

氏 名	もり た たか ひろ 森 田 孝 広
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	論 薬 博 第 654 号
学位授与の日付	平成 13 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	凍結相分離現象に基づく新規タンパク質微粒子化技術の開発と長期徐放性製剤への応用に関する研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 橋 田 充 教 授 高 倉 喜 信 教 授 半 田 哲 郎

論 文 内 容 の 要 旨

タンパク質医薬品の多くは、現在凍結乾燥注射剤として製剤化され臨床の場に供給されているが、同時に、薬物治療の最適化あるいは患者のコンプライアンスの向上を目指した各種ドラッグデリバリーシステム (DDS) の開発も盛んに行われている。中でも生分解性素材である乳酸・グリコール酸コポリマー (PLGA) やポリ乳酸 (PLA) からなる長期徐放性マイクロスフェア製剤は、数ヶ月単位での薬物の持続放出が可能となることから、ワクチンへの応用も含めて既にいくつかの生理活性タンパク質への適用が検討されている。タンパク質をマイクロスフェアに封入する方法は、これまで water-in-oil-in-water (W/O/W) 型エマルジョン法が一般的であったが、最近、調製工程におけるタンパク質の活性保持に優れた solid-in-oil-in-water (S/O/W) 型エマルジョン法が開発された。しかし、この方法に適用するためには予めタンパク質を何らかの方法で微粒子とする必要がある。そこで著者は、古典的なスプレードライ法やジェットミル粉碎法等に代わる簡便な方法として、ポリエチレングリコール (PEG) とタンパク質の混合水溶液を凍結乾燥した後に有機溶媒を添加し、両親媒性高分子である PEG を選択的に溶解することによる新しいタンパク質微粒子化技術を考案した。そして、本法を S/O/W 型エマルジョンを経由したマイクロスフェアの製造へ適用することにより、タンパク質の新規長期徐放性製剤の製造法を確立し、その処方設計に関する指針を得ると共に、モデル製剤としてウシ由来スーパーオキシドディスムターゼ (bSOD) 封入マイクロスフェアを調製し、in vivo において製剤特性を評価した。

第 1 章 凍結相分離現象を利用した新規タンパク質微粒子化技術の確立

モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) を用い、PEG6000 (PEG6K) との澄明な混合水溶液を凍結乾燥後、塩化メチレンを添加して数 μm のサイズの球状微粒子を得た。本調製法において、粒子径は PEG6K/BSA 混合比の上昇に伴って小さくなり、混合比が 1 以上の場合には 10 μm 以下、4 以上の場合には 1 μm 以下となった。凍結乾燥工程における球状微粒子の形成メカニズムは、PEG6K-BSA 混合水溶液系の相図において高濃度領域で液-液相分離が起こること、凍結過程において自由水の凍結とともに未凍結部分の溶質濃度が上昇すること、さらに、BSA 相と PEG 相が転相を起こす臨界点組成 (16.7%, 3.6%) に相当する PEG6K/BSA 混合比 (0.22) において、得られる微粒子の径および形態に劇的な変化が認められたことなどから、凍結濃縮により誘起される PEG-BSA 間の相分離現象に基づくことが推察された。本技術により単離したタンパク質微粒子は高純度 (>90%) であり、油/水界面を生じない系であることからタンパク質の失活も認められなかった。また、小スケールの検討においても充分高い収率 (>90%) が得られた。さらに、幅広い分子量範囲の球状タンパク質のみならず、ゼラチンなどの微粒子化にも適用可能であり、また PEG 以外に各種両親媒性高分子 (界面活性剤) も適用可能であるなど、応用範囲の広い技術であることを明らかにした。

第 2 章 S/O/W 型エマルジョン法によるタンパク質封入マイクロスフェアの調製

前章で確立したタンパク質微粒子化技術を、S/O/W 型エマルジョンを経由した PLGA マイクロスフェアへのタンパク質の封入に応用した。ペルオキシダーゼを PEG6K と凍結乾燥処理後、直接マイクロスフェア調製工程に供した場合、90% 以上の高い封入効率に加え、残存活性の点においても W/O/W 型エマルジョン法よりも優れた封入特性が得られた。単一

ポリマーを用いた場合にはこのように高い封入効率が得られたものの初期バースト率が高かったため、その改善を目指してポリマーアロイ法を適用した。すなわち、PLGA と PLA を混合比20 : 80ないし40 : 60とした場合に油相中でこれら2種類のポリマー間で相分離が起こり、タンパク質微粒子がPLGA リッチな内油相に選択的に局在することを利用し、S/OPLGA/OPLA/W型エマルジョンを経由してコア-シェル型のマイクロスフェアを調製した。本技術によりBSA やbSODの初期バーストは顕著に抑制され、さらにポリマーの分子量やPEGの処方量を最適化することによりマトリクス中のタンパク質の拡散速度を制御できることがわかった。

第三章 スーパーオキシドデイスムターゼ封入マイクロスフェアのin vivo 評価

長期徐放性製剤の開発において、In vitro で得られる放出プロファイルとin vivo 放出の関連の解析が極めて重要であるが、実験動物を用いたin vivo 評価においては、しばしばタンパク質の免疫原性が問題となり、本研究においてもbSOD封入マイクロスフェアを正常ラットに投与した場合、投与後一週間以降に血中に特異的抗体が産生され、長期にわたる試験が困難であった。そこで、汎用性のあるin vivo 放出特性評価実験系の確立を目的として、先天性免疫不全マウス(スキッドマウス)の利用を試みた。In vitro において制御されたプロファイルを示したbSOD封入マイクロスフェアをスキッドマウスに皮下投与した場合、血中bSOD濃度および投与部位における残存SOD活性の消失時間推移はいずれもin vitro の放出プロファイルによく対応し、かつ抗体の産生は全く認められなかったことから、実験結果を基にタンパク質の長期徐放性製剤のin vitro-in vivo 相関を論ずることが可能となった。

以上、著者はタンパク質の新しい微粒子化技術を開発し、S/O/W型エマルジョンを経由した生分解性マイクロスフェアへの効率的なタンパク質封入技術を確認した。また、タンパク質の長期徐放性製剤に対する、先天性免疫不全マウスを用いたin vivo 評価系を構築し、本技術の有用性を証明した。これらの新しい技術および知見は、今後ますます重要性を増すタンパク質医薬品のDDS製剤の開発において、有益な設計指針を提供するものと思われる。

論文審査の結果の要旨

タンパク質医薬品を生分解性素材である乳酸・グリコール酸コポリマー(PLGA)やポリ乳酸(PLA)からなるマイクロスフェアに封入した製剤は、数ヶ月単位での薬物の持続放出が可能なることから広く注目を集めている。調製方法としては、これまでwater-in-oil-in-water(W/O/W)型エマルジョン法が一般的であったが、最近調製工程におけるタンパク質の活性保持に優れたsolia-in-oil-in-water(S/O/W)型エマルジョン法が開発された。著者は、本法の適用の前提となるタンパク質の簡便な微粒子化法として、ポリエチレングリコール(PEG)とタンパク質の混合水溶液を凍結乾燥した後に有機溶媒を添加し両親媒性高分子であるPEGを選択的に溶解する新しい技術を考案し、タンパク質の新規長期徐放性製剤の製造法を確認した。最初に、ウシ血清アルブミン(BSA)を用い、PEGとの混合水溶液を凍結乾燥後、塩化メチレンを添加することにより数 μm サイズの球状微粒子が得られることを確認した。また、球状微粒子の形成メカニズムについて、PEG-BSA混合水溶液系の相図において高濃度領域で液-液相分離が起こること、凍結過程において自由水の凍結とともに未凍結部分の溶質濃度が上昇すること、さらにBSA相とPEG相が転相を起こす臨界点組成に相当するPEG/BSA混合比において得られる微粒子の径および形態に劇的な変化が認められることから、凍結濃縮により誘起されるPEG-BSA間の相分離現象に基づくと考察した。さらに、幅広い分子量範囲の球状タンパク質だけでなくゼラチンなどの微粒子化にも適用可能であり、またPEG以外に各種両親媒性高分子(界面活性剤)も使用可能であるなど、応用範囲が広いことも明らかにした。次に、本技術の欠点である高い初期バースト率の改善を目指してポリマーアロイ法を適用し、PLGAとPLAを混合した場合に油相中でポリマー間で相分離が起こりタンパク質微粒子がPLGAリッチな内油相に選択的に局在することを利用して、S/OPLGA/OPLA/W型エマルジョンを経由するコア-シェル型マイクロスフェアの調製法を確認した。一方、長期徐放性製剤の開発においては、in vitro で得られる放出プロファイルとin vivo 放出の関連の比較解析が重要であるが、実験動物を用いたin vivo 評価においてはしばしばタンパク質に対する特異的抗体の産生により、長期にわたる試験が困難となる。そこで、先天性免疫不全マウスを利用を試み、ウシ由来スーパーオキシドデイスムターゼ(bSOD)封入マイクロスフェアの皮下投与後、抗体の産生が無く、かつ血中bSOD濃度および投与部位における残存SOD活性の消失時間推移が、in vitro の放出プロファイルによく対応することを確認し、長期徐放性製剤のin vitro-in vivo 相関の評価を実現した。

以上、著者はタンパク質の新しい微粒化技術を開発し、S/O/W型エマルジョンを経由した生分解性マイクロスフェアへの効率的なタンパク質封入技術を確立した。また、タンパク質の長期徐放性製剤に対する、先天性免疫不全マウスを用いた *in vivo* 評価系を構築し、本技術の有用性を証明した。これらの新技术および知見は、タンパク質医薬品の DDS 製剤の開発に有益な設計指針を提供するものと思われる。

よって、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成13年8月10日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。