

超臨界流体及び水中溶媒拡散法
を用いた吸入粉末製剤用微粒子設計
に関する研究

2017 年

宮崎 雄太

目次

緒言.....	6
第 1 章 シクロデキストリンを分散安定化剤とした水中溶媒拡散法による インドメタシンのナノ粒子設計	12
1.1. 序論.....	12
1.2. 試料ならびに実験方法.....	13
1.2.1. 試料.....	13
1.2.2. IMC ナノ粒子の調製	13
1.2.3. 粒子径及び粒子径分布.....	13
1.2.4. IMC ナノ粒子の収率測定	13
1.2.5. 電子顕微鏡.....	14
1.2.6. 粉末 X 線回折	14
1.2.7. 示差走査熱量測定.....	14
1.2.8. 溶出試験.....	14
1.3. 結果・考察.....	14
1.3.1. 懸濁液中での粒子径.....	15
1.3.2. SEM 写真	17
1.3.3. 結晶性評価.....	18
1.3.4. 溶出性評価.....	20
1.4. 結論.....	21
第 2 章 適切な分散安定化剤を選択した水中溶媒拡散法による ONO-2921 の 粉末吸入製剤設計	22
2.1. 序論.....	22
2.2. 試料ならびに実験方法.....	23
2.2.1. 試料.....	23
2.2.2. ONO-2921 粒子の調製.....	24
2.2.3. 粒子径, 粒子径分布.....	25
2.2.4. 電子顕微鏡.....	25
2.2.5. 示差走査熱量測定.....	25
2.2.6. 粉末 X 線回折	25

2.2.7. In vitro 吸入特性.....	25
2.2.8. HPLC 分析.....	26
2.3. 結果・考察.....	27
2.3.1. 有機溶媒のスクリーニング.....	27
2.3.2. 添加剤のスクリーニング.....	27
2.3.3. 添加剤濃度の最適化.....	34
2.3.4. Andersen cascade impactor による in vitro 吸入特性評価.....	40
2.3.5. 粒子形成のメカニズム.....	41
2.4. 結論.....	44

第 3 章 インドメタシンのナノ粒子設計を目指した新規超臨界流体法の構築..... 46

3.1. 序論.....	46
3.2. 試料ならびに実験方法.....	46
3.2.1. 試料.....	46
3.2.2. IMC ナノ粒子の調製.....	47
3.2.3. 粒子径, 粒子径分布.....	48
3.2.4. 収率測定.....	48
3.2.5. 電子顕微鏡.....	48
3.2.6. 粉末 X 線回折.....	48
3.2.7. 示差走査熱量測定.....	48
3.2.8. 溶出試験.....	49
3.3. 結果・考察.....	49
3.3.1. combinational scCO ₂ 法によるナノ粒子調製.....	49
3.3.2. IMC 粒子の評価.....	52
3.3.3. IMC 粒子の溶出プロファイル.....	56
3.4. 結論.....	56

第 4 章 超臨界流体法を適用した ONO-2921 の吸入製剤用微粒子の設計 ... 58

4.1. 序論.....	58
4.2. 試料ならびに実験方法.....	59
4.2.1. 試料.....	59
4.2.2. ONO-2921 粒子の調製.....	59
4.2.3. 粒子径, 粒子径分布.....	59
4.2.4. 電子顕微鏡.....	59
4.2.5. 示差走査熱量測定.....	59

4.2.6. In vitro 吸入特性	59
4.2.7. HPLC 分析	60
4.3. 結果・考察.....	60
4.3.1. combinational scCO ₂ 法による粒子調製	60
4.3.2. 超臨界流体の圧力が粒子に及ぼす影響評価.....	62
4.3.3. 超臨界流体の粒子調製条件の最適化.....	67
4.3.4. Andersen cascade impactor による in vitro 吸入特性評価	70
4.4. 結論.....	72
第 5 章 超臨界流体法と新規添加剤を組み合わせたブデソニドの吸入製剤用	
微粒子設計	73
5.1. 序論.....	73
5.2. 試料ならびに実験方法.....	73
5.2.1. 試料.....	73
5.2.2. BDS 粒子の調製	74
5.2.3. 粒子径, 粒子径分布	75
5.2.4. In vitro 吸入特性	75
5.2.5. HPLC 分析	75
5.2.6. 粉末 X 線回折	75
5.2.7. 示差走査熱量測定	75
5.2.8. 電子顕微鏡.....	75
5.2.9. 統計解析	76
5.3. 結果.....	76
5.3.1. combinational scCO ₂ 法により得られた粒子の粒子径	76
5.3.2. 添加剤濃度の最適化.....	77
5.3.3. 添加剤のスクリーニング	80
5.3.4. 結晶性評価.....	82
5.3.5. SEM 写真	83
5.4. 考察.....	85
5.5. 結論.....	87
総括.....	89
謝辞.....	91

略語.....	92
参考文献	93
論文目録	106
主査・副査	107

緒言

医薬品の投与経路において経口投与は、最も簡便かつ汎用されている手法である。経口投与された医薬品は消化液中で溶解し、腸管粘膜から吸収され、肝臓を経て循環血液中に到達する。近年、経口投与を目的とした医薬品の開発候補化合物は難水溶性で生物学的利用能 (bioavailability: BA) が低いものが増加している¹。

難水溶性薬物の溶解性を改善する方法として、粒子径の減少、塩への変換、結晶形の変更などが考えられる^{2,4}。粒子径が減少することにより粒子の比表面積は増大する。Noyes-Whitney の式において、溶解速度と薬物粒子の比表面積の間には相関があり、薬物の溶解速度を改善することが可能であることが知られている。

粒子径を減少させる方法は粉砕による **break-down** 法と晶析などによる **bottom-up** 法に大別される^{5,6}。**break-down** 法はジェットミル、ボールミル、ピンミル、ハンマーミルなどによる乾式粉砕法とビーズミルや高圧噴射による湿式粉砕法の 2 つに分類される^{7,8}。一般的に粉砕は大量の粉体を一度に処理し、粒子径を減少させることができる。一方、粉砕で得られた粒子の粒子径分布は不均一であること、また、結晶を破砕することにより生じた新たな結晶面は表面エネルギーが高いため、付着凝集性が高まり、粉体としての取り扱いが困難になるといった問題点が挙げられる⁹⁻¹¹。**bottom-up** 法は **break-down** 法に比べ、粒子生成に要するエネルギーが低く、また、装置も **break-down** 法で使用されるものに比べ安価であり、低温処理も可能である。更には、得られる粒子の粒子径分布は均一である¹²。本研究では、**bottom-up** 法である水中溶媒拡散法及び超臨界二酸化炭素 (supercritical CO₂: scCO₂) を用いた新たな析出法による微粒子設計を試みた。

球形晶析法は医薬品化合物を良溶媒に溶解させ、貧溶媒を添加し、医薬品化合物を析出させながら、造粒する方法である。例えば、これまでもサリチル酸を良溶媒のエタノール中に溶解させ、貧溶媒である水を添加し、サリチル酸を析出させながら、造粒する球形晶析法により、マイクロサイズのサリチル酸粒子が得られている¹³。さらに、この球形晶析法を応用した水中溶媒拡散法では、メタクリル系ポリマーである Eudragit®を用い、徐放性のマイクロ粒子が得られている¹⁴。また、生分解性のポリマーであるポリ乳酸グリコール酸共重合体 (Poly(lactic-co-glycolic) acid: PLGA) を用い、PLGA ナノ粒子も得られている¹⁵。このように晶析法を用いてすでにいくつかの粒子設計に関する成功例はあるものの、晶析法で薬物の粒子径を精密に制御するためには、粒子を安定して分散化さ

せる添加剤の選択が特に重要である。その理由は、薬物、良溶媒、貧溶媒間の相互作用が良溶媒から貧溶媒の界面への薬物分子の拡散速度に影響し、粒子径に影響を及ぼすためである。分散安定化剤の親和性はこれらの相互作用を変化させることができる¹⁶。しかし、水中溶媒拡散法は、医薬品化合物を有機溶媒中に溶解させ水中で晶析させるため、得られる医薬品粒子中の有機溶媒の残留がしばしば問題となる。地球環境問題への関心の増加と更なる持続可能な社会の確立の必要性から、有害な溶媒を環境に優しい溶媒へと置き換える試みが行われている¹⁷。環境負荷の低い溶媒として、超臨界流体が挙げられる。超臨界流体とは臨界点以上の流体であり、液体と気体の相が平衡状態で共存し、高い溶解性と拡散性を有する¹⁸。Figure 1 に示す通り、純物質は圧力と温度により固体、液体、気体の異なる3つの状態として存在し、蒸気圧曲線の終点に臨界点が存在する。

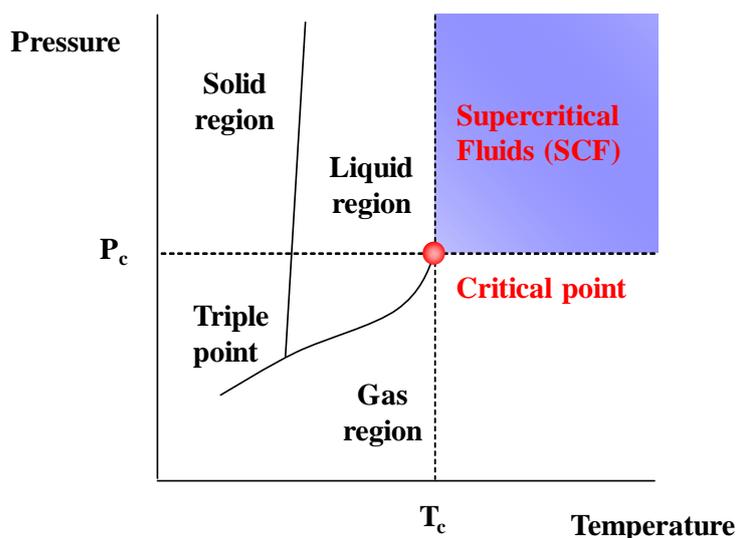


Figure 1. Phase diagram of a one component system.

CO₂は安価、存在量が豊富、低毒性、非燃性であることから環境に優しいプロセスを開発するために適当である^{19,20}。CO₂は他の物質と比較して、低圧低温（7.4 Mpa・31.2℃）で超臨界状態となるため、広く用いられる。超臨界二酸化炭素（scCO₂）を用いた医薬品微粒子の設計は長い間注目されてきており、scCO₂を良溶媒として用いる手法（rapid expansion of supercritical solutions（RESS）法²¹）、scCO₂を貧溶媒として用いる手法（supercritical antisolvent（SAS）法²²と solution-enhanced dispersion by supercritical fluids（SEDS）^{23,24}法）に大別される。RESS法は有機溶媒が不要である利点を有するが、大部

分の医薬品化合物の scCO_2 への溶解度が低いこと、得られる粒子の回収が困難であることなどの欠点を有する。これらの欠点を克服するための手法がいくつか報告されており、少量の有機溶媒を scCO_2 に導入し、医薬品化合物の scCO_2 への溶解度を改善する方法^{25,26} や水溶液中で scCO_2 を噴霧し、医薬品粒子の回収を改善する方法などが挙げられる (rapid expansion from supercritical to aqueous solution (RESAS))²⁷。多くの医薬品化合物の scCO_2 への溶解度は低いため、SAS 法や SEDS 法は適用範囲が広いが、プロセスのスケールアップが困難である²⁸。

ここまで、水中溶媒拡散法及び scCO_2 用いた微粒子調製について述べてきた。しかし、粒子径を減少させ溶解性改善が達成されたとしても、薬物は消化管から吸収され、肝臓を経由し、全身に分布されなければ薬理作用を示すことができない。消化管粘膜の透過性が低い医薬品化合物、さらには肝初回通過効果を受けやすい化合物は BA が低く、経口投与では十分な薬効を得られないことが多い。肺への医薬品送達は気管支喘息や慢性閉塞性肺疾患 (chronic obstructive pulmonary disease: COPD) などの肺局所の疾患を治療する目的で行われることが一般的である。これらに加えて、全身性疾患の治療を目的として、肺から医薬品を投与する事例も出てきている。肺から医薬品を投与し循環血液中に送達した場合、肝初回通過効果を避けられること、速やかな治療効果の発現ができることなどがメリットとして挙げられる^{29,30}。これは肺が $40\sim 100\text{ m}^2$ と大きな表面積を有していること、肺胞の上皮細胞が薄く透過性が良好であること、代謝酵素の活性が低いことが起因していると考えられている³¹⁻³⁴。

吸入製剤はネブライザー式吸入剤、加圧定量噴霧式吸入剤 (pressurized metered dose inhaler: pMDI)、ソフトミスト吸入剤、吸入粉末製剤 (dry powder inhaler: DPI) などが汎用されている。ネブライザー式吸入剤は装置が巨大で高額であること、投与に時間がかかること³⁵、pMDI は医薬品化合物がプロペラントに溶解し、保存中に化学的及び物理的に安定であることが必要であり、適用できる化合物が限られていること^{36,37}、ソフトミスト吸入剤はプロペラントが不要であるものの、ミストの噴霧と吸気を合わせる必要があること³⁸などがデメリットとして挙げられる。DPI は小型であり携帯性に優れ、液体と比較して粉末は一般的に化学的な安定性に優れ、ミストの噴霧と吸気を同調させる必要がなく吸入性に優れるといったメリットが挙げられる^{39,40}。

DPI として医薬品化合物を肺に効率良く送達させるためには、化合物粒子の空気力学的粒子径 (aerodynamic diameter = 幾何学的粒子径 \times (粒子密度 / 粒子形状係数)^{1/2}) が数 μm

でなければならない⁴¹⁻⁴³。Figure 2 に空気力学的粒子径と到達部位の関係性を示す⁴⁴。

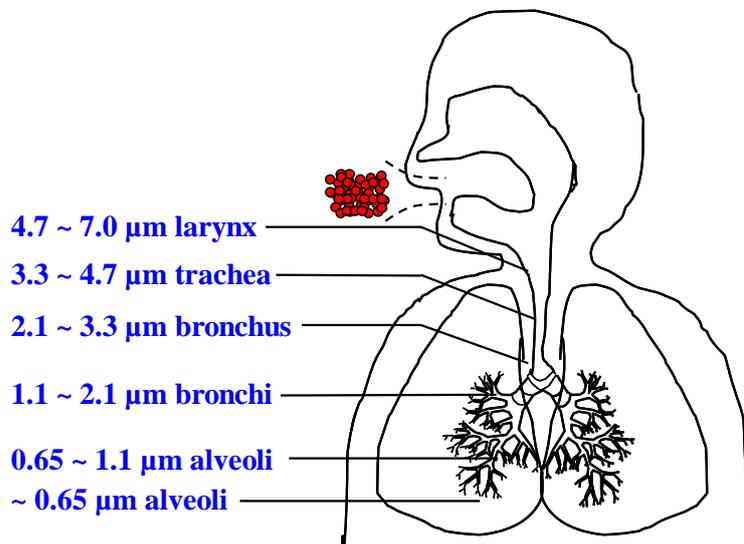


Figure 2. Diagram between the human lung and particle deposition attributed to size.

しかし、この粒子サイズでは付着凝集性の増加や、流動性の低下に伴う吸入用デバイスやカプセル内への化合物の残存などの問題が生じやすい。これらの問題を克服する方法の 1 つとして、医薬品微粒子を乳糖などの粗大な粒子に付着させるキャリア法が用いられる⁴⁵⁻⁴⁷。微粒子は吸入時の気流によりキャリア粒子から分離され、肺深部に沈着することができる⁴⁸。この手法は多くの DPI に用いられるが、キャリア粒子と医薬品微粒子の強力な相互作用が微粒子の分離度を減少させ、微粒子の肺内到達量のバラツキを引き起こしうるものが欠点である。

医薬品化合物の BA 改善を目的とし、球形晶析法、 scCO_2 法を用い粒子径を減少させ溶解性を改善する手法、DPI を設計し経肺投与による手法に関して述べた。本稿では、これらを応用し、難水溶性薬物である indomethacin (IMC)、難水溶性医薬品候補化合物である ONO-2921、気管支喘息用の治療薬である budesonide (BDS) を用い、微粒子設計に関する研究を行い、第 1 章から 5 章にそれぞれ結果・考察を記載した。

第 1 章では IMC の溶解性改善を目的とし、IMC を良溶媒に溶解させ、貧溶媒中で晶析させる水中溶媒拡散法と貧溶媒中での安定化剤として cyclodextrin (CyD) を組み合わせることに着目した。CyD を選択した理由は難水溶性薬物を CyD とともに混合粉碎し、ナノ粒子を得ることができ、CyD はナノ粒子の分散安定化剤として寄与したことが報告さ

れたためである⁴⁹。CyD のグレードを変化させ、CyD が微粒子形成における役割について解明を行った。更に得られた微粒子の粒子径を測定し、外観を観察し、結晶形及び結晶性を評価し、薬物の溶解性改善に及ぼす影響を評価した。

第2章ではONO-2921をモデル薬物とし、肺を経由し全身循環させ、BA改善を目的としたDPIの設計を企図した。水中溶媒拡散法と水溶性ポリマーなどの添加剤を組み合わせ、吸入効率の改善に着目した。得られた粒子の粒子径を測定し、粒子の外観を観察し、*in vitro* 吸入特性を評価し、粒子設計の最適化を実施した。また粒子形成について、仮説を立て、結晶性及び結晶形を評価し、エマルジョンから結晶粒子が生成されるメカニズムの解明も行った。

第3章ではscCO₂を用いた汎用な微粒子調製のプロセスの構築を目的とし、SAS法とRESAS法を組み合わせた新規手法（combinational scCO₂法）に着目した。combinational scCO₂法は、医薬品化合物のscCO₂への溶解度の低さを克服し、連続的に粒子を得ることを可能にし、スケールアップを不要とすることが可能である。第1章と同様にIMCをモデル薬物とし、combinational scCO₂法を用いscCO₂の圧力や温度を変化させ、微粒子を調製し、scCO₂の条件が粒子に及ぼす影響を評価した。また、scCO₂の条件が薬物の溶解性改善に及ぼす影響も評価した。

第4章では第3章と同様にcombinational scCO₂法を用い、添加剤を用いない医薬品化合物のみからなるDPI用の微粒子設計に着目した。第2章と同じくONO-2921をモデル薬物とし、scCO₂の圧力や温度を変化させ、微粒子を調製し、評価した。*in vitro* 吸入特性の評価より、粒子調製時のscCO₂の最適化を実施した。

第5章では気管支喘息用のDPIとして上市されているbudesonide (BDS)をモデル薬物とし、吸入効率改善を目的としたDPIの設計を企図した。scCO₂によるDPI用の粒子設計は粒子の表面改質による影響が大きく、添加剤を用いた粒子調製の事例は少ない。添加剤を用いないDPI用の粒子について、吸入効率は薬物の物性（例えば付着凝集性や流動性など）に依存し、吸入効率の改善に限界があると考えられる。combinational scCO₂法に添加剤（モノグリセリド類）を適応させ、DPI用粒子の表面を改質することに着目した。得られた粒子を評価し、モノグリセリド類が吸入効率改善に及ぼす影響を検証した。

Figure 3に本研究をまとめた図を示す。水中溶媒拡散法及びcombinational scCO₂法を用い、医薬品化合物の微粒子設計に関する研究を行った。更に適切な添加剤を選択し、粉末吸入製剤への適応に関する研究を行った。以下、各章にわたり、得られた知見を詳述

するとともに、最後に総括する。

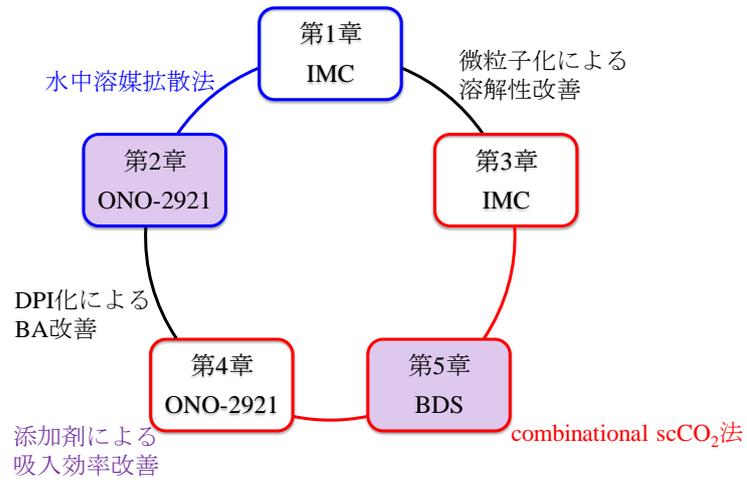


Figure 3. Schematic image of my particle design investigation

第 1 章

シクロデキストリンを分散安定化剤とした水中溶媒 拡散法によるインドメタシンのナノ粒子設計

1.1. 序論

粒子径をナノサイズへ減少させる技術は薬物の溶出性と溶解速度の顕著な増大，それに伴う医薬品の BA の改善を可能にする⁵⁰。Noyes-Whitney の式によれば，薬物粒子の溶出速度と有効比表面積の間には相関関係が成り立つ。更に薬物粒子をナノスケールまで減少させると，薬物の見かけの飽和溶解度を大きく増大させることができる⁵¹。

現在，粒子径をナノサイズまで減少させる技術は目覚ましい進化を遂げている。この要因は，調製した薬物ナノ粒子の凝集を防ぐことが可能な添加剤の安定化効果を利用した先進的な粉碎技術によるものである^{52,53}。実際に，湿式粉碎法の 1 つである高圧噴射法を用い，安定化効果が期待できる添加剤を添加して，薬物結晶のナノ粒子懸濁液が調製されている^{54,55}。乾式粉碎法でも，親水性の安定化剤とともに薬物を混合粉碎し，ナノサイズの薬物粒子を調製する手法が報告されている。安定化剤としては CyD^{49,56}，ポリビニルピロリドン⁵⁷，ポリエチレングリコール，ヒプロメロース⁵⁸などが用いられている。特に，CyDs は 6～8 個のグルコースが α -1, 4 結合した環状オリゴ糖であり，外側に親水性の表面を有し，非極性の空洞を有する円錐台の分子構造を示す⁵⁹。このような特徴のため，CyDs は薬物分子を包接する複合体を形成でき，ゲスト分子の物理化学的性質（溶解性や安定性など）を改善することができる⁶⁰。これまでも，CyDs による包接複合体形成による難水溶性薬物の溶解性改善が行われている^{61,62}。一方，CyDs と薬物分子の凝集体形成や CyDs の界面活性剤様の効果など，CyDs と薬物分子の相互作用による非包接体形成に関する報告も増えてきている⁵⁹。

第 1 章では，晶析法の 1 つである水中溶媒拡散法と分散安定化剤である CyDs を組み合わせ，難水溶性薬物である IMC のナノ粒子を設計したことを報告する。水中溶媒拡散法は球形晶析法を元開発された。球形晶析法は薬物粒子の球状の造粒物を得る方法である（詳細は緒言を参照）。水中溶媒拡散法を用い API を封入した PLGA ナノスフェアも得られている（詳細は緒言を参照）。晶析法により API のナノ粒子を得る場合，粒子径を制

御するために界面活性剤の添加が不可欠であるが、界面活性剤の代わりに CyDs を用いた。IMC は水への溶解度が $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ ⁶⁵ と非常に低く、難水溶性のモデル薬物としてしばしば用いられる。良溶媒（有機溶媒）に溶解させた IMC 溶液を CyDs を含む水溶液中に攪拌条件下滴下した。得られた懸濁液は凍結乾燥法により粉末化され、物理化学的性質を評価した。以下に得られた知見を詳述する。

1.2. 試料ならびに実験方法

1.2.1. 試料

難水溶性のモデル薬物である IMC は大日本住友製薬株式会社に提供頂いた。3 種の異なる CyDs (α -, β -, γ -CyDs) はナカライテスク株式会社から入手し、粒子径測定時の粒子の分散安定化剤として用いた、polyvinyl alcohols (PVA-403, 重合度 = 300, 鹼化度 = 80.0%) は株式会社クラレから入手した。

1.2.2. IMC ナノ粒子の調製

水中溶媒拡散法を用い、CyDs を分散安定化剤として界面活性剤を含まない IMC ナノ粒子を調製した。100 mL の CyD 水溶液中に 400 rpm で攪拌下、IMC エタノール溶液 (200 mg/10 mL) をペリスタポンプ (東京理科機械株式会社) を用いて滴下した (2.0 mL/min)。外相として異なる濃度の α -, β -, γ -CyD 水溶液 (0.1, 0.5, 1.0%, w/v) を用いた。得られた懸濁液は遠心分離 (20,000 rpm, 4°C, 10 min, 株式会社久保田製作所) し、得られたペレットは蒸留水を添加し、超音波により再分散させた。このプロセスを 2 回繰り返し、最終的な懸濁液を凍結乾燥 (-120°C, 72 h, FD-81TS, 東京理科機械株式会社) した。

1.2.3. 粒子径及び粒子径分布

凍結乾燥により得られたサンプルを蒸留水に分散させ、Zetasizer (Zetasizer 3000HS, Malvern) を用い動的光散乱法にて粒子径を測定した。得られた結果は平均粒子径 (Z-average: ZAve) と分散指数 (polydispersity index: PI) で示した。また粒子径分布は FPAR-1000 (大塚電子株式会社) を用いて測定した。

1.2.4. IMC ナノ粒子の収率測定

凍結乾燥サンプルの薬物の定量について、UV 分光測定器 (UV-1700, 株式会社島津製

作所) を用い測定した。IMC ナノ粒子としての回収量を測定するため、得られたサンプル 25 mg を 10 mL の蒸留水に分散させ、0.8 μm のフィルターに通した。フィルターを通過した 0.8 μm 以下の粒子は 3 mL のエタノール中に溶解させ、pH 6.8 のリン酸緩衝液を用い適切な濃度に希釈した。IMC の濃度は 320 nm の波長にて測定した。フィルターを通過した薬物量を蒸留水に分散させたサンプル量で割り、IMC ナノ粒子の収率として示した。

1.2.5. 電子顕微鏡

IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルの外観について、走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscopy: SEM, JSM-330A, 日本電子株式会社) を用い観察した。観察の前処理として、両面テープを貼り付けた観察台に試料を付着させ、減圧下、金蒸着した。加速電圧 15 kV の条件にて観察を行った。

1.2.6. 粉末 X 線回折

IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルの粉末 X 線回折について、Rigaku Geigerflex powder X-ray diffractometer (PXRD, 株式会社リガク) を用い実施した。測定速度は 4°/min, 20 の範囲は 5~40°にて測定を行った。

1.2.7. 示差走査熱量測定

IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルの熱分析について、液体窒素での冷却下、DSC-6200 (セイコーインスツル株式会社) を用い実施した。Differential Scanning Calorimeter (DSC) 分析において、2~3 mg のサンプルをアルミパンに充填し速度は 10°C/min, 範囲は 25~200°Cにて測定を行った。

1.2.8. 溶出試験

IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルの溶出試験について、第十五改正日本薬局方に従って実施した。IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルは 25 mg を溶出試験第 2 液 (pH 6.8 リン酸緩衝液)、 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、パドル法 100 rpm にて溶出性を評価した。一定間隔にて 5 mL サンプルングし、0.2 μm のフィルターを通し、UV 分光測定器を用い測定した。

1.3. 結果・考察

1.3.1. 懸濁液中での粒子径

水中溶媒拡散法を用い、CyD 溶液に IMC エタノール溶液を滴下すると、乳白色の均一な懸濁液が得られた。一方、CyD を含まない水中に IMC エタノール溶液を滴下した場合、IMC 粒子がプロペラへ固着した。得られた懸濁液を遠心分離し、蒸留水を添加し、再分散させ、最終的に懸濁液を凍結乾燥した。凍結乾燥の前処理として、 -120°C にて素早く予備凍結させた。これは、ナノ粒子の液層での分散状態を一定にし、ナノ粒子の再分散性を保つためである⁶⁶。

粒子径測定について、凍結乾燥後のサンプルを蒸留水に分散させ、超音波を 5 min 照射し実施した。Table 1 に異なる β -CyD 水溶液の濃度にて調製した IMC ナノ粒子の平均粒子径 Z_{Ave} と分散指数 PI を示す。300~500 nm の平均粒子径を有するナノ粒子を得ることに成功した。PI は粒子径分布の幅を示す指標であり、低い値ほど粒子の分散性が良好であることを意味する。粒子調製時の β -CyD の濃度を 0.1 から 1.0%へと増加させると PI が減少していった。0.8 μm のフィルターを通過した IMC ナノ粒子の割合は、粒子調製時の β -CyD の濃度を増大させると僅かに増大した。

Table 1. Effect of β -CyD concentration in the outer phase of primary emulsion on the average particle diameter (Z_{Ave}), polydispersity index (PI), and nanoparticle yield of the freeze-dried samples.

β -CyD concentration (%, w/v)	Z _{Ave} (nm)	PI	Nanoparticle yield (%)
0.1	437.6	0.348	82.4
0.5	399.8	0.168	84.9
1.0	336.8	0.013	85.1

Figure 4 に凍結乾燥後のサンプルを分散させた IMC 粒子の粒子径分布を示す。蒸留水をナノ粒子の分散媒とした場合、3~5 μm の比較的粗大な粒子が認められた。しかし、同じサンプルを PVA 水溶液に分散させた場合、ナノサイズの単一ピークの粒子径分布を示した。この結果より、蒸留水を分散媒とした時に認められたマイクロサイズの粒子はナノ粒子の凝集体であると言える。

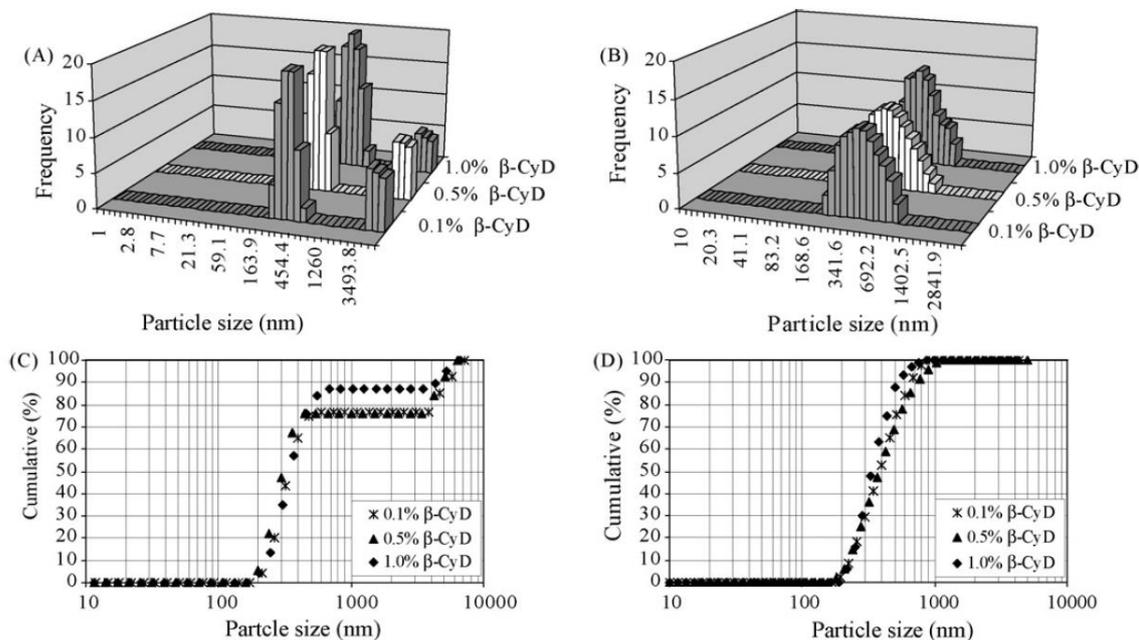


Figure 4. Particle size distributions of freeze-dried samples prepared in different concentrations of β -CyD; dispersion in water: (A) and (C); and in 0.1% PVA solution: (B) and (D).

Figure 5 に水中溶媒拡散法を用い、IMC 粒子の調製時に 2 種の異なる CyDs を添加し、CyD (α -, γ -)が IMC の分散性に及ぼす影響を比較した結果を示す。 α -, γ -CyDs を用いた場合の平均粒子径及び粒子径分布の結果は β -CyD の結果と類似したものであった。 α -, γ -CyDs を用いた場合、300~400 nm の範囲のナノ粒子が得られた。異なる CyDs の空洞のサイズは得られるナノ粒子の粒子径にはほとんど影響せず、CyD の包接複合体形成の理論は本報告内容である CyD 分子のナノ粒子形成の安定化効果の主要な要因ではないと考えられる。エマルション形成の初期において、滴下した溶液中からエタノールが水相中に素早く拡散し、IMC 微粒子が形成される。CyD の役割は IMC 結晶の成長とこれら粒子の凝集によりマイクロサイズの粒子形成を抑制することであり、CyD の分子間相互作用を通じた CyD ネットワークの形成によるためと推測された。CyD 分子は水溶液中で自己結合し、約 90 nm の最小流体力学的半径を有するナノサイズの凝集体を形成することが過去に報告されている⁶⁷。その凝集体は非包接複合体やミセル様構造形成により疎水性薬物と相互作用することが可能である⁵⁹。

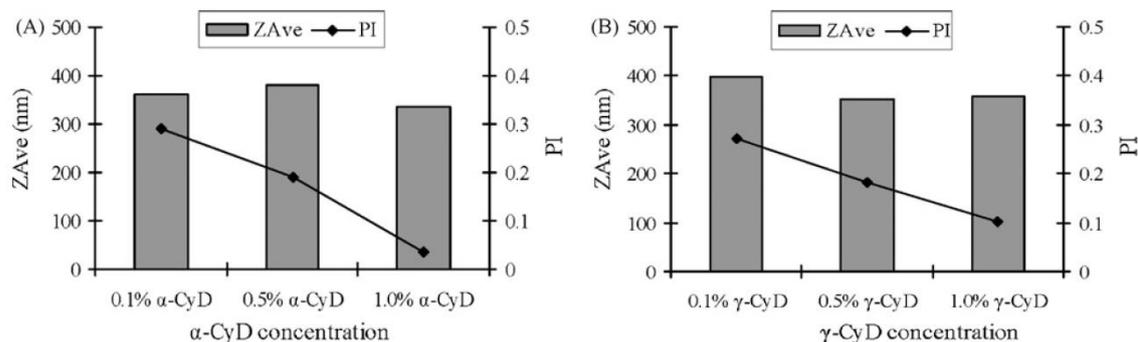


Figure 5. Average particle size (ZAve) and polydispersity index (PI) of freeze-dried samples prepared in different concentrations of α -CyD: (A) and γ -CyD: (B).

1.3.2. SEM 写真

Figure 6 に IMC 原末，凍結乾燥後のサンプルの SEM 画像を示す。IMC 原末は比較的粒子径分布の広い，不規則な形状の粒子であった (Figure 6 (A))。異なる濃度の β -CyD を用い調製した凍結乾燥後のサンプルは棒状または繊維状のナノサイズの IMC 粒子の凝集体であった (Figure 6 (B)-(D))。SEM 画像から観察された粒子径は，球状の粒子径と想定し粒子径測定された結果と一致している。

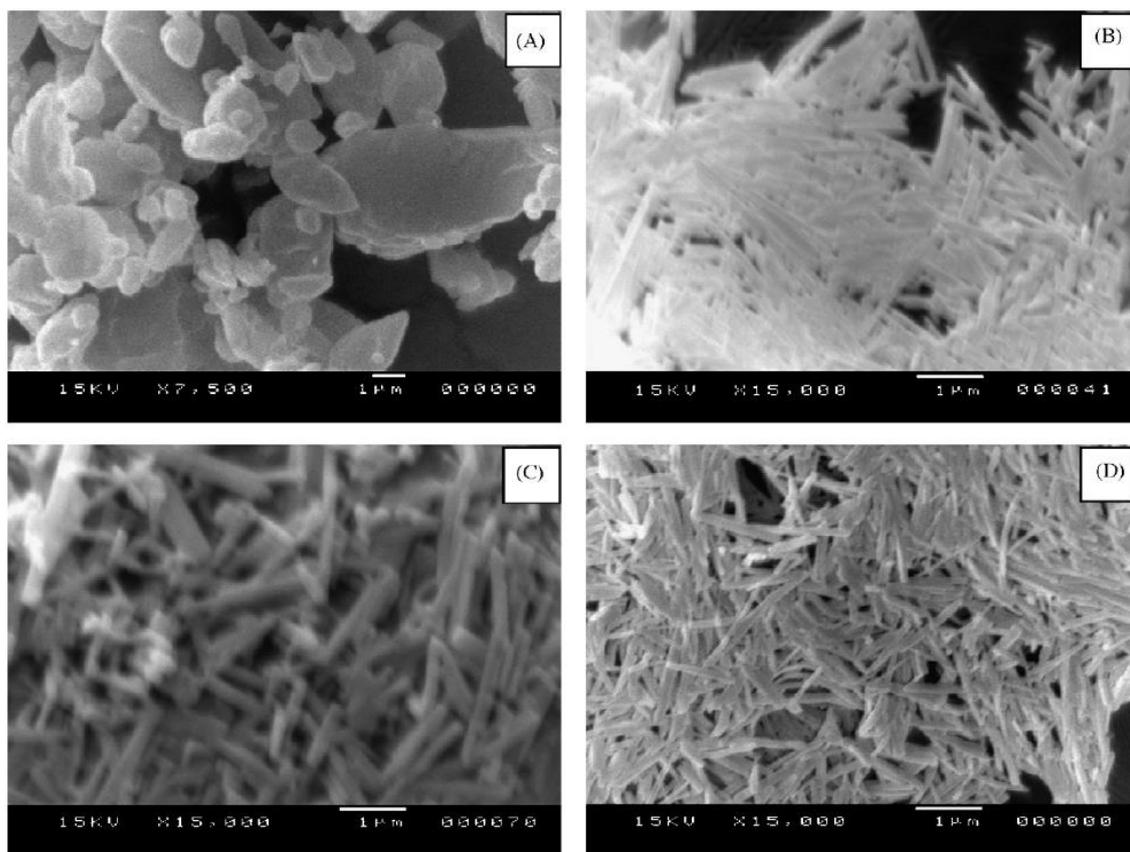


Figure 6. SEM photographs of commercial IMC powder: (A) and freeze-dried samples prepared in different concentrations of β -CyD solutions; 0.1% β -CyD: (B), 0.5% β -CyD: (C), and 1.0% β -CyD: (D).

1.3.3. 結晶性評価

Figure 7にIMC原末, 凍結乾燥後のサンプルのPXRDパターンを示す. IMC原末のPXRDパターンは 2θ で $11.7, 17.0, 19.8, 22.0, 26.8^\circ$ に回折ピークを示し, IMCの安定晶(γ -form)と一致する. 一方, 凍結乾燥後のIMCナノ粒子のPXRDパターンは 2θ で $8.3, 11.8, 14.4, 18.0, 22.0^\circ$ に低強度の回折ピークを示した. このパターンは過去に報告されたIMCの準安定晶である α -formと一致していた^{68,69}.

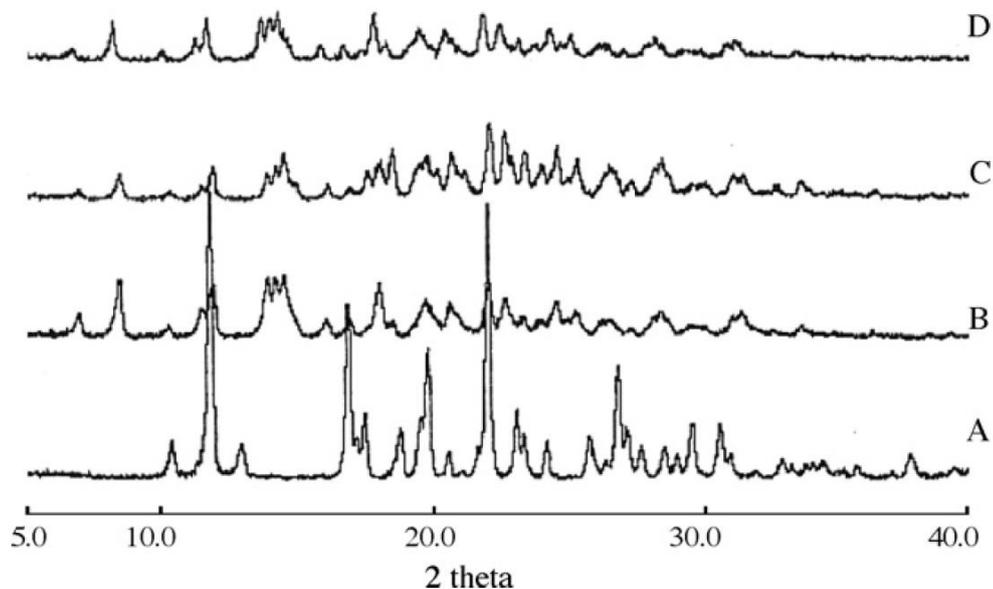


Figure 7. PXR D patterns of commercial IMC powder: (A) and freeze-dried samples prepared in different concentrations of β -CyD solutions; 0.1% β -CyD: (B), 0.5% β -CyD: (C), and 1.0% β -CyD: (D).

Figure 8に異なるサンプルのDSCプロファイルを示す。PXR Dから予想された様に、IMC原末は安定晶である γ -formの融点である 159.4°C において鋭い吸熱ピークを示した。一方、凍結乾燥後のサンプルの融点ピークは約 152.0°C に認められ、それは準安定晶である α -formの融点と一致する。 α -、 γ -CyDsを用いた場合において、類似のPXR DとDSCプロファイルが得られ、IMC結晶の準安定晶への結晶転移が確認された。

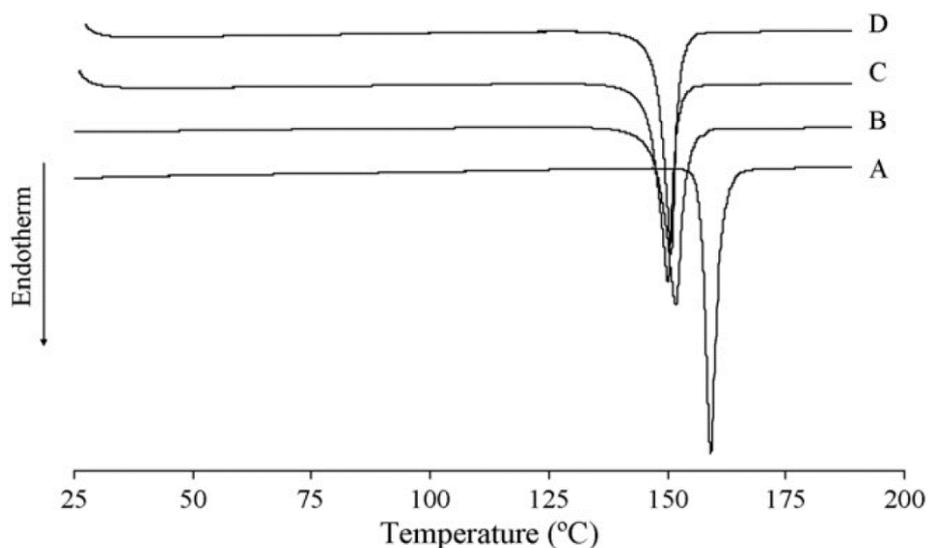


Figure 8. DSC profiles of commercial IMC powder: (A) and IMC nanocrystals prepared in different concentrations of β -CyD solutions; 0.1% β -CyD: (B), 0.5% β -CyD: (C), and 1.0% β -CyD: (D).

1.3.4. 溶出性評価

準安定晶の形成は難水溶性薬物の見かけの溶解度と溶解速度を劇的に増大させるとして一般的に知られている⁷⁰. Figure 9にIMC原末と凍結乾燥後のサンプルの溶出プロファイルを示す. IMC原末の溶出速度は遅く, 90 minにおいて溶出率約50%と完全には溶解しなかった. 凍結乾燥後のサンプルについて, IMC分子の90%以上は5 min以内に溶解し, 10分以内に完全に溶解した. 異なる β -CyD濃度にて調製したサンプルはほとんど同等の溶出プロファイルを示した. 詳細な結果は割愛するが, α - γ -CyDsを用いて調製した凍結乾燥後のナノ粒子の溶出プロファイルは β -CyDの結果と類似していた. IMCの著しい溶出速度の改善は粒子径がナノサイズまで減少し, 有効比表面積が顕著に増大したこと, 及び結晶形が準安定晶に転移したためと考察する.

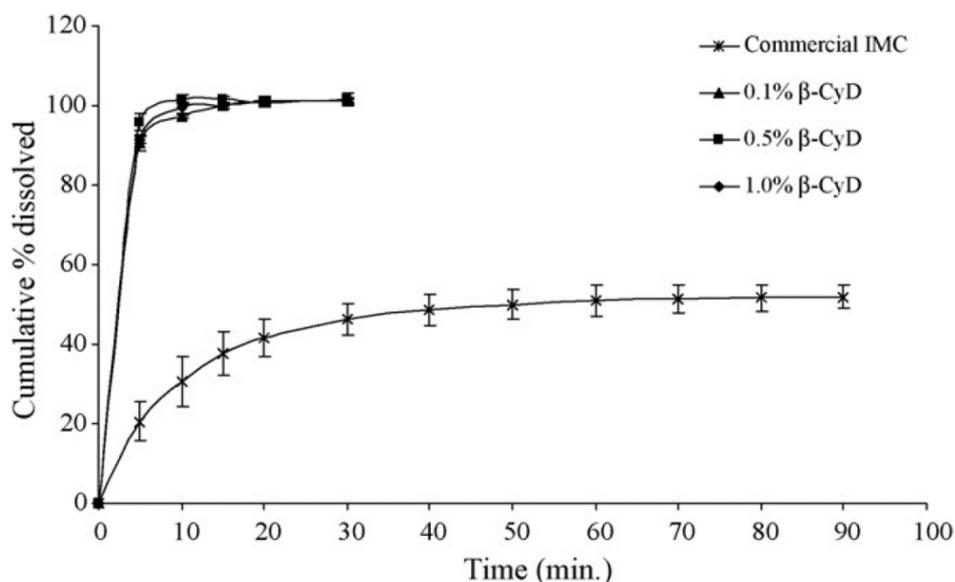


Figure 9. Dissolution profiles of commercial IMC powder and freeze-dried samples prepared in different concentrations of β -CyD solutions.

結論として、CyDs 存在下、水中溶媒拡散法により IMC ナノ粒子の調製は成功した。エタノールを良溶媒として用い、界面活性剤の代わりに CyDs を含む水溶液を貧溶媒として用いた。水中溶媒拡散法における CyD 分子の役割は形成された一次粒子の分散状態の維持と粒子の凝集や結晶成長を防止することであった。

1.4. 結論

水中溶媒拡散法は難水溶性薬物である IMC の溶解速度を増大させるための効率的な製法であると言える。本方法において、CyDs は調製された懸濁液の安定化剤として用いられた。この安定化効果は CyD 分子の分子間相互作用による CyD ネットワークの形成のためであり、これにより分散した粒子の凝集と結晶成長を抑制することができた。得られた IMC ナノ粒子は平均粒子径が 300~500 nm の均一な粒子径分布を示した。IMC 原末と比較し、調製された IMC 粒子の溶解性改善効果はナノサイズへの粒子径の減少と準安定晶への結晶形転移のためである。

第 2 章

適切な分散安定化剤を選択した水中溶媒拡散法による ONO-2921 の粉末吸入製剤設計

2.1. 序論

経肺投与は気道の局所疾患と全身疾患の治療に大別できる。経肺投与のメリットとして、治療効果の発現が早いこと、肺内での薬物濃度を高めることができること、薬物の全身循環を最小限に留め副作用の発現を最小にできること、肝初回通過効果を回避できることなどが挙げられることから、肺は薬物送達において有用な標的の一つとして注目されている^{29,30}。近年、肺への薬物送達に関して難吸収性の化合物を全身に送達することが期待されている。これは肺が広い内表面積を有すること、肺胞上皮細胞が薄いこと、代謝酵素活性が低いことから化合物を肺から吸収させて全身に送達することが有用と考えられているためである³¹⁻³⁴。

経肺投与の方法はネブライザー式吸入剤、pMDI、ソフトミスト吸入剤、DPI の 4 つのシステムに分類される。各システムは分散機構やデザインにより細分化される⁷¹（詳細は緒言を参照）。DPI は小型であり携帯性に優れ、粉末は液体と比較して化学的な安定性に優れ、ミストの噴霧と吸気を同調させる必要がなく吸入性に優れるといったメリットが挙げられる^{39,40}。DPI を用い肺に薬物を送達するためには、薬物粒子の空気力学的粒子径が $0.5\sim 7\ \mu\text{m}$ と適切なサイズでなければならない⁴¹⁻⁴³。

粒子径を減少させる一般的な手法として、**break-down** 法による粗大な粒子を破碎する方法がある⁷（詳細は緒言を参照）。粉碎された粒子は不均一、電荷を帯び、凝集し、粉体としての性質の低下につながりうる。DPI としてこれら問題を解決するため、粉碎された薬物はしばしば粗大なキャリア粒子、例えば乳糖やマンニトールなどに付着させるキャリア法が採用される⁴⁵⁻⁴⁷。付着された薬物は吸入時、キャリア粒子から分離し、肺に到達する⁴⁸。キャリア法は多くの DPI 製品に採用されているが、キャリア粒子と薬物間の強力な相互作用が薬物の分離や吸入量の均一性の低下を引き起こす問題を含んでいる^{72,73}。

第 2 章では、キャリア粒子を用いない DPI の設計を試みた。粒子間の付着凝集性を改

善するため、break-down 法は用いず、build-up 法である水中溶媒拡散法を用い、微粒子のみから成る 2 次粒子を調製した。難水溶性の医薬品候補化合物である ONO-2921 をモデル化合物として用いた。ONO-2921 は N 型 Ca^{2+} チャンネル阻害剤であり、神経性疼痛を適応症として開発された^{74,75}。ONO-2921 は肺で吸収され、全身循環系に移行し、薬理効果を発現する。薬理効果発現のためには高い血中濃度が必要であり、薬物含有率は 80%、吸入効率は 40%以上の DPI を目標とした。以下に得られた知見を詳述する。

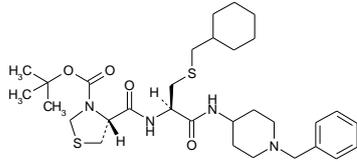
2.2. 試料ならびに実験方法

2.2.1. 試料

難水溶性のモデル薬物である ONO-2921 (tert-butyl(4R)-4-{(((1R)-2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)amino]-1-[[cyclohexylmethyl]thio]methyl)-2-oxoethyl)amino]carbonyl}-1,3-thiazolidine-3-carboxylate) は小野薬品工業株式会社に提供頂いた。Table 2 に ONO-2921 の物理化学的性質と構造式を示す。

水中溶媒拡散法の添加剤として、4 種の異なるグレードの PVA (PVA-105, 重合度 = 500, 鹼化度 = 98.5%; PVA-205, 重合度 = 500, 鹼化度 = 88.0%; PVA-405, 重合度 = 500, 鹼化度 = 80.0%; PVA-L8, 重合度 = 500, 鹼化度 = 71.0%; 株式会社クラレ提供) を用いた。Pluronic F-88 は株式会社アデカ、Tween20 はキシダ化学株式会社、hydroxyl propyl cellulose (HPC-L) は日本曹達株式会社、D-mannitol は三菱商事フードテック株式会社、4 種の異なる CyDs (α -, β -, methyl- β -, hydroxypropyl- β -CyDs) は塩水港精糖株式会社から入手した。

Table 2. Physicochemical properties and the structural formula of ONO-2921.

Properties	
Chemical formula	C ₃₁ H ₄₈ N ₄ O ₄ S ₂
Molecular weight	604.9 g/mol
Melting point	160 °C
Log P	6.3
pKa	8.0
Solubility in methanol	68.7 mg/mL
Solubility in ethanol	39.2 mg/mL
Solubility in octanol	36.8 mg/mL
Solubility in water (20 ± 5 °C)	3.3 µg/mL
Solubility in pH 1.2 solution (1st fluid for dissolution test) (20 ± 5 °C)	463.5 µg/mL
Solubility in pH 4.0 buffer (0.05 mol/L acetic acid-sodium acetate buffer solution) (20 ± 5 °C)	686.6 µg/mL
Solubility in pH 6.8 buffer (2nd fluid for dissolution test) (20 ± 5 °C)	1.1 µg/mL
Solubility in pH 7.4 buffer (Phosphate Buffer Solution) (20 ± 5 °C)	0.5 µg/mL
Structural formula	

2.2.2. ONO-2921 粒子の調製

水中溶媒拡散法を用い、ONO-2921 粒子を調製した。100 mL の添加剤水溶液中に 400 rpm で攪拌し、ONO-2921 エタノール溶液 (200 mg/5 mL) をペリスタポンプ (東京理科機械株式会社) を用いて滴下した (2.0 mL/min)。外相として用いた添加剤水溶液の濃度は 0 ~2.0% (w/v) とした。以降の操作は 1.2.2. IMC ナノ粒子の調製を参照。

2.2.3. 粒子径, 粒子径分布

凍結乾燥前の懸濁液中の粒子径は Zetasizer を用い, 動的光散乱法にて測定した. 得られた結果は平均粒子径で示した.

凍結乾燥後のサンプルは LDSA-2400A (マイクロトラック・ベル株式会社) を用い, 気中分散時の粒子径をレーザー回折法にて測定した. 気中分散時の圧力は 0.3 MPa とした. 粒子の凝集性は span により評価した. span は平均粒子径に対する相対的な粒子径分布の幅であり, 次の式より算出した^{76,77}.

$$\text{span} = (D_{90}-D_{10})/D_{50}$$

2.2.4. 電子顕微鏡

ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルの外観について, SEM を用い観察した. 以降の操作は 1.2.5. 電子顕微鏡を参照.

2.2.5. 示差走査熱量測定

ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルの熱分析について, DSC を用い実施した. 以降の操作は 1.2.7. 示差走査熱量測定を参照.

測定範囲は 20~220°C とした.

2.2.6. 粉末 X 線回折

ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルの粉末 X 線回折について, PXRD (SmartLab X-ray diffractometer, 株式会社リガク) を用い実施した. 測定速度は 10°/min, 2θ の範囲は 5~40°にて測定を行った.

結晶性の評価は Hermans-Weidinger 法⁷⁸ を用い次の式より, 実施した.

$$\text{結晶性の割合} = \frac{\text{結晶部分の強度}}{\text{結晶部分の強度} + \text{非晶質部分の強度}} \times 100$$

2.2.7. *In vitro* 吸入特性

ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルを適量 (6.5 mg) 2 号ゼラチンカプセルに充填し, 吸入デバイスにセットした. *In vitro* 吸入特性の評価は twin impinger (Copley Scientific Limited) と Andersen cascade impactor (AN-200 system, 東京ダイレック株式会社) を用い

た。吸入デバイスには Spinhaler® (アステラス製薬株式会社) を用いた。In vitro 吸入特性の結果について、薬物含有率は考慮せず、回収した粒子量を 100% とした。

2.2.7.1. Twin impinger

Twin impinger は咽頭部と肺内部をモデルとした stage 1 及び stage 2 から成り、専用吸入器から吸入された粒子は粒子径の大きさに従い、空気力学的に 2 つの stage に分画及び捕獲される。すなわち、stage 2 への沈着率 (%) を求めることにより肺内に到達する (空気力学的粒子径は 5.7 µm 以下である⁷⁹⁾ 有効な薬物量を推定し、製剤学的な品質を判断することができる。メタノールを twin impinger の stage 1 と stage 2 に導入した。吸入の流量は 60 ± 5 L/min に設定した。吸引時間は 5 s とした。吸入後、capsule, device, throat, stage 1, stage 2 に沈着した化合物をメタノールで洗浄し、25~50 mL にメスアップした。ONO-2921 の含有量は highperformance liquid chromatography (HPLC) を用いて評価した。

2.2.7.2. Andersen cascade impactor

Andersen cascade impactor は 8 つの stage から成り、専用吸入器から吸入された粒子は粒子径の大きさに従い、空気力学的に 8 つの stage に分画及び捕獲される。Twin impinger と同様、一定の stage 以降への沈着率 (%) を求めることにより肺内に到達する有効な薬物量を推定し、製剤学的な品質を判断することができる。Andersen cascade impactor の評価は throat, stage 0~7, filter を用いた。In vitro 吸入特性評価時の粒子の跳ね返りを防止するため、各 stage の collection plate を 2%w/w のシリコン入りヘキサソラン溶液に入れた後ヘキサソランを蒸発させ、シリコン薄膜を形成させた。吸入の流量は 28.3 L/min に設定した。吸引時間は 5 s とした。吸入後、capsule, device, throat, stage 0~7 に沈着した化合物をメタノールで洗浄し、25 mL にメスアップした。ONO-2921 の含有量は HPLC を用いて評価した。In vitro 吸入特性の結果は emitted dose (ED) と fine particle fraction (FPF) で評価した。ED は capsule に充填された ONO-2921 に対する capsule から放出された ONO-2921 の割合で示した。FPF は ONO-2921 の stage 3 以降の到達割合として示した (空気力学的粒子径は 4.7 µm 以下である)^{80,81}。

2.2.8. HPLC 分析

ONO-2921 の含有量は HPLC (pump: Jasco-880-PU; detector: Jasco-875; integrator:

Jasco-807-IT, 日本分光株式会社) を用い測定した。カラムは 4.6×250 mm ODS column (Inertsil ODS-2 5 μm, ジーエルサイエンス株式会社), カラムオーブンの温度は 30°C, サンプル注入量は 20 μL, 検出波長は 220 nm, 移動相は 5 mM KH₂PO₄ と 5 mM K₂HPO₄ の混液/アセトニトリル/メタノール=5/18/3 (v/v/v), 流量は約 1.1 mL/min にて ONO-2921 の保持時間が約 10 分の条件を用いた。

2.3. 結果・考察

2.3.1. 有機溶媒のスクリーニング

薬物微粒子を調製するため水中溶媒拡散法⁸²を用い, ONO-2921 を溶解させた良溶媒 (例えば, メタノール, エタノール, アセトンなど) を界面活性剤やポリマーなどの添加剤を含む水溶液に滴下した。薬物粒子生成時, 添加剤はエマルションの凝集を抑制した⁶³。Twin impinger の stage 2 到達率について, 異なる良溶媒を用い調製したサンプルの最大値と最小値の差は約 9%であった。良溶媒として, メタノール, エタノール, 1-または 2-プロパノールを用いたスクリーニング結果より, 吸入効率について大きな差が認められなかったため, 以降の検討において良溶媒としてエタノールを選択することとした。エタノールは残留溶媒の観点からも適切な溶媒である⁸³。効率良く粒子を調製するため, エタノール溶液中の薬物濃度はほぼ飽和溶解度である 40 mg/mL とした。

2.3.2. 添加剤のスクリーニング

2.3.2.1. 粒子径評価

水相にて初期エマルションの凝集を抑制するため, 10 種類以上の添加剤 (PVA 類, 界面活性剤類, 糖類) のスクリーニングを実施した。これらの添加剤はこれまでの報告でもナノスフェア, ナノ粒子, ナノスフェア表面の修飾に用いられている^{63,84-86}。なお, 本スクリーニング検討において, 水溶液の濃度は 1.0%に固定した。水相中に PVA-205 存在下, ナノサイズの ONO-2921 粒子 (凍結乾燥前の懸濁液中の粒子径約 600 nm) が形成された。一方, 添加剤が存在しない水相にて ONO-2921 粒子を調製した場合, 粒子径は約 3.6 μm であった。これは凝集抑制剤である添加剤が存在せず, 結晶成長したためである。その他の添加剤を用いて ONO-2921 粒子を調製した場合, 粒子径は 300~900 nm であった。以上より, 添加剤非存在下を除き, 用いる添加剤による凍結乾燥前の懸濁液中での粒子径について, 大きな差は認められなかった。添加剤はエマルションや粒子の凝集融

合を抑制する⁸⁷とともに、粒子の表面性質を変えることができる⁸⁶。

第1章で報告した通り、CyDsはIMC粒子の凝集や結晶成長を抑制することが可能であった。CyDsを用い、ONO-2921粒子を調製した場合、得られた粒子の粒子径は凍結乾燥前において300~400 nmであり、ONO-2921においても同様の効果を確認できた。薬物粒子の懸濁液は凍結乾燥され、凍結乾燥後のサンプル粉末の性質は評価された。β-CyD, methyl-β-CyD, hydroxypropyl-β-CyDの収率は各々、26%、11%、6%であり、他の添加剤を用いて調製したサンプルと比較して低かった。β-CyDsを用いて調製した粒子の収率が低い理由として、β-CyDsによるONO-2921の可溶化効果が考えられる。なお、methyl-β-CyD, hydroxypropyl-β-CyDを用い得られたサンプルについては、低収率のため以降の評価を実施できなかった。

Table 3に異なる添加剤を用いて調製し、凍結乾燥した粉末サンプルの薬物含有率及び気中分散時の粒子径を示す。いずれの凍結乾燥後サンプルの薬物含有率も80%以上であった。低収率で測定不可能であったmethyl-β-CyD, hydroxypropyl-β-CyDのサンプルを除き、凍結乾燥後のサンプルの粒子径D₅₀は5.0~13.7 μmであり、ONO-2921原末(D₅₀: 4.2 μm)と比較して増大していた。D-mannitolのspanは2.1であり、他のサンプルと比較して大きい値であった。糖類は一般的に凍結乾燥時のナノ粒子の凝集抑制剤として効果的であるが、D-mannitolは凍結乾燥時、凝集を促す作用も報告されている⁸⁸。本検討では、D-mannitolが凝集を促し、粒子径分布が広がったと考えられる。PVA-405を用い調製したサンプルのspanは小さかったが、PVA-205とPVA-L8はspanが1.6と比較的大きかった。これは薬物含有率が低くなり、相対的に添加剤であるPVAsの含有率が高くなり、他の添加剤を用い調製したサンプルと比較し、分散し難くなったためであると考えられる。上記以外のサンプルについて、spanは1.2~1.4と大きな差は認められなかった。

Table 3. Drug content of ONO-2921 and particle size of freeze-dried samples of ESD-processed suspensions using 1.0% w/v of different additives (mean \pm SD, $n=3$).

Additive for ESD processing	Drug content (%)	Particle size (μm)			Span
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
PVA-105	93.0 \pm 0.6	2.4 \pm 0.0	5.7 \pm 0.0	9.4 \pm 0.1	1.2
PVA-205	83.6 \pm 0.8	3.5 \pm 0.0	8.9 \pm 0.2	17.3 \pm 0.3	1.6
PVA-405	87.7 \pm 0.4	3.8 \pm 0.2	8.0 \pm 0.5	13.6 \pm 1.3	1.2
PVA-L8	88.4 \pm 1.3	4.4 \pm 0.5	13.7 \pm 3.1	25.8 \pm 3.5	1.6
Pluronic F-88	92.8 \pm 0.3	2.0 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	9.6 \pm 0.4	1.4
Tween20	91.2 \pm 0.3	2.2 \pm 0.2	6.0 \pm 0.4	10.6 \pm 1.1	1.4
HPC-L	96.7 \pm 0.4	3.0 \pm 0.3	7.3 \pm 0.3	12.7 \pm 0.4	1.3
D-mannitol	95.8 \pm 1.2	1.7 \pm 0.1	5.3 \pm 0.5	12.8 \pm 5.0	2.1
α -CyD	96.7 \pm 0.6	1.8 \pm 0.0	5.0 \pm 0.1	8.8 \pm 0.1	1.4
β -CyD	96.9 \pm 0.8	1.9 \pm 0.0	5.0 \pm 0.0	8.7 \pm 0.0	1.4
methyl- β -CyD			N/A		
hydroxypropyl- β -CyD			N/A		

2.3.2.2. *In vitro* 吸入特性評価

Figure 10 に ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルの twin impinger を用いて評価した *in vitro* 吸入特性の結果を示す. ONO-2921 原末は大部分が stage 1 に沈着し, stage 2 到達率は 2.1% と低い値であった. PVA-405 を除き, 添加剤を用いて調製したサンプルの stage 2 到達率は増大した. PVA-205, Pluronic F-88, HPC-L を用い調製したサンプルの stage 2 到達率は 40% 以上であった.

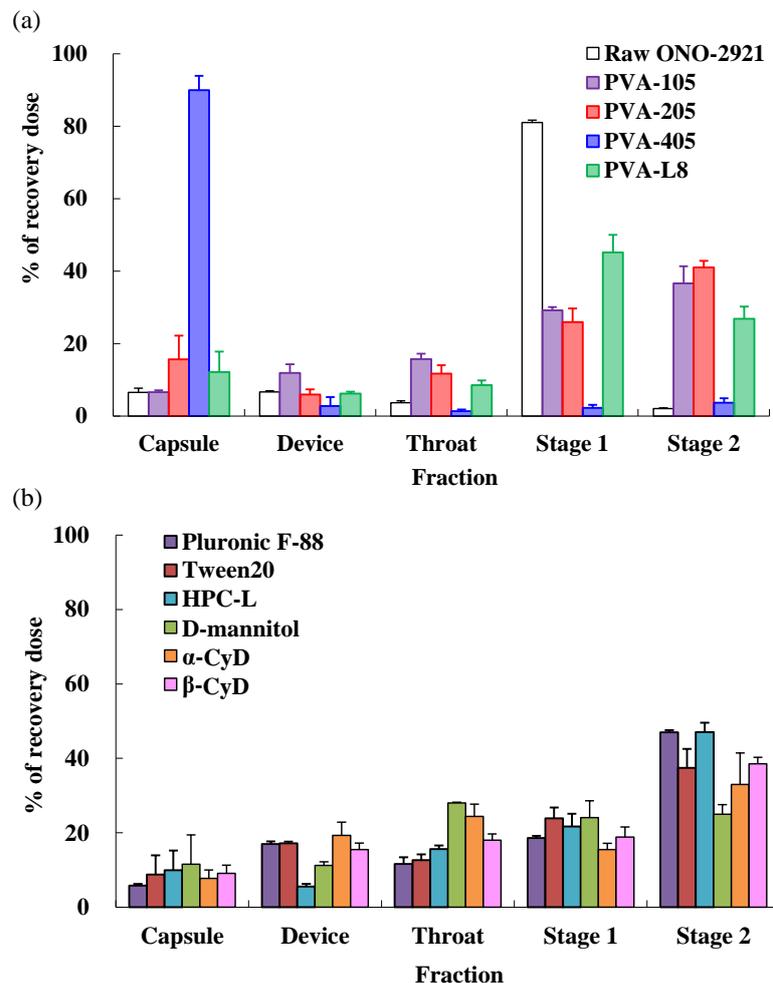


Figure 10. Effect of additives dissolved in the outer phase on the *in vitro* inhalation properties of the freeze-dried samples determined using a twin impinger: (a) raw ONO-2921 and the samples processed with PVAs; and (b) samples processed with surfactants, HPC-L, D-mannitol and CyDs (mean \pm SD, $n=3$).

凍結乾燥後のサンプルの粒子径は ONO-2921 原末の粒子径と比較し増大したが (Table 3), 凍結乾燥後のサンプルの *in vitro* 吸入特性は改善された. 過去の報告より, 粒子径測定時の気中分散のエア圧力を増大させると凝集体は分散され, 特に粉碎された原薬に対してその傾向は強いと言われている. 一方, 通常の吸気条件にて生じる吸入デバイス内の気流は弱く, 粉碎された粒子の凝集体を全て解砕することは困難である⁸⁹. 凍結乾燥後のサンプルについて, 全ての粒子が気中分散時の粒子径測定時ほど分散はされていないが (詳細な結果は 2.3.4. Andersen cascade impactor を参照), ONO-2921 原末と比較し

分散され易かったと考えられる。CyDs を用い調製したサンプルについて、気中分散時の粒子径は他の添加剤を用いたものと比較し小さかったにも関わらず、stage 2 到達率は40%未満であり、CyDs は吸入用の粒子調製には適さなかった。

2.3.2.3. 粒子の外観評価

Figure 11 に *in vitro* 吸入特性が良好であった PVA-205, Pluronic F-88, HPC-L を用い調製したサンプルの SEM 画像を示す。ONO-2921 原末は 1 次粒子が密に凝集した球形の 2 次粒子であった。PVA-205, PVA-405, PVA-L8 を用い調製したサンプルもまた、球状の 2 次粒子であった (Figure 11 (b), Figure 12 (b), (c))。Pluronic F-88, HPC-L, その他の添加剤を用い調製したサンプルは繊維状の 2 次粒子であった (Figure 11 (c), (d), Figure 12)。添加剤の含有率をサンプル中の薬物含有率の差から算出した。PVA-105, Pluronic F-88, Tween20, HPC-L, D-mannitol, α -CyD, β -CyD を用い調製したサンプルの薬物含有率は約 95% であり、添加剤の含有量は残りの約 5% である。添加剤の含有量は比較的 low, ONO-2921 と添加剤の弱い相互作用により、凍結乾燥後のサンプルは非立体的な繊維状の 2 次粒子を示した。PVA-205, PVA-405, PVA-L8 を用い調製したサンプルの薬物含有率は 83.6~88.4% であり、PVAs の含有率は 10% 以上である。PVAs の含有量は比較的 high, 相互作用し、これらのサンプルは比較的立体的な球状の 2 次粒子を示した。

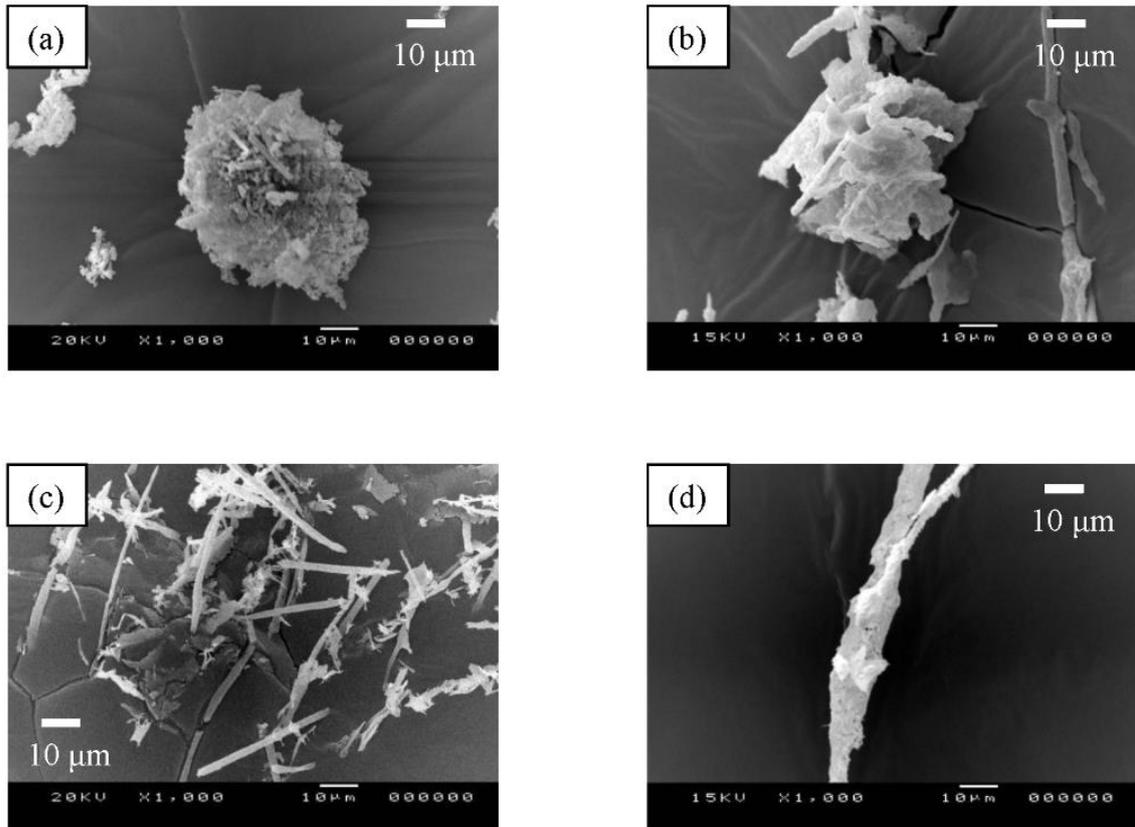


Figure 11. SEM images of freeze-dried samples prepared with different types of additives: (a) raw ONO-2921; (b) processed with PVA-205; (c) processed with Pluronic F-88 and (d) processed with HPC-L.

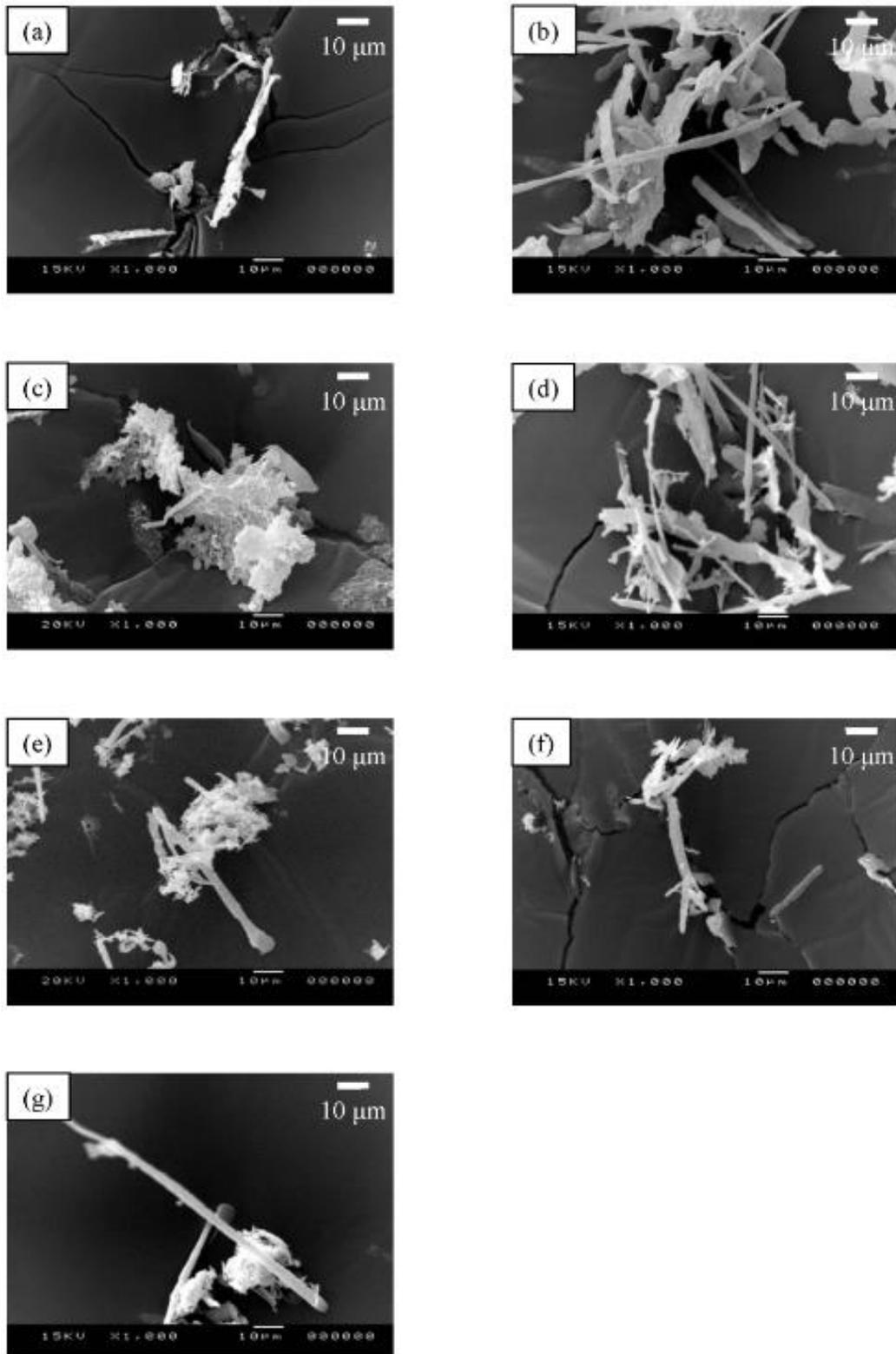


Figure 12. SEM images of freeze-dried samples: (a) processed with PVA-105; (b) processed with PVA-405; (c) processed with PVA-L8; (d) processed with Tween20; (e) processed with D-mannitol; (f) processed with α -CyD; and (g) processed with β -CyD (all 1.0% w/v).

PVA-205, Pluronic F-88, HPC-L を用い調製したサンプルは他のサンプルと比較し、良好な *in vitro* 吸入特性を示した。

PVA-205 を用い調製したサンプルは PVA-405, PVA-L8 を用いて調製したサンプルと同様に球状の 2 次粒子であったにも関わらず、良好な *in vitro* 吸入特性を示した。これは、PVA-405 を用い調製したサンプルの粒子径は PVA-205 よりも小さく、分散し易いため、分散した粒子が capsule に付着し、その結果 *in vitro* 吸入特性が低下したと考えられる。さらに、親水性である PVA-405 は粒子中に 10%以上存在し、粒子表面を覆っており、capsule 表面と粒子表面の親水的な相互作用で capsule に付着したことが考えられる。一方、PVA-L8 を用い調製したサンプルの気中分散時の粒子径は PVA-205 のサンプルと比較し大きかった。その結果、PVA-L8 を用い調製したサンプルは吸入時、十分に分散せず、twin impinger の stage 1 に沈着した。PVA-405, PVA-L8 を用い調製したサンプルの結果より、分散性のバランスが *in vitro* 吸入特性において重要であり、結果 PVA-205 がバランスの良い粒子が生成していたと推測される。

Pluronic F-88, HPC-L を用い調製したサンプルが良好な *in vitro* 吸入特性を示したことは次の通り考察する。D-mannitol を用い調製したサンプルの粒子径分布は広く (span: 2.1), device, throat, stage 1 と幅広く沈着した。CyDs を用い調製したサンプルは薬物含有率からサンプル中の CyDs の含有量は僅かであり、粒子表面は改質されなかったと推察する。疎水性の粒子は device や throat に沈着し易く⁹⁰, device と throat に多く沈着したと考えられる。*in vitro* 吸入特性において、サンプルが分散した場合、粒子は capsule, device, throat に沈着し易く、サンプルが分散しなかった場合、凝集体は stage 1 に堆積する。良好な *in vitro* 吸入特性を示すためには適切な分散性が必要である。PVA-105, Pluronic F-88, Tween20, HPC-L を用い調製したサンプルについて、Pluronic F-88 を用い調製したサンプルは気中分散時の粒子径 D_{10} と D_{50} が他の 3 つのサンプルと比較し僅かに小さく、HPC-L を用い調製したサンプルは薬物含有率からサンプル中の HPC-L 含有率が低く、吸入時に分散し易く、stage 2 到達率は PVA-105 や Tween20 を用い調製したサンプルと比較し、良好であった。

2.3.3. 添加剤濃度の最適化

2.3.3.1. *In vitro* 吸入特性評価

PVA-205, Pluronic F-88, HPC-L について、水中溶媒拡散法による粒子調製時の添加剤濃度の最適化検討を実施した。Figure 13 に得られたサンプルの *in vitro* 吸入特性の結果を

示す。Pluronic F-88, HPC-L を用い調製したサンプルについて、添加剤濃度を変化させたが、*in vitro* 吸入特性の結果は 1.0%w/v にて調製したサンプルと同等かそれ以下であった (Figure 13 (b), (c))。対照的に PVA-205 を用い調製したサンプルについて、粒子調製時の濃度が 0~0.5% (w/v) の間では stage 2 到達率は粒子調製時の濃度に依存して増大した。特に 0.5% w/v PVA-205 を用い調製したサンプルの stage 2 到達率は 50%以上であった (Figure 13 (a))。

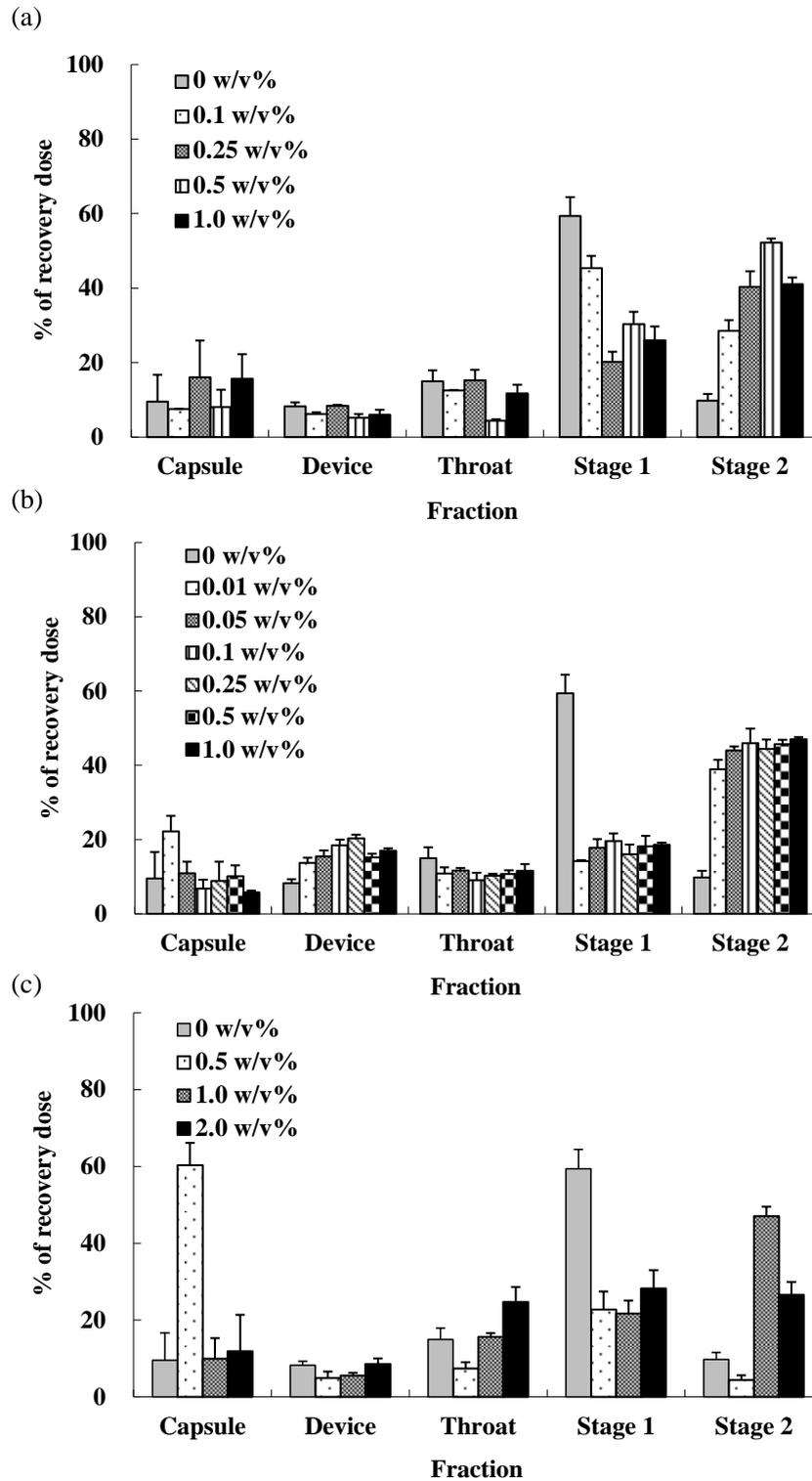


Figure 13. Changes in the *in vitro* inhalation properties of the freeze-dried samples with different concentrations of additives determined using a twin impinger (mean \pm SD, $n=3$): (a) processed with PVA-205; (b) processed with Pluronic F-88 and (c) processed with HPC-L.

2.3.3.2. 粒子径と粒子の外観評価

異なる PVA-205 の濃度にて調製した凍結乾燥後のサンプルについて、気中分散時の粒子径はほとんど差がなかった。異なる Pluronic F-88 の濃度にて調製したサンプルにおいても、気中分散時の粒子径はほとんど差がなかった。異なる HPC-L の濃度にて調製したサンプルについては、粒子調製時の濃度を増大させると粒子径と薬物含有率は減少した (Table 4)。HPC-L の含有率をサンプル中の薬物含有率の差から算出すると、粒子調製時の HPC-L 濃度が高いほど、HPC-L 含有率が増大した。HPC-L の含有率が高いほど、気中分散時の粒子径は減少したが、吸入時の分散性は悪くなった。そのため、中間である HPC-L 1.0% w/v の濃度にて調製したサンプルが比較的良好な *in vitro* 吸入特性を示したと考察する。

Table 4. Drug content of ONO-2921 and particle size of freeze-dried samples of ESD-processed suspensions using different concentrations of additives (mean \pm SD, $n=3$) processed with (a) PVA-205, (b) Pluronic F-88 and (c) HPC-L.

(a)

PVA-205 concentration (%)	Drug content (%)	Particle size (μm)			Span
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
0	99.1 \pm 5.9	2.6 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6	13.9 \pm 2.3	1.6
0.1	92.2 \pm 0.7	3.0 \pm 0.2	7.5 \pm 0.3	13.2 \pm 0.7	1.4
0.25	88.3 \pm 0.6	2.9 \pm 0.1	6.7 \pm 0.3	12.7 \pm 2.0	1.5
0.5	82.6 \pm 0.2	2.9 \pm 0.1	6.9 \pm 0.0	12.4 \pm 0.1	1.4
1.0	83.6 \pm 0.8	3.5 \pm 0.0	8.9 \pm 0.2	17.3 \pm 0.3	1.6

(b)

Pluronic F-88 concentration (%)	Drug content (%)	Particle size (μm)			Span
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
0	99.1 \pm 5.9	2.6 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6	13.9 \pm 2.3	1.6
0.01	93.1 \pm 1.2	2.1 \pm 0.1	5.7 \pm 0.2	9.6 \pm 0.6	1.3
0.05	96.4 \pm 2.2	2.1 \pm 0.0	5.8 \pm 0.1	9.7 \pm 0.3	1.3
0.1	92.8 \pm 0.3	1.7 \pm 0.0	5.3 \pm 0.2	9.5 \pm 0.8	1.5
0.25	91.2 \pm 0.4	1.8 \pm 0.1	5.2 \pm 0.2	9.1 \pm 0.3	1.4
0.5	89.3 \pm 0.1	1.7 \pm 0.0	5.0 \pm 0.1	8.9 \pm 0.1	1.4
1.0	92.8 \pm 0.3	2.0 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	9.6 \pm 0.4	1.4

(c)

HPC-L concentration (%)	Drug content (%)	Particle size (μm)			Span
		D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
0	99.1 \pm 5.9	2.6 \pm 0.3	7.2 \pm 0.6	13.9 \pm 2.3	1.6
0.5	97.3 \pm 0.2	3.4 \pm 0.1	9.0 \pm 0.7	16.5 \pm 2.3	1.5
1.0	96.7 \pm 0.4	3.0 \pm 0.3	7.2 \pm 0.3	12.7 \pm 0.3	1.4
2.0	94.2 \pm 0.2	2.6 \pm 0.3	6.4 \pm 0.5	11.5 \pm 0.9	1.4

Figure 14に異なる PVA-205 の濃度にて調製した凍結乾燥後のサンプルの SEM 画像を示す。水のみを用い調製したサンプル (0%w/v PVA-205) は球状の 2 次粒子を示し, 0.1%, 0.25% (w/v) PVA-205 を用い調製したサンプルは繊維状の 2 次粒子を示した。一方, 0.5%, 1.0% (w/v) PVA-205 を用い調製したサンプルは中空球状の 2 次粒子であった。異なる Pluronic F-88, HPC-L の濃度にて調製した凍結乾燥後のサンプルは全て繊維状の 2 次粒子であった。

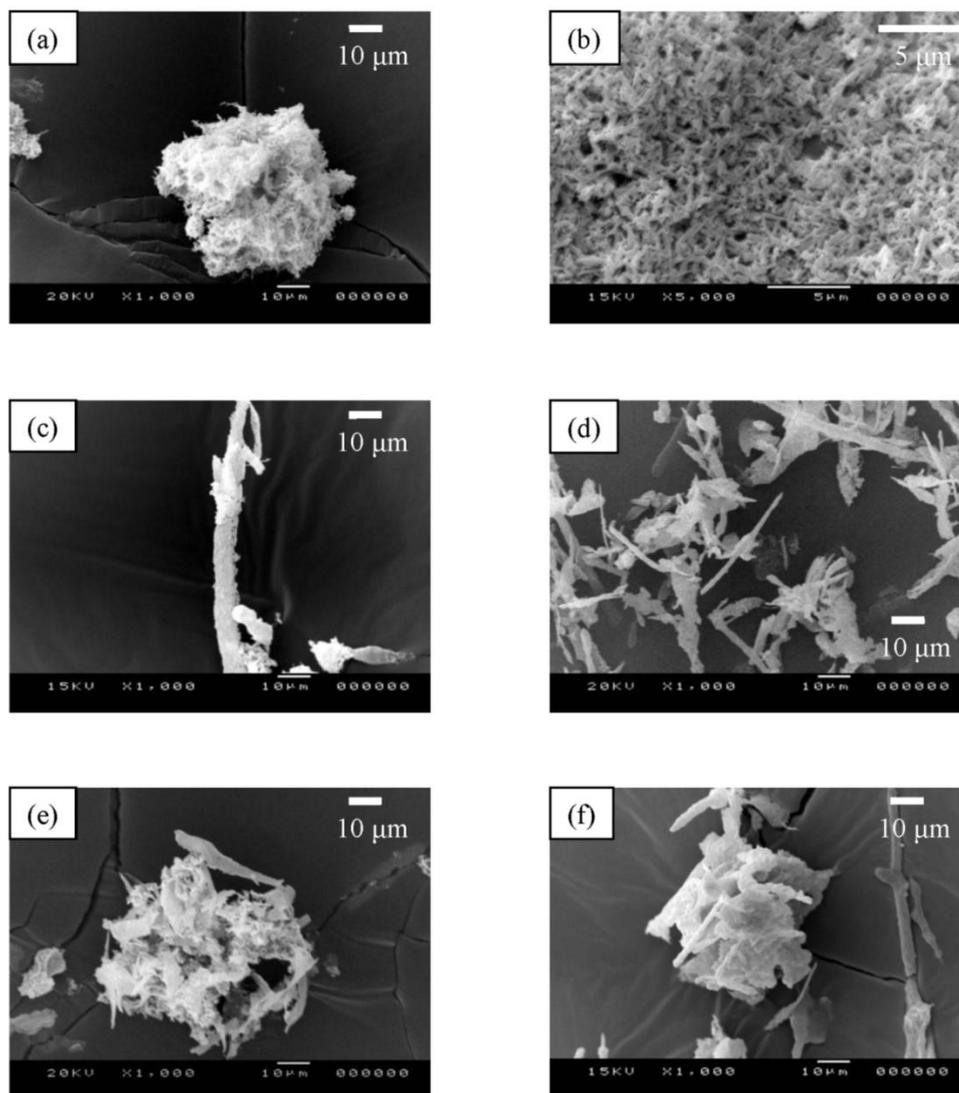


Figure 14. SEM images of freeze-dried samples of ESD suspensions: (a) and (b), prepared without additives (PVA-205 0%); (c) processed with PVA-205 (0.1%); (d) processed with PVA-205 (0.25%); (e) processed with PVA-205 (0.5%) and (f) processed with PVA-205 (1.0%) (all w/v).

薬物含有率が 90%以上の凍結乾燥後のサンプルは繊維状の 2 次粒子を示した。薬物含有率が約 80%のサンプルは 10%以上の PVA-205 を含んでいた。PVA-205 が相互作用し、凍結乾燥後のサンプルは比較的立体的な球状の 2 次粒子を示したと考察する。一般的に球状の粒子は粒子間摩擦を低減でき、気中での分散性は不規則な形や針状粒子と比較し、良好である。これは粒子間で接する面積が減少し、分散し易くなるためである⁹¹。これらの結果より、PVA-205 の最適な濃度は 0.5%w/v である。0.5%w/v が最適な濃度である理由は、粒子調製時の濃度が粒子径に及ぼす影響はほとんどないが、0.5%w/v にて球状の 2 次粒子を形成することによると考える。

2.3.4. Andersen cascade impactor による *in vitro* 吸入特性評価

Twin impinger を用いた評価より、0.5%w/v PVA-205 及び 1.0%w/v HPC-L を用い調製した粒子は高い *in vitro* 吸入特性を示した。Figure 15 にそれら 2 つのサンプルについて、Andersen cascade impactor を用いた評価結果を示す。各サンプルは twin impinger を用いた評価結果と同様、高い ED と FPF を示した。0.5%w/v PVA-205 及び 1.0%w/v HPC-L にて調製したサンプルの ED は各々、 $92.6 \pm 4.1\%$ と $92.2 \pm 3.9\%$ であり、FPF は各々、 $25.5 \pm 2.7\%$ と $20.6 \pm 0.5\%$ であった (Table 5)。各サンプルの各フラクションへの分布割合に大きな差はなく、大部分が Andersen cascade impactor の stage 0~3 に沈着した。Andersen cascade impactor の各ステージに分布したサンプルについて、SEM による粒子外観を観察したところ、吸入した粒子の 10%は吸入時に分散せず stage 0 に沈着し、その粒子は 50 μm 以上の凝集体であった。Stage 1~4 に沈着したサンプルは 10~数 μm の凝集体であった。stage 5 に沈着したサンプルは約 1 μm であり、1 次粒子であった。

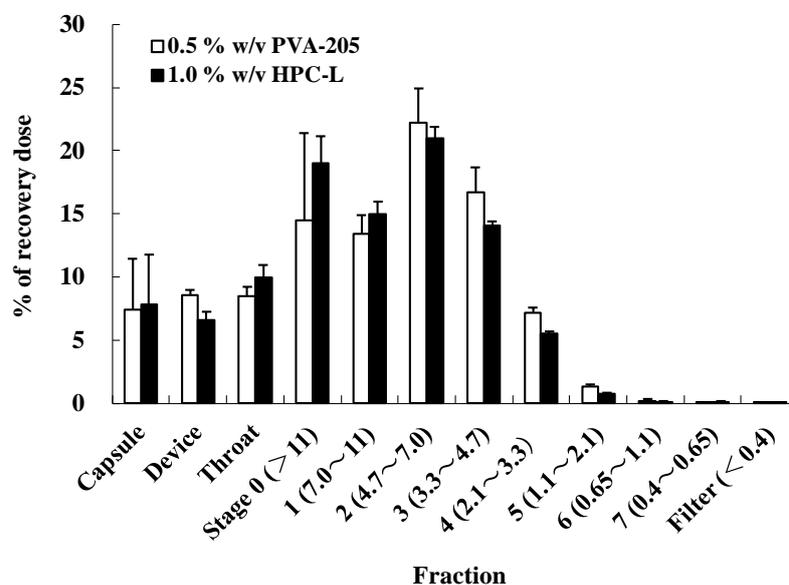


Figure 15. *In vitro* inhalation properties of freeze-dried powders determined by an Andersen cascade impactor for ONO-2921 processed with either 0.5% w/v PVA-205 or 1.0% w/v HPC-L solutions (mean \pm SD, $n=3$).

Table 5. ED and FPF determined using an Andersen cascade impactor for freeze-dried powders of ONO-2921 processed with either 0.5% w/v PVA-205 or 1.0% w/v HPC-L solutions (mean \pm SD, $n=3$).

Additives	ED (%)	FPF (%)
0.5% PVA-205	92.6 \pm 4.1	25.5 \pm 2.7
1.0% HPC-L	92.2 \pm 3.9	20.6 \pm 0.5

2.3.5. 粒子形成のメカニズム

水中溶媒拡散法による微粒子設計は PLGA などのポリマーを用いたものが一般的であり^{63,64,92}、水中溶媒拡散法による DPI 用の薬物粒子の設計はこれまでにほとんど報告がない。前述の報告において、ポリマー粒子は通常、球状の粒子が得られている。一方、ONO-2921 の 1 次粒子は針状粒子であった (Figure 14 (b))。Figure 16 に水中溶媒拡散法による ONO-2921 微粒子形成の模式図を示す。

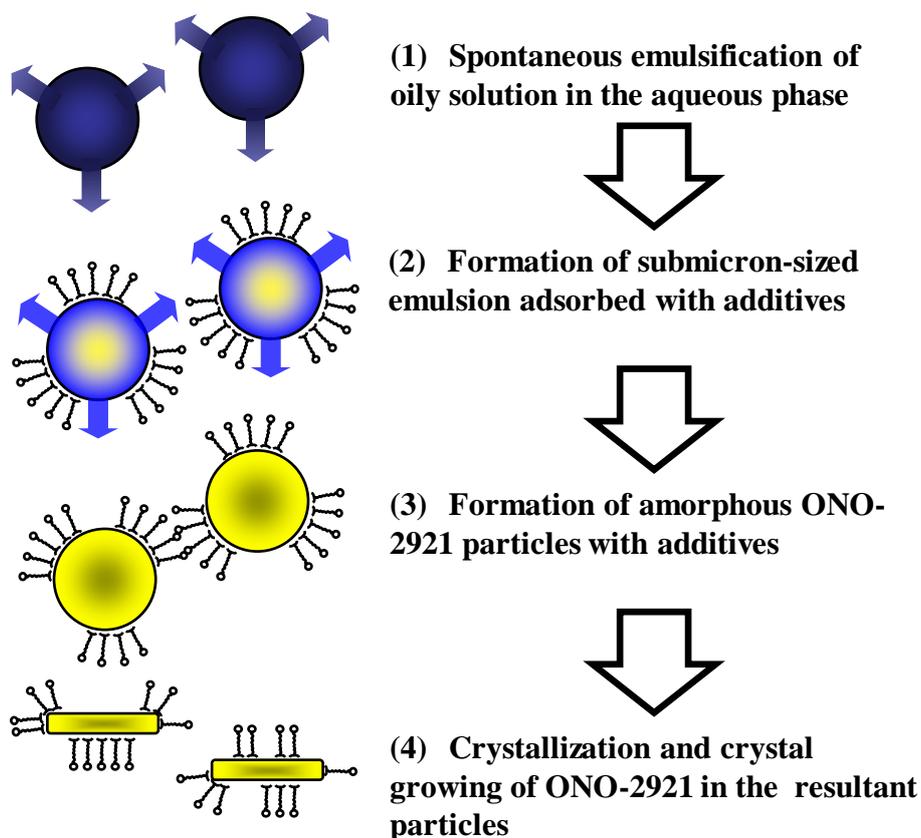


Figure 16. Schematic representation of the formation of ONO-2921 fine particles in aqueous media prepared using the ESD method. (1) Spontaneous emulsification of oily solution in the aqueous phase, (2) formation of submicron-sized emulsion adsorbed with additives, (3) formation of amorphous ONO-2921 particles with additives, (4) crystallization and crystal growing of ONO-2921 in the resultant particles.

ONO-2921 が初めに非晶質体 (Figure 16 (3)) となり, その後, ONO-2921 の結晶化及び結晶成長 (Figure 16 (4)) が起こっていることを確認するため, 次に記載するサンプルの結晶性を評価した. (a) 添加剤を加えず水中溶媒拡散法により粒子が形成された直後に凍結乾燥したサンプル, (b) 添加剤を加えず水中溶媒拡散法により粒子を調製し, 遠心分離と再分散を 2 回実施 (通常の粒子調製のプロセス) し, 凍結乾燥したサンプル, (c) ONO-2921 原末. Figure 17 に前述の (a) ~ (c) のサンプルの DSC プロファイルを示す. Figure 18 に前述の (a) ~ (c) のサンプルの PXRD パターンを示す. サンプル (a) は 70°C 付近に発熱ピークを示し (Figure 17 (a), 点線部), ONO-2921 の非晶質体形成は確認された. 一方, サンプル (b) は発熱ピークを示さず, ONO-2921 粒子は結晶で構成されてい

ることが確認された (Figure 17 (b)). 結晶化度について, サンプル (a) は 7.7% (Figure 18 (a)), サンプル (b) は 41.1% (Figure 18 (b)), サンプル (c) は 75.8% (Figure 18 (c)) であった. これらの結果より, Figure 16 に示した通り, 水中溶媒拡散法による ONO-2921 粒子は非晶質体を経て結晶化していると推察された.

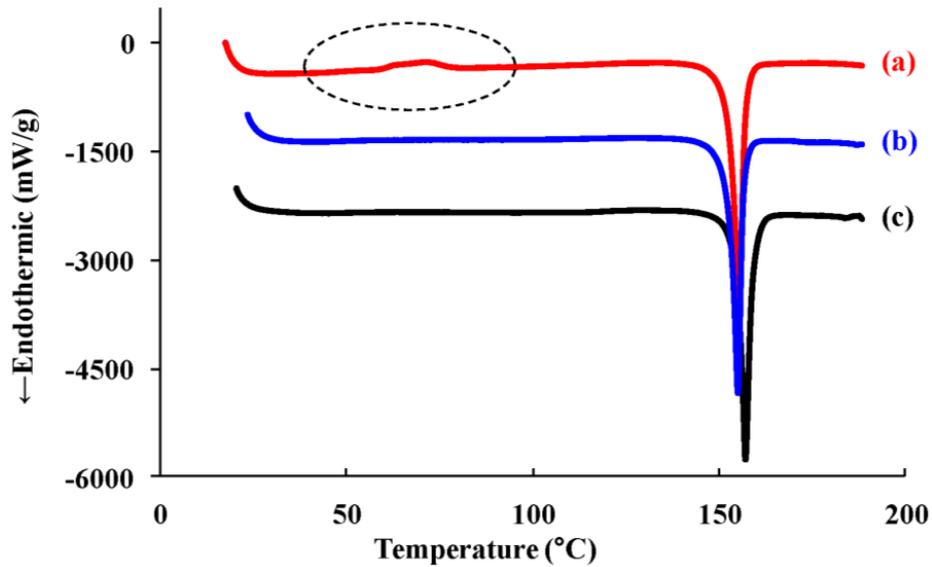


Figure 17. DSC profiles of ONO-2921 (a) freeze-dried immediately after ESD processing without additives, (b) freeze-dried after the suspension was centrifuged and resuspended twice following ESD processing in the absence of additives and (c) raw ONO-2921.

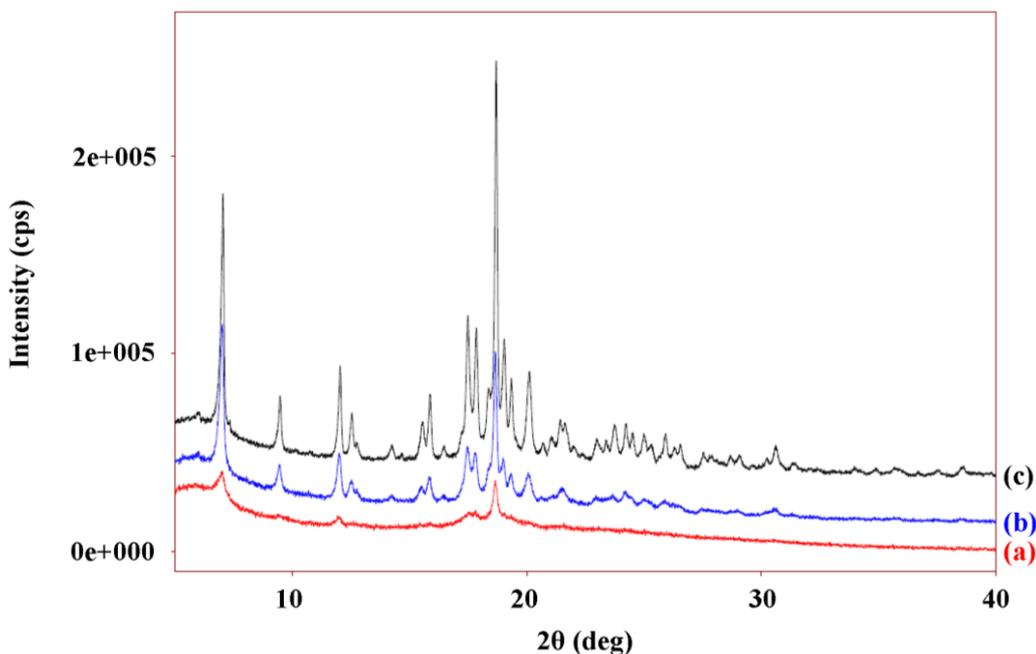


Figure 18. PXRD patterns of ONO-2921 (a) freeze-dried immediately after ESD processing without additives, (b) freeze-dried after the suspension was centrifuged and resuspended twice following ESD processing in the absence of additives and (c) raw ONO-2921.

ONO-2921 原末は 158°Cにて鋭い吸熱ピークを示し、融点と一致し (Figure 17 (c)), サンプル (a) と (b) も同じ融点であった。サンプル (a), (b), (c) 間における PXRD パターンの差は認められず、水中溶媒拡散法により得られた粒子の多形転移は起こっていなかった。その他の凍結乾燥後のサンプル (例えば PVA-205 や Pluronic F-88 を用いて調製したもの) についても、DSC の結果より発熱ピークを示さず、ONO-2921 原末と同じ融点を示した。これより、ONO-2921 原末と水中溶媒拡散法にて調製したサンプル間で多形転移は起こっていなかった。

水中溶媒拡散法により、吸入用の ONO-2921 粒子の設計を実施した。エタノールを良溶媒として用い、ONO-2921 と結晶形の変化がない主に ONO-2921 から構成される粒子を得ることができた。

2.4. 結論

水中溶媒拡散法により、大部分の条件にて薬物含有率が 80%以上である吸入用の ONO-2921 粒子を得ることができた。凍結乾燥後のサンプルの気中分散時の粒子径は ONO-2921 原末と比較し大きかったが、それらのサンプルの *in vitro* 吸入特性は ONO-2921

原末と比較し良好な結果を示した。特に、0.5%w/v PVA-205 を用い調製したサンプルは最も良好な *in vitro* 吸入特性を示した。水中溶媒拡散法による微粒子形成のメカニズムは ONO-2921 エタノール溶液を添加剤が存在する水溶液中に滴下すると、ONO-2921 のエマルションが形成され、ONO-2921 の非晶質体を経て、結晶粒子が形成されていた。DPI として大量の API を肺に送達する場合、水中溶媒拡散法による API 粒子の調製は高い薬物含有率と *in vitro* 吸入特性のため、有用な方法である。

第3章

インドメタシンのナノ粒子設計を 目指した新規超臨界流体法の構築

3.1. 序論

近年、超臨界流体を用い、晶析法により医薬品化合物の微粒子を得る方法が注目されてきている。特に scCO₂ を用い、マイクロ粒子またはナノ粒子を調製する研究が盛んに行われている⁹³。scCO₂ を用いた晶析法は2通りに大別され、scCO₂ を薬物の良溶媒として用いる方法と貧溶媒として用いる方法がある。薬物の scCO₂ への溶解度が低いことから⁹⁴、scCO₂ を貧溶媒として用いる研究成果が多く報告されている。具体的には gas antisolvent technique (GAS) 法⁹⁵⁻⁹⁷、SAS 法⁹⁸、aerosol solvent extraction system technique (ASES) 法⁹⁹、SEDS 法^{40,100,101} が挙げられる。貧溶媒法は多くの化合物に適用できるが、プロセスのスケールアップが困難である²⁸。

良溶媒法として薬物微粒子を調製する場合、RESS 法が汎用される^{102,103} が、RESS 法は調製後の微粒子の回収が困難といった課題を有する。この問題を克服する方法として、化合物を含む scCO₂ を水中に噴霧する方法 (RESAS 法)⁴⁷ がある。しかし、RESS 法を用い、医薬品化合物のナノ粒子を得ることは依然として困難である。

SAS 法と RESAS 法を組み合わせ、新規の粒子調製システムを構築したことを第3章では報告する。SAS 法と RESAS 法を組み合わせた理由は薬物の scCO₂ への溶解度の低さを改善するためである。本システムの特徴はナノ粒子を連続的に製造できることであり、スケールアップが不要である。本章の目的は前述のシステムを適用し、難水溶性薬物のナノ粒子を調製することである。難水溶性のモデル薬物として、第1章でも用いた IMC を用いた。得られた懸濁液は凍結乾燥法により粉末化され、物理化学的性質を評価した。以下に得られた知見を詳述する。

3.2. 試料ならびに実験方法

3.2.1. 試料

難水溶性のモデル薬物である IMC は大日本住友製薬株式会社に提供頂いた。粒子径測

定時の粒子の分散安定化剤として用いた PVA (PVA-403, 重合度=300, 鹼化度=80.0%) は株式会社クラレから入手した。

3.2.2. IMC ナノ粒子の調製

Figure 19 に IMC 懸濁液調製の装置の概略を示す。本装置は反応容器 (pressure vessel) と晶析ユニット (sample collection vessel) から構成され、反応容器までが SAS 法、以降が RESAS 法を基本としたシステムである。CO₂ ポンプ (最大流量 20 mL/min), 薬物溶液ポンプ (最大流量 10 mL/min), 反応容器 (50 mL), 圧力制御弁 (back pressure regulator) で構成される。

初めに液体 CO₂ を調温条件下, 反応容器に導入する。反応容器が目標圧力に到達した後, IMC 溶液 (20 mg/mL) と CO₂ の両方を 2 流体ノズルを介して反応容器に放出させる (外側ノズル: 外径 1/16 in., 内径 0.8 mm のステンレス管 (日本分光株式会社); 内側ノズル: 外径 0.25 mm., 内径 0.25 μm のキャピラリー管 (アジレント・テクノロジー株式会社))。Figure 19 (B) に 2 流体ノズルの概略を示す。

反応容器に IMC エタノール溶液と CO₂ を放出させた直後, 反応容器から back pressure regulator を介して 30 mL の蒸留水中に IMC とエタノールを分散させた CO₂ を噴霧する。本システムの耐圧は 25 MPa, 反応容器の温度は 25~80°C の範囲で調節可能である。

IMC とエタノールが分散した CO₂ を全て噴霧した後, 得られた懸濁液は超音波処理により分散させ, 凍結乾燥した (詳細は 1.2.2. IMC ナノ粒子の調製を参照)。

1 回当たりの IMC の仕込量は 200 mg とした (20 mg/mL の IMC エタノール溶液として 10 mL)。エタノール溶液の量を増加し, 粒子の調製量を増加させることは可能である。

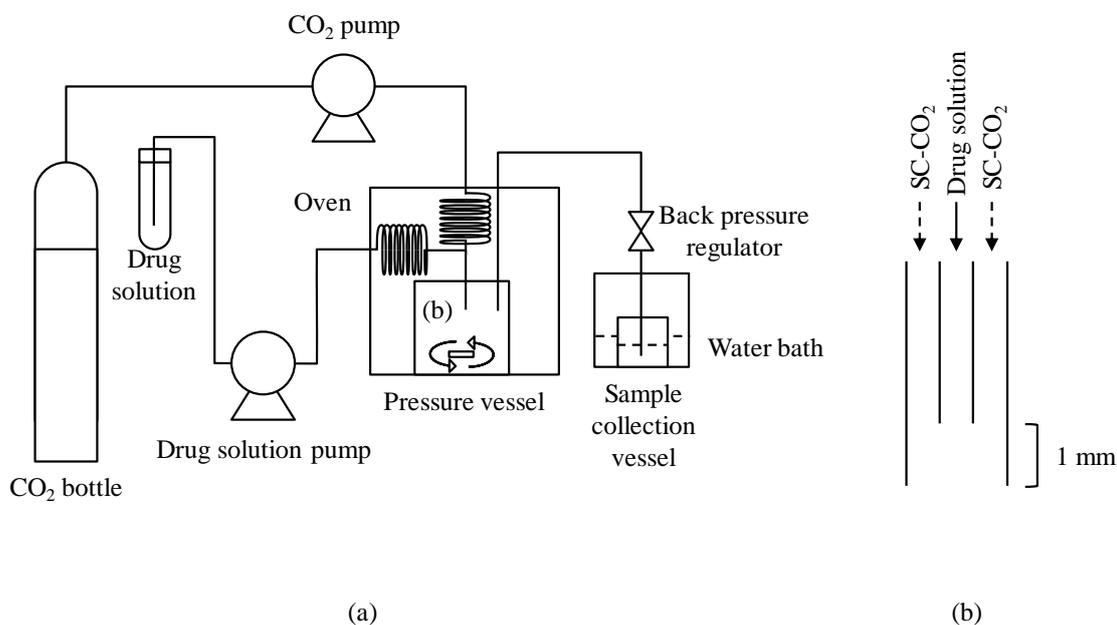


Figure 19. Schematic diagram of the apparatus for the novel processing using supercritical carbon dioxide (scCO₂).

3.2.3. 粒子径, 粒子径分布

懸濁液中の IMC 粒子（凍結乾燥前の懸濁液, 凍結乾燥後のサンプルを再分散させた懸濁液）の粒子径分布は動的光散乱法にて FPAR-1000（大塚電子株式会社）を用い測定した。

3.2.4. 収率測定

IMC の定量試験法は 1.2.4. IMC ナノ粒子の収率測定を参照。

収率について, 得られた粉末量を仕込んだ IMC 量で割り, IMC 粒子の収率とした。

3.2.5. 電子顕微鏡

1.2.5. 電子顕微鏡を参照。

3.2.6. 粉末 X 線回折

2θ の範囲は 5~30°にて測定を行った。その他の条件は 1.2.6. 粉末 X 線回折を参照。

3.2.7. 示差走査熱量測定

1.2.7. 示差走査熱量測定を参照.

3.2.8. 溶出試験

1.2.8. 溶出試験を参照. なお, サンプルの投入量は 20 mg, パドルの回転数は 50 rpm とした.

3.3. 結果・考察

3.3.1. combinational scCO₂ 法によるナノ粒子調製

10 MPa 以下に保った scCO₂ 中に薬物溶液を送液すると, scCO₂ が貧溶媒として作用し IMC 結晶が析出した^{40,100,101}. scCO₂ (反応容器) 中で IMC のマイクロサイズの結晶が得られたため, back pressure regulator 側からナノ粒子は得られなかった. 一方, scCO₂ の圧力を 15 MPa 以上に保った場合, scCO₂ 中に析出した IMC 結晶は僅かであった. これは, 反応容器に付属するサファイアガラス越しに scCO₂ の密度ゆらぎを確認でき, IMC とエタノールは scCO₂ 中に分散していたためと考えられる. 一方, scCO₂ の圧力を 15 MPa 以上に保った場合においても, IMC エタノール溶液を scCO₂ 中で数分間保存した場合, scCO₂ 中で IMC 結晶が析出した. これより, IMC 分子が scCO₂ 中で均一に分散し溶解しているのではなく, 微小の IMC が溶解したエタノールの液滴が scCO₂ 中で分散し, その状態は比較的不安定であると考えられる.

scCO₂ の圧力を 15 MPa 以上に保ち, back pressure regulator を介し IMC とエタノールを含有する scCO₂ を蒸留水中に噴霧すると, IMC 微粒子を含む懸濁液が得られた. 得られた懸濁液は医薬品としての応用を考慮し, 粉末化するため凍結乾燥した. Figure 20 に凍結乾燥前後の粒子径分布の結果を示す. 凍結乾燥後のサンプルを蒸留水中に懸濁させたところ, 粒子径分布は 2 つのピークから成り, 1 つはナノ粒子による 300~600 nm のピーク, もう 1 つは数 μm のピークであった. 2 つのピークを示したサンプルについて, 1.0% w/v の PVA 溶液にサンプルを分散させるとナノサイズの単一ピークの粒子径分布を示した (Figure 20 (c)). 本現象より, 粒子径分布中のマイクロ粒子はナノ粒子の凝集体であると考えられる.

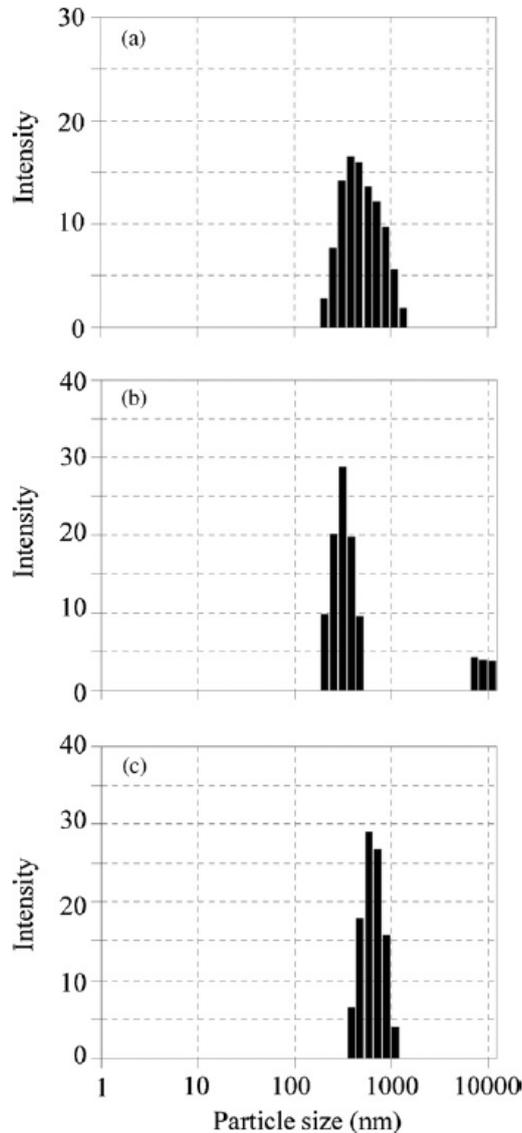


Figure 20. Particles size distribution IMC suspension: (a) scCO₂ processed IMC suspension at 25 MPa·40 °C prior to freeze-drying; (b) freeze-dried sample of (a) was dispersed in distilled water; (c) freeze-dried sample of (a) was dispersed in 1.0% PVA-403 solution.

Figure 21, Table 6 に凍結乾燥後のサンプルの収率と再分散させた平均粒子径を示す. scCO₂の温度を40°Cに制御した場合, scCO₂の圧力が高いほど, 平均粒子径は小さかった. scCO₂の圧力を10 MPaに保ちサンプルを調製すると, IMC粒子の収率は1.6%と低く, 大部分のIMCはscCO₂中に析出した. 一方, scCO₂の圧力を15~25 MPaに制御した場合, back pressure regulator側からIMC微粒子が得られた. Figure 22にscCO₂の温度を80°Cに上げた場合の凍結乾燥後のサンプルの収率及び平均粒子径の変化を示す. scCO₂の温度を

上げると、平均粒子径は増加し、RESS 法による結果と類似していた。

RESS 法は、scCO₂を放出するノズルを介し大気圧下に噴霧される間冷却され、均一な核生成と粒子成長を伴う過飽和を示すことが報告されている。さらに、圧力、温度、ノズル形状、ノズル径など様々なパラメータが製品品質に影響しうる¹⁰⁴。本装置で得られた最小の粒子径を有する粒子が得られる scCO₂ 条件は 25 MPa・40℃であった。IMC 粒子の収率は圧力を高くするほど、収率が高くなった (Figure 21, Figure 22)。しかし、その収率は約 50%と比較的低い。これは 1 回当たりの IMC の仕込み量が 200 mg のためと考えられる。IMC 粒子を連続的に調製した場合、収率は高くなった。例えば、IMC を通常の 4 倍である 800 mg 仕込み、調製時間を 4 倍に延長した場合、IMC 粒子の収率は 76.7 ± 5.2% であり、本装置は IMC 微粒子を高収率で製造可能と考える。RESS 法を用い安息香酸の粒子を調製した場合、噴霧前の scCO₂ の圧力及び温度と得られる粒子の粒子径の間で相関関係が存在する。scCO₂ の圧力を高めると粒子径は減少し、温度を上げると粒子径は増大した¹⁰⁵。この結果は Figure 21 及び Figure 22 に示す粒子径の結果と一致した。

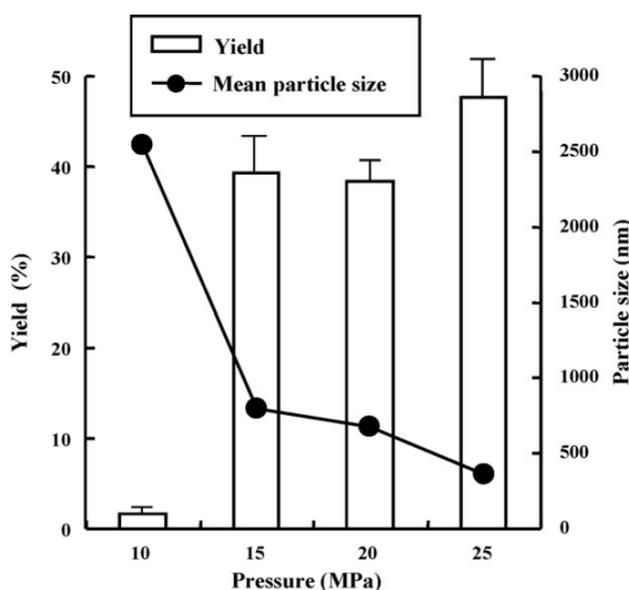


Figure 21. Changes in the particle size and yield of IMC particle when the after freeze-dried sample of IMC suspension was dispersed into distilled water: scCO₂ processing was performed under various CO₂ pressures in the vessel (temperature: 40 °C).

Table 6. Effect of scCO₂ conditions on the particle properties of freeze-dried samples.

Pressure (MPa)	Temperature (°C)	Yield (%)	Mean particle size (nm)
10	40	1.6	2540.9
15	40	39.3	799.9
20	40	38.3	674.2
25	40	47.7	354.9
25	60	31.7	718.3
25	80	26.7	799.4

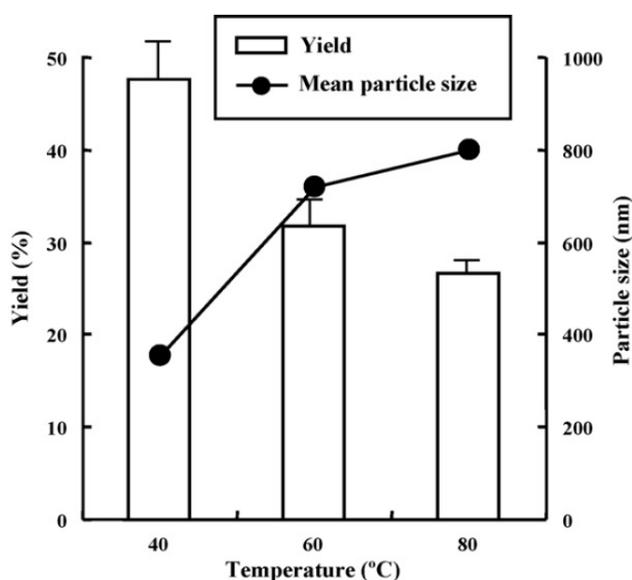


Figure 22. Changes in the particle size and yield of IMC particle when the after freeze-dried sample of IMC suspension was dispersed into distilled water: scCO₂ processing was performed under various temperatures in the vessel (pressure: 25 MPa).

3.3.2. IMC 粒子の評価

IMC 原末, 凍結乾燥後のサンプルについて, SEM を用い粒子径や形状の観察を行った。Figure 23 にその SEM 画像を示す。IMC 原末は比較的粒子径分布の広い, 不規則な形状の粒子であり, 平均粒子径は数 μm であった。10 MPa \cdot 40°C の scCO₂ 条件にて調製した IMC 粒子は棒状結晶であった (Figure 23 (B))。一方, 高压の scCO₂ 条件にて調製した IMC 粒子はナノサイズの球形粒子と棒状粒子の混合物であった (Figure 23 (C))。25 MPa \cdot 40°C の scCO₂ 条件にて調製した IMC 粒子は大部分が球形であった (Figure 23 (D))。

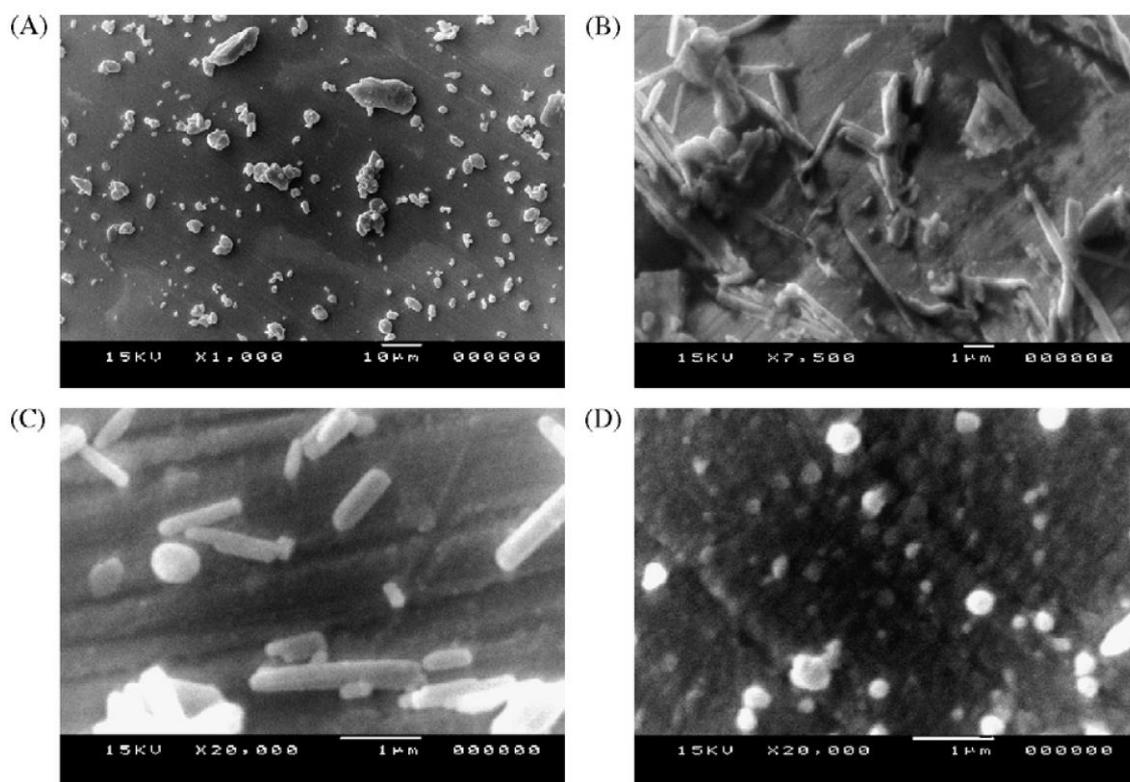


Figure 23. SEM images of IMC after freeze-dried samples of scCO₂ processed suspension under various CO₂ pressures in the vessel (temperature: 40 °C). (A) Unprocessed IMC, (B) scCO₂ processing at 10 MPa·40 °C, (C) scCO₂ processing at 20 MPa·40 °C, and (D) scCO₂ processing at 25 MPa·40 °C.

高圧の scCO₂ 条件にて調製した懸濁液を凍結乾燥したサンプル中には球形のナノ粒子が含まれていた (Figure 23 (C), (D)). そこで、PXRD と DSC による結晶性を評価した。Figure 24 に IMC 原末、凍結乾燥後のサンプルの PXRD パターンを示す。IMC 原末は $2\theta = 11.7^\circ, 17.0^\circ, 19.8^\circ, 22.0^\circ, 26.8^\circ$ に回折ピークを示し、IMC の安定晶である γ -form のピークと一致した。10 MPa·40°C の scCO₂ 条件にて調製したサンプルは $2\theta = 8.3^\circ, 11.8^\circ, 14.4^\circ, 18.0^\circ, 22.0^\circ$ に回折ピークを示している。これは IMC の準安定晶である α -form のピークと一致した⁶⁸。25 MPa·40°C の scCO₂ 条件にて調製したサンプルは α -、 γ -form と異なる回折パターンを示している。大部分の回折ピークは IMC の準安定晶である α -form と一致した。Figure 24 にて矢印を付けた様に、いくつかの回折ピークは既知の IMC 結晶と異なる結晶形の回折ピークを含んでいる¹⁰⁶。25 MPa·40°C の scCO₂ 条件にて調製したサ

ンプルは α -form と他の結晶形の混合物であると考察する.

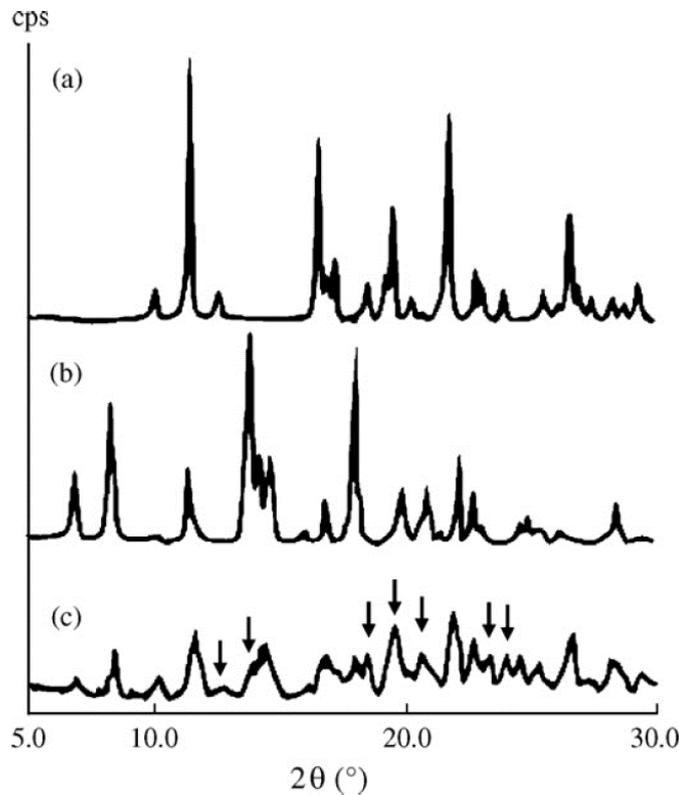


Figure 24. PXR D patterns of IMC powder: (a) unprocessed IMC (γ -form), (b) scCO_2 processing at 10 MPa·40 °C, and (c) scCO_2 processing at 25 MPa·40 °C.

Figure 25 に各サンプルの DSC プロファイルを示す. PXR D から予想された様に, IMC 原末は安定晶である γ -form の融点である 160°C において鋭い吸熱ピークを示した. 10 MPa·40°C の scCO_2 条件にて調製したサンプルの融点ピークは 157°C に認められ, それは準安定晶である α -form の融点と一致する. 一方, 25 MPa·40°C の scCO_2 条件にて調製したサンプルは 148°C 付近に小さな吸熱ピークと発熱ピークを連続して示し, 157°C の融点ピークと重なっている. γ -form と α -form は結晶転移を示すことが報告されている¹⁰⁷. 明確な根拠は得られていないが, DSC プロファイルの結晶の多形転移より γ -form と α -form 以外の結晶形が存在すると推察する. 25 MPa·40°C の scCO_2 条件にて調製したサンプル中に新しい結晶形が存在する場合, この結晶形は enantiotropic 転移を示していると考え (Figure 25 (B)). enantiotropic 転移は Grunenber g らにより報告されており, 液体や気体を経ずに可逆的に結晶形が転移することと定義されている¹⁰⁸. PXR D と DSC の結果より, 25

MPa·40°Cの scCO₂ 条件にて調製したサンプルは非晶質， α -form，高温で α -form に転移する enantiotropic-form の混合物であると考察される．DSC の結果について，151°Cでの吸熱ピークは α -， β -， γ -form いずれの結晶形においても認められていないことから¹⁰⁶，151°Cの吸熱ピークはIMCの既知以外の結晶形か非晶質体から α -form への結晶化と推察する．IMCの新しい結晶多形の報告は少なく，scCO₂を用いた本粒子調製法により，IMCの新しい結晶多形を調製できる可能性があると考えられる．

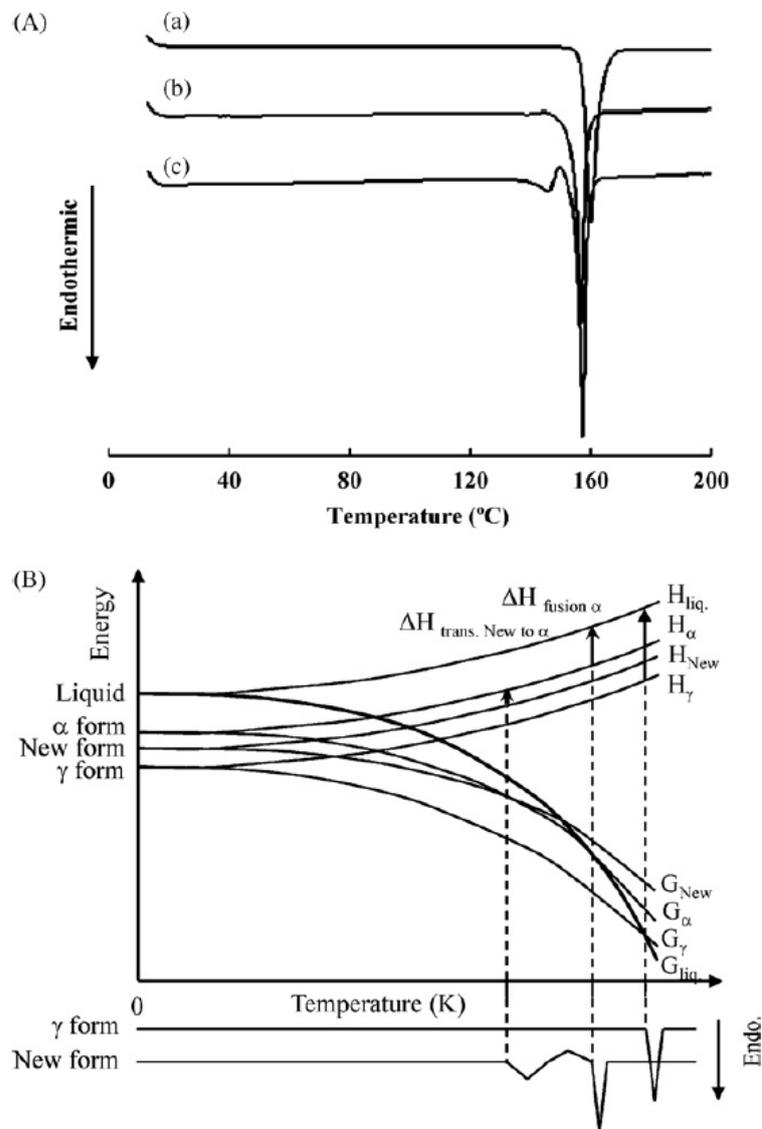


Figure 25. DSC profiles (A) of IMC powder: (a) unprocessed IMC (γ -form), (b) scCO₂ processing at 10 MPa·40 °C, (c) scCO₂ processing at 25 MPa·40 °C, and (B) schematic energy-temperature diagram of the sample processing at 25 MPa·40 °C.

3.3.3. IMC 粒子の溶出プロファイル

Figure 26 に IMC 原末, 凍結乾燥後のサンプルの溶出プロファイルを示す. IMC 原末について, 溶出速度は遅く, 60 分の時点で約 60% の溶出率であった. 凍結乾燥後のサンプルについて, 試験開始後 3 分の時点で 90% 以上が溶出し, 10 分にて 100% の溶出率を示した. 第 1 章で報告したが, IMC の著しい溶出性の増大は粒子径がナノサイズまで減少し, 有効比表面積が顕著に増大したためと, 高い溶出性を有する準安定晶へ結晶形が多形転移したためであると考えられる.

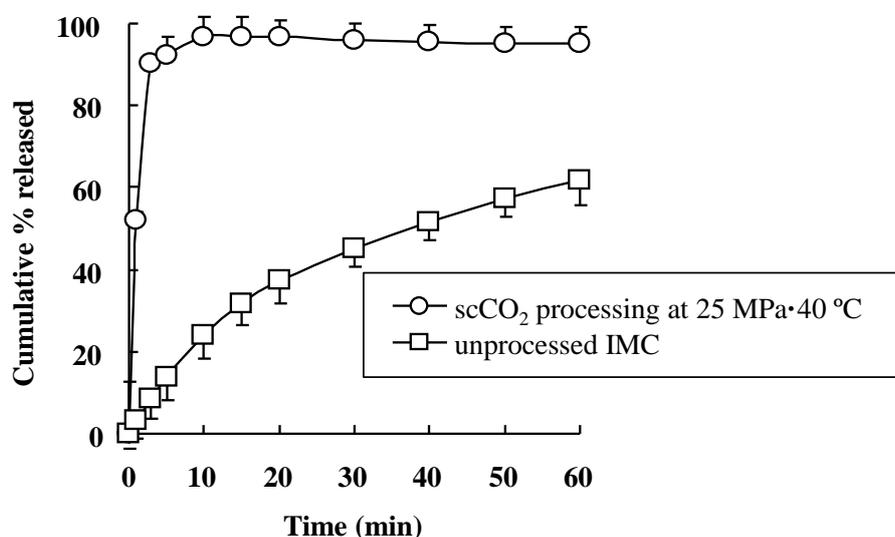


Figure 26. Dissolution profiles of (□) unprocessed IMC powder and (○) freeze-dried sample of scCO₂ processed IMC at 25 MPa·40 °C ($n=3$).

25 MPa·40°C の条件にて調製した粒子について, 外観は球状のナノ粒子であった (Figure 23). このサンプルの PXRD パターンは 10 MPa·40°C の条件にて調製した粒子 (α -form) と一部異なるピークを示した. IMC の結晶性の低下は back pressure regulator から高圧の scCO₂ が噴霧され, IMC の非晶質体生成によるためと考えられる. 非晶質体は IMC 結晶のナノ化と同様, 溶出プロファイル改善に寄与していると考えられる.

3.4. 結論

scCO₂ の SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational scCO₂ 法は IMC 粒子の連続調製に成功した. RESS 法における医薬品化合物の scCO₂ への溶解度の低さを克服し,

粒子を連続的に調製可能にしたことが本研究の利点である。本方法を用い、ナノサイズの IMC の球状粒子を調製することができた。さらに本方法は複雑で高額な粒子捕集装置を必要としない。本研究は医薬品化合物のナノ粒子を調製でき、scCO₂を用い、コスト効率の高い方法を提案可能である。

第 4 章

超臨界流体法を適用した ONO-2921 の

吸入製剤用微粒子の設計

4.1. 序論

医薬品化合物のナノ粒子を調製する技術は break-down 法と bottom-up 法の 2 つに大別される^{5,6}。break-down 法を応用した特許や製品は多く存在する。一例に、Emend[®]は Elan 社のビーズミルを用いた湿式粉碎を応用し、ナノ粒子化により製品化されている¹⁰⁹。一方、bottom-up 法を応用した製品は少ない¹¹⁰⁻¹¹²。しかし、bottom-up 法は break-down 法と比べ、必要なエネルギー量が少ないこと、break-down 法で使用されるものに比べ、コストが安い^{11,113}ため、近年、注目を集めている。

環境負荷の優しい溶媒として超臨界流体が注目されている。CO₂は他の物質と比べ、低圧低温（7.4 MPa・31.2℃）で超臨界状態となるため、汎用性に優れる。粒子調製の技術において、scCO₂は晶析の良溶媒または貧溶媒として用いられる。scCO₂を良溶媒として用いる方法は RESS 法²¹や RESAS 法⁴⁷が挙げられ、貧溶媒として用いる方法は SAS 法や SEDS 法²²⁻²⁴が挙げられる。

第 4 章では、第 3 章で確立した SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational scCO₂法を用い、モデル薬物には ONO-2921 を用い、微粒子を調製した。得られた微粒子は DPI に応用することを試みた。これは、近年、医薬品の開発ステージに上がってくる候補化合物に関して、難水溶性で BA が低いものが増加しており、経口投与において十分な血中薬物濃度が得られない場合、肺から薬物を吸収させることが選択肢の 1 つとして考えられるためである。第 2 章で報告したアプローチと大きく異なる点として、本章においては添加剤を全く用いない点である。以下に得られた知見を詳述する。

4.2. 試料ならびに実験方法

4.2.1. 試料

難水溶性のモデル薬物である ONO-2921 (tert-butyl(4R)-4-[[[(1R)-2-[(1-benzylpiperidin-4-yl)amino]-1-[[cyclohexylmethyl]thio]methyl]-2-oxoethyl)amino]carbonyl]-1,3-thiazolidine-3-carboxylate) は小野薬品工業株式会社に提供頂いた。ONO-2921 の物理化学的性質と構造式は Table 2 を参照。粒子径測定時の粒子の分散安定化剤として用いた、PVA (PVA-403, 重合度=300, 鹸化度=80.0%) は株式会社クラレから入手した。

4.2.2. ONO-2921 粒子の調製

ONO-2921 懸濁液は第 3 章で確立した SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational scCO₂ 法を用いた (Figure 19 を参照)。1 回当たりの ONO-2921 の仕込量は 200 mg とした (40 mg/mL の ONO-2921 エタノール溶液として 5 mL)。その他の操作条件は 3.2.2. IMC ナノ粒子の調製を参照。

4.2.3. 粒子径, 粒子径分布

凍結乾燥後のサンプルは LDSA-2400A を用い, 気中分散時の粒子径をレーザー回折法にて測定した。また FPAR-1000 を用い, 懸濁液中の粒子径を動的光散乱法にて測定した。

4.2.4. 電子顕微鏡

2.2.4. 電子顕微鏡を参照。

4.2.5. 示差走査熱量測定

2.2.5. 示差走査熱量測定を参照。

4.2.6. *In vitro* 吸入特性

In vitro 吸入特性の評価は twin impinger を用い, 吸入デバイスには Spinhaler[®]を用いた。また, Andersen cascade impactor (東京ダイレック株式会社及び Copley Scientific) を用い, 吸入デバイスには Spinhaler[®]及び Monohaler[®] (RPC Bramlage GmbH) を用いた。その他の操作条件は 2.2.7. *In vitro* 吸入特性を参照。

4.2.6.1. Twin impinger

2.2.7.1. Twin impinger を参照.

4.2.6.2. Andersen cascade impactor

Andersen cascade impactor の評価は throat, stage 0~7, filter (東京ダイレック株式会社) または throat, preseparator, stage -1~6, filter (Copley Scientific) を用いた. 吸入の流量は 28.3 L/min または 60.0 L/min に設定した. *In vitro* 吸入特性の結果は ED と FPF で評価した. ED は capsule に充填された ONO-2921 に対する capsule から放出された ONO-2921 の割合で示した. FPF は ONO-2921 の stage 3 以降の到達割合 (吸入流量: 28.3 L/min) または stage 2 以降の到達割合 (吸入流量: 60.0 L/min) として示した (空気力学的粒子径は 4.7 μm 以下である)^{80,81}. その他の操作条件は 2.2.7.2. Andersen cascade impactor を参照.

4.2.7. HPLC 分析

2.2.8. HPLC 分析を参照.

4.3. 結果・考察

4.3.1. combinational scCO₂ 法による粒子調製

第 3 章で報告したが, scCO₂ 中に薬物溶液を送液すると, scCO₂ が貧溶媒として作用し薬物結晶が析出する^{23,40}. Figure 27 に示す通り, scCO₂ が 15 MPa・40°C または 20 MPa・60~80°C 条件において scCO₂ 中で ONO-2921 は析出しなかった. 反応容器の圧力を 10 MPa 以下に保った場合, 反応容器にて ONO-2921 結晶が析出した. 一方, 圧力を 15 MPa 以上に保った場合, ONO-2921 結晶は反応容器中ではほとんど析出しなかった. これは高圧低温の条件ほど, scCO₂ の密度が増大し, ONO-2921 の scCO₂ への溶解度が増大するためと考えられる.

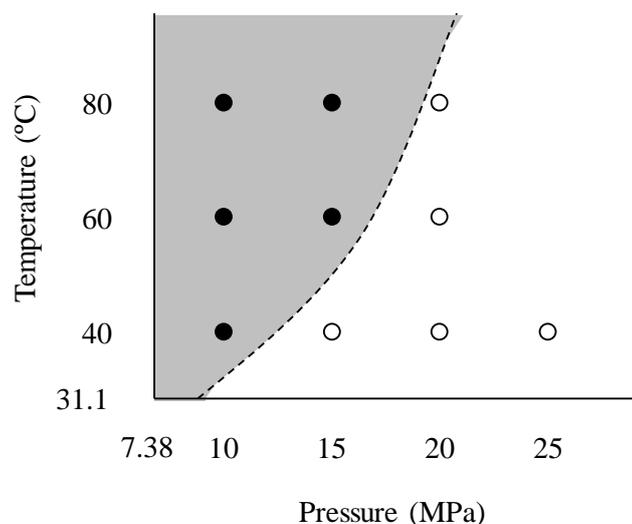


Figure 27. Schematic representation of ONO-2921 precipitated or not precipitated in the reaction vessel filled with CO₂ above the critical point. Gray zone: predicted ONO-2921 precipitation; white zone: predicted nonprecipitation conditions; ●: precipitation observed; ○: precipitation not observed.

CO₂は臨界点 (7.4 MPa・31.1°C) 以上において超臨界流体となるが、純粋な CO₂ の相図は API や溶媒存在下において必ずしも適応されるとは限らない。これは Braeuer の次の報告のためである。CO₂ 以外の物質がほとんど存在しない“CO₂-rich”混合物について、CO₂ の超臨界条件下その混合物は超臨界流体となる。一方、CO₂ 中に溶媒が多く存在する“solvent-rich”混合物について、CO₂ の超臨界条件下であっても、その混合物は溶媒が多く液体となる (超臨界流体にならない) ¹¹⁴。

Figure 27 で示した ONO-2921 が反応容器中で析出しない条件下 (white zone), ONO-2921 は scCO₂ 中で分散または溶解した。20 MPa・40°C 条件において、ONO-2921 の scCO₂ への溶解度は 3.3×10^{-6} mol/mol CO₂ であった。一般的に scCO₂ への溶解度が高いと言われている ibuprofen は scCO₂ への溶解度が 1.1×10^{-4} mol/mol CO₂ と報告されており ¹¹⁵, ONO-2921 は ibuprofen と比較して、scCO₂ への溶解度は低い。scCO₂ への見かけの溶解度を改善する方法の 1 つにエントレーナー (例えばエタノール) を添加する方法がある。Figure 28 (a) に示す通り、エントレーナーは溶質と CO₂ との間で相互作用し、溶解度を向上させる ¹¹⁶。ONO-2921 溶液を scCO₂ 中に送液し、しばらくの間放置した場合、ONO-2921 結晶が scCO₂ 中で析出した。一方、ONO-2921 溶液を scCO₂ 中に送液し、続いて ONO-2921 溶液を含む

scCO₂ を RESAS 装置を介して大気圧下に噴霧すると ONO-2921 微粒子が得られた。これより、ONO-2921 はエタノール存在下、scCO₂ に安定的に溶解しているのではなく、適当なサイズの ONO-2921 エタノール溶液の液滴が不安定な状態で CO₂ に分散していると考えられる (Figure 28 (b))。溶液の小さな液滴が scCO₂ 中に比較的不安定な状態で分散しており、これは第 3 章で報告した現象と類似している。

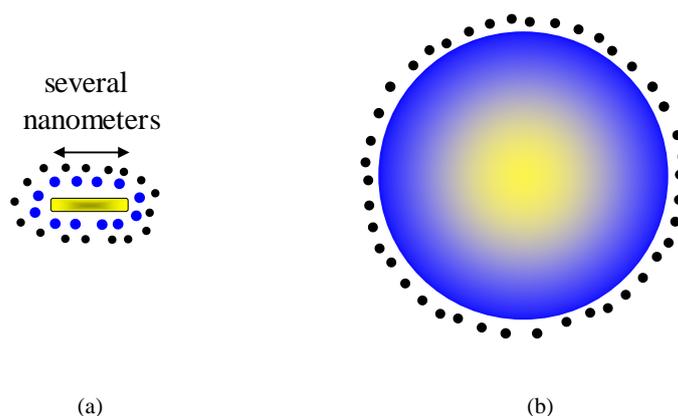


Figure 28. Schematic representation of ONO-2921 dispersion in the reaction vessel (yellow: ONO-2921; blue: ethanol; black dot: CO₂). (a) Dissolution of ONO-2921 in CO₂ with ethanol as an entrainer. (b) Dispersion of ethanolic ONO-2921 solution in CO₂.

4.3.2. 超臨界流体の圧力が粒子に及ぼす影響評価

scCO₂ の圧力を 15 MPa 以上に保ち、ONO-2921 と溶媒が分散する scCO₂ を back pressure regulator を介して蒸留水中に噴霧すると、ONO-2921 微粒子を含む懸濁液が得られた。得られた懸濁液は DPI として応用するため、凍結乾燥し粉末化した。初期検討として異なる有機溶媒を用い、得られる ONO-2921 粒子に及ぼす影響を評価した。溶媒としてメタノールまたはエタノールを用いた場合、収率や粒子径の変化は認められなかった。一方、アセトンを用いた場合、粒子が得られなかった。これは scCO₂ が貧溶媒として作用し、大部分の ONO-2921 が scCO₂ 中に析出したためである。メタノールとエタノールについて、粒子調製において大きな差がなかったため、残留溶媒の観点からエタノールを有機溶媒として選択した。

Figure 29 に ONO-2921 粒子の収率と凍結乾燥後のサンプルを PVA 水溶液中に分散させた粒子径を示す。一定温度条件下、CO₂ の圧力を増大させると収率は増大した。一方、平均粒子径はほとんど変化がなかった。10 MPa 条件下、ONO-2921 粒子はほとんど得るこ

とができなかった。これは大部分の ONO-2921 が scCO₂ 中で析出したためである。一定温度条件下、CO₂ の圧力を増大させると CO₂ の密度が増大し¹¹⁷、ONO-2921 の scCO₂ への溶解度が増大すると考察する。この傾向は過去に報告されている¹¹⁸。更に ONO-2921 の scCO₂ への溶解度が増大するほど、ONO-2921 粒子の収率は増大した。過去の報告より、scCO₂ を良溶媒または貧溶媒として用いたいずれの場合においても scCO₂ を用いた晶析の収率は通常 60~70% であった¹¹⁹⁻¹²¹。しかし、本章における収率は 35% 以下であった。これは ONO-2921 が装置のチューブ、反応容器中、ノズル中に残存したためである。ONO-2921 粒子の収率は 1 回当たりの仕込み量を 4 倍にした場合、第 3 章の結果と同様に改善された。

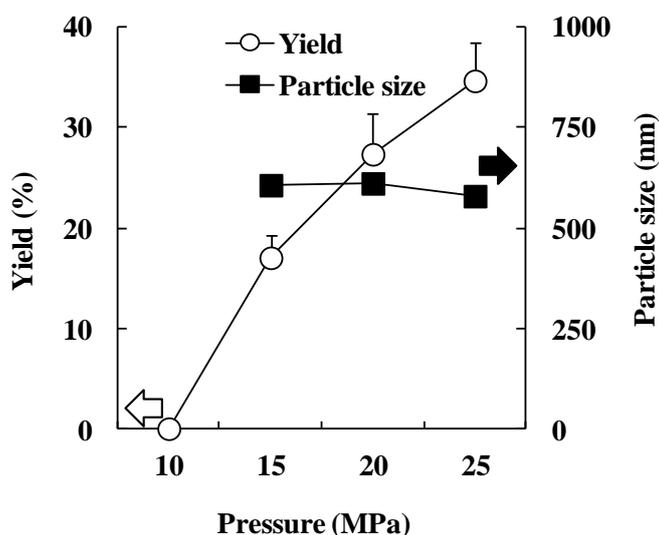


Figure 29. Changes in the yield and size of ONO-2921 particles dispersed in 1% (w/v) polyvinyl alcohol after freeze-drying; scCO₂ processing was performed under various CO₂ pressures in the reaction vessel at 40 °C.

Figure 30 に ONO-2921 原末、凍結乾燥後のサンプルについて、SEM を用い粒子径及び形状の観察を行い、その SEM 画像を示す。ONO-2921 原末は 1 次粒子が密に凝集した球形の凝集体であった (Figure 30 (a))。凍結乾燥後のサンプルもまた球状の 2 次粒子であった (Figure 30 (c)-(e))。1 次粒子を比較した結果、いずれも針状結晶であった (Figure 30 (b), (f))。Figure 31 に ONO-2921 原末と 25 MPa・40°C 条件にて調製した粒子の DSC プロファイ

ルを示した。DSC プロファイルの差は認められず、融点も同じであり、結晶形の転移は起こっていないと推察される。

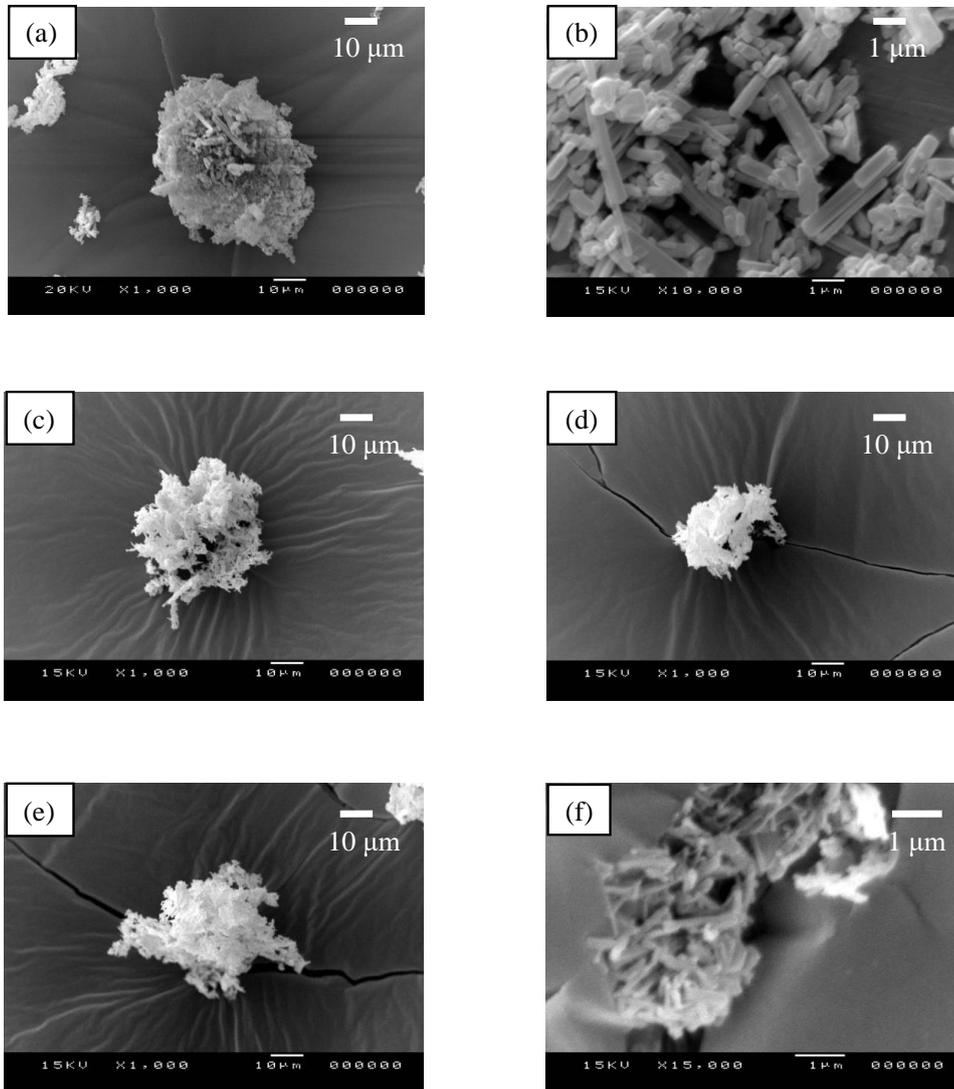


Figure 30. Scanning electron microscopy images of freeze-dried samples under various CO₂ pressures in the reaction vessel at 40 °C. (a) Raw ONO-2921. (b) Raw ONO-2921 at 10,000 × magnification. (c) scCO₂ processing at 15 MPa (c), 20 MPa (d), 25 MPa (e), and 25 MPa at 15,000 × (f).

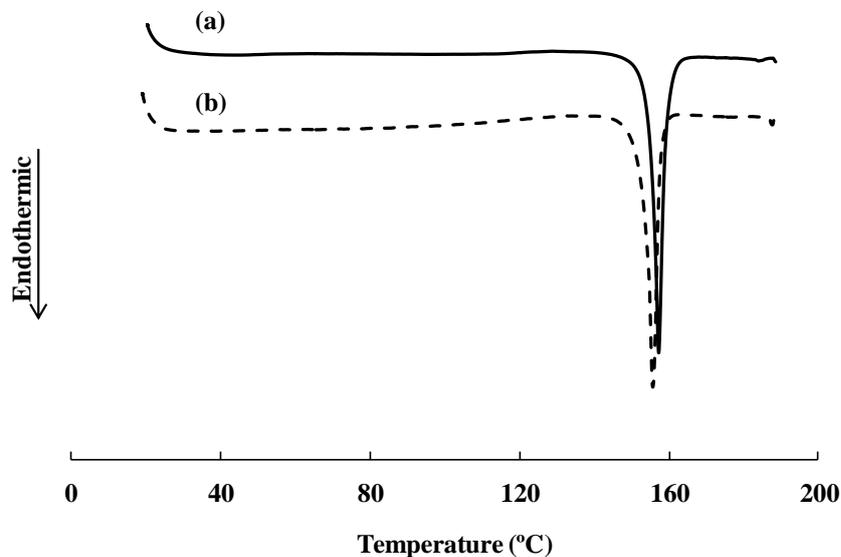


Figure 31. Differential scanning calorimetry profiles of (a) raw and (b) scCO₂-processed ONO-2921 at 25 MPa and 40 °C.

Table 7に ONO-2921 原末, 凍結乾燥後のサンプルの気中分散時の粒子径を示す. 吸入に適切な粒子径 (1~5 μm) における薬物粒子は高い付着性を示し, 凝集体を形成し, 流動性や分散性が悪く, 投与量の均一性の低下を招く¹²². scCO₂ プロセスにより調製したサンプルの気中分散時の粒子径は 2.9~3.1 μm であり, ONO-2921 原末と比較して小さかった (4.2 μm; dispersed pressure: 0.3 MPa). scCO₂ プロセスにより調製したサンプルの懸濁液中での粒子径は約 600 nm であり (Figure 29), ONO-2921 原末と比較して小さかった (1782 nm). scCO₂ プロセスにより調製したサンプルの気中分散時の粒子径は 2.9~3.1 μm (dispersed pressure: 0.3 MPa), 懸濁液中の粒子径は 578.4~610.1 nm であり, scCO₂ プロセス条件による粒子径の差は認められなかった.

Table 7. Size of ONO-2921 particles dispersed in air after supercritical CO₂-processing at various CO₂ pressures in the reaction vessel at 40 °C.

Pressure (MPa)	Particle size (μm)					
	0.1 MPa			0.3 MPa		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
Raw ONO-2921	2.7 ± 0.6	10.3 ± 4.1	199.0 ± 37	1.0 ± 0.1	4.2 ± 0.3	7.8 ± 1.1
15	1.3 ± 0.0	4.1 ± 0.1	7.3 ± 0.4	0.6 ± 0.0	2.9 ± 0.2	5.0 ± 0.1
20	2.9 ± 0.4	7.9 ± 1.7	18.0 ± 8.0	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2
25	1.9 ± 0.0	5.1 ± 0.1	9.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2

Values represent mean ± standard deviations; *n*=3.

Figure 32 に ONO-2921 原末，凍結乾燥後のサンプルの twin impinger を用いた *in vitro* 吸入特性の結果を示す．ONO-2921 原末は大部分が stage 1 に沈着し，stage 2 到達率は 2.1% と低い値であった．scCO₂ プロセスにより調製したサンプルは stage 1 への沈着量が減少し，stage 2 到達率が増大した (28.8~50.3%)．25 MPa・40°C 条件にて調製したサンプルの stage 2 到達率は ONO-2921 原末と比較し，24 倍に増大した．

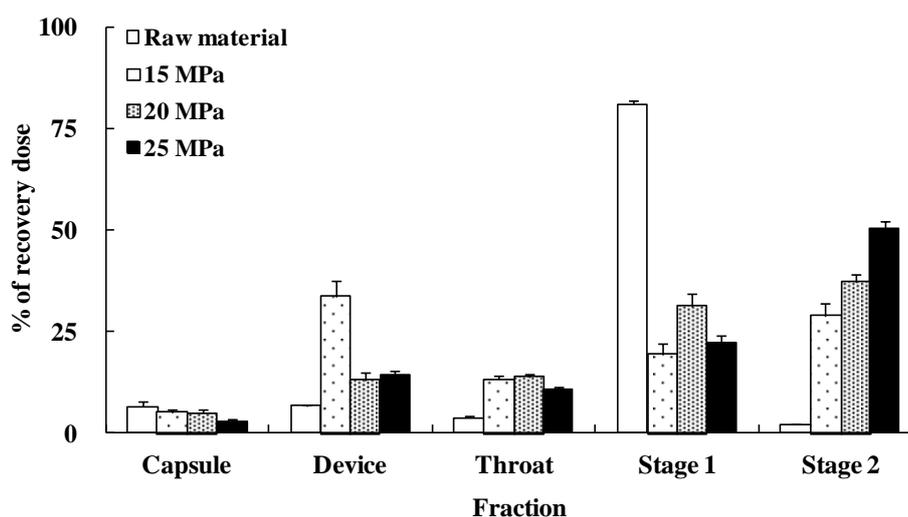


Figure 32. Changes in the *in vitro* inhalation properties of ONO-2921 samples in scCO₂ processed under various CO₂ pressures in the reaction vessel at 40 °C in a twin impinger (mean ± standard deviation; *n*=3).

scCO₂ プロセスにより調製したサンプルの懸濁液中の粒子径及び気中分散時の粒子径は調製時の scCO₂ の圧力による差は認められなかったものの、stage 2 到達率は scCO₂ の圧力増大に伴って、上昇した。気中分散時の粒子径測定について、分散圧 0.3 MPa では調製したサンプルは大部分が分散されたと考察する。過去の報告より、同一サンプルの気中分散時の粒子径測定時、分散圧を 50~400 kPa に増大させると、分散圧 300 kPa 以上において粒子径の差がほとんど認められず¹²³、一次粒子に分散していると考えられる。Table 7 の raw material の気中分散時の粒子径 D₅₀ は 10.3 ± 4.1 μm (dispersed pressure: 0.1 MPa), 4.2 ± 0.3 μm (dispersed pressure: 0.3 MPa) であり、*in vitro* 吸入特性の結果、大部分が stage 1 に沈着していることより、*in vitro* 吸入特性時の分散圧は比較的弱く、twin impinger の stage 2 到達率は分散圧 0.1 MPa における気中分散時の粒子径に基づくと考えられる。scCO₂ の圧力 15 MPa 条件にて調製した粒子は他の 2 つのサンプルと比較し、粒子径が小さく、付着性が増大し、大部分が twin impinger の device に沈着したと考察する。scCO₂ の圧力 20 MPa 条件にて調製した粒子は粒子径が比較的大きく、stage 1 に沈着したと考えられる。scCO₂ の圧力 25 MPa 条件にて調製した粒子は分散性のバランスが良好であり、stage 2 到達率が最も高い値を示した。同様の結果は過去にも報告されている。SEDS 法により調製された salbutamol sulfate 粒子は粒子径が大きいサンプルの方が良好な *in vitro* 吸入特性を示した。著者らは粒子の形状と表面自由エネルギーの差が *in vitro* 吸入特性の増大に寄与したと述べている¹²⁴。本研究においても、粒子調製時の CO₂ の圧力を増大させると得られる粒子の表面自由エネルギーが減少したと推測される。

4.3.3. 超臨界流体の粒子調製条件の最適化

粒子調製時、圧力一定条件下、scCO₂ の温度の最適化検討を実施した。Table 8 に調製したサンプルの気中分散時の粒子径を示す。圧力を 20 MPa に固定し、scCO₂ の温度を 40°C から 80°C に増大させると得られたサンプルの粒子径が増大した ((a); dispersed pressure: 0.3 MPa)。圧力を 25 MPa に固定し、scCO₂ の温度を 40°C から 30°C に減少させた場合、得られたサンプルの粒子径の差は認められなかった (Table 8 (b))。CO₂ の臨界点は 7.4 MPa・31.1°C であり、CO₂ の温度 30°C は亜臨界状態である²⁴。これより、ONO-2921 粒子は超臨界条件以外においても調製可能であった。

Table 8. Size of ONO-2921 particles dispersed in air after supercritical CO₂ processing at various temperatures in the reaction vessel at 20 MPa (a) and 25 MPa (b).

Temperature (°C)	Particle size (μm)					
	0.1 MPa			0.3 MPa		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
(a)						
40	2.9 ± 0.4	7.9 ± 1.7	18.0 ± 8.0	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2
80	2.7 ± 0.2	7.8 ± 0.2	14.6 ± 1.2	0.8 ± 0.0	4.0 ± 0.1	7.6 ± 0.4
(b)						
30	2.1 ± 0.2	5.5 ± 0.3	10.4 ± 0.7	0.8 ± 0.0	3.2 ± 0.2	5.3 ± 0.3
40	1.9 ± 0.0	5.1 ± 0.1	9.0 ± 0.2	0.7 ± 0.0	3.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2

Values represent mean ± standard deviations; $n=3$.

Figure 33 に scCO₂ の異なる温度条件にて調製したサンプルの *in vitro* 吸入特性の結果を示す. scCO₂ の温度を 40°C から 80°C に増大させると twin impinger の stage 2 到達率は減少した. 一方, scCO₂ の温度を 40°C から 30°C に減少させた場合, stage 2 到達率は同等であった (50.3~47.9%). scCO₂ の圧力の変化が及ぼす影響を 4.3.2.の項にて報告した事に加え, scCO₂ の一定圧力条件下, CO₂ の温度を減少させると CO₂ の密度が上昇し¹¹⁷, ONO-2921 の溶解度が増加すると考えられる. ONO-2921 の scCO₂ への溶解度が増大すると ONO-2921 粒子の *in vitro* 吸入特性は増大すると推察される. これより良好な *in vitro* 吸入特性を有する粒子は CO₂ が高压低温条件にて調製可能であり, これは scCO₂ を用いた抽出効率の過去の報告と一致する¹²⁵⁻¹²⁷.

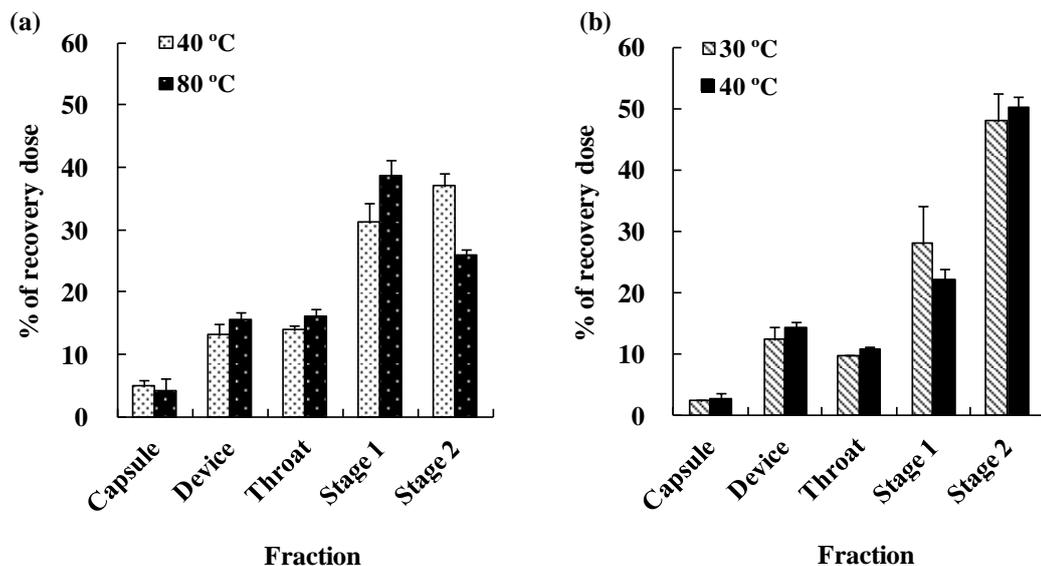


Figure 33. Changes in the *in vitro* inhalation properties of ONO-2921 samples processed under various temperatures in the reaction vessel in a twin impinger at 20 MPa (a) and 25 MPa (b) (mean \pm standard deviation; $n=3$).

ここまでの検討は CO_2 の流量が 14 mL/min の条件にて実施してきた。Figure 34 に CO_2 の流量を変化させた場合の影響を評価した結果を示す。sc CO_2 の条件は 25 MPa \cdot 40°C 条件に固定した。 CO_2 の流量を 10 mL/min にした場合、API は反応容器内で析出し、13% と低収率であった。 CO_2 の流量を 20 mL/min にした場合、収率は 14 mL/min の時と同等であった。これらサンプルの *in vitro* 吸入特性は twin impinger を用いて評価し、 CO_2 の流量が 14 mL/min の条件にて調製した粒子が最も良好な *in vitro* 吸入特性の結果を示した。詳細なデータは割愛するが、異なる CO_2 の流量にて調製した粒子の粒子径分布の差は認められなかった。以上の結果より、DPI 用の ONO-2921 粒子調製について、最適な条件は 25 MPa \cdot 40°C、 CO_2 の流量が 14 mL/min であることが分かった。

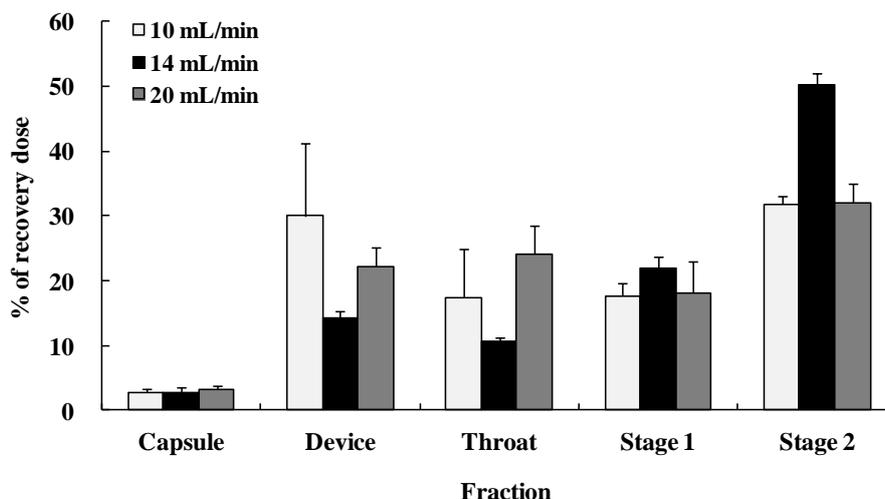


Figure 34. Effect of CO₂ flow rate on *in vitro* inhalation properties of ONO-2921 samples processed with scCO₂ in a twin impinger at 25 MPa and 40 °C (mean ± standard deviation; *n*=3).

4.3.4. Andersen cascade impactor による *in vitro* 吸入特性評価

Figure 35 に最適条件にて調製したサンプルの Andersen cascade impactor を用い評価した *in vitro* 吸入特性の結果を示す. Spinhaler[®]を用いた場合, 吸入時の流量は 28.3 L/min (喘息患者を想定), Monohaler[®]を用いた場合, 吸入時の流量は 60.0 L/min (健常人を想定)とした. 本化合物が喘息治療薬ではなく, 神経性疼痛を適応症として開発されており^{74,75}, 吸入時の流量は健常人と同等であることも想定されたためである. 吸入時の流量を増大させ, デバイスを Spinhaler[®]から Monohaler[®]に変更すると, capsule と device の残留割合が減少し, stage 3 と 4 (空気力学的粒子径は各々, 2.1~3.3 μm と 1.1~2.1 μm) への沈着割合が増大した. 吸入時の流量 28.3 L/min について, Andersen cascade impactor の各ステージに分布した粒子の外観を SEM により観察した. stage 0~3 に沈着した粒子は 30 μm から 5 μm の凝集体であった. stage 4 以降に沈着したサンプルは 1 次粒子であったものの, その割合は少なかった. 吸入時の流量を増大させ, デバイスを変更したことにより capsule と device に残留したサンプルが分散し, stage 3 と 4 に沈着したと推察する. Spinhaler[®]と Monohaler[®]のデバイスの抵抗値は各々, 0.01 (kPa)^{1/2}/L·min と 0.02 (kPa)^{1/2}/L·min であり, それらは低から中程度の抵抗値である. Cyclohaler[®] (Teva Pharmaceutical Industries) と Turbospin[®] (PH&T) は低から中程度のデバイスの抵抗値であり, これらのデバイスを用いて吸入時の流量を増大させると ED が増大した⁴⁰. これより吸入時の流量を 28.3 L/min

から 60.0 L/min に増大させると、FPF が増大することは妥当な結果であると考える。

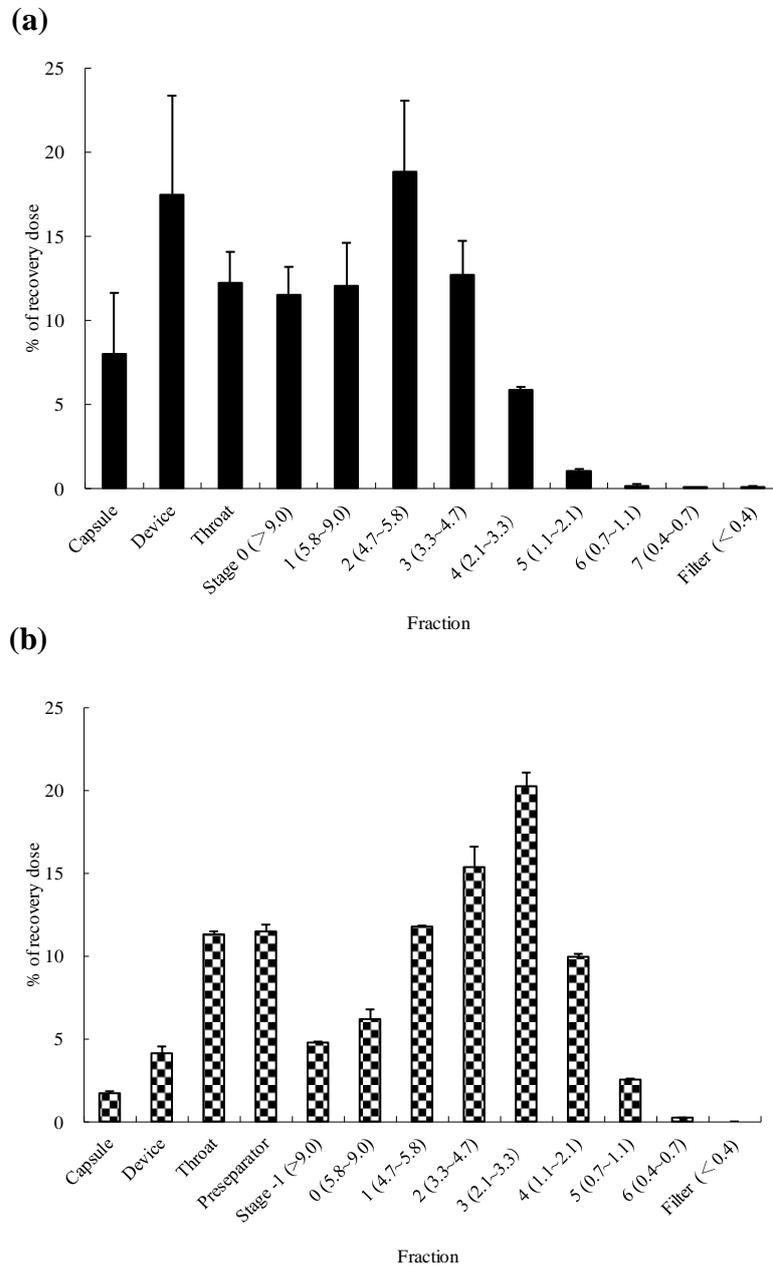


Figure 35. *In vitro* inhalation properties of freeze-dried powders in an Andersen cascade impactor of ONO-2921 processed with scCO₂ at 25 MPa and 40 °C using a (a) Spinhaler® with an inhalation flow rate of 28.3 L/min and (b) Monohaler® with an inhalation flow rate of 60 L/min (mean ± standard deviation; *n*=3).

Table 9. Emitted dose (ED) and fine particle fraction (FPF) of ONO-2921 processed at 25 MPa and 40 °C was measured by an Andersen cascade impactor.

Flow rate (L/min) - Device	ED (%)	FPF (%)
28.3 - Spinhaler®	91.9 ± 3.6	19.9 ± 2.5
60.0 - Monohaler®	98.3 ± 0.1	48.7 ± 0.6

気道の分泌物は粘膜毛様体クリアランスにより異物を除去するが、肺胞細胞は外来物質に対して敏感である。吸入用の添加剤はFDAに認可されたもの、または肺の内因性物質に限定される¹²⁸。本章における手法は有機溶媒のみを用い、添加剤を必要としないものの、効率良くAPIを肺に送達可能である。このため高容量の肺内送達が必要な場合、本手法は有益な方法である。

4.4. 結論

SAS法とRESAS法の装置から成るcombinational scCO₂法を用い、ナノサイズのONO-2921粒子の調製に成功した。ONO-2921を含むエタノール滴は高压低温条件においてscCO₂中に分散した。ONO-2921エタノール溶液をscCO₂に送液し、すぐにONO-2921溶液が分散したscCO₂をRESAS装置を介して大気圧下に噴霧すると、ONO-2921粒子は得られた。scCO₂処理したONO-2921粒子は吸入製剤として用いることができた。得られたサンプルの*in vitro*吸入特性評価の結果、ONO-2921原末と比較し、24倍の吸入効率を示し、FPF 49%以上（空気力学的粒子径4.7 μm以下）を示した。添加剤を用いず、吸入効率の良いAPI粒子を調製可能である。我々の粒子調製の技術は大量のONO-2921を肺に効率良く送達可能である。本手法は粒子の連続生産が可能であり、また、薬物のscCO₂への低溶解度の問題点も克服可能である。本法の開発により、既存の装置を組み合わせることによりscCO₂を用いナノ粒子をコスト効率良く調製可能である。

第 5 章

超臨界流体法と新規添加剤を組み合わせた

ブデソニドの吸入製剤用微粒子設計

5.1. 序論

吸入製剤による薬剤の投与は、気管支喘息やCOPDの局所治療に広く用いられている。なぜなら経肺投与は薬効の発現が早く、非侵襲性、全身への副作用が低いためである^{29,30,129}。吸入製剤の中でもDPIは携帯性に優れ、吸入方法も比較的簡便であることから服薬コンプライアンスに優れると言われている。DPIの設計方法としてキャリア法やステアリン酸マグネシウム等の滑沢剤を用い粒子表面を改質する方法などが挙げられる（詳細は諸言を参照）。キャリア法はキャリア粒子と薬物粒子間の相互作用が強い場合、薬物のキャリアからの分離や投与量の均一性低下を引き起こすため、キャリア法の適用は限定的である。そこで本章では滑沢効果を有する添加剤を **combinational scCO₂** 法に適応し、付着凝集性を抑えた粒子設計に着目した。

第 5 章では、第 3 章及び第 4 章で確立した **combinational scCO₂** 法を用いた。第 3 章及び第 4 章は薬物のみから成る粒子を調製しており、薬物の物性に大きく依存することから汎用性が高いとは言えない。第 2 章で得た添加剤を用い吸入効率を改善する知見を組み合わせ、更なる粒子表面の改質を試みた。モデル薬物として気管支喘息の治療薬の 1 つである BDS を用いた。添加剤として、これまで DPI 用の添加剤として用いられているもの (DPPC など) に加え、医薬品用としては新規添加剤であるモノグリセリド類を用いた。モノグリセリド類は乳化剤の用途で食品の添加剤として広く用いられている。構造中に長い脂肪鎖を含み表面改質が期待できること、DPPC と比較して安価なことが用いた理由である。以下に得られた知見を詳述する。

5.2. 試料ならびに実験方法

5.2.1. 試料

難水溶性のモデル薬物である Budesonide (BDS; (+)-[(RS)-16 α ,17 α -butylidenedioxy-11 β ,21-dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,20-dione]) は大塚製薬

株式会社に提供頂いた。添加剤として以下のものを用いた。dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) は日油株式会社, monoglyceride of hydrogenated palm oil (MGHPO), monoglyceride laurate (MGL) は太陽化学株式会社, monoglyceride palmitate (MGP) は東京化成工業株式会社, monoglyceride stearate (MGS), sorbitan monopalmitate (Span 40) はナカライテスク株式会社から入手した。Figure 36 にこれら添加剤の構造式を示す。MGHPO の構成比率は MGL 0.6%, MGP 43.2%, MGS 52.0%, その他 4.2% である。

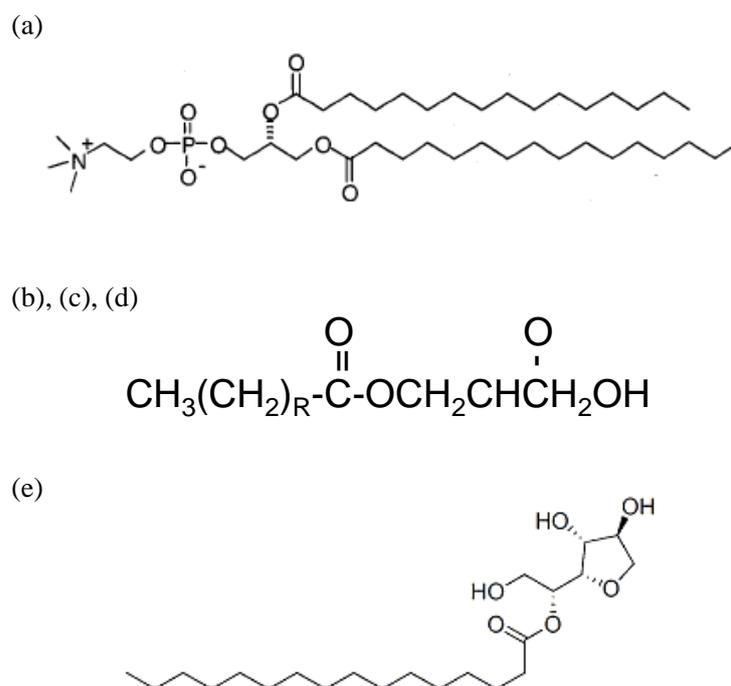


Figure 36. Chemical structural formula of additives: (a) dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), (b) R=10, monoglyceride laurate (MGL), (c) R=14, monoglyceride palmitate (MGP), (d) R=16, monoglyceride stearate (MGS), and (e) sorbitan monopalmitate (Span 40).

5.2.2. BDS 粒子の調製

BDS 懸濁液は第 3 章で確立した SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational scCO₂ 法を用いて調製された (Figure 19 を参照)。1 回当たりの BDS と添加剤の仕込量は合計 200 mg とした (20 mg/mL の BDS/添加剤エタノール溶液として 10 mL)。反応容器中の scCO₂ の圧力及び温度は 25 MPa・40°C とした。理由は高压低温程, CO₂ の密度が上昇し¹¹⁷, BDS の scCO₂ への溶解度が増加し, 最も *in vitro* 吸入特性が良好な条件と考えたためである。その他の操作条件は 3.2.2. IMC ナノ粒子の調製を参照。

5.2.3. 粒子径, 粒子径分布

凍結乾燥後のサンプルは LDSA-2400A を用い, 気中分散時の粒子径をレーザー回折法にて測定した. 気中分散時の圧力は 0.3 MPa とした.

5.2.4. *In vitro* 吸入特性

BDS 供給品, 凍結乾燥後のサンプルの *in vitro* 吸入特性の評価は twin impinger を用い, 吸入デバイスには Spinhaler[®]を用いた. その他の操作条件は 2.2.7. *In vitro* 吸入特性を参照. Twin impinger の操作条件は 2.2.7.1. Twin impinger を参照.

5.2.5. HPLC 分析

BDS の含有量は HPLC を用い測定した. カラムは 4.6×150 mm Kromasil C8 (シグマアルドリッチジャパン株式会社), カラムオーブンの温度は 35°C, サンプル注入量は 20 µL, 検出波長は 254 nm, 移動相はメタノール/水=7/3 (v/v), 流量は約 1.0 mL/min の条件を用いた.

5.2.6. 粉末 X 線回折

BDS 供給品, 凍結乾燥後のサンプルの粉末 X 線回折について, PXRD を用い実施した. 測定速度は 4°/min, 2θ の範囲は 5~30°にて測定を行った. 以降の操作は 1.2.6. 粉末 X 線回折を参照.

5.2.7. 示差走査熱量測定

BDS 供給品, 凍結乾燥後のサンプルの熱分析について, DSC を用い実施した. 速度は 10°C/min, 範囲は 25~275°Cにて測定を行った. 以降の操作は 1.2.7. 示差走査熱量測定を参照.

5.2.8. 電子顕微鏡

BDS 供給品, 凍結乾燥後のサンプルの外観について, 電界放射型走査型電子顕微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscopy: FE-SEM, JSM-T300, 日本電子株式会社) を用い観察した. 無蒸着状態, 加速電圧 0.5 kV の条件にて観察を行った.

5.2.9. 統計解析

気中分散時の粒子径及び *in vitro* 吸入特性の結果は平均値±標準偏差 ($n = 3$) を示した。統計的に有意な差は Student の t 検定により計算され、 $p < 0.05$ は有意差があると判断した (Figure 37 及び Table 10)。また、分散分析 (ANOVA) し、Tukey 法により *post hoc* 分析し、 $p < 0.05$ は有意差があると判断した (Figure 38, Figure 39, Table 11 及び Table 12)。

5.3. 結果

5.3.1. combinational scCO₂ 法により得られた粒子の粒子径

Table 10 に BDS 供給品, combinational scCO₂ 法により調製し、凍結乾燥後 (scCO₂/FD) BDS の平均粒子径を示す。scCO₂/FD 処理した BDS の気中分散時の粒子径 D₅₀ は 2.4 μm であり、BDS 供給品と比較し有意に増大した ($p < 0.05$)。Figure 37 に BDS 供給品, scCO₂/FD 処理した BDS の twin impinger を用いた *in vitro* 吸入特性の結果を示す。BDS 供給品は大部分が stage 1 に沈着し、stage 2 到達率は 5.2% と低かった。scCO₂/FD 処理した BDS は BDS 供給品と比較し、stage 2 到達率は 4 倍であった ($p < 0.05$)。しかし、capsule への残存量もまた BDS 供給品と比較し増大した ($p < 0.05$)。

Table 10. Particle size of supplied BDS and scCO₂/FD processed BDS particles. Values are means \pm SD ($n = 3$) (* $p < 0.05$ compared with supplied BDS).

Sample	Particle size dispersed in air (μm)		
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀
Supplied BDS	0.7 \pm 0.0	1.8 \pm 0.1	3.5 \pm 0.1
BDS (scCO ₂ treatment)	1.0 \pm 0.0*	2.4 \pm 0.1*	4.6 \pm 0.3*

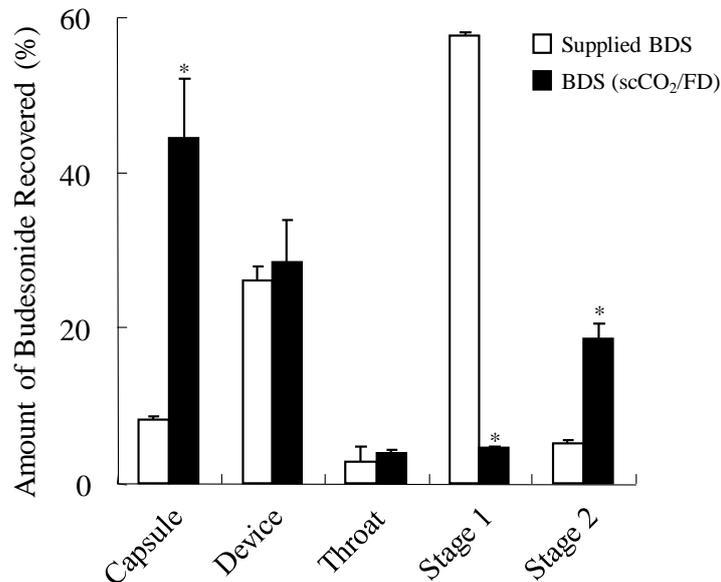


Figure 37. Inhalation properties of supplied BDS and scCO₂/FD processed BDS particles were evaluated with a twin impinger. Values are means \pm SD ($n = 3$) (* $p < 0.05$ compared with supplied BDS).

5.3.2. 添加剤濃度の最適化

In vitro 吸入特性を改善するため、scCO₂/FD 処理した BDS に添加剤を加えることとした。添加剤が粒子の物性に及ぼす影響を評価するため MGHPO を選択し、添加濃度を 5.0 ~90.0% (w/solid content) の範囲で評価した。Table 11 に各 MGHPO 濃度における薬物含有率と粒子径を示す。MGHPO を加え scCO₂/FD 処理した BDS (BDS/MGHPO) の薬物含有率は MGHPO の添加量が増大するほど減少した。薬物含有率は理論値 \pm 5%の範囲内であり、添加した MGHPO はサンプル中に存在すると考えられる。各 MGHPO 濃度における scCO₂/FD 処理した BDS の気中分散時の粒子径 D₅₀ は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し、僅かに増大した ($p > 0.05$) (90.0% (w/solid content) の MGHPO 添加時は除く)。MGHPO の添加量と気中分散時の粒子径 D₅₀ の間には相関関係が認められた。MGHPO の添加率を 5.0%から 12.5% (w/solid content) へ増加させると、scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の気中分散時の粒子径 D₅₀ は減少した。MGHPO 濃度と気中分散時の粒子径の相関係数 (R 値) は 0.92 であった。MGHPO の添加率を 12.5%から 90.0% (w/solid content) へ増加させると、scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の気中分散時の粒子径 D₅₀ は増大し、 R 値は 0.99 であった。

Figure 38に scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の *in vitro* 吸入特性の結果を示す. scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO は scCO₂/FD 処理した BDS と比較し, capsule の残存率が減少した ($p < 0.05$) (5.0% (w/solid content) の MGHPO 添加時は除く). MGHPO の添加量と stage 2 到達率の間にも相関関係が認められた. MGHPO の添加率を 5.0%から 12.5% (w/solid content) へ増加させると, scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の stage 2 到達率は増大した. MGHPO の添加率を 12.5%から 90.0% (w/solid content) へ増加させると, scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の stage 2 到達率は減少した. R 値は 1.00 (MGHPO 添加率: 5.0~12.5% (w/solid content)), 0.72 (MGHPO 添加率: 12.5~90.0% (w/solid content))であった. MGHPO の添加率が 5.0~15.0% (w/solid content) の場合, scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の stage 2 到達率は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 有意に増大した ($p < 0.05$). 特に 12.5% (w/solid content) の MGHPO 条件にて調製したサンプルは stage 2 到達率が $31.9 \pm 2.5\%$ であった. MGHPO の添加濃度が 5.0~90.0% (w/solid content) の範囲において, 12.5% (w/solid content) の MGHPO 条件にて調製したサンプルは stage 2 到達率が最大値であり, 気中分散時の粒子径 D_{50} が最小値であった. MGHPO の添加濃度が 5.0~15.0% (w/solid content) の範囲において, 調製したサンプルの stage 2 到達率の間に有意な差は認められなかったものの ($p > 0.05$), MGHPO の添加量と stage 2 到達率間の相関関係及び MGHPO の添加量と気中分散時の粒子径 D_{50} 間の相関関係からも妥当である. これより以降の添加剤の濃度は 12.5% (w/solid content) にてサンプルを調製することとした.

Table 11. Difference in particle size and drug content of BDS particles containing different amounts of MGHPO. Values are means \pm SD ($n = 3$).

MGHPO amount (%) (w/solid content)	Particle size dispersed in air (μm)			Drug content (%)
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
0.0 (BDS (scCO ₂ treatment))	1.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.1	4.6 \pm 0.3	-
5.0	1.6 \pm 0.0	3.5 \pm 0.2	6.2 \pm 0.8	94.5 \pm 1.8
10.0	1.5 \pm 0.0	3.4 \pm 0.1	5.7 \pm 0.3	92.7 \pm 1.2
12.5	1.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	6.3 \pm 0.9	86.5 \pm 1.1
15.0	2.8 \pm 0.1	5.6 \pm 0.3	9.0 \pm 0.3	83.9 \pm 0.5
20.0	2.9 \pm 0.0	6.1 \pm 0.1	9.7 \pm 0.2	78.2 \pm 0.7
25.0	1.5 \pm 0.0	3.7 \pm 0.2	6.3 \pm 0.6	77.6 \pm 1.5
90.0	8.4 \pm 0.5	37.6 \pm 5.2	78.0 \pm 14.2	11.6 \pm 0.2

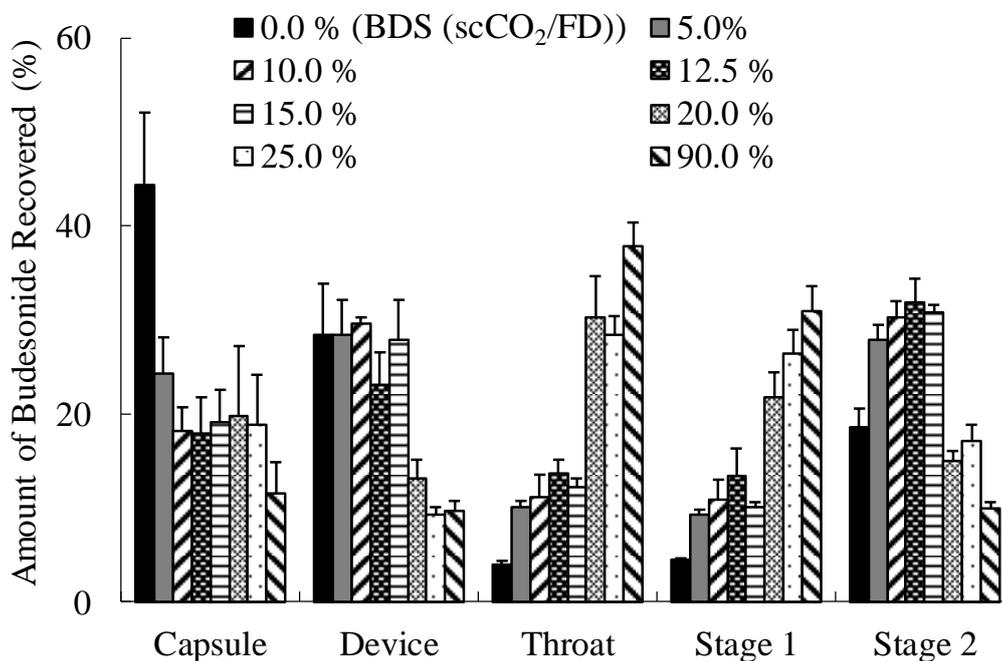


Figure 38. Differences in the deposition of emitted doses of scCO₂ treated BDS particles containing different amounts of monoglycerides of hydrogenated palm oil (MGHPO), assessed using a twin impinger. The weight ratio of MGHPO varied from 5.0% to 90.0% (w/solid content). Values are means \pm SD ($n = 3$).

5.3.3. 添加剤のスクリーニング

粉末サンプルの収率は添加剤の有無、種類、量によらず 30~50%であった。Table 12 に各種添加剤が scCO₂/FD 処理した BDS の粒子径に及ぼす影響を示す。添加剤として DPPC, MGHPPO, MGL, MGP, MGS, Span 40 を用いた。これらを用いた理由として DPPC は肺に多く存在するため¹³⁰, MGHPPO は食品添加剤として広く用いられるため, MGL, MGP, MGS は MGHPPO の構成成分であるため, Span 40 は代表的な非イオン性の界面活性剤であり, 医薬, 化粧品に汎用されるためである¹³¹。添加剤を加えて調製した粒子の気中分散時の粒子径 D₅₀ は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 増大した ($p < 0.05$) (scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPPO を除く)。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の粒子径 D₅₀ は 5 μm 以下であり, scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPPO と比較し有意な差は認められなかった ($p > 0.05$)。一方, MGS 以外の添加剤を添加し, scCO₂/FD 処理した BDS の粒子径 D₅₀ は scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPPO と比較し, 増大した ($p < 0.05$)。

Figure 39 に各種添加剤を加え scCO₂/FD 処理した BDS の *in vitro* 吸入特性の結果を示す。DPPC 及び Span 40 を添加し, scCO₂/FD 処理した BDS の capsule への残存率は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 低下は認められず ($p > 0.05$)。その他の添加剤を加え scCO₂/FD 処理した BDS の capsule への残存率は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 有意な差が認められた ($p < 0.05$)。MGL, MGP, MGS が *in vitro* 吸入特性に及ぼす影響を比較し, scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の stage 2 到達率は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 有意に増大した ($p < 0.05$)。scCO₂/FD 処理した BDS/Span 40 について, *in vitro* 吸入特性の結果は scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPPO と比較し, stage 1 に多く沈着し ($p < 0.05$)。stage 2 到達率は低かった ($p < 0.05$)。これより, 添加剤を加え scCO₂/FD 処理した BDS の *in vitro* 吸入特性の改善は添加剤の界面活性効果のみが要因ではないことが分かった。

MGHPPO, DPPC 及び MGS を添加し, scCO₂/FD 処理した BDS の stage 2 到達は, scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 有意に増大した ($p < 0.05$)。scCO₂/FD 処理した BDS/DPPC の capsule への残存率は scCO₂/FD 処理した BDS (添加剤無) と比較し, 改善は認められなかった ($p > 0.05$)。MGHPPO は MGL, MGP, MGS 及びその他の成分で構成され, scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPPO の結晶性評価は複雑になりうることが考えられる。これより次項にて, scCO₂/FD 処理した BDS/MGS を結晶性及び結晶形を評価するサンプルとして選択した。

Table 12. Differences in particle size and drug content of BDS particles containing different types of additive (theoretical additive content: 12.5%). Values are means \pm SD ($n = 3$).

Additive	Particle size dispersed in air (μm)			Drug content (%)
	D ₁₀	D ₅₀	D ₉₀	
Without additives				
BDS (scCO ₂ treatment)	1.0 \pm 0.0	2.4 \pm 0.1	4.6 \pm 0.3	-
MGHPO	1.3 \pm 0.1	3.2 \pm 0.1	6.3 \pm 0.9	86.5 \pm 1.1
DPPC	1.7 \pm 0.0	4.5 \pm 0.1	8.2 \pm 0.2	92.0 \pm 0.9
MGL	1.8 \pm 0.1	5.1 \pm 0.4	9.5 \pm 1.0	89.8 \pm 3.5
MGP	2.0 \pm 0.1	5.4 \pm 0.1	9.0 \pm 0.1	81.9 \pm 2.8
MGS	1.7 \pm 0.0	3.8 \pm 0.4	6.7 \pm 0.5	85.3 \pm 1.3
Span 40	2.4 \pm 0.1	6.1 \pm 0.1	9.9 \pm 0.2	82.4 \pm 0.4

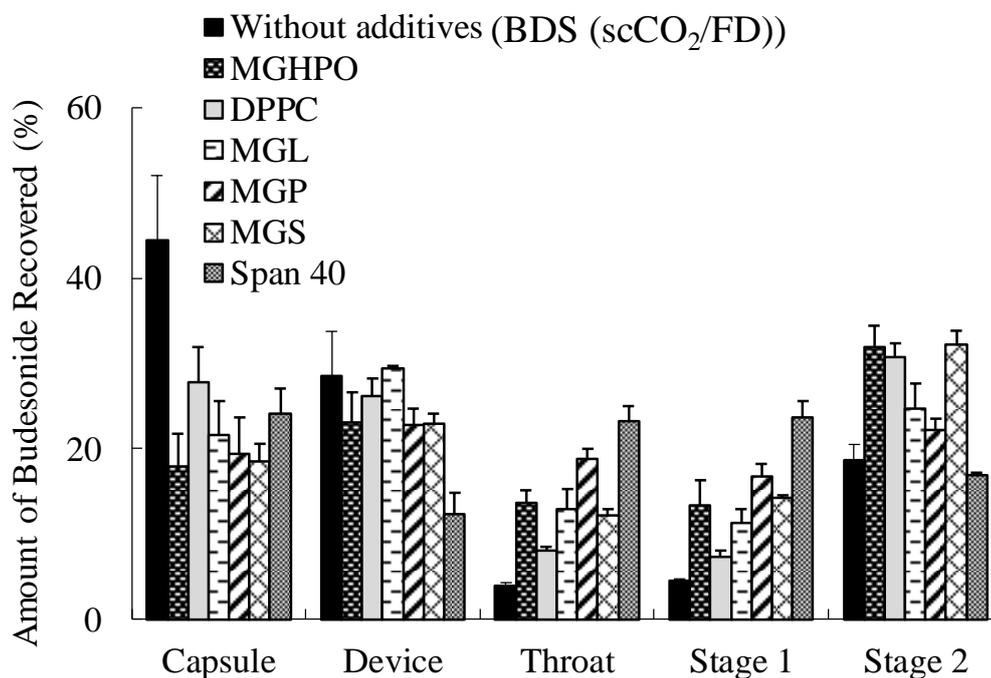


Figure 39. Changes in deposition stage of emitted doses of scCO₂ treated BDS particles containing different types of additive (theoretical additive content: 12.5%). Values are means \pm SD ($n = 3$).

5.3.4. 結晶性評価

In vitro 吸入特性に及ぼす影響を考察するため、BDS サンプルの結晶性の評価を実施した。Figure 40 に BDS サンプルの PXRD パターンを示す。scCO₂/FD 処理が BDS の結晶化度への影響を評価するため、Figure 40 (a)及び(d)に BDS 供給品と scCO₂/FD 処理した BDS の結晶化度の違いを示す。scCO₂/FD 処理による BDS の結晶化度は BDS 供給品と比較し低下した。BDS 供給品の PXRD パターンは過去に報告されたもの⁴⁰と比較し、特異的なピークの差は認められなかった。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS との比較を目的とし、物理混合物の組成は 87.5%の BDS と 12.5%の MGS とした。BDS/MGS の物理混合物の PXRD パターンは 87.5%の BDS の PXRD パターン (Figure 40 (a)) と 12.5%の MGS の PXRD パターン (Figure 40 (b)) で構成されるはずである。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の PXRD パターンは BDS/MGS の物理混合物の PXRD パターンと比較し、ピーク強度が低く (Figure 40 (e)及び(c))、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の結晶化度も低下したことが示された。

Figure 41 に BDS サンプルの DSC プロファイルを示す。BDS 供給品、scCO₂/FD 処理した BDS、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS は昇温により BDS が融解、分解し、吸熱ピークを示した。230°C付近の BDS の発熱エンタルピーを発熱ピークの面積値から算出した。BDS 供給品、scCO₂/FD 処理した BDS の発熱エンタルピーは各々、4.7、22.4 mJ/mg であった (Figure 41 (a)及び(d))。発熱エンタルピーの増大は BDS の結晶が非晶質体に変化したためと推測された。MGS 供給品の融点は約 70°Cであり、BDS/MGS の物理混合物、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS について、約 70°Cに MGS の融点と考えられる吸熱ピークが認められた。MGS の融解エンタルピーを融点ピークの面積値から算出した。BDS/MGS の物理混合物、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の融解エンタルピーは各々、30.5、24.2 mJ/mg であった。

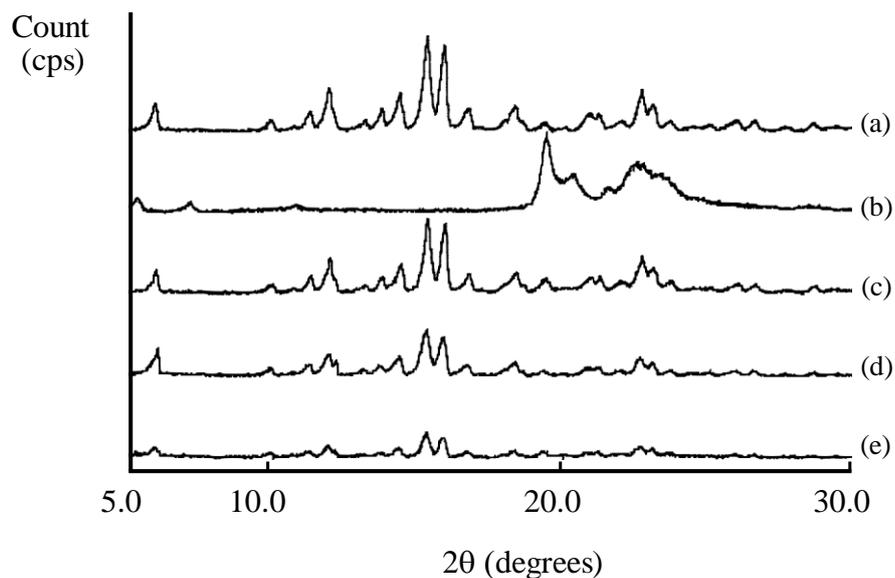


Figure 40. PXRD patterns of BDS particles: (a) supplied BDS, (b) supplied MGS, (c) physical mixture of BDS/MGS, (d) scCO_2/FD processed BDS, and (e) scCO_2/FD processed BDS/MGS.

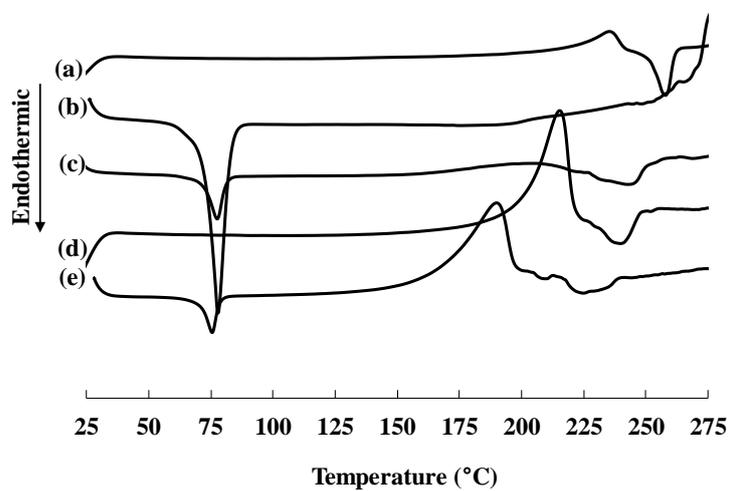


Figure 41. DSC curves of BDS particles: (a) supplied BDS, (b) supplied MGS, (c) physical mixture of BDS/MGS, (d) scCO_2/FD processed BDS, and (e) scCO_2/FD processed BDS/MGS.

5.3.5. SEM 写真

In vitro 吸入特性に及ぼす影響を考察するため、FE-SEM を用い BDS サンプルの外観評

価を実施した. Figure 42 に FE-SEM 画像を示す. BDS 供給品は滑らかな表面を持つ粒子であり (Figure 42 (a)), scCO_2/FD 処理した BDS は凹凸の表面を持つ粒子であった (Figure 42 (b)). BDS 供給品及び scCO_2/FD 処理した BDS の粒子径は各々, 約 500 nm 及び約 1 μm であり, 気中分散時の粒子径 D_{10} と同等であった (Table 10). 一方, scCO_2/FD 処理した BDS/MGS は表面状態が明らかに異なり, 滑らかな表面を持つ粒子であり, MGS は粒子表面に吸着したと推測した. 更に形状が BDS 粒子と異なる粒子も認められた. これより, 全ての MGS が粒子表面に吸着したのではなく, 一部は MGS 単独の粒子として存在すると考察する.

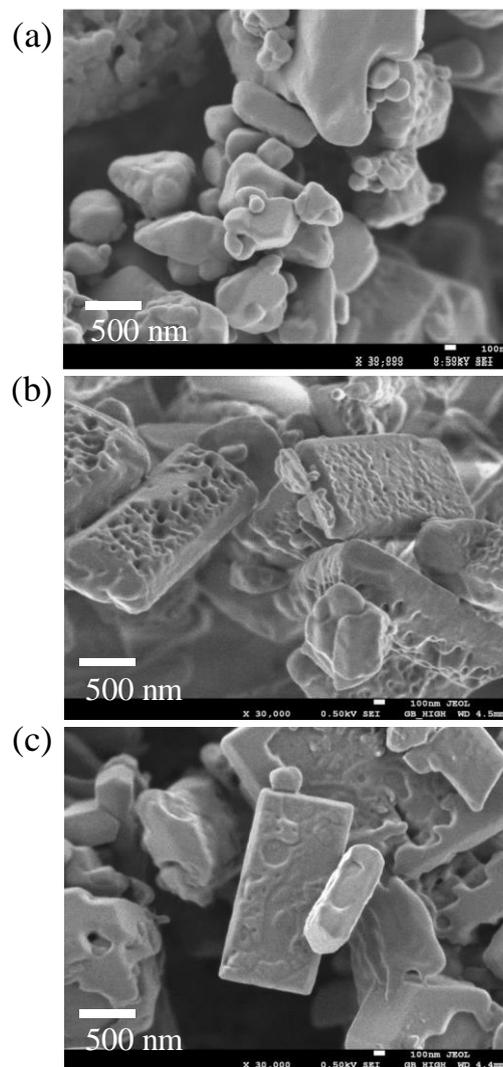


Figure 42. Field emission scanning electron micrographs of (a) supplied BDS, (b) scCO_2/FD processed BDS, and (c) scCO_2/FD processed BDS/MGS.

5.4. 考察

BDS 供給品の気中分散時の粒子径 D_{50} は $scCO_2$ /FD 処理した BDS と比較し、小さかった ($p < 0.05$). しかし、BDS 供給品の twin impinger の stage 2 到達率は 5.2% と吸入効率は低かった (Table 10, Figure 37). $scCO_2$ を良溶媒として用いる RESS 法により粒子を調製する研究^{132,133} と $scCO_2$ を貧溶媒として用いる SEDS 法により粒子を調製する研究²³ が報告されている. $scCO_2$ を用い DPI 用の粒子を設計する研究もまた行われている. York は医薬品化合物の粒子設計や drug delivery system に $scCO_2$ を応用することは有用であり、DPI への応用は特に期待されると報告している¹³⁴. 第 4 章で報告した SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational $scCO_2$ 法を用い、ONO-2921 の DPI 用の粒子調製する技術を本章では BDS に応用した. 添加剤を加えず、 $scCO_2$ /FD 処理した BDS の stage 2 到達率は BDS 供給品と比較し、4 倍に改善された (Figure 37). *In vitro* 吸入特性の改善は粒子表面の粗さと $scCO_2$ 処理による表面自由エネルギーの低下が要因と考えられる. FE-SEM 画像より $scCO_2$ /FD 処理した BDS の粒子表面が凹凸であった (Figure 42 (b)). $scCO_2$ /FD 処理した BDS について BDS 供給品と比較し、PXRD のピーク強度は低下しており、発熱ピークのエンタルピーは増加していることから (Figure 40 (a)及び(d), Figure 41 (a)及び(d)), $scCO_2$ /FD 処理した BDS の結晶化度は BDS 供給品と比較し、低下していた. これまでも、粒子表面の凹凸が粒子間の付着凝集性を低下させ、*in vitro* 吸入特性を改善したことが報告されている^{45,135}. 一方、 $scCO_2$ /FD 処理した BDS の capsule への残存量は増加した. これは $scCO_2$ /FD 処理により capsule 内での分散量が増大し、capsule 内に付着する量もまた増大したためである. $scCO_2$ /FD 処理した BDS の分散性は粒子表面の凹凸と $scCO_2$ /FD 処理による表面自由エネルギーの低下により、増大した. $scCO_2$ /FD 処理した BDS の粒子表面は親水性に改質されていると推測できる. ゼラチンカプセルの壁面は親水性であり、粒子表面が親水性の粒子はカプセル壁面に付着しやすい傾向がある¹³⁶. BDS 供給品は気中分散時の粒子径測定時に分散したものの、BDS 供給品の粒子間の凝集性は強く、大部分の BDS 供給品は吸入中に分散せず、stage 1 に沈着した. 気中分散時の粒子径測定時、分散圧を 50 kPa から 400 kPa で変化させた際、粒子は 300 kPa 以上の分散圧において十分に分散した¹²³.

$scCO_2$ 法で調製したサンプル量が非常に少ないため、BDS の表面自由エネルギーを実際に評価することはできない. しかし、Tong ら¹⁰⁰ や Schiavone ら¹⁰¹ は SEDS 法を用い、salmeterol xinafoate や BDS の粒子を調製し、バルク原末と比較し表面自由エネルギーが低

下し、*in vitro* 吸入特性が改善されたことを報告している。Tong らは高い表面自由エネルギーはプロトン供給基 (OH や COOH など) とプロトン受容基 (NH など) が非極性の立体的に大きい基 (ベンゼンやナフタレンなど) よりも粒子表面に存在することによる可能性を示した。彼らは、粒子表面の官能基の変化は結晶化速度を促進させるためであると推測している。実際、有機化合物の $scCO_2$ への溶解度は比較的 low、RESS 法の結晶化速度は速い¹⁸。 $scCO_2$ /FD 処理した BDS の結晶化速度は速いと推測し、その粒子表面の自由エネルギーは低下したものだと考えられる。

まず始めに、添加剤を加えず $scCO_2$ /FD 処理した BDS の *in vitro* 吸入特性の改善は粒子の表面改質によると仮説を立てた。次に $scCO_2$ /FD 処理時、粒子に添加剤を吸着または付着させ、粒子間付着力を減少させることで、更に *in vitro* 吸入特性を改善できると仮説を立てた。そこで添加剤として MGHPO を用い粒子を調製した。

添加剤を用いた DPI 用の粒子調製について、薬物を乳糖やマンニトールなどの粗大なキャリア粒子に付着させる手法^{45,46}や、スプレードライにより薬物と添加剤から成る粒子を調製する手法^{33,135}が過去に報告されている。トリロイシン、キトサン、ロイシン、レシチン、フェニルアラニン、シクロデキストリン、コレステロール、ステアリン酸マグネシウムなどが過去に添加剤として用いられている^{49,135-142}。本章では、用いる添加剤として MGHPO に着目した。MGHPO は脂肪酸エステル体 (Figure 36 (b)-(d)) であり、滑沢効果が期待でき、DPPC と比較して安価であり、乳化剤として食品に広く用いられヒトへの投与実績が豊富であり、医薬の分野で新規添加剤であるなどの理由から選択した。MGHPO は MGL, MGP, MGS で構成され、それらも評価した。

$scCO_2$ /FD 処理した BDS/MGHPO は $scCO_2$ /FD 処理した BDS と比較し、capsule の残存量が減少した ($p < 0.05$) (5.0% (w/solid content) の MGHPO 添加時は除く) (Figure 38)。薬物含有率は理論値 \pm 5%の範囲内であり (Table 11)、添加した MGHPO はサンプル中に存在すると考えられる。DPPC 又は MGS を添加し $scCO_2$ /FD 処理した BDS は $scCO_2$ /FD 処理した BDS/MGHPO の stage 2 到達量が同等であった ($p > 0.05$) (Figure 39)。DPPC は長い脂肪族鎖のため粒子間の付着性を減少させることが過去に報告されており^{143,144}、DPPC を用いた粒子の *in vitro* 吸入特性改善効果は本研究においても認められた。MGHPO は主に MGL, MGP, MGS で構成され、いずれも長い脂肪族鎖を有する。DPPC と同様、MGHPO の *in vitro* 吸入特性改善効果は長い脂肪族鎖に由来すると考察する。MGHPO の構成比率は 0.6%の MGL, 43.2%の MGP, 52.0%の MGS と 4.2%のその他である。MGS

が MGHPO 中の主成分であり、MGP が第二成分である。scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO と scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の twin impinger の各 fraction への分布は同等であることより ($p > 0.05$)、MGHPO による流動性の改善は MGS に由来し、MGS は MGL や MGP と比較し長い脂肪鎖を有し (Figure 36 (b)-(d))、それが *in vitro* 吸入特性を向上させたと考えられる。scCO₂/FD 処理した BDS/MGP は scCO₂/FD 処理した BDS/MGS と比較し、stage 2 到達率が有意に減少し ($p < 0.05$)、throat への沈着が有意に増大した ($p < 0.05$)。この影響により、scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の stage 2 到達率 ($31.9 \pm 6.3\%$) は scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の stage 2 到達率と比較し僅かに低く ($32.2 \pm 2.8\%$)、scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO の throat 沈着率 ($13.6 \pm 2.3\%$) は scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の throat 沈着率と比較し僅かに高くなった ($12.2 \pm 0.5\%$) と考えられる ($p > 0.05$)。

前述の通り、添加剤を加えない scCO₂/FD 処理した BDS の表面自由エネルギーを測定できておらず、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の表面自由エネルギーも測定できていない。しかし、scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO や MGS の粒子径は BDS 供給品や添加剤を加えない scCO₂/FD 処理した BDS と比較して大きい (Table 12)。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の PXRD パターンは BDS/MGS 物理混合物と比較し、ピーク強度が低下していた (Figure 40 (e)及び(c))。上記の通り、RESS 法は結晶化速度が早く¹⁸、scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の結晶化の低下を引き起こし、表面自由エネルギーの低下も起こっていると推察する。

scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の粒子の外観は添加剤を加えない scCO₂/FD 処理した BDS と比較してはっきりと異なっていた (Figure 42 (b), (c))。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の粒子表面の性質は添加剤を加えない scCO₂/FD 処理した BDS と明らかに異なると推測する。

5.5. 結論

SAS 法と RESAS 法の装置で構成される combinational scCO₂ 法を用い、BDS 供給品と比較して BDS の *in vitro* 吸入特性改善に成功した。scCO₂/FD 処理時、種々の添加剤を加えることにより capsule からの粒子の放出を改善し、*in vitro* 吸入特性の改善を実現させた。特に scCO₂/FD 処理した BDS/MGHPO は scCO₂/FD 処理した BDS/DPPC と同等の *in vitro* 吸入特性を示した。MGHPO は食品添加物であり、DPPC と比較し非常に安価であるため、MGHPO 処方是有用である。MGHPO 処方の *in vitro* 吸入特性の改善は MGHPO の構成成分の 1 つである MGS に由来すると考える。scCO₂/FD 処理した BDS/MGS の粒子の外観は

添加剤を加えない scCO₂/FD 処理した BDS と明らかに異なっていた。これより MGS を粒子表面に吸着させることで粒子間の付着性を減少できると考えられる。combinational scCO₂ 法は DPI 用の粒子調製において有用であり、添加剤を用い更なる *in vitro* 吸入特性の改善が可能である。

総括

本研究ではエネルギー効率に優れ、得られる粒子をコントロールしやすい **bottom-up** 法を用いた。有機溶媒中に溶解させた薬物を添加剤水溶液中で晶析させる水中溶媒拡散法（第 1 章，第 2 章），有機溶媒中に溶解させた薬物を **scCO₂** 中に分散させ，それらを噴霧し粒子を得る **combinational scCO₂** 法（第 3 章，第 4 章，第 5 章）を確立した。これらの方法を用い，薬物が主な構成成分である溶解性改善を目的とした粒子，**BA** 改善を目的とした **DPI** 用の粒子を設計した。

第 1 章では分散安定化剤として **CyDs** を用い，**IMC** ナノ粒子を調製する基礎検討を実施した。得られたナノ粒子は **IMC** 原末と比較し，溶解性を大きく改善できた。これは平均粒子径が **300~500 nm** と **IMC** 原末と比較し小さく有効比表面積が顕著に増大したためと，結晶形が準安定晶に転移したためと考えられる。このような **IMC** ナノ粒子が得られた理由は分散安定化剤である **CyDs** の分子間相互作用により **CyD** ネットワークを形成し，晶析した結晶の凝集と結晶成長を抑制することができたためと考えられる。

第 2 章では第 1 章で得られた知見を活かし，様々な分散安定化剤を用い，**DPI** 用の **ONO-2921** 粒子の調製を試みた。最適な条件にて得られた粒子の薬物含有率は **80%** 以上であり，*in vitro* 吸入特性は **ONO-2921** 原末と比較し大きく改善できた。これより，高含量の薬物を効率良く肺に送達することができた。水中溶媒拡散法による粒子形成のメカニズムは薬物のエマルションが形成され，エマルションから有機溶媒が抜け，薬物の非晶質体が形成され，結晶化し，粒子形成されていた。

第 3 章では **SAS** 法と **RESAS** 法の装置で構成される **combinational scCO₂** 法を新規に確立し，**IMC** ナノ粒子を調製する基礎検討を実施した。得られたナノ粒子は **IMC** 原末と比較し，溶出性が大きく改善された。これは第 1 章と同様，微粒子化による比表面積の増大と結晶形の転移のためと考えられる。特に高圧低温条件においては **IMC** の新規の結晶形を含有すると考えられるサンプルが得られた。本 **scCO₂** 法の利点は医薬品化合物の **scCO₂** への溶解度の低さを克服し，粒子を連続的に調製可能にしたことである。

第 4 章では第 3 章で得られた知見を活かし，**DPI** 用の **ONO-2921** 粒子の調製を試みた。高圧低温条件の **scCO₂** から得られた粒子の *in vitro* 吸入特性は **ONO-2921** 原末と比較し大きく改善された。これは **scCO₂** を用いて粒子を調製したことにより，粒子表面の自由エネルギーが低下し，付着凝集性の低下によるためと示唆された。第 2 章との差異は添加

剤を必要とせず、薬物のみからなる粒子を調製した点である。

第5章では第2章と第4章で得られた知見を活かし、combinational scCO₂法に添加剤を加えDPI用のBDS粒子設計を試みた。scCO₂/FD処理した粒子の*in vitro*吸入特性はBDS供給品と比較し、大きく改善された。安価で食品添加剤として汎用されるモノグリセリド類を添加することにより、更に*in vitro*吸入特性は改善された。scCO₂/FD処理した粒子はその表面が凹凸であり、分散性が改善されたと考えられる。一方、モノグリセリド類を添加した粒子は粒子表面が滑らかであり、粒子間の付着凝集性を減少できたためと考えられる。これよりcombinational scCO₂法の汎用性を高めることができたと考えられる。

近年、新規医薬品候補化合物の多くは難水溶性であり、そのBAの改善は喫緊の課題である。本研究成果は難水溶性化合物のBAの改善に貢献できると考える。難水溶性化合物の溶解性を改善する方法はいくつか挙げられるが、粒子径を減少させる方法は選択肢の1つである。難水溶性の薬物であるIMCを用い、水中溶媒拡散法とcombinational scCO₂法の2通りの方法を適応し、ナノ粒子を調製し、溶解性改善に成功した。一方、有機化合物の微粒子化には限界があり、数十nmが限界粒子径であると言われている。すなわち粒子径を小さくすることにより、溶解性を改善し、BAを向上させることには限界がある。吸収性改善を目的として、肺から医薬品を投与する事例も出てきている。肺は大きな表面積を有し、肺胞上皮細胞が薄く透過性が良好であること、肺から投与し循環血液中に到達した薬物は肝初回通過効果を避けることができるなど、メリットは多い。DPIに関する研究は盛んに行われているが、多くは薬物をキャリア粒子に封入または付着させて送達する方法であり、大量の薬物をDPIとして肺に送達可能な事例は少ない。難水溶性の医薬品候補化合物であるONO-2921を用い、前述の2通りの晶析法を適応し、大量の化合物を効率良く肺に送達することを達成できた。更にcombinational scCO₂法により得られる粒子表面を添加剤を用い表面改質することで、combinational scCO₂法の応用範囲を広げることにも成功した。今後、薬理効果は期待できるものの、難水溶性でありBAが低く医薬品化が困難な化合物において、上記手法により医薬品化の一助になると確信する。最後に、本件において得られた成果が病気で苦しむ患者さんの助けになることを切に願う。

謝辞

本研究を学位論文としてまとめるにあたり、多くの方にご支援、ご指導頂きました。ここに深く感謝の意を表します。

粒子製造法の確立、データ取得方針、結果の解釈、論文作成と研究全般にわたりご指導、ご鞭撻を賜りました大阪薬科大学 製剤設計学研究室 戸塚裕一教授に甚大なる謝意を表します。今こうして製剤の研究活動に携われているのは、先生のお力添えの賜物です。本当にありがとうございました。最先端の科学、論文の執筆に関して、ご指導、ご鞭撻を賜りました大阪薬科大学 製剤設計学研究室 門田和紀講師には深く感謝の意を表します。博士論文をまとめることができたのは、日夜休日問わずご指導頂き、私のつたない文章力に付き合ってくださいったからに他なりません。誠にありがとうございました。論文作成や実験に協力頂きました大阪薬科大学 製剤設計学研究室 内山博雅助教、Novo Nordisk A/S Abdallah Makhlof 博士、東亜薬品株式会社 有賀直樹氏に深く感謝致します。私が大阪薬科大学にて論文博士を目指すに際し、強力なご支援、有益なご助言頂きました岐阜薬科大学 製剤学研究室 竹内洋文教授には深謝の意を表します。

学位論文をまとめるにあたり、研究及び論文作成を後押し頂きました高田章部長に深く感謝致します。入社以来、研究活動全般に渡りご指導頂き、学位取得の重要性を教えてくださいました宮本祐司ヘッドに感謝致します。論文作成や投稿がうまくいかず、挫折しかけた際、叱咤激励を頂きました山本政信博士に感謝致します。研究活動に行き詰まり、社会人としてのモチベーションが落ちていた際、学位取得を促して頂きました八木明ヘッドに感謝致します。学生時代より大学及び会社の先輩として、常に進むべき道を示して頂きました杉原光博士に感謝致します。共同研究や原薬供給、知財面等種々、ご協力頂きました西浦昭雄博士に感謝致します。

最後に出産前後の一番大変な時期に論文作成に理解を示し、子供と私を支えてくれた妻、頑張る元気をくれた子、私たち家族を助けてくれました義父母に謝意を示します。私を育ててくれた父母に感謝致します。

略語

ASES: aerosol solvent extraction system technique, BA: bioavailability, BDS: budesonide, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, CyD: cyclodextrin, DSC: differential scanning calorimeter, DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine, DPI: dry powder inhaler, ED: emitted dose, FE-SEM: field emission scanning electron microscopy, FPF: fine particle fraction, GAS: gas antisolvent technique, HPLC: highperformance liquid chromatography, HPC-L: hydroxyl propylcellulose, IMC: indomethacin, MGL: monoglyceride laurate, MGHPO: monoglyceride of hydrogenated palm oil, MGP: monoglyceride palmitate, MGS: monoglyceride stearate, PI: polydispersity index, PLGA: poly(lactic-co-glycolic) acid, PVA: polyvinyl alcohols, PXR: powder X-ray diffractometer, pMDI: pressurized metered dose inhaler, RESAS: rapid expansion from supercritical to aqueous solution, RESS: rapid expansion of supercritical solutions, SEM: scanning electron microscopy, SEDS: solution-enhanced dispersion by supercritical fluids, Span 40: sorbitan monopalmitate, SAS: supercritical antisolvent, scCO₂: supercritical CO₂, Z-average: Z_{Ave}

参考文献

1. Ku MS, Dulin W, 2012. A biopharmaceutical classification-based Right-First-Time formulation approach to reduce human pharmacokinetic variability and project cycle time from First-In-Human to clinical Proof-Of-Concept. *Pharm Dev Technol.* 17, 285-302.
2. Maestrelli F, Bragagni M, Mura P, 2016. Advanced formulations for improving therapies with anti-inflammatory or anaesthetic drugs: A review. *J Drug Deliv Sci Technol.* 32, 192-205.
3. Li S, Wong S, Sethia S, Almoazen H, Joshi Y, Atm S, 2005. Investigation of solubility and dissolution of a free base and two different salt forms as a function of pH. *Pharm Res.* 22, 628-635.
4. Rodriguez-Aller M, Guillarme D, Veuthey JL, Gurny R, 2015. Strategies for formulating and delivering poorly water-soluble drugs. *J Drug Deliv Sci Technol.* 30, 342-351.
5. Horn D, Rieger J, 2001. Organic nanoparticles in the aqueous phase-theory, experiment and use. *Angew Chem Int Ed.* 40, 4330-4361.
6. Waldraff A, Schaber K, 2015. A gas phase method for the generation of aqueous submicron suspensions of poorly water soluble organic substances. *Chem Eng Res Des.* 102, 244-252.
7. Hajratwala BR, 1982. Particle size reduction by a hammer mill I: Effect of output screen size, feed particle size, and mill speed. *J Pharm Sci.* 71, 188-190.
8. Salazar J, Müller RH, Möschwitzer JP, 2013. Application of the combinative particle size reduction technology H 42 to produce fast dissolving glibenclamide tablets. *Eur J Pharm Sci.* 49, 565-577.
9. Ticehurst MD, Basford PA, Dallman CI, Lukas TM, Marshall PV, Nichols G, Smith D, 2000. Characterisation of the influence of micronisation on the crystallinity and physical stability of revatropate hydrobromide. *Int J Pharm.* 193, 247-259.
10. Mackin L, Zanon R, Park JM, Foster K, Opalenik H, Demonte M, 2002. Quantification of low levels (< 10%) of amorphous content in micronised active batches using

- dynamic vapour sorption and isothermal microcalorimetry. *Int J Pharm.* 231, 227-236.
11. Rasenack N, Müller BW, 2002. Dissolution rate enhancement by in situ micronization of poorly water-soluble drugs. *Pharm Res.* 19, 1894-1900.
 12. Rasenack N, Steckel H, Müller BW, 2004. Preparation of microcrystals by in situ micronization. *Powder Technol.* 143, 291-296.
 13. Kawashima Y, Okumura M, Takenaka H, 1982. Spherical crystallization: direct spherical agglomeration of salicylic Acid crystals during crystallization. *Science.* 216, 1127-1128.
 14. Kawashima Y, Niwa T, Handa T, Takeuchi H, Iwamoto T, Itoh K, 1989. Preparation of controlled-release microspheres of ibuprofen with acrylic polymers by a novel quasi-emulsion solvent diffusion method. *J Pharm Sci.* 78, 68-72.
 15. Horisawa E, Kubota K, Tuboi I, Sato K, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y, 2002. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. *Pharm Res.* 19, 132-139.
 16. Matteucci ME, Brettmann BK, Rogers TL, Elder EJ, Williams RO 3rd, Johnston KP, 2007. Design of potent amorphous drug nanoparticles for rapid generation of highly supersaturated media. *Mol Pharm.* 4, 782-793.
 17. Gonçalves VS, Rodríguez-Rojo S, Matias AA, Nunes AV, Nogueira ID, Nunes D, Fortunato E, de Matos AP, Cocero MJ, Duarte CM, 2014. Development of multicore hybrid particles for drug delivery through the precipitation of CO₂ saturated emulsions. *Int J Pharm.* 478, 9-18.
 18. Palakodaty S, York P, 1999. Phase behavioral effects on particle formation processes using supercritical fluids. *Pharm Res.* 16, 976-985.
 19. Martín A, Cocero MJ, 2008. Micronization processes with supercritical fluids: Fundamentals and mechanisms. *Adv Drug Deliv Rev.* 60, 339-350.
 20. Tabernero A, Martín del Valle EM, Galán MA, 2012. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modeling. *Chem Eng Process Process Intensif.* 60, 9-25.
 21. Matson DW, Fulton JL, Petersen RC, Smith RD, 1987. Rapid expansion of supercritical fluid solutions: Solute formation of powders, thin films and fibres. *Ind Eng Chem Res.*

- 26, 2298-2306.
22. Bertucco A, Pallado P, Benedetti L, 1996. Formation of biocompatible polymer microspheres for controlled drug delivery by a supercritical antisolvent technique. *Process Technol. Proc High Press Chem Eng.* 12, 217-222.
 23. York P, Hanna M, 1995. Salmeterol Xinafoate with controlled particle size. International Patent Publication WO 95/01324.
 24. Vemavarapu C, Mollan MJ, Lodaya M, Needham TE, 2005. Design and process aspects of laboratory scale SCF particle formation systems. *Int J Pharm.* 292, 1-16.
 25. Mishima K, Matsuyama K, Nagatani M, 1999. Solubilities of poly(ethylene glycol)s in the mixtures of supercritical carbon dioxide and cosolvent. *Fluid Phase Equilib.* 161, 315-324.
 26. Thakur R, Gupta RB, 2006. Formation of phenytoin nanoparticles using rapid expansion of supercritical solution with solid cosolvent (RESS-SC) process. *Int J Pharm.* 308, 190-199.
 27. Pathak P, Meziani MJ, Desai T, Sun YP, 2004. Nanosizing drug particles in supercritical fluid processing. *J Am Chem Soc.* 126, 10842-10843.
 28. Bałdyga J, Czarnocki R, Shekunov BY, Smith KB, 2010. Particle formation in supercritical fluids-Scale-up problem. *Chem Eng Res Des.* 88, 331-341.
 29. D'Arcy PF, McElnay JC, 1989. *The Pharmacy and Pharmacology of Asthma.* Chichester Ellis Horwood. 47-69.
 30. Labiris NR, Dolovich MB, 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol.* 56, 588-599.
 31. Wigley FW, Londono JH, Wood SH, Shipp JC, Waldman, RH, 1971. Insulin across respiratory mucosae by aerosol delivery. *Diabetes.* 20, 552-556.
 32. Patton JS, 1996. Mechanisms of macromolecule absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev.* 19, 3-36.
 33. Edwards DA, Hanes J, Caponetti G, Hrkach J, Ben-Jebria A, Eskew ML, Mintzes J, Deaver D, Lotan N, Langer R, 1997. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science.* 276, 1868-1871.

34. Ezzati Nazhad Dolatabadi J, Hamishehkar H, Valizadeh H, 2015. Development of dry powder inhaler formulation loaded with alendronate solid lipid nanoparticles: solid-state characterization and aerosol. *Drug Dev Ind Pharm.* 41, 1431-1437.
35. Griffioen RW, de Jongh FH, 1998. Inhalation therapy in children younger than 2 years. II. The practice *Ned Tijdschr Geneesk.* 142, 1488-1493.
36. Williams RO3rd., Brown J, Liu J, 1999. Influence of micronization method on the performance of a suspension triamcinolone acetonide pressurized metered-dose inhaler formulation. *Pharm Dev Technol.* 4, 167-179.
37. Balducci AG, Cagnani S, Sonvico F, Rossi A, Barata P, Colombo G, Colombo P, Buttini F, 2014. Pure insulin highly respirable powders for inhalation. *Eur J Pharm Sci.* 51, 110-117.
38. Newman SP, 2005. Inhaler treatment options in COPD. *Eur Respir Rev.* 96, 102-108.
39. Chew NY, Chan HK, 2002. The role of particle properties in pharmaceutical powder inhalation formulations. *J Aerosol Med.* 15, 325-330.
40. Lobo JM, Schiavone H, Palakodaty S, York P, Clark A, Tzannis ST, 2005. SCF-engineered powders for delivery of budesonide from passive DPI devices. *J Pharm Sci.* 94, 2276-2288.
41. Adjei A, Garren J, 1990. Pulmonary delivery of peptide drugs: effect of particle size on bioavailability of leuprolide acetate in healthy male volunteers. *Pharm Res.* 7, 565-569.
42. Timsina MP, Martin GP, Marriott C, Ganderton D, Yainneskis M, 1994. Drug delivery to the respiratory tract using dry powder inhalers. *Int J Pharm.* 101, 1-13.
43. Yakubu SI, Assi KH, Chrystyn H, 2013. Aerodynamic dose emission characteristics of dry powder inhalers using an Andersen Cascade Impactor with a mixing inlet: the influence of flow and volume. *Int J Pharm.* 455, 213-218.
44. Kunda NK, Somavarapu S, Gordon SB, Hutcheon GA, Saleem IY, 2013. Nanocarriers targeting dendritic cells for pulmonary vaccine delivery. *Pharm Res.* 30, 325-341.
45. Kawashima Y, Serigano T, Hino T, Yamamoto H, Takeuchi H, 1998. Effect of surface morphology of carrier lactose on dry powder inhalation property of pranlukast hydrate. *Int J Pharm.* 172, 179-188.
46. Steckel H, Bolzen N, 2004. Alternative sugars as potential carriers for dry powder

- inhalations. *Int J Pharm.* 270, 297-306.
47. Zellnitz S, Schroettner H, Urbanetz NA, 2015. Influence of surface characteristics of modified glass beads as model carriers in dry powder inhalers (DPIs) on the aerosolization performance. *Drug Dev Ind Pharm.* 41, 1710-1717.
 48. Staniforth JN, 1995. Performance-Modifying Influences in Dry Powder Inhalation Systems. *Aerosol Sci Technol.* 22, 346-353.
 49. Tozuka Y, Wongmekiat A, Sakata K, Moribe K, Oguchi T, Yamamoto K, 2004. Co-grinding with cyclodextrins as a nanoparticle preparation method of a poorly water soluble drug. *J Incl Phenom Macrocyc. Chem.* 50, 67-71.
 50. Müller RH, Jacobs C, Kayser O, 2001. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy, rationale for development and what we can expect for the future. *Adv Drug Deliv Rev.* 47, 3-19.
 51. Mosharraf M, Nyström C, 1995. The effect of particle size and shape on the surface specific dissolution rate of microsized practically insoluble drugs. *Int J Pharm.* 122, 35-47.
 52. Müller RH, Peters K, 1998. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs. I. Preparation by a size-reduction technique. *Int J Pharm.* 160, 229-237.
 53. Merisko-Liversidge E, Liversidge GG, Cooper ER, 2003. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. *Eur J Pharm Sci.* 18, 113-120.
 54. Krause KP, Müller RH, 2001. Production and characterization of highly concentrated nanosuspensions by high pressure homogenization. *Int J Pharm.* 214, 21-24.
 55. Hecq J, Deleers M, Fanara D, Vranckx H, Amighi K, 2005. Preparation and characterization of nanocrystals for solubility and dissolution rate enhancement of nifedipine. *Int J Pharm.* 299, 167-177.
 56. Wongmekiat A, Tozuka Y, Moribe K, Oguchi T, Yamamoto K, 2007. Preparation of drug nanoparticles by co-grinding with cyclodextrins: formation mechanism and factors affecting nanoparticle formation. *Chem Pharm Bull.* 55, 359-363.
 57. Itoh K, Pongpeerapat A, Tozuka Y, Oguchi T, Yamamoto K, 2003. Nanoparticle formation of poorly water-soluble drugs from ternary ground mixtures with PVP and SDS. *Chem Pharm Bull.* 51, 171-174.

58. Sugimoto M, Okagaki TS, Narisawa S, Koida Y, Nakajima K, 1998. Improvement of dissolution characteristics and bioavailability of poorly water-soluble drugs by novel co-grinding method using water-soluble polymer. *Int J Pharm.* 160, 11-19.
59. Loftsson T, Masson M, Brewster ME, 2004. Self-association of cyclodextrins and cyclodextrin complexes. *J Pharm Sci.* 93, 1091-1099.
60. Blanchard J, Proniuk S, 1999. Some important considerations in the use of cyclodextrins. *Pharm Res.* 16, 1796-1798.
61. Becket G, Schep LJ, Tan MY, 1999. Improvement of the in vitro dissolution of praziquantel by complexation with α -, β -, and γ -cyclodextrins. *Int J Pharm.* 179, 65-71.
62. Veiga MD, Ahsan F, 2000. Study of tolbutamide-hydroxypropyl- γ -cyclodextrin interaction in solution and solid state. *Chem Pharm Bull.* 48, 793-797.
63. Yamamoto H, Kuno Y, Sugimoto S, Takeuchi H, Kawashima Y, 2005. Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight junctions. *J Control Release.* 102, 378-381.
64. Niwa T, Takeuchi H, Hino T, Kuno N, Kawashima Y, 1994. In vitro drug release behavior of D,L-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres with nafarelin acetate prepared by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method. *J Pharm Sci.* 83, 727-732.
65. Hancock BC, Parks M, 2000. What is the true solubility advantage for amorphous pharmaceuticals? *Pharm Res.* 74, 397-404.
66. Lee J, Cheng Y, 2006. Critical freezing rate in freeze drying nanocrystal dispersions. *J Control Release.* 111, 185-192.
67. Bonini M, Rossi S, Karlsson G, Almgren M, Lo Nostro P, Baglioni P, 2006. Self-assembly of β -cyclodextrin in water. Part 1. Cryo-TEM and dynamic and static light scattering. *Langmuir.* 22, 1478-1484.
68. Takeuchi H, Nagira S, Yamamoto H, Kawashima Y, 2005. Solid dispersion particles of amorphous indomethacin with fine porous silica particles by using spray-drying method. *Int J Pharm.* 293, 155-164.
69. Masuda K, Tabata S, Kono H, Sakata Y, Hayase T, Yonemochi E, Terada K., 2006.

- Solid-state ¹³C NMR study of indomethacin polymorphism. *Int J Pharm.* 318, 146-153.
70. Miller DA, McConville JT, Yang W, Williams III RO, McGinity JW, 2007. Hot-melt extrusion for enhanced delivery of drug particles. *J Pharm Sci.* 96, 361-376.
 71. Pedersen S, 1996. Inhalers and nebulizers: which to choose and why. *Respir Med.* 90, 69-77.
 72. Zhou QT, Morton DA, 2012. Drug-lactose binding aspects in adhesive mixtures: controlling performance in dry powder inhaler formulations by altering lactose carrier surfaces. *Adv Drug Deliv Rev.* 64, 275-284.
 73. Kaialy W, Nokhodchi A, 2015. Dry powder inhalers: physicochemical and aerosolization properties of several size-fractions of a promising alternative carrier, freeze-dried mannitol. *Eur J Pharm Sci.* 68, 56-67.
 74. Suzuki A, Omori H, Kinoshita M, Akaike A, Satoh M, Kaneko S, 2002. A novel analgesic, ONO-2921, causes a use-dependent inhibition of human N-type (α 1B) Ca²⁺ channels and increases inactivated state. *Jpn J Pharmacol.* 88, 162.
 75. Nishi M, Ishikawa T, Matsumoto Y, Katsube N, Tateishi N, Yonamine H, Matsui T, Okano K, Nakanishi O, 2004. Biochemical and physical treatment in rat neuropathic pain and nerve growth factor. *Pain Res.* 19, 141-149.
 76. Pham DD, Fattal E, Ghermani N, Guiblin N, Tsapis N, 2013. Formulation of pyrazinamide-loaded large porous particles for the pulmonary route: avoiding crystal growth using excipients. *Int J Pharm.* 454, 668-677.
 77. Eggersdorfer ML, Pratsinis SE, 2014. Agglomerates and aggregates of nanoparticles made in the gas phase. *Adv Powder Technol.* 25, 71-90.
 78. Hermans PH, Weidinger A, 1948. Quantitative X-ray investigations on the crystallinity of cellulose fibers. A background analysis. *J Appl Phys.* 19, 491-506.
 79. Srichana T, Martin GP, Marriott C, 1996. The effect of device design on drug deposition from dry powder inhaler formulations determined in vitro at different flow rates. *Proc. Drug Deliv. Lungs Lond.* 7, 36-39. The Aerosol Society, Bristol.
 80. United States Pharmacopeia. General Chapter, <601> Aerosols, Nasal sprays, Metered-dose inhalers, and Dry powder inhalers.
 81. United States Pharmacopeia Pharmacopeial Forum, 28-2, 601-603.

82. Kawashima Y, Yamamoto H, Takeuchi H, Hino T, Niwa T, 1998. Properties of a peptide containing DL-lactide/glycolide copolymer nanospheres prepared by novel emulsion solvent diffusion methods. *Eur J Pharm Biopharm.* 45, 41-48.
83. ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). Impurities, Guideline for Residual Solvents Q3C (R3), 1997.
84. Oster CG, Wittmar M, Bakowsky U, Kissel T, 2006. DNA nano-carriers from biodegradable cationic branched polyesters are formed by a modified solvent displacement method. *J Control Release.* 111, 371-381.
85. Youm I, Bazzil JD, Otto JW, Caruso AN, Murowchick JB, Youan BB, 2014. Influence of surface chemistry on cytotoxicity and cellular uptake of nanocapsules in breast cancer and phagocytic cells. *AAPS J.* 16, 550-567.
86. Shi C, Ahmad KS, Wang K, Schneider M, 2015. Improved delivery of the natural anticancer drug tetrandrine. *Int J Pharm.* 479, 41-51.
87. Vandervoort J, Ludwig A, 2002. Biocompatible stabilizers in the preparation of PLGA nanoparticles: a factorial design study. *Int J Pharm.* 238, 77-92.
88. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H, 2006. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev.* 58, 1688-1713.
89. Pilcer G, Sebti T, Amighi K, 2006. Formulation and characterization of lipid-coated tobramycin particles for dry powder inhalation. *Pharm Res.* 23, 931-940.
90. Karner S, Urbanets NA, 2011. The impact of electrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders. *J Aerosol Sci.* 42, 428-445.
91. Kim YH, Sioutas C, Shing KS, 2009. Influence of stabilizers on the physicochemical characteristics of inhaled insulin powders produced by supercritical antisolvent process. *Pharm Res.* 26, 61-71.
92. Yang M, Cui F, You B, You J, Wang L, Zhang L, Kawashima Y, 2004. A novel pH-dependent gradient-release delivery system for nitrendipine: I. Manufacturing, evaluation in vitro and bioavailability in healthy dogs. *J Control Release.* 98, 219-229.
93. Tong HH, Shekunov BY, York P, Chow AH, 2006. Predicting the aerosol performance

- of dry powder inhalation formulations by interparticulate interaction analysis using inverse gas chromatography. *J Pharm Sci.* 95, 228-233.
94. Shinozaki H, Oguchi T, Suzuki S, Aoki K, Sako T, Morishita S, Tozuka Y, Moribe K, Yamamoto K, 2006. Micronization and polymorphic conversion of tolbutamide and barbital by rapid expansion of supercritical solutions. *Drug Dev Ind Pharm.* 32, 877-891.
 95. González DA, Mabe G, Zabaloy M, Brignole EA, 2000. Gas antisolvent crystallization of organic salts from aqueous solutions. *J Supercrit Fluids.* 17, 249-258.
 96. Yeo SD, Lee JC, 2004. Crystallization of sulfamethizole using the supercritical and liquid antisolvent processes. *J Supercrit Fluids,* 30. 315-323.
 97. Bakhbakhi Y, Charpentier PA, Rohani S, 2006. Experimental study of the GAS process for producing microparticles of beclomethasone-17,21-dipropionate suitable for pulmonary delivery. *Int J Pharm.* 309, 71-80.
 98. Reverchon E, Celano C, Porta GD, Trolino AD, Pace S, 1998. Supercritical antisolvent precipitation: a new technique for preparing submicronic yttrium powders to improve YBCO superconductors. *Mater Res Soc.* 13, 284-289.
 99. Kunastitchai S, Pichert L, Sarisuta N, Müller BW, 2006. Application of aerosol solvent extraction system (ASES) process for preparation of liposomes in a dry and reconstitutable form. *Int J Pharm.* 316, 93-101.
 100. Tong HH, Shekunov BY, York P, Chow AH, 2001. Characterization of two polymorphs of salmeterol xinafoate crystallized from supercritical fluids. *Pharm Res.* 18, 852-858.
 101. Schiavone H, Palakodaty S, Clark A, York P, Tzannis ST, 2004. Evaluation of SCF-engineered particle-based lactose blends in passive dry powder inhalers. *Int J Pharm.* 281, 55-66.
 102. Huang J, Moriyoshi T, 2006. Fabrication of fine powders by RESS with a clearance nozzle. *J Supercrit Fluids.* 37, 292-297.
 103. Türk M, Upper G, Hils P, 2006. Formation of composite drug-polymer particles by co-precipitation during the rapid expansion of supercritical fluids. *J Supercrit Fluids.* 39, 253-263.
 104. Türk M, 1999. Formation of small organic particles by RESS: experimental and

- theoretical investigations. *J Supercrit Fluids*. 15, 79-89.
105. Harrison JJ, Lee C, Lenzer TS, Oum K, 2007. On-line in-situ characterization of CO₂ RESS processes for benzoic acid, cholesterol and aspirin. *Green Chem*. 9, 351-356.
 106. Lin SY, 1992. Isolation and solid-state characteristics of a new crystal form of indomethacin. *J Pharm Sci*. 81, 572-576.
 107. Legendre B, Feutelais Y, 2004. Polymorphic and thermodynamic study of indomethacin. *J Therm Anal Calorim*. 76, 255-264.
 108. Grunenberg A, Henck JO, Siesler HW, 1996. Theoretical derivation and practical application of energy/temperature diagrams as an instrument in preformulation studies of polymorphic drug substances. *Int J Pharm*. 129, 147-158.
 109. Junghanns JUAH, Müller RH, 2008. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. *Int J Nanomedicine*. 3, 295-310.
 110. Van Eerdenbrugh B, Van den Mooter G, Augustijns P, 2008. Top-down production of drug nanocrystals: nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products. *Int J Pharm*. 364, 64-75.
 111. Verma S, Gokhale R, Burgess DJ, 2009. A comparative study of top-down and bottom-up approaches for the preparation of micro/nanosuspensions. *Int J Pharm*. 380, 216-222.
 112. Thorat AA, Dalvi SV, 2012. Liquid antisolvent precipitation and stabilization of nanoparticles of poorly water soluble drugs in aqueous suspensions: Recent developments and future perspective. *Chem Eng J*. 181-182, 1-34.
 113. Sinha B, Müller RH, Möschwitzer JP, 2013. Bottom-up approaches for preparing drug nanocrystals: formulations and factors affecting particle size. *Int J Pharm*. 453, 126-141.
 114. Braeuer A, 2015. In Situ Spectroscopic Techniques at High Pressure.
 115. Hirunsit P, Huang Z, Srinophakun T, Charoenchaitrakool M, Kawi S, 2005. Particle formation of ibuprofen-supercritical CO₂ system from rapid expansion of supercritical solutions (RESS): A mathematical model. *Powder Technol*. 154, 83-94.
 116. Iwai Y, Nagano H, Lee GL, Uno M, Arai Y, 2006. Measurement of entrainer effects of water and ethanol on solubility of caffeine in supercritical carbon dioxide by FT-IR

- spectroscopy. *J of Supercritical Fluids*. 38, 312-318.
117. Van Hees T, Piel G, Evrard B, Otte X, Thunus L, Delattre L, 1999. Application of supercritical carbon dioxide for the preparation of a piroxicam-beta-cyclodextrin inclusion compound. *Pharm Res*. 16, 1864-1870.
 118. Bleich J, Kleinebudde P, Mueller BW, 1994. Influence of gas density and pressure on microparticles produced with the ASES process. *Int J Pharm*. 106, 77-84.
 119. Toropainen T, Velaga S, Heikkilä T, Matilainen L, Jarho P, Carlfors J, Lehto VP, Järvinen T, Järvinen K, 2006. Preparation of budesonide/gamma-cyclodextrin complexes in supercritical fluids with a novel SEDS method. *J Pharm Sci*. 95, 2235-2245.
 120. Sui X, Wei W, Yang L, Zu Y, Zhao C, Zhang L, Yang F, Zhang Z, 2012. Preparation, characterization and in vivo assessment of the bioavailability of glycyrrhizic acid microparticles by supercritical anti-solvent process. *Int J Pharm*. 423, 471-479.
 121. Vijayaraghavan M, Stolnik S, Howdle SM, Illum L, 2013. Suitability of polymer materials for production of pulmonary microparticles using a PGSS supercritical fluid technique: preparation of microparticles using PEG, fatty acids and physical or chemical blends of PEG and fatty acids. *Int J Pharm*. 441, 580-588.
 122. Hassoun M, Ho S, Muddle J, Buttini F, Parry M, Hammond M, Forbes B, 2015. Formulating powder-device combinations for salmeterol xinafoate dry powder inhalers. *Int J Pharm*. 490, 360-367.
 123. Tay T, Das S, Stewart P, 2009. Magnesium stearate increases salbutamol sulphate dispersion: what is the mechanism? *Int J Pharm*. 383, 62-69.
 124. Richardson CH, de Matas M, Hosker H, Mukherjee R, Wong I, Chrystyn H, 2007. Determination of the relative bioavailability of salbutamol to the lungs following inhalation from dry powder inhaler formulations containing drug substance manufactured by supercritical fluids and micronization. *Pharm Res*. 24, 2008-2017.
 125. Bartle KD, Clifford AA, Jafar SA, Shilstone, GF, 1991. Solubilities of solids and liquids of low volatility in supercritical carbon dioxide. *J Phys Chem. Ref Data*. 20, 713-756.
 126. Mitra S, Wilson NK, 1991. An Empirical Method to Predict Solubility in Supercritical Fluids. *J Chromatogr Sci*. 29, 305-309.

127. Miller DJ, Hawthorne SB, 1995. Determination of solubilities of organic solutes in supercritical CO₂ by on-Line flame ionization detection. *Anal Chem.* 67, 273-279.
128. Vanbever R, Mintzes JD, Wang J, Nice J, Chen D, Batycky R, Langer R, Edwards DA, 1999. Formulation and physical characterization of large porous particles for inhalation. *Pharm Res.* 16, 1735-1742.
129. Hickey AJ, 2013. Back to the future: inhaled drug products. *J Pharm Sci.* 102, 1165-1172.
130. Thannhauser S, Benotti J, Boncoddò, 1946. Isolation and properties of hydrolecithin (dipalmityl lecithin) from lung, its occurrence in the sphingomyelin fraction of animal tissues. *J Biol Chem.* 166, 669-675.
131. Singh VK, Anis A, Al-Zahrani SM, Pal K. 2015. Microemulsions of Sorbitans and its Derivatives for Iontophoretic Drug Delivery. *Int J Electrochem Sci.* 10, 2239-2252.
132. Jung J, Perrut Michel, 2001. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. *J Supercrit. Fluids.* 20, 179-219.
133. Asghari I, Esmaeilzadeh F, 2012. Formation of ultrafine deferasirox particles via rapid expansion of supercritical solution (RESS process) using Taguchi approach. *Int J Pharm.* 433, 149-156.
134. York P, 1999. Strategies for particle design using supercritical fluid technologies. *Pharm Sci Technol Today.* 2, 430-440.
135. Gervelas C, Serandour AL, Geiger S, Grillon G, Fritsch P, Taulelle C, Le Gall B, Benech H, Deverre JR, Fattal E, Tsapis N, 2007. Direct lung delivery of a dry powder formulation of DTPA with improved aerosolization properties: effect on lung and systemic decorporation of plutonium. *J Control Release.* 12, 78-86.
136. Behara SRB, Farkas DR, Hindle M, Longest PW, 2014. Development of a High Efficiency Dry Powder Inhaler: Effects of Capsule Chamber Design and Inhaler Surface Modifications. *Pharm Res.* 31, 360-372.
137. Lechuga-Ballesteros D, Charan C, Stults CL, Stevenson CL, Miller DP, Vehring R, Tep V, Kuo MC, 2008. Trileucine improves aerosol performance and stability of spray-dried powders for inhalation. *J Pharm Sci.* 97, 287-302.
138. Yang M, Velaga S, Yamamoto H, Takeuchi H, Kawashima Y, Hovgaard L, van de Weert

- M, Frokjaer S, 2007. Characterisation of salmon calcitonin in spray-dried powder for inhalation. Effect of chitosan. *Int J Pharm.* 331, 176-181.
139. Yang Y, Cheow WS, Hadinoto K, 2012. Dry powder inhaler formulation of lipid-polymer hybrid nanoparticles via electrostatically-driven nanoparticle assembly onto microscale carrier particles. *Int J Pharm.* 15, 49-58.
140. Claus S, Weiler C, Schiewe J, Friess W, 2013. Optimization of the fine particle fraction of a lyophilized lysozyme formulation for dry powder inhalation. *Pharm Res.* 30, 1698-1713.
141. Ozeki T, Kano Y, Takahash N., Tagami T, Okada H, 2012. Improved Bioavailability of a Water-Insoluble Drug by Inhalation of Drug-Containing Maltosyl- β -Cyclodextrin Microspheres Using a Four-Fluid Nozzle Spray Drier. *AAPS Pharm Sci Tech.* 13, 1130-1137.
142. Mizoe T, Ozeki T, Okada, H, 2008. Application of a Four-fluid Nozzle Spray Drier to Prepare Inhalable Rifampicin-containing mannitol Microparticles. *AAPS Pharm Sci Tech.* 9, 755-761.
143. Cuvelier B, Eloy P, Loira-Pastoriza C, Ucakar B, Sanogo AA, Dupont-Gillain C, Vanbever R, 2015. Minimal amounts of dipalmitoylphosphatidylcholine improve aerosol performance of spray-dried temocillin powders for inhalation. *Int J Pharm.* 495, 981-990.
144. Eedara BB, Tucker IG, Das SC, 2016. Phospholipid-based pyrazinamide spray-dried inhalable powders for treating tuberculosis. *Int J Pharm.* 506, 174-183.

論文目録

1. Makhlof A, Miyazaki Y, Tozuka Y, Takeuchi H, 2008. Cyclodextrins as stabilizers for the preparation of drug nanocrystals by the emulsion solvent diffusion method. *Int J Pharm.* 357, 280-285.
2. Miyazaki Y, Sugihara H, Nishiura A, Kadota K, Tozuka Y, Takeuchi H, 2017. Appropriate selection of an aggregation inhibitor of fine particles used for inhalation prepared by emulsion solvent diffusion. *Drug Dev Ind Pharm.* 43, 30-41.
3. Tozuka Y, Miyazaki Y, Takeuchi H, 2010. A combinational supercritical CO₂ system for nanoparticle preparation of indomethacin. *Int J Pharm.* 386, 243-248.
4. Miyazaki Y, Sugihara H, Nishiura A, Kadota K, Tozuka Y, Takeuchi H, 2016. Application of combinational supercritical CO₂ techniques to the preparation of inhalable particles. *J Drug Deliv Sci Technol.* 36, 1-9.

主査・副査

主査 土井 光暢 教授 (大阪薬科大学 分子構造化学研究室)

副査 永井 純也 教授 (大阪薬科大学 薬剤学研究室)

副査 戸塚 裕一 教授 (大阪薬科大学 製剤設計学研究室)