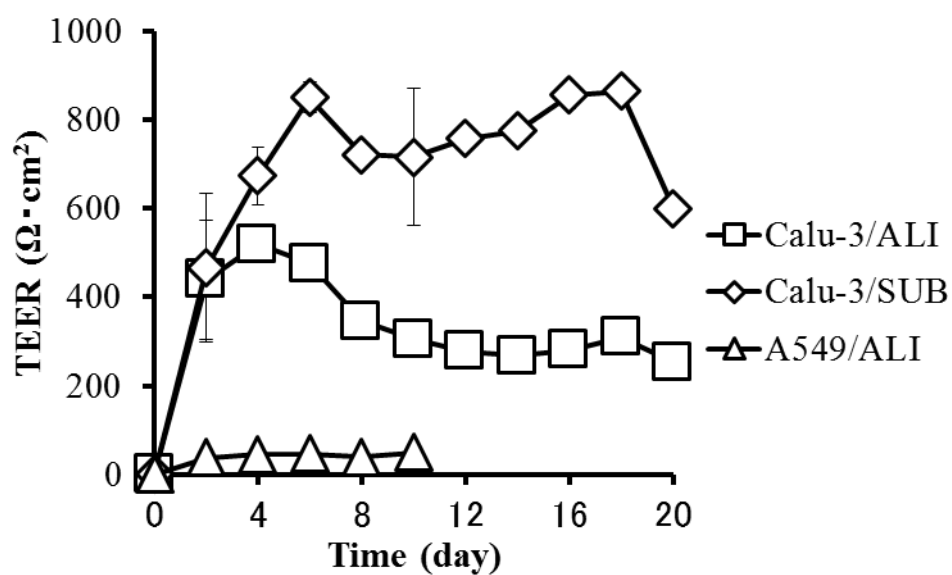


Fig. 8 Change of TEER of Calu-3 cell layer cultured in ALI or SUB and A549 cell layer cultured in ALI. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

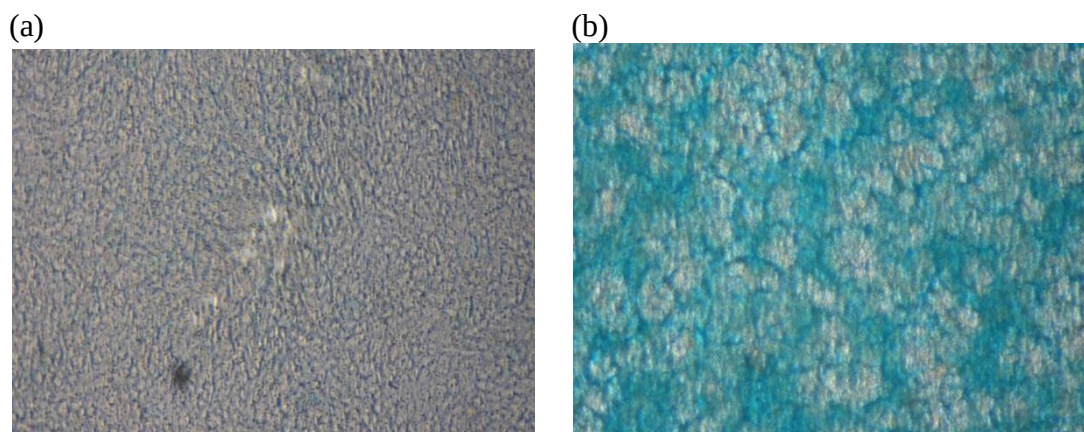


Fig. 9 Images of cell layer surface cultured in SUB (a) and ALI (b) after mucus staining.

II.3.4 薬物膜透過実験

圧縮空気量を変化 (0.1, 0.2, 0.3 mL) させて粉末微粒子製剤の薬物膜透過性を評価したところ、薬物膜透過量に有意差はなく、圧縮空気量は薬物膜透過性に大きな影響を与えなかった (Fig. 10)。

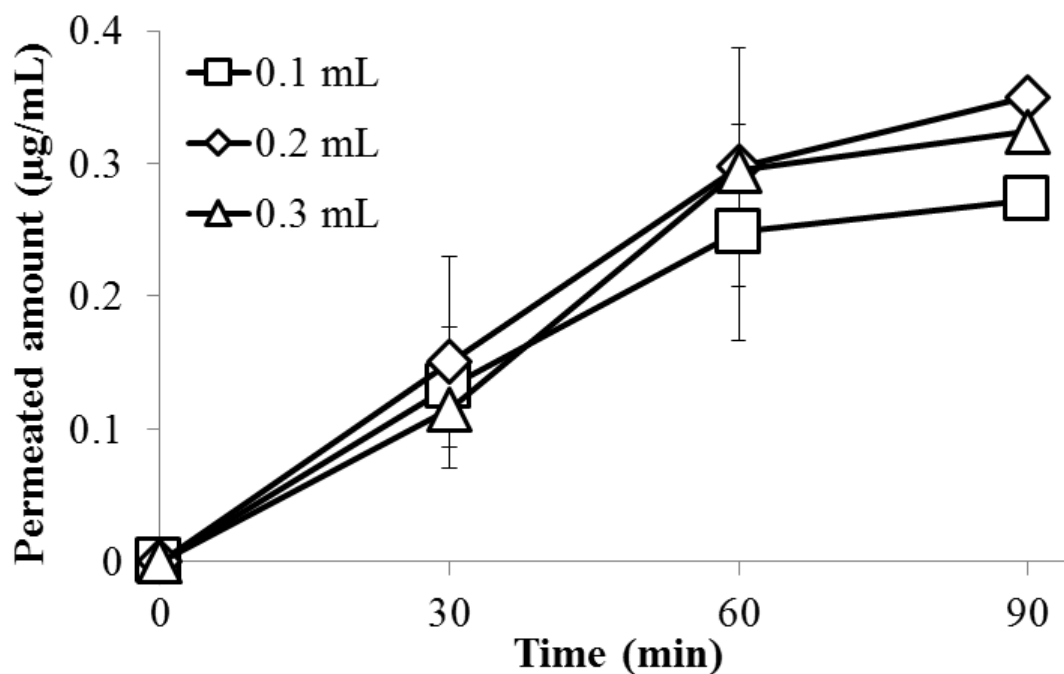


Fig. 10 Drug permeation study of dry powder formulation with various compressed air volumes. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

II.4 考察

本章において、粉末微粒子製剤は SFD 法によって調製した。SFD 法は簡便に多孔質な粉末微粒子を高収率で回収可能であり、タンパク質などの熱に不安定な物質に対しても安定性を保持可能な手法である^{44,45)}。さらに、SFD 法によって調製された多孔質な粉末微粒子は粒子密度が減少し、低比重であることから、幾何学的粒子径が比較的大きくても、吸入に適した MMAD を示す⁴⁴⁾。本章において調製された粉末微粒子製剤は SFD 特有の多孔質な球形構造であったため、吸入に適した粉末微粒子製剤であると推察される。

気液界面培養された細胞層上に粉末微粒子を添加するために用いられる Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADD OCC) system 及び Twin stage impinger (TSI) は極めて沈着効率が低い (<5%) ことが報告されている^{28,38-40)}。また、これらの装置は無菌操作に用いることが困難であるため、粉末微粒子の細胞障害性評価に用いることができないことが問題視されている⁴²⁾。マイクロスパーテルなどを用いた細胞層への粉末微粒子の沈着は比較的簡便な方法であるが、細胞層上で粉末微粒子が堆積し、呼吸器上皮表面で実際に生じる環境を反映していないため、評価系として適していないと考えられる。本研究で用いた新規粉末微粒子分散添加デバイスでの沈着効率は、充填量の増加に伴い低下したが、圧縮空気量の影響はあまり受けなかった。しかし、高い圧縮空気量は細胞のバイアビリティに影響を与えることが懸念されるため、最適な分散添加条件は充填量を 0.5 mg、圧縮空気量を 0.2 mL とした。充填量と圧縮空気量を最適化することにより、細胞層表面に再現性良く充填量の約 40% を分散させることが可能となった。また、本研究で用いた新規粉末微粒子分散添加デバイスの圧縮空気 (0.1-0.3 mL) による衝撃は粉末微粒子の薬物膜透過性に影響を与えなかった。さらに、小型であることからエタノール消毒や紫外線照射を介したクリーンベンチ内での無菌操作にも適しており、細胞障害性評価への応用も期待できると考えられる。よって、本研究で考案した新規粉末微粒子分散添加デバイスは、粉末微粒子を細胞層に分散添加するためのツールとして有用であると考えられる。

本章では粉末微粒子の評価系の確立を目的として気液界面培養された Calu-3 及び A549 細胞について培養条件を最適化するとともに特徴づけを行った。Calu-3、16HBE14o-、A549 細胞は経肺吸収の呼吸器上皮モデルとして使用されてきた⁴⁶⁻⁴⁸⁾。Calu-3 及び 16HBE14o-細胞は適切な呼吸器上皮細胞様の表現型を示し、培養によって適切なバリア特性を得るものの、A549 細胞はバリア能が極めて低いことが知られている^{49,50)}。また、Calu-3 細胞を用いた従来の培養系 (SUB) と比較して、Calu-3 細胞を気液界面培養することで呼吸器内環境を反映する繊毛形成の促進、粘液分泌などの魅力的な特徴を獲得することが報告されて

いるだけでなく^{37,51)}、*in vitro-in vivo* 相関性研究より、吸入された医薬品候補物質の吸収を予測するために有用であることが報告されている^{46,52)}。上記の理由より、気液界面培養された Calu-3 細胞モデルは、上皮細胞層の表面に直接送達されたエアロゾルからの薬物透過性評価に主に使用されてきた^{39,42)}。さらに、ウサギの気道上皮細胞の TEER は $260 - 300 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であることが報告されている。本研究で気液界面培養された Calu-3 細胞層の TEER は $300 - 400 \Omega \cdot \text{cm}^2$ であり、粘液分泌を確認できたことから、本研究で用いた気液界面培養された Calu-3 細胞層は *in vivo* 環境を反映するモデルとして適していると考えられる。一方、A549 細胞は吸入された物質の毒性を評価するための上皮モデルとして汎用されている⁵³⁾。よって、本研究では粉末微粒子の薬物吸収特性評価には気液界面培養された Calu-3 細胞層、細胞障害性評価には気液界面培養された A549 細胞層を用い、気液界面培養の漿膜側の培地量には最も TEER が安定していた 1.0 mL を用い、それぞれ TEER の安定している播種後 12-19 日、4-11 日に実験に用いることとした。

II.5 結論

本章では粉末微粒子製剤を細胞層に簡便に直接かつ均一に分散添加可能な新規分散添加用デバイスを新たに作製し、粉末微粒子の充填量と圧縮空気量を最適化した。最適化された条件（充填量：0.5 mg、圧縮空気量：0.2 mL）では充填量の約 40% を細胞層表面に沈着させることが可能となり、従来の大掛かりな装置（<5%）や市販の粉末微粒子分散添加デバイス（<11%）と比較して高い沈着効率を示した。また、新規粉末微粒子分散添加用デバイスを用いた粉末微粒子の分散添加は細胞層のバリア能に大きな影響を与えなかったことから、粉末微粒子を細胞層表面に分散添加するための有用なツールであることが示された。さらに、気液界面細胞培養系の培養条件（漿膜側の培地量、実験に使用するまでの培養期間）を最適化することで安定した気液界面培養細胞層が得られた。新規粉末微粒子分散添加デバイスの分散添加条件と気液界面細胞培養系の培養条件を最適化することにより、気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の新規評価法を確立した。この評価法を応用することにより、従来の *in vivo*、*in vitro* の評価系よりもより厳密で実作用環境を反映した粉末微粒子製剤の生物学的作用評価が可能となり、今後の吸入剤開発に対する有益な情報を提供することが可能となると考えられる。

III 第二章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の吸収特性評価

III.1 緒言

これまでに小動物を用いた *in vivo* 実験において粉末微粒子製剤の良好な薬物吸収性及び薬理効果が報告されているものの^{4,54}、小動物への粉末微粒子製剤の経肺投与は手技が煩雑であり、投与量を厳密にコントロールすることや実際に投与された量を把握することが困難なため、実験結果が不明瞭となるケースも少なくない^{34,35}。また、肺上皮細胞層からの薬物膜透過性評価や粘膜障害性など局所的な生物学的作用を評価することは難しく、詳細な作用解析についてはより簡便な培養細胞を用いた評価系の応用が好ましい³⁶。

これまでも肺内環境を反映した細胞培養系である気液界面細胞培養系 (ALI; Air-liquid interfaced cell culture) を応用し、薬物を粉末微粒子製剤化することで膜透過性が改善されることが複数報告されているものの^{28,42}、メカニズムなどの詳細は未だ不明なままである。

そこで本章では Fluorescein sodium salt 及び Fluorescein isothiocyanate-dextran (分子量約 4 及び 11 kDa) をモデル薬物とする粉末微粒子製剤を SFD 法により調製し、同組成溶液と薬物膜透過性を比較すると共に、試料の添加様式、透過実験時の温度、溶液の溶媒量の影響の解析、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行うことにより、粉末微粒子製剤からの薬物吸収特性を評価した。

III.2 実験方法

III.2.1 試料

粉末微粒子製剤のモデル薬物として蛍光物質である Fluorescein sodium salt (Fl-Na; 分子量 376, SIGMA-ALDRICH Co.)、Fluorescein isothiocyanate-dextran (FD-4; 分子量 4,400 及び FD-10; 分子量 11,000, SIGMA-ALDRICH Co.)、賦形剤として D-(-)-Mannitol (Man; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)、分散補助剤として L-Leucine (Leu; SIGMA-ALDRICH Co.) を用いた。定量実験の溶媒として Hanks' Balanced Salt solution (HBSS; SIGMA-ALDRICH Co.) を用いた。吸収促進剤として Sodium caprate (C10; SIGMA-ALDRICH Co.) を用いた。

細胞培養用試薬として、Minimum Essential Medium Eagle (E-MEM)、ウシ胎児血清 (FBS; Fetal Bovine Serum)、Penicillin-Streptomycin、Sodium pyruvate、L-Glutamine を用い、さらに継代培養で用いる Trypsin-EDTA はいずれも SIGMA-ALDRICH Co. のものを用いた。

気液界面細胞培養系には Transwell® (pore size: 0.4 μm , 1.12 cm^2 , Transwell® type 3460) を Corning Inc. から購入して用いた。

III.2.2 細胞培養

気液界面細胞培養系の培養細胞としてヒト由来気道上皮癌細胞である Calu-3 細胞を American Type Culture Collection より購入して用いた。

培養方法は II.2.2 と同様に行い、気液界面培養の漿膜側の培地量及び実験に使用するまでの培養期間は前章で確立した 1.0 mL 及び播種後 12-19 日とした。

III.2.3 粉末微粒子製剤の調製

粉末微粒子製剤の調製は II.2.3 と同様の方法で行った。各モデル薬物を含有する粉末微粒子製剤の組成は Table 2 に示した。FD-4 及び FD-10 は定量性を確保するために含量を増加させた。

Table 2 Each Powder's Composition

Function	Fl-Na Model drug (fluorescent substance)	FD-4	FD-10	Leu Dispersion enhancer	Man Excipient
Fl-Na powder	2%			5%	93%
FD-4 powder		25%		5%	70%
FD-10 powder			50%	5%	45%

III.2.4 粉末微粒子製剤の粒子形状評価

II.2.4 と同様の方法で行った。

III.2.5 Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価

新規粉末微粒子分散添加デバイスを用いて前章で確立された分散添加条件（充填量：0.5 mg、圧縮空気量：0.2 mL）で分散添加を行い、II.2.6 と同様の方法で各粉末微粒子の沈着効率を評価した。

III.2.6 薬物膜透過実験

III.2.6.1 薬物膜透過性/細胞内移行性評価

粉末微粒子製剤の薬物膜透過性は気液界面培養された Calu-3 細胞を用いて、様々な条件 (a: 試料の添加様式、b: モデル薬物の分子量、c: 透過実験時の温度、d: 試料溶液の溶媒量) を変化させることで評価した。

試料の添加様式の影響を評価するために、細胞層上に添加する Fl-Na 量を統

一して 5 つの添加様式 (“Solution”, “Powder”, “Powder + HBSS”, “Aerosol”, 及び “Solution + C10”)を検討した。“Solution”はⅢ.2.5 で確認した細胞層へ添加される量の Fl-Na 粉末微粒子を HBSS 150 μ L に溶解した試料溶液をマイクロディスペンサーを用いて細胞層上に滴下した。“Powder”は Fl-Na 粉末微粒子を新規粉末微粒子分散添加デバイスを用いて細胞層上へ分散添加した。“Powder + HBSS”は新規粉末微粒子分散添加デバイスを用いて分散添加した Fl-Na 粉末微粒子を細胞層上で HBSS 150 μ L で溶解した。“Aerosol”はⅢ.2.5 で確認した細胞層へ添加される量の Fl-Na 粉末微粒子を HBSS 15 μ L (前章Ⅱ.3.3 で確認した噴霧量 25 μ L の 60%)に溶解した試料溶液を MicroSprayer[®] (Model IA-1C, PENNCENTURY Co.)を用いて細胞層上に噴霧した。“Solution + C10”は“Solution”の試料溶液に吸収促進剤である C10 を 10 mM 含有させてマイクロディスペンサーを用いて細胞層上に滴下した。

モデル薬物の分子量の影響を評価するために、Fl-Na の代わりに FD-4 又は FD-10 を含有する製剤を調製し、“Solution”、“Powder”、“Powder + HBSS”の条件で細胞層上に添加した。

能動輸送の寄与を評価するために、Fl-Na 又は FD-10 の粉末微粒子及び溶液について通常の状態である 37°C と能動輸送が抑制される状態である 4°C において薬物膜透過性及び細胞内薬物量を比較した。

濃度依存性を確認するために、Fl-Na 又は FD-10 粉末微粒子を溶解した試料溶液において、薬物量を固定して溶媒量を変化させて細胞層上へ添加した。

薬物膜透過実験においては、試料添加後に経時的に漿膜側から 100 μ L をサンプリングしたものを薬物膜透過量として定量し、新たに漿膜側に HBSS 100 μ L を補充した。実験終了後に細胞層表面を洗浄した後、Lysis Buffer を用いて細胞層を破壊した。破壊した細胞層を 3 分間ずつ液体窒素と 37°C の恒温槽に交互に 3 回ずつ浸し、4°C、13,000 g で 7 分間遠心分離し、上清中に回収された薬物量を細胞内薬物量として定量した。各モデル薬物の薬物膜透過量及び細胞内薬物量は蛍光分光光度計(Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Devices Co.)を用いてモデル薬物由来の蛍光を検出(Ex; 490 nm, Em; 515 nm)し、定量した。

Ⅲ.2.6.2 膜抵抗値 (TEER)の測定

試料添加の細胞間隙への影響を評価するために、試料添加前後に TEER を測定した。TEER 測定の前に、漿膜側の培地を HBSS に置き換え、粘膜側に HBSS を添加し、37°C で 30 分間インキュベートした。TEER は Millicell[®]-ERS (MILLIPORE Co.)を用いて測定を行った。

Ⅲ.2.6.3 タンパク質の定量

細胞障害性の指標⁵⁵⁾として、薬物膜透過実験終了後に細胞層表面に存在する溶液及び細胞表面洗浄液中のタンパク質を Bradford 法により定量した。また、細胞内薬物量の評価の際に細胞層のタンパク質量で補正するために、III.2.6.1 の細胞層を破壊・遠心分離後の上清中のタンパク質量を Bradford 法により定量した。

III.2.7 薬物透過経路の可視化

モデル薬物の薬物透過経路を評価するために、タイトジャンクション関連タンパク質の zonula occludens-1 (ZO-1)を免疫染色し、モデル薬物との共局在性を評価した。Fl-Na 又は FD-10 の粉末微粒子及び溶液添加 30 分後に、細胞層を 4% paraformaldehyde で固定した。標識前に、抗体の透過性を亢進させるために 0.1% triton-X、抗体の非特異的結合を妨げるために 1.5% bovine serum albumin で処理した。細胞層を ZO-1, Mouse Monoclonal Antibody Alexa Fluor[®] 594 で 60 分間処理することにより、ZO-1 を標識した。その後、粘膜側から細胞層を半透膜ごと切り離し、スライドガラスに乗せ、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510, Carl Zeiss Co., Ltd.)を用いて観察を行った。各モデル薬物由来の蛍光画像と細胞層の ZO-1 に相当する蛍光画像を重ね合わせて薬物の透過経路を評価し、細胞内及び細胞間隙における薬物由来の蛍光強度を比較した。

III.2.8 統計解析

一元配置分散分析法 (ANOVA) により $p < 0.05$ で有意差ありとなったものについて、最小有意差法により各平均値間の有意差の検定を行い、 p 値が 0.05 未満のとき有意差ありとした。

III.3 結果

III.3.1 粉末微粒子製剤の粒子形状評価

FD-4 及び FD-10 粉末微粒子は前章で報告した Fl-Na 粉末微粒子と同様に中空多孔な球状粒子であった (Fig. 11)。一方、粒子径は Fl-Na、FD-4、FD-10 の順に小さくなる傾向が認められた。

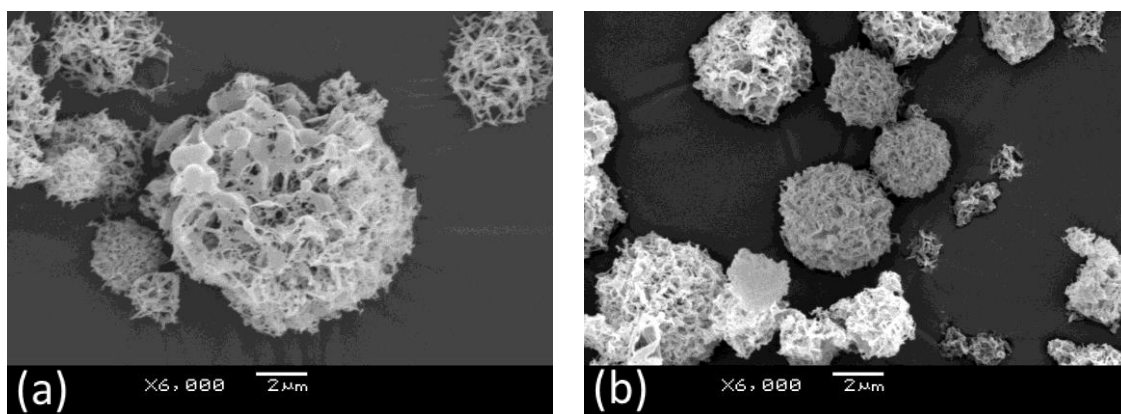


Fig. 11 Scanning electron micrographs of prepared dry powder: (a) FD-4 powder and (b) FD-10 powder.

III.3.2 Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価

Fl-Na、FD-4 及び FD-10 粉末微粒子の Transwell®への沈着効率を評価したところ、各粉末微粒子の Transwell®への沈着効率に有意な差はなかった (Fig. 12)。

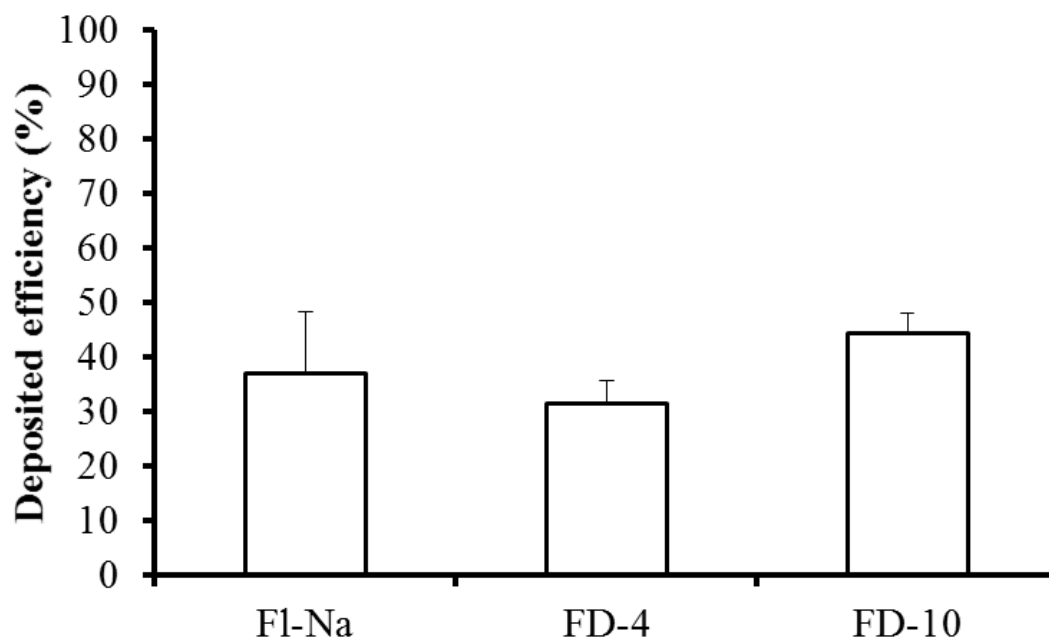


Fig. 12 Deposited efficiency of each dry powder in apical chamber of Transwell®. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

III.3.3 薬物膜透過実験

III.3.3.1 試料の添加様式の影響

気液界面培養された Calu-3 細胞層に試料の添加様式を変化させて添加した際の薬物膜透過実験において、“Solution”、“Powder”、“Powder + HBSS”、“Aerosol”、“Solution + C10”のそれぞれの試料添加 90 分後の薬物膜透過量は 0.12 ± 0.01 、 0.67 ± 0.11 、 0.23 ± 0.04 、 0.42 ± 0.08 、 0.48 ± 0.05 $\mu\text{g}/\text{well}$ であり、粉末微粒子製剤は同組成溶液よりも 5.6 倍高い薬物膜透過性を示した (Fig. 13a)。一方、細胞層上に添加した粉末微粒子製剤に溶媒を加えて速やかに溶解した“Powder + HBSS”の薬物膜透過性は“Powder”よりも低かった。“Solution + C10”においても粉末微粒子製剤と同様に“Solution”よりも薬物膜透過性が亢進したものの、その透過性亢進挙動は粉末微粒子製剤と異なった。“Powder”では添加後即座に薬物膜透過量が増加し、その後の薬物膜透過量の増加は緩徐だった。しかし、“Solution + C10”では試料添加 30 分後まで薬物膜透過量の増加は緩徐であり、その後増加した。さらに、“Solution + C10”はタイトジャンクション開口を示す TEER の減少、細胞障害性を示すタンパク質漏出の増加を引き起こしたものの、他の条件では影響はなかった (Fig. 13b, c)。“Powder”はタイトジャンクション開口や細胞障害性を示すことなく、“Solution + C10”と同程度以上の高い薬物透過性を示した。さらに、“Aerosol”は“Solution”よりも高い薬物膜透過性を示し、“Aerosol”の低溶媒量による高濃度条件が起因したと考えられる。

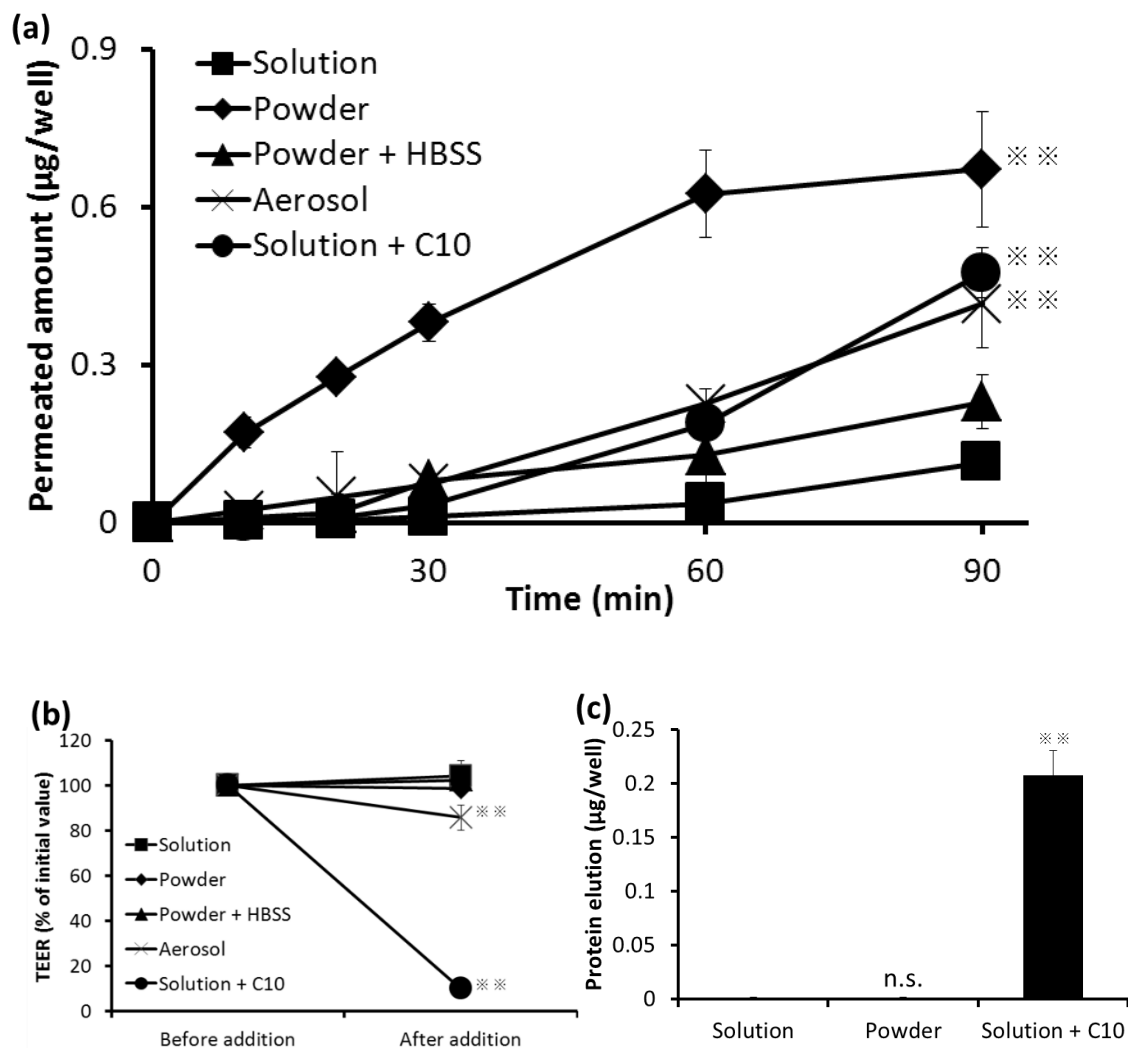


Fig. 13 Permeation study with different applied forms: (a) change of cumulative permeated amount of Fl-Na after sample addition, (b) TEER change before and after sample addition, and (c) protein elution amount at 90 min after sample addition. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). **: $p < 0.01$, compared with Solution.

III.3.3.2 モデル薬物の分子量の影響

異なる分子量のモデル薬物を含有する粉末微粒子製剤を用いて、粉末微粒子製剤からの薬物膜透過性に対するモデル薬物の分子量の影響を検討したところ、FD-4 及び FD-10 粉末微粒子は TEER に影響を与えることなく、同組成の溶液よりもそれぞれ 6.0、4.7 倍高い薬物膜透過性を示した (Fig. 14)。

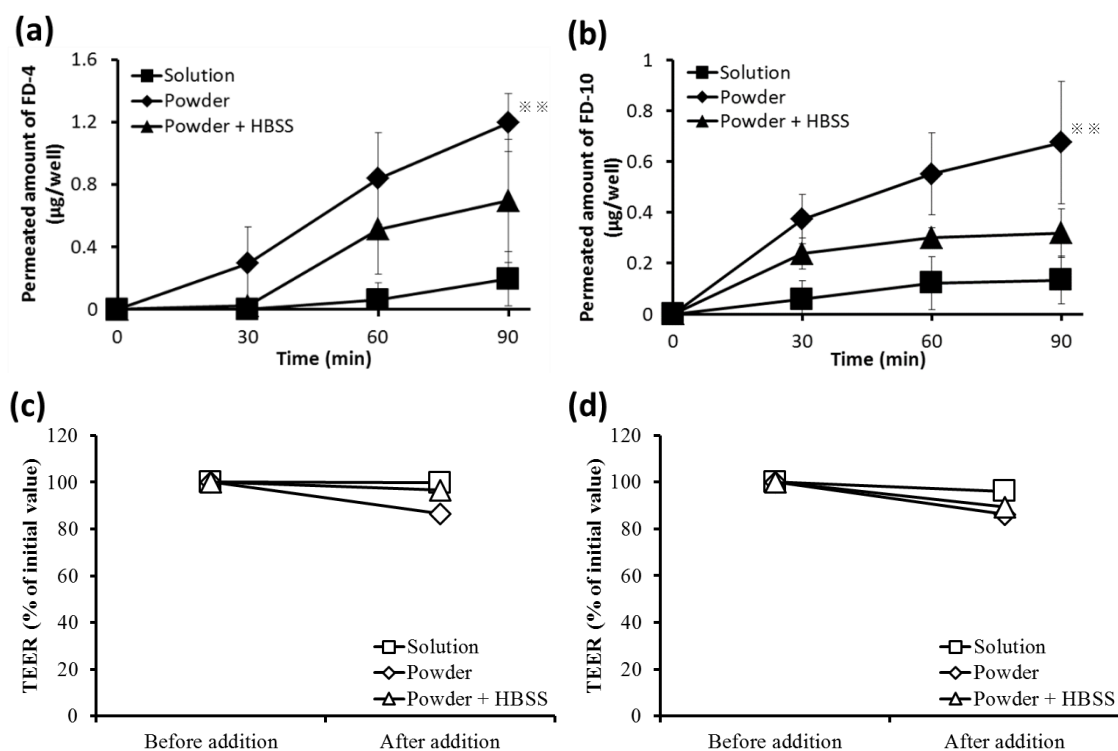


Fig. 14 Permeation study with various molecular weights of model drugs: change of cumulative permeated amount of (a) FD-4 and (b) FD-10, and change of TEER by (c) FD-4 and (d) FD-10 sample addition. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). **: $p<0.01$, compared with Solution.

III.3.3.3 透過実験時の温度の影響

薬物膜透過実験時の温度を変化 (37, 4°C)させたところ、いずれの温度においても Fl-Na 及び FD-10 粉末微粒子製剤は同組成溶液よりも高い薬物膜透過性を示した(Fig. 15a, b)。また、Fl-Na 粉末微粒子においては 37°C よりも 4°C の方が薬物膜透過性は低下したものの、FD-10 粉末微粒子においては 37°C よりも 4°C の方が薬物膜透過性は向上し、温度による一貫した薬物膜透過性への影響は観察できなかった。さらに、細胞内薬物量を測定したところ、Fl-Na 及び FD-10 粉末微粒子製剤は同組成溶液よりも高い細胞内薬物量を示したものの、透過実験時の温度の影響を受けなかった (Fig. 15c, d)。TEER は 37°C では試料添加によって添加前の約 75%程度まで低下し、4°C では約 120%程度まで上昇していた(Fig. 15e)。

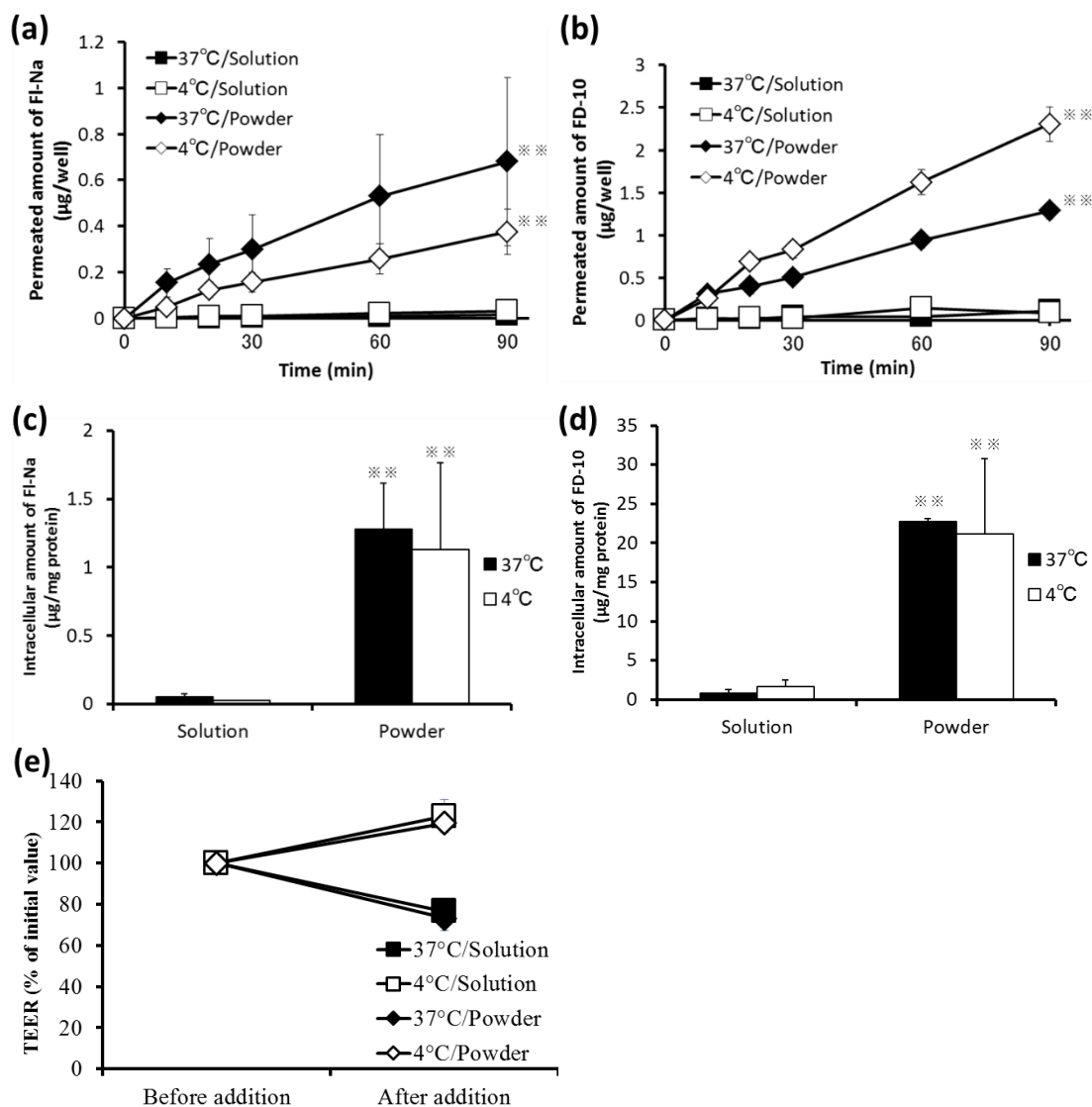


Fig. 15 Permeation study at 37 and 4°C: change of cumulative permeated amount of (a) Fl-Na and (b) FD-10 after sample addition, intracellular amount of (c) Fl-Na and (d) FD-10 at 90 min after sample addition, and (e) change of TEER by Fl-Na powder and solution at different temperatures. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). **: $p < 0.01$, compared with Solution at the same temperature.

III.3.3.4 試料溶液の溶媒量の影響

薬物膜透過実験において、薬物量を固定して溶液の溶媒量を変化 (10-150 μ L) させたところ、溶媒量の減少 (濃度の増加) に伴って、Fl-Na 及び FD-10 のいずれにおいても薬物膜透過量及び細胞内薬物量は増加した (Fig. 16)。

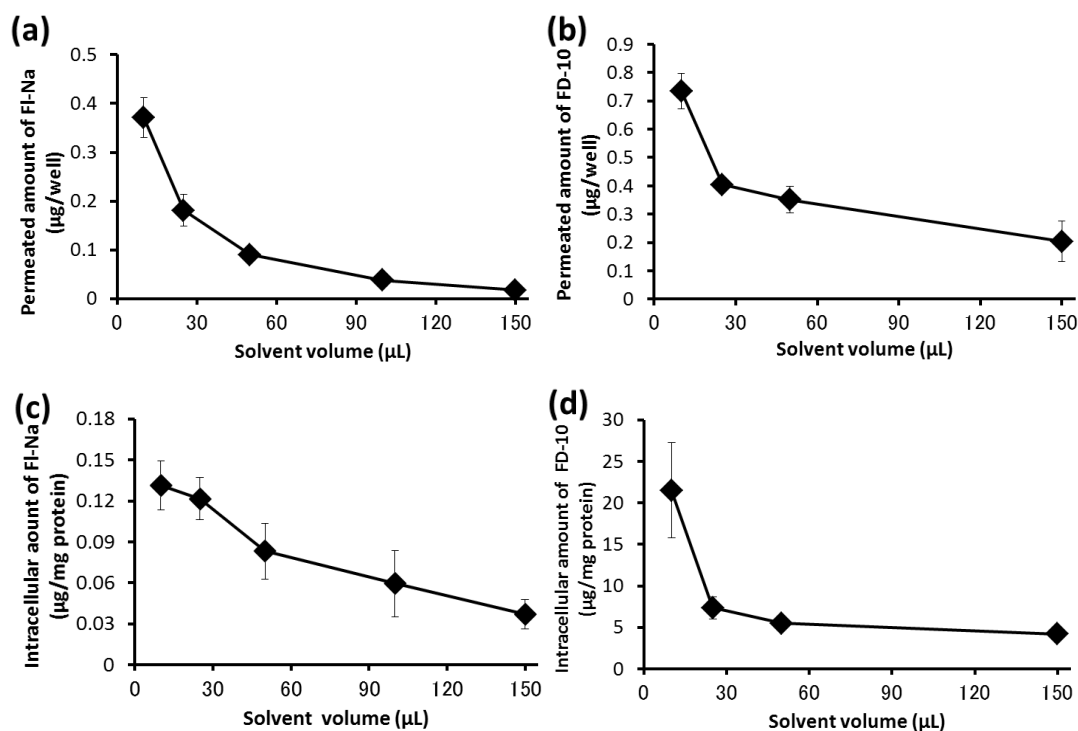


Fig. 16 Permeation study with various solvent volumes: permeated amount of (a) Fl-Na and (b) FD-10 and intracellular amount of (c) Fl-Na and (d) FD-10 at 90 min after sample addition. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

III.3.4 薬物透過経路の可視化

Fl-Na 及び FD-10 の粉末微粒子製剤及び溶液を細胞層に添加後、ZO-1 を免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡で観察を行ったところ、粉末微粒子製剤添加後の細胞層からモデル薬物由来の強い蛍光が検出された (Fig. 17a-d)。溶液と比較して、粉末微粒子製剤の分散添加によるモデル薬物由来の強い蛍光は細胞間隙 (ZO-1 由来の赤い蛍光の領域) 及び細胞内 (ZO-1 由来の赤い蛍光で囲われた領域) で同程度増加していた (Fig 17e, f)。

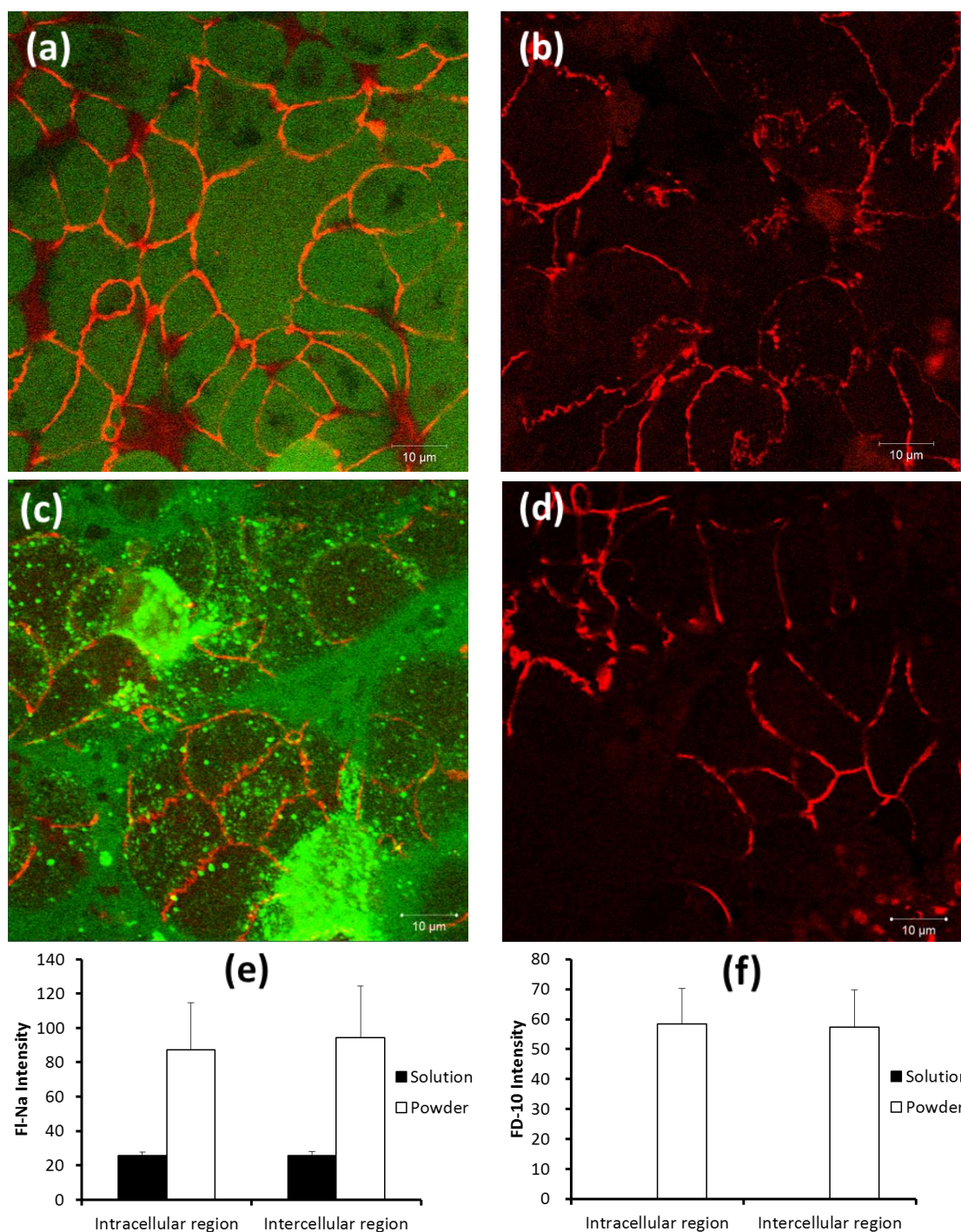


Fig. 17 Confocal images of the cell layer at 30 min after sample addition: (a) FI-Na powder, (b) FI-Na solution, (c) FD-10 powder, and (d) FD-10 solution. Green images represent model drugs (FI-Na and FD-10) and red images represent tight junctions. The intensities of (e) FI-Na and (f) FD-10 in the intracellular and intercellular regions determined by the co-localization analysis. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

III.4 考察

粉末微粒子製剤からの薬物吸収性はこれまでも小動物を用いた *in vivo* 実験^{4,54)}、気液界面細胞培養系を用いた *in vitro* 実験^{28,42)}によるものが複数報告されてきた。これらにより、粉末微粒子製剤は溶液よりも高い吸収性及び薬理効果を示すことが報告されているものの、詳細なメカニズムなどは明らかとなっていない。そこで本章ではFluorescein sodium salt及びFluorescein isothiocyanate-dextran (分子量 4, 11 kDa)をモデル薬物とする粉末微粒子製剤をSFD法により調製し、気液界面培養されたCalu-3細胞を用いて同組成溶液と薬物膜透過性を比較すると共に、試料の添加様式、透過実験時の温度、溶液の溶媒量の影響を解析、共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察を行うことにより、粉末微粒子製剤の薬物吸収特性を評価した。

モデル薬物としてFI-Naを含有する試料の添加様式を変化させて、薬物膜透過実験を行ったところ、粉末微粒子製剤は細胞間隙の開口を示すTEERの減少を伴うことなく、同組成溶液よりも高い薬物膜透過性を示した (Fig. 13a, b)。粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性は添加直後に著しかったものの、その後減弱した。一方、粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性は細胞層上で粉末微粒子製剤を溶解することで消失した (Fig. 13a)。このことから、粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性は分散添加時の物理的刺激によるものではなく、粉末微粒子製剤が細胞層上で粉末微粒子製剤のまま存在することが重要であると考えられる。

本章で用いたC10は最も効果的な吸収促進剤の一つとして知られている。C10の吸収促進効果はホスホリパーゼCの活性化及びその後のイノシトール三リン酸及びジアシルグリセロールへ向かうホスファチジルイノシトール4,5-ビスリン酸の分解に起因する細胞内の Ca^{2+} レベルの上昇に伴うタイトジャンクションの開口を介することが報告されている。また、時間依存的であり、高分子(4-20 kDa)よりも低分子(<1 kDa)において高い薬物膜透過性を示すことが報告されている⁵⁶⁻⁵⁸⁾。しかし、C10は顕著な細胞障害性を示す⁵⁹⁾。薬物膜透過実験において、C10はタイトジャンクションの開口や細胞障害性を引き起こし、薬物膜透過亢進効果を示したものの、その効果の発現は緩徐であった (Fig. 13)。逆に、粉末微粒子製剤はタイトジャンクションの開口や細胞障害性を伴うことなく、薬物の分子量に依存せず、高い薬物膜透過性を示した (Fig. 13, 14)。これらの結果は粉末微粒子製剤の薬物膜透過性亢進効果のメカニズムはC10とは異なることを示している。Fluorescein isothiocyanate-dextran (分子量約 4, 11 kDa)において粉末微粒子製剤が同組成溶液よりも高い薬物膜透過性を示すことについてはGraingerらの報告と一致する⁴²⁾。また、小動物を用いた*in vivo*実験においても溶液よりも粉末微粒子製剤として経肺投与することでsalmon calcitonin (分子量 3,432)が高い吸収性を示し⁵⁴⁾、insulin (分子量 5,808)が高い薬理効果⁴⁾を示すこと

が報告されており、粉末微粒子製剤の経肺投与は全身移行性の低い高分子医薬の全身送達において有用であることが示唆されている。

Gumbleton らはカベオラが豊富な肺胞 I 型細胞において浸透圧負荷により、エンドサイトーシス経路が亢進することを報告しており、高浸透圧エアロゾルを用いた経肺薬物送達を向上させるための方法を提案している⁶⁰⁾。本章では通常の 37°C と能動輸送が不活性な 4°C で薬物膜透過実験を行い、薬物吸収特性の比較を行ったところ、温度は粉末微粒子製剤からの薬物膜透過量及び細胞内薬物量にほとんど影響を与えなかったことから、粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性及び細胞内薬物量における能動輸送の寄与は小さいことが示された (Fig. 15)。さらに、低温では細胞層の完全性の上昇や膜の流動性の変化が報告されている⁶¹⁾。実際に、4°C 時の TEER は薬物膜透過実験前の約 120%まで増加したものの (Fig. 15e)、FI-Na 及び FD-10 の薬物膜透過性にはほとんど影響はなかった。それゆえ、粉末微粒子製剤適用による薬物膜透過性の亢進は能動輸送の影響はほとんどないと考えられる。

溶液の溶媒量 (濃度) を変化させて透過実験を行ったところ、FI-Na 及び FD-10 のいずれにおいても溶媒量の減少 (濃度の増加) に伴って薬物膜透過量及び細胞内薬物量が増加した (Fig. 16)。溶媒量が減少した場合、細胞層に対する試料溶液の接触面積の低下が考えられる。Fick の第一法則 (Eq. 1)からもわかるように、通常薬物膜透過において接触面積の低下は不利に働くものの、今回の検討では溶媒量の減少に伴う接触面積の低下よりも濃度の増加に伴う受動輸送の亢進の方が有意な影響を与え、薬物膜透過性が亢進したものと考えられる。

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{A \cdot K \cdot D}{h} (C_2 - C_1) \quad (\text{Eq. 1})$$

A は透過膜面積 (cm²)、h は膜の厚さ (cm)、K は薬物の膜/水間分配係数、D は拡散係数 (cm²/min)、C₁ は粘膜側の濃度 (mg/mL)、C₂ は漿膜側の濃度 (mg/mL) を示している。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた細胞層の観察において、蛍光モデル薬物と C10 を適用した細胞層の細胞間隙領域のみモデル薬物由来の蛍光強度が増加することが報告されている⁶²⁾。さらに、FD-10 は一般的に細胞間隙経路を介して透過することが知られている⁶³⁾。本章では試料添加後の薬物透過経路の解明を目的として、試料添加後の細胞層のタイトジャンクション関連タンパク質である ZO-1 を免疫染色して共焦点レーザー顕微鏡によって観察を行った後に、モデル薬物由来の蛍光と ZO-1 由来の蛍光に対して共局在解析を行った。その結果、

Fl-Na 及び FD-10 粉末微粒子添加後の細胞層の細胞内及び細胞間隙領域からモデル薬物由来の強い蛍光が検出され、いずれにおいても粉末微粒子製剤添加によって同組成溶液よりも細胞内、細胞間隙で同程度蛍光強度が増加していた (Fig. 17e, f)。このことから、粉末微粒子製剤によって細胞内及び細胞間隙経路の両経路の透過性が亢進していることが示唆された。

上記の結果より、粉末微粒子製剤からの高い薬物膜透過性及び細胞内移行性は分散添加された粉末微粒子製剤が細胞層上の極微量の粘液に溶解することで生じる局所的な高濃度条件に起因する細胞内及び細胞間隙における濃度依存的な受動輸送の亢進によるものであると考えられる。これまでの気液界面細胞培養系を応用した *in vitro* 実験及び小動物を用いた *in vivo* 実験において観察された粉末微粒子製剤における高い薬物吸収性及び高い薬理効果は上記と同様の現象が生じたものと考えられる。本章で用いたモデル薬物は全て Biopharmaceutics Classification System (BCS) 分類のクラスⅢにあたる易溶解性・難膜透過性だったものの、Hein らは BCS 分類のクラスⅡにあたる難溶解性・易膜透過性の budesonide においても同様の粉末微粒子製剤添加による高い薬物膜透過性を報告している²⁸⁾。これらのことより、粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性は広範な条件で生じるものであると考えられる。粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性及び組織移行性は難吸収性の薬物の全身送達及び肺組織への作用において大変有用であると考えられるものの、薬物の特性（溶解性、膜透過性、トランスポーター介在）、賦形剤の性質、粉末微粒子製剤の物性（粒子径、形状、結晶性、表面特性）など薬物膜透過性、細胞内移行性及び細胞障害性に影響を及ぼす可能性のある因子については未だ詳細に検討されていない。全身送達又は肺組織への移行を目的とした吸入粉末剤の開発に向けては粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性/細胞内移行性を生じる適用範囲及び粉末微粒子製剤の薬物透過性/細胞内移行性に影響を与える因子について更なる検討が必要であると考えられる。

III.5 結論

本章では粉末微粒子製剤の吸収特性について評価したところ、粉末微粒子製剤はタイトジャンクション開口及び細胞障害性を伴って吸収促進効果を示す吸収促進剤とは異なり、薬物の分子量に依存せず、タイトジャンクション開口及び細胞障害性を伴うことなく、吸収促進剤と同程度以上の透過性亢進効果及び高い細胞内移行性を示した。その透過性/細胞内移行性亢進効果に及ぼす能動輸送の寄与は小さく、細胞内及び細胞間隙の両経路の透過性が亢進していたことから、粉末微粒子製剤が細胞層上で局所的な高濃度条件を生じることによる受動輸送の亢進によるものであると考えられる。この粉末微粒子製剤の高い薬物膜透過性/細胞内移行性は難吸収性薬物の全身送達/肺組織への移行に対し、大変

有用であり、今後の吸入粉末剤開発にとって有益な情報になると考えられる。

IV 第三章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の安全性評価

IV.1 緒言

吸入により薬物を効率的に肺内に送達するためには、一般的に薬物粒子の空気力学的粒子径 (MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter) を 6 μm 以下に制御する必要がある²⁹⁻³¹⁾。しかし、微細化された薬物粒子は吸入に適さない高い凝集性、低分散性を示す傾向にある。これらの問題を解決するために、粗大な乳糖のような賦形剤に微細な有効成分を付着させることが有用である^{64,65)}。また、賦形剤としてアミノ酸⁶⁶⁾やシクロデキストリン⁶⁷⁾の添加により、肺内送達が改善されることも報告されている。吸入粉末剤の基礎研究においては、肺治療域に効率的に送達するための吸入粉末剤の粒子径や吸入特性といった物性評価が主流であるものの²⁸⁾、臨床応用に向けては有効性・安全性などの生物学的評価が必要であり、これらの評価には専ら小動物を用いた *in vivo* 実験及び肺組織切片を用いた *ex vivo* 実験が行われる^{32,33)}。しかし、小動物への粉末微粒子製剤の経肺投与は手技が煩雑であり、投与量を厳密にコントロールすることや実際に投与された量を把握することが困難なため、実験結果が不明瞭となるケースも少なくない^{34,35)}。また、肺上皮細胞層からの薬物膜透過性評価や粘膜障害性など局所的な生物学的作用を評価することは難しく、詳細な作用解析についてはより簡便な培養細胞を用いた評価系の応用が好ましい³⁶⁾。

これまでに肺内環境を反映した細胞培養系である気液界面細胞培養系 (ALI; Air-liquid interfaced cell culture) を応用した吸入された物質の細胞障害性評価は報告されているものの、エアロゾル⁶⁸⁻⁷⁰⁾又はガス状化合物⁷¹⁻⁷³⁾に関する報告が多く、粉末微粒子に関する報告は未だほとんどない。

そこで本章では ALI を粉末微粒子製剤の安全性評価に適用するために、異なる培養系 (96 well プレート及び ALI) において 3 つの安全性評価法 (3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, yellow tetrazole (MTT)) アッセイ、乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイ、ヨウ化プロピジウム (PI) 染色を比較することで ALI における安全性評価系を確立した。また、上記で確立した評価法を用いて粉末微粒子の肺内送達に適すると考えられる各種賦形剤 (糖、アミノ酸、シクロデキストリン (CyD)) 溶液及び粉末微粒子製剤の安全性を評価した。

IV.2 実験方法

IV.2.1 試料

粉末微粒子製剤の賦形剤として D-(+)-Trehalose dihydrate (Tre)、2-Hydroxypropyl- γ -cyclodextrin (HP- γ -CyD)、L-Phenylalanine (Phe)、L-Leucine (Leu)、L-Isoleucine (Ile) は SIGMA-ALDRICH Co. から購入し、Lactose monohydrate (Lac)、

D-(-)-Mannitol (Man)、 α -Cyclodextrin (α -CyD)、 β -Cyclodextrin (β -CyD)、 γ -Cyclodextrin (γ -CyD)、2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CyD)は Wako Pure Chemical Industries, Ltd.から購入した。細胞障害性評価のポジティブコントロールとして Sodium dodecyl sulfate (SDS)及び Doxorubicin hydrochloride (DOX)は Wako Pure Chemical Industries, Ltd.から購入し、Hydrogen peroxide (H_2O_2)は SIGMA-ALDRICH Co. から購入した。Fluorescein sodium salt (Fl-Na; SIGMA-ALDRICH Co.)は粉末微粒子の定量用試薬として用いた。細胞培養のための Roswell Park Memorial Institute (RPMI)培地、Fetal Bovine Serum (FBS)、Penicillin-Streptomycin、Trypsin-EDTA は SIGMA-ALDRICH Co.から購入した。96 well プレート (Clear 96 well Microtest™ Plate)及び Transwell® permeable filters (pore size: 0.4 μ m, 1.12 cm², Transwell® type)は Corning Inc.から購入した。

IV.2.2 細胞培養

ヒト肺上皮癌細胞である A549 細胞を CELL BANK (理化学研究所) より購入して用いた。培養方法は II.2.2 と同様に行った。96 well プレートに、細胞を 100 μ L の培地中で 4×10^3 cells/well の密度で播種し、24 時間培養後に実験に用いた。気液界面培養の漿膜側の培地量及び実験に使用するまでの培養期間は第一章で確立した 1.0 mL 及び播種後 4-11 日とした。

IV.2.3 粉末微粒子製剤の調製

粉末微粒子製剤は噴霧乾燥 (SD)法により調製した。1% (w/v)試料溶液を 5 mL/min で送液し、噴霧乾燥機 (SD-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)中の 2 流体スプレーノズル (inner diameter: 0.4 mm, Tokyo Rikakikai Co., Ltd)から 150 kPa で噴霧し、液滴を入口温度 120°C で乾燥した。SDS は Man と質量比 1:49 (SDS/Man) で混合して微粒子化した。粉末微粒子製剤の Transwell®への沈着効率を評価するために、0.1% (w/w) Fl-Na を含有する粉末微粒子製剤についても同様に調製した。

IV.2.4 粉末微粒子製剤の形状評価

II.2.4 と同様の方法で行った。

IV.2.5 粉末微粒子製剤の粒子径評価

粒度分布の測定は、乾式レーザー回折粒度分布測定装置 (LMS-30, SEISHIN) により行った。圧縮空気圧 0.4 MPa とし、乾式ワンショットユニットを用いて噴霧した粒子を測定した。得られた積算粒度分布から d10、d50、d90 値を算出した。

IV.2.6 Transwell®への粉末微粒子製剤の沈着効率評価

粉末微粒子製剤の安全性評価は可能な限り無菌状態で行うため、沈着効率評価においても予め電子天秤、マイクロスパーテルをエタノール清拭して粉末微粒子製剤の充填を行った。0.1% (w/w) Fl-Na を含有する粉末微粒子製剤を滅菌済み 100 μ L 用ディスポーザブルチップに充填し、紫外線照射したシリカゲルを入れた滅菌済みディスポーザブル 5 mL マイクロチューブ内で保存した。Transwell® への粉末微粒子製剤の沈着効率評価はクリーンベンチ内で行い、新規粉末微粒子分散添加デバイスを用いて圧縮空気量を 0.2 mL に設定し、充填量を変化させて Transwell® の粘膜側内に分散添加を行い、II.2.6 と同様の方法で各粉末微粒子の沈着効率を評価した。

IV.2.7 安全性評価

96 well プレートで培養した細胞の表面から培地を取り除き、FBS を含有する培地 200 μ L で溶解した各種賦形剤の試料溶液を添加し、37°C で 48 時間インキュベートした。ALI では、漿膜側の培地を新鮮な培地で置換し、FBS 不含の培地 150 μ L で溶解した各種賦形剤の試料溶液を添加又は粉末微粒子製剤を分散添加し、37°C で 48 時間インキュベートした。SDS、DOX、H₂O₂ はポジティブコントロールとして安全性評価法のバリデーションに用いた。安全性評価における操作は全てクリーンベンチ内において無菌状態で行った。また、96 well 及び ALI における試料溶液は 0.45 μ m のメンブランフィルターで濾過滅菌した後に実験に用いた。一方、粉末微粒子は調製過程における滅菌処理が困難なため、アルコールで清拭した器具を用いて高圧蒸気滅菌処理したディスポーザブルチューブに粉末微粒子を秤量し、高圧蒸気滅菌処理したディスポーザブルチューブ内で実験に用いるまで保管した。賦形剤の安全性の指標として、各細胞の生存率を算出し、Hill 式から誘導した式 (Eq. 2)^{74,75)} に対して、非線形最小二乗法プログラム MULTI⁷⁶⁾を用いて当てはめ計算を行い、50%致死濃度 (LC₅₀; lethal concentration)又は 50%致死量 (LD₅₀; lethal dose)を算出した。

$$E = \frac{100 \times LC_{50}}{LC_{50} + C} \quad (\text{Eq. 2})$$

E は細胞生存率 (%), C は各種賦形剤濃度 (mM)又は粉末微粒子量 (mg)、LC₅₀ は各細胞の 50%致死賦形剤濃度 (mM)又は 50%致死賦形剤量 (mg)を示している。

IV.2.7.1 MTT アッセイ

96 well において、試料曝露 48 時間後に試料を取り除き、各ウェルに 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μ L を添加し、48 時間インキュベートした。その後、各ウェルに 10% SDS 溶液 100 μ L を添加し、37°C で 12-24 時間遮光下でインキュベートした。

ALI においては、試料曝露 48 時間後に試料を粘膜及び漿膜側から取り除き、各チャンバーに 0.5 mg/mL MTT 溶液をそれぞれ 250 μ L 及び 1000 μ L 添加し、48 時間インキュベートした。その後、各粘膜側に 10% SDS 溶液 250 μ L を添加し、37°C、遮光下で 12-24 時間インキュベートした。

IV.2.7.2 LDH アッセイ

ALI において、試料曝露 48 時間後に試料を粘膜及び漿膜側から回収し、Lactate Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (BioVision)を用いて乳酸脱水素酵素活性を測定した。

IV.2.7.3 PI 染色

ALI において、試料曝露 48 時間後に試料を粘膜及び漿膜側から取り除き、細胞を Trypsin-EDTA (300 μ L/well)処理して懸濁した。懸濁液は 25°C、400 g、10 分間遠心分離し、上清を取り除いた。細胞を PBS 中の 50 μ g/mL PI 溶液で再懸濁し、死細胞の DNA にインターカレートした PI 由来の蛍光を蛍光分光光度計 (Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Devices Co.)で定量した (Ex: 493 nm, Em: 630 nm)。

IV.2.8 統計解析

一元配置分散分析法 (ANOVA) により $p < 0.05$ で有意差ありとなったものについて、Dunnett 法により各平均値間の有意差の検定を行い、 p 値が 0.05 未満のとき有意差ありとした。

IV.3 結果

IV.3.1 ALI における安全性評価法の確立

ALI における安全性評価法を確立するために、ポジティブコントロールを用いて安全性評価法として汎用される MTT アッセイ、LDH アッセイ、PI 染色の結果を比較した。

MTT アッセイでは、全てのポジティブコントロールにおいて濃度依存的に細胞生存率が減少した (Fig. 18)。

LDH アッセイではポジティブコントロールは MTT アッセイよりも低濃度から反応した。しかし、濃度依存的に LDH 活性が上昇したポジティブコントロールはなかった。興味深いことに、SDS (0.001-0.1%)又は DOX (0.08-2 mM)におい

では濃度増加に伴って粘膜側の LDH 活性は低下した。一方、漿膜側の LDH 活性は適用した SDS 又は DOX の濃度に依存して上昇した (Fig. 19)。しかし、Tre 及び Man (50-800 mM) 添加時は漿膜側の LDH 活性の濃度依存的な上昇は認められなかった。また、同一試料でも測定タイミングで LDH 活性 (mU/mL) が大きく異なったことから、培地のみを添加した control を 100% とした相対的な LDH 活性 (% of control) で評価した。

PI 染色では、10% SDS 及び 200 μ M H₂O₂ 処理の蛍光強度はネガティブコントロール (培地) 処理の蛍光強度と有意な差はなかった (Fig. 20)。

上記の 3 つの方法を用いて得られた結果を比較したところ、ALI における安全性評価には MTT アッセイが最適な方法であり、以後の安全性評価は MTT アッセイによって行うこととした。

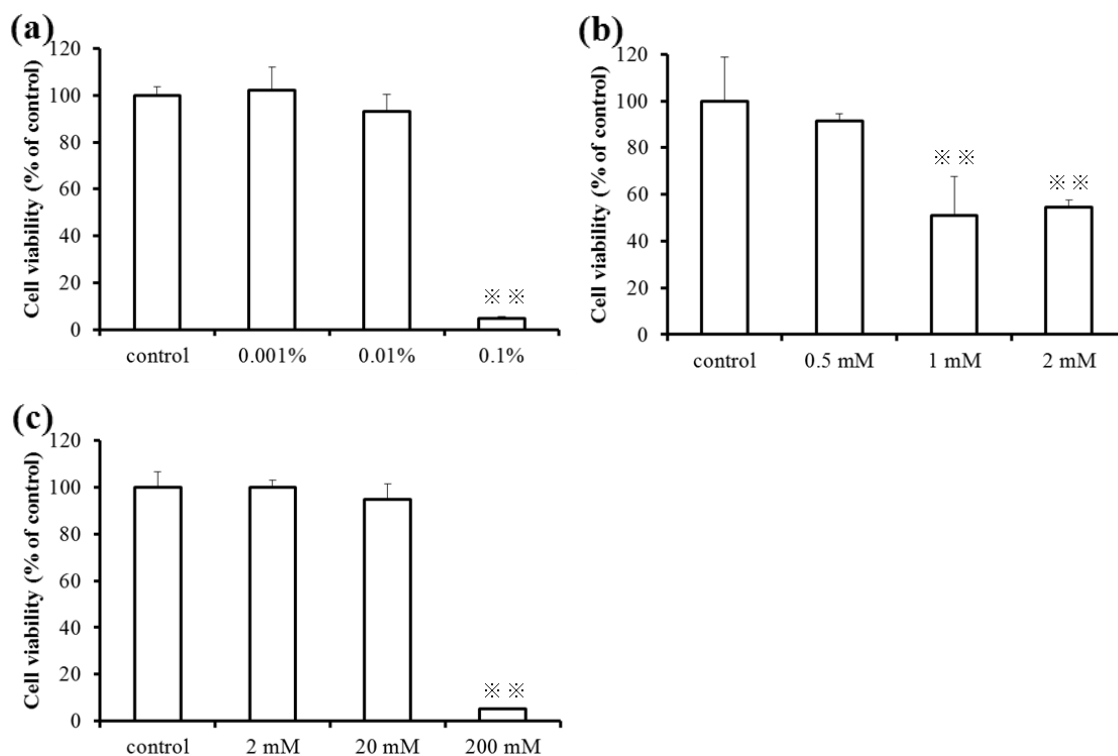


Fig. 18 MTT assay analysis of (a) SDS, (b) DOX, and (c) H₂O₂ with ALI. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). **: p<0.01, compared with control.

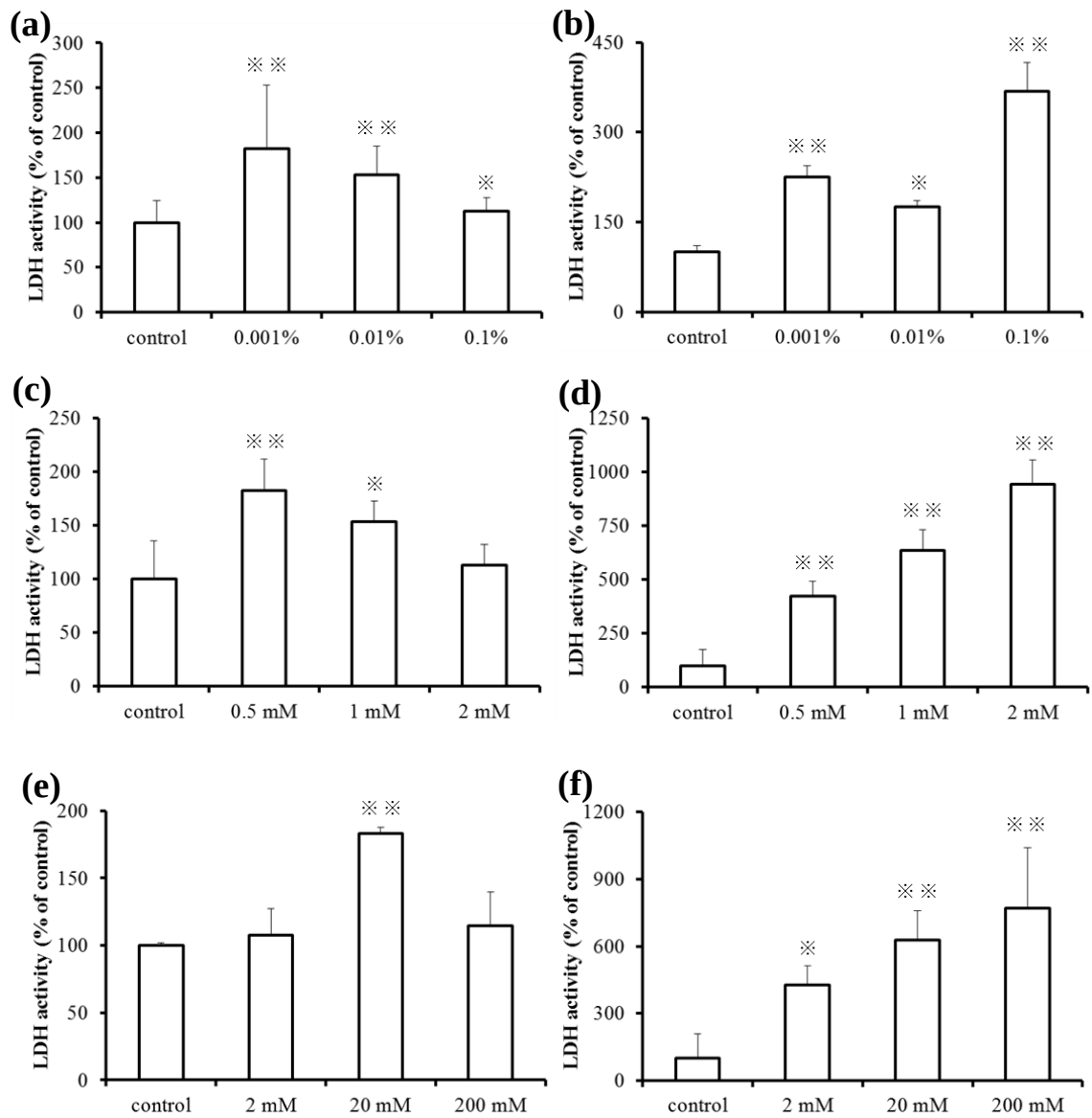


Fig. 19 LDH assay analysis of (a, b) SDS, (c, d) DOX, and (e, f) H₂O₂ with ALI. LDH was assayed in apical solutions (a, c, e) or in basolateral solutions (b, d, f). Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). *: $p < 0.05$, compared with control. **: $p < 0.01$, compared with control.

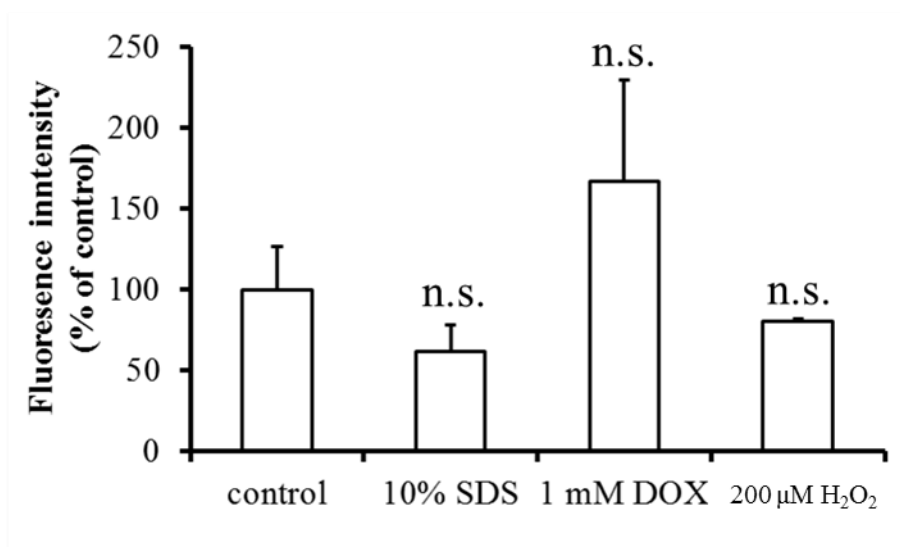


Fig. 20 PI dyeing of positive control with ALI. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). n.s.: not significant, compared with control.

IV.3.2 粉末微粒子製剤の物理化学的性質評価

本章で SD 法により調製された粉末微粒子製剤は全て球形だったが、CyD は表面にくぼみを生じた。一方、Phe 及び Leu 粉末微粒子はリング状又は割れた風船のような特徴的な構造を有していた (Fig. 21)。糖と CyD の平均粒子径 (d_{50}) は約 3 μm だったが、アミノ酸及び SDS/Man はより大きかった (Table 3)。

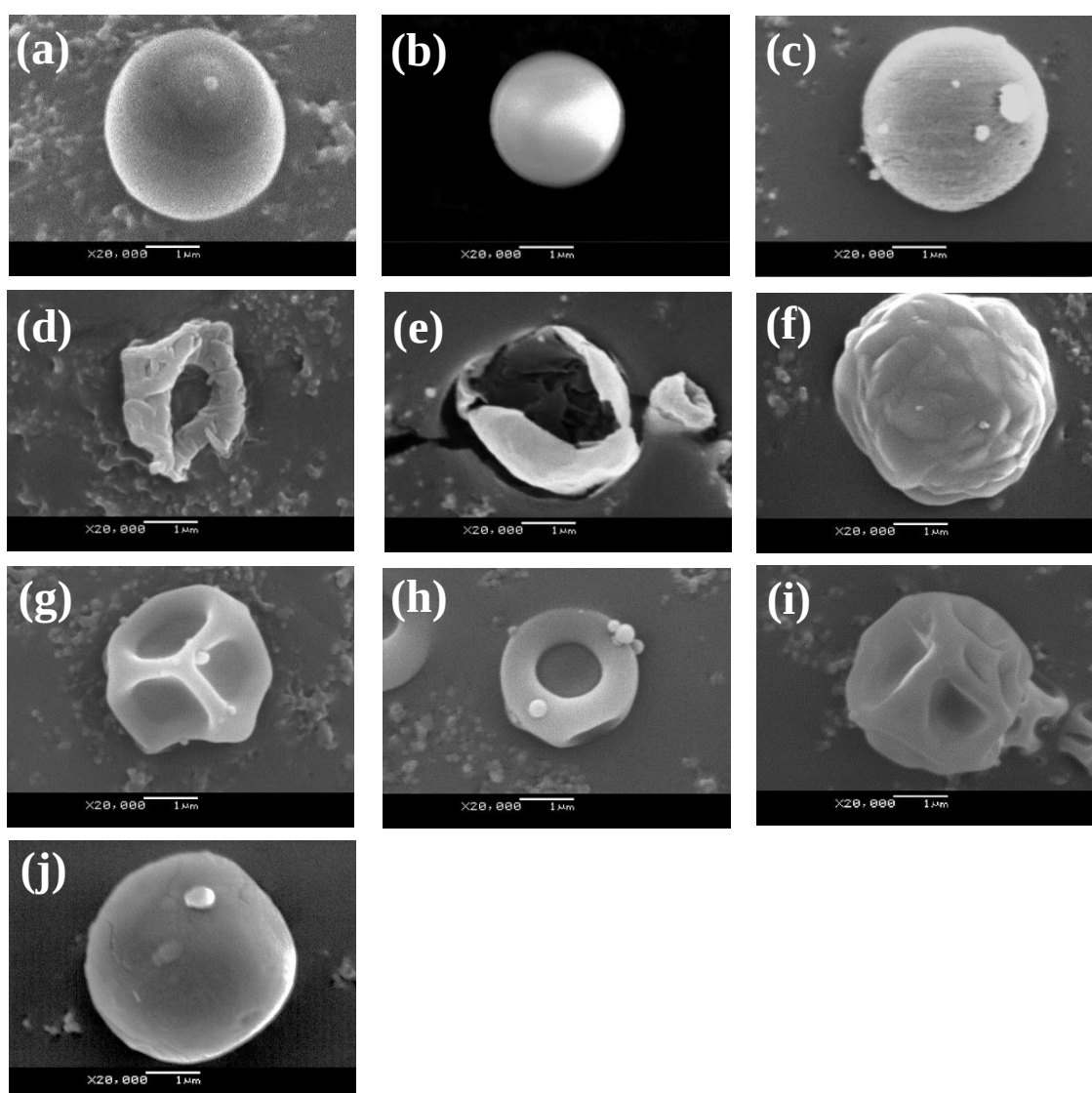


Fig. 21 Scanning electron micrographs of prepared dry powders ($\times 20,000$). (a) Lac, (b) Tre, (c) Man, (d) Phe, (e) Leu, (f) Ile, (g) α -CyD, (h) β -CyD, (i) HP- β -CyD, and (j) SDS.

Table 3 Particle size of the dry powders

(μm)	Lac	Tre	Man	Phe	Leu	Ile	α -CyD	β -CyD	HP- β -CyD	SDS
d10	1.77	1.70	1.89	2.49	2.30	2.68	1.90	1.37	1.95	2.67
d50	2.77	2.55	2.96	4.22	7.71	5.05	3.09	3.01	2.98	5.60
d90	4.66	4.09	4.88	7.04	17.8	9.27	5.18	5.93	4.70	10.9

IV.3.3 従来の評価系における賦形剤溶液の安全性評価

96 well を用いた従来の評価系において、糖は濃度依存的に細胞生存率を減少させ、それぞれの糖はモル濃度基準においては同じレベルの安全性だった (Fig. 22)。一方、Man の安全性は質量基準では糖の中で最も低かった (Table 4)。Table 4 で示される LC50 で比較したところ、本章で用いた賦形剤の中で糖が最も LC50 が高く、最も安全性が高かった。

アミノ酸も濃度依存的に細胞生存率を低下させた (Fig. 22)。アミノ酸の中では Phe が最も安全性が低かった (Table 4)。

CyDs は濃度依存的に顕著に細胞生存率を減少させ、CyDs の安全性はモル濃度基準においては検討した賦形剤の中で最も低かった (Table 4)。 γ -CyD は天然 CyDs (α -, β -, and γ -CyD)の中で最も安全性が高かった。さらに、水溶性が増加した CyDs (HP- β -CyD、HP- γ -CyD)は対応する天然 CyDs よりも安全性が高かった。

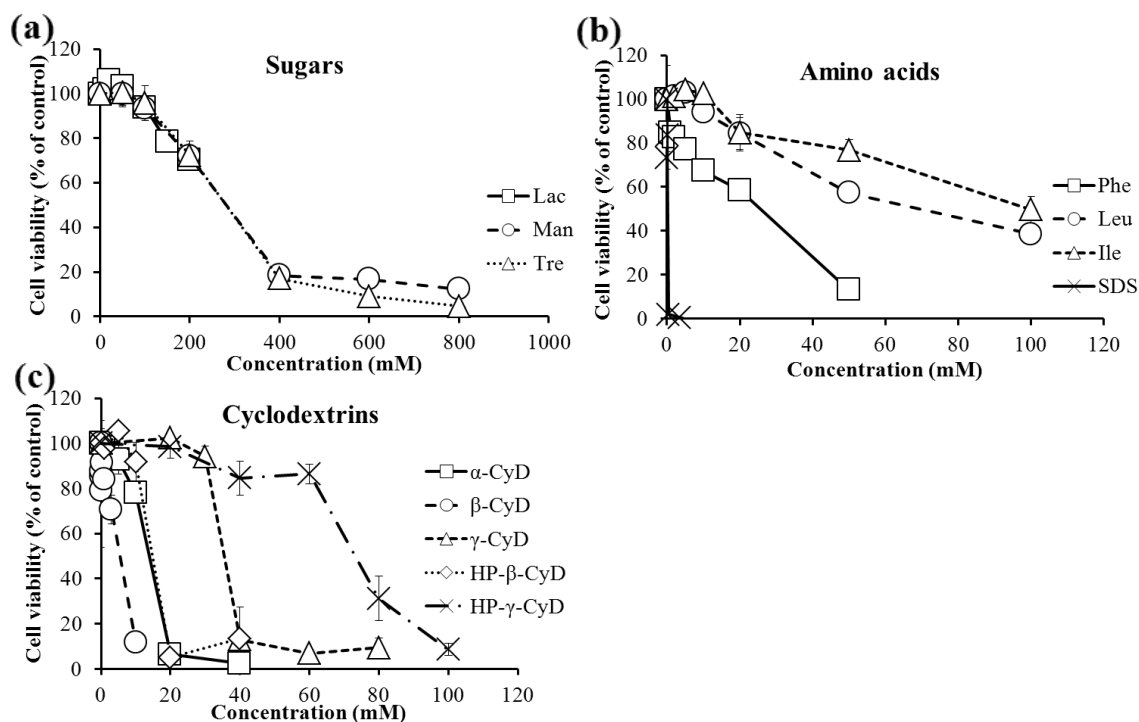


Fig. 22 Safety evaluation of excipient solutions with 96 well: (a) sugars, (b) amino acids, and (c) cyclodextrins. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4). The exposure concentration led to a significant difference compared with the control (0 mM): (a) Lac: ≥ 100 mM ($p < 0.01$), Tre: ≥ 200 mM ($p < 0.01$), Man: ≥ 100 mM ($p < 0.01$), (b) Phe: ≥ 1 mM ($p < 0.01$), Leu: ≥ 20 mM ($p < 0.01$), Ile: ≥ 20 mM ($p < 0.01$), SDS: ≥ 0.00347 mM ($p < 0.01$), and (c) α -CyD: ≥ 5.0 mM ($p < 0.05$), ≥ 10 mM ($p < 0.01$), β -CyD: ≥ 0.030 mM ($p < 0.05$), ≥ 3.0 mM ($p < 0.01$), γ -CyD: ≥ 40 mM ($p < 0.01$), HP- β -CyD: ≥ 5.0 mM ($p < 0.05$), ≥ 10 mM ($p < 0.01$), HP- γ -CyD: ≥ 40 mM ($p < 0.01$).

IV.3.4 ALIにおける賦形剤溶液の安全性評価

ALIにおける賦形剤溶液の安全性評価において、糖は飽和溶解度に近い曝露濃度でさえ、細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 23a)。

アミノ酸において、Pheは飽和溶解度に近い曝露濃度において若干細胞生存率の減少を引き起こした。一方、他のアミノ酸は飽和溶解度に近い濃度においても細胞生存率に影響を与えなかった (Fig. 23b)。

CyDsにおいて、 α -CyD、HP- β -CyDは濃度依存的に細胞生存率が減少したものの、 β -CyDにおいては細胞生存率の低下は認められなかった (Fig. 23c)。

全ての賦形剤において、ALIは96 wellよりも感受性が低かった (Table 4)。

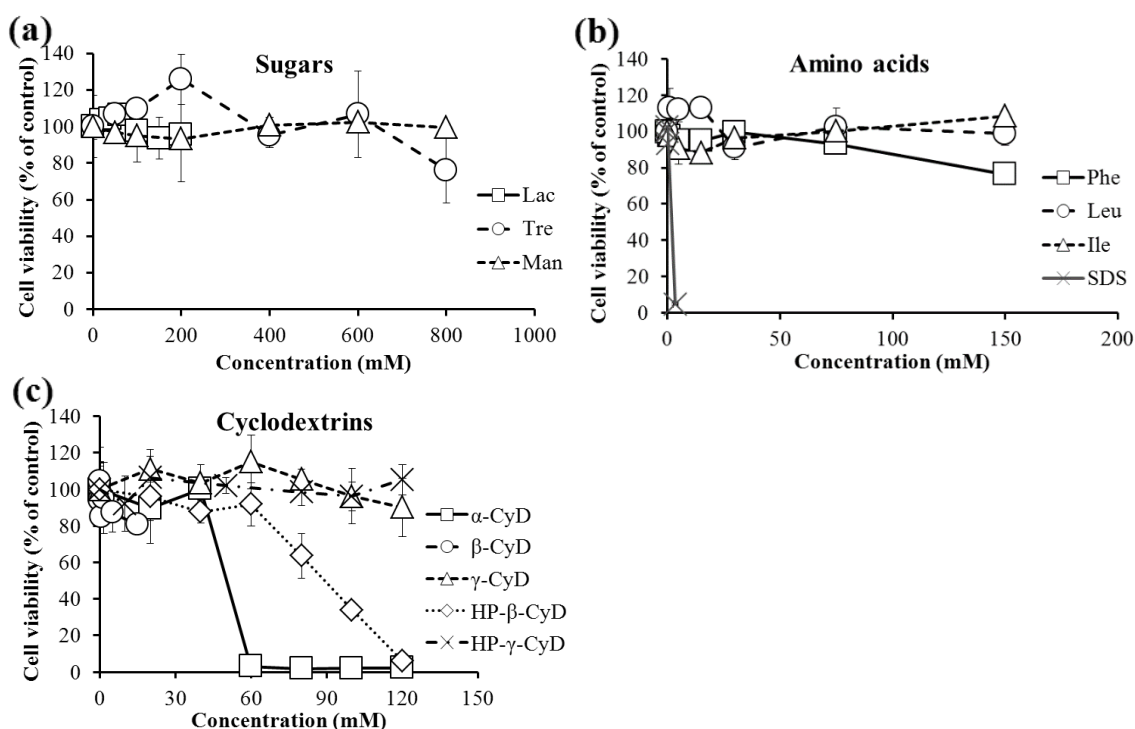


Fig. 23 Safety evaluation of excipient solution with ALI: (a) sugars, (b) amino acids, and (c) cyclodextrins. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). The exposure concentration led to a significant difference compared with the control (0 mM): (a) Lac, Tre, Man: not significant, (b) Phe: 150 mM ($p < 0.01$), Leu, Ile: not significant, SDS: ≥ 3.47 mM ($p < 0.01$), and (c) α -CyD: ≥ 60 mM ($p < 0.01$), HP- β -CyD: ≥ 80 mM ($p < 0.01$), β -CyD, γ -CyD, HP- γ -CyD: not significant.

Table 4 LC50 of each excipient solution in molar and mass concentrations with 96 well and ALI

LC50		Lac	Tre	Man	Phe	Leu	Ile	α -CyD	β -CyD	γ -CyD	HP- β -CyD	HP- γ -CyD	SDS
96well	mM	> 200	336	331	25.6	>100	>100	11.9	4.10	39.5	13.7	69.9	0.416
	mg/mL	> 68.5	127	60.4	4.23	> 13.1	> 13.1	11.6	4.65	51.3	21.1	123	0.120
ALI	mM	> 200	> 800	> 800	> 150	> 150	> 150	62.3	> 15.0	> 120	83.4	> 120	1.07
	mg/mL	> 68.5	> 303	> 146	> 24.8	> 19.7	> 19.7	60.6	> 17.0	> 156	129	> 211	0.309

IV.3.5 ALI の感受性低下の原因の検討

ALI の低い感受性の原因を解明するために、細胞生存率に対する細胞数、曝露時間、血清の存在、賦形剤の透過の影響を検討した。

ALI のウェル内の播種時の細胞密度 (約 179 cells/cm²) は 96 well (約 12 cells/cm²) と比較して約 15 倍高く、ALI の培養期間 (4-11 日間) は 96 well (24 時間) よりも少なくとも 4 倍は長いため、実験時の細胞の密度はかなり異なると考えられる。細胞生存率に対する細胞数の影響を検討するために、96 well プレート内に様々な細胞数 (4, 8, 20 × 10³ cells/well) で播種し、Man、Phe、HP- β -CyD 溶液を適用した。その結果、播種細胞数は細胞生存率に有意な影響を与えなかった (Fig. 24)。

細胞生存率に対する曝露時間及び血清の存在の影響を検討するために、異なる曝露条件 (4 時間 FBS 有り、4 時間 FBS 無し、48 時間 FBS 有り) で試料溶液を適用した。その結果、Man 溶液を曝露した細胞の生存率は基本的に曝露時間及び FBS によって影響されなかったが、200 mM においては有意な影響が観察された (Fig. 25a)。Phe 溶液は FBS の有無に関わらず 4 時間で細胞生存率の低下を示さなかった。しかし、長い曝露時間 (48 時間) では有意に細胞生存率を低下させた (Fig. 25b)。一方、HP- β -CyD 溶液を曝露した細胞の生存率は曝露時間と FBS の影響を受けた (Fig. 25c)。以上より、細胞生存率に対する血清と曝露時間の影響は賦形剤間で異なった。

96 well の粘膜表面に適用された賦形剤は細胞内に入り、蓄積されるものの、細胞がウェルの底に播種されているため、細胞を透過することはできない。一方、ALI の粘膜表面に適用された賦形剤は細胞を通して透過できる。細胞生存率に対する賦形剤の透過の影響を検討するために、Transwell® の漿膜側から培地を取り除いて Man、Phe、HP- β -CyD 溶液を粘膜側に適用した (ALI without permeating)。その結果、ALI without permeating に試料溶液曝露後の細胞生存率は ALI よりも低く、賦形剤の透過が ALI の感受性を低下させていることが考えられた。一方、ALI without permeating に試料溶液曝露後の細胞生存率は 96 well よ

りも高く、ALI で培養することは細胞生存率に影響を及ぼすことが示された (Fig. 26)。

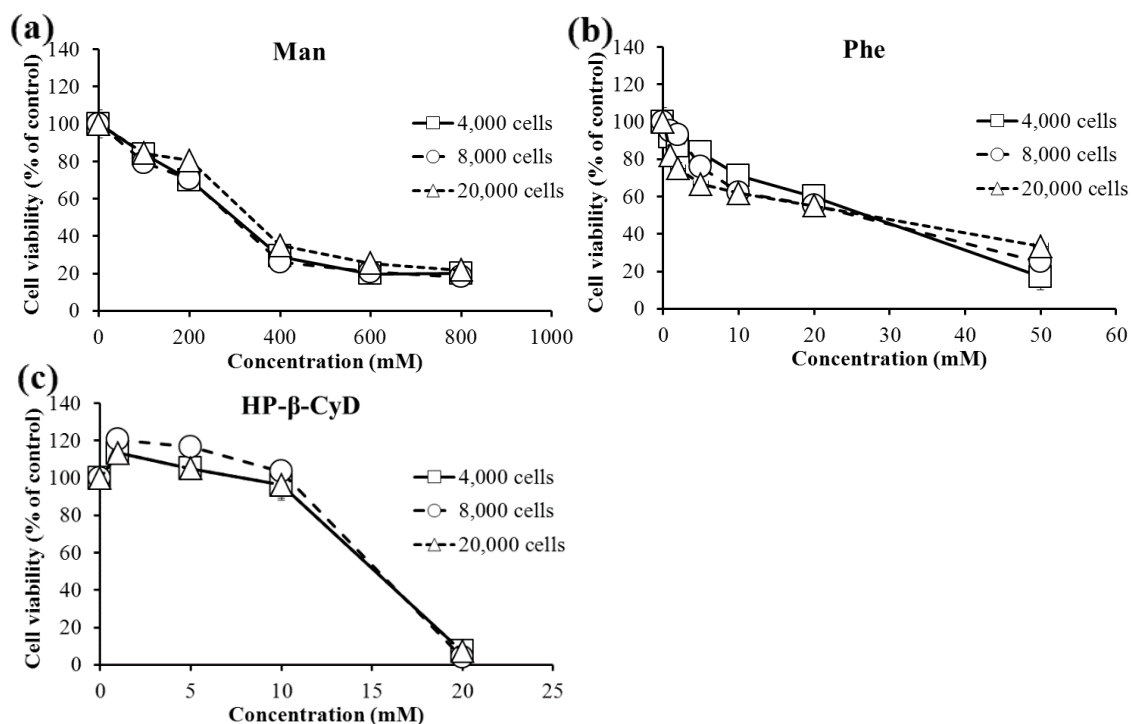


Fig. 24 The effect of cell number on cell viability. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4). The exposure concentration led to a significant difference compared with 4,000 cells: (a) 8,000 cells: 400 mM ($p < 0.05$), 800 mM ($p < 0.01$), 20,000 cells: ≥ 200 mM ($p < 0.01$), (b) 8,000 cells: 20, 50 mM ($p < 0.05$), 5, 10 mM ($p < 0.01$), 20,000 cells: 1 mM ($p < 0.05$), 2, 5, 10, 50 mM ($p < 0.01$), and (c) 8,000 cells: 10 mM ($p < 0.05$), 1, 5 mM ($p < 0.01$), 20,000 cells: ≤ 10 mM ($p < 0.01$).

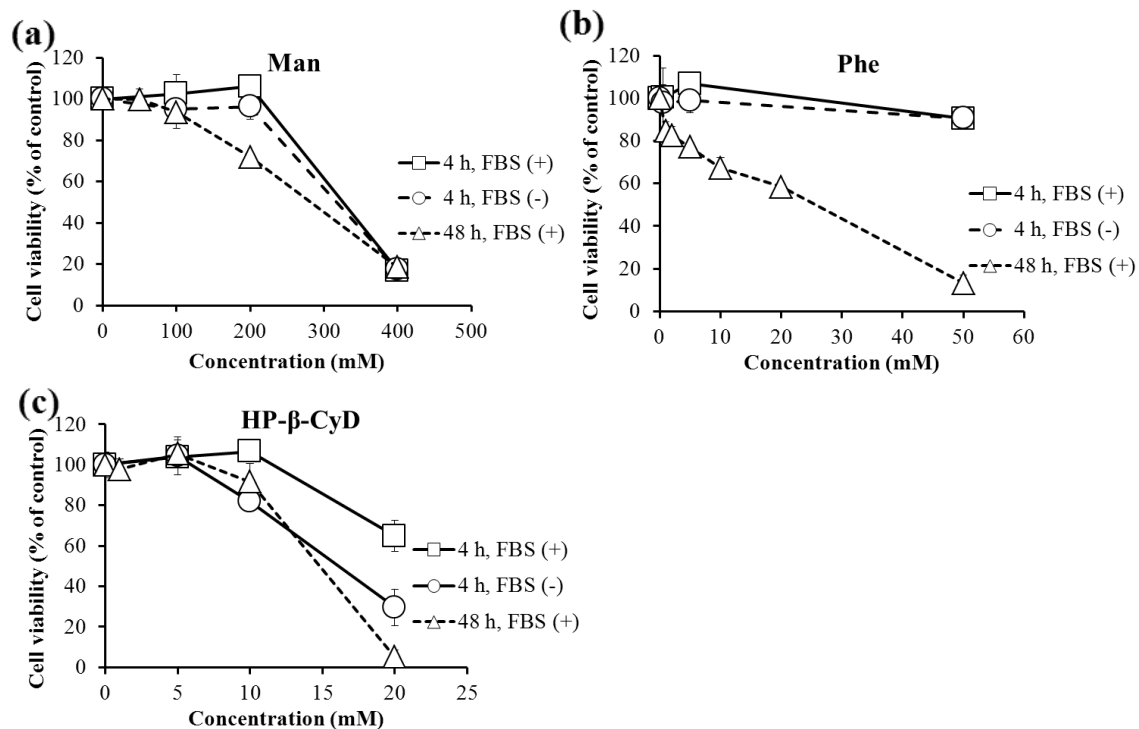


Fig. 25 The effect of exposure time and the presence of serum on cell viability: (a) Man, (b) Phe, (c) HP-β-CyD. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=4). The exposure concentration produced a significant difference compared with 4 h with FBS: (a) 4 h without FBS: 200 mM ($p < 0.05$), 48 h with FBS: 200 mM ($p < 0.01$), (b) 4 h without FBS: not significant, 48 h with FBS: ≥ 5 mM ($p < 0.01$), and (c) 4 h without FBS, 48 h with FBS: ≥ 10 mM ($p < 0.01$).

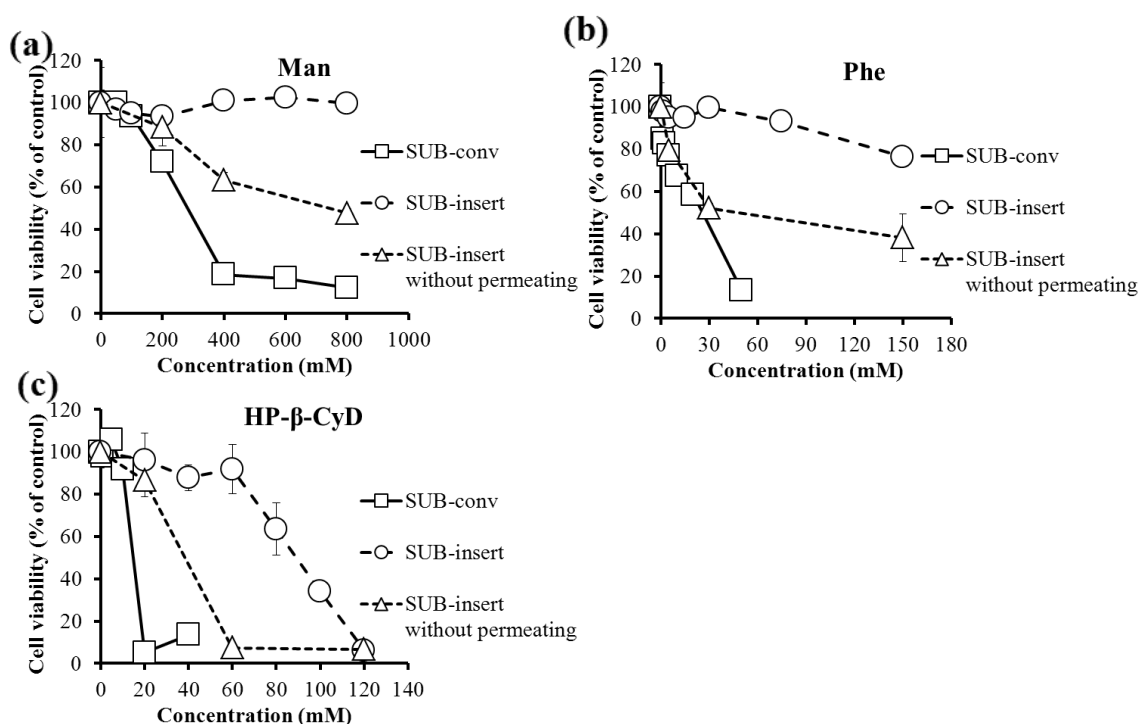


Fig. 26 The effect of permeation of excipient on cell viability. Each value represents the mean $\pm$ S.D. ($n=3$). The exposure concentration led to a significant difference compared with ALI without permeating: (a) 96 well.: ≥ 200 mM ($p < 0.01$), ALI: 800 mM ($p < 0.01$), (b) ALI: ≥ 5 mM ($p < 0.01$), and (c) 96 well.: 20 mM ($p < 0.01$), ALI: 60 mM ($p < 0.01$).

IV.3.6 ALIにおける粉末微粒子製剤の安全性評価

粉末微粒子製剤の安全性を評価するために、ALIに試料溶液及び粉末微粒子を添加した。実験前に、FI-Naを含有する粉末微粒子を用いてALIの粘膜側に均一に粉末微粒子を分散できていることを確認した。また、細胞層上に分散された粉末微粒子をFBS不含の培地150 μ Lで溶解する条件についても同様に検討した。その結果、Man粉末微粒子は溶液と比較して細胞生存率を低下させた。一方、Man粉末微粒子による細胞生存率の低下は細胞層上で粉末微粒子を溶解することにより、消失した (Fig. 27)。同様に、他の賦形剤においても溶液と粉末微粒子を気液界面培養された細胞層上に適用し、それぞれのLD50を算出した。その結果、Leu、Ile及び β -CyDを除いて全ての賦形剤で粉末微粒子は溶液よりも細胞生存率を低下させ、その程度は賦形剤間で異なった (Table 5)。

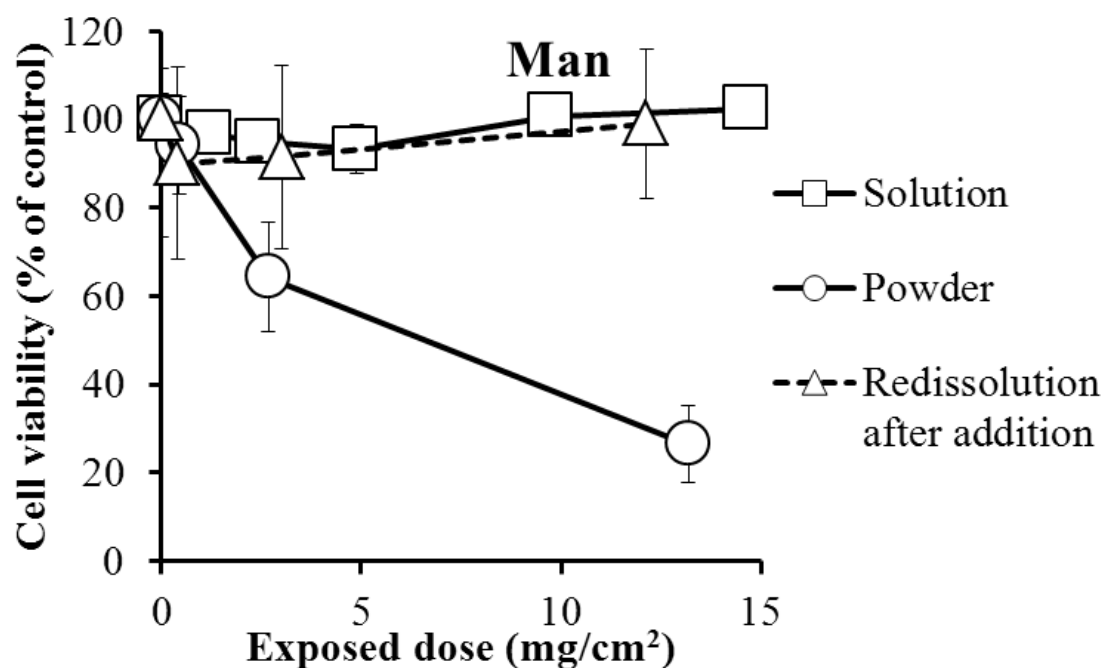


Fig. 27 Safety evaluation of dry powder with ALI. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). The exposure concentration led to a significant difference compared with Solution: Powder: ≥ 2.67 mg/cm² ($p < 0.01$), Redissolution after addition: not significant.

Table 5 LD50 of each dry powder with ALI.

LD50		Lac	Tre	Man	Phe	Leu	Ile	α -CyD	β -CyD	γ -CyD	HP- β -CyD	HP- γ -CyD	SDS
Solution	mg/cm ²	> 9.19	> 40.5	> 19.5	> 3.32	> 2.64	> 2.64	8.11	> 2.28	> 20.8	17.2	> 28.3	0.143
Powder	mg/cm ²	3.86	5.74	5.78	0.692	> 5.57	> 1.89	1.44	> 2.02		4.76		0.0132

IV.4 考察

本章では ALI を応用した安全性評価系を確立するために、ポジティブコントロールとして SDS、DOX、H₂O₂ を用いて MTT アッセイ、LDH アッセイ、PI 染色により A549 細胞に対する細胞障害性を比較した。MTT アッセイはミトコンドリアの脱水素酵素の還元反応に基づいており⁷⁷⁾、LDH アッセイは傷害を受けた細胞膜から漏出した乳酸脱水素酵素の検出⁷⁸⁾、PI 染色は損傷を受けた細胞に入り込んで塩基対にインターカレートする反応に基づく評価システムである⁷⁹⁾。Scherliess も Calu-3 細胞に対して MTT アッセイ、LDH アッセイ、ニュートラル

レッド アッセイについて同様に検討を行っており、MTT アッセイが最も感度が良く、LDH アッセイでは妥当な結果が得られなかったことが報告されている⁴³⁾。本章においては、MTT アッセイではいずれのポジティブコントロールを用いても濃度依存的に細胞障害性を示した (Fig. 18)。一方、LDH アッセイでは MTT アッセイの約 100 倍近く感度が良かったものの、粘膜側においては濃度依存的な細胞障害性を示さず、逆に濃度の増加に伴い、LDH 活性は減少し、漿膜側においては濃度依存性を示すものと示さないものがあった (Fig. 19)。LDH は界面活剤と相互作用することにより、活性が低下することが報告されているため⁸⁰⁾、試料を添加した粘膜側において顕著にその影響が生じたと考えられる。PI 染色ではポジティブコントロールの細胞障害性は培地のみを添加したものと差はなかった (Fig. 20)。これはポジティブコントロールの細胞障害性よりもトリプシン処理の影響の方が大きかったためであると考えられる。よって、ALI を応用した安全性評価には MTT アッセイが最適と判断した。

本章で安全性評価に用いられた粉末微粒子は SD 法により調製されたもので一般的に SD 法により調製された粉末微粒子は滑らかな表面の球形を示すとされており⁸¹⁾、本章で調製された糖を賦形剤とする粉末微粒子においては滑らかな表面の球形粒子が得られた (Fig. 21a-c, j)。一方で、CyDs 及び疎水性アミノ酸を賦形剤とする粉末微粒子は表面にくぼみが生じたり、破裂したような粒子が得られた (Fig. 21d-i)。これは CyDs や疎水性アミノ酸のように界面活性作用を有する物質は液滴の表面張力を減少させることによって表面にくぼみを有する粉末微粒子を生じたと考えられる⁸²⁻⁸⁴⁾。本章で調製された粉末微粒子のうち、糖及び CyDs を賦形剤とする粉末微粒子の粒子径 (d50) は約 3 μm であったのに対し、疎水性アミノ酸や SDS を含有する粉末微粒子はそれよりも大きかった (Table 3)。一般的には界面活性作用を有するものを用いたほうが粒子径は小さくなるが^{82,84)}、本研究では逆に大きくなったため、送液速度、乾燥温度、試料溶液濃度などの操作条件等により界面活性作用の影響が異なつたと考えられる。

96 well において各賦形剤の安全性を評価したところ、いずれも濃度依存的に細胞生存率が低下した。その中で、糖はモル濃度基準で他の賦形剤と比較して安全性が高かった (Table 4)。Lac に関しては培地への溶解度に制限されるため、200 mM までしか検討できていないものの、今回用いた Lac、Tre、Man はモル濃度基準では同程度の安全性だった (Fig. 22a)。この結果より、浸透圧などの同様のメカニズムに基づいて細胞障害性を生じたと考えられるものの、Scherliess はより高分子の物質では糖と同じ細胞障害性を示すためにはより高濃度（高浸透圧）が必要であったことから糖の細胞障害性メカニズムは浸透圧のみでは説明できないとしている⁴³⁾。質量基準では Man の安全性が最も低かったため、分子あたりの安全性は糖の中に差はないものの、各種糖を同量吸入した際には Man

が最も安全性が低いことが示された (Table 4)。疎水性アミノ酸に関してはモル濃度基準では比較的安全性が高かったものの (Fig. 22b)、質量基準では Phe が今回用いた SDS を除く賦形剤の中で最も安全性が低かった (Table 4)。CyDs は濃度を増加させると急激に細胞障害性を示し、モル濃度基準では今回用いた賦形剤の中で最も安全性が低かった。天然 CyDs (α -, β -, and γ -CyD)の中では γ -CyD が最も安全だった。さらに、水溶性が増加した CyDs (HP- β -CyD、HP- γ -CyD)は対応する天然 CyDs よりも安全だった (Fig. 22 (c), Table 4)。一般的に、CyDs は脂質の可溶化能に起因する細胞膜の構造変化を引き起こし、 γ -CyD は天然 CyDs の中で最も可溶化能が低いことが報告されており⁸⁵⁾、溶解性が高い HP- γ -CyD は細胞膜成分との相互作用が低下したと考えられる。

ALI を応用した粉末微粒子の安全性を評価するために、ALI において溶液の安全性を評価することで従来の評価系と比較を行ったところ、ほとんどの賦形剤で飽和溶解度に近い曝露濃度においても細胞生存率の低下を引き起こさず、濃度依存的な細胞生存率の減少を示したものは α -CyD、HP- β -CyD のみだった (Fig. 23)。従来の評価系において安全性の低かった Phe、 β -CyD においては、Phe は飽和溶解度に近い曝露濃度において若干の細胞生存率の減少を引き起こしたものの、顕著な細胞障害性は認められなかった。いずれも培地への溶解度が低いため、細胞障害性を示すために十分な溶質量を曝露できなかったためであると考えられる。この ALI の感受性の低下はヒト気道上皮がん細胞である Calu-3 細胞においても同様の結果が観察されている (data not shown)。しかし、Scherliess 氏は Calu-3 細胞において Lac を用いた際に Transwell®で培養された細胞層の方が 96 well プレートで培養された細胞よりもわずかに感受性が良好だったことを報告している⁴³⁾。今回の検討ではいずれの賦形剤においても ALI の方が感受性が低下しており、その程度は賦形剤により異なるものの、少なくとも約 2 倍は低下しており (Table 4)、この結果の差は Scherliess と今回の細胞培養条件及び/又は試料曝露・評価条件の違いに起因するかもしれない。

ALI の低い感受性の原因を解明するために、細胞生存率に対する細胞数、曝露時間、血清の存在、賦形剤の透過の影響を検討した。ALI のウェル内の播種細胞密度は 96 well と比較して約 15 倍高く、播種から実験に用いるまでの培養期間においても少なくとも 4 倍は長いため、実験時の細胞密度は二つの評価系間でかなり異なってくる。そのため、細胞生存率に対する細胞数の影響を検討するために、96 well プレートに様々な細胞数 ($4, 8, 20 \times 10^3$ cells/well)で播種された細胞に Man、Phe 及び HP- β -CyD 溶液を適用し、細胞生存率を評価した。その結果、播種細胞数は細胞生存率に対し、有意な影響はなかったことから、ALI の感受性低下に対する細胞数の影響は小さいことが示された (Fig. 24)。細胞生存率に対する曝露時間及び血清の存在の影響を検討するために、曝露条件を変えて (4 時

間 FBS 有り、4 時間 FBS 無し、48 時間 FBS 有り)、細胞生存率を評価した。その結果、Man 溶液を曝露された細胞の生存率は基本的に曝露時間及び血清の影響を受けなかったものの、200 mM においてのみ有意な影響が観察された (Fig 25a)。Phe 溶液は血清の有無に関わらず、4 時間では細胞生存率の減少は示さなかった (Fig. 25b)。Phe は細胞障害性を示すためには、細胞に取り込まれる必要があり、4 時間では細胞への取り込みが不十分であったために細胞障害性を示さなかったと推察している。一方、HP- β -CyD を曝露された細胞の生存率は曝露時間及び血清の影響を受けた (Fig. 25c)。HP- β -CyD は血漿中のアルブミンに結合することで可溶化能を減弱させることが報告されている⁸⁶⁾。上記のように細胞生存率に対する血清の影響は賦形剤ごとに異なるものの、血清の影響のなかった Man においても ALI では感受性が低下していることから、ALI の感受性低下に対する血清の影響は小さいことが示された。

96 well の粘膜表面に適用された賦形剤は細胞内を通過及び蓄積されるものの、細胞はウェルの底に播種されているため、細胞を通して透過することができない。一方、ALI の粘膜表面に適用された賦形剤は細胞を透過できる。細胞生存率に対する賦形剤の透過の影響を検討するために、ALI の漿膜側から培地を取り除き (ALI without permeating)、粘膜側に Man、Phe 及び HP- β -CyD 溶液を適用し、細胞生存率を評価した。その結果、ALI without permeating に試料溶液曝露後の細胞生存率は ALI よりも低く、賦形剤の透過が ALI の感受性を低下させることが示された (Fig. 26)。粘膜側に高濃度で曝露された賦形剤は漿膜側へ透過することで、細胞内に蓄積される賦形剤が減少していると考えられる。一方、ALI without permeating に試料溶液曝露後の細胞生存率は 96 well よりも高かったことから、Transwell®で培養されることは細胞生存率に影響を及ぼすことが示された (Fig. 26)。96 well と ALI における細胞培養は細胞の密度以外にも培養期間が異なり、特に ALI のようにコンフルエント状態に達した細胞は分化が誘導される⁸⁷⁾。コンフルエント状態で 4-11 日間培養することによる細胞層の形成などの細胞の分化が細胞の感受性を低下させたと考えられる。

吸入剤が実際に適用される呼吸器系は ALI のように呼吸器系組織として膜状に分化しており、漿膜側への膜透過を伴うため、96 well よりも ALI の方が評価系として適していると考えられる。

粉末微粒子の安全性を評価するために、ALI で培養した細胞層に溶液及び粉末微粒子を適用した。また、細胞層上に適用された粉末微粒子を血清不含の培地で溶解することで噴霧時の物理的刺激の影響を検討した。その結果、Man 粉末微粒子は溶液と比較して細胞生存率を低下させ、一方、Man 粉末微粒子に起因する細胞生存率の低下は細胞層上で粉末微粒子を溶解することにより消失した (Fig. 27)。これらの結果から、粉末微粒子による細胞生存率の低下は粉末微粒

子添加による物理的刺激に起因するものではないことが示された。粉末微粒子添加による細胞生存率の低下は、粉末微粒子の直接添加により細胞層上に局所的な賦形剤の高濃度溶液が形成されることによることが考えられる。他の賦形剤についても同様の検討を行い、ALI に曝露された Man 及び他の賦形剤の溶液及び粉末微粒子製剤の LD50 値を算出した。その結果、粉末微粒子による細胞生存率の低下は Leu、Ile を除く全ての賦形剤で認められた (Table 5)。しかし、 β -CyD 粉末微粒子はあまり細胞生存率を低下させなかった。Leu、Ile、 β -CyD は本研究で用いた賦形剤の中では比較的溶解性が低く、これが粉末微粒子の安全性に影響を及ぼしている可能性がある。

粉末微粒子の安全性は必ずしも溶液の安全性と関連しなかったものの、ALI で培養した細胞層は従来の細胞培養系よりも生体内環境をより反映しており、評価系としてより適していると考えられる。そのため、ALI における粉末微粒子の安全性評価の結果はより妥当であると考えられる。ALI システムの妥当性を検証するために、小動物を用いた賦形剤の *in vivo* 毒性評価結果との比較検討が必要である。

IV.5 結論

本章では粉末微粒子製剤の安全性を評価するための ALI を適用するために、賦形剤溶液を用いて 96 well 及び ALI で異なる評価系間の安全性の結果を比較した。ALI の感受性は 96 well で培養されたものよりも低く、透過が可能であることに起因する細胞内の賦形剤の蓄積の低下によるものであると考えられる。ALI で評価された粉末微粒子の安全性は溶液よりも低く、少量の粘液で溶解して形成される賦形剤の高濃度溶液が起因していると考えられる。粉末微粒子製剤の安全性の低下の程度は賦形剤間で異なり、必ずしも溶液の結果と関連するものではなかった。本章は粉末微粒子製剤の安全性は溶液の結果を外挿するのではなく、ALI のように粉末微粒子製剤を用いて評価されるべきであることを提唱するものである。

V 総括

小動物を用いた *in vivo* における吸入粉末剤の生物学的作用評価においては投与量を厳密に制御/把握することが困難であるため、投与量に対する生物学的作用を評価することが困難であった。そこで、本論文では肺内環境を反映する気液界面細胞培養系と均一に効率的に粉末微粒子を分散添加可能な新規粉末微粒子分散添加デバイスを組み合わせることで粉末微粒子製剤の生物学的作用評価系を確立するとともに、粉末微粒子製剤の薬物吸収特性及び安全性を評価した。

第一章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の新規評価系の確立

粉末微粒子製剤を細胞層に簡便に直接かつ均一に分散添加可能な新規粉末微粒子分散添加用デバイスを新たに作成し、粉末微粒子の充填量と圧縮空気量を最適化した。新規粉末微粒子分散添加用デバイスの最適化された条件では従来の大掛かりな装置や市販の粉末微粒子分散添加デバイスと比較して高い沈着効率を示した。また、新規粉末微粒子分散添加用デバイスを用いた粉末微粒子の分散添加は細胞層に大きな影響を与えなかったことから、粉末微粒子を細胞層表面に分散添加するための有用なツールであることが示された。さらに、気液界面細胞培養系の培養条件を最適化することで安定した気液界面培養細胞層が得られた。新規粉末微粒子分散添加デバイスの分散添加条件と気液界面細胞培養系の培養条件を最適化することにより、気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の新規評価法を確立した。この評価法を応用することにより、従来の *in vivo*、*in vitro* の評価系よりもより厳密で実作用環境を反映した粉末微粒子製剤の生物学的作用評価が可能となり、今後の吸入剤開発に対する有益な情報を提供することが可能となると考えられる。

第二章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の吸収特性評価

第一章で確立した評価系を用いて粉末微粒子製剤の吸収特性について評価したところ、粉末微粒子製剤はタイトジャンクション開口及び細胞障害性を伴って吸収促進効果を示す吸収促進剤とは異なり、薬物の分子量に依存せず、タイトジャンクション開口及び細胞障害性を伴うことなく、吸収促進剤と同程度以上の透過性亢進効果及び高い細胞内移行性を示した。その透過性/細胞内移行性亢進効果に及ぼす能動輸送の寄与は小さく、細胞内及び細胞間隙の両経路の透過性が亢進していたことから、粉末微粒子製剤が細胞層上で局所的な高濃度条件を生じることによる受動輸送の亢進によるものであると考えられる。この粉末微粒子製剤の高い薬物透過性/細胞内移行性は難吸収性薬物の全身送達/肺組織への移行に対し、大変有用であり、今後の吸入粉末剤開発にとって有益な情報になると考えられる。

第三章 気液界面細胞培養系を応用した粉末微粒子製剤の安全性評価

第一章で確立した評価系を用いて粉末微粒子製剤の安全性を評価するために、賦形剤溶液を用いて 96 well 及び ALI で異なる評価系間の安全性の結果を比較した。ALI の感受性は 96 well で培養されたものよりも低く、賦形剤が細胞を透過することが可能であることに起因する細胞内の賦形剤の蓄積の低下によるものであると考えられる。ALI で評価された粉末微粒子の安全性は溶液よりも低く、少量の粘液で溶解して形成される賦形剤の高濃度溶液が起因していると考えられる。粉末微粒子の安全性の低下の程度は賦形剤間で異なり、溶液の結果と必ずしも相関するものではなかった。これらは粉末微粒子製剤の安全性は溶液の結果を外挿するのではなく、ALI のように粉末微粒子製剤を用いて評価されるべきであることを提唱するものである。

以上のことから、気液界面細胞培養系の培養条件を最適化し、粉末微粒子製剤の分散添加を可能にすることで粉末微粒子製剤の生物学的作用評価が可能となった。また、溶液と粉末微粒子製剤の生物学的作用は異なり、今後の吸入粉末剤開発においては溶液の結果を外挿するのではなく、粉末微粒子製剤を用いて評価することの重要性が明らかとなった。粉末微粒子製剤は溶液よりも高い薬物膜透過性/細胞内移行性を示したことから、吸入粉末剤は肺を介した薬物の全身送達及び肺組織移行性が期待できるものであるが、同時に安全性面において課題が残るものであった。粉末微粒子製剤の安全性は添加剤間で異なったことから、適切な添加剤を用いることでより安全でより薬物の全身送達性/肺組織移行性の高い有効な吸入粉末剤の開発が可能になると考えられる。本研究は今後の吸入剤開発に有益な情報を提供するものであると考えられる。

VI 謝辞

本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました名城大学大学院薬学研究科 岡本浩一教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究の遂行並びに論文の作成にあたって、終始親身に御指導、ご助言を賜りました名城大学大学院薬学研究科 加藤美紀准教授に深謝いたします。論文の作成に当たり懇切丁寧な御指導、御助言をいただきました名城大学大学院薬学研究科 丹羽敏幸教授に深く感謝の意を表します。また、本研究に関して貴重な御助言を賜りました名城大学薬学部 奥田知将助教に深く感謝致します。

本研究の全般にわたり御協力頂きました名城大学薬学部薬物動態制御学研究室の出身者各位、所属学生各位に感謝致します。

VII 参考文献

1. F.Y. Liu, Z. Shao, D.O. Kildsig, A.K. Mitra : Pulmonary delivery of free and liposomal insulin.
Pharm Res., 10, 228–32 (1993)
2. J.S. Patton : Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs.
Adv Drug Deliv Rev., 19, 3–36 (1996)
3. Y. Matsukawa, V.H. Lee, E.D. Crandall, K.J. Kim : Size-Dependent Dextran Transport across Rat Alveolar Epithelial Cell Monolayers.
J Pharm Sci., 86, 305-9 (1997)
4. H. Okamoto, M. Aoki, K. Danjo : A novel apparatus for rat in vivo evaluation of dry powder formulations for pulmonary administration.
J Pharm Sci., 89, 1028-35 (2000)
5. J.S. Patton, R. Platz : Pulmonary delivery of peptides and proteins for systemic action.
Adv Drug Deliv Rev., 8, 179–96 (1992)
6. S. Sanjar, S. Matthews : Treating systemic diseases via the lung.
J. Aerosol Med., 14, S51–8 (2001)
7. Y.W. Qi, G.L. Zhao, D.F. Liu, Z. Shriver, M. Sundaram, S. Sengupta, G. Venkataraman, R Langer, R Sasisekharan : Delivery of therapeutic levels of heparin and low-molecular-weight heparin through a pulmonary route.
PNAS, 101, 9867-72 (2004)
8. H. Okamoto, K. Danjo : Application of supercritical fluid to preparation of powders of high-molecular weight drugs for inhalation.
Adv Drug Deliv Rev., 60, 433–46 (2008)
9. E. Guenette, A. Barrett, D. Kraus, R. Brody, L. Harding, G. Magee : Understanding the effect of lactose particle size on the properties of DPI formulations using experimental design.
Int J Pharm., 380, 80-8 (2009)
10. M.J. Telko, A.J. Hickey : Dry powder inhaler formulation.
Respir Care., 50, 1209-27 (2005)
11. P.M. Young, P. Kwok, H. Adi, H.K. Chan, D. Traini : Lactose composite carriers for respiratory delivery.
Pharm Res., 26 802-10 (2009)
12. M.M. Bailey, E.M. Gorman, E.J. Munson, C. Berkland : Pure insulin nanoparticle agglomerates for pulmonary delivery.

- Langmuir*, 24, 13614-20 (2008)
13. R.P. Raffin, P. Colombo, F. Sonvico, A. Rossi, D.S. Jornada, A.R. Pohlmann, S.S. Guterres : Agglomerates containing pantoprazole microparticles: modulating the drug release.
AAPS PharmSciTech, 10, 335-45 (2009)
 14. P. Russo, C. Sacchetti, I. Pasquali, R. Bettini, G. Massimo, P. Colombo, A. Rossi : Primary microparticles and agglomerates of morphine for nasal insufflation.
J Pharm Sci., 95, 2553-61 (2006)
 15. A.H. Chow, H.H. Tong, P. Chattopadhyay, B.Y. Shekunov : Particle engineering for pulmonary drug delivery.
Pharm Res., 24, 411-37 (2007)
 16. S. Onoue, H. Sato, Y. Kawabata, T. Mizumoto, N. Hashimoto, S. Yamada : In vitro and in vivo characterization on amorphous solid dispersion of cyclosporine A for inhalation therapy.
J Control Release, 138, 16-23 (2009)
 17. K. Bürki, I. Jeon, C. Arpagaus, G. Betz : New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer.
Int J Pharm., 408, 248-56 (2011)
 18. D.E. Geller, J. Weers, S. Heuerding : Development of an inhaled dry-powder formulation of tobramycin using PulmoSphere™ technology.
J Aerosol Med Pulm Drug Deliv., 24, 175-82 (2011)
 19. L.M. Nolan, L. Tajber, B.F. McDonald, A.S. Barham, O.I. Corrigan, A.M. Healy : Excipient-free nanoporous microparticles of budesonide for pulmonary delivery.
Eur J Pharm Sci., 37, 593-602 (2009)
 20. S. Claus, T. Schoenbrodt, C. Weiler, W. Friess : Novel dry powder inhalation system based on dispersion of lyophilisates.
Eur J Pharm Sci., 43, 32-40 (2011)
 21. K. Mohri, T. Okuda, A. Mori, K. Danjo, H. Okamoto : Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation.
J Control Release, 144, 221-6 (2010)
 22. W. Mueannoom, A. Srisongphan, K.M. Taylor, S. Hauschild, S. Gaisford : Thermal ink-jet spray freeze-drying for preparation of excipient-free salbutamol sulphate for inhalation.

- Eur J Pharm Biopharm.*, 80, 149-55 (2012)
23. V. Saluja, J.P. Amorij, J.C. Kapteyn, A.H. de Boer, H.W. Frijlink, W.L. Hinrichs : A comparison between spray drying and spray freeze drying to produce an influenza subunit vaccine powder for inhalation.
J Control Release, 144, 127-33 (2010)
24. A. Bouchard, N. Jovanović, G.W. Hofland, W. Jiskoot, E. Mendes, D.J. Crommelin, G.J. Witkamp : Supercritical fluid drying of carbohydrates: selection of suitable excipients and process conditions.
Eur J Pharm Biopharm., 68, 781-94 (2008)
25. E. Reverchon, G. Della Porta, P. Pallado : Supercritical antisolvent precipitation of salbutamol microparticles.
Powder Technol., 114, 17-22 (2001)
26. H. Okamoto, K. Danjo : Application of supercritical fluid to preparation of powders of high-molecular weight drugs for inhalation.
Adv Drug Deliv Rev., 60, 433-46 (2008)
27. H. Todo, H. Okamoto, K. Iida, K. Danjo : Improvement of stability and absorbability of dry insulin powder for inhalation by powder-combination technique.
Int J Pharm., 271, 41-52 (2004)
28. S. Hein, M. Bur, U.F. Schaefer, C.M. Lehr : A new Pharmaceutical Aerosol Deposition Device on Cell Cultures (PADD OCC) to evaluate pulmonary drug absorption for metered dose dry powder formulations.
Eur J Pharm Biopharm., 77, 132-8 (2011)
29. M.P. Timsina, G.P. Martin, C. Marriott, D. Ganderton, M. Yianneskis : Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers.
Int J Pharm., 101, 1-13 (1994)
30. M. Taki, C. Marriott, X.M. Zeng, G.P. Martin : Aerodynamic deposition of combination dry powder inhaler formulations in vitro: a comparison of three impactors.
Int J Pharm., 388, 40-51 (2010)
31. M.J. Telko, A.J. Hickey : Dry powder inhaler formulation.
Respir Care., 50, 1209-27 (2005)
32. M. Beck-Broichsitter, J. Gauss, C.B. Packhaeuser, K. Lahnstein, T. Schmehl, W. Seeger, T. Kissel, T. Gessler. : Pulmonary drug delivery with aerosolizable nanoparticles in an ex vivo lung model.
Int J Pharm., 367, 169-78 (2009)

33. S.A. Cryan, N. Sivadas, L. Garcia-Contreras : In vivo animal models for drug delivery across the lung mucosal barrier.
Adv Drug Deliv Rev., 59, 1133–51 (2007)
34. H. Eixarch, E. Haltner-Ukomadu, C. Beisswenger, U. Bock : Drug Delivery to the Lung: Permeability and Physicochemical Characteristics of Drugs as the Basis for a Pulmonary Biopharmaceutical Classification System (pBCS).
J Epithelial Biol Pharmacol., 3, 1-14 (2010)
35. M. Sakagami : In vivo, in vitro and ex vivo models to assess pulmonary absorption and disposition of inhaled therapeutics for systemic delivery.
Adv Drug Deliv Rev., 58, 1030-60 (2006)
36. R.T. Borchardt : The application of cell culture systems in drug discovery and development.
J Drug Target, 3, 179–82 (1995)
37. K.A. Foster, M.L. Avery, M. Yazdanian, K.L. Audus : Characterization of the Calu-3 cell line as a tool to screen pulmonary drug delivery.
Int J Pharm., 208, 1–11 (2000)
38. M. Haghi, D. Traini, M. Bebawy, P.M. Young : Deposition, Diffusion and Transport Mechanism of Dry Powder Microparticulate Salbutamol, at the Respiratory Epithelia.
Mol Pharmaceutics, 9, 1717–26 (2012)
39. M. Haghi, D. Traini, D.S. Postma, M. Bebawy, P.M. Young : Fluticasone uptake across Calu-3 cells is mediated by salmeterol when deposited as a combination powder inhaler.
Respirology, 18, 1197–201 (2013)
40. H.X. Ong, D. Traini, R. Salama, S.D. Anderson, E. Daviskas, P.M. Young : The Effects of Mannitol on the Transport of Ciprofloxacin across Respiratory Epithelia.
Mol Pharmaceutics, 10, 2915–24 (2013)
41. A.G. Lenz, E. Karg, B. Lentner, V. Dittrich, C. Brandenberger, B. Rothen-Rutishauser, H. Schulz, G.A. Ferron, O. Schmid : A dose-controlled system for air-liquid interface cell exposure and application to zinc oxide nanoparticles.
Part Fibre Toxicol., 6, 1-17 (2009)
42. C.I. Grainger, L.L. Greenwell, G.P. Martin, B. Forbes : The permeability of large molecular weight solutes following particle delivery to

air-interfaced cells that model the respiratory mucosa.

Eur J Pharm Biopharm., 71, 318-24 (2009)

43. R. Scherliess : The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity in vitro on respiratory epithelial cells.

Int J Pharm., 411, 98-105 (2011)

44. Y.F. Maa, P.A. Nguyen. T. Sweeney, S.J. Shire, C.C. Hsu : Protein inhalation spray drying vs spray freeze drying.

Pharm Res., 16, 249-54 (1999)

45. Y.F. Maa, M. Ameri, C. Shu, L.G. Payne, D. Chen : Influenza Vaccine Powder Formulation Development: Spray-Freeze-Drying and Stability Evaluation.

J Pharm Sci., 93, 1912-23 (2004)

46. N.R. Mathias, J. Timoszyk, P.I. Stetsko, J.R. Megill, R.L. Smith, D.A. Wall : Permeability characteristics of Calu-3 human bronchial epithelial cells: in vitro-in vivo correlation to predict lung absorption in rats.

J Drug Target, 10, 31-40 (2002)

47. C. Ehrhardt, C. Kneuer, J. Fiegel, J. Hanes, U.F. Schaefer, K.J. Kim, C.M. Lehr : Influence of apical fluid volume on the development of functional intercellular junctions in the human epithelial cell line 16HBE14o-: implications for the use of this cell line as an in vitro model for bronchial drug absorption studies.

Cell Tissue Res., 308, 391-400 (2002)

48. K.J. Kim, Z. Borok, E.D. Crandall : A useful in vitro model for transport studies of alveolar epithelial barrier.

Pharm. Res., 18, 253-5 (2001)

49. N.R. Mathias, F. Yamashita, V.H.L. Lee : Respiratory epithelial cell culture models for evaluation of ion and drug transport.

Adv. Drug Deliv. Rev., 22, 215-49 (1996)

50. D. Cooney, M. Kazantseva, A.J. Hickey : Development of a size-dependent aerosol deposition model utilising human airway epithelial cells for evaluating aerosol drug delivery.

ATLA, 32, 581-90 (2004)

51. A. Grenha, C.I. Grainger, L.A. Dailey, B. Seijo, G.P. Martin, C. Remunan-Lopez, B. Forbes : Chitosan nanoparticles are compatible with respiratory epithelial cells in vitro.

Eur J Pharm Sci., 31, 73-84 (2007)

52. M. Bhat, D. Toledo-Velasquez, L. Wang, C.J. Malanga, J.K.H. Ma, Y. Rojanasakul : Regulation of tight junction permeability by calcium chelators and cell cytoskeleton in rabbit tracheal epithelium.
Pharm Res., 10, 991–7 (1993)
53. J.V. Castell, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechón : Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach.
Exp Toxicol Pathol., 57, 189-204 (2005)
54. S. Kobayashi, S. Konda, K. Juni : Pulmonary delivery of salmon calcitonin dry powders containing absorption enhancers in rats.
Pharm. Res., 13, 80-3 (1996)
55. T. Yata, Y. Endo, M. Sone, K. Ogawara, K. Higaki, T. Kimura : Amino Acids Protect Epithelial Cells From Local Toxicity by Absorption Enhancer, Sodium Laurate.
J Pharm Sci., 90, 1456-65 (2001)
56. M. Tomita, M. Hayashi, S. Awazu : Absorption-enhancing mechanism of sodium caprate and decanoylcarnitine in Caco-2 cells.
J Pharmacol Exp Ther., 272, 739-43 (1995)
57. E.K. Anderberg, T. Lindmark, P. Artursson. : Sodium caprate elicits dilatations in human intestinal tight junctions and enhances drug absorption by the paracellular route.
Pharm Res., 10, 857–64 (1993)
58. S.M. Krug, M. Amasheh, I. Dittmann, I. Christoffel, M. Fromm, S. Amasheh : Sodium caprate as an enhancer of macromolecule permeation across tricellular tight junctions of intestinal cells.
Biomaterials, 34, 275-82 (2013)
59. M. Sakai, T. Imai, H. Ohtake, M. Otagiri : Cytotoxicity of absorption enhancers in Caco-2 cell monolayers.
J Pharm Pharmacol., 50, 1101–8 (1998)
60. M. Gumbleton, A. J. Hollins, Y. Omid, L. Campbell, G. Taylor : Targeting caveolae for vesicular drug transport.
J Control Release, 87, 139–51 (2003)
61. L. Gonzguez-Mariscal, B. Chavez de Ramfrez, M. Cerejido. Effect of Temperature on the Occluding Junctions of Monolayers of Epithelioid Cells (MDCK).
J Membrane Biol., 79, 175-84 (1984)
62. M. Sakai, T. Imai, H. Ohtake, H. Azuma, M. Otagiri : Effects of

Absorption Enhancers on the Transport of Model Compounds in Caco-2 Cell Monolayers: Assessment by Confocal Laser Scanning Microscopy.

J Pharm Sci., 86, 779-85 (1997)

63. M.A. Hurni, A.B. Noach, M.C. Blom-Rosemalen, A.G. de Boer, J.F. Nagelkerke, D.D. Breimer : Permeability Enhancement in Caco-2 Cell Monolayers by Sodium Salicylate and Sodium Taurodihydrofusidate: assessment of Effect-Reversibility and Imaging of Transepithelial Transport Routes by Confocal Laser Scanning Microscopy.

J Pharmacol Exp Ther., 267, 942-50 (1993)

64. P.M. Young, P. Kwok, H. Adi, H.K. Chan, D. Traini : Lactose composite carriers for respiratory delivery.

Pharm Res., 26, 802-10 (2009)

65. I. Saleem, H. Smyth, M. Telko : Prediction of dry powder inhaler formulation performance from surface energetics and blending dynamics.

Drug Dev Ind Pharm., 34, 1002-10 (2008)

66. N.Y. Chew, B.Y. Shekunov, H.H. Tong, A.H. Chow, C. Savage, J. Wu, H.K. Chan : Effect of Amino Acids on the Dispersion of Disodium Cromoglycate Powders.

J Pharm Sci., 94, 2289-300 (2005)

67. M.I. Amaro, L. Tajber, O.I. Corrigan, A.M. Healy : Co-spray dried carbohydrate microparticles: crystallisation delay/inhibition and improved aerosolization characteristics through the incorporation of hydroxypropyl- β -cyclodextrin with amorphous raffinose or trehalose.

Pharm Res., 32, 180-95 (2015)

68. D.J. Cooney, A.J. Hickey : Cellular response to the deposition of diesel exhaust particle aerosols onto human lung cells grown at the air-liquid interface by inertial impaction.

Toxicol In Vitro, 8, 1953-65 (2011)

69. Y. Xie, N.G. Williams, A. Tolic, W.B. Chrisler, J.G. Teeguarden, B.L. Maddux, J.G. Pounds, A. Laskin, G. Orr : Aerosolized ZnO nanoparticles induce toxicity in alveolar type II epithelial cells at the air-liquid interface.

Toxicol Sci., 125, 450-61 (2012)

70. E. Fröhlich, G. Bonstingl, A. Höfler, C. Meindl, G. Leitinger, T.R. Pieber, E. Roblegg : Comparison of two in vitro systems to assess cellular effects of nanoparticles-containing aerosols.

- Toxicol In Vitro*, 27, 409-17 (2013)
71. K. Komori, K. Murai, S. Miyajima, T. Fujii, S. Mohri, Y. Ono, Y. Sakai :
Development of an in vitro Batch-type Closed Gas Exposure Device with
an Alveolar Epithelial Cell Line, A549, for Toxicity Evaluations of
Gaseous Compounds.
Anal Sci., 24, 957-62 (2008)
72. C. Mathis, C. Poussin, D. Weisensee, S. Gebel, A. Hengstermann, A.
Sewer, V. Belcastro, Y. Xiang, S. Ansari, S. Wagner, J. Hoeng, M.C.
Peitsch : Human bronchial epithelial cells exposed in vitro to cigarette
smoke at the air-liquid interface resemble bronchial epithelium from
human smokers.
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol., 304, L489-503 (2013)
73. J. Rach, J. Budde, N. Möhle, M. Aufderheide : Direct exposure at the
air-liquid interface: evaluation of an in vitro approach for simulating
inhalation of airborne substances.
J Appl Toxicol., 34, 506-15 (2014)
74. M. Eghbali, B. Birnir, P.W. Gage : Conductance of GABAA channels
activated by pentobarbitone in hippocampal neurons from newborn rats.
J Physiol., 552, 13-22 (2003)
75. J.G. Lim, H.Y. Lee, J.E. Yun, S.P. Kim, J.W. Park, S.I. Suh, B.C. Jang,
C.H. Cho, J.H. Bae, S.S. Kim, J. Han, M.J. Park, D.K. Song : Taurine
block of cloned ATP-sensitive K⁺ channels with different sulfonylurea
receptor subunits expressed in *Xenopus laevis* oocytes.
Biochem Pharmacol., 68, 901-10 (2004)
76. K. Yamaoka, Y. Tanigawara, T. Nakagawa, T. Uno : A pharmacokinetic
analysis program (multi) for microcomputer.
J Pharmacobiodyn., 4, 879-85 (1981)
77. T. Mosmann : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival:
application to proliferation and cytotoxicity assays.
J Immunol Methods, 65, 55-63 (1983)
78. S.J. Tabrizi, M. Orth, J.M. Wilkinson, J.W. Taanman, T.T. Warner, J.M.
Cooper, A.H. Schapira : Expression of mutant alpha-synuclein causes
increased susceptibility to dopamine toxicity.
Hum Mol Genet., 9, 2683-9 (2000)
79. C.J. Yeh, B.L. Hsi, W.P. Faulk : Propidium iodide as a nuclear marker in
immunofluorescence. II. Use with cellular identification and viability

studies.

J Immunol Methods, 43, 269-75 (1981)

80. J. Weyermann, D. Lochmann, A. Zimmer : A practical note on the use of cytotoxicity assays.

Int. J. Pharm., 288, 369-76 (2005)

81. T. Eldem, P. Speiser, A. Hincal : Optimization of spray-dried and -congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy.

Pharm Res., 8, 47-54 (1991)

82. M. Jalalipour, A.R. Najafabadi, K. Gilani, H. Esmaily, H. Tajerzadeh : Effect of dimethyl-beta-cyclodextrin concentrations on the pulmonary delivery of recombinant human growth hormone dry powder in rats.

J Pharm Sci., 97, 5176-85 (2008)

83. J. Gliniski, G.C. Healy, J.K. Platten : Surface properties of aqueous solutions of L-leucine.

Biophys Chem., 84, 99-103 (2000)

84. Y. You, M. Zhao, G. Liu, X. Tang : Physical characteristics and aerosolization performance of insulin dry powders for inhalation prepared by a spray drying method.

J Pharm Pharmacol., 59, 927-34 (2007)

85. L. Matilainen, T. Toropainen, H. Vihola, J. Hirvonen, T. Järvinen, P. Jarho, K. Järvinen : In vitro toxicity and permeation of cyclodextrins in Calu-3 cells.

J Control Release, 126, 10-6 (2008)

86. S.V. Kurkov, T. Loftsson, M. Messner, D. Madden : Parenteral delivery of HPβCD: effects on drug-HSA binding.

AAPS Pharm Sci Tech., 11, 1152-8 (2010)

87. S. Ray, H.I. Swanson : Activation of the aryl hydrocarbon receptor by TCDD inhibits senescence: a tumor promoting event?

Biochem Pharmacol., 77, 681-8 (2009)