

( 続紙 1 )

京都大学	博士 (薬学)	氏名	塚本 雅志
論文題目	噴霧急速凍結乾燥法によるリポプレックス粉末吸入製剤の開発に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>肺がんなどの難治性肺疾患の治療を目的として、肺局所に選択的かつ、効率良く治療遺伝子、核酸医薬品を送達させるためのDDS製剤技術の開発が期待されている。経肺投与は肺局所に投与できる投与経路であり、肺疾患治療において最も効率の良い投与方法と考えられる。現在までに開発されてきた経肺投与製剤の多くは、医薬品の溶液、懸濁液などを容器に充填し、エアロゾルとして用時噴霧して用いる製剤である。しかし、溶液中における治療遺伝子、核酸医薬品の安定性は低く、調製後速やかな投与が必要であり、臨床応用への障壁となっている。一方、粉末吸入製剤は溶液の経肺投与製剤に比べ保存安定性が高いと考えられるが、現在までに遺伝子、核酸医薬品の粉末吸入製剤に関する報告は少ない。とりわけ、非ウイルスベクターを用いた遺伝子医薬品の粉末吸入製剤化においては、凍結乾燥過程における粒子径増大による肺における遺伝子発現能の低下が予想されるため、粒子径制御技術の構築が必要不可欠である。</p> <p>そこで、申請者は経肺投与を目的とした遺伝子医薬品の粉末吸入製剤の開発を目指して、まず凍結乾燥過程におけるプラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体(リポプレックス)の粒子径変化に及ぼす種々の凍結保護剤の影響に関して系統的な評価を行った。さらに、凍結乾燥後でも粒子径の維持が可能であった血清アルブミンを凍結保護剤とした噴霧急速凍結乾燥法による粉末吸入製剤を調製し、本製剤の肺における遺伝子発現に関する評価を行った。</p>			
第1章 凍結乾燥過程におけるリポプレックスの粒子径増大抑制			
<p>凍結乾燥過程における粒子径増大を抑制するためには、リポプレックスを安定化させる添加剤を凍結保護剤として製剤処方中に添加する必要がある。そこで、通常のリポソーム製剤に汎用される凍結保護剤である二糖類に加え、単糖類、多糖類、血清アルブミンをそれぞれリポプレックス溶液に添加し、凍結乾燥後に再溶解してリポプレックスの粒子径変化を評価した。その結果、二糖類では高濃度で添加して調製することにより、凍結乾燥後において、凍結乾燥前に比べて粒子径とマウス気道内投与後の肺での遺伝子発現を維持することができた。一方、血清アルブミンは、二糖類に比べ少量の添加で粒子径を維持し、保護効果を示すことが明らかとなった。したがって、血清アルブミンは遺伝子医薬品の粉末吸入製剤化における凍結保護剤として有用である可能性が示された。</p>			

## 第2章 噴霧急速凍結乾燥法によるリポプレックス粉末吸入製剤の開発

リポプレックス粉末吸入製剤の臨床応用を実現するためには、調製後の粒子径変化を少なくする処方設計が必要である。そこで第1章での知見を基に、凍結保護剤として血清アルブミンを選択し、凍結乾燥法、噴霧急速凍結乾燥法によりそれぞれ調製した粉末吸入製剤の諸特性を評価した。血清アルブミンを凍結保護剤に用いて通常の凍結乾燥法により調製した粉末吸入製剤は、付着凝集性が高く、そのままでは良好な吸入特性を有する製剤ではないことが予想された。そこで、良好な吸入特性を持つ粉末吸入製剤を調製することを目的に、血清アルブミンを凍結保護剤とし噴霧急速凍結乾燥法を用いて、粉末吸入製剤の調製を行った。得られた製剤は、電気泳動の結果から調製後もプラスミドDNAの過度な分解は生じておらず、調製過程におけるプラスミドDNAの安定性保持に優れた方法であることが示唆された。さらに、製剤をマウス気道内投与後の肺における遺伝子発現能を評価した結果、凍結保護剤を添加しなかった製剤と比較して、血清アルブミンを添加した本製剤では、有意に高い遺伝子発現が得られ、その発現レベルはリポプレックス溶液を用時調製しエアロゾルとしてマウス気道内投与した場合と同程度であったことから、本製剤は粉体化することにより保存安定性を改善し、十分な遺伝子発現が維持できる製剤となることが示された。

以上、申請者は凍結保護剤として血清アルブミンをリポプレックス製剤処方中に添加することにより、リポプレックスの凍結乾燥過程における粒子径増大を抑制できることを明らかにした。さらに、血清アルブミンを凍結保護剤とし、噴霧急速凍結乾燥法により調製した粉末吸入製剤を新たに開発し、用時調製されたエアロゾル製剤と比べ、肺においてほぼ同等の遺伝子発現能を得ることに成功した。以上の知見は非ウイルスベクターを用いた粉末吸入製剤の処方設計において重要な情報となるものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

肺がんなどの難治性肺疾患の治療を目的として、肺局所に選択的かつ効率良く治療遺伝子や核酸医薬品を送達させるためのDDS製剤技術の開発が期待されている。しかし、現在開発されている経肺投与製剤の多くは医薬品の溶液、懸濁液などを容器に充填しエアロゾルとして用時噴霧して用いる製剤であり、治療遺伝子や核酸医薬品では安定性が悪いため臨床応用への障壁となっている。これに対し、粉末吸入製剤は保存安定性に優れるが、遺伝子、核酸医薬品の粉末吸入製剤に関する報告は少なく、とりわけ非ウイルスベクターを用いた遺伝子医薬品の粉末吸入製剤化においては凍結乾燥過程における粒子径増大による遺伝子発現能の低下が予想されるため、粒子径制御技術の構築が不可欠と考えられている。そこで、著者は経肺投与に適した遺伝子医薬品の粉末吸入製剤の開発を目指して、凍結乾燥過程における粒子径変化に及ぼす種々の凍結保護剤の影響を系統的に評価し、得られた結果に基づいて血清アルブミンを凍結保護剤としたプラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体(リポプレックス)の粉末吸入製剤を噴霧急速凍結乾燥法により調製し、経肺投与における遺伝子発現能の評価を行った。

一般に、凍結乾燥過程における粒子径増大を抑制するためには凍結保護剤が用いられることから、通常のリポソーム製剤に汎用される凍結保護剤である二糖類に加えて、単糖類、多糖類、硫酸化多糖類、血清アルブミンをリポプレックス分散液に添加し、凍結乾燥後に水に再分散させて粒子径変化を評価した結果、血清アルブミンが少量の添加で粒子径を小さく保ち、 $\zeta$ -ポテンシャルも大きくは低下させないことが明らかとなった。そこで凍結保護剤として血清アルブミンを選択し、通常の凍結乾燥法と、付着凝集性などに優れると考えられる噴霧急速凍結乾燥法によりそれぞれ調製した粉末吸入製剤の特性を比較した。噴霧急速凍結乾燥法を用いることにより、調製した製剤は電気泳動による評価において調製後もプラスミドDNAの安定性が相対的に保たれ、さらにマウス気道内投与により他の処方、調整法の製剤と比較して有意に高い遺伝子発現が得られ、その発現レベルはリポプレックス分散液のエアロゾルをマウス気道内に投与した場合と同程度であったことから、本製剤が粉体化することにより保存安定性を改善し、かつ十分な遺伝子発現が期待できる製剤であることが証明された。

以上、著者はリポプレックス製剤処方中に凍結保護剤として血清アルブミンを添加することにより凍結乾燥過程における粒子径増大を抑制できることを見出し、さらに噴霧急速凍結乾燥法と組み合わせることにより、経肺投与により優れた遺伝子発現能を示すリポプレックスの新規粉末吸入製剤の開発に成功した。以上の知見は非ウイルスベクターを用いたDDS製剤の処方設計において重要な情報となるものと考えられる。

よって本論文は博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月22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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降