

点鼻ワクチン粉末の処方における抗原安定性と送達効率の最適化

Optimizing Antigen Stability and Delivery Efficiency in the Formulation of
Nasal Vaccine Powders

令和 7 年度

論文博士申請者

三枝周平 (Mieda, Shiuhei)

目次

緒言	1
結果および考察	4
第1章 抗原活性を安定に維持できる粉末の処方設計	4
第1節 粉末の性状変化	5
第2節 湿度の影響によるスクロースの結晶性変化	9
第3節 製造時および室温保存時における抗原活性の安定性	13
第4節 小括	18
第2章 標的部位送達率向上のためのデバイス設計と粉末物性の最適化	19
第1節 抗原粉末の物理的特性が標的部位への送達率に与える影響	23
第2節 抗原粉末の物理的特性がデバイスからの排出率および標的部位への送達率に 与える影響	29
第3節 小括	39
総括	40
実験の部	42
掲載論文	59
参考論文	60
謝辞	71

緒言

現在、ワクチンは主に皮下または筋肉内注射へ投与されているが、粘膜を通じた経鼻投与も有用な投与方法として認識されている^{1,2)}。この方法は特にインフルエンザワクチンにとって有益であり、全身に免疫を誘導することが可能である。具体的には、血中の免疫グロブリン G (IgG) 抗体の産生が促進され、さらにウイルス感染の主要な部位である粘膜表面での分泌型免疫グロブリン A (IgA) 抗体の産生も促進される。したがって、この方法は全身免疫を通じて重篤な病気を予防し、粘膜感染に対する保護効果を提供する可能性がある³⁻⁸⁾。さらに点鼻ワクチンは、針を使用せず非侵襲的に投与可能であるため、小児患者へのワクチン投与に有用である。

ワクチンには、弱毒生ワクチンと不活化ワクチンの 2 種類がある。弱毒生ワクチンは、鼻粘膜内で自己増殖によって十分な抗原を生成できる利点があるが、病原性を回復するリスクがある。また、弱毒生ワクチンの使用は特定の集団に制限されることがある。2 歳未満の子供、免疫不全者、妊婦には承認されていないことが多い。不活化ワクチンはこうした欠点を解消できるが、自己増殖能力の欠如を補うために他の工夫が必要である⁹⁾。

点鼻ワクチンの場合、鼻腔の複雑な構造により、標的部位である鼻腔後方への直接アクセスが非常に困難である¹⁰⁾。鼻腔の大部分は鼻甲介によって占められ、鼻前庭から標的部位への通路は狭く曲がりくねっている。さらに、不活化ワクチンの抗原は、繊毛クリアランス機構によって粘膜の表面に長時間留まることができない¹¹⁾。これらの課題、すなわち標的部位へのアクセスの低さや抗原の迅速な排除は、不活化ワクチンの鼻腔投与にお

ける主要な課題である¹²⁾。これらの要因は、標的部位への薬剤の供給量を減少させるため、投与された用量の効果を高めるための戦略が必要になる。これらの問題を克服するために、2つのアプローチが検討されている。アジュバントの使用と粘膜粘着性賦形剤の使用である¹³⁻¹⁵⁾。2000年にスイスでアジュバントを含む最初の鼻腔投与製剤(NasalFlu)が発売されたが、アジュバント自体の強い毒性のため臨床使用は中止された。その後、安全性と有効性の両方を達成することを目指して、いくつかのアジュバントが検討されている。Virosome 技術¹⁶⁾、ナノエマルジョン技術 NB-1008¹⁷⁾、バクテリア様粒子 FluGEM¹⁸⁾、および Eurocine¹⁹⁾。粘膜粘着性賦形剤としては、キシログルカン²⁰⁾、ヒアルロン酸²¹⁾、カルボキシビニルポリマー²²⁾、ゼラチン類²³⁾、メチルセルロース²⁴⁾などが検討されている。現在、これらの技術を用いた製剤は商業化されていない。アジュバントと粘膜粘着技術は、抗原を直接標的部位に届けるための投与技術に依存している。なぜなら、いずれの技術も非免疫組織に付着した抗原を標的部位に輸送する能力をもっていないからである。効果的な不活化経鼻用ワクチンを開発するためには、抗原を鼻腔の標的部位に直接届ける投与技術の開発が最も重要である²⁵⁻²⁸⁾。

点鼻ワクチンの投与形態には、液剤と粉末剤の2つの選択肢がある²⁹⁻³⁴⁾。前者の場合、シリンジ等のネブライザーを使用して霧化された液体を吸入することで、抗原を標的部位に届けられる。しかし、デバイスからの高速度で直線的な軌道により抗原が鼻前庭付近に集中しやすく、標的部位への十分な供給を確保することが難しい³⁵⁻³⁸⁾。また、液剤は冷蔵が必要である。一方、後者の場合、投与デバイスから放出された粉末は、穏やかな気流に乗って鼻腔の奥に到達することが可能である³⁹⁾。また、適切な処方

と製造方法を設定することで、室温での保存が可能となり、安価な使い捨てデバイスを使用してさまざまな場所で自己投与ができるようになる。この利点は、短期間で大規模な人口に迅速にワクチン接種が求められるパンデミックの状況で特に重要である⁴⁰⁾。以上の利点を鑑み、我々は経鼻用ワクチンの投与形態として粉末を選択した。

このような背景のもと、本研究では、室温で保存可能な点鼻ワクチン粉末の製剤開発を目指し、一定量の抗原を標的部位（鼻甲介、鼻咽頭）に直接送達できる特性を有する製剤の最適化に関する検討を行った。第1章では、製造時および室温保存で抗原活性を安定に維持できる粉末処方を検討した。第2章では、標的部位送達率向上のための粉末物性とデバイス設計の最適化を検討した。以下に本研究で得られた知見を詳述する。

結果および考察

第1章 抗原活性を安定に維持できる粉末の処方設計

凍結乾燥法では、薬液を乾燥させるのにかなりの時間がかかり、凍結乾燥ケーキを破壊した後の最終的な粉末は球状になりにくい。一方、噴霧乾燥法はより迅速に、かつ球状の粉末を迅速に製造できる。本研究では、点鼻ワクチン粉末を噴霧乾燥法で製造することにした。抗原のようなタンパク質は熱に敏感であり、高温の噴霧乾燥法で製造される際に変性するリスクがある。そのため、噴霧乾燥法では処方や製造方法に工夫が求められる。非晶質状態を形成する賦形剤は、乾燥および保存過程でタンパク質（すなわち抗原）の変性や不活化を防ぐことが報告されている⁴¹⁾。例えば、スクロースは水に対する高い溶解性と、乾燥後に非晶質状態を形成する能力から、バイオ医薬品の添加剤として一般的に使用されている⁴²⁾。

一方で、噴霧乾燥法の場合、製造中に粉末はさまざまな環境条件にさらされるため、スクロースの吸湿性は製造上のリスクとなる⁴³⁾。さらに、水分の影響によるスクロースの結晶化は、タンパク質の構造変化や活性損失を引き起こす可能性がある⁴⁴⁻⁴⁶⁾。作業環境の湿度はある程度制御可能であるが、静電気の発生により、30%未満の相対湿度（RH）を維持するのは現実的ではない。したがって、環境湿度条件にさらされても、安定した抗原活性を保持する処方設計および製造プロセスを確立する必要がある。本章では、セルロース誘導体である水溶性高分子のヒドロキシプロピルセルロース（HPC）とスクロースを混合して、共噴霧乾燥させた粉末を製造し、粉末の性状変化、湿度の影響によるスクロースの結晶性変化、製造時および室温保存時における抗原活性の安定性を評価した。

第1節 粉末の性状変化

粉末を噴霧乾燥法（Fig. 1）で製造し、それらの性状変化を、外観、走査電子顕微鏡（SEM）で観察した。また、ラマンイメージングを用いた可視化分析にて、HPC とスクロースの分布や均一性を観察した。

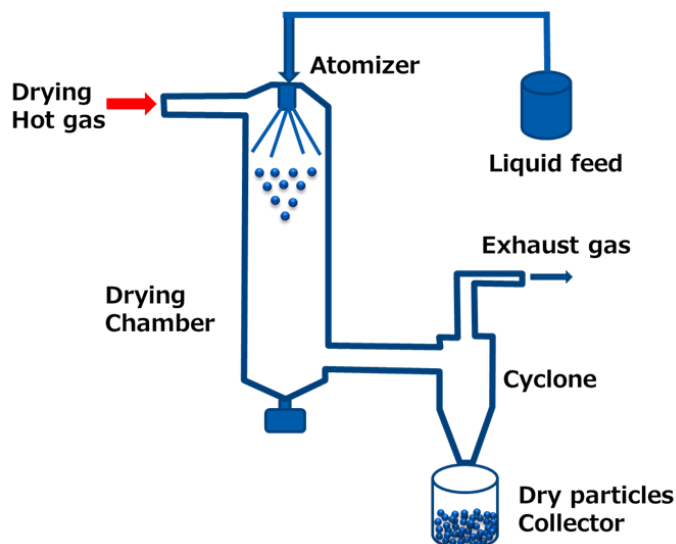


Fig. 1 Schematic diagram of the spray drying process

粉末の性状変化を外観検査で観察した結果を Table 1 に示す。25℃および 60% RH で 2 日間保存した後、噴霧乾燥 HPC-L 粉末の外観に変化は認められなかった。それに対して、噴霧乾燥スクロース粉末およびモデル抗原を含む噴霧乾燥スクロース粉末は、25℃、60% RH で 2 日間保存中に潮解（Deliquescence）していた。さらに、後者の検体は、25℃、30% RH で 7 日間保存中に、凝集固化（Agglomeration）していた。一方、モデル抗原を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末の形態の変化の程度は、いずれの保存条件においてもスクロース粉末よりも著しく小さく、25℃、60% RH、2 日間保存で凝集固化したものの、25℃、30% RH では、7 日間保存しても外観の変化は認められなかった。これらの結果から、スクロースの吸湿性が HPC-L との共噴霧乾燥によって抑制されることを示唆している。

Table 1 Appearance of the spray-dried powders after storage at 25°C and 60% RH or 25°C and 30% RH under open conditions.

	25°C, 60% RH, 2 d	25°C, 30% RH, 7 d
噴霧乾燥 HPC-L 粉末	No change	Not tested
噴霧乾燥スクロース粉末	Deliquescence	Not tested
噴霧乾燥スクロース粉末 (モデル抗原を含む)	Deliquescence	Agglomeration
共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末 (モデル抗原を含む)	Agglomeration	No change

次に粉末の性状変化を走査電子顕微鏡（SEM）画像で観察した。粉末の調製直後（25°C、30%RH 環境下）の SEM 画像を Fig. 2 に示す。(a)に示すように、噴霧乾燥スクロース粉末の粒子は潮解している様子が観察された。一方、噴霧乾燥 HPC-L 粉末では、(b)に示すように、粒子の表面が凹んでおり、潮解や凝集は観察されなかった。(c)および(d)は、噴霧乾燥 HPC-L と噴霧乾燥スクロース粉末の物理的混合物の画像を示している。(c)では、噴霧乾燥 HPC-L 粉末の粒子がいくつか集まっているのが観察でき、拡大した画像(d)では、これらの粉末の凝集が観察された。この凝集は、物理的に混合された噴霧乾燥スクロース粉末が潮解することに起因し、噴霧乾燥 HPC-L 粉末の凝集を促進したと考えられる。一方、(e)および(f)は、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末を示しており、ここでは細かい粉末のきれいな分散が観察できた。これらの結果から、噴霧乾燥スクロースの溶解が HPC-L との共噴霧乾燥によって抑制されたことが SEM 画像においても観察された。

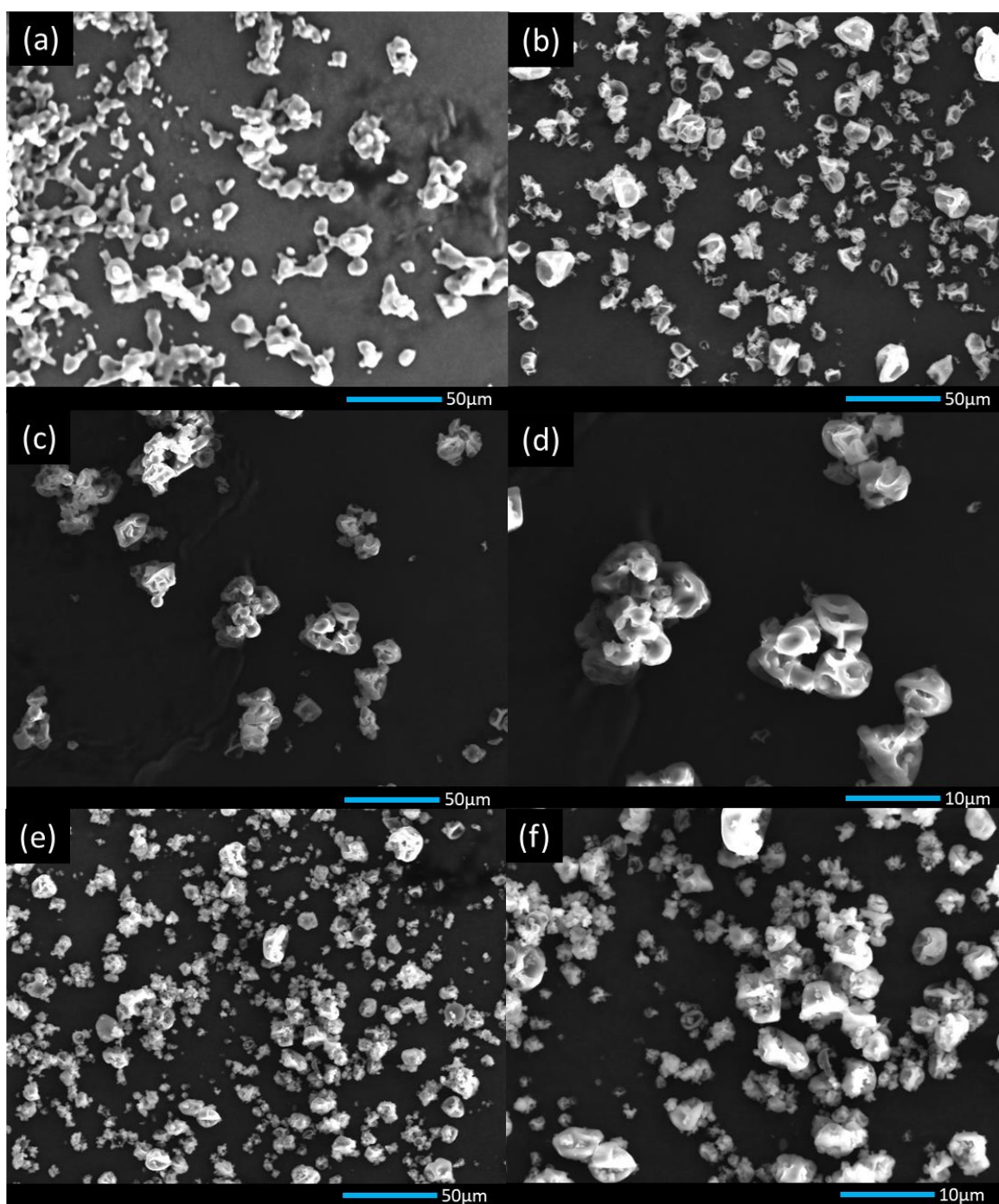


Fig. 2 Scanning electron microphotographs of (a) the spray-dried sucrose powder ($\times 500$), (b) the spray-dried HPC-L powder ($\times 500$), (c) the spray-dried HPC-L/spray-dried sucrose powder mixture ($\times 500$), (d) the spray-dried HPC-L/spray-dried sucrose powder mixture ($\times 1000$), (e) the co-spray-dried HPC-L/sucrose powder ($\times 500$) and (f) the co-spray-dried HPC-L/sucrose powder ($\times 1000$) at immediately after preparation.

次にラマンイメージングで HPC とスクロースを識別することで、粉末上の HPC とスクロースの分布状況を可視化した。ラマンイメージングの組み合わせを Fig. 3 に示す。噴霧乾燥 HPC-L と噴霧乾燥スクロースの粉末混合物 (a) では、スクロース (赤) が潮解し、HPC-L (青) と分離している様子が認められた。一方、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末 (b) は、複合体を形成しているように見え、各粉末は完全な状態を維持していることが観察された。このことから、HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥して粉末化することにより、HPC-L とスクロースが均一化され、製造条件下の湿度の影響を低減していることがわかった。

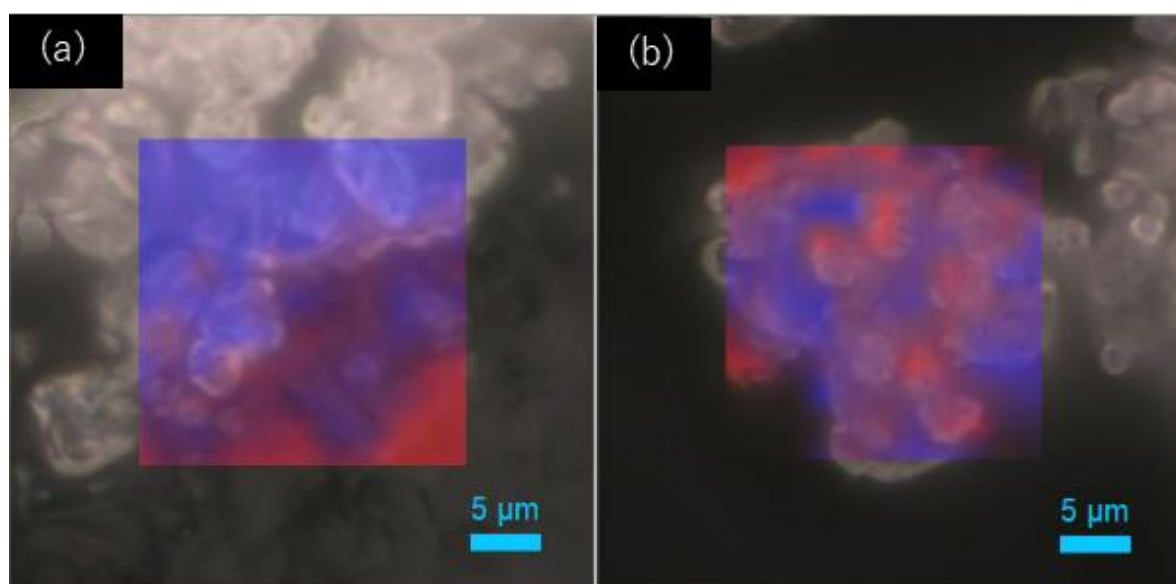


Fig. 3 Superposition of Raman mapping of HPC-L (blue) and sucrose (red): (a) The spray-dried HPC-L/spray-dried sucrose powder mixture, (b) the co-spray-dried HPC-L/sucrose powder.

第2節 湿度の影響によるスクロースの結晶性変化

噴霧乾燥スクロース粉末は非晶質で物理的に不安定であるため、保存中に水蒸気の吸着によって結晶化する可能性がある⁴⁷⁾。そのため、蒸気吸脱着等温線測定および粉末 X 回折 (PXRD) 測定により、スクロースの結晶性変化を観察した。

Fig. 4 に蒸気吸脱着等温線を示す。非晶質スクロースは、高湿度条件下で保存されると結晶化し、水分含量が一時的に減少した後、臨界 RH に達すると急速に潮解することが知られている⁴⁸⁻⁵⁰⁾。噴霧乾燥スクロース粉末 (a) は、①-②間で水分を吸湿し、ガラス状態からゴム状態へ転移し、②-③間で吸湿と一部の結晶転移が同時に進行し、③-④間で重量減少が観察されたことから、この時点で結晶転移が完了したと推察される。また、85% RH を超える (⑤) と重量が急激に増加したことから、結晶化したスクロースが急速に潮解したと考えられる。

噴霧乾燥 HPC-L 粉末 (b) は、0 から 95% RH の範囲で水蒸気を徐々に吸着した⁵¹⁾。また、噴霧乾燥 HPC-L と噴霧乾燥スクロース粉末の物理的混合物 (c) は、60-65% RH 周辺で平衡を保ち、その後、噴霧乾燥スクロース (a) と同様に 85% RH を超えると急激に吸着量が増加した。このことは、スクロースが 60-65% RH の条件下で結晶化して重量減少したが、HPC-L への水分吸着量があるため、スクロースの重量減少が明確に認められず、85% RH を超えると結晶化したスクロースが急速に潮解したと考えられる。

一方、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース (d) は、60-65% RH の条件下で重量減少を示さず、また 85% RH を超えても急速に潮解することはなかった。0 から 95% RH の範囲で徐々に水分を吸収したことから、HPC-L を

スクロースと共噴霧乾燥することで、スクロースの分子移動性が低下し、スクロースの結晶化が抑制され⁵²⁾、かつ水分が HPC の表面に吸着した際、HPC の表面にゲル層が形成され、結晶化に必要な水分がスクロースに供給されず、スクロースの結晶化が抑制されたと推察される^{53,54)}。水蒸気吸着等温線の測定結果から、HPC-L とスクロースの共噴霧乾燥によりスクロースの結晶化が抑制されていると推定された。

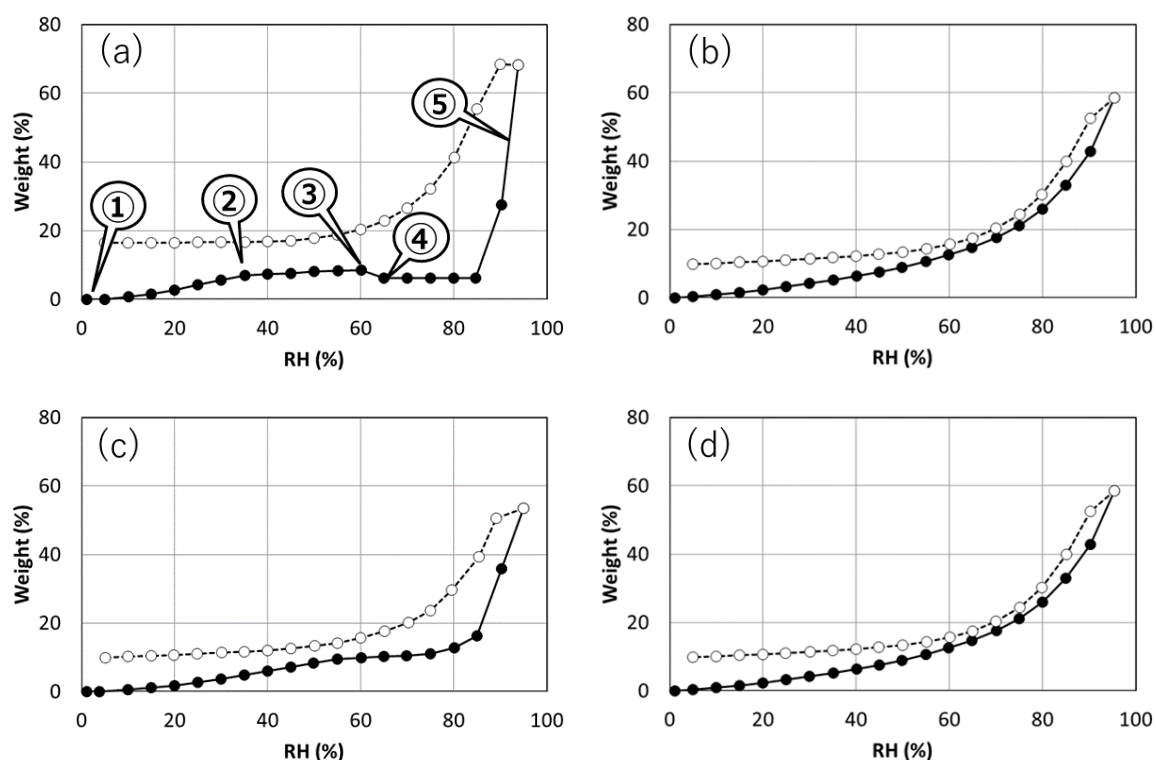


Fig. 4 Water vapor adsorption isotherms of the various powders: (a) The spray-dried sucrose powder, (b) the spray-dried HPC-L powder, (c) the spray-dried HPC-L/spray-dried sucrose powder mixture, and (d) the co-spray-dried HPC-L/sucrose powder.

次に PXRD 測定により、室温保存時におけるスクロースの結晶性変化を観察した。Fig. 5(a)に示すように、測定開始時点ではいずれの粉末についても結晶の回折パターンは観察されず、非晶質であることが示された。25℃、30% RH で 20 日間保存後、再測定を行ったところ、噴霧乾燥スクロース粉末に特有の回折ピークが現れ、スクロースの結晶化が観察された (Fig. 5(b))。また、噴霧乾燥 HPC-L と噴霧乾燥スクロース粉末の物理的混合物でも特有の回折ピークが観察され、スクロース成分が結晶化していることが観察された。対照的に、噴霧乾燥 HPC-L 粉末はその特有のハローパターンを示し、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末も同様のハローパターンを示した。よって、HPC がスクロースの非晶質状態を維持していることが示唆された。以上の結果から、HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥することで、25℃、30% RH 条件下でスクロースの非晶質状態を一定期間保持できることが示唆された。

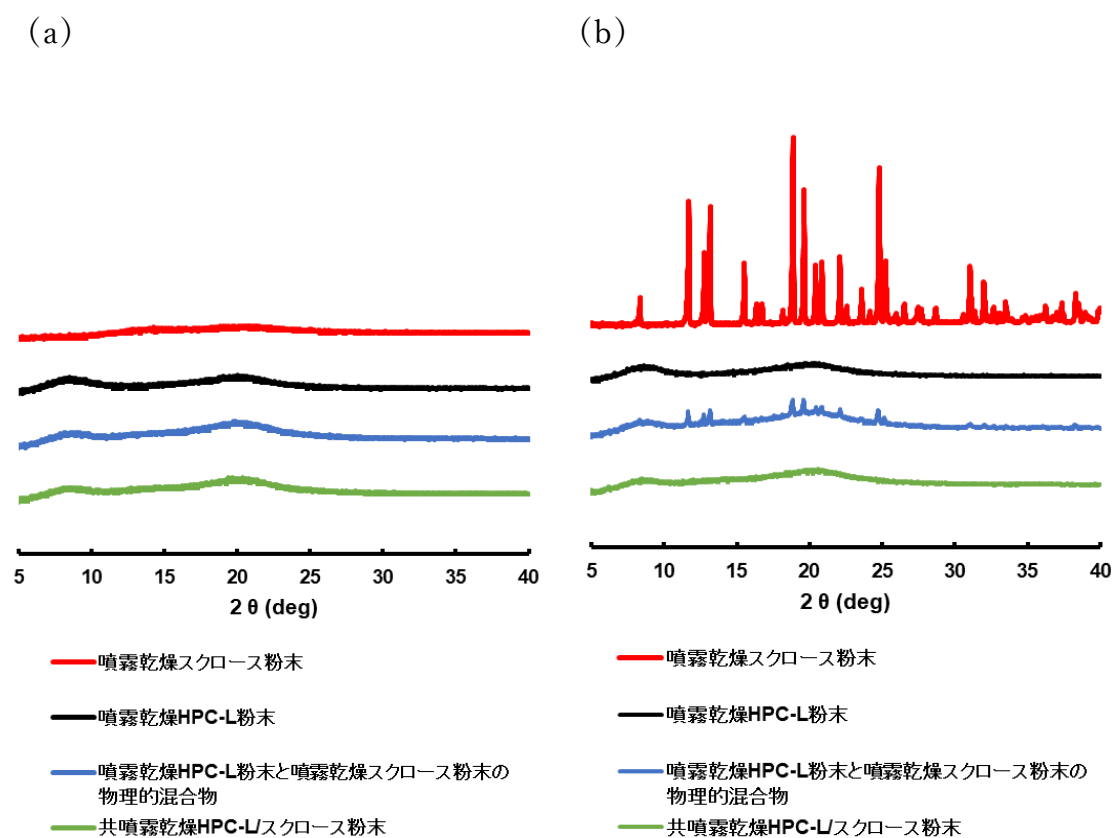


Fig. 5 Powder X-ray diffractograms of the powders stored at 25°C and 30% RH. (a) The initial sample, and (b) after 20 d storage.

第3節 製造時および室温保存時における抗原活性の安定性

噴霧乾燥プロセスでは、熱風との接触によって粉末化が行われるため、抗原活性が熱変性によって低下する可能性がある。そこで、ヘマグルチニン（HA）抗原を含む粉末を作製し、水に溶解して 300 ng の HA を含む水溶液をマウスに皮下投与した。投与後 3 週間で抗 HA IgG 抗体の力価を酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）によって測定した。その結果を Fig. 6 に示す。噴霧乾燥スクロース粉末中の抗原活性は維持されていた。また同様に、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末でも抗原活性が維持されていた。一方、噴霧乾燥 HPC-L 粉末では、陽性対象群に対する抗体価の差が log2 スケールで 2 以上であり、抗原活性が低下していることが示された。

乾燥状態でタンパク質の活性を維持するためには、タンパク質が水溶液中の状態と同様の環境を保持する必要がある。そのため、乾燥時に除去される水分子を賦形剤が補うことが求められる。スクロースのような二糖類はタンパク質の周辺に十分に配置されるため、乾燥時に除去される水分子の代替となる。一方で、デキストランや HPC などの多糖類は鎖状に連結しているため、タンパク質周辺に十分に配置されない場合があり、その結果、水分子の置換作用を十分に発揮できないことがある^{55,56)}。

前述のように、噴霧乾燥 HPC-L 粉末は抗原の安定化効果を示さなかったが、HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥することで抗原の安定化効果が得られた。これらの結果は、HPC-L が乾燥プロセスにおいてスクロース分子の水分子との置換を妨げないことを示している。

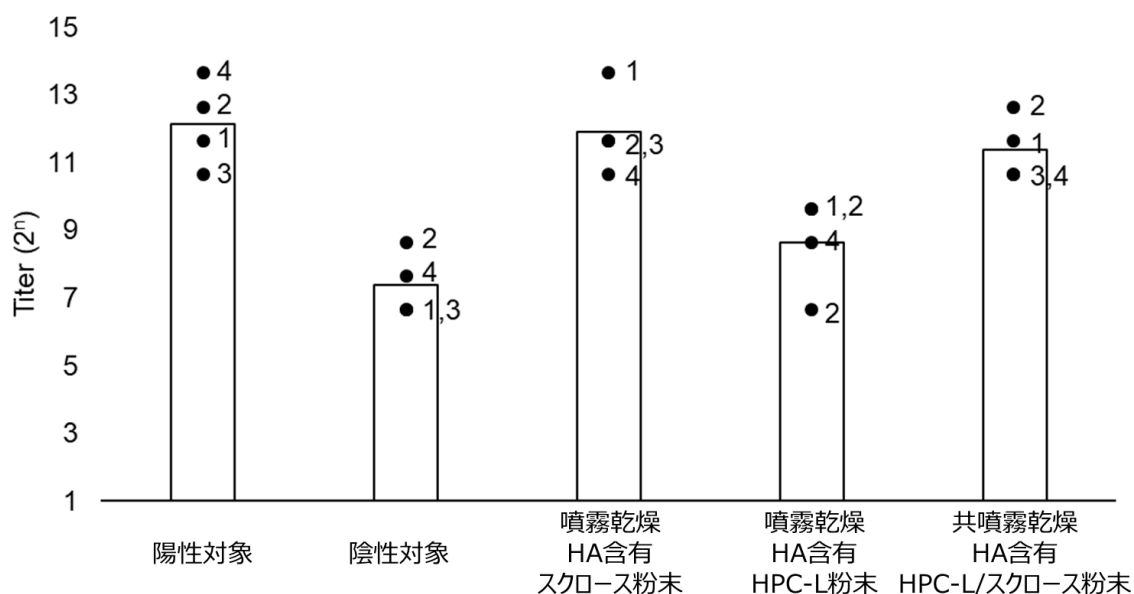


Fig. 6 In vivo antigen activity (Anti-HA IgG titer) of the dry powder influenza HA vaccine. n = 4 for each group.

HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥することによって、抗原を含む安定した粉末が製造できることが示唆された。次に、インフルエンザ全粒子ワクチン (WV) を含む粉末を作製し、スクロースの安定化効果が長期保存後も維持されるかを評価した。まず、赤血球凝集試験と溶血試験の 2 つの in vitro 法を用いて抗原活性を評価した。赤血球凝集試験は、ワクチンの表面にある HA が細胞表面に吸着するプロセスを評価し、溶血アッセイは、HA が細胞内の低 pH 値で構造変化を受けて膜に融合するプロセスを評価するものである。Table 2 に、赤血球凝集試験の結果を示した。安定剤成分を含まない粉末 (陰性対象) の抗原活性は、 -80°C 、6 箇月および 30°C 、6 箇月の保存中にともに 20%以下に低下した。一方、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末では、同じ条件下で保存した後も抗原活性の低下は観察されなかった。また、溶血試験の結果を Table 3 に示す。安定剤成分を含まない粉末 (陰性対象) の抗原活性は、 -80°C 、6 箇月および 30°C 、6 箇月の

保存中にともに 26%に低下した。対照的に、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末では、同じ条件下で保存した後も抗原活性の低下は観察されなかった。

Table 2 Hemagglutination activity of the dry powder WV antigen after 6 months of storage at -80°C or 30°C .

	Hemagglutination activity ¹⁾	
	-80°C 6 months	30°C , 6 months
陽性対象	100	100
陰性対象	20	16
共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末 (WV 抗原を含む)	220	183

1) Each data represents the mean of 2–3 experiments.

Table 3 Hemolytic activity of the dry powder WV antigen after 6 months of storage at -80°C or 30°C .

	Hemolytic activity ¹⁾	
	-80°C , 6 months	30°C , 6 months
陽性対象	100	100
陰性対象	26	26
共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末 (WV 抗原を含む)	238	198

1) Each data represents the mean of 2–3 experiments.

最後に、WV 抗原を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末をマウスに経鼻投与し、その免疫原性を評価した。Fig. 7 (上段) には、血清中の抗 HA IgG 抗体価の結果を示した。保存条件が 30℃、6 箇月および 25℃、15 箇月後の抗 HA IgG 抗体価の陽性対照群に対する差は、log2 スケールで 2 以内であった。また、Fig.7 (下段) には、鼻腔洗浄液中の抗 HA IgA 抗体価の結果を示した。同様の保存条件下で、抗 HA IgA 抗体価の差も陽性対照群に対して log2 スケールで 2 以内であった。これらの結果は、HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥粉末中の WV 抗原が、長期保存後においても IgG だけでなく IgA の産生も誘導することが示された。したがって、この粉末の抗原は室温での長期保存が可能であり、かつ全身免疫を通じて重篤な病状を予防し、粘膜感染に対する保護効果を提供すると考えられる。

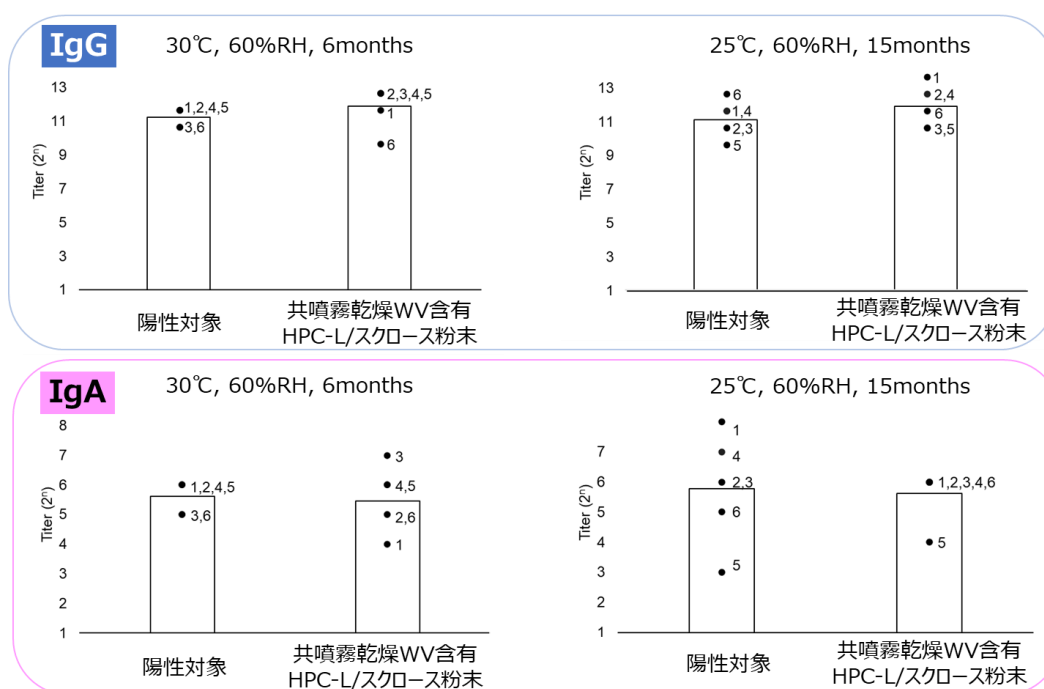


Fig. 7 Anti-HA IgG titer induced in the serum or anti-HA IgA titer induced in the nasal cavity of mice two weeks after the final intranasal immunization of dry powder WV. Immunization was repeated twice with a two-week interval. n = 6 for each group.

多糖類のデキストランにスクロースのような二糖類を混合することで、デキストラン単独よりも優れたタンパク質安定化効果が得られることが明らかとなっているが、タンパク質の長期的な安定化効果は十分に達成されていない⁵⁷⁻⁶⁰⁾。本研究では、HPC-L とスクロースを共噴霧乾燥することにより、長期的な安定化効果を実現できることが示された。

HPC-L は繊維状の構造を有し、デキストランに比べて柔軟性が低いいため、タンパク質を取り囲む際により剛直な構造を形成すると考えられる。このため、HPC-L 単独では抗原の安定化効果は観察されなかった。HPC-L と抗原の間に存在する立体空間にスクロースが侵入することによって、スクロース分子は乾燥時に除去された水分子の置換に寄与したと考えられる。さらに、HPC-L の繊維状構造が、スクロース分子を安定的に配置することを可能にしていると推察される (Fig. 8)。加えて、HPC-L はスクロースの吸湿性を抑制するため、粉末が乾燥した状態を維持しやすく、これにより抗原の安定化効果が製造時および長期保存中に持続する要因となることが示された。これにより、HPC とスクロースの共噴霧乾燥は、抗原を含む粉末の安定性を向上させる効果的な手法であることが示唆された。

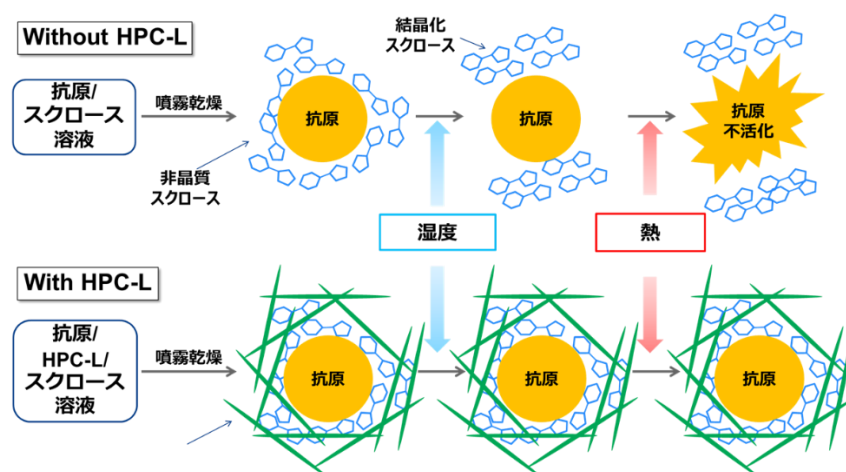


Fig. 8 Synergistic Stabilization of Antigens by Sucrose and HPC-L.

第4節 小括

本章では、抗原活性を安定に維持できる粉末の処方設計について検討した。以下に得られた知見を要約する。

第1節では、粉末の性状変化を評価した。共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末は、25°C、30% RH で7日間保存しても変化が認められなかった。また、SEM 画像分析においても、均一に分散していることが観察された。さらに、ラマンイメージングにおいて、HPC-L とスクロースが粉末内で均一に分散していることが示された。

第2節では、湿度の影響によるスクロースの結晶性変化を検討した。噴霧乾燥スクロース粉末は非晶質で、水蒸気吸着により結晶化することが示された。共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末は、水蒸気吸脱着等温線において 60–65% RH で非晶質状態を維持し、PXRD 測定によっても非晶質状態を維持することが観察された。

第3節では、抗原活性の安定性が評価された。製造時に噴霧乾燥スクロース粉末および共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末は抗原活性を維持していたが、HPC-L 粉末では抗原活性の低下が認められた。さらに、WV ワクチンを含む粉末の長期安定性が評価され、共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末は抗原活性の低下が認められなかった。この結果は、HPC-L とスクロースの共噴霧乾燥が安定した抗原粉末の製造と長期保存に寄与することを示した。

以上の結果より、HPC-L とスクロースの共噴霧乾燥は、点鼻ワクチン粉末製剤の新たな処方として有望であることが示唆された。

第2章 標的部位送達率向上のためのデバイス設計と粉末物性の最適化

通常、インフルエンザワクチンはシーズンごとに1回または2回投与され、経鼻ワクチンの場合、1回の投与量は左右の鼻孔に2つに分けて投与される。これは、インフルエンザワクチンの投与デバイスが、シーズン中に2回または4回しか使用されないことを意味する。したがって、デバイスのコストは使い捨てに適したレベルに抑える必要がある。場合によっては、粉末製剤が製造過程でデバイスに直接充填される低コストの使い捨てデバイスが設計されている。しかし、このような粉末を直接デバイスに充填するアプローチは、インフルエンザワクチンには望ましくない。なぜなら、デバイスに特化した充填装置が必要であり、予期しない感染拡大に対する生産需要の増加に柔軟に対応できないからである。したがって、本研究では粉末剤の単位量がカプセルに充填され、投与時にカプセルをデバイスにセットするカプセルベースの経鼻投与デバイスを選択した。

点鼻ワクチンの標的部位である鼻甲介や鼻咽頭は鼻腔の後方に位置している（Fig. 9）。吸入された空気は鼻腔を通過して垂直に上昇し、方向を変えて咽頭に達する。抗原を標的部位に効果的に届けるためには、非標的領域との接触を最小限にすることが重要である。

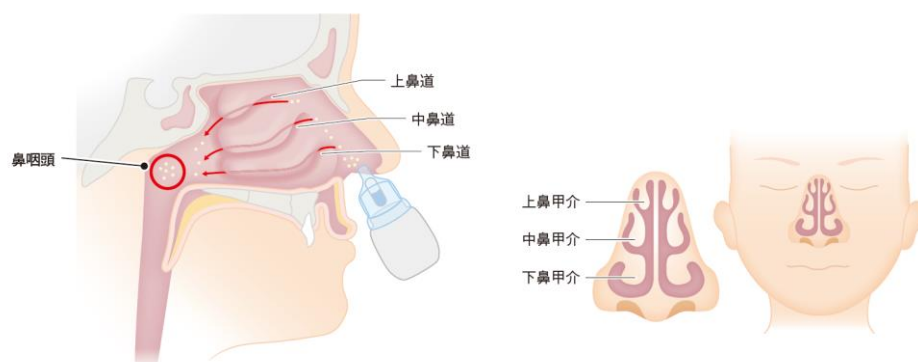


Fig. 9 Image diagram of nose inner structure and powder dispersion.

我々は、ヒト鼻腔モデル (Fig. 10) を用いて、点鼻用デバイスから排出されたモデル抗原粉末の標的部位へ送達率を測定し、噴霧性に影響を与える粉末物性の特定と送達率の最適化を行った。本章では、異なる気流パターンをもつ 2 種類の経鼻投与デバイス (Fig. 11) を作製し、評価に用いた。また、粉末剤は、抗原粉末を適切な担体粉末 (抗原フリー) を物理的に混合したキャリアベースのコンセプトを採用した⁶¹⁻⁶⁸⁾。抗原粉末と担体粉末のさまざまな組み合わせを検討し、両粉末の物理特性が鼻腔内の標的部位への抗原粉末の送達率に与える影響を包括的に検討した。また、鼻甲介や鼻咽頭を標的部位とする薬剤において、気道や肺への移行は有効性に寄与しない無駄な曝露に繋がるだけでなく刺激など予期しない副反応を誘発するリスクに繋がる。そのため、賦形剤が肺組織に曝露されることを最小限に抑えることが望ましい。この安全性の観点に基づいて、微粒子量 (Fine particle fraction) を最小限に抑える粉末物性の範囲を検討した。これらの結果を統合し、経鼻投与デバイスに最適な有効性と安全性を確保することが可能な粉末の物性範囲を特定した。

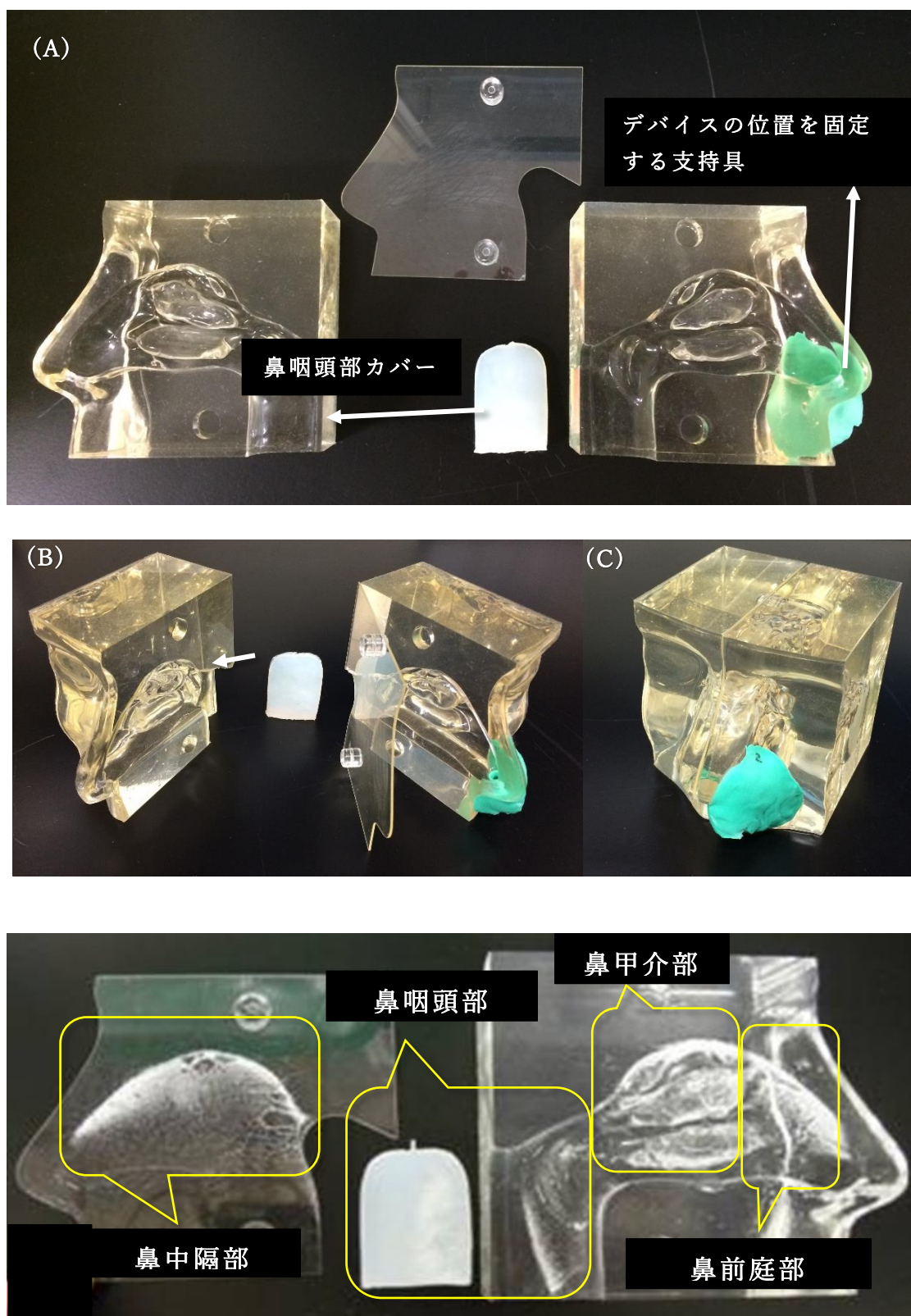
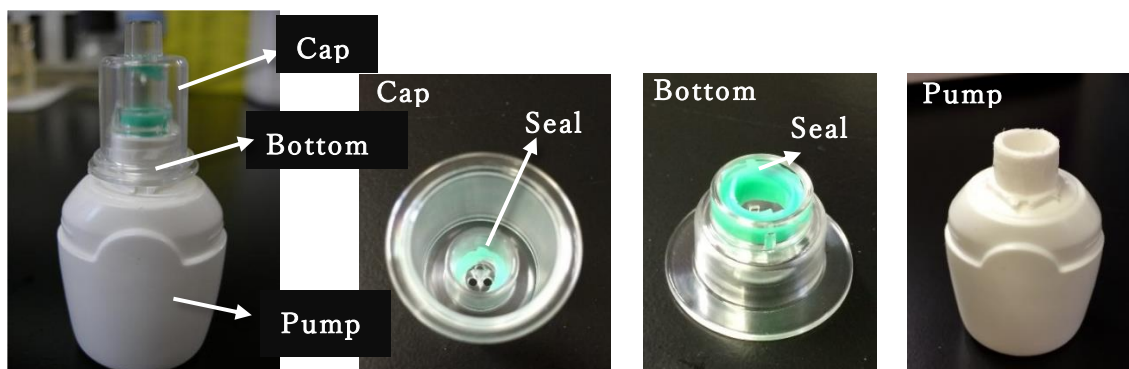


Fig. 10 Silicone cast model of human nasal cavity and partition of the nasal cavity.

< Device A >



< Device B >

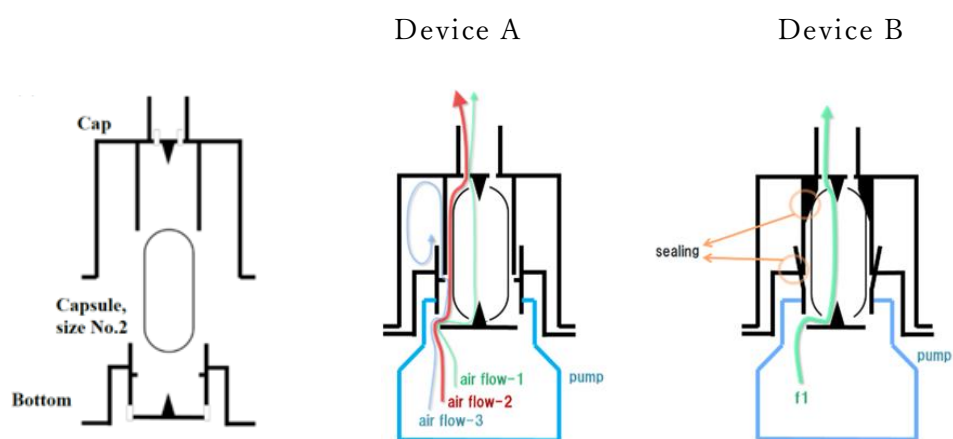
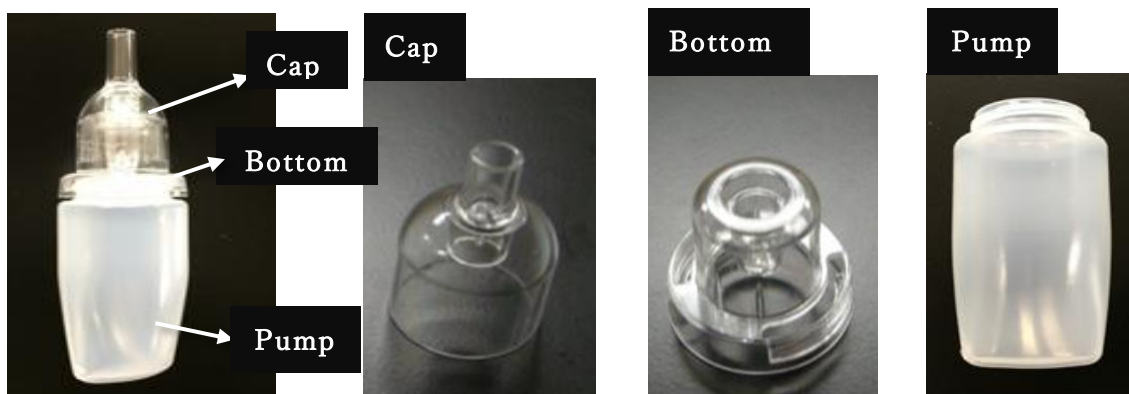


Fig. 11 The appearance and schematic structure of the device.

第1節 抗原粉末の物理的特性が標的部位への送達率に与える影響

プロトタイプデバイス（デバイス A）を用いた予備評価では、標的部位への送達率に影響を与える抗原粉末の物理的特性を評価した。ヒト鼻型モデルにおけるモデル抗原粉末の分布を（Fig. 12）に示す。白色カラムがデバイスへの残存率、灰色カラムが鼻前庭部および鼻中隔部への送達率、赤色カラムが標的部位である鼻甲介部および鼻咽頭部への送達率、黒色カラムが下気道部への送達率を示す。DP1～DP6 は、同じモデル抗原粉末を、材料および粒子径が異なる担体粉末と混合して作製した粉末であり、担体粉末の物理的特性の影響を評価した。また、DP7～DP15 は、材料および組成の異なるモデル抗原粉末を同じ担体粉末とさまざまな混合比で混合して作製した粉末であり、モデル抗原粉末の物理的特性と担体粉末の配合比の影響を評価した。DP1～DP9 の場合、モデル抗原粉末の X50（体積基準のメジアン径）が 3-5 μm の範囲にあり（Table 4-1 および Table 4-2）、デバイス A 内に 30%以上のモデル抗原粉末が残存し、標的部位への送達率は最大で 20%程度であった。一方、DP10～DP15 では、X50 が 10-30 μm の範囲にあり、DP13 を除いてデバイス内の抗原粉末の残存量は比較的少なく、標的部位への送達率は DP1～DP9 よりも相対的に高かった。この結果から、モデル抗原粉末の粒子径がデバイスからの排出率に大きな影響を与えると推察した。

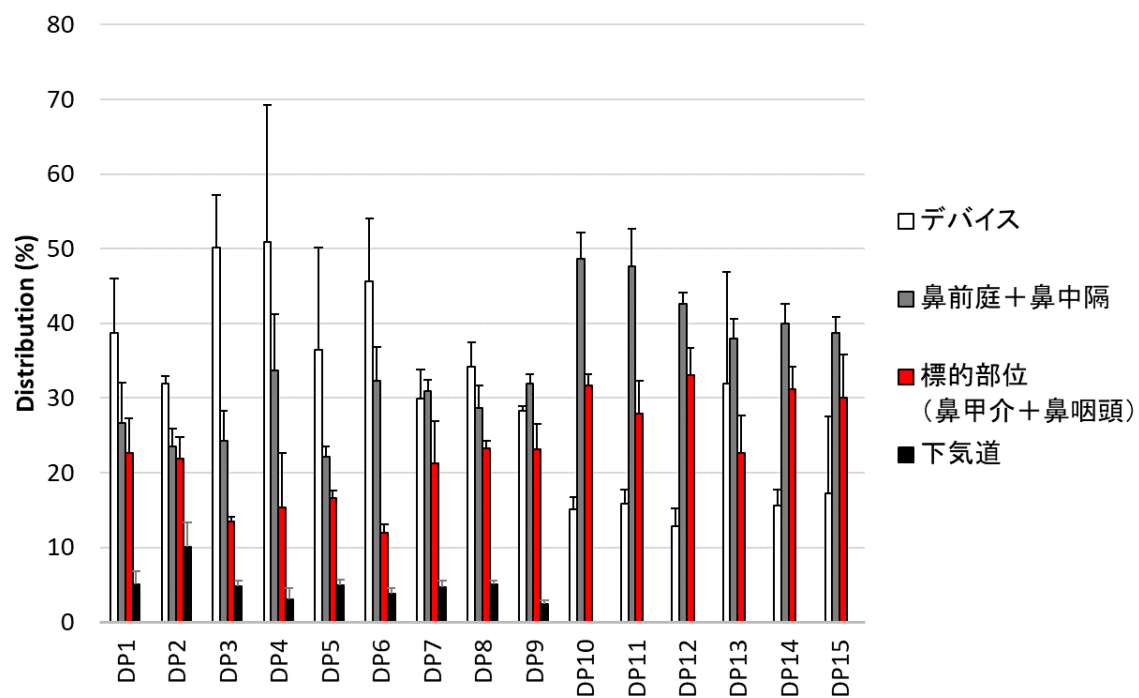


Fig. 12 Distribution of model antigen powder in the nasal cavity of the human nasal cast model (mean $\pm$ standard deviation (SD), n=3).

Table 4-1 Particle size distribution of powder formulation.

Powder mixture		Lot No.	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6
Model Antigen Powder	Lot No.		AP1					
	Particle size distribution (µm) ¹⁾	X10	1.4 ± 0.0					
		X50	5.1 ± 0.0					
		X90	15.3 ± 0.1					
Carrier Powder	Lot No.		CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6
	Particle size distribution (µm) ¹⁾	X10	29.7 ± 0.2	16.6 ± 1.1	34.9 ± 0.6	35.2 ± 1.9	40.4 ± 2.7	153.8 ± 19.0
		X50	56.1 ± 0.1	63.2 ± 0.4	78.4 ± 0.6	135.6 ± 2.6	149.8 ± 15.9	361.4 ± 21.0
		X90	87.2 ± 0.2	122.2 ± 0.3	155.7 ± 2.5	215.7 ± 7.3	348.3 ± 54.4	567.3 ± 24.6

1) mean ± SD, n = 3

Table 4-2 Particle size distribution of powder formulation.

Powder mixture		Lot No.	DP7	DP8	DP9	DP10	DP11	DP12	DP13	DP14	DP15
Model Antigen Powder	Lot No.		AP7	AP8	AP9	AP10	AP11	AP12	AP13	AP14	AP15
	Particle size distribution (μm) ¹⁾	X10	1.1 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	1.0 $\pm$ 0.0	12.1 $\pm$ 0.2	12.0 $\pm$ 0.1	8.4 $\pm$ 0.0	10.5 $\pm$ 0.1	7.7 $\pm$ 0.0	6.4 $\pm$ 0.0
		X50	3.4 $\pm$ 0.0	3.6 $\pm$ 0.0	3.5 $\pm$ 0.1	27.4 $\pm$ 0.1	26.2 $\pm$ 0.2	17.9 $\pm$ 0.1	20.7 $\pm$ 0.1	14.8 $\pm$ 0.1	13.0 $\pm$ 0.0
		X90	13.8 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.2	8.6 $\pm$ 0.3	53.4 $\pm$ 0.6	44.5 $\pm$ 1.0	30.6 $\pm$ 0.3	35.7 $\pm$ 0.3	26.1 $\pm$ 0.2	22.9 $\pm$ 0.1
Carrier Powder	Lot No.		CA7	CA7	CA7	CA7	-	CA7	-	CA7	CA7
	Particle size distribution (μm) ¹⁾	X10	8.8 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.2	-	8.8 $\pm$ 0.2	-	8.8 $\pm$ 0.2	8.8 $\pm$ 0.2
		X50	26.1 $\pm$ 0.8	26.1 $\pm$ 0.8	26.1 $\pm$ 0.8	26.1 $\pm$ 0.8	-	26.1 $\pm$ 0.8	-	26.1 $\pm$ 0.8	26.1 $\pm$ 0.8
		X90	61.9 $\pm$ 5.7	61.9 $\pm$ 5.7	61.9 $\pm$ 5.7	61.9 $\pm$ 5.7	-	61.9 $\pm$ 5.7	-	61.9 $\pm$ 5.7	61.9 $\pm$ 5.7

1) mean $\pm$ SD, n = 3

次に、DP7～DP15（担体粉末を含まない DP11 と DP13 を除く）において、モデル抗原粉末の粒子径とデバイス A からの排出率の相関を検証した（Fig. 13）。粒子径と排出率の相関係数 R^2 は 0.9727 であり、良好な線形相関を示した。評価した粒子径の範囲内で、モデル抗原粉末の粒子径とデバイスからの排出率が線形に相関することが示された。これは、粒子径がデバイスからの排出率において重要な要素であることを示唆している。一般的に、微細粉末はファンデルワールス力、静電気、水分などの影響により凝集しやすいと報告されており⁶⁹⁻⁷¹⁾、粒子径を大きくし微細粉末を減少させることで、モデル抗原粉末の凝集や担体粉末との凝集を抑制し、排出率を改善することができると考えられる。次に、デバイスからの排出率と標的部位へのモデル抗原粉末の送達率の関連性を評価した。結果は Fig. 14 に示しており、相関係数 R^2 は 0.8437 で、良好な線形相関を示した。標的部位への送達率は、デバイスからの排出率と排出された粉末の標的部位への送達率（デバイスから排出された粉末の中で標的部位に送達される抗原粉末の割合）の 2 つの要素の積であり、高い標的部位への送達率を達成するためには、高い排出率を確保することが前提条件であることは明らかである。粉末のデバイスからの放出は、デバイス内の空気の流れを最適化することによって改善されることが報告されている^{72, 73)}。そこで、デバイス内の気流パターンを分析し、粉末排出率が改善されたデバイス B を設計した。まず、キャップとボトムの接合部の形状を変更し、より接着させた。さらに、カプセル穿刺時の開口部を拡大するために針の形状を修正し、カプセルからの空気の流出経路を拡大するために排気ポートの形状も修正した。その結果、粉末放出が改善されたデバイス B が設計された。デバイ

ス A で得られた知見に基づき、モデル抗原粉末の標的部位への送達の実現可能性をデバイス B で再評価した。

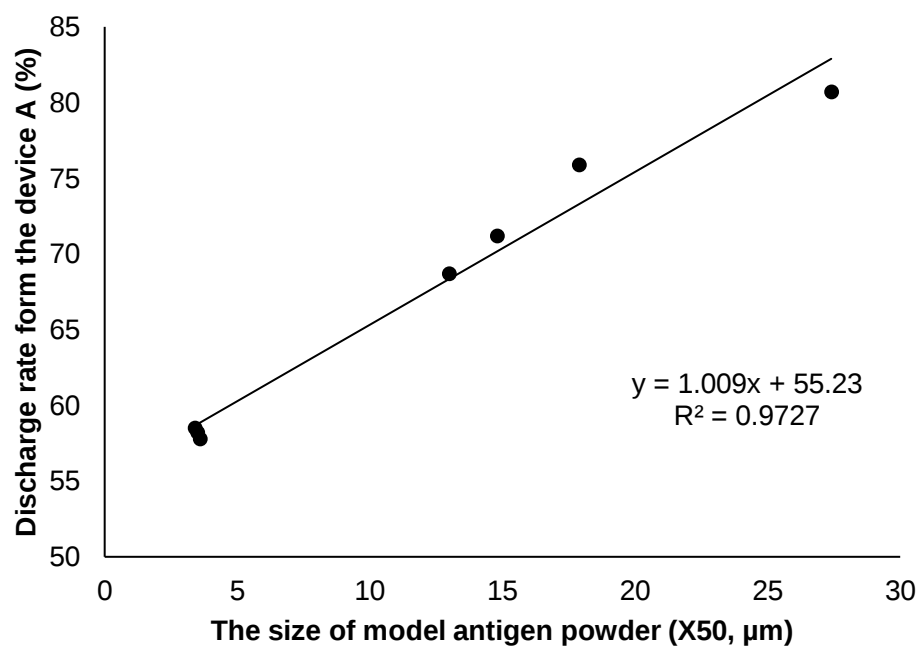


Fig. 13 Correlation between model antigen powder size and device discharge rate.

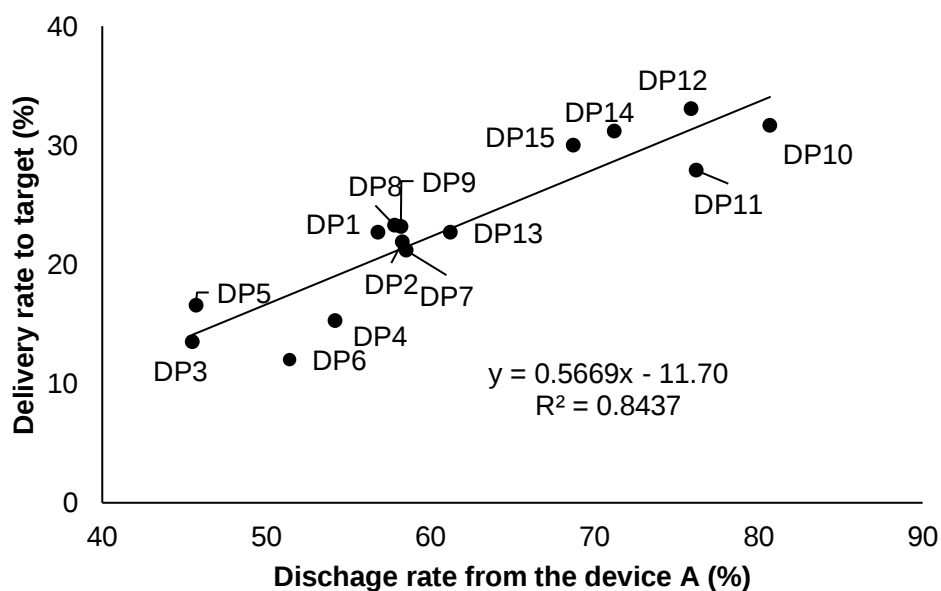


Fig. 14 Correlation between model antigen powder delivery rate to target site and device discharge rate.

第2節 抗原粉末の物理的特性がデバイスからの排出率および標的部位への送達率に与える影響

異なる粒子径をもつ2種類のモデル抗原粉末と、異なる粒子径をもつ5種類の担体粉末を作製し、それらを混合して10種類の粉末剤を作製し、粒子径を測定した (Table 5)。また、デバイス B を使用して標的部位へのモデル抗原粉末の送達率を評価した。ヒト鼻腔モデルにおけるモデル抗原粉末の分布を Fig. 15 に示す。デバイス A と比較して、デバイスへの残存率 (白色カラム) が軽減し、デバイスからの粉末の排出率が改善されたことが示された。さらに、標的部位への送達率 (赤色カラム) も改善され、DP17~19、DP21、および DP22 では、標的部位送達率が 40% を超えた。

DP16~DP20 は、モデル抗原粉末 AP11 (X50 13.7 μm) に担体粉末 CA8~CA12 を混合した粉末、DP21~DP25 は、モデル抗原粉末 AP12 (X50 28.1 μm) に担体粉末 CA8~CA12 を混合した粉末である。同じ担体粉末を混合したにもかかわらず、標的部位送達率は DP16~DP20 群と DP21~DP25 群で異なっていた。この結果は、抗原粉末のサイズと担体粉末のサイズの間に関連した相互作用があり、標的部位への送達率に影響を与えていることを示唆している。

Table 5 Particle size distribution of powder formulation.

Model Antigen powder	Lot No.		AP11					AP12				
	Particle size distribution (μm) ¹⁾	X10	7.0 ± 0.0					12.1 ± 0.1				
		X50	13.7 ± 0.0					28.1 ± 0.1				
		X90	25.5 ± 0.2					58.4 ± 0.6				
Carrier powder	Lot No.		CA8	CA9	CA10	CA11	CA12	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12
	Particle size distribution (μm) ¹⁾	X10	3.7 ± 0.0	11.7 ± 0.2	12.2 ± 0.2	16.2 ± 1.5	39.0 ± 1.8	3.7 ± 0.0	11.7 ± 0.2	12.2 ± 0.2	16.2 ± 1.5	39.0 ± 1.8
		X50	8.9 ± 0.1	37.7 ± 0.6	49.3 ± 0.6	52.0 ± 1.7	135.0 ± 7.0	8.9 ± 0.1	37.7 ± 0.6	49.3 ± 0.6	52.0 ± 1.7	135.0 ± 7.0
		X90	17.2 ± 0.0	86.0 ± 1.4	92.0 ± 0.5	93.2 ± 0.6	261.7 ± 6.7	17.2 ± 0.0	86.0 ± 1.4	92.0 ± 0.5	93.2 ± 0.6	261.7 ± 6.7
Powder mixture	Lot No.		DP16	DP17	DP18	DP19	DP20	DP21	DP22	DP23	DP24	DP25
	Particle size distribution (μm) ¹⁾	X10	3.8 ± 0.0	7.7 ± 0.1	8.1 ± 0.1	8.0 ± 0.3	8.8 ± 0.1	4.1 ± 0.1	12.5 ± 0.3	12.9 ± 0.1	14.2 ± 0.6	17.7 ± 0.4
		X50	11.6 ± 0.0	20.9 ± 0.0	20.7 ± 0.5	21.1 ± 0.2	25.8 ± 1.4	13.3 ± 0.2	35.2 ± 0.4	39.0 ± 0.0	43.2 ± 0.3	73.4 ± 5.7
		X90	23.5 ± 0.2	68.0 ± 1.1	70.4 ± 0.7	78.3 ± 0.2	216.3 ± 8.4	46.4 ± 0.5	79.6 ± 1.9	82.2 ± 0.5	89.0 ± 0.6	230.5 ± 18.6
	Fraction under 5 μm (%) ²⁾		14.3 ± 0.1	5.4 ± 0.1	4.5 ± 0.1	5.0 ± 0.9	1.4 ± 0.0	14.2 ± 0.2	3.4 ± 0.0	3.1 ± 0.0	1.7 ± 0.6	1.5 ± 0.0
	Fine particle dose (%) ³⁾	Model Antigen powder	0.17 ± 0.04	0.27 ± 0.00	0.23 ± 0.06	0.14 ± 0.07	0.19 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
		Carrier powder	3.13 ± 0.49	0.51 ± 0.01	0.53 ± 0.06	0.42 ± 0.14	0.07 ± 0.02	4.45 ± 0.03	0.49 ± 0.01	0.26 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.20 ± 0.03

1) mean $\pm$ SD, n = 3; 2) mean $\pm$ SD, n = 3; 3) mean $\pm$ SD, n = 2

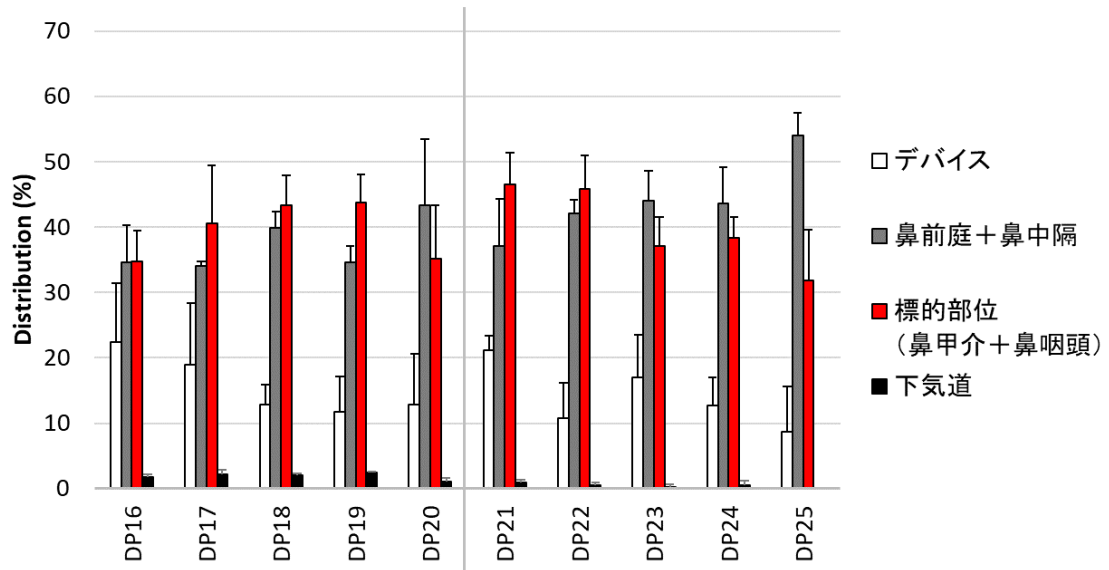
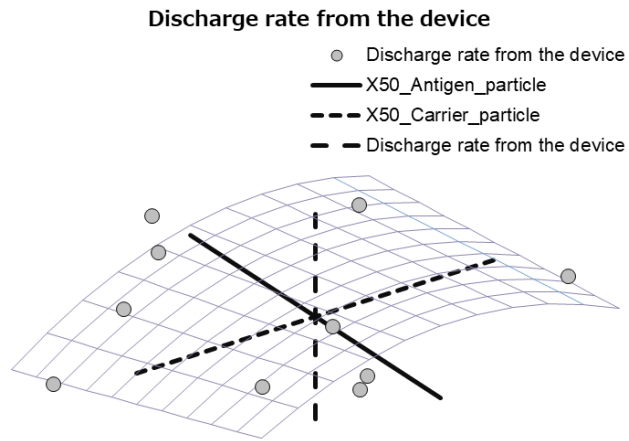


Fig. 15 Distribution of model antigen powder into the nasal cavity of the human nasal cast model (mean $\pm$ SD, n=3).

交互作用の様式を明らかにするために、抗原粉末の標的部位への送達率を、デバイスからの排出率とデバイスから排出された粉末の中で標的部位に送達した抗原粉末の割合の2要素に分解した。また、それぞれの要素に対する抗原粉末と担体粉末の粒子径の影響を別々に分析した。Fig16(a)は、デバイスからの排出率に対する、抗原粉末のX50および担体粉末のX50の関係を示している。この関係を表現するために、線形および非線形項を含む方程式を用いた非線形回帰分析が行われ、Fig16(a)に示すように回帰曲面を表す式 Eq. (1) が算出された。

$$\begin{aligned}
 \text{Discharge rate from the device} = & 0.531 X50_{\text{Antigen particle}} - 0.000859 X50_{\text{Carrier particle}}^2 + 0.211 X50_{\text{Carrier Particle}} \\
 & + 66.152 - 0.00248 X50_{\text{Antigen particle}} X50_{\text{Carrier Particle}}
 \end{aligned}
 \quad \text{Eq. (1)}$$

(a)



(b)

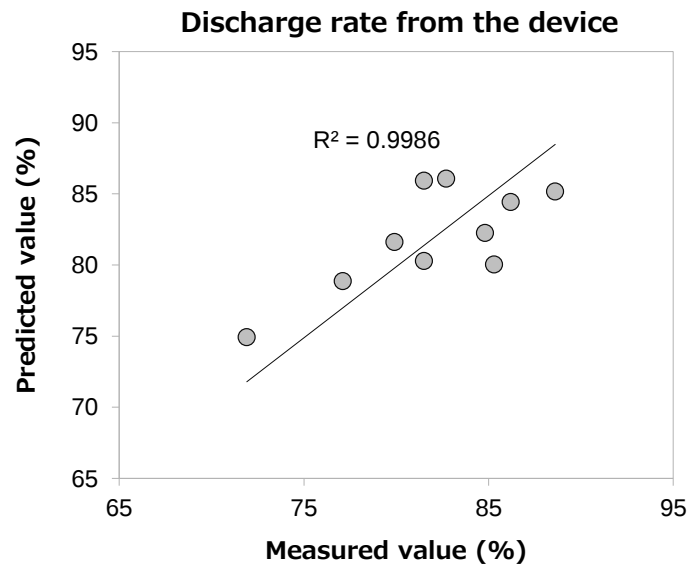


Fig. 16 The relationship between the discharge rate from the device, X50 of antigen particle and X50 of carrier. The grey plots in (a) represent the measured value, and the anticlastic surface in (a) represents the regression surface derived by JMP. The grey plots in (b) represent the relationship between the measured value and the predicted value by the regression surface.

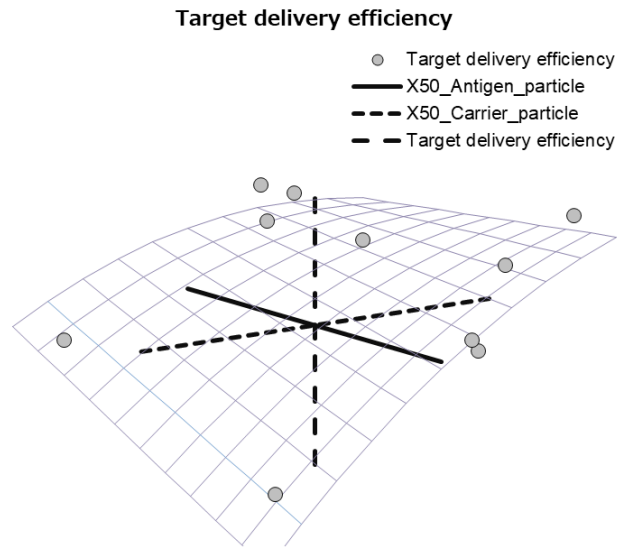
上記の方程式の変数は非線形最小二乗法を用いて決定された。デバイス B では、抗原粉末の X50 に対してデータポイントが 2 つしかないが、デバイス A の結果を考慮すると、排出率と標的部位への送達率はともに抗原粉末の X50 に対して単調に変化することが予想される。したがって、排出率と標的部位への送達率は X50 抗原粉末に対して線形関係をもつと仮定した。一方、担体粉末の X50 に関しては、排出率と標的部位への送達率が最大値に達する特定の粒子径で非線形相関を示し、抗原粉末の X50 に応じて担体粉末の X50 のピーク値が変化することが示唆されている。これにより、2 つの変数間に交互作用があることが示され、抗原粉末の X50 と担体粉末の X50 の積を含む項も追加された。

Fig. 16 (b) は、デバイスからの実測の排出率と Eq. (1) によって予測された値との相関を示している。決定係数 R^2 は 0.9986 であり、良好な回帰を示した。同様に、標的部位への送達率、抗原粉末の X50、および担体粉末の X50 との関係は Fig. 17 (a) に示されており、非線形回帰分析によって導出されたフィッティング面が Eq. (2) として記述されている。

$$\begin{aligned} \text{Target delivery efficiency} = & 0.00153 X50_{\text{Antigen particle}} - 4.85 \times 10^{-6} X50_{\text{Carrier particle}}^2 + 0.00108 X50_{\text{Carrier particle}} \\ & + 0.489 - 6.17 \times 10^{-5} X50_{\text{Antigen particle}} X50_{\text{Carrier particle}} \end{aligned} \quad \text{Eq. (2)}$$

Fig. 17 (b) は、実測の標的部位への送達率と Eq. (2) によって予測された値との相関を示している。決定係数 R^2 は 0.9981 であり、良好な回帰を示した。

(a)



(b)

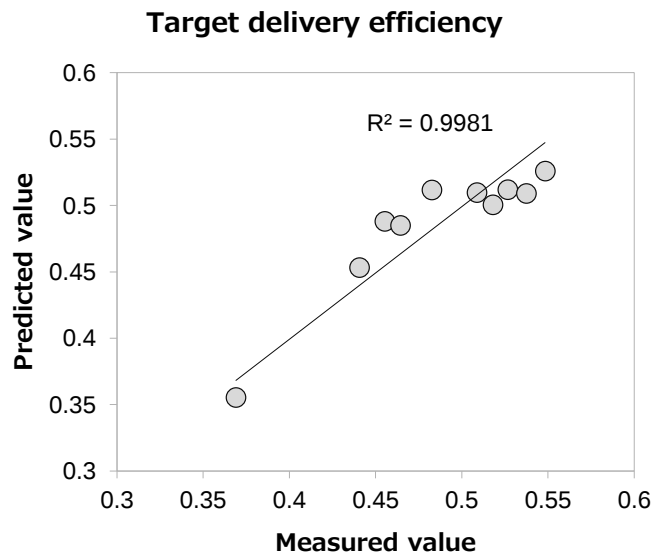
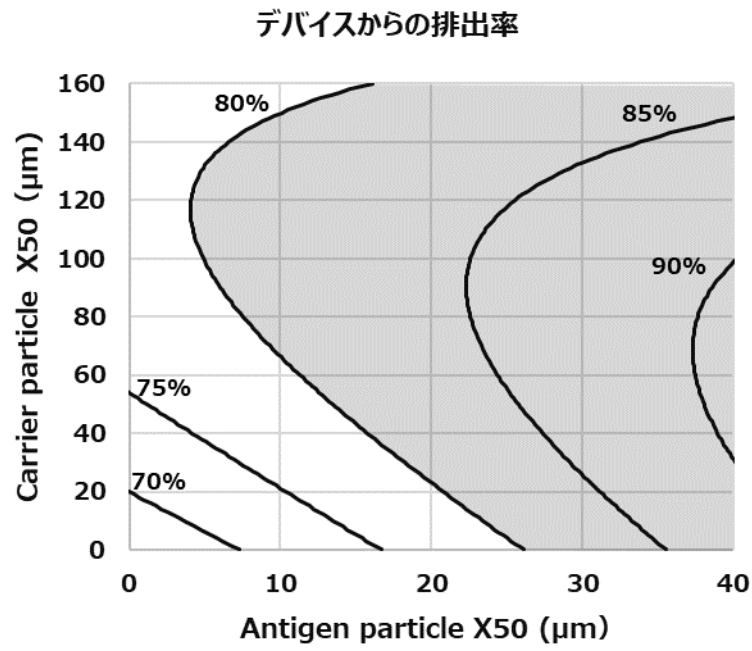


Fig. 17 The relationship between the target delivery efficiency, X50 of antigen particle and X50 of carrier. The grey plots in (a) represent the measured value, and the anticlastic surface in (a) represents the regression surface derived by JMP. The grey plots in (b) represent the relationship between the measured value and the predicted value by the regression surface.

Fig. 18 (a) および (b) は、それぞれ Eq. (1) から導出されたデバイスからの排出率の等高線プロットと、Eq. (2) から導出された標的部位への送達率の等高線プロットを示している。Fig. 18 (a) は、モデル抗原粉末の粒子径が大きくなるにつれて排出率が増加することを示唆しているが、抗原粉末のサイズが固定された場合、排出率は特定の担体粉末のサイズで最大に達し、抗原粉末のサイズが $5\text{ }\mu\text{m}$ から $40\text{ }\mu\text{m}$ に増加するにつれてピーク位置が $120\text{ }\mu\text{m}$ から $60\text{ }\mu\text{m}$ にシフトすることが示されている。Fig. 18 (a) の灰色の領域は、排出率が 80%以上確保される領域を示している。Fig. 18 (b) は、標的部位への送達率が灰色の領域内で 50%の区間で最大に達し、その後両方の担体粉末と抗原粉末のサイズがこの領域から離れるにつれて減少することを示唆している。Fig. 18 (a) および (b) の灰色の領域を重ね合わせることで、標的部位へのモデル抗原粉末の送達率が 40%以上確保される領域が特定された (Fig. 19)。

(a)



(b)

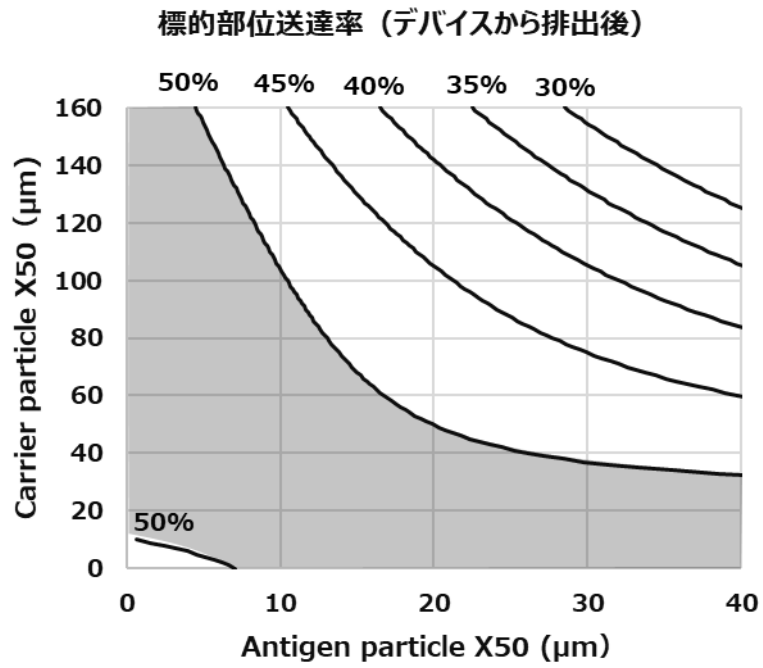


Fig. 18 The contour plots of the discharge rate from the device derived by Eq. (1) or those of the target delivery efficiency derived by Eq. (2).

最後に、安全性を考慮した最大標的部位送達率を得られる粒子径の範囲を検証した。経鼻インフルエンザワクチンの開発には、安全性の考慮が必要である。鼻腔内でより深く位置する気道や気管支への粉末の送達は、効果がないだけでなく、肺組織の炎症や痛み、腫れといった症状を引き起こす可能性がある。一般に、空気力学的粒子径が $5\mu\text{m}$ 未満の粒子は鼻腔よりも深い部分に送達されることが報告されている^{74, 75)}。Table 4 に示されるように、モデル抗原粉末の X50 が $13.7\mu\text{m}$ のとき、微粒子量は 1%未満であり、X50 が $28.1\mu\text{m}$ のときは検出されなかった。これは、モデル抗原粉末の X50 を $13.7\mu\text{m}$ 以上に調整することで、微粒子量を 1%未満に抑制できることを示唆している。また、Table 5 には担体粉末の X50 を $37.7\mu\text{m}$ 以上に制御することで、微粒子量を 1%未満に抑制できることも示唆している。これらの考慮事項を Fig. 18 (a) および (b) の灰色の領域と重ね合わせるにより、デバイス B で粉末を噴霧した際の最大標的部位送達率 40%以上を安全に送達可能な粒子径の範囲が Fig. 19 の灰色の領域として特定された。なお、Fig. 18 (a) および (b) の等高線プロットはモデル抗原で得られたものであり、実際の抗原で得られたプロットと必ずしも一致しない可能性がある。これは、実際の抗原粉末の物理化学的特性（例：凝集性、摩擦、粗さなど）がモデル抗原とは異なるためである。この違いが、デバイスからの排出中の粉末の分散様式に顕著な影響を与えられられる。したがって、今後の開発段階では、製剤の最適化に向け、デバイスをさらに改良し、実際の抗原粉末を用いた等高線プロットの再構築が求められる。この取り組みは、より精密で効果的な点鼻粉末ワクチン製剤の実現を目指すものであり、製剤開発において重要な一步となる。具体的には、

対象となる抗原の特性を考慮することで、実用的な応用が広がり、ワクチンの研究開発分野における新たな知見の創出が促進されると期待される。

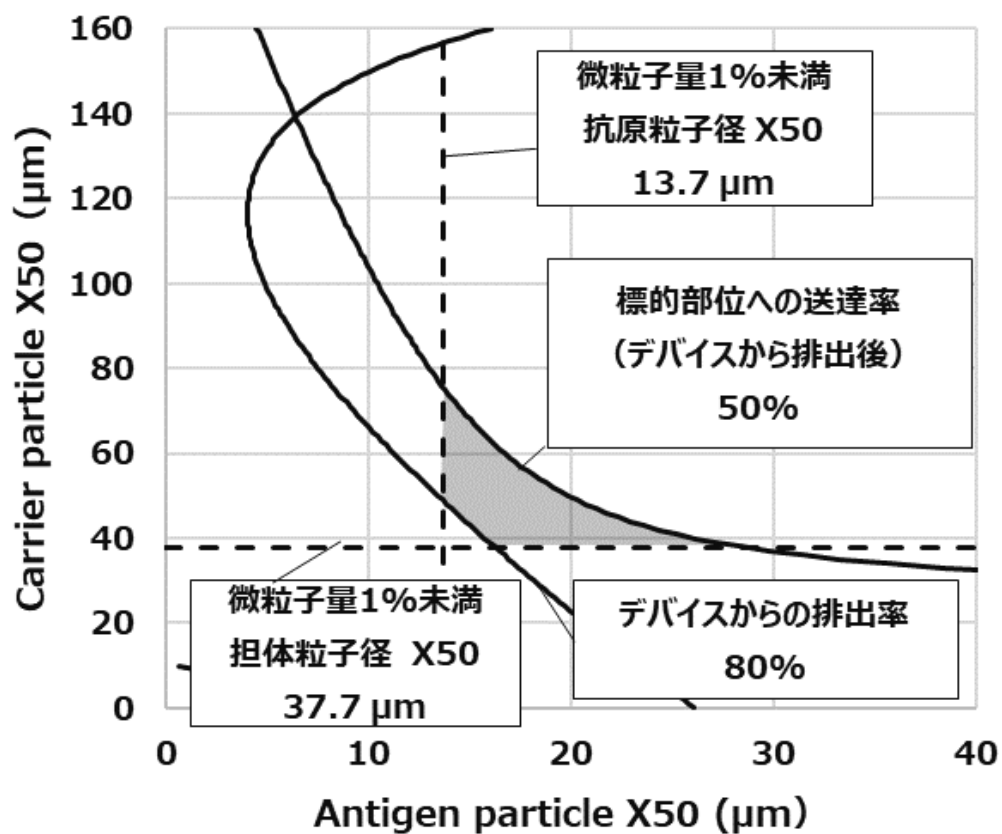


Fig. 19 Optimal range of powder properties to ensure more than 40% delivery rate to the target site and less than 1% of the fine particle fraction of both antigen powder and carrier powder.

第3節 小括

本章では、カプセルベースの経鼻投与デバイスを開発し、抗原粉末の物理的特性がデバイスからの排出率および標的部位への送達率に与える影響を評価した。

第1節では、デバイス A を用いて、モデル抗原粉末の粒子径がデバイスの排出性に寄与することを明らかにした。特に、粒子径の大きいモデル抗原粉末は、デバイスから排出されやすいことが示された。これに基づき、デバイス B を設計し、気流パターンを最適化することで、排出率と送達率の向上を図った。

第2節では、デバイス B を用いて、異なる粒子径をもつモデル抗原粉末と担体粉末の組み合わせが標的部位への送達率に与える影響を詳細に解析した。非線形回帰分析により、抗原粉末と担体粉末の粒子径の交互作用が重要であることが示された。特に、抗原粉末の X50 を $13.7\mu\text{m}$ 以上、担体粉末の X50 を $37.7\mu\text{m}$ 以上に調整することで、標的部位への送達率が 40% 以上に達する際に安全に投与できる粉末特性の範囲を特定した。

本章の成果は、経鼻ワクチンの開発における新たな知見を提供し、今後の実際の抗原製剤の最適化に向けた基盤となることが期待される。将来的には、実際の抗原粉末を用いて等高線プロットを再構築し、さらなる応用を目指すことが重要である。

総括

本研究では室温で保存可能な点鼻ワクチン粉末の製剤開発を目指し、使い捨ての経鼻投与デバイスを用い、抗原を鼻腔の標的部位に直接送達できる粉末の最適化を行った。

第1章では、抗原活性を安定に維持できる粉末の処方設計について詳細に検討した。共噴霧乾燥法にて、HPCとスクロースを組み合わせた粉末を製造することで、温度に対する抗原の安定性と湿度に対するスクロースの安定性が向上することが示された。また、共噴霧乾燥により得られた粉末は、抗原が安定した状態で保持され、室温での保存が可能であることが示唆された。

第2章では、カプセルベースの経鼻投与デバイスの設計を通じて、抗原粉末の物理的特性がデバイスからの排出率および標的部位への送達率に与える影響を詳細に解析した。プロトタイプデバイス（デバイスA）と改良型デバイス（デバイスB）を用いて、抗原粉末の粒子径や担体粉末の特性が送達率に果たす重要な役割を明らかにした。特に、粒子径が大きいモデル抗原粉末はデバイスからの排出性が向上し、標的部位への送達率が改善されることが示された。また、非線形回帰分析により、抗原粉末と担体粉末の粒子径の交互作用が重要であることが示唆され、特定の粒子径の組み合わせで標的部位への送達率を40%以上に確保できる粉末特性の範囲が特定された。

本研究の成果は、点鼻ワクチンの開発における新たなアプローチを提供し、今後の抗原製剤の最適化に向けた基盤を築くものである。特に、抗原粉末の物性やデバイスの設計に基づいた開発戦略は、効果的かつ安全なワ

クチン投与の実現に寄与する重要な要素であり、これにより多くの患者に対して迅速かつ効果的なワクチン接種が可能となる。また、本研究で得られた知見は、経鼻ワクチンに限らず、さまざまな薬剤の投与方法やデバイス設計にも応用可能であり、医療分野における新たな革新を促進するものである。今後の研究においては、実際の臨床試験を通じて、これらの粉末特性やデバイス設計がもたらす効果を実証し、経鼻ワクチンの効果を最大限に引き出すための実用化を進めることが重要である。

実験の部

試薬

スクロースは和光純薬工業株式会社またはメルクミリポア社から購入した。トレハロースは林原株式会社から購入した。HPC-L (140,000 g/mol) および HPC-SSL (40,000 g/mol) は株式会社日本曹達から購入した。大豆レシチンは NOF 株式会社から購入した。コレステロールは株式会社日本ファインケミカルから購入した。セチルピリジニウム塩化物はシグマアルドリッチ社から購入した。インフルエンザ HA ワクチン (HA) およびインフルエンザ全ウイルスワクチン (WV) はウイルス株 A/California/07/2009 (X-179A) を使用したもので、北里第一三共ワクチン株式会社から提供された。BALB/c マウス (雌、7 週齢) は日本チャースル・リバー株式会社から購入した。アシッドブルー 9 (モデル抗原) は東京化成工業から、フルオレセインナトリウム塩はシグマアルドリッチ社から、Respitose SV003 は DEF ファーマ社から、ダイラクトーズ S はフロイント産業株式会社から、Pearlitol 200SD はルケットフレール社から、マクロゴール 4000PS は三洋化成工業株式会社から、Methocel K4M はダウケミカルカンパニーから、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) はサーモフィッシャーサイエンティフィック社から購入した。リン酸二水素カリウム、リン酸水素ナトリウム水和物、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、カルボキシルビニルポリマー、アセトニトリル、およびエタノールは和光純薬工業株式会社から購入した。溶媒として Milli-Q 水を使用した。他の分析用試薬はすべて分析グレードのものをを使用した。

第 1 章 抗原活性を安定に維持できる粉末の処方設計

噴霧乾燥法

Büchi B-290 ミニスプレードライヤー (BÜCHI Labortechnik AG.製) を用いて作製した。ノズルは二流体ノズル・オリフィス径 0.5 mm を使用した。噴霧乾燥条件は以下のとおりである。Inlet air temperature, 120–130°C; Outlet temperature, 70–80°C; Gas flow, 400 L/min; Aspiration pressure, -85 mbar; Flow of spray liquid, 1.5–2.0 mL/min。噴霧乾燥賦形剤溶液の濃度は 7.5～10 w/w%にした。粉末はガラスバイアル (第一ガラス株式会社製) に収集し、バイアルは乾燥剤 (FUJIGEL SANGYO Ltd.製) で密閉した。

粉末形状の外観検査 (目視)

噴霧乾燥粉末の外観の変化は目視検査によって評価した。最初の実験では、91.79%スクロースと 8.21%PBS 塩を含む噴霧乾燥スクロース粉末と、91.79%HPC-L と 8.21%PBS 塩を含む噴霧乾燥 HPC-L 粉末を噴霧乾燥法により作製した。これらの粉末をガラスプレートに広げ、25°Cおよび 60%RH または 30%RH の条件下で 2 日間放置した (ナガノサイエンス株式会社製)。次の実験では、1.61%モデル抗原 (大豆レシチン/コレステロール/セチルピリジニウム塩化物 = 41.904/14.581/24.101 (w/w/w))、90.33%スクロース、8.06%PBS 塩を含む噴霧乾燥スクロース粉末と、64.52%HPC-L、25.81%スクロース、1.61%モデル抗原、8.06%PBS 塩を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末を噴霧乾燥により作製した。これらの粉末をガラスプレートに広げ、25°Cおよび 60% RH または 30% RH の

条件下で 2 日または 7 日間放置した。保管期間終了後、検体の外観を目視で評価し、「No change」（変化なし）、「Agglomeration」（凝集固化）、「Deliquescence」（潮解）として分類した。

粉末形状の外観検査（SEM）

100%スクロースを含むスクロース粉末、100% HPC-L を含む HPC-L 粉末、50% HPC-L および 50%スクロースを含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末を噴霧乾燥により作製した。噴霧乾燥 HPC-L 粉末と噴霧乾燥スクロース粉末を同量混合し、めのう製乳鉢で 30 秒間混合して噴霧乾燥 HPC-L と噴霧乾燥スクロース粉末の物理的混合物を作製した。SEM 画像は、JSM-IT200 SEM（日本電子株式会社、東京、日本）を使用し、15 kV の電圧で取得した。試料は 25°C、30% RH で調整直後、金でコーティングせずに測定した。

粉末形状の外観検査（ラマンイメージング）

SEM で評価した粉末を使用した。共焦点ラマン顕微鏡 LabRAM HR Evolution（HORIBA, Ltd.製）を用いて、ラマンスペクトルを取得した。検体は 100 倍の対物レンズを通して 532 nm レーザーで励起された。2.0 μm のステップサイズを用い、20 $\times$ 20 (X, Y) μm の領域をスキャンするために 10 秒の露光時間を使用した。検体のラマンシグネチャはフィンガープリント領域（134–3184 cm^{-1} ）で取得した。LabSpec 6 ソフトウェアを用いてスペクトルの収集、スペクトルの前処理、およびデータセットの処理を行った。得られたスペクトルは蛍光の影響を除去するために前処理

し、その後、古典的最小二乗法（CLS）アルゴリズムを用いて画像を生成した。

水蒸気吸脱着等温線測定

SEM で評価した粉末を使用し、VTI-SA 装置（TA Instruments 製）を用いて測定した。試料（約 10 mg）を 25°C で水蒸気吸着 5% および 95% RH の条件下で繰り返し測定した。水分量が 5 分間で 0.03 wt% 変化しなかった場合、ステップの開始から 180 分後に次のステップへ進ませた。

粉末 X 線回折（PXRD）測定

SEM で評価した粉末を使用した。噴霧乾燥粉末はポリエステルフィルム（Chemplex industries, Inc. 製）で挟み、25°C、30% RH の条件下で恒温恒湿槽（ナガノサイエンス株式会社製）に 20 日間保存した。噴霧乾燥粉末は、多目的 X 線回折装置 Empyrean（Malvern Panalytical Ltd 製）を用い、室温で測定した。データは、45 kV/40 mA の Cu-K α 線を用い、0.2–40°（2 θ ）の範囲で、0.013° のステップサイズで収集した。

赤血球凝集試験

インフルエンザ全粒子ワクチン（WV）を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末（65.53% HPC-L、26.17% スクロース、0.10% WV、8.20% PBS 塩）を噴霧乾燥により作製した。0.10% WV および 99.90% PBS 塩を含む陰性対照粉末も噴霧乾燥により作製した。粉末を収集したガラスバイアルは、−80°C または 30°C、60% RH で 6 箇月間、ディープフリーザー（日本

フリーザー株式会社製) および恒温恒湿槽 (ナガノサイエンス株式会社製) で保存した。

アッセイは、検体を水に溶解させ、抗原濃度 (HA 換算) $100\text{--}200\ \mu\text{g/mL}$ とし、これを 0.9%塩化ナトリウム溶液で段階希釈したものをマイクロプレート の各ウェルに注入した。別途、0.5%七面鳥赤血球溶液 (株式会社バイオテスト研究所製) を各ウェルに追加し、 4°C で 1 時間インキュベートした。その後、赤血球凝集像の有無を観察し、凝集に必要な最低濃度を決定した。凝集が観察された検体では、均一な赤色懸濁液が生成されることを確認した。また、凝集反応がない検体の場合、赤血球がウェルの底に沈んでいることを確認した。未処理の抗原溶液の最低濃度と検体溶液の比率 (パーセンテージ) を検体の赤血球凝集力価とした。

溶血性試験

赤血球凝集試験で評価した粉末を使用した。検体を純水に溶解し、WV 濃度 (HA 換算) $100\text{--}200\ \mu\text{g/mL}$ の溶液とし、0.9%塩化ナトリウム溶液で段階希釈したものをマイクロプレート の各ウェルに添加した。。次に、2% ニワトリ赤血球溶液 (株式会社バイオテスト研究所製) を各ウェルに追加し、 4°C で 1 時間インキュベートした。その後、各ウェルにリン酸緩衝生理食塩水を追加し、 37°C でさらに 1 時間インキュベートした。ウェル内の溶液を遠心分離した後、上清の吸光度を 540 nm で測定した。吸光度が 0.1 を上回る最低濃度を、溶血を誘発するための最低濃度として設定した。未処理の抗原溶液の最低濃度と検体溶液の比率 (パーセンテージ) を検体の溶血力価とした。

噴霧乾燥工程における免疫原性評価（皮下投与）

HA を含む噴霧乾燥スクロース粉末（91.56% スクロース、0.25% HA、8.19% PBS 塩）、HA を含む噴霧乾燥 HPC-L 粉末（91.56% HPC-L、0.25% HA、8.19% PBS 塩）、HA を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末（65.40% HPC-L、26.16% スクロース、0.25% HA、8.19% PBS 塩）を噴霧乾燥により作製した。0.25% HA および 99.75% PBS 塩を含む陰性対照粉末も噴霧乾燥により作製した。粉末を純水に溶解させ、HA 濃度が 100–200 $\mu\text{g/mL}$ の溶液とし、300 ng HA に相当する量をマウスに皮下投与した。投与後 3 週間に、血清中の抗 HA IgG 抗体の濃度を ELISA によって測定した。陽性対照群に対する抗体濃度の差が $\log_2$ スケールで 2 以下の場合、効果があると判断した。

長期保存後における免疫原性評価（経鼻投与）

WV を含む共噴霧乾燥 HPC-L/スクロース粉末（65.53% HPC-L、26.17% スクロース、0.10% WV、8.20% PBS 塩）を噴霧乾燥により作製した。粉末を収集したガラスバイアルは、30°C、60% RH の条件下で 6 箇月、25°C、60% RH の条件下で 15 箇月間、恒温恒湿槽（ナガノサイエンス株式会社製）で保存した。HA 換算で抗原を 0.5 μg 含む粉末をマイクロピペットチップに詰め、チップをイソフルランで麻酔されたマウスの鼻腔に挿入した。次に、チップの後端を、三方コックを介して 1 mL シリンジチューブに接続し、シリンジチューブに保存された空気をチップに送り込むことによって粉末を鼻腔に投与した。この操作は、同一の個体に対して左右の鼻腔の両方で単回投与として行った。また接種は、同じ個体に対して 2 週間の間

隔で2回行った。最終接種後2週間で、鼻腔洗浄液(0.6 mL)の抗HA IgA抗体濃度をELISAによって測定し、血清中の抗HA IgG抗体濃度も同様に測定した。各時点で、6 μ Lの陽性対照液(未処理のWV)を鼻腔に滴下し、評価した。陽性対照群に対する抗体濃度の差がlog2スケールで2以内の場合、抗原活性が維持されていると判断した。

第2章 標的部位送達率向上のためのデバイス設計と粉末物性の最適化

粉末作製(第1節-1: Table 6-1、Table 8)

アシッドブルー9 0.4 g、トレハロース 5.6 g、HPC-L 14.0 gをPBS 980 mLに溶解させ、噴霧乾燥溶液を作製した。この溶液を噴霧乾燥条件(SP1)下で噴霧乾燥し、モデル抗原粉末とした。モデル抗原粉末(重量比3部)に対して、異なる材料および物理特性をもつ6種類の担体粉末のうちの1つ(重量比20部)を加え、混合条件(MX1)下で均一に混合し、表S1に示す組成をもつ粉末(DP1-DP6)を作製した。得られた粉末は、乾燥剤(MiniPax、富士ゲル産業株式会社製)を充填したガラス瓶に収集し、密封して25°Cで保存した。カプセル剤は、ヒドロキシプロピルメチルセルロース(HPMC)カプセル(クオリカプス株式会社製)に充填機(Lonza Group Ltd 製)で23 $\pm$ 1 mgを充填して作製した。

粉末作製(第1節-2: Table 6-2、Table 8)

スクロース 37.5 gをそのまま使用するか、HPC-LまたはHPC-SSLと2:5または1:1の比率で混合して総量37.5 gとした。この混合物をリン酸緩衝液 462 g (0.408 mg/mL リン酸二水素カリウム、2.51 mg/mL リン酸

水素ナトリウム水和物、8.3 mg/mL 塩化ナトリウムを含む) にアシッドブルー9 0.282 g を溶解させて噴霧乾燥溶液を作製した。その後、特定の噴霧乾燥条件 (SP2 または SP3) 下で噴霧乾燥し、モデル抗原粉末を作製した。さらに、4.9% (w/w) HPC-L および 0.1% (w/w) フルオレセインを水に溶解させ、噴霧乾燥条件 (SP3) 下で噴霧乾燥して担体粉末を作成した。モデル抗原粉末 (重量比 45 部) は、担体粉末 (重量比 55 部) と混合条件 (MX1) 下で混合され、粉末 (DP7-DP10、DP12、DP14) が作製された。また、モデル抗原粉末 (重量比 30 部) も同じ混合条件 (MX1) 下で担体粉末 (重量比 70 部) と混合され、別の粉末 (DP15) が作成された。さらに、粉末 (DP11 および DP13) はモデル抗原粉末のみを使用して作製された。得られた粉末は、乾燥剤を充填したガラス瓶に収集され、密封して 25°C で保存した。カプセル剤は、HPMC カプセルに充填機で 10 ± 1 mg 充填して作製した。

粉末作製 (第 2 節 : Table 7、Table 8)

アシッドブルー9 1.20 g、スクロース 79.8 g、HPC-SSL 79.8 g、リン酸二水素カリウム 0.8 g、塩化ナトリウム 16.4 g、およびリン酸水素ナトリウム水和物 4.95 g を水 1946 g または 527 g に溶解させ、噴霧乾燥溶液を作製した。噴霧乾燥条件 (SP4 または SP5) 下で噴霧乾燥し、モデル抗原粉末 (AP11 または AP12) を作製した。担体粉末 (CA8) は、噴霧乾燥条件 (SP6) 下で 5% (w/w) HPC-SSL を含むエタノール溶液を噴霧乾燥して作製した。担体粉末 (CA9) は、噴霧乾燥条件 (SP7) 下で 20% (w/w) HPC-SSL を含むエタノール溶液を噴霧乾燥して作製した。担体粉末 (CA10)

は、75 μm の開口部をもつふるいにかけて作製した。担体粉末 (CA11) は、噴霧乾燥条件 (SP8) 下で 20% (w/w) HPC-SSL を含むエタノール溶液を噴霧乾燥して、作製した。担体粉末 (CA12) は、250 μm の開口部をもつふるいにかけて作製した。モデル抗原粉末 (重量比 45 部) は、担体粉末 (重量比 55 部) と混合条件 (MX2) 下で混合され、粉末 (DP16-DP25) が作製された。得られた粉末は、乾燥剤を充填したガラス瓶に収集され、密封して 25°C で保存した。カプセル剤は、HPMC カプセルに充填機で $10 \pm 1 \text{ mg}$ 充填して作製した。

Table 6-1 Composition of spray-dried powder (w/w%)

		Lot No.	DP1	DP2	DP3	DP4	DP5	DP6
Model Antigen Powder	Lot No.				AP1			
	Acid Blue 9				0.18			
	Trehalose				2.46			
	HPC-L				6.14			
	KH ₂ PO ₄				0.06			
	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O				0.34			
	NaCl				3.87			
	Spray-drying condition				SP1			
Carrier Powder	Lot No.	CA1	CA2	CA3	CA4	CA5	CA6	
	Respitose SV003	86.96	-	-	-	-	-	
	HPC-L-fine	-	86.96	-	-	-	-	
	Dilactose S	-	-	86.96	-	-	-	
	Pearlitol 200SD	-	-	-	86.96	-	-	
	Methocel K4M	-	-	-	-	86.96	-	
	PEG4000	-	-	-	-	-	86.96	
Antigen powder/carrier (w/w)					3/20			
Mixing condition					MI1			

Table 6-2 Composition of spray-dried powder (w/w%)

Lot No.		DP7	DP8	DP9	DP10	DP11	DP12	DP13	DP14	DP15
Model Antigen Powder	Lot No.	AP2	AP3	AP4	AP5	AP6	AP7	AP8	AP9	AP10
	Acid Blue 9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.7	0.3	0.7	0.3	0.18
	Sucrose	11.22	11.22	19.64	11.22	26.65	11.22	46.68	19.64	12.29
	HPC-L	28.05	-	-	28.05	-	-	-	-	-
	HPC-SSL	-	28.05	19.64	-	66.63	28.05	46.68	19.64	12.29
	KH ₂ PO ₄	0.2	0.2	0.2	0.2	0.22	0.2	0.22	0.2	0.19
	Na ₂ HPO ₄ •12H ₂ O	1.22	1.22	1.22	1.22	1.35	1.22	1.35	1.22	1.17
	NaCl	4.02	4.02	4.02	4.02	4.45	4.02	4.45	4.02	3.88
	HPC/sucrose (w/w)	2/5	2/5	1/1	2/5	2/5	2/5	1/1	1/1	1/1
	Spray-drying condition No.	SP2	SP2	SP2	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3	SP3
Carrier Powder	Lot No.	CA7	CA7	CA7	CA7	-	CA7	-	CA7	CA7
	FC	1.1	1.1	1.1	1.1	-	1.1	-	1.1	1.4
	HPC-L	53.9	53.9	53.9	53.9	-	53.9	-	53.9	68.6
	Spray-drying condition No.	SP3	SP3	SP3	SP3	-	SP3	-	SP3	SP3
Antigen powder/carrier (w/w)		45/55	45/55	45/55	45/55	100/0	45/55	100/0	45/55	30/70
Mixing condition		MI1	MI1	MI1	MI1	-	MI1	-	MI1	MI1

Table 7 Composition of spray-dried powder (w/w%)

Lot No.		DP16	DP17	DP18	DP19	DP20	DP21	DP22	DP23	DP24	DP25
Model Antigen Powder	Lot No.	AP11					AP12				
	Acid blue 9	0.03					0.03				
	Sucrose	1.996					1.996				
	HPC-SSL	1.996					1.996				
	KH ₂ PO ₄	0.02					0.02				
	Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	0.1237					0.1237				
	NaCl	0.409					0.409				
	Spray-drying condition No.	SP4					SP5				
Carrier powder	Lot No.	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12	CA8	CA9	CA10	CA11	CA12
	HPC-L	-	-	-	-	5.5	-	-	-	-	5.5
	HPC-SSL	5.5	5.5	5.5	5.5	-	5.5	5.5	5.5	5.5	-
	Spray-drying condition No.	SP6	SP7	-	SP8	-	SP6	SP7	-	SP8	-
Antigen powder/carrier (w/w)		45/55					45/55				
Mixing condition		MI2					MI2				

Table 8 Spray-drying and Mixing conditions

Spray drying condition NO.		Condition
SP1	Machine	GS-31 (Yamato Scientific Co., Ltd.)
	Nozzle	Two fluid nozzle, orifice diameter: 0.5 mm
	Inlet temperature	130°C
	Flow of spray liquid	Approx. 2 g/min
SP2	Machine	Mini Spray Dryer B-290 (Buchi labortechnik AG)
	Nozzle	Two fluid nozzle, orifice diameter: 0.5 mm
	Gas flow	Approx. 400 L/min
	Aspiration pressure	-85 mbar
	Inlet temperature	130°C
	Flow of spray liquid	1.5 - 2.0 mL/min
SP3	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 30000 rpm
	Cyclone differential pressure	1 kPa
	Inlet temperature	100 - 110°C
	Flow of spray liquid	5 - 10 g/min
SP4	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 35000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.92 - 1.00 kPa
	Inlet temperature	100°C
	Flow of spray liquid	6 g/min
SP5	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 35000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.89 - 0.93 kPa
	Inlet temperature	100°C
	Flow of spray liquid	12 g/min
SP6	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 35000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.87 - 0.93 kPa
	Inlet temperature	80°C
	Flow of spray liquid	40 g/min
SP7	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 40000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.77 - 0.80 kPa
	Inlet temperature	80°C
	Flow of spray liquid	40 g/min
SP8	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 20000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.81 - 0.96 kPa
	Inlet temperature	80°C
	Flow of spray liquid	40 g/min
SP9	Machine	Spray dryer CL-8i (Ohkawara Kakohki Co., Ltd.)
	Nozzle	Rotary disk, 35000 rpm
	Cyclone differential pressure	0.89 - 0.93 kPa
	Inlet temperature	100°C
	Flow of spray liquid	12 g/min
Mixing condition No.		Condition
MI1	Machine	Turbula Shaker Mixer (Willy A. Bachofen AG)
	Container	Glass bottle
	Mixing speed	96 rpm
	Mixing time	15 min
MI2	Machine	V-blender S-3 (Tsutsui Scientific Instruments Co., Ltd.)
	Container	Stainless steel
	Mixing speed	55 rpm
	Mixing time	15 min

粒子径測定

Sympatec HELOS/RODOS (Sympatec GmbH、ドイツ) を用い、低角レーザー光散乱法により測定した。各粉末を 4.0 bar の分散圧で分散し、R3 レンズを用いて、X10、X50、および X90 を測定した。

経鼻投与デバイスおよび送達率評価方法

経鼻投与デバイス

デバイスは、キャップ、ボトム、ポンプ、シール、およびカプセルで構成され、キャップとボトムは、一体成形された三角錐形の針を備えている。これらの針には通気孔および凹部があり、カプセルの両端を貫通させて空気流路を形成する。この構造により、針を取り外すことなくカプセルから粉末を排出することが可能となる。

デバイス A：ポンプは「Erizas® Capsules for Nasal spray」専用スプレーデバイス (Twinlizer™、日本新薬株式会社製) から流用されており、排気ポート周りのネジ山をトリミングすることでボトムに適合するように改造された。空気流をカプセル内に導くためのシールが追加され、薬剤放出のための内部空気流を確保している。このシールは、キャップとカプセル、ボトムとカプセルの周囲の隙間にシリコンパテ (KATAMARU-KUN、Castaldo 社製) を充填し、硬化させて作製した。

デバイス B：デバイス B は、デバイス A に比べて初期の空気流の増加が速く、独自設計のポンプを備えている。キャップとボトムも新たに設計され、樹脂成形部品のみを使用し、シールを不要にした。デバイス B は、ポンプの形状を改善することにより使いやすさ (潰しやすさ) を向上させた。

さらに、カプセルとの適合性の改善により、薬剤の損失リスクを低減し、効果的な薬剤吸入に不可欠な空気流の流れも向上させた。

鼻腔モデルおよび送達率測定

鼻腔モデルは、二つの半分の空洞モデル、鼻中隔プレート、およびシリコンゴムで作成された咽頭蓋から構成されている。アダプター（緑色で示される）はシリコンパテで作成し、装置を保持するために空洞モデルの鼻孔部分に取り付けた。これらの部品の内面には、約 3 g の 2%カルボキシルビニルポリマーを 10 N NaOH で中和した溶液をコーティング⁷⁶⁾し、次に鼻中隔プレートを二つの半分の空洞モデルの間に挟んで組み立て、咽頭蓋を鼻咽頭領域に取り付けた。粉末で充填された HPMC カプセルがデバイスに装填され、粉末排出前にカプセル装填デバイスの総重量を測定した。デバイスのノズルをモデルの左鼻孔に挿入し、約 15 mL の空気を用いて粉末を鼻腔モデル内に排出した。排出後、デバイスを鼻孔から取り外し、再度重量を測定した。鼻腔モデルの内面に堆積した粉末は、鼻前庭、鼻甲介、鼻咽頭、鼻中隔、およびその他（デバイスの支持部分以外の領域を含む）から綿棒を用いて収集した。収集した検体は、一定量の溶媒（PBS/アセトニトリル = 1/1 v/v）に溶解させた後、25 mm GD/X シリンジフィルター（PVDF、0.45 μ m）（メルク社製）を通してろ過した。試料溶液中のアシッドブルー9 の濃度は高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用いて定量し、各部位におけるアシッドブルー9 の回収率を計算した。回収されたアシッドブルー9 の量の割合は、10 mg または 23 mg の粉末中の理論的含量に対するもので計算され、すべての部分からの回収率の合計が抗原

粉末の送達率として計算された。さらに、鼻甲介および鼻咽頭領域からの回収率の合計を、目標部位への抗原粉末の送達率として計算した。鼻腔内の堆積物の分析に加えて、デバイス内の抗原粉末の残存量は、カプセルおよび装置から前述の溶媒を用いてアシッドブルー9を抽出し、HPLC分析を行ってアシッドブルー9の濃度を測定した。デバイスからの粉末排出率は、デバイス以外の領域への総送達率を合計した。

微粒子量測定

点鼻剤用エクспанジョンチャンバー（容量：1 L）接続したアンダーセンカスケードインパクターと真空ポンプを、TPKコントローラーを介して取り付けた。真空ポンプを作動し、吸引流速 28.3 L/min で吸引しながら10カプセルに相当する粉末をエクспанジョンチャンバー内に噴霧した。噴霧後、カスケードインパクターを分解し、各ステージのコレクションプレートの重量を測定した。次いで、各ステージに堆積した粉末を所定量の溶媒（PBS/アセトニトリル = 1/1 v/v）を用いて抽出し、HPLCを用いてアシッドブルー9濃度を算出した。測定値は、各ステージに堆積したモデル抗原粉末の重量に変換した。乾燥後、コレクションプレートの重量を再度測定し、抽出前後の重量差を各ステージに堆積した粉末の重量として計算した。モデル抗原粉末の重量を結果から差し引き、担体粉末の重量とした。微粒子量は、カスケードインパクターのフィルタ部分とステージ3部分の間に堆積したモデル抗原粉末または担体粉末の比率を、粉末全体の総重量に対して計算した。

アシッドブルー9 定量法

HPLC システム (LC-20A、島津製作所製) を用い、以下の条件下で、クロマトグラム上のアシッドブルー9 のピーク面積と濃度既知標準液のピーク面積の比率から、試料溶液中のアシッドブルー9 濃度を算出した。

カラム：TSKgel Super SW2000 カラム (東ソー株式会社製)

カラム温度：30℃

移動相：PBS/アセトニトリル (1:1 v/v)

流量：0.4 mL/min

注入量：50 μ L

検出波長：UV 460 nm

統計解析

抗原粉末または担体粉末の粒子径がデバイスからの排出率や目標部位への送達率に及ぼす影響を、Microsoft® Excel® for Microsoft 365 および JMP ソフトウェア (JMP®、バージョン 16.0、SAS Institute Inc.製) を使用して分析した。

掲載論文

1. Mieda S., Inoue K., Ito A., Yada S., Miyajima M., Fukami T., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **69**, 103165 (2022).
2. Mieda S., Inoue K., Ito A., Yada S., Miyajima M., Fukami T., *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **104**, 106454 (2025).

參考論文

1. Pires A., Fortuna A., Alves G., Falcão A., Intranasal drug delivery: how, why and what for? *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.*, **12**, 288–311(2009).
2. Chavda V. P., Vora L. K., Pandya A. K., Patravale V. B., Intranasal vaccines for SARS-CoV-2: from challenges to potential in COVID-19 management, *Drug Discov. Today.*, **26**, 2619–2636 (2021).
3. Ambrose C. S., Luke C., Coelingh K., Current status of live attenuated influenza vaccine in the United States for seasonal and pandemic influenza, *Influenza Other Respir. Viruses*, **2**, 193–202 (2008).
4. Giudice E. L., Campbell J. D., Needle-free vaccine delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 68–89 (2006).
5. Koprowski H., Mucosal Vaccines. Modern Concepts, Strategies, and Challenges, Springer, Heidelberg, Dordrecht, London, New York, 2012.
6. Brokstad K. A., Cox R. J., Eriksson J.-C., Olofsson J., Jonsson R., Davidsson Å, High prevalence of influenza specific antibody secreting cells in nasal mucosa, *Scand. J. Immunol.*, **54**, 243–247 (2001).
7. Pavot V., Rochereau N., Genin C., Verrier B., Paul S., New insights in mucosal vaccine development, *Vaccine*, **30**, 142–154 (2012).
8. Kasel J. A., Fulk R. V., Togo Y., Hornick R. B., Heiner G. G., Dawkins A. T., Mann J. J., Influenza antibody in human respiratory secretions after subcutaneous or respiratory immunization with inactivated virus, *Nature*, **218**, 594–595 (1968).
9. Riese P., Sakthivel P., Trittell S., Guzmán C. A., Intranasal

- formulations: promising strategy to deliver vaccines, *Expert Opin. Drug Deliv.*, **11**, 1619–1634 (2014).
10. Pavot V., Rochereau N., Genin C., Verrier Bernard, Paul Stéphane, Rational design of nasal vaccines, *J. Drug Target.*, **16**, 1–17 (2008).
 11. Mygind N., Dahl R., Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **29**, 3–12 (1998).
 12. Nakahashi-Ouchida K., Fujihashi Y., Kurashima Y., Yuki Y., Kiyono H., Nasal vaccines: solutions for respiratory infectious diseases, *Trends Mol. Med.*, **29**, 124–140 (2023).
 13. Tregoning J. S., Russell R. F., Kinnear E., Adjuvanted influenza vaccines, *Hum. Vaccin. Immunother.*, **14**, 550–564 (2018).
 14. Jabbal-Gill I., Nasal vaccine innovation, *J. Drug Target.*, **18**, 771–786 (2010).
 15. Trenkel M., Scherließ R., Nasal powder formulations: In-vitro characterization of the impact of powders on nasal residence time and sensory effects, *Pharmaceutics*, **13**, 385 (2021).
 16. Huckriede A., Bungener L., Stegmann T., Daemen T., Medema J., Palache A. M., Wilschut J., The virosome concept for influenza vaccines, *Vaccine*, **23**, 26–38 (2005).
 17. Hamouda T., Sutcliffe J. A., Ciotti S., Baker J. R. Jr., Intranasal immunization of ferrets with commercial trivalent influenza vaccines formulated in a nanoemulsion-based adjuvant, *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**, 1167–1175 (2011).

18. Van Braeckel-Budimir N., Haijema B. J., Leenhouts K., Bacterium-like particles for efficient immune stimulation of existing vaccines and new subunit vaccines in mucosal applications, *Front. Immunol.*, **4**, 282 (2013).
19. Petersson P., Hedenskog M., Alves D., Brytting M., Schröder U., Linde A., Lundkvist A., The Eurocine L3 adjuvants with subunit influenza antigens induce protective immunity in mice after intranasal vaccination, *Vaccine*, **28**, 6491–6497 (2010).
20. Akira O., JP3109886B2, 1991.
21. El-Telbany D. F. A., Tayel S. A., EL-NABARAWI M. A., Tag R., Aboelwafa A. A., FORMULATION AND EVALUATION OF ERGOTAMINE TARTRATE LYOPHILIZED NASAL INSERT, 2014.
22. Hideki H., JP6247639B2, 2013.
23. Chang R. C., WO2001/034801, 2001.
24. Shuichi S., JP2004262847, 2003.
25. Bartos C., Pallagi E., Szabó-Révész P., Ambrus R., Katona G., Kiss T., Rahimi M., Csóka I., Formulation of levodopa containing dry powder for nasal delivery applying the quality-by-design approach, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **123**, 475–483 (2018).
26. Henriques P., Fortuna A., Doktorovová S., Spray dried powders for nasal delivery: process and formulation considerations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **176**, 1–20 (2022).
27. Salade L., Wauthoz N., Goole J., Amighi K., How to characterize a nasal

- product. The state of the art of in vitro and ex vivo specific methods, *Int. J. Pharm.*, **561**, 47–65 (2019).
28. Torikai Y., Sasaki Y., Sasaki K., Kyuno A., Haruta S., Tanimoto A., Evaluation of systemic and mucosal immune responses induced by a nasal powder delivery system in conjunction with an OVA antigen in cynomolgus monkeys, *J. Pharm. Sci.*, **110**, 2038–2046 (2021).
29. Djupesland P. G., Nasal drug delivery devices: characteristics and performance in a clinical perspective—a review, *Drug Deliv. Transl. Res.*, **3**, 42–62 (2013).
30. Lapidot T., Bouhajib M., Faulknor J., et al., A novel faster-acting, dry powder-based, naloxone intranasal formulation for opioid overdose, *Pharm. Res.*, **39**, 963–975 (2022).
31. Fasiolo L. T., Manniello M. D., Tratta E., Buttini F., Rossi A., Sonvico F., Bortolotti F., Russo P., Colombo G., Opportunity and challenges of nasal powders: Drug formulation and delivery, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **113**, 2–17 (2018).
32. Chu N. N., Huang K., Que L. L., et al., Safety, tolerability, and pharmacokinetic study of 101BHG-D01 nasal spray, a novel long-acting and selective cholinergic M receptor antagonist, in healthy Chinese volunteers: A randomized, double-blind, placebo-controlled, single-dose escalation, first-in-human study, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, **47**, 509–521 (2022).
33. Newman S. P., Pitcairn G. R., Dalby R. N., Drug delivery to the nasal

- cavity: in vitro and in vivo assessment, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **21**, 21–66 (2004).
34. Keldmann T., Advanced simplification of nasal delivery technology: anatomy + innovative device = added value opportunity, in: Nasal Drug Deliv. Rapid Onset Via Convenient Route, *On Drug Delivery*, 4–7 (2005).
 35. Sosnowski T. R., Rapiejko P., Sova J., Dobrowolska K., Impact of physicochemical properties of nasal spray products on drug deposition and transport in the pediatric nasal cavity model, *Int. J. Pharm.*, **574**, 118911 (2020).
 36. Hosseini S., Alfaifi A., Esmaeili A. R., Edwards D., Schuman T., Longest W., Hindle M., Golshahi L., Effects of nasal anatomical characteristics and administration parameters on delivery of locally-acting drugs with suspension nasal sprays in adults, *J. Aerosol Sci.*, **167**, 106101 (2023).
 37. Chen J. Z., Kiaee M., Martin A. R., Finlay W. H., In vitro assessment of an idealized nose for nasal spray testing: Comparison with regional deposition in realistic nasal replicas, *Int. J. Pharm.*, **582**, 119341 (2020).
 38. Chen J. Z., Finlay W. H., Martin A., In vitro regional deposition of nasal sprays in an idealized nasal inlet: Comparison with in vivo gamma scintigraphy, *Pharm. Res.*, **39**, 3021–3028 (2022).
 39. Pozzoli M., Rogueda P., Zhu B., Smith T., Young P. M., Traini D., Sonvico F., Dry powder nasal drug delivery: challenges, opportunities

- and a study of the commercial Teijin Pulverizer Rhinocort device and formulation, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **42**, 1660–1668 (2016).
40. Amorij J. P., Huckriede A., Wilschut J., Frijlink H. W., Hinrichs W. L., Development of stable influenza vaccine powder formulations: challenges and possibilities, *Pharm. Res.*, **25**, 1256–1273 (2008).
 41. Liu Y., Bhandari B., Zhou W., Glass, Transition and enthalpy relaxation of amorphous food saccharides: a review, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 5701–5717 (2006).
 42. Mensink M. A., Frijlink H. W., van der Voort Maarschalk K., Hinrichs W. L.J., et al., How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): mechanisms of stabilization in relation to stress conditions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **114**, 288–295 (2017).
 43. Hancock B. C., Shamblin S. L., Water vapour sorption by pharmaceutical sugars, *Pharmaceut. Sci. Technol. Today*, **1**, 345–351 (1998).
 44. Wang W., Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals, *Int. J. Pharm.*, **10**, 1–60 (2000).
 45. Naini V., Byron P. R., Phillips E. M., Physicochemical stability of crystalline sugars and their spray-dried forms: dependence upon relative humidity and suitability for use in powder inhalers, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **24**, 895–909 (1998).
 46. Heljo V.P., Nordberg A., Tenho M. et al., The effect of water plasticization on the molecular mobility and crystallization tendency of

- amorphous disaccharides, *Pharm. Res.*, **29**, 2684–2697 (2012).
47. Sebhatu T., Elamin A.A., Ahlneck C., Effect of moisture sorption on tableting characteristics of spray-dried (15% amorphous) lactose, *Pharm. Res.*, **11**, 1233–1238 (1994).
48. Makower B., Dye W. B., Dye W. B., Sugar crystallization, equilibrium moisture content and crystallization of amorphous sucrose and glucose, *J. Agric. Food Chem.*, **4**, 72–77 (1956).
49. Palmer K. J., Dye W. B., Black D., Sugar crystallization, x-ray diffractometer and microscopic investigation of crystallization of amorphous sucrose, *J. Agric. Food Chem.*, **4**, 77–81 (1956).
50. Kameoka T., Water sorption in water and chemical potential, *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**, 140–146 (1995).
51. Alvarez-Lorenzo C., Interactions between hydroxypropylcelluloses and vapour/liquid water, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **50**, 307–318 (2000).
52. Poirier-Brulez F., Roudaut G., Champion D., Tanguy M., Simatos D., Influence of sucrose and water content on molecular mobility in starch-based glasses as assessed through structure and secondary relaxation, *Biopolymers*, **81**, 63–73 (2006).
53. Seo M., Kumacheva E., Response of adsorbed layers of hydroxypropyl cellulose to variations in ambient humidity, *Colloid Polym. Sci.*, **280**, 607–615 (2002).
54. Imamura K., Multiple states of sorbed water molecules in amorphous sugar matrix and their different impacts on physical properties of the

- matrix, *Nihon Shokuhin Kogakkaishi*, **12**, 1–9 (2011).
55. Sun W. Q., Davidson P., Effect of dextran molecular weight on protein stabilization during freeze-drying and storage, *Cryo Lett.*, **22**, 285–292 (2001).
 56. Allison S. D., Manning M. C., Randolph T. W., Middleton K., Davis A., Carpenter J. F., Optimization of storage stability of lyophilized actin using combinations of disaccharides and dextran, *J. Pharm. Sci.*, **89**, 199–214 (2000).
 57. Haeuser C., Goldbach P., Huwyler J., Friess W., Allmendinger A., Impact of dextran on thermal properties, product quality attributes, and monoclonal antibody stability in freeze-dried formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **147**, 45–56 (2020).
 58. Mensink M.A., Nethercott M.J., Hinrichs W.L.J. et al., et al., In-line near infrared spectroscopy during freeze-drying as a tool to measure efficiency of hydrogen bond formation between protein and sugar, predictive of protein storage stability, *Int. J. Pharm.*, **496**, 792–800 (2015).
 59. Mensink M.A., Nethercott M.J., Hinrichs W.L.J. et al., Influence of miscibility of protein-sugar lyophilizates on their storage stability, *AAPS J.*, **18**, 1225–1232 (2016).
 60. Tonnis W. F., Mensink M. A., de Jager A., van der Voort Maarschalk K., Frijlink H. W., Hinrichs W. L. J., Size and molecular flexibility of sugars determine the storage stability of freeze-dried proteins, *Mol.*

Pharm., **12**, 684–694 (2015).

61. Emami F., Vatanara A., Park E. J., Na D. H., Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals, *Pharmaceutics*, **10**, **131** (2018).
62. Yingtong C., Huang Y., Zhang X., Lu X., Xue J., Wang G., Hu P., Yue X., Zhao Z., Pan X., Wu C., A real-time and modular approach for quick detection and mechanism exploration of DPIs with different carrier particle sizes, *Acta Pharm. Sin. B*, **12**, 437–450 (2022).
63. Hamishehkar H., Rahimpour Y., Javadzadeh Y., The role of carrier in dry powder inhaler, in: Sezer A. D. (Ed.), Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, *IntechOpen*, London, 2012.
64. Pilcer G., Amighi K., Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **392**, 1–19 (2010).
65. Kiaee M., Wachtel H., Noga M. L., Martin A. R., Finlay W. H., Regional deposition of nasal sprays in adults: A wide-ranging computational study, *Int. J. Numer. Method Biomed. Eng.*, **34**, (2018).
66. Chavda V., Jogi G., et al., Advanced particulate carrier-mediated technologies for nasal drug delivery, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **74**, 103569 (2022).
67. Trows S., Scherlie R., Carrier-based dry powder formulation for nasal delivery of vaccines utilizing BSA as model drug, *Powder Technol.*, **223**, 231 (2016).
68. Nižić Nodilo L., Ugrina I., Špoljarić D., Amidžić Klarić D., Jakobušić

- Brala C., Perkušić M., Pepić I., Lovrić J., Saršon V., Safundžić Kučuk M., Zadavec D., Kalogjera L., Hafner A., A dry powder platform for nose-to-brain delivery of dexamethasone: formulation development and nasal deposition studies, *Pharmaceutics*, **13**, 795 (2021).
69. Hazlett R., Schmidmeier C., O'Mahony J. A., Approaches for improving the flowability of high-protein dairy powders post spray drying – A review, *Powder Technol.*, **388**, 26–40 (2021).
70. Karner S., Urbanetz N. A., The impact of electrostatic charge in pharmaceutical powders with specific focus on inhalation-powders, *J. Aerosol Sci.*, **42**, 428–445 (2011).
71. Mitani R., Ohsaki S., Nakamura H., Watano S., Numerical study on particle adhesion in dry powder inhaler device, *Chem. Pharm. Bull.*, **68**, 726–736 (2020).
72. Okuda T., Tang P., Yu J., Finlay W. H., Chan H. K., Powder aerosol delivery through nasal high-flow system: in vitro feasibility and influence of process conditions, *Int. J. Pharm.*, **533**, 187–197 (2017).
73. Benque B., Khinast J. G., Carrier particle emission and dispersion in transient CFD-DEM simulations of a capsule-based DPI, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **168**, 106073 (2022).
74. Demoly P., Hagedoorn P., de Boer A. H., Frijlink H. W., The clinical relevance of dry powder inhaler performance for drug delivery, *Respir. Med.*, **108**, 1195–1203 (2014).
75. Maloney S. E., Mecham J. B., Hickey A. J., Performance testing for dry

powder inhaler products: Towards clinical relevance, *KONA Powder Part. J.*, **40**, 172–185 (2023).

76. Saito S., Ainai A., Suzuki T., Harada N., Ami Y., Yuki Y., Takeyama H., Kiyono H., Tsukada H., Hasegawa H., The effect of mucoadhesive excipient on the nasal retention time of and the antibody responses induced by an intranasal influenza vaccine, *Vaccine*, **34**, 1201–1207 (2016).

謝辞

本研究を遂行するにあたり、御懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました、明治薬科大学分子製剤学研究室 深水啓朗教授に深く感謝の意を表します。本学位論文作成に際し、御指導、御助言を賜りました主査の明治薬科大学 下川健一教授、副査の野地匡裕准教授、安武夫准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えていただき、特段の御指導と御鞭撻を賜りました、元第一三共株式会社 矢田修一博士に心より御礼申し上げます。また、全体的な技術面でのご指導と御鞭撻を賜りました、元第一三共株式会社 井上和博博士に心より御礼申し上げます。さらに、議論を通じて多くの知識や示唆を賜り、そして心の支えとなっていた第一三共株式会社 伊藤敦俊博士に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、長きに渡る研究期間を賜りました、第一三共株式会社 製剤技術研究所 元所長 宮島誠博士、所長 長谷川晋博士に心より御礼申し上げます。また、JMP 解析などについて多くのご支援をいただいた、丸山直博士および中江崇文氏、英文チェックに協力いただいた Tobias Keil 博士、数々のご助言を賜りました第一三共株式会社製剤技術研究所の研究員の皆様に心より感謝いたします。

最後に、長時間にわたり私の研究活動を支え、理解してくれた家族に心より感謝申し上げます。