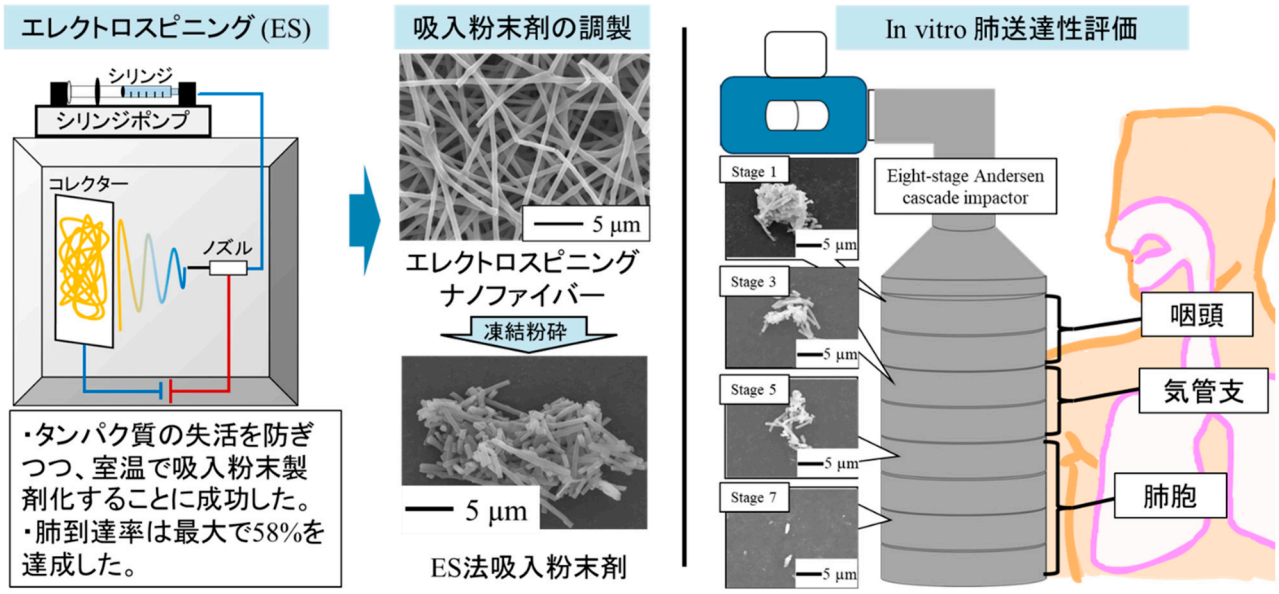
167　エレクトロスピニングファイバーの吸入粉末剤への応用	伊藤　貴章

【目的】吸入粉末剤（DPI）は吸入剤開発の第一選択である。粉末粒子が肺深部に到達するには粒子径を約 1〜6μm と微細に制御する必要があるが、シングルミクロンの粒子は付着凝集性が高いため吸入デバイスからの放出が難しい。また、既存の DPI 調製法は薬物を粉末固化するために熱を用いる。しかし、熱処理による乾燥は熱に弱い薬物を分解または失活させてしまうため、タンパク医薬を DPI へ応用する際のボトルネックとなっている。本研究では、高分子ポリマー溶液を室温以下でファイバー固化可能なエレクトロスピニング（ES）法に着目し、薬物含有ファイバーを微粒子化することで、DPI に応用することを目指した。装置のノズルから放出された試料溶液は、コレクターに捕集される過程で溶媒が蒸発するため、熱を必要とせずあらゆる薬物を粉末固化できる。
【方法】ナノファイバーマットの賦形剤としてポリビニルアルコールおよび D(-)-マンニトール（Man）、モデル薬物としてα-キモトリプシンを用いた。ES 法を用いてナノファイバーマットを調製し、それを凍結粉砕することにより乾燥粉末を得た。薬物安定性評価としてα-キモトリプシンの基質である *p*-ニトロフェニル酢酸を添加し、加水分解物を定量することで ES 法 DPI 製剤化後のα-キモトリプシン活性を評価した。肺送達性評価として、カスケードインパクターを用いて ES 法 DPI の肺到達率を測定した。
【結果】ナノファイバーマットは直径数百ナノメートルの均一な繊維構造を有していた。Man を添加することで、短い粉砕時間（0.5 分未満）でナノファイバーマットを微細化することに成功した。粉砕時間依存的にα-キモトリプシン活性は低下したものの、短時間で粉砕した ES 法 DPI のα-キモトリプシン活性は、粉末製剤化前と同等の活性を維持していた。対照群である、ネブライザー処理した吸入液剤のα-キモトリプシン活性は 57%まで低下したため、ES 法 DPI のタンパク医薬に対する有用性が示された。さらに、0.5 分未満で粉砕した Man を含む ES 法 DPI は、高い分散性と優れた *in vitro* 肺送達性を示した。*in vitro* 肺送達性評価の結果、Man を含む ES 法 DPI は解砕性の程度によって分級され、15%の Man を含み 0.25 分間粉砕された ES 法 DPI が最も高い肺送達率（58%）を示した。ES 法 DPI 調製技術は、タンパク質を安定かつ効率的に肺へ送達する新規調製技術となる可能性がある。

エレクトロスピニングファイバーの吸入粉末剤の製剤コンセプトおよびその成果



167. エレクトロスピニングファイバーの吸入粉末剤への応用

伊藤　貴章

岐阜薬科大学 薬物送達大講座 製剤学研究室

Key words：エレクトロスピニング，タンパク医薬，吸入治療，吸入粉末剤，新規製剤技術

緒　言

抗体医薬などバイオ医薬品は標的特異的な作用が期待できることから、これまで難治性だった疾患に対する有望な治療モダリティとして、近年開発が急速に広がっている。一方で、バイオ医薬の多くは分子量が大きく経口投与によるバイオアベイラビリティが低いことから、投与剤形は注射剤がほとんどである。注射剤は薬物を確実に体内に送達できる一方で、患者に強い侵襲性が伴うほか、薬物が全身を循環するので治療に必要な薬物量増加と全身性副反応発現が問題となる。この薬剤学的課題を背景に、局所投与可能なバイオ医薬の製剤設計が強く望まれている。例えば、α1−アンチトリプシン欠乏症など肺局所的な疾患に対して、吸入投与による治療ができれば、患者は非侵襲的かつ自己投与で治療を完了させることができるほか、治療に必要な薬物量減少による薬剤コスト削減と全身性副反応の回避につながる。

吸入剤は薬剤を肺上皮に安全かつ効率的に送達するよう設計され、薬物は局所組織または体循環に吸収されて治療作用を発揮する。吸入剤は、吸入液剤、加圧定量噴霧式吸入器、吸入粉末剤（DPI）に大別される。それぞれに製剤学的特長があるものの、加水分解を回避でき室温保存が可能な点で、DPI は吸入用バイオ医薬開発の第一選択となる［1］。

吸入用粉末を呼吸器へ効率的に送達するためには、幾何学的粒子径と密度から計算される空気力学的粒子径（MMAD）を約 1〜6 μm と微細に制御する必要がある。一方、従来の製剤技術で微細化したシングルミクロン粒子は付着力が重力よりも優位となることで凝集が生じ、その結果、吸入デバイスからの放出性と肺送達性が低下する。凝集の低減を目的に、50〜100 μm の幾何学的粒子径となるよう、微粉化された薬物を乳糖などのキャリアと混合造粒することが一般的だが、この製剤技術は、薬物粒子が吸入するまで担体から離脱してはならないため、複雑な製剤設計が必要となる。加えて、既存の DPI 調製法は、薬物を粉末固化するために熱を用いるため、熱に弱い薬物を分解または失活させる。以上の様々な製剤学的課題がバイオ医薬品を DPI へ応用する際のボトルネックとなっている。

著者は、高分子ポリマー溶液を室温以下でファイバー固化可能なエレクトロスピニング（ES）法に着目し、薬物含有ファイバーを微粒子化することで、DPI に応用することを着想した。装置のノズルから放出された試料溶液は、コレクターに捕集される過程で溶媒が蒸発するため、熱を必要とせずあらゆる薬物を粉末固化できる。一方で、ES 法は既存の DPI 調製法とは全く異なるコンセプトであるため、実用化には肺送達性と薬物安定性へ影響を及ぼすファクターの検証が必要となる。本研究は、DPI の新たな調製法として ES 法 DPI 調製技術の製剤設計基盤を構築することを目的に、肺送達性および薬物安定性の観点から、ファイバーの物理化学的性質が ES 法 DPI へ及ぼす影響を多角的に評価した。

方　法

1. ES 法 DPI の調製

ナノファイバーマットの賦形剤として生分解性高分子ポリマーであるポリビニルアルコール（PVA、GOHSENOL EG-40P、三菱ケミカル）および D(-)-マンニトール（Man、富士フィルム和光）を用いた。モデル薬物として、本研究ではバイオ医薬品の代わりにタンパク質であるα-キモトリプシン（α-Chy、Sigma-Aldrich）を用いた。

全ての構成成分を水に溶解した後ガラスバイアル内で均一に混合し、サンプル溶液を得た（表 1)。得られたナノファイバーマットは、Man の組成比に従って命名した（Man0%、Man8%、Man12%、Man15%)。調製したサンプル溶液をシリンジに充填し、シリンジポンプ（HSP-101、MECC）で 22 G 注射針にサンプル溶液を供給した。印加電源装置（HAR-100P1、松定プレシジョン）の陽極を注射針に接続し、陰極をアルミニウムコレクターに接地した。専用のボックス（ユタカ電子）を用いて紡糸することで、ナノファイバーマットを得た。

ナノファイバーマットを凍結粉砕（JFC-300、日本分析工業）することで ES 法 DPI を得た。約 50 mg のナノファイバーマットと 12 G の鉄球を 12 mL の専用チタンセルに移した。液体窒素に 30 分間浸漬した後、0.25、0.5、1.0、または 5.0 分間粉砕した。ES 法 DPI のサンプル名は、粉砕時間（M0.25、M0.5、M1、M5）およびマンニトール含有量に従って命名した（例えば、Man0M0.5 はマンニトール 0%、粉砕時間 0.5 分)。

表 1. ES 法ナノファイバーマットの組成およびその平均繊維径

Formulations	α-Chy (mg)	PVA (mg)	Man (mg)	Solvent (mL)	Average diameter (nm)
Man0%	25.3	480 (8 w/v%)	0	6	379.0 ± 47.0
Man8%	50.5		480 (8 w/v%)		609.4 ± 68.9
Man12%	63.2		720 (12 w/v%)		622.0 ± 52.2
Man15%	72.6		900 (15 w/v%)		702.8 ± 81.4

平均繊維径は、SEM 画像より無作為に選び、ImageJ™ を用いて算出した（mean±SD、n＝50)。「Man」は、D(-)-マンニトールの組成比を示す。

2. ES 法 DPI の物理化学的性質評価

ナノファイバーマットおよび DPI の形態は、走査型電子顕微鏡（SEM、JSM-6510LV、日本電子）を用いて調べた。SEM 画像から 50 箇所の繊維を無作為に選び、ImageJ™（National Institutes of Health）を用いてナノファイバーの平均直径を算出した。

3. *In vitro* 肺送達性評価

ES 法 DPI の肺送達性を、8 段階アンダーセンカスケードインパクター（ACI, AN-200、東京ダイレック）を用いて評価した。約 2 mg の ES 法 DPI をカプセルに充填し、吸入器（Jethaler リバースタイプ、トキコシステムソリューションズ）に設置した。粉末の跳ね返りを防ぐため、各ステージの捕集板をグリセリンでコーティングした。吸入器を ACI に接続した後、装填した乾燥粉末を、真空ポンプを用いて 28.3 L/min の流速で 8.5 秒間吸入した。各セクション（カプセル、吸入器、スロート、ステージ、フィルター）に付着した粉末粒子を、30 mL のリン酸緩衝液（PBS）で洗浄することにより回収した。各セクションの粉末沈着率を算出し、それを基に肺送達性の指標であるデバイス放出性（output efficiency：OE)、肺到達率（fine particle fraction：FPF)、空気力学的質量中央径（mass median aerodynamic diameter：MMAD）を算出した。

さらに、ACI の各セクションに沈着した ES 法 DPI の形態を SEM で観察した。ステージ 1、3、5、7 の捕集板に SEM 観察用の両面カーボンテープを貼り付けた後、ES 法 DPI を吸引し、各セクションの両面カーボンテープ付着した ES 法 DPI を回収および観察した。

4. α-Chy 酵素活性評価

ES 法 DPI に含まれるα-Chy の安定性を、α-Chy 基質である *p*-ニトロフェニル酢酸添加後、加水分解物の *p*-ニトロフェノールを定量することで評価した。ES 法 DPI 22.5 mg を 1 mL の PBS に溶解した後、ジメチルスルホキシドに溶解した 30 mM *p*-ニトロフェニル酢酸 20 μL を加え、室温で 30 分間反応させた。*p*-ニトロフェノール量は、紫外可視分光光度計（UV-1800、島津製作所）を用いて 404 nm の吸収波長から定量した。対照群として、α-Chy の PBS 溶液および PBS で再溶解したナノファイバーマット（Man0%、Man8%、Man12%、Man15%）の *p*-ニトロフェノールの量を測定した。吸入剤形の違いを評価するため、ネブライザー処理したα-Chy の PBS 溶液も測定した。

結果および考察

1. PVA ナノファイバーマット中の Man はナノファイバーマットの微粒子化を容易にする

Man を含まない（Man0%）ナノファイバーマットは柔軟な質感を有していた。対照的に、Man を含むナノファイバーマットは、柔軟性が低下し粉砕が容易になることが示唆された。調製したナノファイバーマットの形態を SEM で観察し、平均直径を算出した（図 1a～d、表 1）。ナノファイバーの平均直径は、Man 組成比に比例して増加した。一般に、ES 法ナノファイバーの直径は溶質濃度とともに増加する。したがって、観察された直径の増加は、Man の添加によって溶質濃度が上昇したことに起因する。

ナノファイバーマットを凍結粉砕機で微粉砕し、SEM を用いて粒子形態を調べた結果、Man 有無によって顕著な形態の違いが認められた（図 1e～l）。Man を添加せずに調製し、0.5 分粉砕したナノファイバーマット（Man0M0.5）は、粉砕前の繊維構造を維持しており、幾何学的粒子径が 40～60 μm の粉末が得られた（図 1e）。この結果から、Man を含まないナノファイバーマットから微粒子を製造するには、0.5 分の粉砕時間では不十分である可能性が示唆された。一方、Man を含むナノファイバーマットでは、0.25 分という極めて短い粉砕時間で、幾何学直径 10～15 μm の粒子が得られた（図 1f～h）。Man を含むナノファイバーは細かく破砕され（1～5 μm）、短くまっすぐな凝集繊維を形成していた。Man はナノファイバーマットの繊維内に組み込まれマットの柔軟性を低下させることで短時間の粉砕微粒子化が期待できる。5 分間粉砕したナノファイバーマットでは、Man 組成比にかかわらず、繊維構造の喪失と凝集体の形成が認められた（図 1j～l）。これは、過度の粉砕に起因すると考えられる［2］。

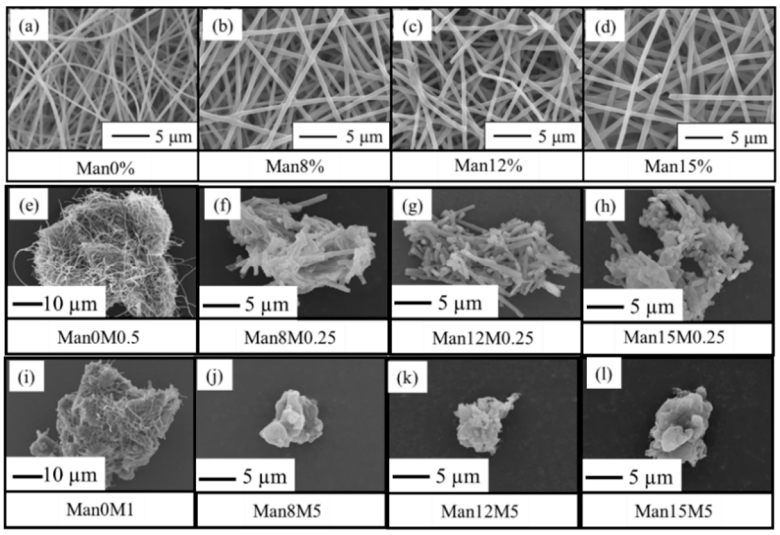


図 1. ナノファイバーマットおよび DPI の SEM 画像

a～d）ES 法ナノファイバーマット。

e～l）ES 法 DPI。「Man」と「M」は、D(-)-マンニトールの組成比と粉砕時間（分）を示す。

2. PVA ナノファイバーマット中の Man は ES 法 DPI の肺送達性を向上させる

次に、調製した ES 法 DPI の *in vitro* 肺送達性を、ACI を用いて評価した。Man を含まない ES 法 DPI では、最も優れた肺送達性を示した 1 分の粉砕（Man0M1）のみ示す。各 ES 法 DPI を比較した結果、Man を含み 0.25 分または 0.5 分間粉砕した ES 法 DPI が、Man0M1 および Man を含み 5 分間粉砕した ES 法 DPI と比較して、優れた肺送達性を示すことを見出した（表 2）。Man15M0.25 の OE 値は、他の全ての粉砕ナノファイバーマットより劣っていたものの、肺送達性を示す FPF 値および OE×FPF 値は最も優れていた。0.25 分または 0.5 分間粉砕した Man を含むナノファイバーマットは、DPI の理想的な範囲である 2～8 μ m の MMAD 値を示した。以上の結果より、Man の添加は ES 法 DPI の肺送達性を著しく改善することが明らかとなった。

表 2. ES 法 DPI の肺送達性の指標

Formulations	OE (%)	FPF (%)	OE×FPF (%)	MMAD (μm)
Man0M1	88.6 ± 5.2	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	11.0<
Man8M0.25	84.0 ± 2.8	19.1 ± 3.0	16.1 ± 2.8	7.8 ± 1.2
Man8M0.5	81.2 ± 1.2	24.4 ± 3.7	19.8 ± 2.7	5.1 ± 1.0
Man8M5	89.9 ± 3.7	1.9 ± 0.3	1.7 ± 0.2	11.0<
Man12M0.25	72.6 ± 1.5	32.6 ± 3.7	23.6 ±2.2	5.4 ± 0.7
Man12M0.5	79.0 ± 1.0	25.1 ± 2.2	19.8 ± 1.5	4.9 ± 0.5
Man12M5	77.9 ± 4.9	8.6 ± 1.6	6.7 ± 1.6	11.0<
Man15M0.25	52.3 ± 2.0	58.6 ± 2.3	30.7 ± 2.2	2.0 ± 0.1
Man15M0.5	69.2 ± 1.2	30.9 ± 1.2	21.4 ± 0.5	3.0 ± 0.4
Man15M5	87.4 ± 2.6	2.5 ± 0.8	2.2 ± 0.7	11.0<

OE, output efficiency; FPF, fine particle fraction; MMAD, mass median aerodynamic diameter

（mean±SD、n＝3）。「Man」と「M」は、D(-)-マンニトールの組成比と粉砕時間（分）を示す。

Man を含む ES 法 DPI が優れた肺送達性を示すメカニズムを調べるため、SEM 観察用テープを使用して ACI の各セクションにおける微粒子を捕集し SEM 観察を行った（図 2）。Man0G1 粒子は各セクションで絡み合ったナノファイバーとして観察された。一方、Man を含む粉砕 ES 法 DPI は棒状の形態を示し、破砕性の程度はステージ分布と関連していた。肺深部組織への効果的な送達のためには、粒子のアスペクト比は 3～5 の範囲が理想とされているほか、凝集体の表面粗さは粒子間の接触面積を減少させ、それによって乾燥粉末の分散性を高めることが報告されている。Man 含有ナノファイバーマットの短時間粉砕により、理想的な分散性を持つ凝集体が形成されたことが示唆された。

3. Man の添加で可能になったナノファイバーマットの粉砕時間短縮は、タンパク質の安定性維持に貢献する

DPI 製剤化後のタンパク質の安定性を評価するため、試料中の α-Chy 活性を評価した（図 3）。粉末製剤化前の α-Chy 溶液の酵素活性を 100%としている。また、メッシュタイプのネブライザーで処理した α-Chy 溶液も併せて評価した。ネブライザーを用いたエアロゾル化では、活性が 57%まで低下した。これは、メッシュの振動とせん断応力がタンパク質を不活化することを示している。一方で、Man を含み 0.25 分間粉砕した ES 法 DPI は、α-Chy 溶液と同等の酵素活性を維持していた。Man 比に関係なく、5 分粉砕した ES 法 DPI は著しい酵素活性の低下を示したが、これは過度の粉砕とそれに伴う物理化学的ストレスに起因すると考えられる。以上より、Man 添加によるナノファイバーマットの粉砕時間短縮は、α-Chy の酵素活性の損失を最小限に抑えることに貢献することが明らかとなった。

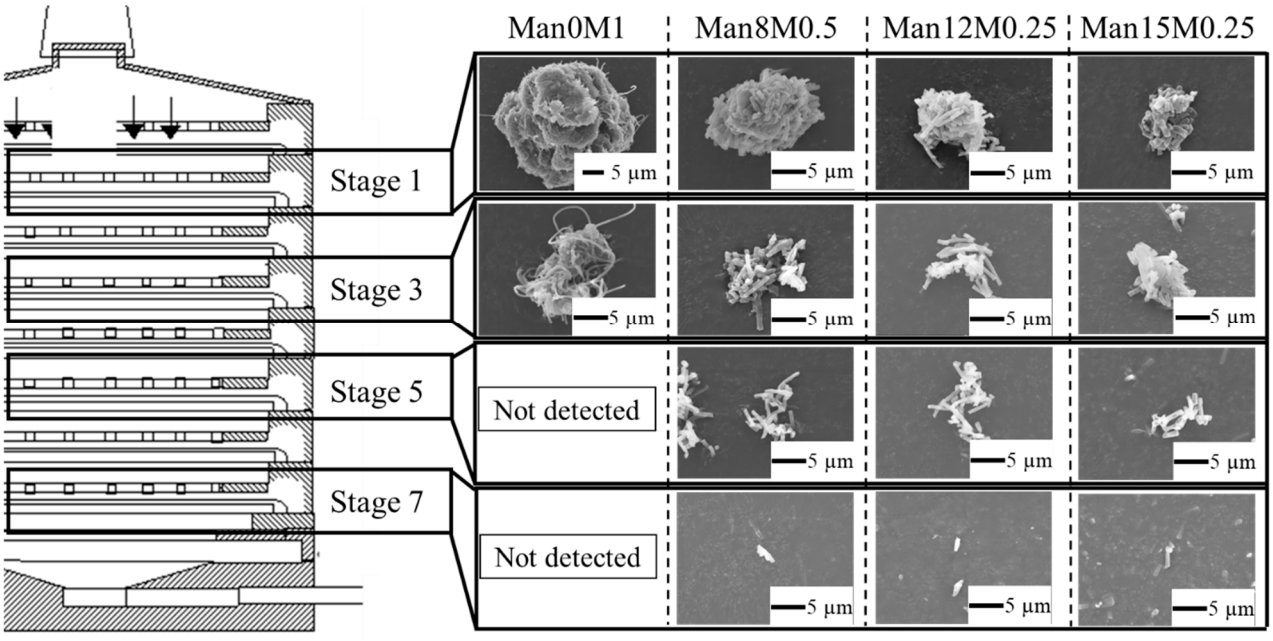


図 2. ACI のステージ 1、3、5、7 における ES 法 DPI の SEM 画像

「Man」と「M」は、それぞれ D(-)-マンニトールの組成比と粉砕時間（分）を示す。

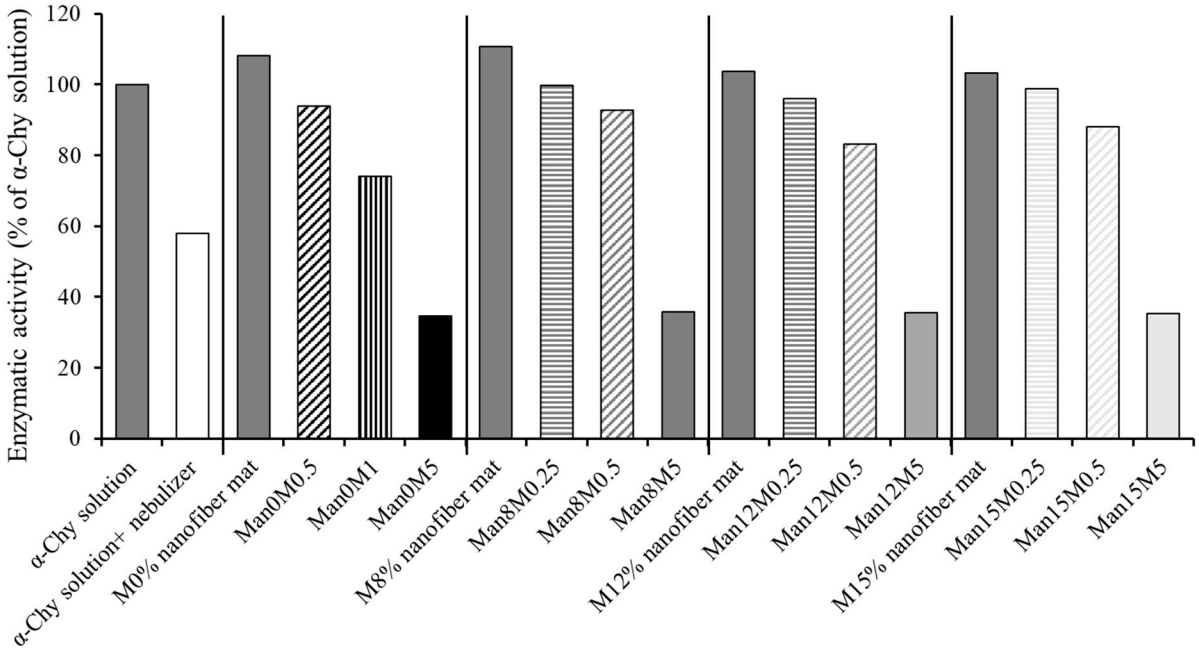


図 3. ES 法 DPI 中の α-Chy の酵素活性評価

α-Chy 水溶液の酵素活性を 100%としている。「α-Chy solution＋nebulizer」はネブライザー処理した α-Chy 水溶液。「Man」と「M」は、それぞれ D(-)-マンニトールの組成比と粉砕時間（分）を示す。

共同研究者・謝辞

本研究に際しご支援いただきました公益財団法人上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。

文　献

1）Ito T, Fukuhara M, Okuda T, Okamoto H. Naked pDNA/hyaluronic acid powder shows excellent long-term storage stability and gene expression in murine lungs. Int J Pharm. 2020 Jan 25;574:118880. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.118880. Epub 2019 Dec 4. PMID: 31811928.

2）Ito T, Yamazoe E, Tahara K. Dry Powder Inhalers for Proteins Using Cryo-Milled Electrospun Polyvinyl Alcohol Nanofiber Mats. Molecules. 2022 Aug 12;27(16):5158. doi: 10.3390/molecules27165158. PMID: 36014394; PMCID: PMC9412343.