

平成 2 7 年度 学 位 論 文

論 文 題 目

〈邦 文〉

吸入粉末剤の適用拡大を目的とした新規吸入
粉末微粒子の開発

〈欧 文〉

Development of New Inhalable Powders for
Increased Application of Dry Powder Inhalers

名城大学大学院 薬学研究科 薬学専攻 博士課程

氏 名

大竹 裕子

I	緒論	1
II	第一章 噴霧急速凍結乾燥法による吸入特性が吸入パターンに依存しない吸入粉末 微粒子の開発	4
II.1	緒言	4
II.2	実験方法	5
II.2.1	試料	5
II.2.2	SFD 微粒子の調製	5
II.2.3	SFD 微粒子の粒子形状評価	6
II.2.4	SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定	7
II.2.5	ヒト吸入パターン再現装置を用いた吸入パターンの再現	7
II.2.6	ヒト吸入パターン再現装置を用いたツインステージリキッドインピンジャーに よる吸入特性評価	8
II.2.7	SFD 微粒子の付着性評価	8
II.2.8	SFD 微粒子の帯電性評価	9
II.2.9	統計処理	9
II.3	結果	10
II.3.1	SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布	10
II.3.2	ヒト吸入パターン再現装置を用いた際の <i>in vitro</i> 吸入特性評価	11
II.3.3	異なる吸入デバイスを用いた際の <i>in vitro</i> 吸入特性評価	15
II.3.4	SFD 微粒子の付着性および帯電性評価	16
II.4	考察	18
II.5	結論	20
III	第二章 優れた吸入特性および耐吸湿性を示す吸入粉末微粒子の開発	21
III.1	緒言	21
III.2	実験方法	21
III.2.1	試料	21
III.2.2	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の調製	21
III.2.3	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子形状評価	21
III.2.4	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定	22
III.2.5	疎水性アミノ酸の結晶性評価	22
III.2.6	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の <i>in vitro</i> 吸入特性評価	22
III.2.7	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の加湿保存	22
III.3	結果	23
III.3.1	疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布	23
III.3.2	優れた吸入特性を示す疎水性アミノ酸の探索	25
III.3.3	PFR 変化時の <i>in vitro</i> 吸入特性変化	27

III.3.4	異なる吸入デバイスを用いた際の吸入特性変化	28
III.3.5	加湿前後における吸入特性, 粒子形状, 結晶性変化	28
III.4	考察	31
III.5	結論	33
IV	第三章 噴霧急速凍結乾燥微粒子の気中構造崩壊／保持性による吸入特性への影響	34
IV.1	緒言	34
IV.2	実験方法	35
IV.2.1	試料	35
IV.2.2	多孔性の程度が異なる SFD 微粒子の調製	35
IV.2.3	SEM による粒子形状評価	35
IV.2.4	LMS を用いた粒子径および粒度分布測定	35
IV.2.5	Andersen Cascade Impactor (ACI)を用いた際の <i>in vitro</i> 吸入特性評価	35
IV.2.6	吸入特性評価時の ACI 各 Stage における沈着粒子形状評価	36
IV.2.7	統計処理	36
IV.3	結果	37
IV.3.1	SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布	37
IV.3.2	ACI を用いた際の PER 変化時の <i>in vitro</i> 吸入特性評価 (吸入抵抗の大きいデバイス: Reverse)	38
IV.3.3	吸入沈着挙動と沈着粒子形状の関係性 (吸入抵抗の大きいデバイス: Reverse)	39
IV.3.4	ACI を用いた際の PER 変化時の <i>in vitro</i> 吸入特性評価 (吸入抵抗の小さいデバイス: Single)	40
IV.3.5	吸入沈着挙動と沈着粒子形状の関係性 (吸入抵抗の小さいデバイス: Single) ...	42
IV.4	考察	46
IV.5	結論	48
V	総括	49
VI	謝辞	52
VII	参考文献	53

I 緒論

呼吸器内へ直接かつ非侵襲的に薬物を送達可能な吸入剤は、気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患、結核などを代表とする局所性疾患治療のみならず、糖尿病などの全身性疾患治療の投与剤形として注目されている [1-3]. 呼吸器系での局所作用を期待する場合は作用部位に直接薬物を送達することが可能であり、標的部位にのみ高濃度で薬物を送達でき、全身循環系への薬物移行による全身性の副作用を軽減できるという利点を有している [4]. また、気管支喘息の治療に汎用されている β_2 刺激性気管支拡張薬の吸入剤は、経口薬と比較して効果の発現が速いことも利点として挙げられる [5]. 一方で、全身作用を期待する場合は、吸入部位である肺の組織学的特徴からその有用性が示される. 呼吸器系は、気管、気管支、細気管支、終末気管支と分岐し、肺胞へと至るが、その肺胞は成人で約 100 m^2 と小腸に匹敵する表面積を有しており、薄い肺胞上皮と近接する毛細血管を経由して豊富な血流量を誇る肺循環系に接続しており [6], 薬物透過性が高く、到達した薬物を速やかに全身循環系へ移行させることが可能である. 2006 年 1 月にファイザー社のインスリン吸入粉末剤 Exubera が米国と EU の一部の国で製造承認されたが、費用の面や安全性への懸念から売り上げが伸びず、2007 年 10 月に販売中止となった. しかし、2014 年 6 月にマンカインド社のインスリン吸入粉末剤 AFREZZA が米国の FDA による承認を受け、吸入粉末剤によるインスリン治療が行われており [7-10], 今後、全身性疾患治療薬の投与剤形として選択される機会が増えるのではないかと期待される. 現在市販化されている吸入剤として主に吸入エアゾール剤 (Metered-Dose Inhalers), 吸入液剤, 吸入粉末剤 (Dry Powder Inhalers: DPI) の 3 つが挙げられるが、DPI は薬剤噴霧と吸入動作との同調およびフロンガスなどの噴霧剤が不要であるという利点を有するため、近年、吸入剤の中で最も注目されている [11, 12]. しかしながら、DPI は薬剤の分散に一定以上の吸入能力が必要となるため、使用可能な患者に制約があることが問題となる [13]. また、強く吸引することが推奨されるために、口腔咽頭などへの薬剤の付着が多く、それらの問題を改善するための製剤設計が必要となる [14].

一般的に DPI に適した空気力学的粒子径 (Mass Median Aerodynamic Diameter: MMAD) は $1\text{-}6 \text{ }\mu\text{m}$ とされているが [4], この程度の幾何学的粒子径を有する粒子は付着凝集性が高く、分散性に乏しいため、実際に肺および肺深部に到達させることは難しい [15]. そのため、市販されている DPI の多くは、乳糖などの薬効のない粗大な粒子 (キャリア粒子) に微細な薬物粒子を付着させるキャリア法 [16-18] または微細化した薬物粒子を造粒する造粒法 [19-21] により調製した粉末微粒子を用いており、2 次粒子を形成することで幾何学的粒子径を増大させ、付着凝集性および分散性の改善を行っている. しかし、優れた

吸入特性を達成するためには吸入時に 2 次粒子が 1 次粒子へ再分散する必要があり、高い吸入流量および高解砕性能吸入デバイスが必要である [22]。そのため、キャリア型製剤は表面改質処理によりキャリア粒子表面を滑らかにすることで [23]、または粗大なキャリア粒子に小さな粒子をあらかじめ付着させてから薬物粒子を付着させることで [24]、キャリア粒子からの薬物粒子の分散性の改善を行っている。また、キャリア法および造粒法以外に多孔性微粒子が注目されている。多孔性微粒子は低密度かつ適度な流動性を示す幾何学的粒子径を有するため、粒子間付着力が低く、吸入に適した MMAD を得ることが可能である [25, 26]。多孔性微粒子の調製方法の 1 つとして、噴霧急速凍結乾燥 (Spray Freeze Drying: SFD) 法が挙げられる。SFD 法は噴霧工程と凍結乾燥工程を組み合わせた調製方法であり、得られる粒子は多孔性に富むため、粒子密度が低く、粒子同士の接触面積が小さいことから、高い分散性が期待できる [27]。

吸入粉末微粒子の新規調製法を探索する一方で、dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) や 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) などの脂質や L-ロイシン (Leu) や L-フェニルアラニン (Phe) などの疎水性アミノ酸などを代表とする分散補助剤を添加した吸入粉末微粒子の開発も行われている [28-31]。例として、噴霧乾燥 (Spray Drying: SD) 微粒子を調製する際、これらを添加することで、粒子表面に凹凸を有する粒子が形成されて粒子同士の接触部分が減少するため、付着凝集性が低下し、肺送達性が改善されたという報告がある [28-31]。

上述した製剤設計は吸入治療効果を決定づける因子の 1 つであり、また、肺治療域への薬物送達性が患者の吸入パターン [32, 33]、吸入デバイスの解砕性能 [34, 35] および気道の形状 [36] に影響を受けるという報告がある。

本論文は 3 章から構成されており、DPI 開発における“吸入剤応用に適した MMAD の獲得”と“付着凝集性の改善”の両課題の解決および患者の吸入パターンによる影響を受けやすいという吸入粉末剤の欠点克服を目的として、SFD 法により得られる多孔性微粒子に着目し、賦形剤の種類および比率、調製時の試料濃度を調節することで、吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性および耐吸湿性、効率的な肺深部送達性を発揮する吸入粉末微粒子の開発を試みた。

第一章では、分散補助剤である Leu を添加し、吸入パターンおよび吸入デバイスの変化による吸入特性への影響を検討した。その結果、Leu を一定量以上添加することで、吸入パターンおよび吸入デバイスに依らない優れた吸入特性を発揮する SFD 微粒子の開発に成功した。また、粒子間付着力および帯電性を評価することで Leu 添加による吸入特性改善機序を明らかにした。

第二章では SFD 法特有の多孔性構造に由来する“吸湿しやすさ”を改善する

ため、第一章で用いた Leu 添加量を増量させて SFD 微粒子を調製することで、優れた吸入特性および耐吸湿性を示す SFD 微粒子の開発を試みた。最初に Leu と同様の吸入特性改善効果が期待される 7 種類の疎水性アミノ酸の SFD 微粒子を調製し、吸入特性のスクリーニングを行った後、SFD 微粒子を加湿保存することで加湿保存前後の吸入特性、粒子形状、結晶性の評価を行った。

SFD 微粒子に関する研究を進める中、吸入気流中で粒子構造が部分的に崩壊するという興味深い現象を発見した。第三章では、崩壊しやすさと吸入特性の関係性を明らかにするために、試料調製時の濃度を変化させることで多孔性が異なる SFD 微粒子を調製し、吸入特性評価を包括的に行うことで、SFD 微粒子の吸入気流中での構造崩壊／保持性が吸入特性へ及ぼす影響について検討を行った。

なお、本論文は下記の論文を総括したものである。

- i) Hiroko Otake, Tomoyuki Okuda, Daiki Hira, Haruyoshi Kojima, Yasuhiro Shimada and Hirokazu Okamoto. Inhalable Spray-Freeze-Dried Powder with L-Leucine that Delivers Particles Independent of Inspiratory Flow Pattern and Inhalation Device. *Pharm. Res.*, in press.
- ii) Hiroko Otake, Tomoyuki Okuda and Hirokazu Okamoto. Development of Spray-Freeze-Dried Powders for Inhalation with High Inhalation Performance and Antihygroscopic Property. *Chem. Pharm. Bull.*, in press.

II 第一章 噴霧急速凍結乾燥法による吸入特性が吸入パターンに依存しない吸入粉末微粒子の開発

II.1 緒言

DPI 開発において最も大きな課題として“吸入剤応用に適した MMAD の獲得”と“付着凝集性の改善”が挙げられる．そのため，市販 DPI の多くは，キャリア法または造粒法により課題の克服を試みているが，これらの方法により調製された粉末微粒子は吸入時に高い吸入流量および解砕性能の高い吸入デバイスが必要であり，肺治療域への薬物送達性が患者の吸入パターンや吸入デバイスの解砕性能に影響を受けるという報告がある．

これらの課題を解決する方法として，多孔性微粒子が得られる SFD 法が注目され，吸入粉末微粒子としての実用化に向けた検討が行われている．また，吸入粉末微粒子の新規調製法を探索する一方で，DPPC や DOTAP などの脂質や Leu や Phe などの疎水性アミノ酸などを代表とする分散補助剤を添加した吸入粉末微粒子の開発も行われている．

本章では，吸入粉末微粒子開発における“吸入剤応用に適した MMAD の獲得”と“付着凝集性の改善”の解決および吸入粉末剤の欠点である“吸入パターンおよび吸入デバイスの影響を受けやすい”性質を改善することを目的として，分散補助剤である Leu を含む SFD 微粒子を調製し，当研究室で考案したヒト吸入パターン再現装置と様々な吸入抵抗を有する吸入デバイスを用い，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能が SFD 微粒子の吸入特性に与える影響について検討した．

II.2 実験方法

II.2.1 試料

モデル薬物として、蛍光物質であるフルオレセインナトリウム (FIna) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)を用いた。賦形剤として D-(-)-マンニトール (Man) (Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いた。分散補助剤として L-ロイシン (Leu) (Sigma-Aldrich Co., Ltd. St. Louis, MO, USA)を用いた。その他の試薬、溶液は特級または HPLC 用のものを用いた。

II.2.2 SFD 微粒子の調製

SFD 法の概略図を Fig. 1 に示した。SFD 法は噴霧工程と凍結乾燥工程の 2 工程を組み合わせた微粒子調製法であり、試料溶液を二流体ノズルを用いて液体窒素中に噴霧することで、液滴を瞬時に凍結させた後、得られた氷滴を凍結乾燥機 (EYELA DRC-1100 and FDC-2100, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)に移し、水分を昇華させることで中空多孔な球形粒子を得ることが可能である。各操作条件を Table 1 に示した。本研究で調製した SFD 微粒子の処方を Table 2 に示した。SFD 微粒子中の Leu および Man 添加量を適宜変化させることで、4 種類の Leu 添加量が異なる SFD 微粒子 (Leu 0%, Leu 2.5%, Leu 5%, Leu 10%) を調製した。得られた SFD 微粒子はガラス製のバイアルに回収し、シリカゲルの入ったデシケーター内に室温で保管した。

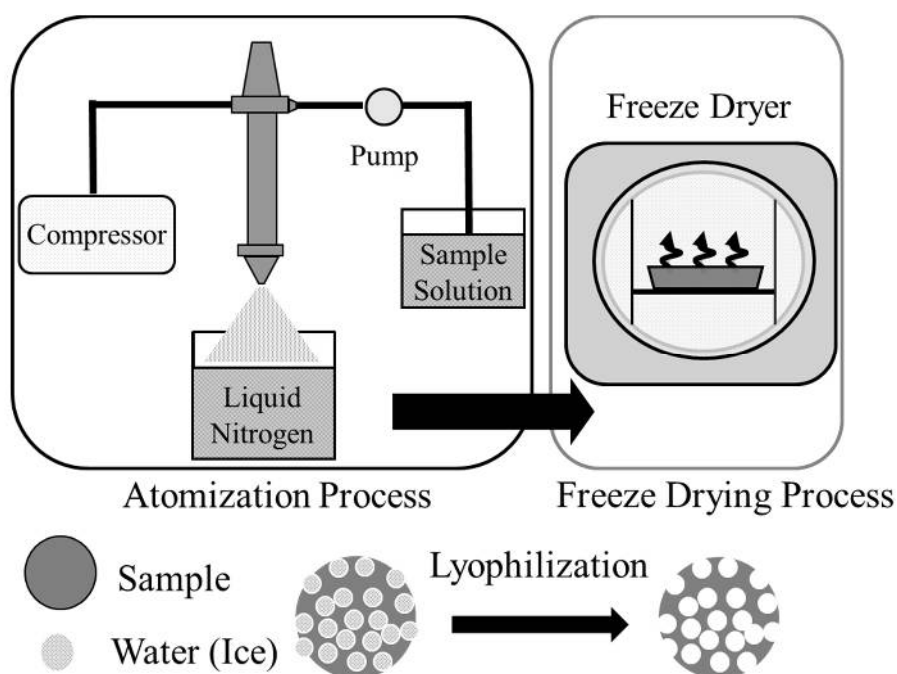


Fig. 1 Schematic diagram of SFD technique.

Table 1 Operating conditions of SFD method

Operating Conditions	
Atomizing pressure	150 kPa
Flow rate of sample solution	5 mL/min
Nozzle diameter	0.4 mm
Sublimation time	24 hr
Final vacuum degree	≤ 2 Pa
Final shelf temperature	10°C

Table 2 Formulation of SFD powders

Formulation Name	Leu 0%	Leu 2.5%	Leu 5%	Leu 10%
L-Leucine (Leu)	—	3.75 mg	7.5 mg	15 mg
D-(-)-Mannitol (Man)	148.5 mg	144.75 mg	141 mg	133.5 mg
Sodium fluorescein (FNa)	1.5 mg			
Total	150 mg/ 7.5 mL water			

II.2.3 SFD 微粒子の粒子形状評価

SFD 微粒子の粒子形状を観察する目的で、走査型電子顕微鏡 (SEM; JSM-6060, JEOL, Tokyo, Japan)を用いた。SEM 観察用試料の前処理としては両面テープを貼付した試料台上に Fig. 2 に示した吸入用粉末微粒子添加用デバイスを用いて噴霧した [37]。噴霧方法としては 0.25 mL の空気をシリンジ内で圧縮し、三方活栓を開放することにより、噴霧を行った。その後、30 mA、90 秒間の条件でプラチナコーティング (JFC-1600, JOEL, Tokyo, Japan)を行った。

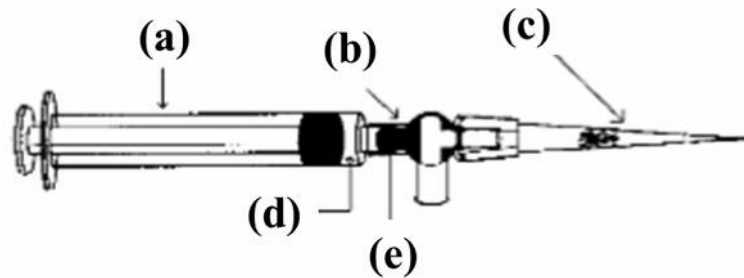


Fig.2 Apparatus for pulmonary administration of dry powder: (a) 1-mL syringe, (b) three-way stopcock, (c) disposable tip with dry powder, (d) compressed air, and (e) administration handle.

II.2.4 SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定

SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定は乾式レーザー回折粒度分布測定装置 (LSM-30; Seishin Enterprise Co., Ltd., Tokyo, Japan)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。

II.2.5 ヒト吸入パターン再現装置を用いた吸入パターンの再現

本装置は真空容器をバルブおよび接続チューブを介してツインステージリキッドインピンジャー (TSLI) (European Pharmacopoeia Apparatus, Copley Scientific Ltd., Nottingham, UK)のポンプ接続部に接続し、バルブを一定速度で開放することによりヒト吸入パターンを模式的に再現した吸引を行う装置である (Fig. 3)。ヒト吸入パターンのパラメータである最大吸入流量 (peak flow rate; PFR, L/min), 吸入容量 (area under the flow rate-time curve; AUC, L), 初期吸入速度 (flow increase rate; FIR, L/min/sec)はそれぞれ接続チューブの内径、デシケータ容積、バルブの開放速度を変更することにより制御した。また、吸入パターンの可視化に吸入流量計 (Hitachi Automotive Systems, Co., Ltd., Takasaki, Japan)を用いた。吸引ポンプによって耐圧容器を真空化した後にバルブを閉じ、TSLI および吸入デバイス、吸入流量計を接続し、10 ミリ秒ごと 30 秒間の流量測定を開始し、一定速度でバルブを開放して吸引を行った。

これまでの検討から DPI の肺内送達には、PFR が最も大きい要因であることを報告してきた [38]ので、PFR を適宜変化させて検討を行った。

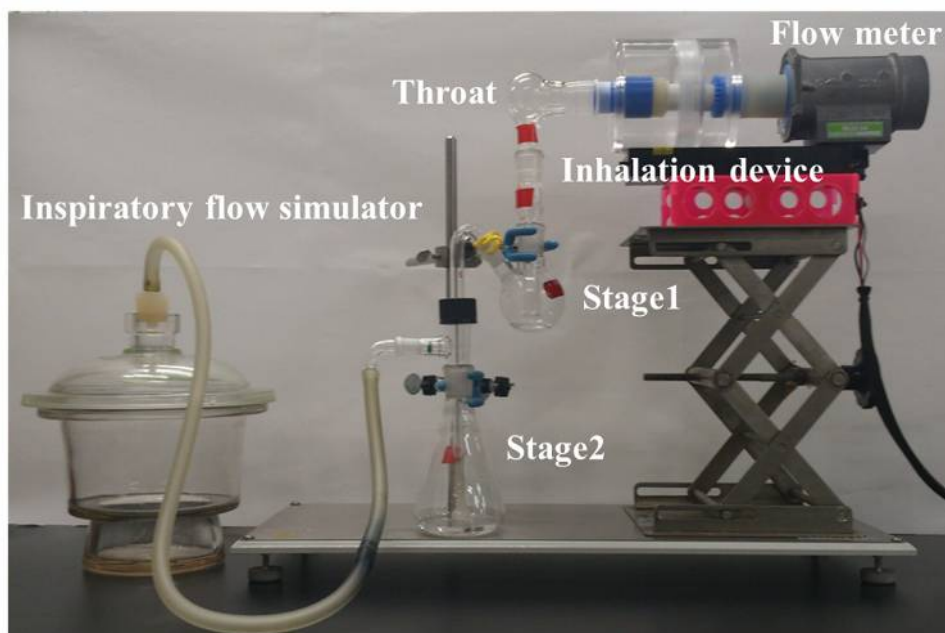


Fig. 3 Picture of the system employed in this study to evaluate inhalation performance of SFD powders.

II.2.6 ヒト吸入パターン再現装置を用いたツインステージリキッドインピンジャーによる吸入特性評価

製剤の吸入特性は TSLI を用い、前述のヒト吸入パターン再現装置により吸入パターンを変化させた際の吸入特性変化を評価した。吸入デバイスには吸入抵抗の異なる 3 種類のデバイス (Jethaler[®] Single, Dual, Reverse, Hitachi Automotive Systems, Co., Ltd.)を用いた。TSLI の Stage1 及び Stage2 にはそれぞれ 7 mL, 30 mL のリン酸緩衝液 (PBS)を入れ、吸入気流により到達した製剤を捕集する機構となっている。2 号 HPMC カプセル(Qualicaps Co., Ltd., Yamatokoriyama, Japan) 内に SFD 微粒子を約 1.0 mg 充填し、吸入デバイス内に留置し、デバイス上部のボタンを押下することによりカプセルに二つの穴を開けた状態でデバイス専用密閉格納器に装着した。格納器前部を TSLI の吸入口に接続し、微粒子吸引時の吸入パターンを測定する目的で、デバイス後部に流量計を設置した。すべての接続を確認した後に再現装置を作動させ、所定の条件で微粒子の吸引を行った。吸引終了後に Capsule, Device, Throat, Stage1, Stage2 のそれぞれに沈着した SFD 微粒子を PBS で 50 mL のメスフラスコ内に洗いこむことにより回収し、各試料溶液中の FINa 含量を蛍光マイクロプレートリーダー (励起波長: 490 nm, 蛍光波長: 515 nm) (Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Device Co., Ltd., Tokyo, Japan) により定量した。

PFR を適宜変化させ、それぞれの条件について 3 回操作を行った。各条件の変化範囲は以下に示す通りとした ; AUC : 2.5 L, FIR : >100 L/min/sec, PFR : 5-80 L/min.

吸入特性評価の指標としては薬物放出性の指標である Output Efficiency (OE, Eq. 1)値と肺送達性の指標である Fine Particle Fraction (FPF, Eq. 2)を算出した。各値の算出方法を以下の式に示した。

$$OE = \text{TSLI のすべての部位から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$FPF = \text{TSLI の Stage2 から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 2})$$

II.2.7 SFD 微粒子の付着性評価

SFD 微粒子間の付着性を微小粒子圧力測定装置 (NS-A100; Nano Seeds Co., Nagoya, Japan)を用いて測定した。ステンレス板に付着させた微粒子 (Fig. 4a)を試料針で引っ張ることで、粒子同士の分離を行い、分離前後の力の差を付着力として算出した (Fig. 4b)。

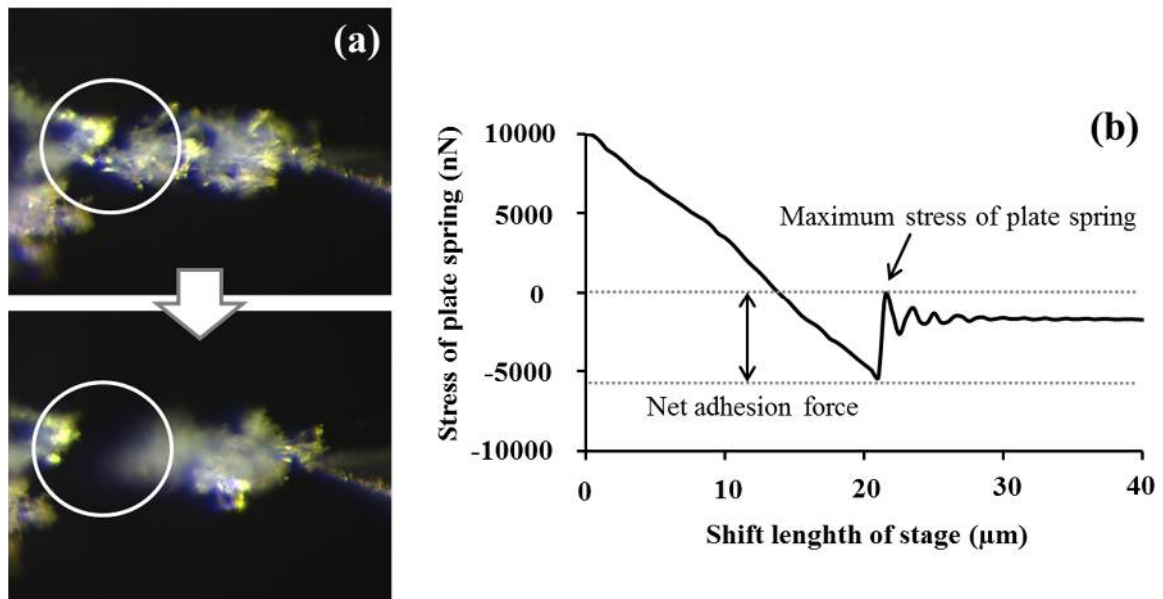


Fig. 4 Measurement of adhesion force of the SFD powders.

(a) The two particles were detached by the needle moving to the right side.

(b) The adhesion force was determined by the difference in the forces working on the summit of the needle just before and after the detachment of two particles.

II.2.8 SFD 微粒子の帯電性評価

SFD 粒子表面の帯電性を評価するため、静電気拡散率測定装置 (NS-D100; Nano Seeds Co.)を用いた。温度 25℃、相対湿度 25%条件下において、粒子表面を 30 秒間 6 kV のコロナ放電により帯電させた後、表面電荷を測定した。

II.2.9 統計処理

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 SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布

調製した SFD 微粒子の SEM 観察結果を Fig. 5 に示した。

Leu の添加量に依らず，調製した SFD 微粒子すべてが多孔性に富む球形粒子であった．Leu を含む SFD 微粒子は良好な分散性を示したのに対し，Leu 0%微粒子は約 50 μm 程度の凝集体が観察された (Fig. 5b の矢印)．

また，Fig. 6 に示した粒度分布の結果から，調製した SFD 微粒子は Leu の添加量に依らず同様のパターンを示したため，同じ粒度分布を有する SFD 微粒子が得られたと考えられる．それぞれの平均粒子径 (D50)は Leu 0%: $6.24\pm0.51\ \mu\text{m}$, Leu 2.5%: $5.71\pm0.02\ \mu\text{m}$, Leu 5%: $8.94\pm0.12\ \mu\text{m}$, Leu 10%: $7.57\pm0.23\ \mu\text{m}$ ($n=3$, means $\pm$ S.D.)であった．

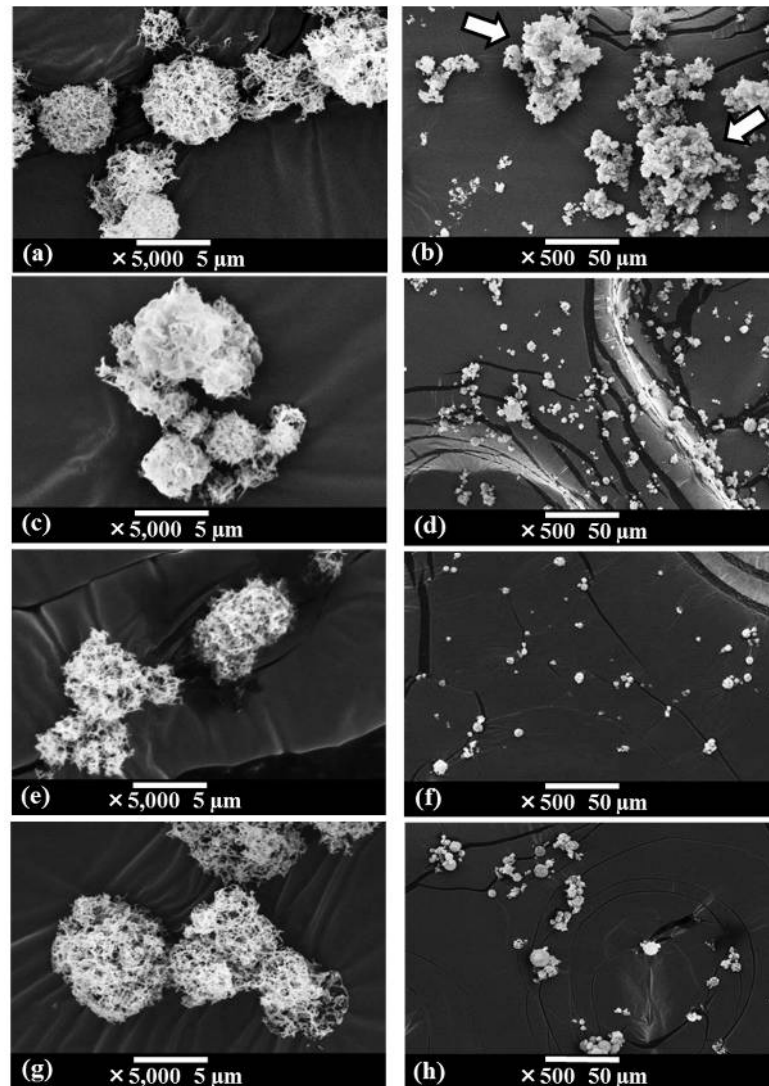


Fig. 5 SEM images of SFD powders.

(a),(b): Leu 0%, (c),(d): Leu 2.5%, (e),(f): Leu 5%, (g),(h): Leu 10%.

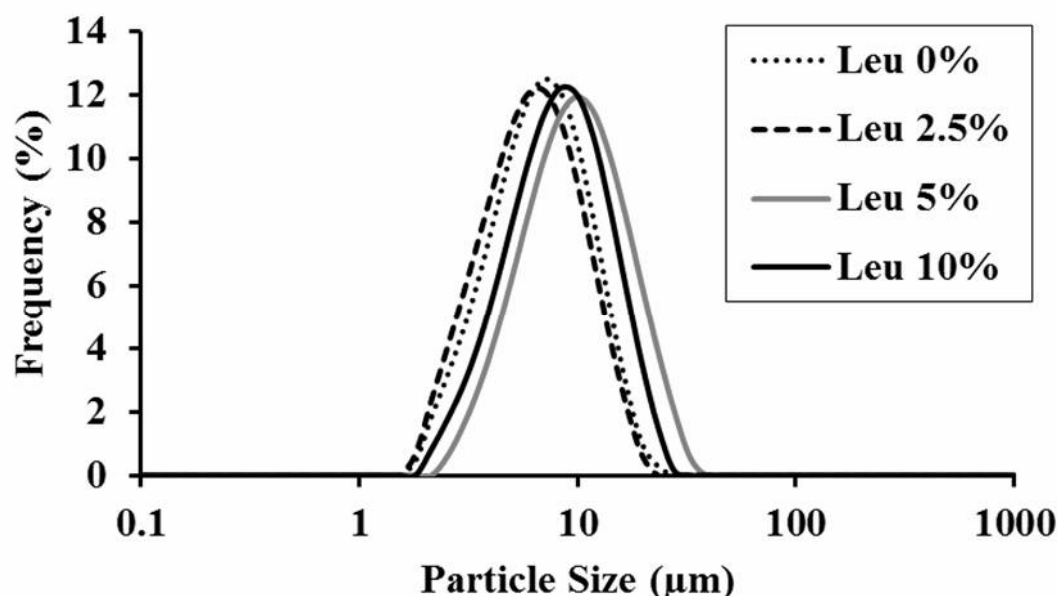


Fig. 6 Particle size distribution of SFD powders.

II.3.2 ヒト吸入パターン再現装置を用いた際の *in vitro* 吸入特性評価

DPI の吸入特性に最も影響を与える要因である PFR を変化させ、Leu 添加量が吸入特性に及ぼす影響を検討した。吸入デバイスには吸入抵抗の高い Jethaler® Reverse を使用した。Fig. 7 に示した結果から、Leu 0%微粒子および Leu 2.5%微粒子は Device および Throat における沈着量が多く認められたものの、Leu 添加量を 5%および 10%へ増加させることで、Device および Throat における沈着量が減少し、Stage2 への沈着の増加が確認された。OE および FPF について注目してみると (Fig. 8), Reverse 使用時における健常人達成可能 PFR 範囲内 (12-40 L/min)において、Leu 0%および Leu 2.5%微粒子は PFR が上昇するにつれて OE および FPF が増加し、PFR 依存的な吸入特性が認められた。一方、Leu 添加量を 5%に増加することで、低 PFR 条件においても優れた OE および FPF が得られ、PFR 非依存的な吸入特性が認められた。さらに Leu 添加量を 10%へ増加させたが、Leu 5%微粒子と同様の沈着挙動を示し、吸入特性の変化は認められなかった。以上の結果から、5%以上の Leu を添加することで SFD 微粒子の肺送達性を改善することに成功し、さらに PFR 非依存的な肺送達性を示すことが明らかとなった。

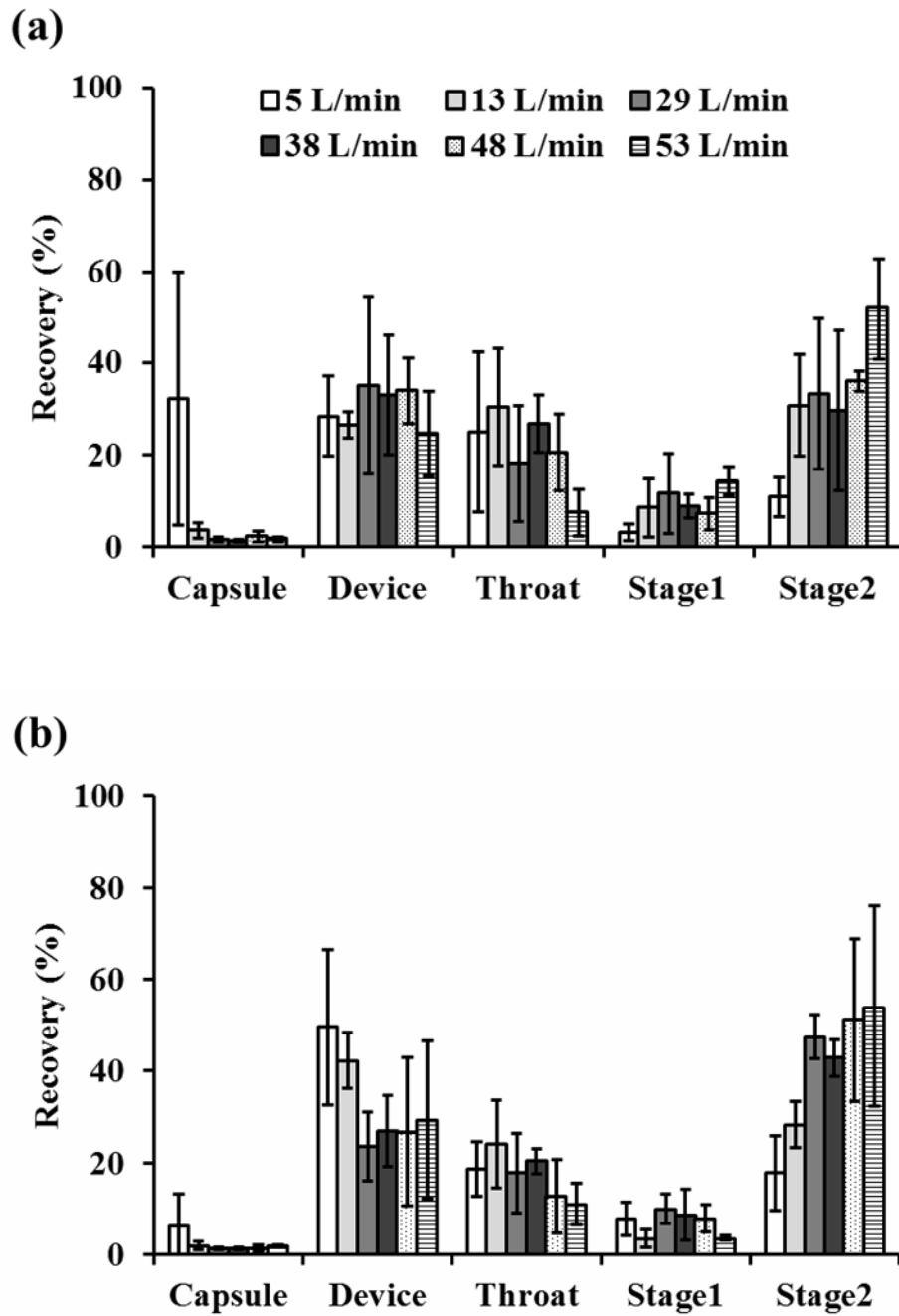


Fig. 7 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders (Inhaler: Reverse).

(a) Leu 0%, (b) Leu 2.5%.

The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

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

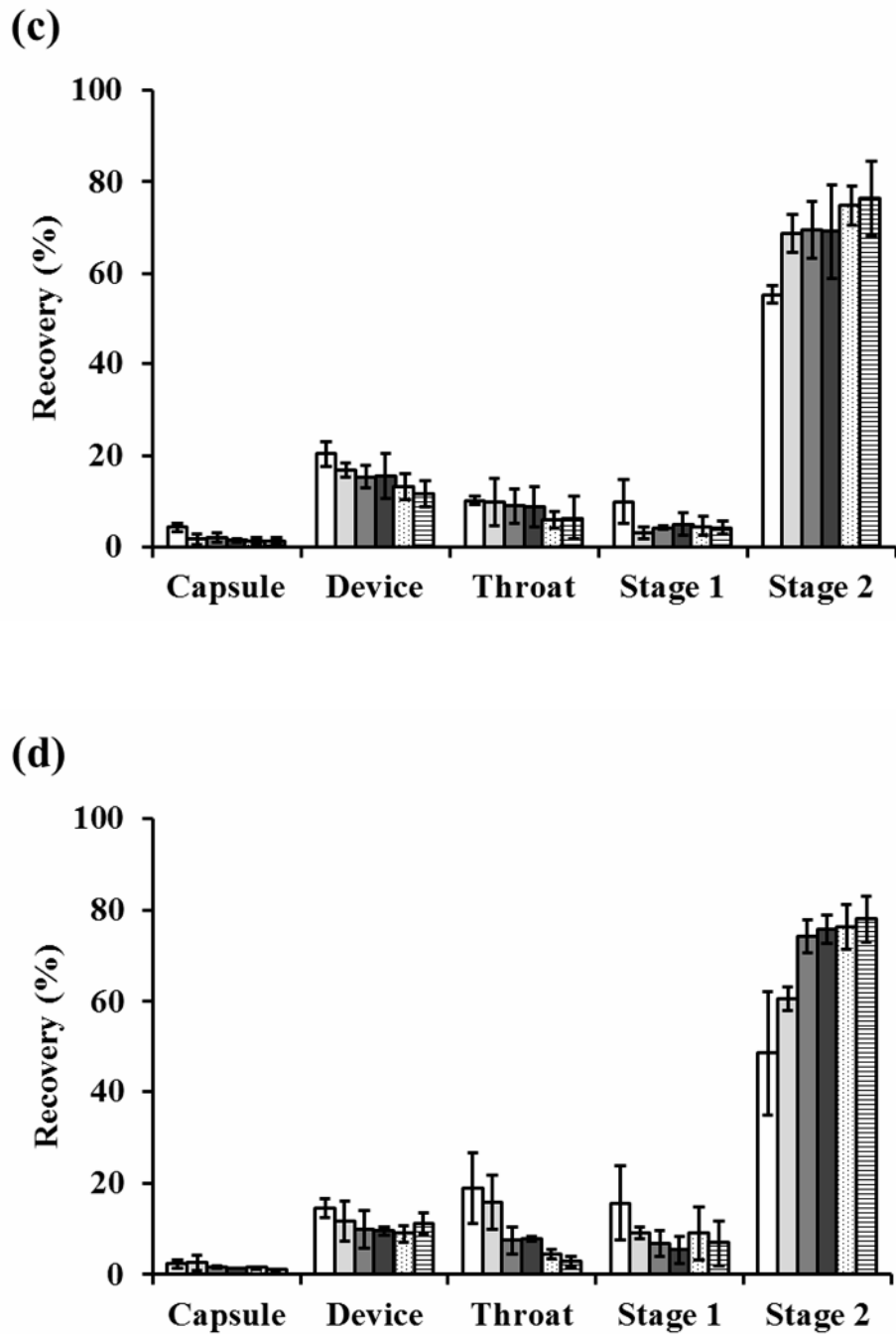


Fig. 7 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders (Inhaler: Reverse) (continued). (c) Leu 5%, (d) Leu 10%.

The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

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

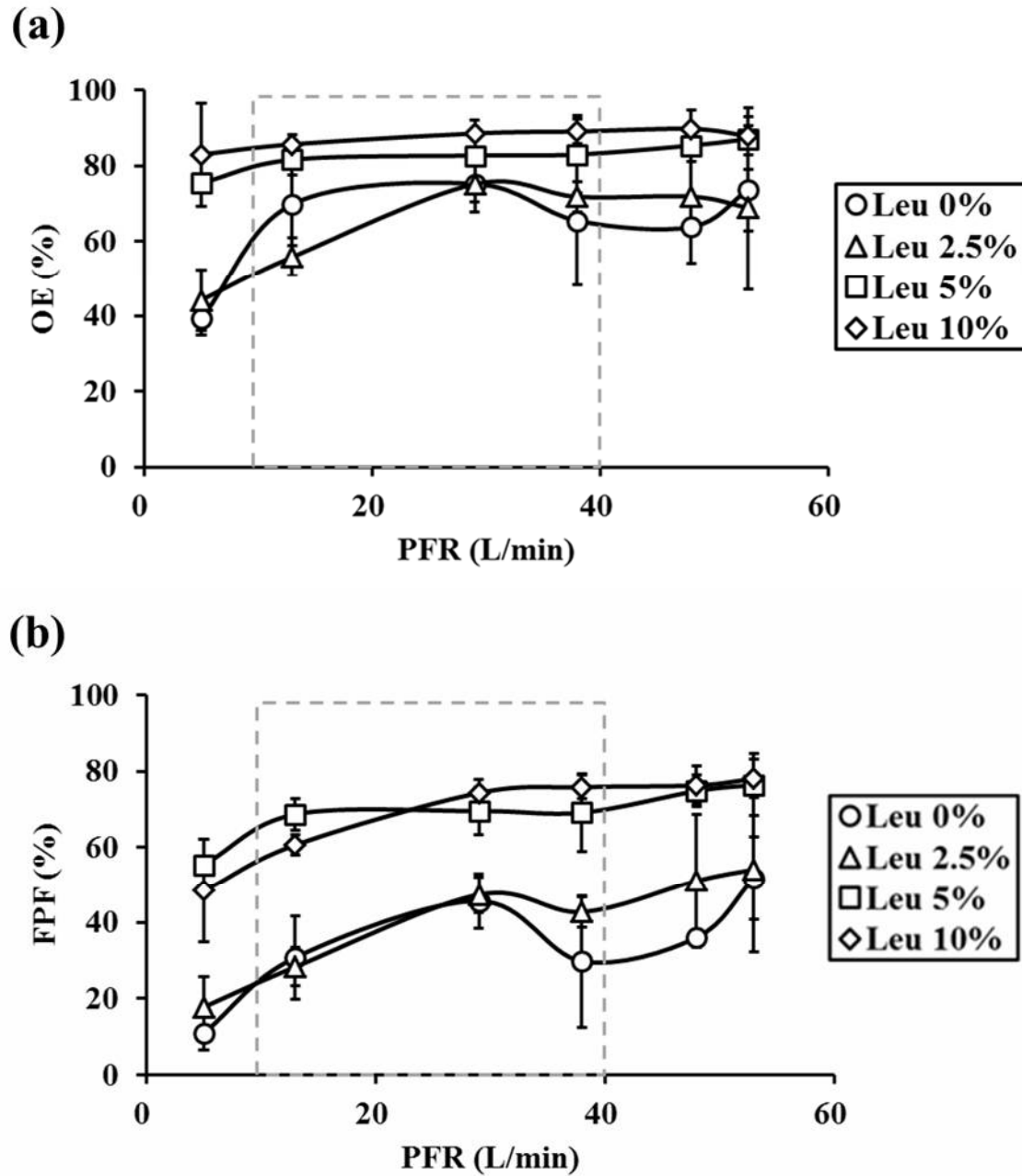


Fig. 8 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders (Inhaler: Reverse). (a) OE value, and (b) FPF value.

The dotted line indicates the range of PFR that normal subjects can achieve with Jethaler® Reverse. The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

II.3.3 異なる吸入デバイスを用いた際の *in vitro* 吸入特性評価

吸入デバイスの性能の違いが吸入特性に与える影響を検討するため、異なる3種類の吸入デバイス (Jethaler® Single, Dual, Reverse)を用いて吸入特性評価を行った。これらの吸入デバイスは内部構造がそれぞれ異なるため、吸入時の抵抗が異なる (吸入抵抗の強さ: Single<Dual<Reverse)。本検討では、II.3.2の検討で優れた吸入特性を示した Leu 5%微粒子を用いて検討を行った。Fig. 9 より、吸入抵抗の高い吸入デバイスである Reverse を用いた場合は低 PFR 条件においても OE は 70%以上および FPF は 50%以上の値を示した。また、Reverse を用いた際の健常人達成可能 PFR 範囲内 (12-40 L/min)において OE は 80%以上、FPF は約 70%と安定した高い吸入特性が認められた。一方、Reverse よりも吸入抵抗が低い吸入デバイスである Single や Dual では低 PFR 条件において FPF の著しい低下が認められた。しかし、Single および Dual を用いた際の健常人達成可能 PFR 範囲内 (Single: 34-115 L/min, Dual: 15-52 L/min)においては OE および FPF とともに約 50%以上の値を示した。これらの結果から、Leu 5%微粒子は吸入デバイスの性能に依らず、優れた吸入特性を示すことが明らかとなった。

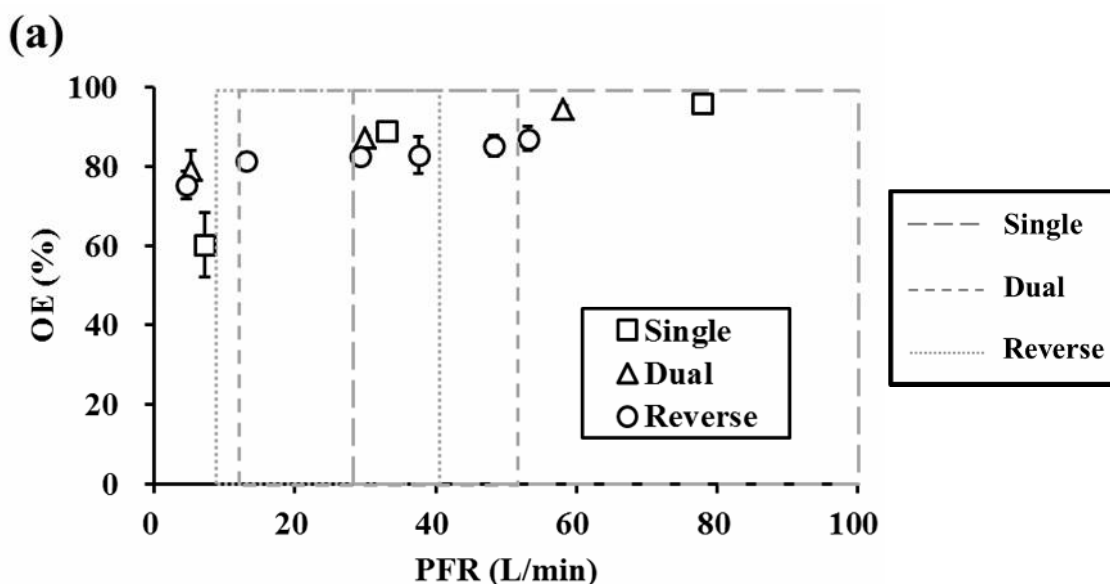


Fig. 9 Influence of different inhalation devices on the inhalation performance of Leu 5% powders. (a) OE value. The area within the dotted lines is what normal subjects can achieve in the PFR range of each inhalation device. The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

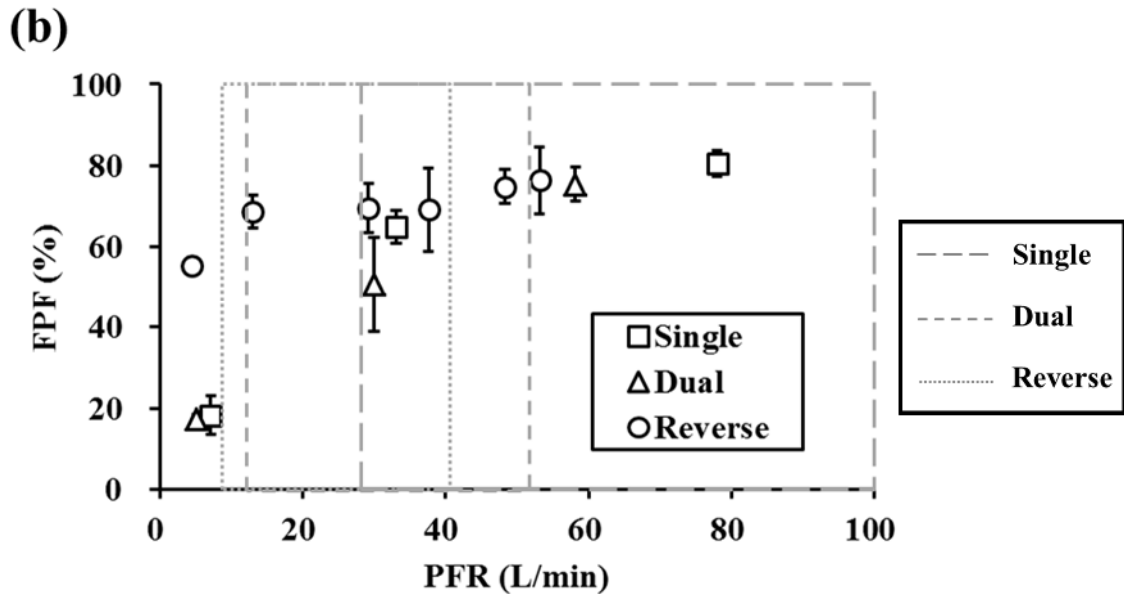


Fig. 9 Influence of different inhalation devices on the inhalation performance of Leu 5% powders (continued). (b) FPF value. The area within the dotted lines is what normal subjects can achieve in the PFR range of each inhalation device. The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

II.3.4 SFD 微粒子の付着性および帯電性評価

Leu 添加による吸入特性改善機序を明らかにするため, SFD 微粒子の付着性および帯電性を評価した. 評価用試料として Leu 0%, Leu 5%, Leu 10%微粒子を用い, 付着性評価結果を Fig. 10 に, 帯電性評価結果を Fig. 11 に示した. Fig. 10 より, Leu を添加することで粒子間付着力の著しい低下が認められた. また Fig. 11 より, Leu 添加量依存的な表面電位の増加が確認でき, 帯電性が増加する傾向が認められた.

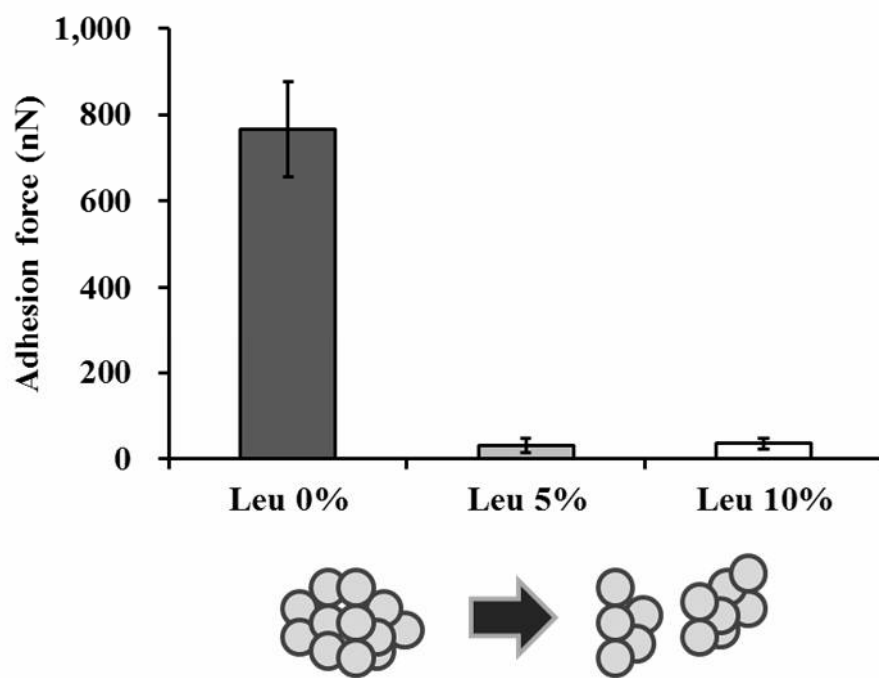


Fig. 10 Measurement of the inter-particle adhesion force of SFD powders. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

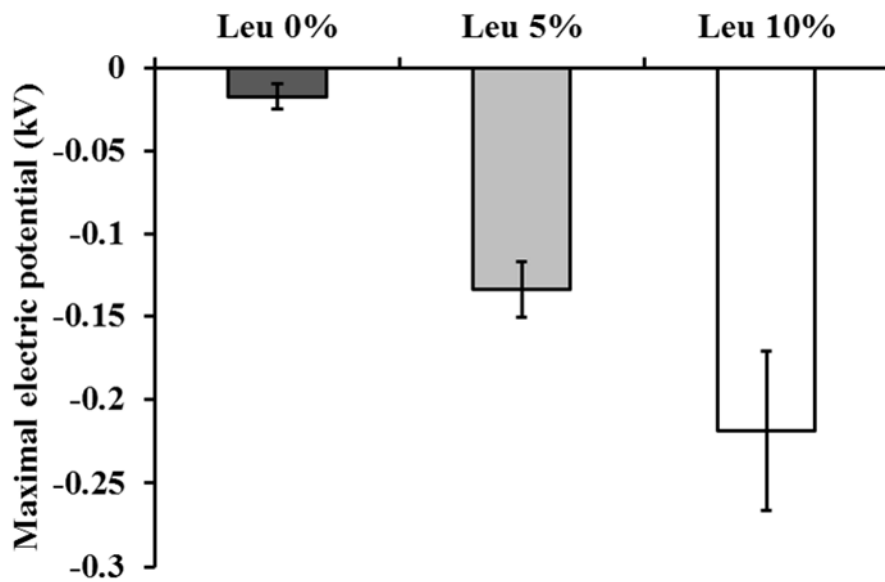


Fig. 11 Measurement of the electrostatic property of SFD powders. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

II.4 考察

本章では、DPI 開発における“吸入剤応用に適した MMAD の獲得”と“付着凝集性の改善”の両課題の解決および患者の吸入パターンによる影響を受けやすいという吸入粉末剤の欠点克服を目的として、分散補助剤である Leu を含む SFD 微粒子を調製し、吸入パターンおよび吸入デバイスの性能が SFD 微粒子の吸入特性に与える影響について検討を行った。

モデル薬物として FINa, 賦形剤として Man, 分散補助剤として Leu を用い、Leu 添加量を適宜変化させて Leu 0%, Leu 2.5%, Leu 5%, Leu 10% の 4 種類の SFD 微粒子を調製した。調製した SFD 微粒子の粒子形状を SEM により評価したところ (Fig. 5), 得られたすべての SFD 微粒子が Leu の添加量に依らず、多孔性に富む球形粒子であることが確認された。また、Leu 含有微粒子では良好な分散性が確認されたのに対し、Leu 0%微粒子のみに約 50 μm 程度の凝集体が観察された。一方、Fig. 6 の粒度分布測定結果より、4 微粒子とも 5-10 μm 付近に一峰性ピークが存在し、同様の粒度分布パターンを示すことが確認された。しかし、Leu 0%微粒子の SEM 観察画像 (Fig. 5b)において確認された約 50 μm 程度の凝集体は確認できなかった。この理由として、微粒子の分散方法が異なることが影響していると考えられた。SEM 観察は、Fig. 2 に示している吸入用粉末微粒子添加用デバイスの圧縮空気により粒子を分散させることで試料台に付着させた後、観察を行っているが、LMS-30 による粒子径および粒度分布測定の際は真空ポンプで粒子を吸い上げることにより、分散させて測定を行っている。今回は、真空ポンプによる吸い上げの方が粒子を分散させる力が強く、SEM 観察で確認された凝集体が十分に分散されてしまったため、LMS による測定の際に検出することができなかったのではないかと考えられる。これらの結果から、吸入パターンおよび吸入デバイスの解砕性能は吸入粉末微粒子の分散性において重要な因子であることが示唆された。

調製した 4 微粒子についてヒト吸入パターン再現装置および TSLI を用いて吸入特性評価を行ったところ、Leu を 5%添加することにより、Capsule や Device における沈着が減少し、Stage2 における沈着が著しく増大することが示された (Fig. 7)。さらに、Fig. 8 より、Leu 添加量依存的に OE および FPF の増加が認められた。Hoe らおよび Duan らは SD 法により吸入粉末微粒子を調製する際、試料溶液中に Leu や脂質などの分散補助剤を添加することで、乾燥時に分散補助剤が粒子表面に集積し、粒子表面に凹凸を形成した粒子の開発に成功している。この粒子表面の凹凸により、粒子同士の接触面積が低下するため、吸入特性が改善すると報告している [31, 39]。しかし、本章にて調製した SFD 微粒子は Leu 添加により吸入特性の改善が認められるものの、粒子構造は Leu 添加の有無に依らず、多孔性に富む球形構造を有していることが SEM 観察により示さ

れている (Fig. 5). このため, Leu 添加 SFD 微粒子の吸入特性改善機序は SD 微粒子の場合とは異なると考えられる. また, Yang らは SD 法により吸入粉末微粒子を調製した際, Leu を製剤中に 20% 添加した場合において良好な吸入特性が得られたと報告している [40]. もし, SD 微粒子と SFD 微粒子の Leu 添加による吸入特性改善機序が同機序であるならば, 多孔性構造に由来する比表面積の大きい SFD 微粒子の表面を覆うため, より多くの Leu が必要となると考えられる. よって, SFD 微粒子の Leu 添加による吸入特性改善機序を明らかにするため, 粒子間付着力および帯電性を測定した. その結果, Leu を添加することにより粒子間付着力が著しく低下し, さらに Leu 5% 微粒子と Leu 10% 微粒子は同等の付着力を示した (Fig. 10). この粒子間付着力測定結果は Fig. 8 の OE および FPF の値と相関関係を示しており, Leu 添加による吸入特性改善効果は “粒子間付着力の低下” によるものであることを見出した. さらに, 粒子の帯電性は Leu を添加することにより添加量依存的に表面電位が増加する傾向が認められた (Fig. 11). 表面電位の増加は粒子間の静電的反発を引き起こす可能性も考えられ, 結果として付着力の低下につながる可能性が考えられる.

現在市販されている DPI の多くは各製薬企業がそれぞれの製剤に合った吸入デバイスを用いて製品化されているため, 多種多様な吸入デバイスが存在している. 吸入デバイスの特性を決める因子の 1 つとして圧力損失が挙げられる. 特徴として, 圧力損失が高いほど内部構造が複雑で, 解砕性能が高いことが予想されるが, それによって吸入抵抗が大きくなり, 吸入しにくいという問題点が存在する. また, 圧力損失が低いほど内部構造は簡単であり, 解砕性能は低くなるが, 吸入抵抗が小さくなるため吸入しやすいという利点がある. 今回, 様々な圧力損失を有する吸入デバイスを用いて吸入特性評価を行った結果 (Fig. 9), OE は吸入デバイスの圧力損失による影響を受けにくいことが示唆された. 一方, FPF は圧力損失の低い Single および Dual を用いた場合, 低 PFR 条件下では値が低いことが示された. しかし, Fig. 9 の各吸入デバイス使用時における健常人達成可能 PFR 範囲においては一定の値を示しており, この範囲内であれば PFR による影響を受けないことが示された. 健常人達成可能 PFR 範囲内において, 解砕性能の低いデバイスである Single でも良好な吸入特性を示していることから, Leu 添加 SFD 微粒子を吸入粉末微粒子として応用する際に, 患者への負担が少ない吸入デバイスを選択することが可能であると期待される.

II.5 結論

本章では、多孔性微粒子が得られる SFD 法および分散補助剤である Leu を組み合わせ、吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依存しない吸入粉末微粒子の開発を試みた。吸入特性評価結果から、一定量以上の Leu 添加により吸入特性が著しく改善されるとともに、吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らず優れた吸入特性を示すことが明らかとなった。また、この Leu 添加による吸入特性改善効果は添加量依存的な“粒子間付着力の低下”および“帯電性の増加”が寄与していることが示唆された。

本章で開発した Leu 添加 SFD 微粒子は吸入パターンや吸入デバイスの性能に依らず優れた吸入特性を発揮できることから、吸入パターンが異なる様々な患者が服用しても、治療に要する十分な肺送達量が保証され、安定した治療効果を達成することが期待でき、吸入粉末剤による吸入療法の拡大に大きく貢献できると考えられる。また、従来の吸入粉末剤では適用が困難であった高齢者や幼児に対する使用拡大も十分に期待できると考えられる。

III 第二章 優れた吸入特性および耐吸湿性を示す吸入粉末微粒子の開発

III.1 緒言

第一章にて、多孔性微粒子調製方法である SFD 法と分散補助剤である Leu を組み合わせることにより、吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性を示す SFD 微粒子の開発に成功したものの、SFD 法により得られる多孔性構造は比表面積を増大させ、吸湿性が大きな問題となる。製剤の吸湿により、吸入デバイスからの薬物放出量の低下および呼吸器内沈着挙動変化に起因する治療効果への影響、口腔内残存による副作用が懸念される。現在、疎水性アミノ酸の吸入特性改善効果を利用した吸入粉末微粒子の開発が数多く行われているが、耐吸湿性に注目した研究は行われておらず、また、第一章において製剤中に Leu を 5% 添加させた SFD 微粒子は優れた吸入特性を示したものの、十分な耐吸湿性を有していないことを予備実験により確認している。

本章では SFD 微粒子の吸湿性改善に向けて、種々の疎水性アミノ酸を製剤中に 99% 含む SFD 製剤を調製し、加湿前後における吸入特性および粒子形状、結晶性へ与える影響について検討を行った。

III.2 実験方法

III.2.1 試料

モデル薬物として、蛍光物質であるフルオレセインナトリウム (FNa) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA) を用いた。賦形剤として L-アラニン (Ala), グリシン (Gly) (Wako Pure Chemical Industries Co., Ltd., Osaka, Japan), L-イソロイシン (Ile), L-ロイシン (Leu), L-フェニルアラニン (Phe), L-トリプトファン (Trp), L-バリン (Val) (Sigma-Aldrich Co., Ltd.) を用いた。その他の試薬、溶液は特級または HPLC 用のものを用いた。

III.2.2 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の調製

II.2.2 と同様の操作を行い、調製を行った。モデル薬物として FNa (1mg), 賦形剤として各疎水性アミノ酸 (Ala, Gly, Ile, Leu, Phe, Trp, Val: 各 99 mg) を含む、全量 100 mg/ 7.5 mL の試料溶液を調製し、SFD 微粒子を 7 種類調製した。得られた SFD 微粒子はガラス製のバイアルに回収し、シリカゲルの入ったデシケータ内に室温で保管した。

III.2.3 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子形状評価

II.2.3 と同様の方法で評価を行った。

III.2.4 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定

疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子径および粒度分布測定は乾式レーザー回折粒度分布測定装置 (LSM-2000e; Seishin Enterprise Co., Ltd., Tokyo, Japan)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。

III.2.5 疎水性アミノ酸の結晶性評価

疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の結晶性評価は粉末 X 線回折測定装置 (X-ray powder diffraction, XRPD; Smart Lab, Rigaku Corporation, Tokyo, Japan)を用いて行った。操作条件として、Cu K α 線 (30mA, 40kV)を用い、 $2\theta=5-45^\circ$ の範囲で走査速度 $5^\circ/\text{min}$ 、走査間隔 0.05° 毎とし、平行ビーム法により測定した。

III.2.6 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の *in vitro* 吸入特性評価

II.2.5 および II.2.6 と同様に、TSLI にヒト吸入パターン再現装置を接続し、吸入パターンを変化させた際の吸入特性を評価した。吸入デバイスには Jethaler[®] Single および Reverse (Hitachi Automotive Systems, Co., Ltd., Takasaki, Japan)を用いた。前章と同様に DPI の肺送達性に影響を与える因子である PFR を適宜変化させ、それぞれの条件について 3 回操作を行った。各条件の変化範囲は以下に示す通りとした；AUC : 2.5 L, FIR : $>100 \text{ L/min/sec}$, PFR : 15-120 L/min. また、吸入特性評価の指標として薬物放出性の指標である OE (Eq. 1)と肺送達性の指標である FPF (Eq. 2)を算出した。各値の算出方法を以下の式に示した。

$$\text{OE} = \text{TSLI のすべての部位から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{FPF} = \text{TSLI の Stage2 から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 2})$$

III.2.7 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の加湿保存

密閉容器の底部に塩化ナトリウム飽和水溶液を充填することによって、室温 (約 25°C)において密閉容器内の相対湿度 (RH)がおよそ 75 %となる [41]。各疎水性アミノ酸 SFD 微粒子約 1.0 mg を充填した 2 号 HPMC カプセルを RH 75 % に調整した密閉容器内に一定期間静置した。

III.2.8 統計処理

II.2.9.と同様に統計処理を行った。

III.3 結果

III.3.1 疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布

得られた SFD 微粒子は疎水性アミノ酸の種類に依らず多孔性に富む球形粒子であった (Fig.12). 分散性が良く, 凝集体も観察されなかったため, 賦形剤として用いた 7 種類の疎水性アミノ酸は分散補助剤の役割を有している可能性が考えられた. また, Fig. 13 の粒度分布測定結果より, ほとんどの疎水性アミノ酸で 1-10 μm 付近に一峰性のピークを示したのに対し, Gly では 1-10 μm および 10-100 μm 付近に二峰性のピークが検出され, SEM では観察されなかった凝集体の存在が確認された. D50 は Ala: $2.32 \pm 0.06 \mu\text{m}$, Gly: $9.17 \pm 2.34 \mu\text{m}$, Ile: $1.78 \pm 0.11 \mu\text{m}$, Leu: $3.34 \pm 0.09 \mu\text{m}$, Phe: $7.17 \pm 0.42 \mu\text{m}$, Trp: $5.96 \pm 0.58 \mu\text{m}$, Val: $1.95 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ($n=3$, means $\pm$ S.D.)であり, 1-10 μm 程度の D50 を示した.

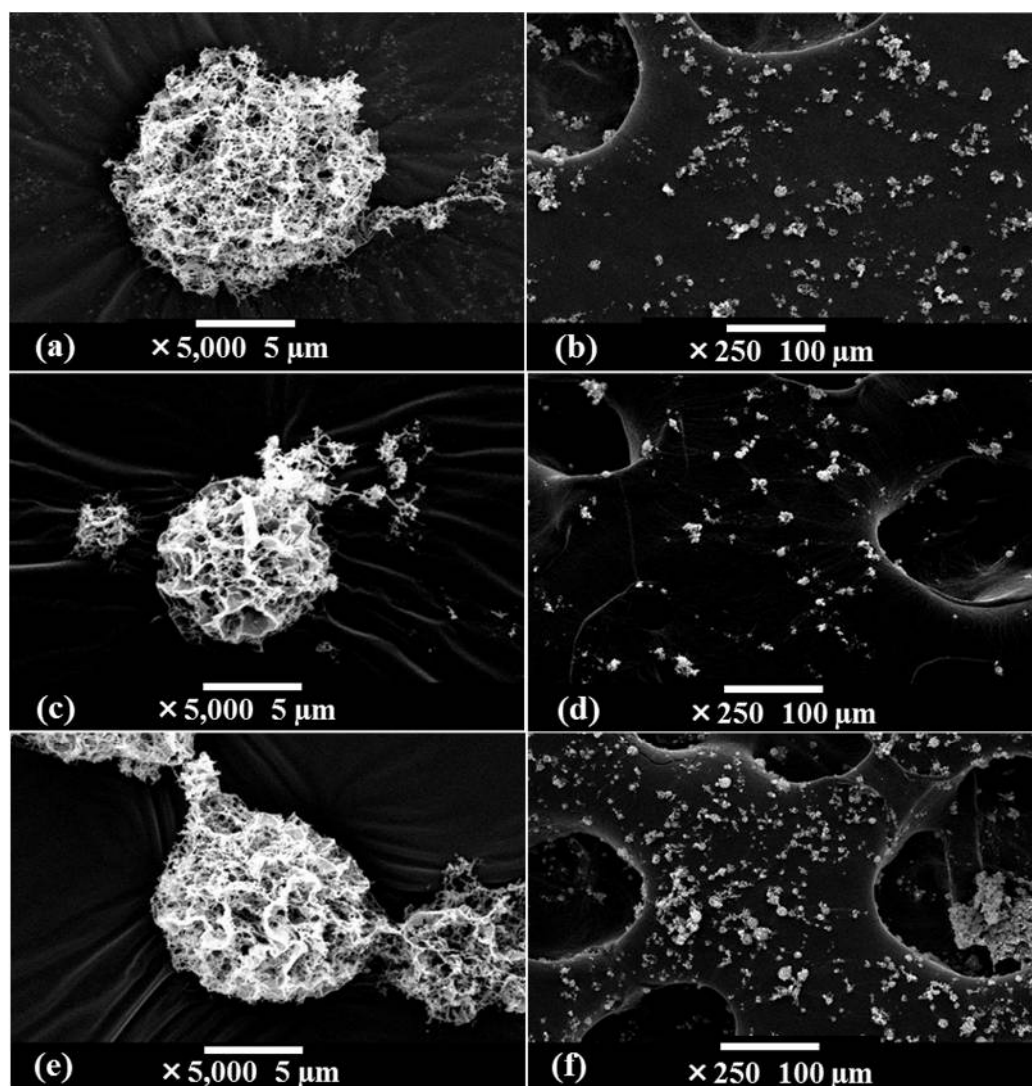


Fig. 12 Morphological analysis of SFD powders of hydrophobic amino acids by SEM. (a), (b): Ala, (c), (d): Gly, and (e), (f): Ile.

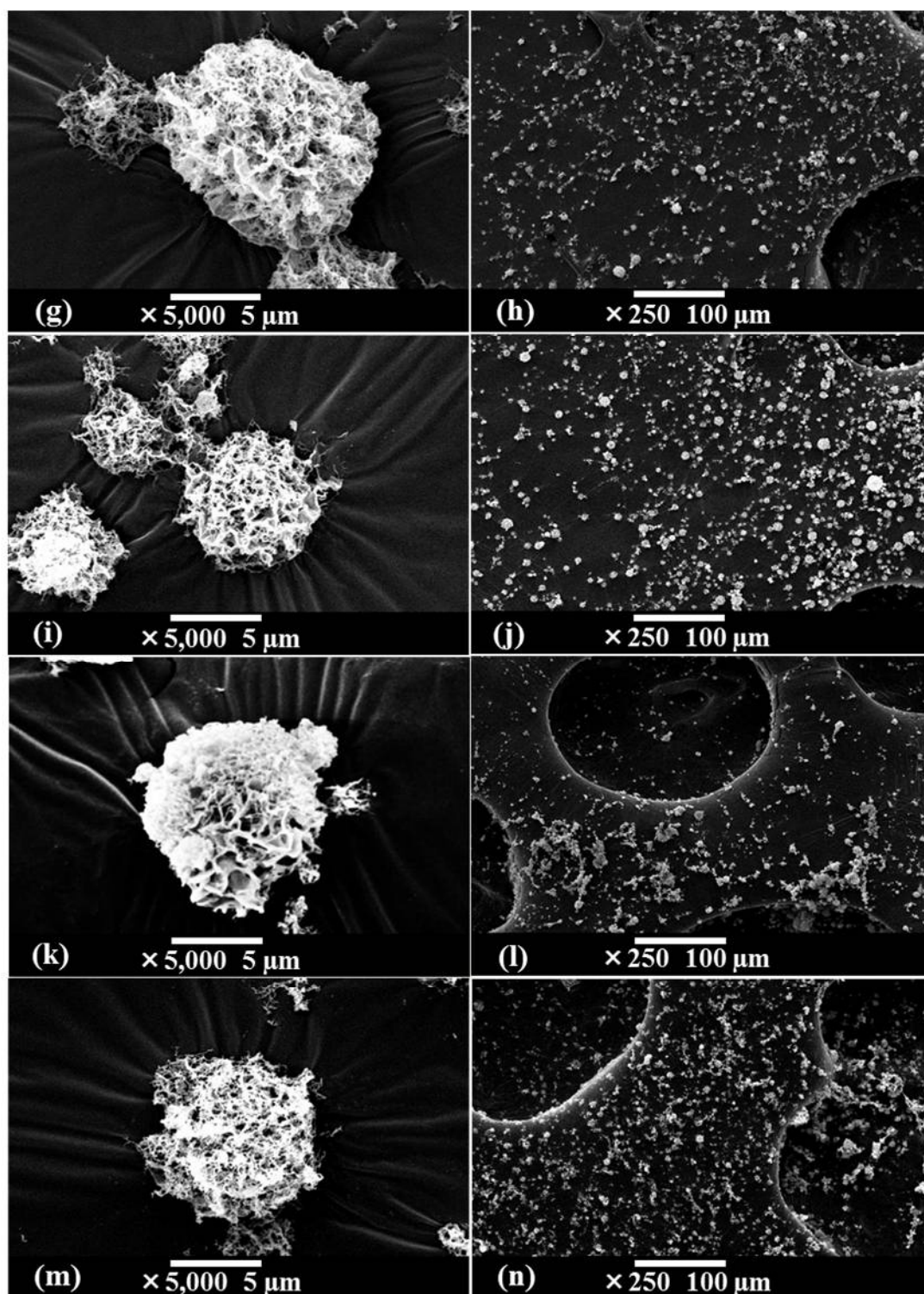


Fig. 12 Morphological analysis of SFD powders of hydrophobic amino acids by SEM (continued).

(g), (h): Leu, (i), (j): Phe, (k), (l): Trp, and (m), (n): Val.

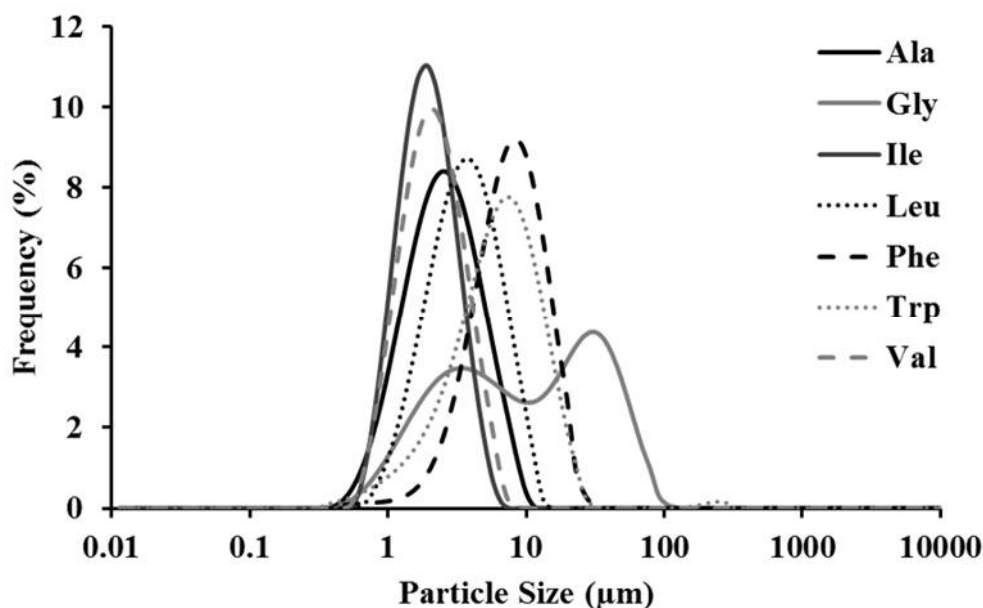


Fig. 13 Particle size distribution of SFD powders of hydrophobic amino acids.

III.3.2 優れた吸入特性を示す疎水性アミノ酸の探索

弱い吸引力でも優れた吸入特性を示す疎水性アミノ酸を探索するため、吸入デバイスの内部構造が複雑で薬物放出により強い吸引を必要とする Reverse を用いて検討を行った。また、PFR を健常人達成可能 PFR 範囲 (Reverse 使用時: 12-40 L/min)における最低値 (15 L/min)に設定して吸入特性評価を行った。Fig 14 より、Gly は吸入デバイスに約 60%沈着しており、そのため OE および FPF が他の疎水性アミノ酸と比較して低値であることが分かる。一方、Ile, Leu, Phe は Stage2 における沈着が著しく多く、OE および FPF も高値を示した。以上の結果から、Ile, Leu, Phe は弱い吸引でも優れた吸入特性を示す賦形剤であると考えられ、以下の検討では、この 3 種類の SFD 微粒子について評価を行った。

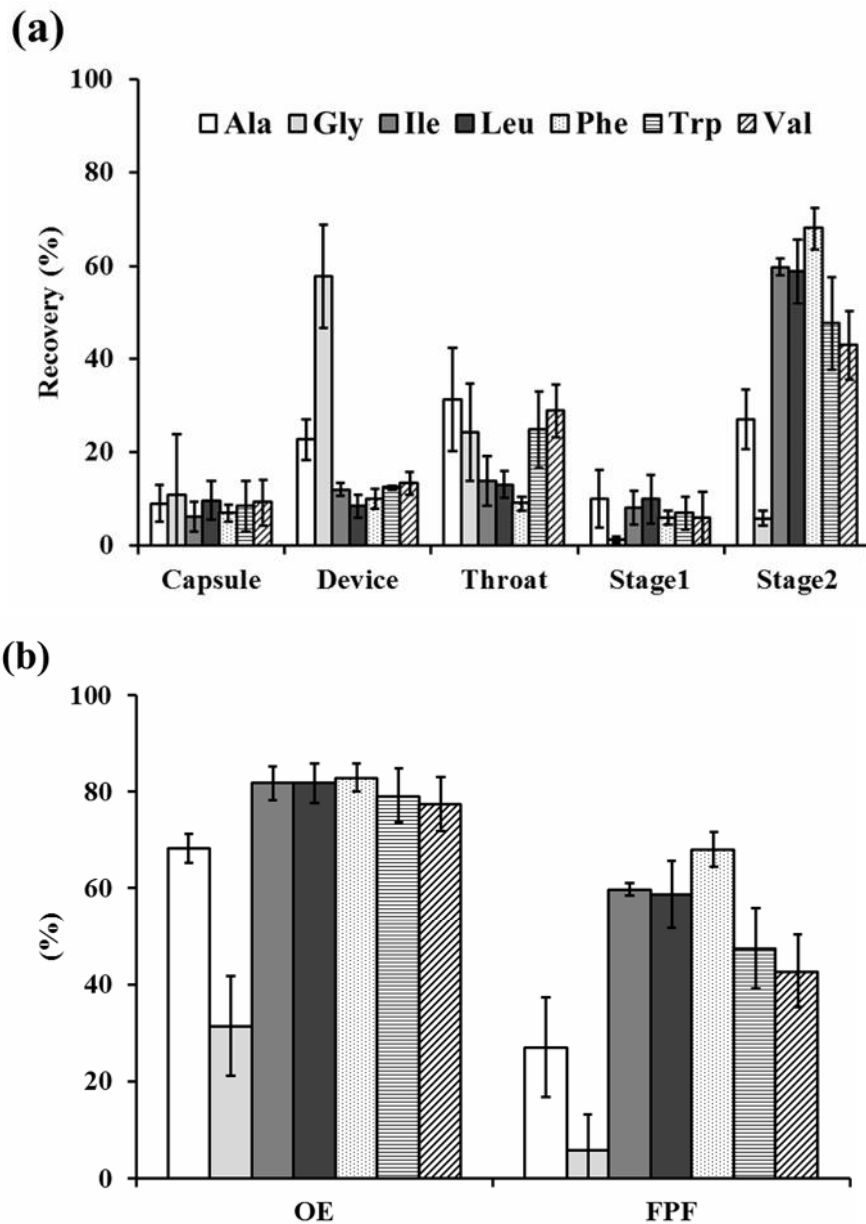


Fig. 14 Inhalation performance of SFD powders of hydrophobic amino acids examined with TSLI (Inhaler: Reverse). (a) Recovery rate and (b) OE and FPF values. The PFR, AUC, and FIR were fixed at 15 L/min, 2.5 L, and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). The OE value of Gly was significantly smaller than those of the other amino acids. The FPF value of Ala was significantly smaller than those of Ile, Leu, and Phe, that of Gly was significantly smaller than those of Ile, Leu, Phe, Trp, and Val, and that of Phe was significantly larger than those of Trp and Val.

III.3.3 PFR 変化時の *in vitro* 吸入特性変化

PFR 変化時における吸入特性への影響を評価するため、吸入デバイスを Single に変更して検討を行った。Single は Reverse と比較して内部構造が簡単であるため、吸入抵抗が小さく、PFR による影響がより明確に得られるのではないかと考え、選択した。Single を用いた際の健常人達成可能 PFR 範囲は 34-115 L/min であるため、本検討では PFR を 30, 60, 120 L/min の 3 条件に設定し、検討を行った。Fig. 15 より、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子は PFR 非依存的な沈着挙動および吸入特性を示し、OE は 80-90%, FPF は 70-90%という優れた吸入特性を示した。

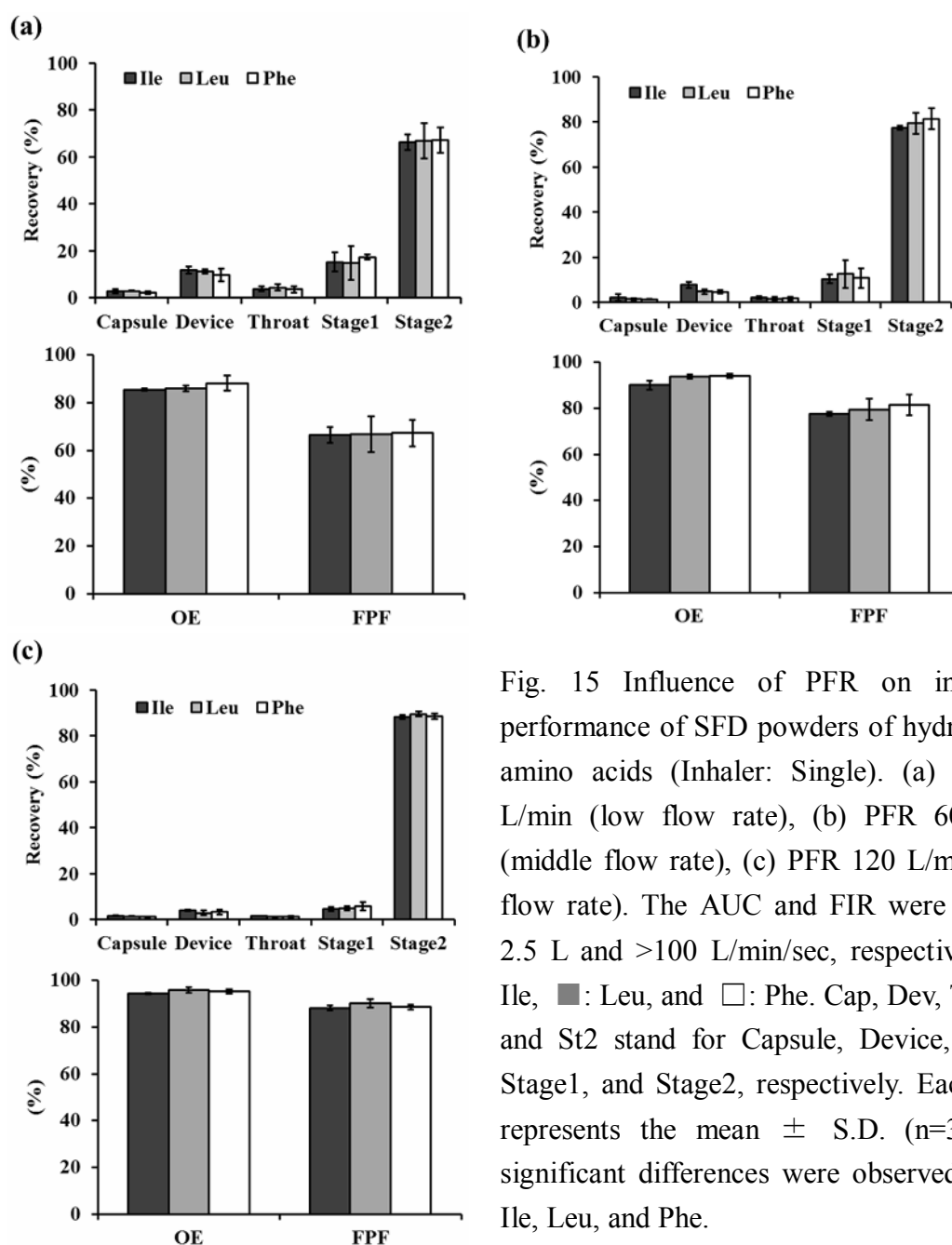


Fig. 15 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders of hydrophobic amino acids (Inhaler: Single). (a) PFR 30 L/min (low flow rate), (b) PFR 60 L/min (middle flow rate), (c) PFR 120 L/min (high flow rate). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. ■: Ile, ■: Leu, and □: Phe. Cap, Dev, Thr, St1, and St2 stand for Capsule, Device, Throat, Stage1, and Stage2, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). No significant differences were observed among Ile, Leu, and Phe.

III.3.4 異なる吸入デバイスを用いた際の吸入特性変化

異なる吸入デバイスを用いた際の吸入特性を評価するため、同じ圧力損失を示す条件において吸入特性の比較を行った。Reverse を用いた際の PFR が 15 L/min の時と Single を用いた際の PFR が 45 L/min の時が同じ圧力損失 (3 kPa) となる [42]ため、この条件において比較検討を行った。Fig. 14 の Reverse を用いた際の吸入特性結果と Fig. 15 の Single を用いた際の吸入特性結果を比較すると、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子ともに吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性を示しており、Ile, Leu, Phe は吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない吸入特性を示す有用な賦形剤であることが示唆された。

III.3.5 加湿前後における吸入特性、粒子形状、結晶性変化

吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性を示した Ile, Leu, Phe の 3 微粒子を室温、RH 75%条件下に一定期間保存し、加湿保存前後における吸入特性、粒子形状、結晶性変化を評価した。Fig. 16 の吸入特性評価結果から、加湿保存前と加湿保存 1 週間および 4 週間後を比較すると、3 微粒子とも加湿保存前と同等の OE および FPF を示しており、加湿保存後も優れた吸入特性を維持することが明らかとなった。また、加湿保存 1 週間後の粒子形状を SEM にて観察した結果 (Fig. 17)、加湿前後で粒子形状に大きな変化は認められず、SFD 微粒子特有の多孔性構造を確認できた。比較対照として FlNa-Man-Leu5%微粒子も同様の条件で加湿保存を 1 日行った後に粒子形状評価を行ったところ、SFD 微粒子特有の多孔性構造が消失し、滑らかな表面を有する球形粒子が観察された。これらの結果から、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子が加湿保存後も優れた吸入特性を維持する原因として、“多孔性構造の維持”が重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、XRPD により結晶性評価を行ったところ (Fig. 18)、Ile, Leu, Phe の原末は結晶性ピークが認められたのに対し、SFD 微粒子はハローパターンが確認された。これは SFD 法により微粒子化した際に非晶質化したと考えられる。加湿保存 1 週間後に測定を再度行った結果、3 微粒子とも加湿保存前と同様のハローパターンを示し、非晶質の維持が確認された。

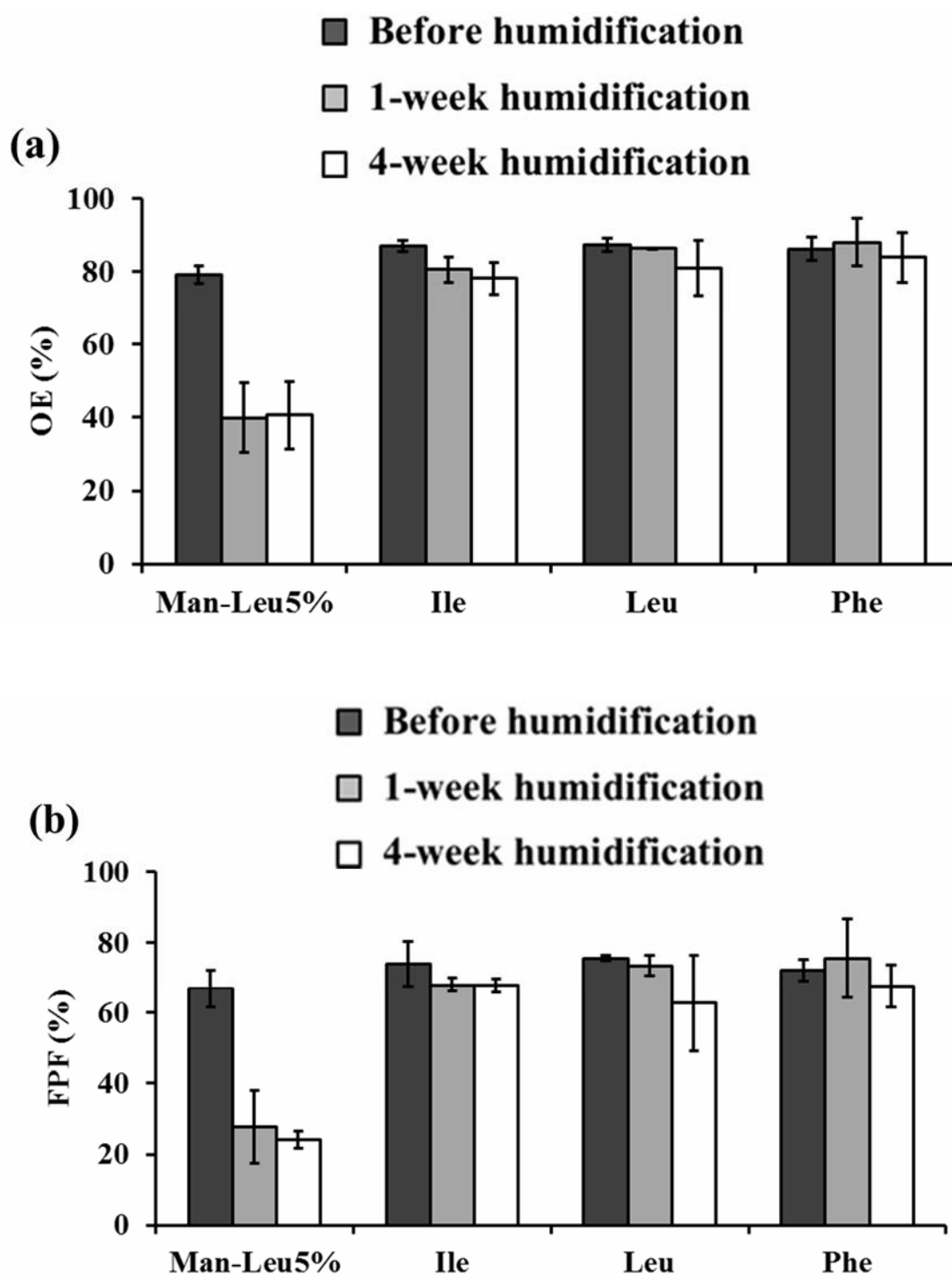


Fig. 16 Comparison of the (a) OE and (b) FPF values of SFD powders before and after humidification at 75%RH (Inhaler: Reverse).

The PFR, AUC, and FIR were fixed at 30 L/min, 2.5 L, and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3). No significant differences were observed among Ile, Leu, and Phe.

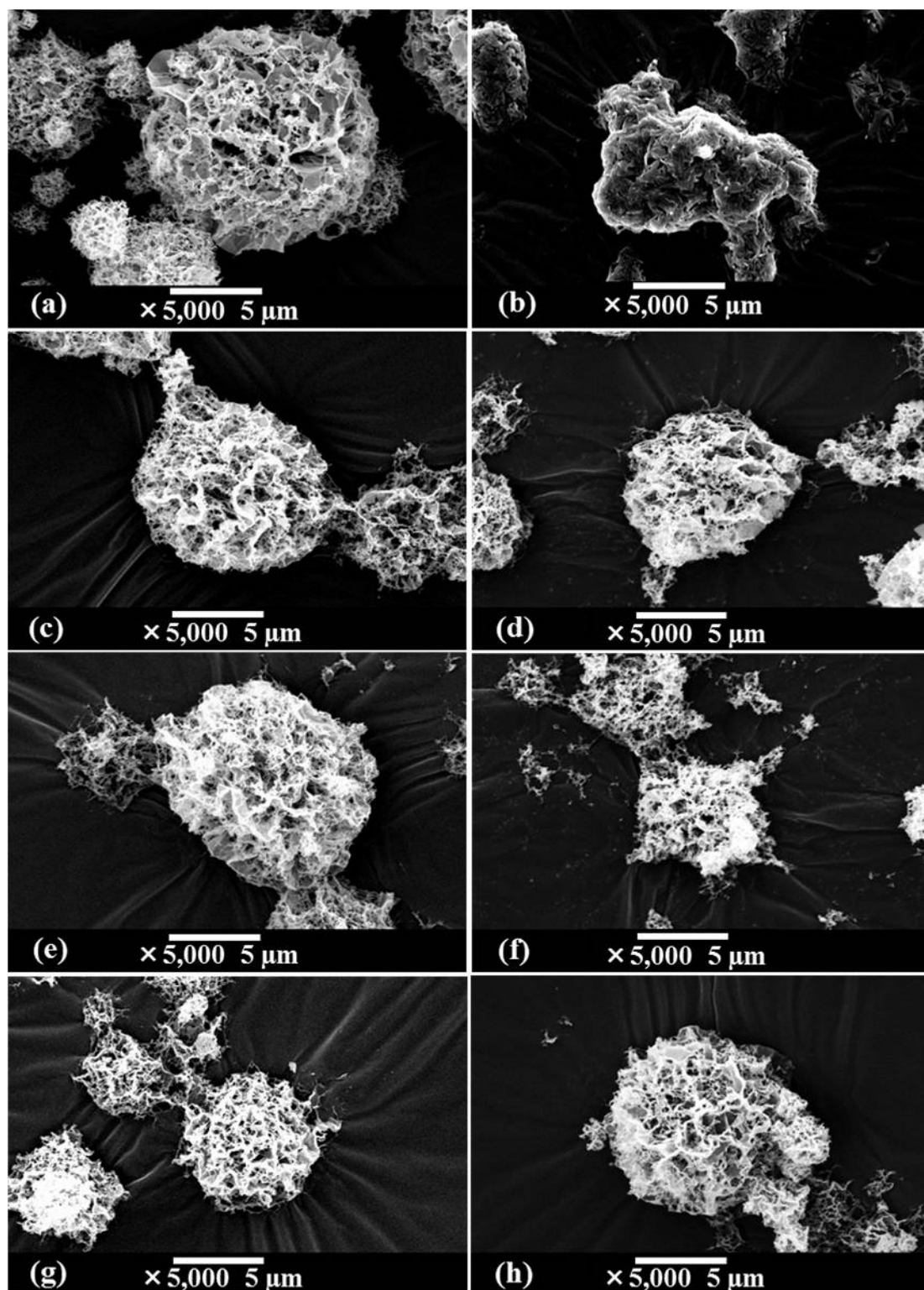


Fig. 17 Morphological analysis of the particle shape before (a, c, e, g) and after (b, d, f, h) humidification for a week except for Man-Leu 5% (b), 1 day.
(a), (b): Man-Leu 5%, (c), (d): Ile, (e), (f): Leu, and (g), (h): Phe.

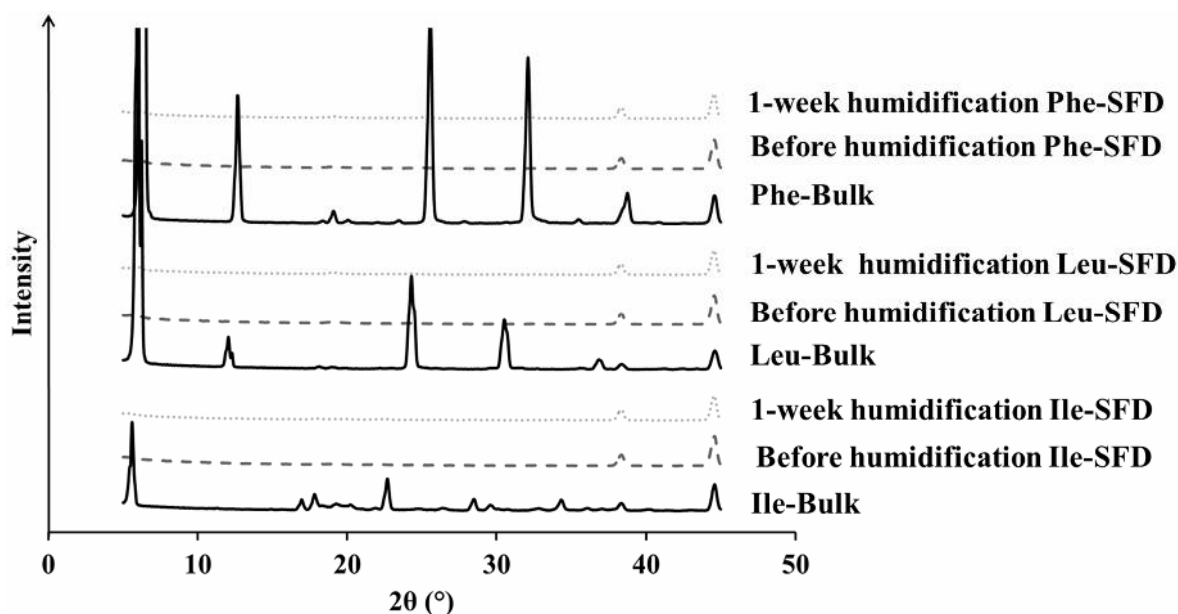


Fig. 18 XRPD patterns of bulk and SFD powders of hydrophobic amino acids.

III.4 考察

SFD 法特有の多孔性構造に由来する比表面積の増大は、製剤の吸湿において大きな問題となる。製剤の吸湿により、吸入デバイスからの薬物放出量の低下および呼吸器内沈着挙動変化に起因する治療効果への影響、口腔内残存による副作用が懸念される。そのため、特に日本やアジアなどの高温多湿な環境では吸入粉末剤の取り扱いおよび保管方法について十分な注意が必要であり、吸湿に対する対策を行った製剤開発が重要である。

第一章において、分散補助剤である Leu を 5% 添加させた SFD 微粒子は吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性を示したものの、十分な耐吸湿性を有していないことを予備実験により確認しており、優れた吸入特性および耐吸湿性の両方を満たす SFD 微粒子の開発が望まれた。

本章では、第一章で分散補助剤として用いた Leu に着目し、製剤中の Leu 比率を高めることで、優れた吸入特性および耐吸湿性の獲得を試みた。また、Leu 以外の疎水性アミノ酸に関しても Leu と同様の効果が得られるかどうか確認するため、種々の疎水性アミノ酸 SFD 微粒子を調製し、加湿前後における吸入特性および粒子形状、結晶性へ与える影響について検討を行った。

調製した 7 種類の疎水性アミノ酸 SFD 微粒子は、すべて多孔性に富む球形粒子であり、良好な分散性を示していた (Fig.12). Fig. 13 の粒度分布測定結果より、Gly は 1-10 μm および 10-100 μm 付近に二峰性のピークが検出され、SEM では観察されなかった凝集体の存在が確認されたのに対し、Gly 以外の疎水性アミノ

酸は 1-10 μm 付近に一峰性のピークを示した。優れた吸入特性を示す疎水性アミノ酸を探索するため、Reverse の健常人達成可能 PFR 範囲において最低 PFR 条件 (PFR 15 L/min) 下で吸入特性評価を行ったところ、Gly は他の疎水性アミノ酸と比較して OE および FPF の著しい低下が認められた (Fig. 14b)。この原因として、Fig. 13 の粒度分布測定結果から示された凝集体の存在が吸入特性の低下につながったと考えられる。一方、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子は OE および FPF が 70% 以上と優れた吸入特性を示した (Fig. 14b)。D50 は Ile および Leu は約 2-4 μm 程度と粒子径が小さいのに対し、Phe は約 7 μm 程度とやや大きいため、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子が示した優れた吸入特性は“粒子径”による影響よりも、第一章で述べた“付着凝集性の低下”や“帯電性の増大”などの他の因子による影響が大きいと考えられる。また、これら 3 微粒子は吸入パターンや吸入デバイスの性能に依らず、優れた吸入特性を示した (Ⅲ.3.3. およびⅢ.3.4.) ことから、Ile, Leu, Phe は吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない吸入特性を示す有用な賦形剤であることが示唆された。この 3 微粒子に対し、室温、RH75% 条件下において一定期間保存後に吸入特性評価を行ったところ、3 微粒子とも加湿保存前と同等の優れた吸入特性を示した (Fig. 16) ため、Ile, Leu, Phe を製剤中に高容量添加することで優れた吸入特性ならびに耐吸湿性を示すことが示唆された。さらに、加湿保存後の粒子形状を SEM 観察により確認した結果 (Fig. 17)、加湿保存前後で粒子形状に大きな変化は認められず、SFD 微粒子特有の多孔性構造が確認された。比較対照として FlNa-Man-Leu 5% 微粒子も加湿保存後に粒子形状評価を行ったところ、SFD 微粒子特有の多孔性構造が消失し、滑らかな表面を有する球形粒子が観察された。これらの結果から、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子が加湿保存後も優れた吸入特性を維持する原因として、“多孔性構造の維持”が重要であることが示唆された。また、XRPD により結晶性評価を行ったところ (Fig. 18)、Ile, Leu, Phe の 3 微粒子はハローパターンを示したため、SFD 法により微粒子化した際に非晶質化したと考えられる。また、加湿保存後に再度測定した結果、3 微粒子ともに加湿保存前と同様のハローパターンを示した。これは加湿保存により製剤の吸湿が生じなかったため、加湿保存前と同様の非晶質を維持することができたと考えられる。

III.5 結論

本章では、SFD 微粒子特有の多孔性構造に由来する“吸湿しやすさ”を改善するため、各疎水性アミノ酸を製剤中に 99%含む SFD 微粒子を 7 種類調製し、加湿前後における吸入特性および粒子形状、結晶性へ与える影響を検討した。吸入特性評価結果から、7 種類の疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の内 Ile, Leu, Phe の 3 微粒子は吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない吸入特性を示すとともに、加湿保存 4 週間後も加湿保存前と同等の吸入特性を示し、優れた耐吸湿性を示した。また、加湿保存前後における FlNa-Man-Leu 5%微粒子形状評価結果より、SFD 微粒子が吸湿すると、特有の多孔性構造が消失することが明らかとなり、加湿保存後も優れた吸入特性を保持するためには“多孔性構造の維持”が重要であることが示唆された。

本章の検討より、優れた吸入特性および耐吸湿性の両方を満たす SFD 微粒子の開発において、Ile, Leu, Phe は有用な賦形剤となることが期待され、これまで市販 DPI で汎用されてきた乳糖に代わる新規賦形剤候補であると言える。また、用いる賦形剤の種類および比率によって吸湿性を制御可能であることが明らかとなった。本章で得られた知見は、使用環境を考慮した吸入粉末剤開発において有益な情報を提供するものと考えられる。

IV 第三章 噴霧急速凍結乾燥微粒子の気中構造崩壊／保持性による吸入特性への影響

IV.1 緒言

第一章および第二章を通じて、吸入粉末微粒子の新規調製法として SFD 法の有用性が示された中、吸入気流中で粒子構造が部分的に崩壊する興味深い現象を発見した (Fig. 19).

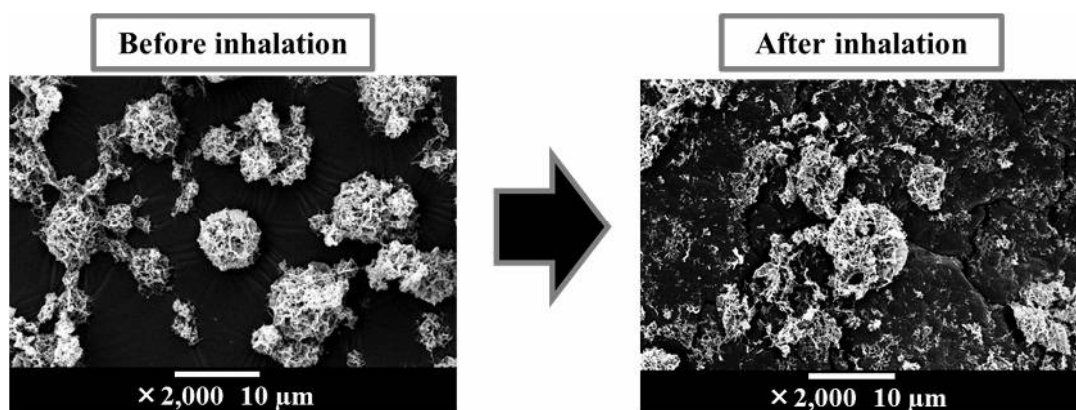


Fig. 19 SEM images of SFD powders before and after inhalation.

このような崩壊しやすさと吸入特性の関係性を明らかにすることで、実用性に優れた新規吸入粉末微粒子の創生につながる有益な情報が得られると考えられる。本章では、試料調製時の濃度を変化させることで粒子の崩壊性が異なる SFD 微粒子を調製し、吸入特性評価を包括的に行うことで、SFD 微粒子の吸入気流中での構造崩壊／保持性が吸入特性へ及ぼす影響について検討を行った。

IV.2 実験方法

IV.2.1 試料

モデル薬物として、蛍光物質であるフルオレセインナトリウム (FI_{Na}) (Sigma-Aldrich Co., Ltd., St. Louis, MO, USA)を用いた。賦形剤として D-(-)-マンニトール (Man) (Wako Pure Chemical Co., Ltd., Osaka, Japan)を用いた。分散補助剤として L-ロイシン (Leu) (Sigma-Aldrich Co., Ltd.)を用いた。その他の試薬、溶液は特級または HPLC 用のものを用いた。

IV.2.2 多孔性の程度が異なる SFD 微粒子の調製

II.2.2.と同様の操作を行い、SFD 微粒子の調製を行った。評価用微粒子として、FI_{Na}-Man-Leu 5%微粒子を調製し、調製時の試料濃度 (0.5 %, 2.0 %, 10 %)を適宜変化させることで、多孔性の程度が異なる 3 種類の SFD 微粒子の調製を試みた。処方の詳細を Table 3 に示した。得られた SFD 微粒子はガラス製のバイアルに回収し、シリカゲルの入ったデシケータ内に室温で保管した。

Table 3 Formulation of SFD powders.

Formulation Name	0.5%	2.0%	10%
D-(-)-Mannitol (Man)	47 mg	141 mg	188 mg
L- Leucine (Leu)	2.5 mg	7.5 mg	10 mg
Sodium fluorescein (FI _{Na})	0.5 mg	1.5 mg	2.0 mg
Total	50 mg/ 10 mL water	150 mg/ 7.5 mL water	200 mg/2.0 mL water

IV.2.3 SEM による粒子形状評価

調製した SFD 微粒子の粒子形状および多孔性の程度を確認するため、II.2.3.と同様の操作で評価を行った。

IV.2.4 LMS を用いた粒子径および粒度分布測定

II.2.4.と同様の方法で評価を行った。

IV.2.5 Andersen Cascade Impactor (ACI)を用いた際の *in vitro* 吸入特性評価

SFD 微粒子の肺送達性を詳細に評価するため、Andersen Cascade Impactor (ACI; Shibata Scientific Technology, LTD., Souka, Japan)を用いた。吸入デバイスには Jethaler[®] Single および Reverse (Hitachi Automotive Systems, Co., Ltd., Takasaki, Japan)を用いた。ACI は多段階の Stage を有しており、より底部に向かうほど cut-off 径が小さくなり、吸引した微粒子がどの Stage まで到達したかによって肺送達性を評価することが可能である。2 号 HPMC カプセル(Qualicaps Co., Ltd.,

Yamatokoriyama, Japan) 内に SFD 微粒子を約 1.0 mg 充填し、吸入デバイス内に留置し、吸入デバイス上部のボタンを押下することによりカプセルに二つの穴を開けた状態でデバイス専用密閉格納器に装着し、格納器前部を ACI の Throat に接続した。さらに微粒子吸引時の吸入パターンを測定する目的で、格納器後部に流量計を設置した。すべての接続を確認した後に再現装置を作動させ、所定の条件で微粒子の吸引を行った。再飛散防止の目的で、各 Stage の捕集板 (プレート) にグリセリンを薄く塗布した。吸引終了後にカプセル、吸入デバイス、Throat、各 Stage、Filter のそれぞれに沈着した SFD 微粒子を PBS で 50 mL のメスフラスコ内に洗いこむことにより回収し、各試料溶液中の FINa 含量を蛍光マイクロプレートリーダー (励起波長: 490 nm, 蛍光波長: 515 nm) (Gemini EM Fluorescence Microplate Reader, Molecular Device Co., Ltd., Tokyo, Japan) により定量した。

吸入パターンは PFR を変化させ、それぞれの条件について 3 回ずつ試験を行った。各条件の変化範囲は以下に示す通りとした ; AUC : 2.5 L, FIR : >100 L/min/sec, PFR : 15-90 L/min.

吸入特性評価の指標としては薬物放出性の指標である Output Efficiency (OE, Eq. 1) 値と肺送達性の指標である Fine Particle Fraction_{stage3} (FPF3, Eq. 2) および肺深部送達性の指標である Fine Particle Fraction_{stage5} (FPF5, Eq. 3) を算出した。各値の算出方法を以下の式に示した。

$$OE = \text{ACI の Throat 以降から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$FPF3 = \text{ACI の Stage3 以降から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 2})$$

$$FPF5 = \text{ACI の Stage5 以降から回収された FINa 量} / \text{全 FINa 回収量} \quad (\text{Eq. 3})$$

IV.2.6 吸入特性評価時の ACI 各 Stage における沈着粒子形状評価

吸入特性評価時の ACI 各 Stage における沈着粒子の形状を評価する目的で、ACI の Stage0-7 および Filter 部分に SEM 用の両面テープを貼付し、吸入特性評価と同様の方法で SFD 微粒子の吸引を行った。吸引後、各部位に貼付した両面テープを SEM 試料台に載せ、30 mA, 90 秒間の条件でプラチナコーティング (JFC-1600, JOEL, Tokyo, Japan) を行い、SEM 観察を行った。

IV.2.7 統計処理

II.2.9.と同様に統計処理を行った。

IV.3 結果

IV.3.1 SFD 微粒子の粒子形状および粒度分布

SEM 観察画像 (Fig. 20) から, SFD 調製時の試料濃度を变化させることで, 多孔性の程度が異なる SFD 微粒子を調製することに成功した (多孔性: $0.5\% > 2.0\% > 10\%$). また, 試料濃度が低いと多孔性が高まり, 球形構造が崩れる傾向が認められた. Fig. 21 の粒度分布は 3 製剤とも一峰性のピークを示し, D50 はそれぞれ $0.5\%: 2.82 \pm 0.09 \mu\text{m}$, $2.0\%: 5.27 \pm 0.20 \mu\text{m}$, $10\%: 6.51 \pm 0.10 \mu\text{m}$ ($n=3$, means $\pm$ S.D.) であった.

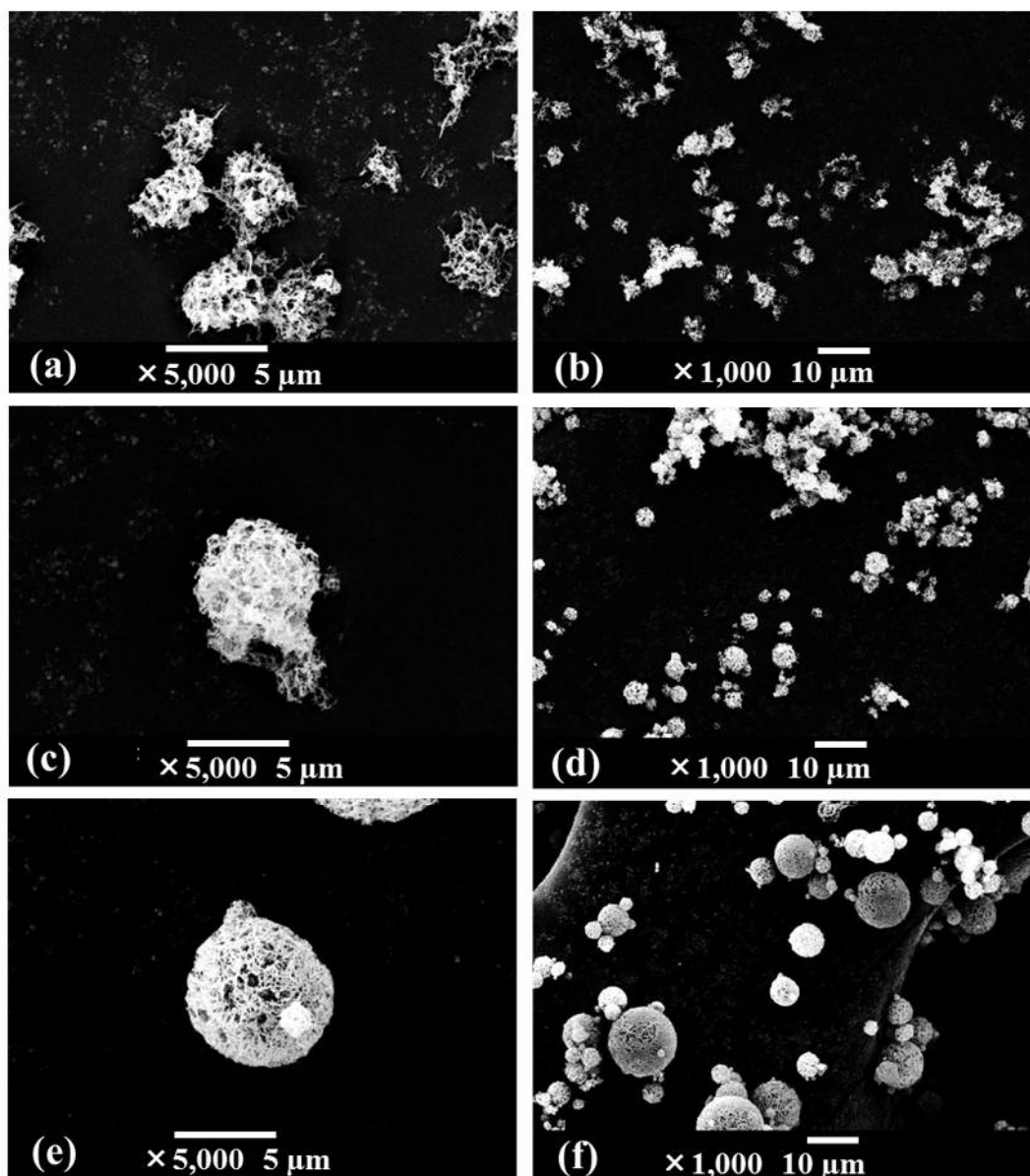


Fig. 20 Morphological analysis of SFD powders by SEM.

(a), (b): 0.5%, (c), (d): 2.0%, and (e), (f): 10% .

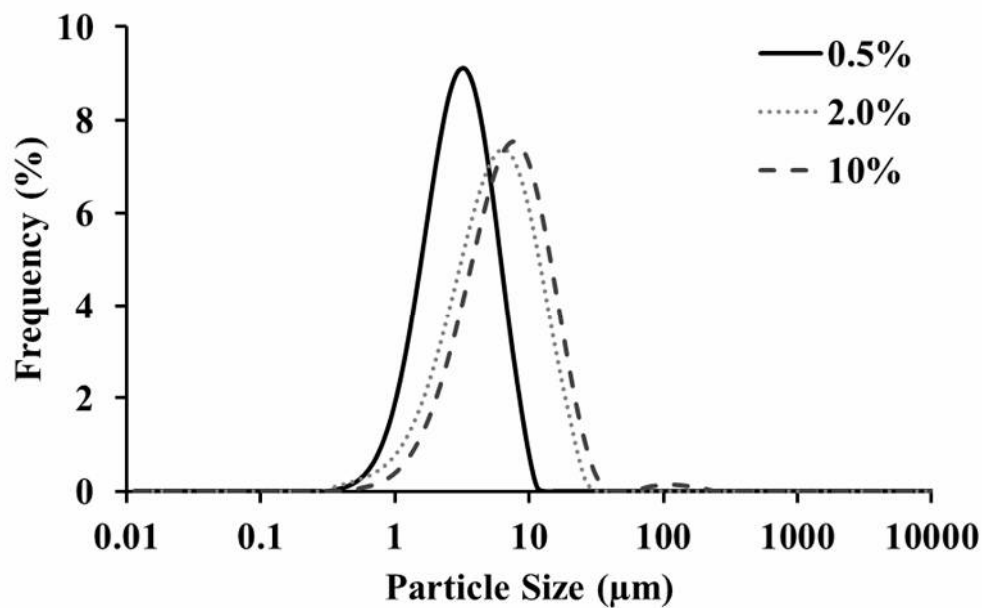


Fig. 21 Particle size distribution of SFD powders.

IV.3.2 ACI を用いた際の PER 変化時の *in vitro* 吸入特性評価 (吸入抵抗の大きいデバイス: Reverse)

吸入抵抗の大きいデバイスである Reverse を用いた際の PFR 変化時における吸入特性評価結果を Fig. 22 に示した. PFR を Reverse 使用時の健常人達成可能 PFR 範囲内における低流量 (15 L/min), 中流量 (30 L/min), 高流量 (60 L/min) の 3 条件に設定し, 検討を行った. その結果, 多孔性の程度に依らず, どの PFR においても同様の沈着挙動および吸入特性を示していた.

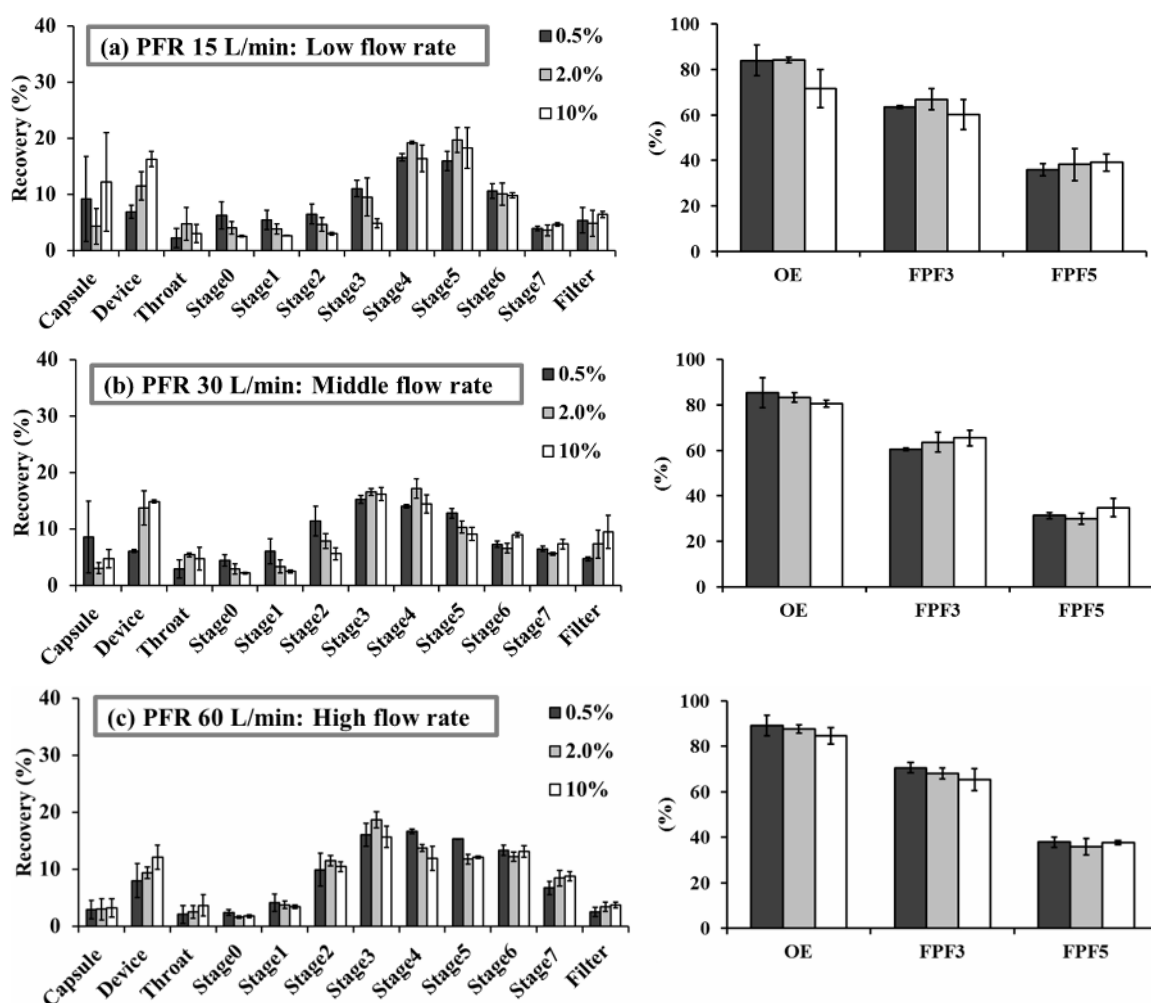


Fig. 22 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders (Inhaler: Reverse). (a) PFR 15 L/min (low flow rate), (b) PFR 30 L/min (middle flow rate), (c) PFR 60 L/min (high flow rate). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

IV.3.3 吸入沈着挙動と沈着粒子形状の関係性 (吸入抵抗の大きいデバイス: Reverse)

ACIを用いた吸入沈着挙動とACI各Stageにおける沈着粒子形状の関係性について注目してみると (Fig. 23), 中流量 (PFR: 30 L/min)の条件において, 多孔性が高い微粒子 (0.5%)は吸入気流中で粒子構造の崩壊が容易に生じ, Stage 上部から肺深部において粒子構造が崩壊したものが多く到達していることが認められた. 一方, 多孔性が低い微粒子 (10%)は Stage 上部における粒子崩壊は認められず, Stage4 までは粒子構造が崩壊しなくても到達するものが多い傾向が認められた. しかし, 肺深部を想定する Stage7 への到達は粒子構造が崩壊したものが多く到達していた.

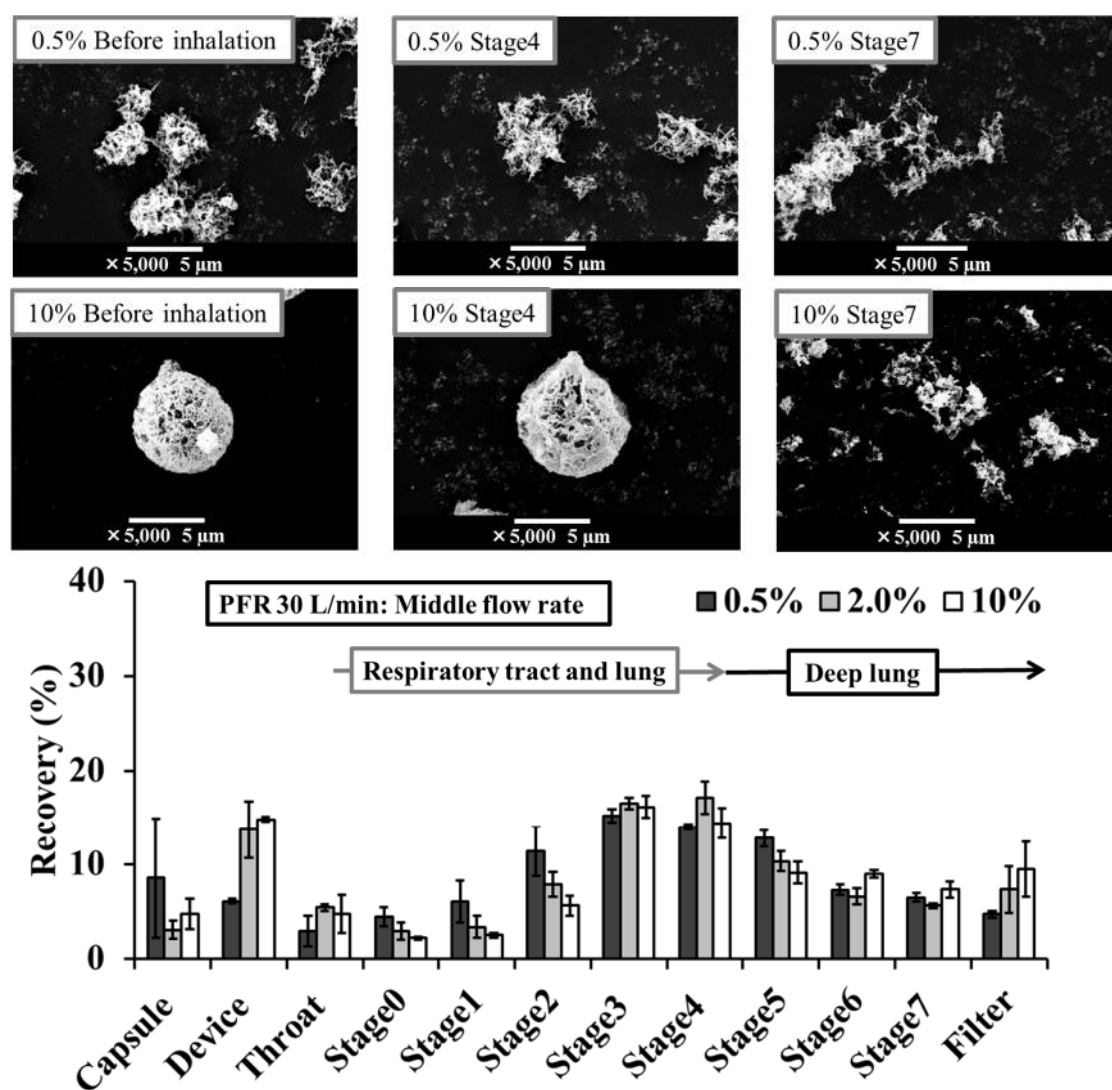


Fig. 23 Correlation of the deposition pattern with particle shape (Inhaler: Reverse).
The PFR, AUC and FIR were fixed at 30 L/min, 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

IV.3.4 ACI を用いた際の PER 変化時の *in vitro* 吸入特性評価 (吸入抵抗の小さいデバイス: Single)

吸入抵抗の小さいデバイスである Single を用いた際の PFR 変化時における吸入特性評価結果を Fig. 24 に示した. PFR を Single 使用時の健常人達成可能 PFR 範囲内における低流量 (30 L/min), 中流量 (60 L/min), 高流量 (90 L/min) および範囲外の最低流量 (15 L/min) の 4 条件に設定し, 検討を行った. その結果, 高流量では IV.3.2 の結果と同様に多孔性の程度に依らず, 同様の沈着挙動および吸入特性が認められた. しかし, 中流量の場合においては, 多孔性の高い微粒子 (0.5%) が最も肺深部における沈着が多く, 最低流量および低流量においては, 多孔性が高い微粒子 (0.5%) は Stage 上部での沈着が多く, 多孔性が低い微粒子 (10%) と比較して肺深部送達が低い傾向が認められた.

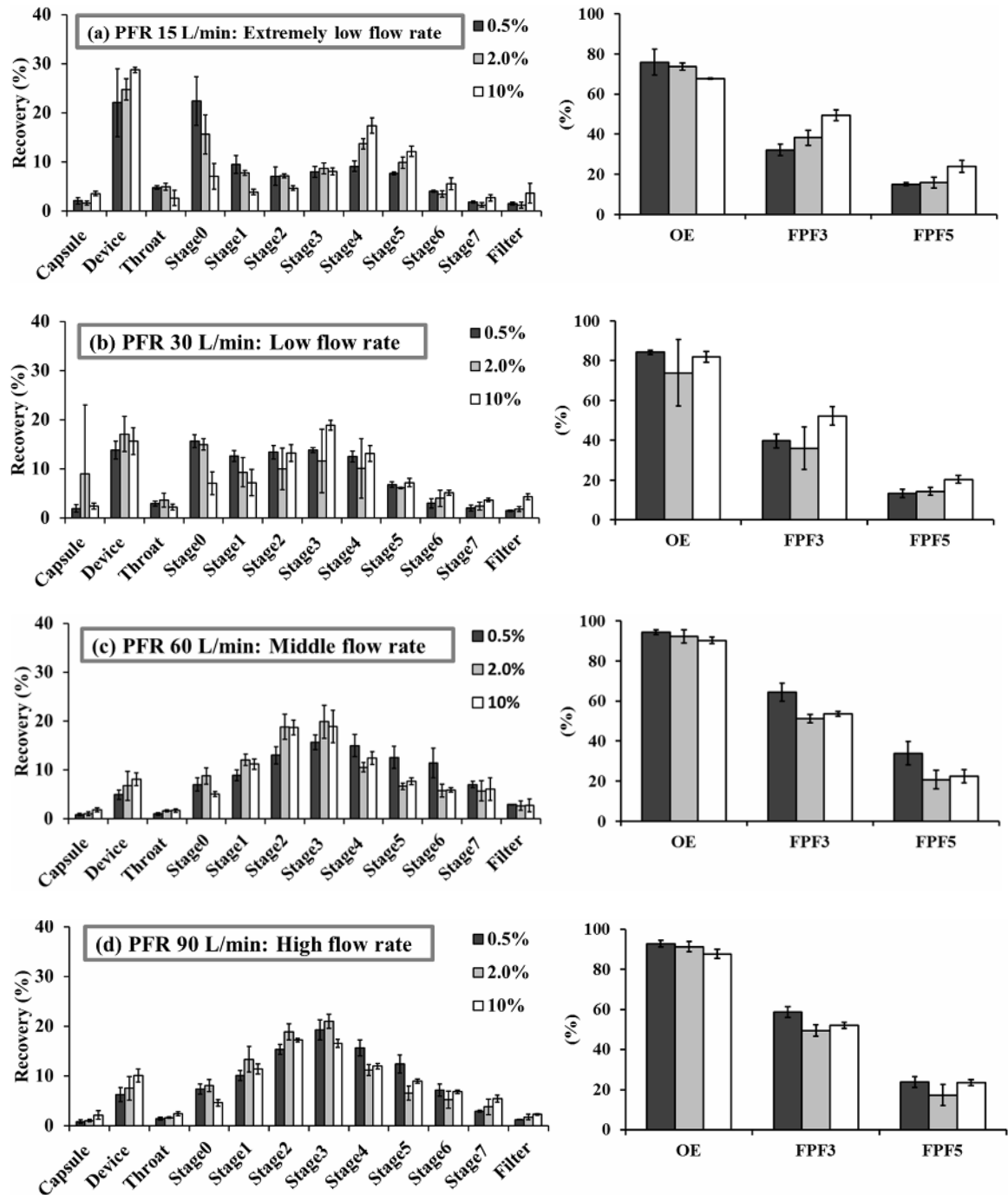


Fig. 24 Influence of PFR on inhalation performance of SFD powders (Inhaler: Single). (a) PFR 15L/min (extremely low flow rate), (b) PFR 30 L/min (low flow rate), (c) PFR 60 L/min (middle flow rate), (d) PFR 90 L/min (high flow rate). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively. Each value represents the mean $\pm$ S.D. (n=3).

IV.3.5 吸入沈着挙動と沈着粒子形状の関係性 (吸入抵抗の小さいデバイス: Single)

IV.3.3 と同様に ACI を用いた吸入沈着挙動と ACI 各 Stage における沈着粒子形状の関係性について注目してみると (Fig. 25), 低流量 (30 L/min) の場合は多孔性が高い微粒子 (0.5%) は吸入気流中で粒子構造の崩壊が生じるものの, 効率的に崩壊されないことが確認でき, このことが肺深部送達の低下に寄与していると考えられる. 一方, 多孔性が低い微粒子 (10%) は各 Stage を通じて良好な分散性が確認でき, 肺深部においても球形構造を維持した粒子が多く観察された. また, 中流量 (60 L/min) の場合の吸入沈着挙動と粒子形状の関係性について注目してみると, IV.3.3 の結果と同様に多孔性の高い微粒子 (0.5%) は吸入気流中で粒子崩壊が生じ, Stage 上部から肺深部において粒子構造が崩壊したものが多く到達していることが認められた. 一方, 多孔性が低い微粒子 (10%) は Stage 上部における粒子崩壊は認められず, Stage4 までは粒子構造が崩壊しなくても到達するものが多い傾向が認められた. しかし, 肺深部を想定する Stage7 への到達は粒子構造が崩壊したものが多く到達していた.

高流量 (90 L/min) の場合の吸入沈着挙動と粒子形状の関係性について注目してみると, 多孔性の高い微粒子は中流量 (60 L/min) の結果と同様に Stage 上部から肺深部において粒子構造が崩壊したものが多く到達していることが認められた. 一方, 多孔性の低い微粒子 (10%) において, 低流量 (30L/min) および中流量 (60 L/min) の場合に認められなかった Stage4 からの粒子構造の崩壊が認められた.

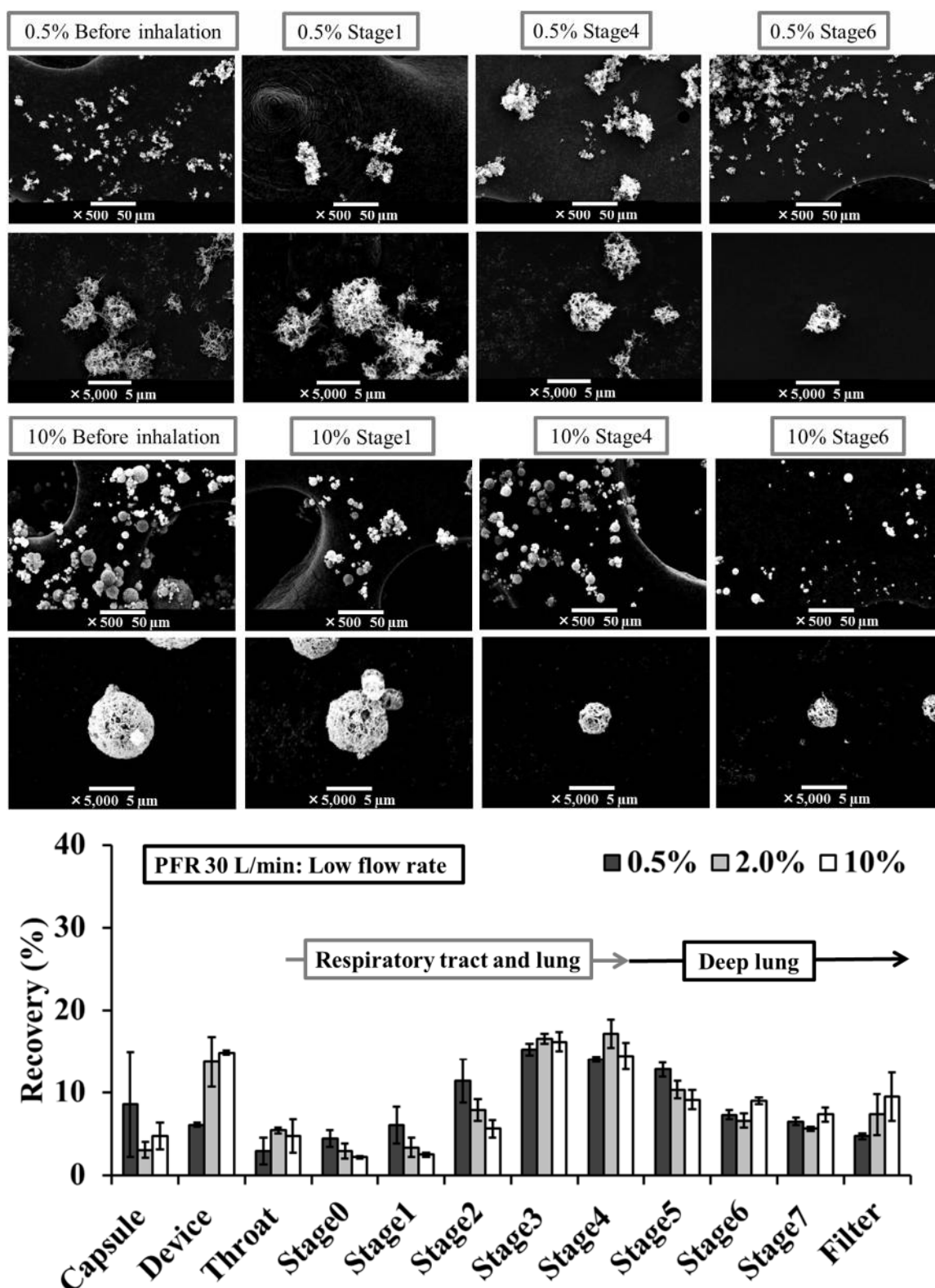


Fig. 25 Correlation of the inhaled deposition with particle shape (Inhaler: Single, PFR 30 L/min). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

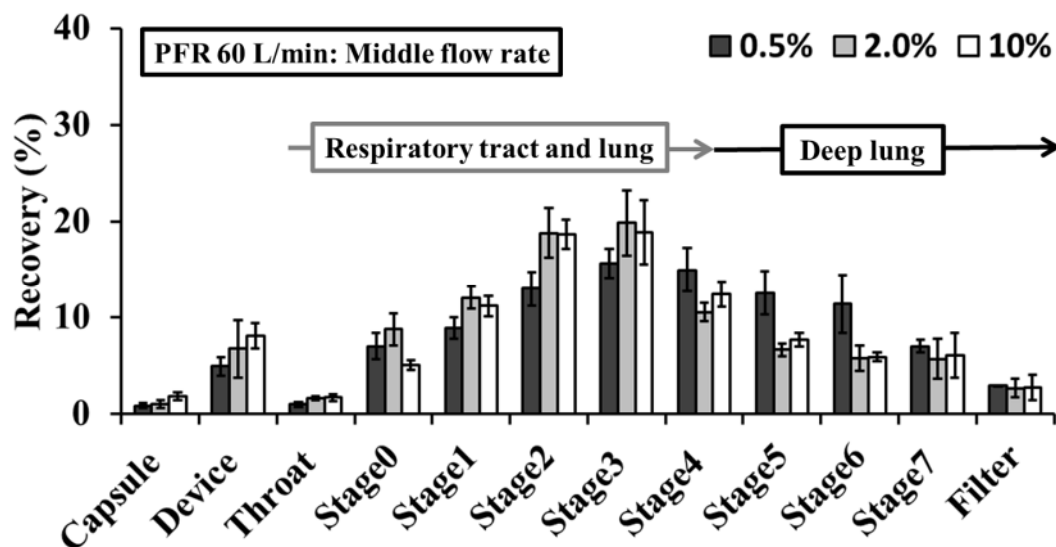
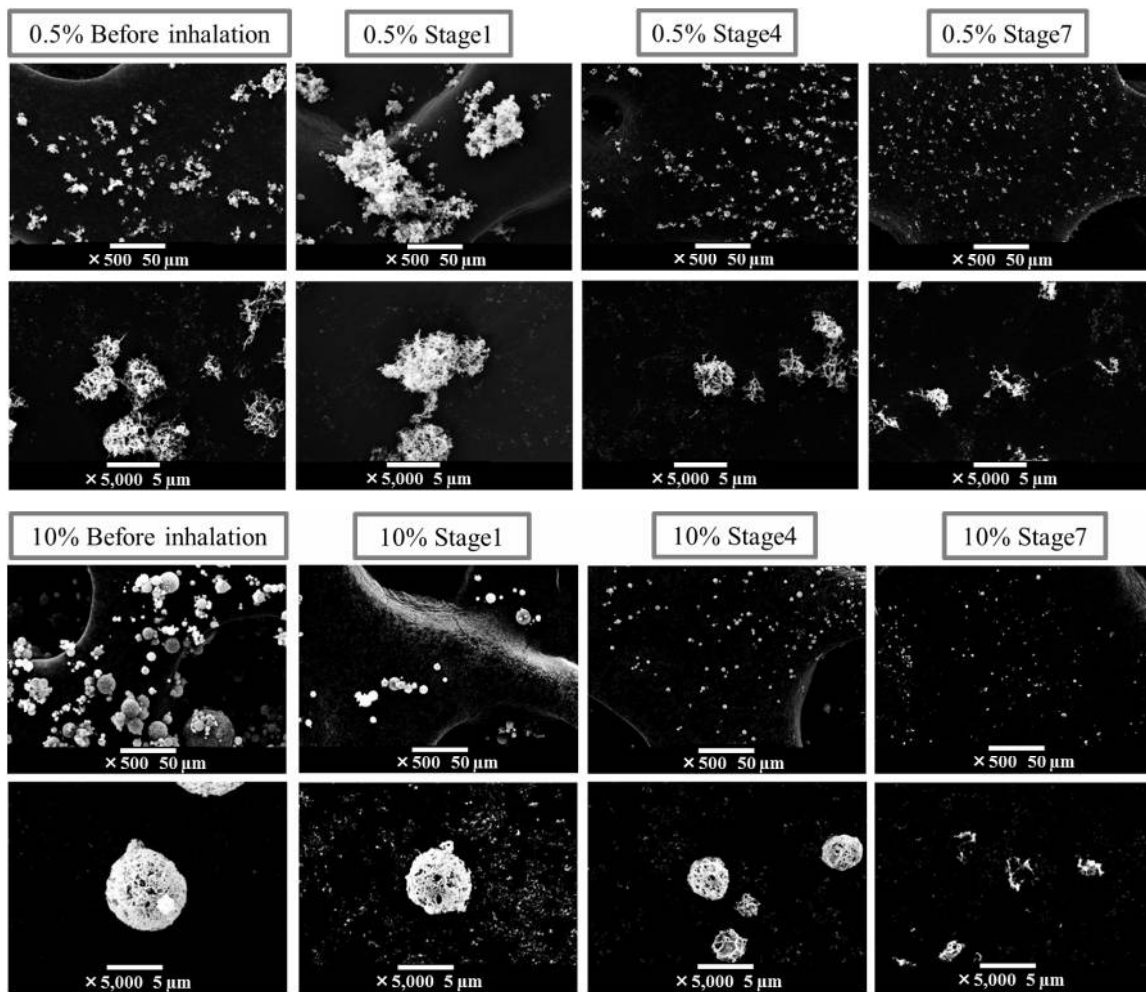


Fig. 26 Correlation of the inhaled deposition with particle shape (Inhaler: Single, PFR 60 L/min). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

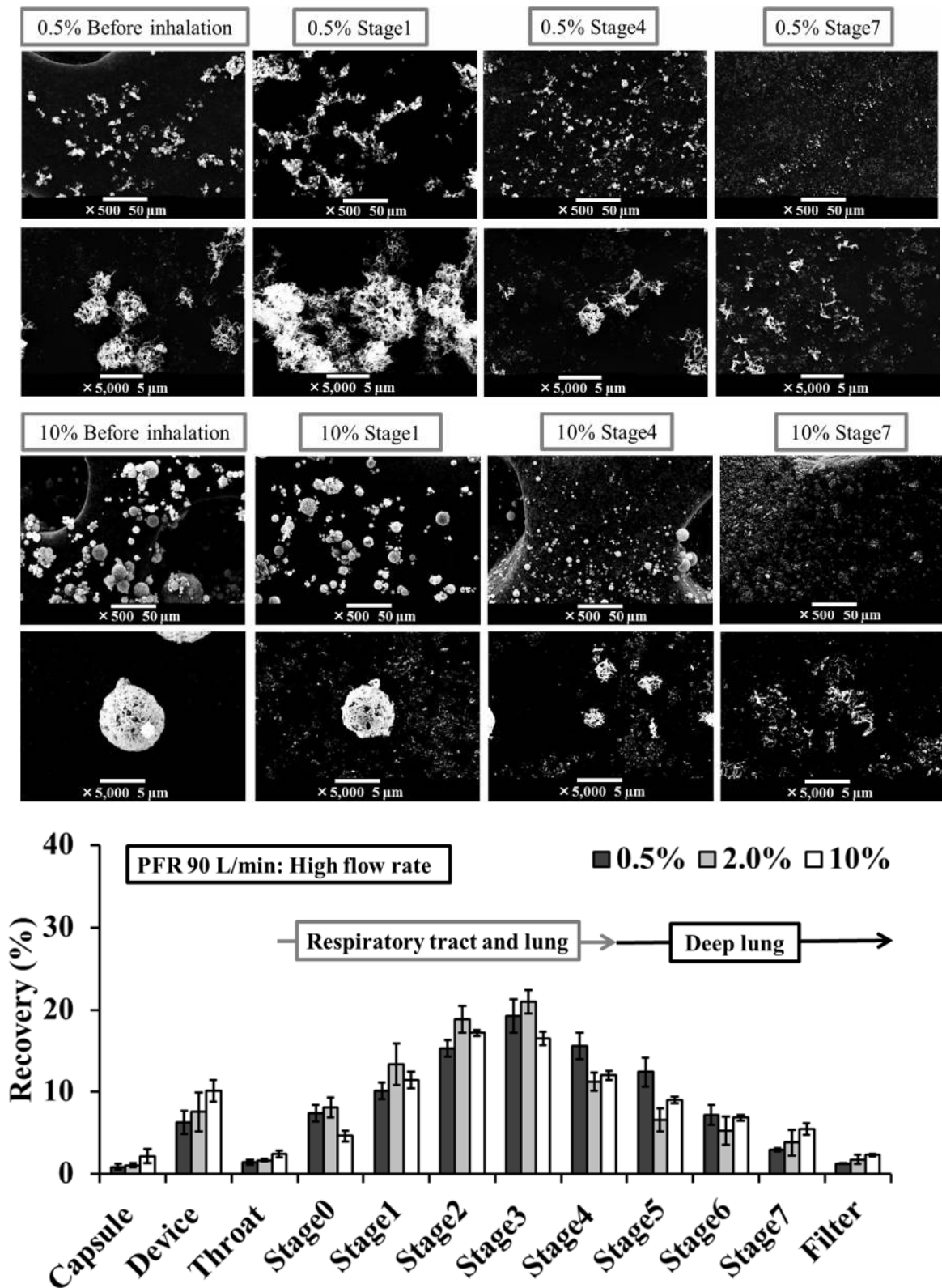


Fig. 27 Correlation of the inhaled deposition with particle shape (Inhaler: Single, PFR 90 L/min). The AUC and FIR were fixed at 2.5 L and >100 L/min/sec, respectively.

IV.4 考察

本章では、試料調製時の濃度を変化させることで粒子強度が異なる SFD 微粒子を調製し、吸入特性評価を包括的に行うことで、SFD 微粒子の吸入気流中での構造崩壊／保持性が吸入特性へ及ぼす影響について検討を行った。

評価用微粒子として、調製時の試料濃度を変化させることで、多孔性の程度が異なる SFD 微粒子の調製を試みた。Fig. 20 の SEM 観察画像より、試料濃度が低い (0.5%) と多孔性が高まり、球形構造が崩れる傾向が認められ、試料濃度が高い (10%) と多孔性が低下し、球形構造を保つ傾向が認められた。以上より、調製時の試料濃度を調節することで、多孔性の程度を制御可能であることが示唆された。Fig. 21 の粒子径および粒度分布測定の結果から、3 微粒子とも 1-10 μm 付近に一峰性のピークを示し、D50 が 1-6 μm であることから、吸入粉末微粒子に適した幾何学的粒子径を有していることが示された。また、D50 について注目すると、多孔性が低い微粒子 (10%) は多孔性が高い微粒子 (0.5%) と比較して 2 倍以上高い値であった。この理由として、粒子径および粒度分布測定時の粒子分散方法として、真空ポンプを用いていることが挙げられる。この真空ポンプの吸い上げる力によって多孔性が高い微粒子 (0.5%) の粒子構造崩壊が容易に生じたため、D50 が低下したと考えられる。

多孔性の程度が異なる 3 種類の微粒子を用いて、吸入気流により粒子の崩壊性が変化するのか、詳細な吸入沈着挙動を示すことができる ACI を用いて吸入特性評価を行った。吸入デバイスとして Reverse を用いた際の PFR 変化時における吸入特性評価結果 (Fig. 22) より、多孔性の程度に依らず、どの PFR 条件においても同様の沈着挙動および吸入特性を示すとともに、MMAD についても 1-2 μm であり、有意差は認められなかった。しかし、Fig. 23 の吸入沈着挙動と沈着粒子形状の関係性について注目すると、中流量 (30 L/min) の条件において、多孔性が高い微粒子 (0.5%) は粒子構造の崩壊が容易に生じ、全 Stage を通じて粒子構造が崩壊したものが多く到達しているのに対し、多孔性が低い微粒子 (10%) は Stage4 までは粒子が分散したもの (非崩壊粒子) が多く到達し、肺深部を想定する Stage7 への沈着は粒子構造が崩壊したもの (崩壊粒子) が多く到達していた。これらの結果から、沈着挙動はどの PFR 条件においても同様で、ある一定の Stage までは粒子構造の崩壊に依らない沈着を示すものの、肺深部送達には粒子構造の崩壊が重要な役割を果たしていることが示唆された。

また、吸入デバイスとして Single を用いた際の PFR 変化時における吸入特性評価結果より (Fig. 24)、高流量 (90 L/min) では多孔性の程度に依らず、同様の沈着挙動および吸入特性が認められた。しかし、中流量 (60 L/min) の場合においては、多孔性の高い微粒子 (0.5%) が最も肺深部における沈着が多く、最低流量 (15 L/min) および低流量 (30 L/min) においては、多孔性が高い微粒子 (0.5%)

は Stage 上部での沈着が多く、多孔性が低い微粒子 (10%)と比較して肺深部送達
が低い傾向が認められた。これらの条件における吸入沈着挙動と沈着粒子形状
の関係性について注目してみると、高流量 (90 L/min)条件において、多孔性が
高い微粒子 (0.5%)および多孔性の低い微粒子 (10%)ともに Stage4 での粒子構
造の崩壊が認められた。この結果から、吸入抵抗の低い Single でも吸入流量が
高い場合は、多孔性の低い微粒子 (10%)であっても多孔性の高い微粒子 (0.5%)
と同様の吸入沈着挙動および粒子構造の崩壊を示すことが明らかとなった。ま
た、中流量 (60 L/min)条件において、多孔性の高い微粒子 (0.5%)は吸入気流中
で粒子崩壊が生じ、Stage 上部から肺深部において粒子構造が崩壊したものが多
く到達しており、肺深部送達量も多いことが示された。一方、多孔性が低い微
粒子 (10%)は Stage 上部における粒子崩壊は認められず、Stage4 までは粒子構造
が崩壊に依らない沈着が認められた。しかし、肺深部を想定する Stage7 への到
達には粒子構造が崩壊したものが多く到達していたが、肺深部送達量は少なかっ
た。以上の結果から、吸入抵抗が低いデバイスを使用し、かつ PFR が中流量の
場合は“粒子構造の崩壊しやすさ”が肺深部送達において重要であることが示
唆された。低流量 (30L/min)条件においては、多孔性の高い微粒子 (0.5%)は気
流中で粒子構造の崩壊が生じるものの、効率的に崩壊されないことが確認でき、
このことが Stage 上部における沈着の増大を引き起こし、肺深部送達が低下す
るものと考えられた。また、多孔性の低い微粒子 (10%)は全 Stage において良
好な分散性が確認でき、肺深部においても粒子形状を保持したものが多く認め
られた。これは球形構造を有することによる付着凝集性の低下により、低流量
においても良好な分散性を示すため、肺深部送達が増加していると原因考えら
れる。これらの結果から、吸入抵抗が低いデバイスを使用し、かつ PFR が低流
量の場合は“粒子構造の崩壊しやすさ”よりも“良好な分散性”を有すること
が肺深部送達において重要であることが示唆された。

上記の結果をまとめると、肺深部送達には粒子構造の崩壊したものが適する
と考えられるが、吸入抵抗の小さいデバイスを使用し、かつ PFR が低流量の場
合は“粒子の崩壊しやすさ”よりも“良好な分散性”が重要であると言える。
今回、吸入抵抗が小さいデバイスとして Single を用いたが、Single は現在市販
されている吸入デバイスのハンディーヘラー®およびタービュヘイラー®よりも
吸入抵抗が小さいデバイスであるとともに、タービュヘイラー®よりも吸入抵抗
が小さなデバイスからなる吸入粉末剤 (ディスカス®など)が多数市販化されて
いるため、実際にヒトが吸入した際に吸入パターンの違いによってこのような
沈着挙動の違いが十分起こり得ると考えられる。そのため、“粒子の崩壊しやす
さ”および“良好な分散性”の両方の性質をバランス良く有する SFD 微粒子を
開発することで、効率的な肺および肺深部送達が可能であると考えられる。

IV.5 結論

試料調製時の濃度を変化させることにより，多孔性の程度が異なる SFD 微粒子の調製に成功した．吸入沈着挙動と沈着粒子形状変化の関係性から，肺深部送達には粒子構造の崩壊したものが適すると考えられるが，吸入抵抗が小さいデバイス使用し，かつ PFR が低流量の場合は，“粒子の崩壊しやすさ”よりも“良好な分散性”を有する微粒子が適することが示唆された．以上の結果から，“粒子の崩壊しやすさ”および“良好な分散性”の両方の性質を有することで，効率的な肺および肺深部送達が可能であると考えられる．

本章で得られた成果は，SFD 微粒子の吸入粉末微粒子としての実用化を大きく推進するとともに，粒子構造の崩壊／保持バランスの制御に基づく吸入粉末剤開発の粒子設計新指針を提示できるものと考えられる．

V 総括

本論文は 3 章から構成されており，DPI 開発における“吸入剤応用に適した MMAD の獲得”と“付着凝集性の改善”の解決および“患者の吸入パターンによる影響を受けやすい”という吸入粉末剤の欠点克服を目的として，SFD 法により得られる多孔性微粒子に着目し，賦形剤の種類および比率，調製時の試料濃度を調節することで，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性および耐吸湿性，効率的な肺深部送達性を発揮する吸入粉末微粒子の開発を試みた．

第一章 噴霧急速凍結乾燥法による吸入特性が吸入パターンに依存しない吸入粉末微粒子の開発

本章では，多孔性微粒子が得られる SFD 法および分散補助剤である Leu を組み合わせ，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依存しない吸入粉末微粒子の開発を試みた．吸入特性評価結果から，5%以上の Leu 添加により吸入特性が著しく改善されるとともに，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らず優れた吸入特性を示すことが明らかとなった．また，この Leu 添加による吸入特性改善効果は添加量依存的な“粒子間付着力の低下”および“帯電性の増加”が寄与していることが示唆された．

本章で開発した Leu 添加 SFD 微粒子は吸入パターンや吸入デバイスの性能に依らず優れた吸入特性を発揮できることから，吸入パターンが異なる様々な患者が服用しても，治療に要する十分な肺送達量が保証され，安定した治療効果を達成することが期待でき，吸入粉末剤による吸入療法の拡大に大きく貢献できると考えられる．また，従来の吸入粉末剤では適用が困難であった高齢者や幼児に対する使用拡大も十分に期待できると考えられる．

第二章 優れた吸入特性および耐吸湿性を示す吸入粉末微粒子の開発

第一章にて，多孔性微粒子調製方法である SFD 法と分散補助剤である Leu を組み合わせることにより，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性を示す SFD 微粒子の開発に成功したものの，SFD 法に由来する多孔性構造は比表面積を増大させ，吸湿性が大きな問題となる．製剤の吸湿により，吸入デバイスからの薬物放出量の低下および呼吸器内沈着挙動変化に起因する治療効果への影響，口腔内残存による副作用が懸念される．現在，疎水性アミノ酸の吸入特性改善効果を利用した吸入粉末微粒子の開発が数多く行われているが，耐吸湿性に注目した研究は行われておらず，また，第一章において製剤中に Leu を 5%添加させた SFD 微粒子は優れた吸入特性を示したものの，十分な耐吸湿性を有していないことを予備実験により確認している．

本章では、SFD 微粒子特有の多孔性構造に由来する“吸湿しやすさ”を改善するため、7 種類の疎水性アミノ酸をそれぞれ製剤中に 99%含む SFD 微粒子を調製し、加湿前後における吸入特性および粒子形状、結晶性へ与える影響を検討した。吸入特性評価結果から、7 種類の疎水性アミノ酸 SFD 微粒子の内 Ile, Leu, Phe の 3 製剤は吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない吸入特性を示すとともに、加湿保存 4 週間後も加湿保存前と同等の吸入特性を示し、優れた耐吸湿性を示した。また、加湿保存前後における粒子形状評価結果より、吸湿すると、SFD 微粒子特有の多孔性構造が消失することが明らかとなり、加湿保存後も優れた吸入特性を維持するためには“粒子形状の維持”が重要であることが示唆された。

本章より、優れた吸入特性および耐吸湿性の両方を満たす SFD 微粒子の開発において、Ile, Leu, Phe は有用な賦形剤となることが期待され、これまで市販 DPI で汎用されてきた乳糖に変わる新規賦形剤候補であると言える。また、用いる賦形剤の種類および比率によって吸湿性を制御可能であることが明らかとなった。本章で得られた知見は、使用環境を考慮した吸入粉末剤開発において有益な情報を提供するものと考えられる。

第三章 噴霧急速凍結乾燥微粒子の気中構造崩壊／保持性による吸入特性への影響

第一章および第二章を通じて、吸入粉末微粒子の新規調製法として SFD 法の有用性が示された中、吸入気流中で粒子構造が部分的に崩壊する興味深い現象を発見した。本章では、試料調製時の濃度を変化させることで粒子の崩壊性が異なる SFD 微粒子を調製し、吸入特性評価を包括的に行うことで、SFD 微粒子の吸入気流中での構造崩壊／保持性による吸入特性への影響について検討を行った。

試料調製時の濃度を変化させることにより、多孔性の程度を制御できることを見出し、多孔性の異なる 3 種類の SFD 微粒子の調製に成功した。吸入沈着挙動と沈着粒子形状変化の関係性から、肺深部送達には粒子構造の崩壊したものが適すると考えられるが、吸入抵抗が小さいデバイス使用時かつ PFR が低流量の場合は、“粒子の崩壊しやすさ”よりも“良好な分散性”を有する微粒子が適することが示唆された。以上の結果から、“粒子の崩壊しやすさ”および“良好な分散性”の両方の性質を有することで、効率的な肺および肺深部送達が可能であると考えられる。

本章で得られた成果は、SFD 微粒子の吸入粉末微粒子としての実用化を大きく推進するとともに、粒子構造の崩壊／保持バランスの制御に基づく吸入粉末剤開発の粒子設計新指針を提示できるものと考えられる。

これらの結果より，吸入パターンおよび吸入デバイスの性能に依らない優れた吸入特性および耐吸湿性を有する吸入粉末微粒子の開発に成功するとともに，賦形剤の種類および比率，調製時の試料濃度などを調節することで，吸入特性改善，吸湿性や崩壊性など様々な条件に応じた対応が可能であることを見出した．本研究で得られた知見は，吸入粉末剤の適応拡大に向けた新規吸入粉末微粒子の開発において，有用な情報を提供するものと考えられる．

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、御助言を賜りました名城大学大学院薬学研究科 丹羽敏幸教授に深謝致します。論文の作成に当たり懇切丁寧な御指導、御助言を賜りました名城大学大学院薬学研究科 灘井雅行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 奥田知将助教ならび近藤啓太助教に深く感謝致します。

本研究に際し、吸入流量計及び圧力計を御提供頂きました日立オートモティブシステムズ株式会社 石関一則様、岡田豊子様には深く感謝申し上げます。粒子間付着力および帯電性測定に御協力頂きました株式会社ナノシーズ 島田泰拓博士に深く感謝申し上げます。

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。

最後に、研究を陰ながら支えて下さった家族に心から感謝致します。

VII 参考文献

1. Richard Dalby, Julie Suman : Technological milestones in asthma treatment.
Inhalation therapy, 55, 779-791 (2003)
2. Handoko Adi, Paul M. Young, Hak-Kim Chan, Helen Arus, Daniela Traini :
Co-spray-dried mannitol-ciprofloxacin dry powder inhaler formulation for cystic
fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease.
Eur J Pharm Sci, 40, 239-247 (2010)
3. Francesca Ungaro, Roberta d'Emmanuele di Villa Bianca, Concetta Giovino,
Agnese Miro, Raffaella Sorrentino, Fabiana Quaglia, Maria Immacolata 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)
4. Myrna B Dolovich, Rajiv Dhand, Aerosol drug delivery: developments in device
design and clinical use.
Lancet, 377, 1032-1045 (2011)
5. Myrna B Dolovich , Richard C Ahrens, Dean R Hess, Paula Anderson, Rajiv Dhand,
Joseph L Rau, Gerald C Smaldone, Gordon Guyatt : Device selection and outcomes
of aerosol therapy: Evidence-based guidelines: American college of chest
physicians/american college of asthma, allergy, and immunology.
Chest, 127, 335-371 (2005)
6. Benowitz N, Forsyth RP, Melmon KL, Rowland M : Lidocaine disposition kinetics
in monkey and man. II. Effects of hemorrhage and sympathomimetic drug
administration.
Clin Pharmacol Ther, 16, 99-109 (1974)
7. Moawia M. Al-Tabakha : Future prospect of insulin inhalation for diabetic patients:
The case of Afrezza versus Exbera.
J Control Release, 215, 25-38 (2015)
8. Laurie W. Fleming, Joshua W. Fleming, Courtney S. Davis : Afrezza: An inhaled
approach to insulin delivery.
J American Association of Nurse Practitioners, 27, 597-601 (2015)
9. Anne J. Kugler, Kristin L. Fabbio, Davied Q. Pham, Daniel A. Nadeau : Inhaled
technosphere insulin: A novel delivery system and formulation for the treatment of
type 1 and 2 diabetes mellitus.
Pharmacotherapy, 35, 298-314 (2015)

10. Tamara Goldberg, Elaine Wong : Afrezza (insulin human) inhalation powder a new inhaled insulin for the management of type-1 or type-2 diabetes mellitus.
Pharmacy and Therapeutics, 40, 735-741 (2015)
11. M.P. Timsina, G.P. Martin, C. Marriott C, D. Ganderton, M. Yianneskis : Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers.
Int J Pharm, 101, 1-13 (1994)
12. Stephen P. Newman, Ann Hollingworth, Andrew R. Clark : Effect of different modes of inhalation on drug delivery from a dry powder inhaler.
Int J Pharm, 102, 127-132 (1994)
13. Nazrul Islam, Ellen Gladki : Dry powder inhalers (DPIs)--a review of device reliability and innovation.
Int J Pharm, 360, 1-11 (2008)
14. Borgström L, Bisgaard H, O'Callaghan C, Pedersen S : Dry-powder Inhalers.
In: Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone GC, editors. Drug delivery to the lungs, Marcel Dekker, Inc., 421-448 (2002)
15. V.N.P. Le, E. Robins, M.P. Flament : Agglomerate behaviour of fluticasone propionate within dry powder inhaler formulations.
Eur J Pharm Biopharm, 80, 596-603 (2012)
16. Estelle Guenette, Andrew Barrett, Debbie Kraus, Rachel Brody, Ljiljana Harding, Gavin Magee : Understanding the effect of lactose particle size on the properties of DPI formulations using experimental design.
Int J Pharm, 380, 80-88 (2009)
17. Martin J Telko, Anthony J Hickey : Dry powder inhaler formulation.
Respir Care, 50, 1209-1227 (2005)
18. Paul M. Young, Philip Kwork, Handoko Adi, Hak-KimChan, Daniela Traini : Lactose composite carriers for respiratory delivery.
Pharm Res, 26, 802-810 (2009)
19. Mark M. Baily, Eric M. Gorman, Eric J. Munson, Cory Berkland : Pure insulin nanoparticle agglomerates for pulmonary delivery.
Lungmuir, 24, 13614-13620 (2008)
20. Renata P. Raffin, Paolo Colombo, Fabio Sonvico, Alessandra Rossi, Denise S. Jornada, Adriana R. Pohlmann, Silvia S. Guterres : Agglomerates containing pantoprazole microparticles: modulating the drug release.
AAPS Pharm Sci Tech, 10, 335-345 (2009)

21. Paola Russo, Cecilia Sacchetti, Irene Pasquali, Ruggero Bettini, Gina Massimo, Paolo Colombo, Alessandra Rossi : Primary microparticles and agglomerates of morphine for nasal insufflation.
J Pharm Sci, 95, 2553-2561 (2006)
22. Handoko Adi, Ian Larson, Herbert Chiou, Paul Young, Daniela Traini, Peter Stewart : Agglomerate strength and dispersion of salmeterol xinafoate from powder mixtures for inhalation.
Pharm Res, 23, 2556-2565 (2006)
23. Iida K, Hayakawa Y, Okamoto H, Danjo K, Leuenberger H : Preparation of dry powder inhalation by surface treatment of lactose carrier particles.
Chem Pharm Bull, 51, 1-5 (2003)
24. A.H. de Boer, H.K. Chan, R. Price : A critical view on lactose-based drug formulation and device studies for dry powder inhalation: which are relevant and what interactions to expect?
Adv Drug Deliv Rev, 64, 257-274 (2012)
25. David A. Edwards, Justin Hanes, Giovanni Caponetti, Jeffrey Hrkach, Abdelaziz Ben-Jebria, Marry Lou Eskew, Jeffrey Mintzes, Daniel Deaver, Noah Lotan, Robert Langer : Large porous particles for pulmonary drug delivery.
Science, 276, 1868-1871 (1997)
26. David A. Edwards, Abdelaziz Ben-Jebria, Robert Langer : Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles.
J Appl Physiol, 85, 379-385 (1998)
27. Kohta Mohri, Tomoyuki Okuda, Asami Mori, Kazumi Danjo, Hirokazu Okamoto : Optimized pulmonary gene transfection in mice by spray-freeze dried powder inhalation.
J Control Release, 144, 221-226 (2010)
28. Nora Y.K. Chew, Boris Y. Shekunov, Henry H.Y. Tong, Albrt H.L. Chow, Charles Savage, James Wu, Hak-Kim Chan : Effect of amino acids on the dispersion of disodium cromoglycate powders.
J Pharm Sci, 94, 2289-2300 (2005)
29. H.Y. Li, P.C. Seville, I.J. Williamson, J.C. Birchall : The use of amino acids to enhance the aerosolisation of spray-dried powders for pulmonary gene therapy.
J Gene Med, 7, 343-353 (2005)

30. Francesca Ungaro, Concetta Giovino, Ciro Coletta, Raffaella Sorrentino, Agnese Miro, Fabiana Quaglia : Engineering gas-foamed large porous particles for efficient local delivery of macromolecules to the lung.
Eur J Pharm Sci, 41, 60-70 (2010)
31. Jinghua Duan, Frederick G Vogt, Xiaojian Li, Don Hayes Jr, Heidi M Mansour : Design, characterization, and aerosolization of organic solution advanced spray-dried moxifloxacin and ofloxacin dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC) microparticulate/ nanoparticulate powders for pulmonary inhalation aerosol delivery.
Int J Nanomedicine, 8, 3489-3505 (2013)
32. Maile Lohrmann, Michael Kappl, Hans-Juergen Butt, Nora Anne Urbanetz, Bernhard Christian Lippold : Adhesion forces in interactive mixtures for dry powder inhalers--evaluation of a new measuring method.
Eur J Pharm Biopharm, 67, 579-586 (2007)
33. L Pekka Malmberg, Paula Rytälä, Pertti Happonen, Tari Haahtela : Inspiratory flows through dry powder inhaler in chronic obstructive pulmonary disease: age and gender rather than severity matters.
Int J Chron Obstruct Pulmon Dis, 5, 257-262 (2010)
34. Kazuo Kanabuchi, Tetsuri Kondo, Toshimori Tanigaki, Sakurako Tajiri, Naoki Hayama, Yoko Takahari, Kayoko Iwao : Minimal inspiratory flow from dry powder inhalers according to a biphasic model of pressure vs. flow relationship.
Tokai J Exp Clin Med, 36, 1-4 (2011)
35. S.P. Newman, W.W. Busse : Evolution of dry powder inhaler design, formulation, and performance.
Respir Med, 96, 293-304 (2002)
36. Stocks J, Hislop AA : Structure and function on the respiratory system.
In: Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone GC, editors : Drug delivery to the lungs, Marcel Dekker, Inc., 47-104 (2002)
37. Hirokazu Okamoto, Seiko Nishida, Hiroaki Todo, Yuki Sakakura, Kotaro Iida, Kazumi Danjo : Pulmonary gene delivery by chitosan-pDNA complex powder prepared with supercritical carbon dioxide.
J Pharm Sci, 92, 371-380 (2003)
38. Daiki Hira, Tomoyuki Okuda, Daisuke Kito, Kazunori Ishizeki, Toyoko Okada, Hirokazu Okamoto : Inhalation performance of physically mixed dry powders evaluated with a simple simulator for human inspiratory flow patterns.
Pharm Res, 27, 2131-2140 (2010)

39. Susan Hoe, James W. Ivey, Mohammed A. Boraey, Abouzar Shamsaddini-Shahrbabak, Emadeddin Javaheri, Sadaf Matinkhoo, Warren H. Finlay, Reinhard Vehring : Use of a fundamental approach to spray-drying formulation design to facilitate the development of multi-component dry powder aerosols for respiratory drug delivery.
Pharm Res, 31,449-465 (2014)
40. Jing-Jing Yang, Chun-Yu Liu, Li-Hui Quan, Yong-Hong Liao : Preparation and in vitro aerosol performance of spray-dried Shuang-Huang-Lian corrugated particles in carrier-based dry powder inhalers.
AAPS PharmSciTech, 13,816-825 (2012)
41. J.F. Young : Humidity control in the laboratory using salt solutions—a review.
J appl Chem, 17, 241-245 (1967)
42. Daiki Hira, Tomoyuki Okuda, Mika Ichihashi, Ayano Mizutani, Kazunori Ishizeki, Toyoko Okada, Hirokazu Okamoto : Influence of peak inspiratory flow rate and pressure drops on inhalation performance of dry powder inhalers.
Chem Pharm Bull, 60, 341-347 (2012)