T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	骨疾患の治療を目指した水酸アパタイト/コンドロイチン硫酸多孔粒子とタンパク質との吸着・放出の制御に関する研究
Title(English)	Research related to Formulation of Proteins and Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Porous Microparticles
著者(和文)	渡邉元
Author(English)	Hajime Watanabe
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10618号, 授与年月日:2017年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:生駒 俊之,鶴見 敬章,中島 章,宮内 雅浩,松下 伸広
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10618号, Conferred date:2017/9/20, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

東京工業大学院博士後期課程

理工学研究科博士論文

骨疾患の治療を目指した
水酸アパタイト/コンドロイチン硫酸多孔質粒子
とタンパク質との吸着・放出の制御に関する研究

Research related to Formulation of Proteins and Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Porous Microparticles for Treatment of Bone Diseases

渡邉　元

（材料工学専攻）

２０１７年　９月

東京工業大学大学院博士後期課程

理工学研究科博士論文

骨疾患の治療を目指した
水酸アパタイト/コンドロイチン硫酸多孔質粒子
とタンパク質との吸着・放出の制御に関する研究

Research related to Formulation of Proteins and Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Porous Microparticles for Treatment of Bone Diseases

渡邉　元

（材料工学専攻）

指導教員　　生駒　俊之

Abstract

A spherical and porous microparticle of hydroxyapatite/chondroitin sulfate nanocomposites (HAp/ChS) with high specific surface area was fabricated by using a spray dry method. Adsorption and controlled release of bone metabolism proteins were investigated with the addition of zinc cations (***Chapter 1***). The adsorption phenomena of various proteins onto the microparticles were investigated; basic proteins were adsorbed a lot on the nanocomposite. Especially, from adsorption isotherms of IgG based on Langmuir-Freundlich model, the maximum adsorption amounts of IgG was almost the same as its theoretical value, indicating monolayer and end-on adsorption. The zinc addition can increase the loading amounts of IgG and enhance the release of IgG due to the charge compensation of zinc cations and negatively charged nanocomposites. It was also caused by the increase of diffusion inside pores of the microparticles (***Chapter 2***). Osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG) had a high affinity to the nanocomposites. OPG loaded microparticles with zinc cations showed no initial burst and zero-order release *in vitro*. After systemic administration into back of rats, the blood levels of OPG were maintained for four days, which was matched to the *in vitro* release property (***Chapter 3***). Anti-sclerostin monoclonal antibody was successfully loaded into the microparticles with zinc addition. The new bone formation ability was investigated *in vivo* under local administration into holes of rat distal femurs. At three weeks of post operations, a significant increase of newly formed osteoid was observed at the administered sites with no inflammatory reaction. Micro-CT images indicated no bone resorption at the administration sites (***Chapter 4***).

In summary (***Chapter 5***), the systemic and local releases of proteins loaded into the microparticles were successfully achieved by the addition of zinc cations. The charge compensation was a driving force of the sustained release of protein drugs, which was expected to be generally applied into clinical use.

目次

第１章　　序　論 ……1
１．１．超高齢社会と整形外科領域における骨関連疾患の現状 ……1
１．２．局所投与可能な骨代謝関連抗体の担体の必要性 ……5
１．３．局所投与が適した局所性骨疾患……6
１．３．１．脆弱性骨折……6
１．３．２．骨巨細胞種……7
１．３．３．特発性・外傷性大腿骨頭壊死症……8
１．３．４．インプラント周囲骨吸収……9
１．４．タンパク質の放出制御担体として骨病変に投与するのに適した形態・素材 … 10
１．５．本研究に用いる骨代謝関連タンパク質…… 14
１．６．原発性骨粗鬆症患者に対する骨吸収抑制薬 Dmab 投与の短期成績 …… 16
１．７．本研究の目的 …… 25
参考文献 …… 25

第２章　　多孔質微粒子の作成とタンパク質との相互作用と放出特性 …… 29
２．１．緒言・目的 …… 29
２．２．実験方法 …… 30
２．２．１．HAp/ChS 多孔質微粒子の作製 …… 30
２．２．２．多孔質微粒子の基礎物性評価…… 32
２．２．３．HAp/ChS 多孔質微粒子の溶液中での ChS の溶出試験 …… 33
２．２．４．タンパク質の吸着試験および吸着等温式を用いた解析 …… 33
２．２．５．タンパク質を担持した多孔質微粒子からの試験管内での放出試験 …… 36
２．３．結果 …… 37
２．３．１．ナノ複合体およびその多孔質微粒子の形態観察 …… 37
２．３．２．多孔質微粒子の粒度分布…… 40
２．３．３．XRD 分析…… 40
２．３．４．比表面積・気孔容積・気孔率…… 41
２．３．５．多孔質微粒子からの ChS 溶出特性…… 42
２．３．６．タンパク質の吸着特性…… 42
２．３．７．タンパク質の放出特性…… 51
２．４．考察 …… 58
２．４．１．生体現象を模倣した HAp/ChS ナノ複合化のメカニズム …… 58
２．４．２．HAp/ChS 多孔質微粒子と Zn のタンパク質製剤への有用性 …… 59
２．４．３．タンパク質の多孔質微粒子への吸着現象 …… 64
２．４．４．多孔質微粒子からの球状タンパク質放出現象と Zn 介在の影響 …… 68
２．４．５．多孔質微粒子からの IgG 放出現象と Zn 介在の影響 …… 70
２．５．結言 …… 74
参考文献 …… 74

第３章　　多孔質微粒子からの破骨細胞形成抑制因子の放出特性 …… 80
３．１．緒言 …… 80
３．２．実験方法 …… 82
３．２．１．OPG 吸着試験および吸着等温式を用いた解析 …… 82

３．２．２．OPG を担持した製剤化粒子の作製と試験管内放出試験 …… 83
３．２．２．１．小さい担持量における OPG-Fc の放出試験 …… 83
３．２．２．２．BMP-2 の製剤化処理及び放出試験 …… 83
３．２．２．３．FGF-2 の製剤化処理及び放出試験 …… 84
３．２．２．４．OPG-Fc と OPG との間における放出挙動の比較 …… 85
３．２．２．５．大きい担持量における OPG の放出試験 …… 85
３．２．３．OPG を担持した HAp/ChS 多孔質微粒子のラットへの単回投与試験 …… 86
３．３．結果 …… 86
３．３．１．BMP-2 の放出試験 …… 86
３．３．２．FGF-2 の放出試験 …… 87
３．３．３．OPG の吸着試験 …… 88
３．３．４．OPG の放出試験 …… 89
３．３．５．単回投与されたラットの OPG の血中濃度変化 …… 95
３．４．考察 …… 100
３．４．１．BMP-2 放出特性 …… 100
３．４．２．FGF-2 放出特性 …… 100
３．４．３．HAp/ChS 多孔質微粒子への OPG の吸着メカニズム …… 101
３．４．４．Zn 介在による HAp/ChS 多孔質微粒子からの OPG 放出への影響 …… 101
３．４．５．ラットへ投与された製剤化粒子からの OPG 放出 …… 102
３．５．結言 …… 105
参考文献 …… 105

第４章　骨形成促進薬と多孔質微粒子を用いた骨再生 …… 109
４．１．緒言・目的 …… 109
４．２．実験方法 …… 110
４．２．１．多孔質微粒子への Sclmab の担持・製剤化 …… 110
４．２．２．ラット大腿骨骨孔への製剤化粒子の投与試験 …… 111
４．３．結果 …… 112
４．４．考察 …… 116
４．４．１．Sclmab の局所投与による骨折治癒促進の必要性 …… 116
４．４．２．Sclmab を局所投与したラット大腿骨骨孔の動物学的評価 …… 120
４．５．結言 …… 123
参考文献 …… 123

第５章　総　括 …… 127

研究業績

謝辞

第１章
序　論

１．１．超高齢社会と整形外科領域における骨関連疾患の現状

我が国では，超高齢社会の到来に伴い骨粗鬆症や悪性骨腫瘍が増加傾向である．また，それによる医療介護費用の増加による医療経済の破綻が懸念されている．前者は，骨粗鬆症により骨が脆弱化し，転倒などの比較的軽微な衝撃により生じる脆弱性骨折（骨粗鬆症性骨折）をきたす．後者は，悪性腫瘍により病変部の骨吸収が著明に亢進して極端に強度が低下し，ごく軽微な機械的刺激によってすら骨折・圧潰する病的骨折をきたす．

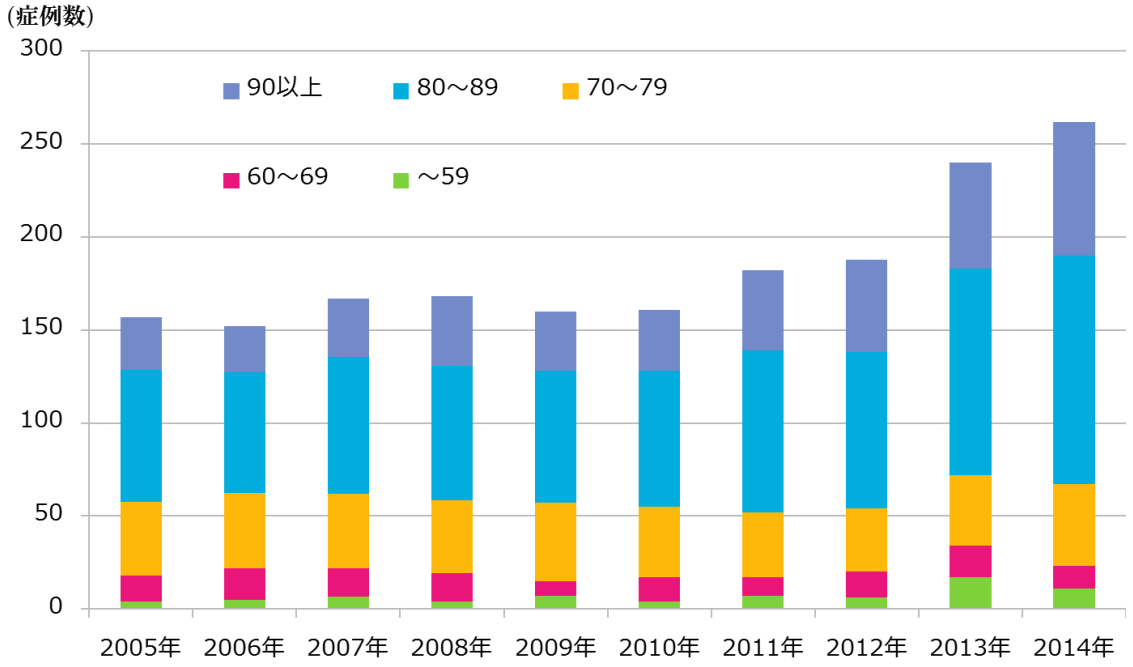


Fig. 1-1 大腿骨近位部骨折における河北総合病院の年別症例数と年齢構成（河北総合病院整形外科 田中瑞枝先生よりご提供）

WHO（世界保健機関）では，「骨粗鬆症は，低骨量と骨組織の微細構造の異常を特徴とし，骨の脆弱性が増大し，骨折の危険性が増大する疾患である：A disease characterized by low bone mass and microarchitectural deterioration of bone tissuer, leading to enhanced bone fragility and a consequent increase in fracture risk」と定義している[1]．40 歳以上の骨粗鬆症の 2005 年の有病率は 1280 万人（男性 300 万人，女性 980 万人）である[2, 3]．骨粗鬆症の原因としては，閉経後女性ホルモンの分泌低下によるもの以外にも，糖尿病・脂質異常症のような生活習慣病や長年のステロイド使用，透析患者，関節リウマチ，ウイルス性肝硬

変などがある．骨粗鬆症による脆弱性骨折として特に重要なのは，大腿骨近位部骨折と椎体骨折である．特に，大腿骨近位部骨折は歩行能力を著しく障害して寝たきりの原因となる．更に，長期臥床により肺炎・尿路感染の発症率が上昇し生命予後の悪化に繋がる．Fig. 1-1 には，河北総合病院の大腿骨近位部骨折の症例数の 10 年間の変動を示す．大腿骨近位部骨折は年々増加傾向にあり，特に 80-90 歳代の割合に優位な増加を認める．全国的には，2007 年の大腿骨近位部骨折の発症数は約 15 万人/年であったのに対し，2030 年の発症数は約 30 万人/年にまで倍増すると推計されており社会的な問題となっている[4]．通常大腿骨近位部骨折の治療法は，骨接合術又は人工骨頭置換術が第 1 選択である．

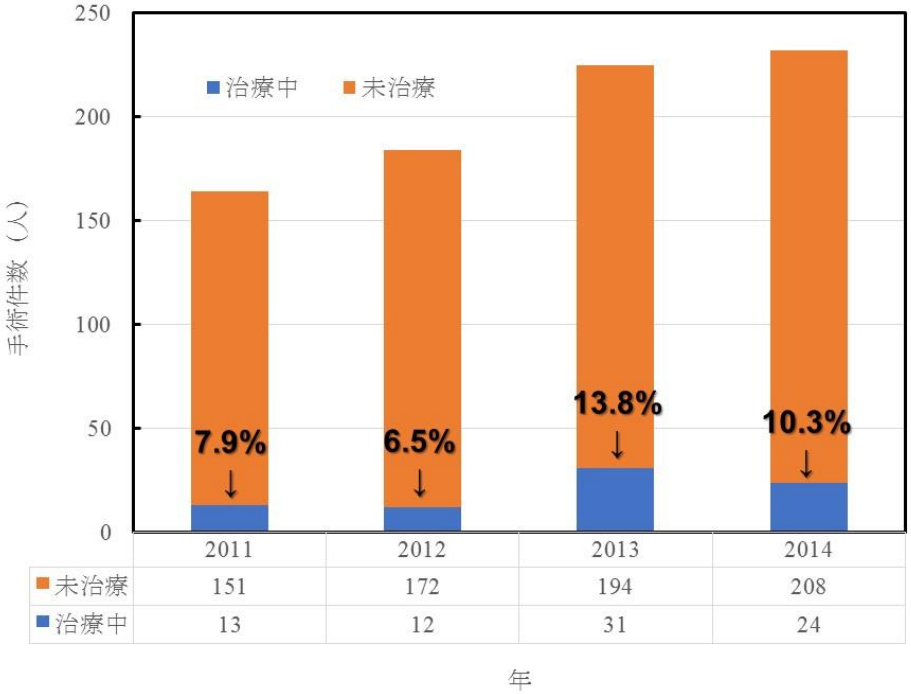


Fig. 1-2 大腿骨近位部骨折における河北総合病院の年別手術件数と骨粗鬆症治療率（河北総合病院）

Fig. 1-3 と Fig. 1-4 に代表的な大腿骨転子部骨折･大腿骨頚部骨折の術後 Xp 写真を示す．術中所見にて固定性が良好であることが確認できれば，術直後より疼痛内全荷重が可能であるため早期の離床を図る．しかし，症例の高齢化に伴い ADL の低下傾向で寝たきりや車イスがベースとなることも少なくない．また，Hagino らは，2328 例の調査から大腿骨近位部骨折後の骨折リスクは初回骨折の 4 倍であることを報告している[5]．にもかかわらず，骨折して 1 年後の骨粗鬆症治療率はわずか 18.7%であり，再骨折予防への取り組みは十分になされていない．河北総合病院でも，Fig. 1-2 に示すように，大腿骨近位部骨折の

手術症例における術前の骨粗鬆症治療率は 10%前後と十分に治療がなされていない．このように，医療費だけでなく介護・人件費なども加速度的に増大傾向であり我が国の財源が困窮する危険にさらされつつある．

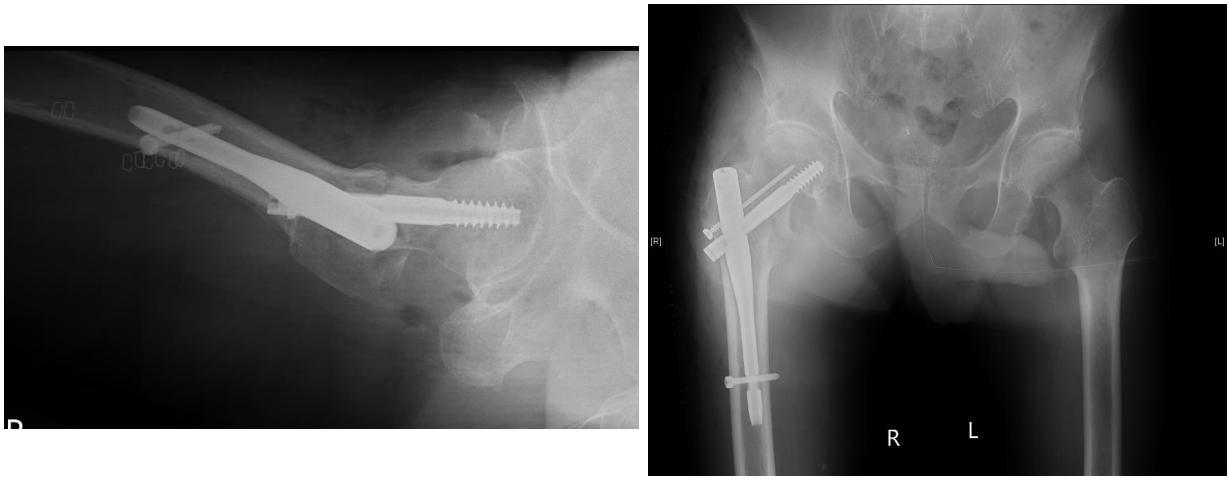


Fig. 1-3 大腿骨転子部骨折の術後 Xp 写真（当院の症例：84 歳男性，左：軸位像，右：正面像）

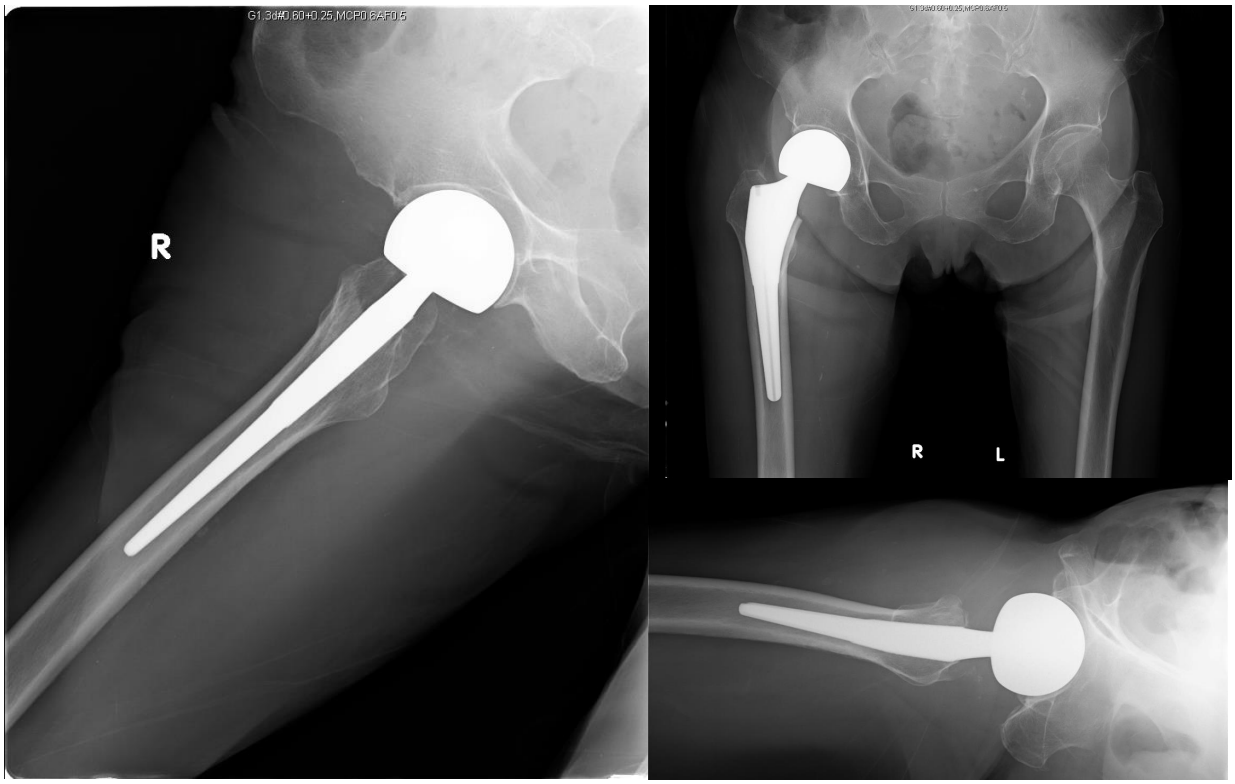


Fig. 1-4 大腿骨頚部骨折の術後 Xp 写真（当院の症例：90 歳女性，左：ラウエンシュタイン像，右上：正面像，右下：軸位像）

2000 年代のはじめから英国老年病学会と英国整形外科学会が連携して行った，大腿骨

近位部骨折の症例のデータベース化とその統計処理は, 骨粗鬆症の治療による骨折の予防は医療費を抑制できることを明らかに示している[6]．一方，米国では，Amgen 社が抗 RANKL 抗体（Denosumab：Dmab）[7]や Romosozumab（抗スクレロスチン抗体：Sclmab）[8]といった抗体医薬（モノクローナル抗体）を開発して，積極的に治験を行い，高い骨密度上昇効果および骨折予防効果を得ている．

高齢化に伴い転移性骨腫瘍や多発性骨髄腫の増加も見られる. 前者は, 肺がん・乳がん・前立腺がんなどの原発巣から骨に血行性に転移して骨吸収が促進して病的骨折をきたす. 特に, 脊椎に転移した場合は椎体骨折を起こして後方の脊髄を圧排してその該当肢に運動麻痺をきたす．後者は，骨髄の形質細胞のがん化による悪性腫瘍であり，全身の骨組織に多発性に著明な骨吸収が起こり病的骨折をきたす. 両者はいずれも全身性に転移する疾患である．両者いずれにおいても長管骨の骨折をきたすこともあり，患者の QOL 改善を目的とした手術を行うこともある．2000 年代より登場した Dmab（商品名：ランマーク®）は強力な骨吸収抑制作用があり，月 1 回の皮下注射（120mg）により椎体圧潰による脊髄損傷や長管骨骨折の発症を遅らせる効果がある．しかしながら, その薬価が高価であるため医療費の増大に繋がる懸念を残している．

関節リウマチは，自己免疫が四肢の関節を侵して関節痛・関節変形をきたす代表的な膠原病（炎症性自己免疫疾患）である．四肢のみならず脊椎・皮膚・筋肉・肺・心臓など全身臓器におよぶため全身疾患といえる．発症年齢が 30-50 歳と比較的若い年代に多いが, 治療開始時期が遅れるとその後数十年かけて変形性関節症が多発性に起こり日常生活に大きな支障が生じる．そのため，高齢化に伴い治療対象となる患者数が増加傾向である．近年ではモノクローナル抗体により関節変形の進行を著明に遅らせるなど高い臨床成績を上げている反面，その薬価があまりにも高いために社会問題となっている．

以上のように，超高齢社会において骨粗鬆症・悪性骨腫瘍・自己免疫性疾患が増加傾向であるだけでなく, そのような全身性疾患から続発した局所性疾患も増えてきている. それに応じてモノクローナル抗体の登場により高い臨床成績を挙げており, その適用が全身疾患だけでなく局所疾患にまで拡大されつつある．しかしながら，そのあまりにも高い薬価ゆえに局所疾患に対しては，その投与形態を見直す必要性が指摘されている．

１．２．局所投与可能な骨代謝関連抗体の担体の必要性

モノクローナル抗体を，脆弱性骨折・原発性骨腫瘍・大腿骨頭壊死・インプラント周囲骨融解のような局所疾患に適用するにあたり，病変部に局所投与できてその部位で必要な量が必要な期間だけ放出されるような放出制御型製剤がふさわしい．なぜなら，過剰な抗体が全身に循環して副作用を起こす危険性を低減させ，投与量の減少によるコスト削減も期待できる．しかしながら，局所疾患に対しても内服や皮下注射のような全身投与がいまだ主流という現状がある．

たしかに，全身性疾患に対して，モノクローナル抗体を皮下注射・静脈注射などで全身投与するのは理にかなっている．また，内服や注射投与で十分な治療効果が得られるのであれば，局所に投与すること自体の侵襲は回避できるし患者のコンプライアンスも高い．しかし，十分な治療効果をもたらすよう局所の血中濃度を上昇させるには，全身投与の場合，一回あたりの投与量を増やすか投与回数を増やす必要がある．例えば，抗体医薬による一般的な癌治療では，十分な治療効果を得るために，数ヶ月にも渡る長い治療期間の間 10μg/mL を超える高い血中有高濃度の維持が必要となる[9, 10]．そのためには，１回あたり数十 mg～数 g もの大量投与が必要である．これは，顆粒球コロニー刺激因子（granulocyto colony-stimulating factor: G-CSF）やエリスロポエチン（erythropoietin: EPO）などを用いたサイトカイン療法に必要な薬剤量の，実に数百倍にも及び，高い薬剤費の原因となっている．このままモノクローナル抗体の大量投与が必要となるような新規適応の拡大が進むと，医療保険制度の維持は難しく，医療経済の破綻は免れない．当然ながら，大量投与による副作用・薬剤コストの増大から患者様にも経済的・身体的負担を強いられる．

このように，局所疾患に対するモノクローナル抗体の全身投与はその莫大なコストが我が国の政策に影響を与える懸念が指摘されており経済的な毒性”economical toxicity”と揶揄される新たな課題に直面している．ではなぜ未だに局所投与可能な生物学的製剤が登場していないかというと，局所における抗体の血中濃度を維持できるような担体の要求される性能があまりにも高いためである．事実，担体およびその製剤化技術の開発が臨床現場のニーズに追いついていない．成長因子やサイトカインでは，担体から放出量が微量でもその効果が期待できるが，抗体では担体からの積極的な放出が長期間持続されなければならない．そのためには，より大量の抗体を担持できる担体かつ抗体の放出速度を制御できるような製剤化技術の確立が必要である．患者の QOL や破綻しつつある医療経済を考え

ると，そのような抗体の放出制御型製剤の開発が急務であると言わざるを得ない．以降では，局所投与が望ましい疾患をピックアップして説明する．

１．３．局所投与が適した骨関連疾患

１．３．１．脆弱性骨折

頻度の高い部位としては，大腿骨近位部・胸腰椎移行部・橈骨遠位端・上腕骨近位部などが挙げられる．治療は，長管骨に対してはプレート固定や髄内釘固定などの内固定を目的とした骨折観血的手術（open reduction and internal fixation: ORIF）が主流である（Fig. 1-4）．骨折の治療で重要なのは，骨折による短縮・回旋・屈曲による変形を矯正してアライメントを整えること，骨折により生じた関節面の段差が平滑となるように矯正することである．これらが術後の四肢の機能回復に大きく影響する．

我が国では超高齢化による患者の骨量･骨質の低下から不安定な粉砕骨折が増加傾向にあり，手術現場で内固定に難渋する症例が増えている．その原因としては，骨折部が不安定なだけでなく海綿骨の圧潰により生じた欠損部（Fracture void: FV）もあり，ORIF で十分な固定性が得られないためである．当然ながら骨癒合には通常よりも長期間を要するし，術後一定期間の外固定・荷重制限を余儀なくされ患者様の QOL の低下に繋がる．

Fig. 1-5 右橈骨遠位端開放骨折の Xp 写真（89 歳女性，左：受傷直後，右：術後 7 か月

FV で骨が再生するのに数年かかるため，骨癒合不全や偽関節の原因となってしまう．

そのため，水酸アパタイトやβ-リン酸三カルシウム（tricalcium phosphate ; β-TCP)などの人工骨を FV に充填していた．しかしながら，移植された人工骨の強度が術後経過で十分に上昇せず再度圧潰することもある．これは，人工骨がほとんど自家骨へ置換されないために，人工骨と海綿骨の間に圧縮強度の不均衡が生じ，人工骨自体もしくは周囲の海綿骨が圧潰するためである．

骨折の治癒過程について説明する．受傷によりまず骨折部に出血が生じて血腫が形成される．その後 0-4 週間かけて，その部位を足場として繊維組織が増生して糊のような役割を果たす．この糊のような状態では固定性はまだまだ不十分である．受傷 4-6 週間後にその繊維組織に仮骨が形成されてある程度の固定性が付与される．骨癒合が完成するのには通常 3-6 か月かかる．

上記の理由から骨折の術後の経過観察で重要な期間は受傷から 4-6 週間の仮骨が形成されるまでの間である．仮骨が形成されれば執刀医は比較的安心して経過を見ることができる．また，関節可動域（ROM）訓練や荷重付加の開始を検討できる．つまり，粉砕骨折でも仮骨形成が早期に認められれば，ROM 訓練や荷重付加が早まることも期待できる．

そこで，粉砕骨折に対して術中に骨癒合を促進させる因子を担持させた担体を骨折部に投与すれば仮骨形成を早めると期待できる．FV に対しても，骨補填材とその薬物担体を併用して骨伝導･誘導能の活性化から自家骨への置換や骨伝導を促進できる．そうすれば，早期の ROM 訓練や荷重訓練が可能となり良好な機能的予後が見込める．

１．３．２．骨巨細胞種

骨巨細胞種は中間悪性骨腫瘍に分類され，局所再発率が高く，10%程度肺転移をきたす．好発部位は大腿骨遠位部・脛骨近位部・橈骨遠位端・上腕骨近位部で関節周囲に多い．標準的には骨皮質を開窓し，腫瘍を完全に掻把したのち，無水エタノールやフェノール，液体窒素などで化学処理をして，自家骨や人工骨を充填する．部位や大きさ，年齢によって骨セメント充填も選択される．骨破壊が強く，広範に病変が及ぶ場合などでは病巣部を一塊として切除し，人工関節などで再建する．部位によっては切除のみ行われる．仙骨など切除が困難な部位に対しては血管塞栓術なども行われる．

海外では試験 20040215（第Ⅱ相）にて，切除不能または再発性の骨巨細胞腫を有する患者に対して Dmab を全身投与した結果，被験者の 86%で効果が認められた[11]．転移性

骨腫瘍や多発性骨髄腫の用法・用量が 120 mg/月であるのに対し，骨巨細胞種では投与最初の月は 120 mg×4/月で，その後は 120 mg/月で投与する．骨巨細胞種は局所性疾患であるため，前者よりも投与量を増量する必要がある．しかしながら，投与法や投与期間に関して，混沌としている部分もある．また，転移性骨腫瘍に対する Dmab の治験では死亡例が報告されている[12]．強力な骨吸収抑制作用がある分，血中の Ca 濃度が低下する低 Ca 血症を起こして死亡に至ったためである．ランマーク®（Dmab）の投与時に Ca とビタミン D の内服を併せれば低 Ca 血症のリスクは軽減するものの，骨巨細胞種のような局所性疾患に対して 120 mg×4/月と大量に投与するのはやはり安全性に不安を残す.

病変部の切除により生じた骨欠損部は, ペーストやブロックなどのリン酸カルシウム人工骨で充填される．他にもスポンジ状の人工骨（リフィット®）も本邦では承認されている．リフィット@は，水酸アパタイトとコラーゲンを分子レベルで複合化した人工骨であり，水に浸すと柔らかくなるため手術操作時の利便性が大幅に向上した．さらに，充填後には自家骨に置換されるような優れた機能も付与されている.

再発率を低下させるためには広範切除が望ましいが, 周囲の組織欠損に伴う機能障害が大きくなるため通常は第一選択とはならない．また，好発年齢が 20-45 歳と若年であり, 切除範囲はなるべく小さい方が患者に恩恵がある．そこで，人工骨の充填部位で Dmab が放出されるような製剤を組み合わせれば, 切除範囲を小さくできる可能性がある. Dmab の全身投与により効果が認められているのであれば, 局所投与でも再発を抑制する効果があるかもしれない.

１．３．３．特発性・外傷性大腿骨頭壊死症

特発性・外傷性大腿骨頭壊死症とは, 股関節の大腿骨頭が血流不全により壊死した状態であり，荷重により骨頭が圧潰すると疼痛を伴う（Fig. 1-6）．年齢・壊死のグレードによっては人工股関節全置換術が選択される場合もあるが, 好発年齢が 30-50 歳と活動性の高い若年に多いため, 骨頭を温存できて侵襲の小さな治療法が望まれている．現在行われている治験では，骨形成作用・血管新生作用のある線維芽細胞増殖因子（FGF-2）をゼラチンに担持させ, 1cm の皮膚切開からレントゲン透視下で大腿骨転子部外側から大腿骨頚部経由で病変部に局所投与することが試みられている．その結果, 壊死部分の骨生成が認められ，骨頭の圧潰が抑制されたことが報告されている[13]．このように，成長因子を担持

した担体を病変部に局所投与して成長因子を徐放させると,壊死部分の骨組織を再生させることが治験にて確認されている.大腿骨頭壊死に対するモノクローナル抗体の使用研究は今のところ報告されていないが,骨形成促進作用もしくは骨吸収抑制作用を有するモノクローナル抗体の局所投与製剤でも改善効果がみられる可能性がある.

Fig. 1-6 特発性大腿骨頭壊死の写真（左：Xp 写真，右：MRIT1 強調，82 歳女性）

１．３．４．インプラント周囲骨吸収

大腿骨近位部骨折において転位･粉砕の強い骨折型では人工骨頭置換術や人工股関節全置換術の適応になることが多い.術後数年～数十年の経過にてレントゲン写真上インプラント周囲に骨吸収像を認めることがある．進行するとインプラントの“緩み；loosening”が起こるだけでなく，骨粗鬆症の要素も加わるとステム周囲骨折[14]の原因にもなる．インプラント周囲に骨吸収が起こる原因としては主に,インプラントと皮質骨の間にかかる荷重が分散される“応力遮へい（stress shielding）”と，人工関節の摺動により生じる摩耗粉がある．前者は，インプラント周囲の大腿骨の髄腔に挿入されるステムの形状によっては,遠位部に荷重がかかる一方で近位部の荷重が弱いためにその周囲の骨量が低下することがある．そこで，大腿骨に対してより近位に荷重がかかるような形状のステム，いわゆる a tapered wedge-type stem を用いれば，応力遮へいは回避できる[15]．後者は，人工関節のライナーがポリエチレンであり経年変化によりポリエチレンの摩耗粉が生じるとマクロファージや樹状細胞による貪食，さらに巨細胞による取り込みにより，サイトカインの放出が起こり免疫反応が惹起されて骨溶解が起こる[16]．また，骨溶解が起こる部位では

RANKL/OPG 比が増加しており，破骨細胞形成抑制因子（osteoprotegerin; OPG）の相対的な低下が指摘されている[17]．近年では，ビタミン E 添加した超高分子量ポリエチレン（E1®）を用いることで，従来のポリエチレンよりも摩耗が減少し，骨溶解を抑制されて骨頭移動が短期的にみて低減されていることが臨床的に示されている[18]．また，術後からビスフォスフォネート製剤の内服を開始することで応力遮へいをある程度抑制できることも報告されている[19-21].

インプラントの“緩み”やステム周囲での骨折はしばしば手術を難渋させる．“緩み”に対してはインプラントを入れ替えるにあたりサイズ決定に迷うこともあるし, ステム周囲骨折では観血的整復固定（open reduction and internal fixation; ORIF）術の際に，スクリューがステムに干渉するなど支障が生じる．これらが起きないようにするためには，初期の人工股関節置換術や人工骨頭置換術を行うに際し, ステムやカップと骨組織との界面において固着性を強化させ，周囲骨組織の強度が上昇することが望ましい．さらに，今後ますます増加する骨粗鬆症患者に対する人工股関節全置換術ではインプラントが周囲の海綿骨を圧潰させる危険性が危惧される．そこで，ステムやカップを設置する前に抗体の放出制御型製剤を局所投与することで，これらの問題点を克服できる可能性がある．

１．４．タンパク質の放出制御担体として骨病変に投与するのに適した形態・素材

１．３で述べたようにモノクローナル抗体の局所投与製剤は様々な疾患に利用できる可能性がある. 病変部が骨組織であれば, 用いられる担体としては骨由来の素材が望ましい. また, 担体が粉末微粒子であれば生理食塩水などに浸してペースト状もしくはスラリー状にすることで, 手術中だけでなくエコーガイド下で経皮的に注射投与することも可能である．骨の無機主成分である水酸アパタイト（hydroxyapatite; $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$: HAp）は Fig. 1-7 に示すような六方晶系・空間群 $P6_3/m$ の結晶構造を有している．*a* 面と *c* 面とでは, カルシウムとリン酸の組成が異なるため, 電荷が異なることが良く知られている. *a* 面（Ca サイト）は正，*c* 面（P サイト）は負に帯電する．例えば，c 軸方向に成長すれば *a* 面の面積が増大するので正の帯電が強くなる．また，タンパク質の吸着特性に優れ，比表面積の高い多孔質微粒子をタンパク質の放出制御型担体に応用する研究がなされている[22, 23]. ただし，HAp 単体では水に浸しても均一な懸濁液とはなりにくく，注射投与する際に中空針を通りにくい．そこで，吸水性に優れたムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸

（chondroitin sulfate; ChS）と複合化させればそのような問題が解決できる．ChS は Fig. 1-8 に示すようなスルホン酸基とカルボキシル基を有する二糖の繰り返し構造からなる酸性多糖類のため，生理条件下で負に帯電する．この性質を利用できればタンパク質の放出特性を制御できる可能性がある．

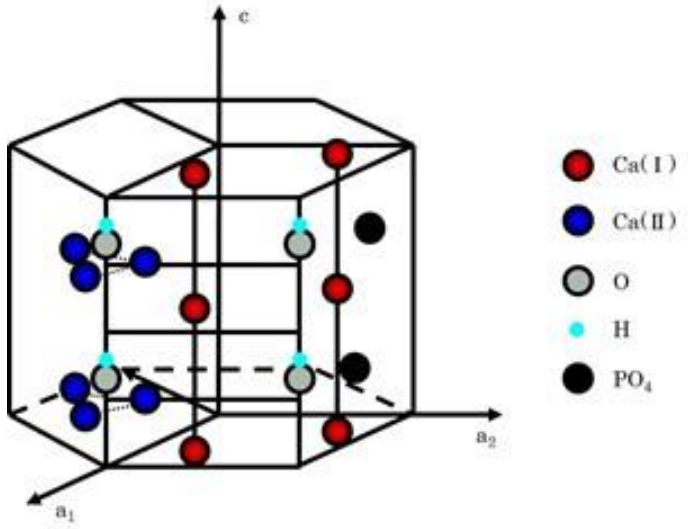


Fig. 1-7 水酸アパタイトの結晶構造

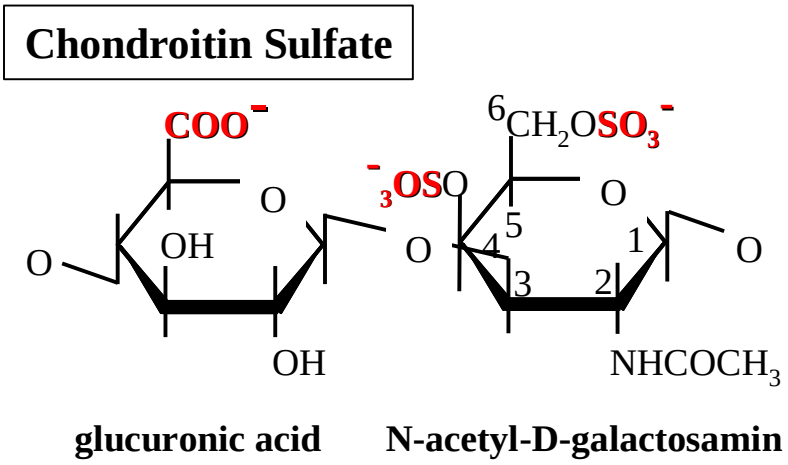


Fig. 1-8 コンドロイチン硫酸の構造

タンパク質を多孔質微粒子に担持させるにあたり，タンパク質の種類によって粒子との相互作用が変化し，タンパク質の担持量や放出特性が変わってしまう．製剤化処理の利便

性を考慮すると, 担体の性質をタンパク質によって制御するよりは第 3 の要素を付加して担持量・放出特性を制御することが望ましい. そこで, 生体微量必須金属である亜鉛 (Zn) を製剤化処理に用いることを検討する. Zn は, 生体内で骨形成, 味覚, 創傷治癒, 免疫維持作用, 抗酸化作用など様々な効果を有しており, ヒスチジンを多く含むタンパク質とキレート錯体を形成する[24]. このキレート錯体による安定化を利用してタンパク質の放出を制御できる可能性がある. ただし, Zn の生体内濃度が過剰になると毒性をきたすため, 製剤化処理における添加量には限りがあり, 担体との相互作用についても明らかにする必要がある.

Fig. 1-9 と Fig. 1-10 に, 代表的な 2 つの薬物放出担体を示す[25]. 1 つ目はモノリシック型（monolithic type）であり, ハイドロゲルや多孔質粒子が相当する. 担体内での薬物の拡散速度が放出挙動に影響するが, 担体内の拡散速度は担体の外つまり液相よりも小さい. 担体の外側に担持されている薬物は投与されてから比較的初期に放出されるが, 放出速度は時間の経過とともに低下する. しかし, 担体内での薬物の拡散速度を制御できれば放出速度を持続させることも可能である. 2 つ目はリザーバー型（reservoir type）であり, リポソームが相当する. 担体内は液相であり薬物は自由に拡散できるため, 放出速度は担体の外側にある放出制御膜に依存する. 初期の爆発的な放出はなく, 放出量が直線的に増加するようなゼロ次放出が起こる. 薬物の放出制御により体内の血中濃度を維持させるにはリザーバー型の放出挙動が望ましい.

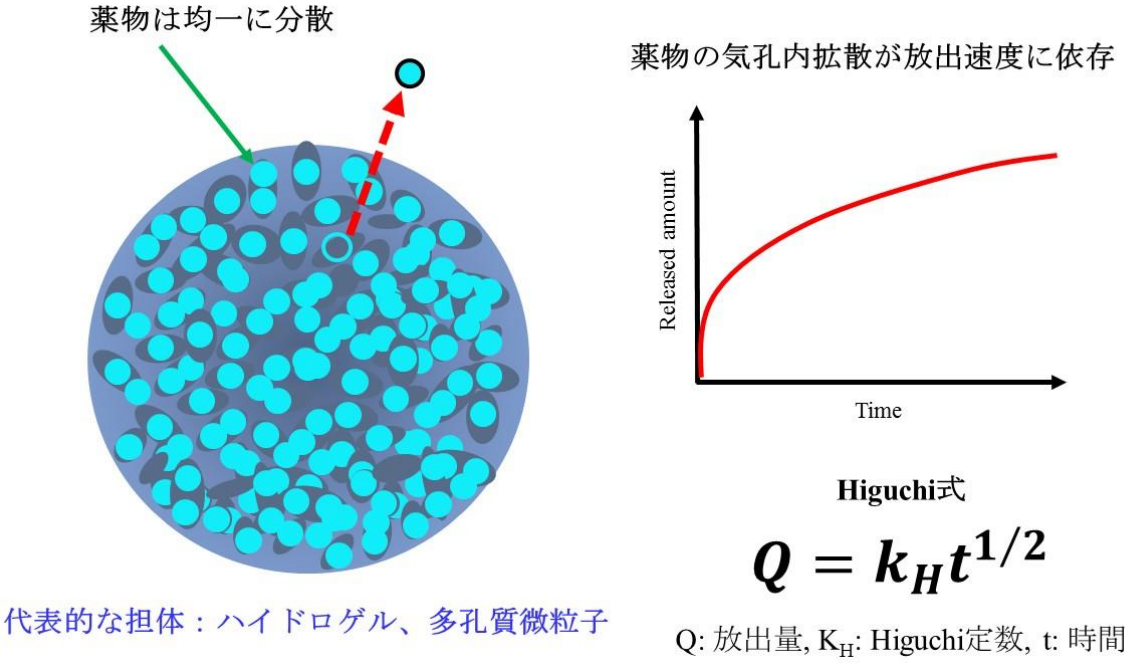


Fig. 1-9 モノリシック型（Monolithic）放出担体とその薬物放出挙動および Higuchi 式

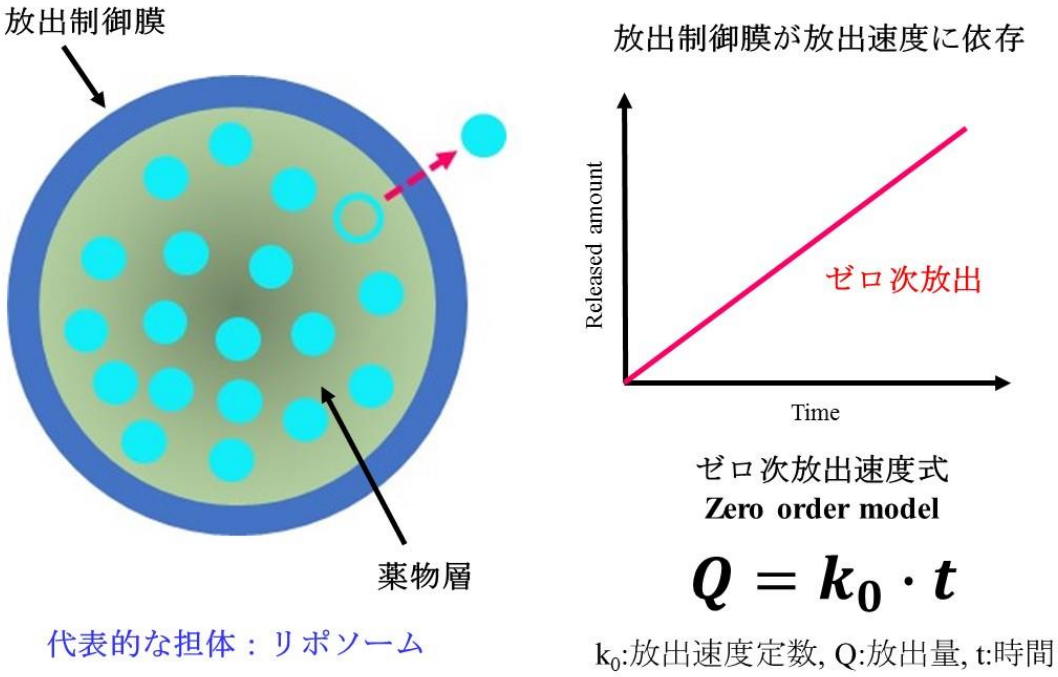


Fig. 1-10 リザーバー型（Reservoir）放出担体とその薬物放出挙動およびゼロ次放出速度式

１．５．本研究に用いる骨代謝関連タンパク質

骨代謝・骨免疫における骨形成・骨吸収のメカニズムが解明される中，骨関連疾患においても生体内の分子に特異的に作用して薬理効果を生み出す分子標的治療薬が実際に臨床において日常化しつつある．以下では，分子標的治療薬に包含される骨代謝関連タンパク質について概説する．骨代謝関連タンパク質は，主に骨吸収抑制型と骨形成促進型に大別される．

骨吸収抑制薬は相対的に骨吸収が亢進した病態である骨粗鬆症の治療に専ら用いられる．代表的な抗体医薬として，Dmab が挙げられる．Dmab は完全ヒトモノクローナル抗体（IgG_2）であり，半減期が長く半年に 1 回の皮下投与（60mg）で十分な骨量の増加効果を示し，生体内においても中和抗体も産生されないため，骨粗鬆症治療薬でプラリア®として商品化されている．関節リウマチによる関節面骨びらんを抑制したり[26]，多発性骨髄腫・転移性骨腫瘍による病的骨折を予防したり[27]，骨粗鬆症に対して高い骨密度上昇効果をもたらす[7]．しかしながら，強い骨吸収抑制作用を有するが故に，低 Ca 血症の危険性[28]があり血中での Ca 濃度のモニタリングを要する．

一方，骨形成促進作用を有する抗体医薬として Sclmab が挙げられる．Sclmab は世界初の骨形成促進作用を有する生物学的製剤として注目されており，骨粗鬆症治療薬として商品化される予定である．Sclmab は，Wnt 経路から産生された sclerostin を不活化させることで骨芽細胞に作用して骨形成を促進する[29]．閉経後の女性に対して高い骨密度上昇効果を示す[8]．また，ラットへの全身投与にて骨折の治癒を促進することも報告されている[30]．しかしながら，その骨形成促進作用により長期間の投与で変形性関節症の進行，血管内の石灰化による心筋梗塞・脳梗塞の発症リスク，悪性骨腫瘍の発症リスクが懸念されている．

Fig. 1-11 に骨芽細胞と破骨細胞の骨代謝のメカニズムについて示す[29]. 骨芽細胞は骨を形成する単核細胞であり，骨髄の間葉系幹細胞から分化する．ここで，骨細胞から分泌された SOST（Sclerostin）はこの骨芽細胞の分化・活性を阻害するが，Sclmab はこの SOST に対する中和抗体であり，骨芽細胞を活性化させて骨形成促進に働く．また，成熟骨芽細胞は RANKL を分泌して破骨細胞も抑制するため, 弱いながらも骨吸収抑制にも働くといった Dual effect も有する[8]．破骨細胞は骨を吸収する多核細胞であり，骨髄の造血幹細胞由来で単球から分化する．細胞膜には RANK という受容体があり，RANKL と結合する

ことで分化・活性が促進されるが，Dmab は RANKL を中和・不活化させることで骨吸収抑制に働く．一方，Dmab と類似したメカニズムで骨吸収抑制作用を有する糖タンパク質で破骨細胞形成抑制因子（OPG）がある．OPG は RANK のデコイ受容体であり RANKL と結合することで破骨細胞の分化･活性を抑制して Dmab と同様に骨吸収抑制に働く[31].

骨組織に病巣を有する局所疾患に対しては, 骨代謝を調節して骨吸収を抑制したり骨形成を促進したりすることが可能なモノクローナル抗体が活躍すると考えられる. 一般的には，骨吸収が亢進するような局所疾患，例えば転移性骨腫瘍（単発性），骨巨細胞種，インプラント周囲骨融解などには Dmab を，骨折治癒などの促進が必要な場合，例えば粉砕骨折，偽関節（骨癒合不全），骨欠損などは Sclmab を適用するの望ましい.

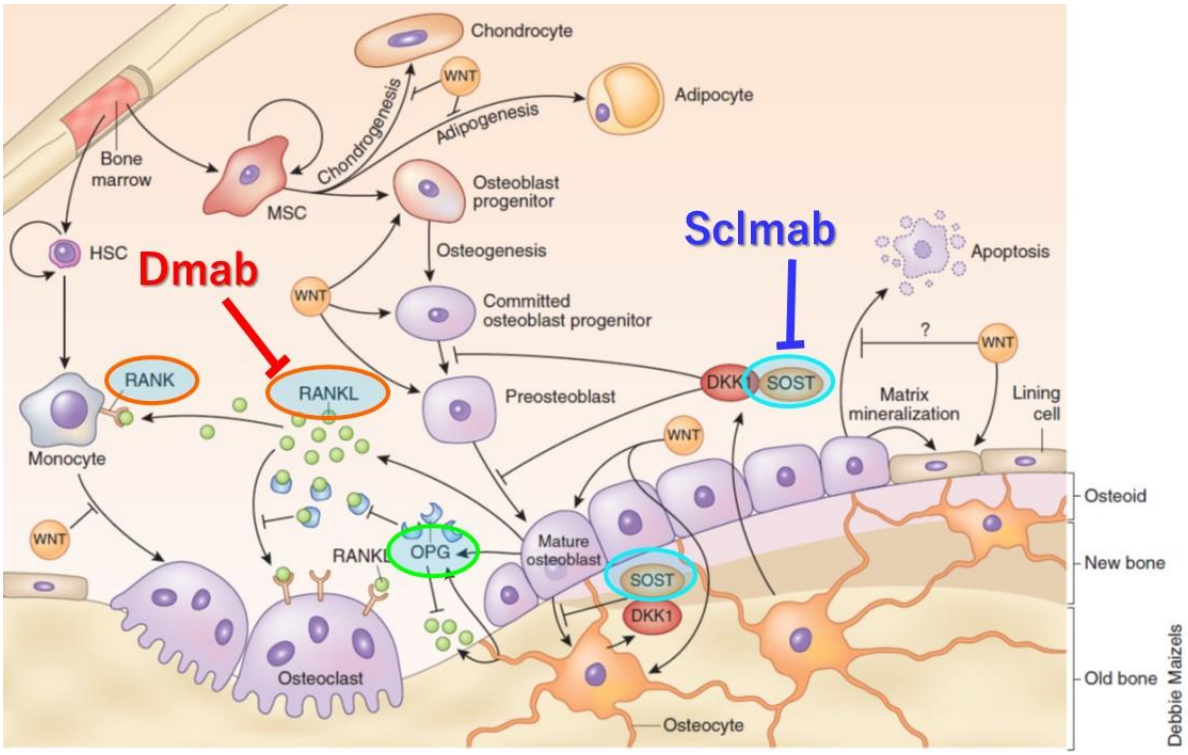


Fig. 1-11 骨組織における骨芽細胞と破骨細胞における骨形成と骨吸収（[28]より引用・改変）

１．６．原発性骨粗鬆症患者に対する骨吸収抑制薬 Dmab 投与の短期成績

河北総合病院の整形外科に在籍中，原発性骨粗鬆症患者に対して Dmab を投与し，半年間における骨代謝マーカー，骨密度（bone mineral density; BMD）の変化を評価した．Fig. 1-12 に，対象および方法について示す．調査期間は 2014-2017 年である．整形外科外来の患者に対して，骨粗鬆症認定医と共に診察し，Dmab の投与が必要であるか判断した．骨密度の骨密度若年成人平均値（young adult mean; YAM）が 60%未満（特に大腿骨近位部），およびビスフォスフォネート製剤（bisphosphonate; BP），選択的エストロゲン受容体モジュレーター（selective estrogen receptor modulators; SERM）やエルデカルシトール（eldecalcitol; EDL）などでも BMD 上昇効果が見られなかった症例を中心に対象とした．また，低 Ca 血症の予防のために，Dmab 投与開始と同時に Ca とビタミン D の合剤であるデノタス®の経口投与も開始した．ただし，投与後の採血にて Ca が上昇傾向であった場合はデノタス®の中止・減量を検討した患者も含まれる．Dmab 投与開始時と投与半年後に骨密度検査（dual-energy X-ray absorptiometry; DEXA）を実施し，投与開始時と 1, 3, 6 か月後に採血して骨代謝マーカーを測定した．骨代謝マーカーは，骨吸収マーカーである骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（Tartrate-Resistant ACid Phosphatase-5b; TRACP-5b）と骨形成マーカーである骨型アルカリフォスファターゼ（bone alkaline phosphatase; BAP）を測定した．

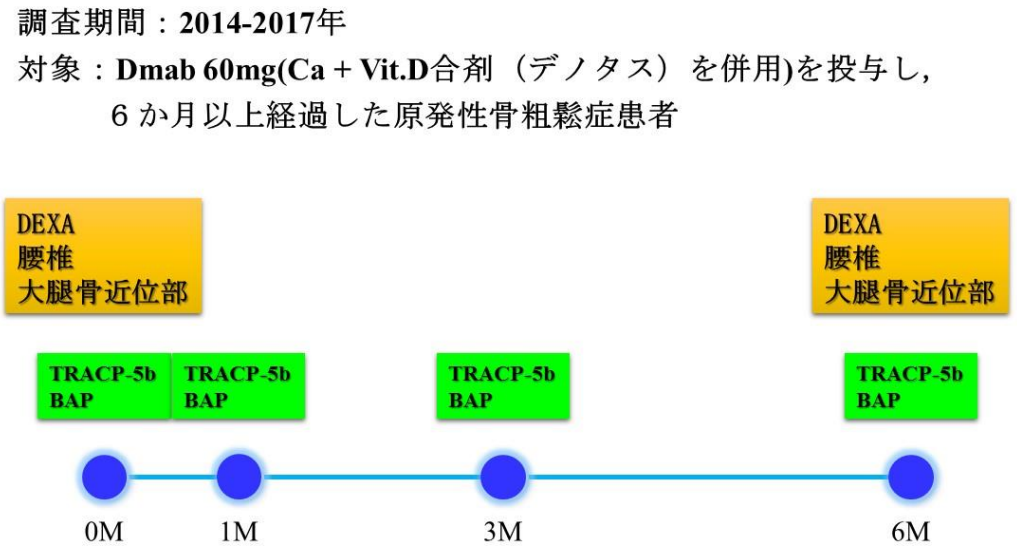


Fig. 1-12 原発性骨粗鬆症患者に対する Dmab の皮下注射における対象と方法（河北総合病院）

症例数は 25 名で平均年齢は 77.5 歳，男女比は男性 2 例，女性 23 例であった．そのうち，前治療薬は BP が 3 例，SERM が 4 例，EDL が 2 例であった．骨折歴は大腿骨近位部骨折が 3 例，橈骨遠位端骨折が 4 例，椎体骨折が 7 例であった．投与後の重篤な有害事象は認めなかった．なお，投与後半年以内に 1 名の患者が誤嚥性肺炎により死亡したが本治療との関連性はないと考える．

Fig. 1-13 に Dmab 投与時と半年後の腰椎 BMD の変化について示す．統計解析は Wilcoxon signed-ranks test 法を用いた. Dmab 投与時の平均腰椎 BMD は 0.644 g/cm^2 であり，半年後は 0.667 であった． Dmab を投与して半年間で腰椎 BMD の上昇率は平均 4.0%であり統計的に有意な変化を認めた．

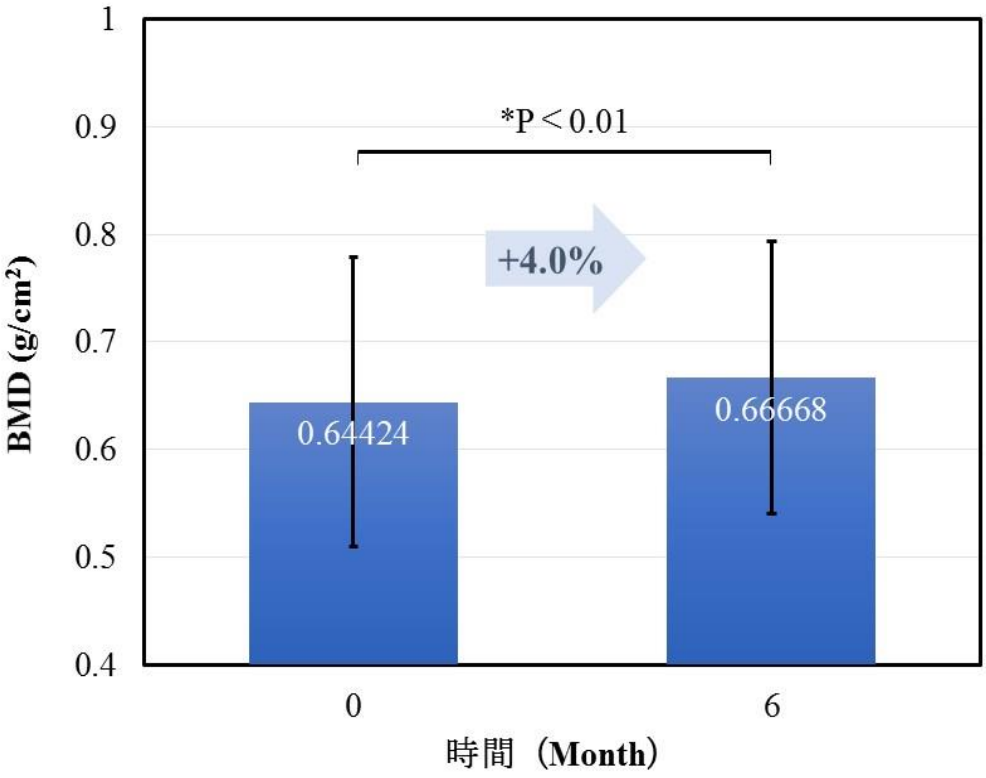


Fig. 1-13 原発性骨粗鬆症患者に対する Dmab 投与半年後の腰椎の BMD 変化
（* Wilcoxon signed-ranks test）

Fig. 1-14 に Dmab 投与時と半年後の大腿骨近位部 BMD の変化について示す．統計解析は同様に Wilcoxon signed-ranks test 法を用いた．Dmab 投与時の平均大腿骨近位部 BMD は 0.559 g/cm^2 であり，半年後は 0.572 であった．Dmab を投与して半年間で大腿骨近位部の BMD の上昇率は平均 2.4%であり統計的に有意な変化を認めた．

Table 1-1 に，河北総合病院における原発性骨粗鬆症患者に対して Dmab を投与し，半年

後における BMD の変化率および文献との比較を示す．腰椎・大腿骨近位部ともに文献と同等の値であった[7, 32]．

このように，Dmab は投与して半年で腰椎・大腿骨近位部共に有意な骨量増加作用があることがわかる．Dmab は 2017 年 7 月の時点で，我が国で承認されている骨粗鬆症治療薬のうち最も骨量増加作用が強いと言われている．

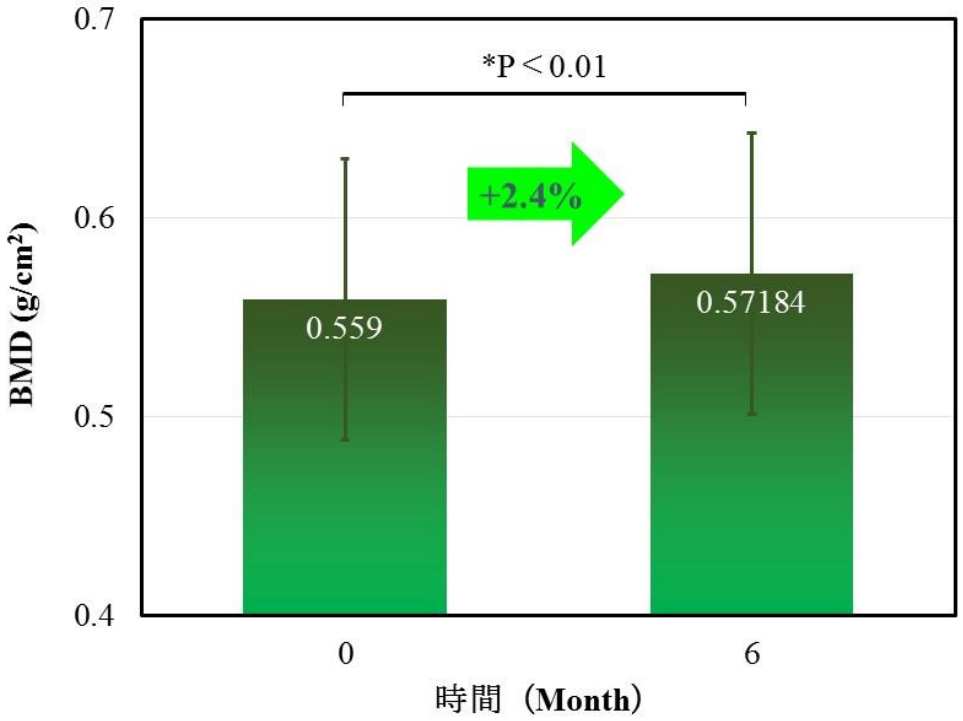


Fig. 1-14 原発性骨粗鬆症患者に対する Dmab 投与半年後の大腿骨近位部の BMD 変化
（* Wilcoxon signed-ranks test）

Table 1-1 河北総合病院における Dmab 投与臨床試験と文献との比較

	河北総合病院	Cummings et al.	Nakamura et al.
腰椎BMD (%)	4.0	3.8	4.1
大腿骨近位部BMD (%)	2.4	1.8	1.6

Fig. 1-15 に，Dmab 投与後の TRACP-5b の血中濃度の推移を示す．TRACP-5b は Dmab 投与 1 か月後から低下し，Dmab を投与して 1 か月で骨吸収が抑制されていることがわかる．また，6 か月後でわずかながら上昇したものの，半年間，骨吸収の抑制が維持されていることもわかった．

Fig. 1-16 に，Dmab 投与後の BAP の血中濃度の推移を示す．BAP は，Dmab を投与して 1 か月後から減少傾向を示したが，TRACP-5b よりも緩やかな減少であった．Dmab は骨吸収を抑制するだけでなく，骨形成も抑制することがわかる．以上の結果より，Dmab を投与して 1 カ月後から骨吸収が始まるが, 骨形成の抑制は遅延して生じることがわかった.

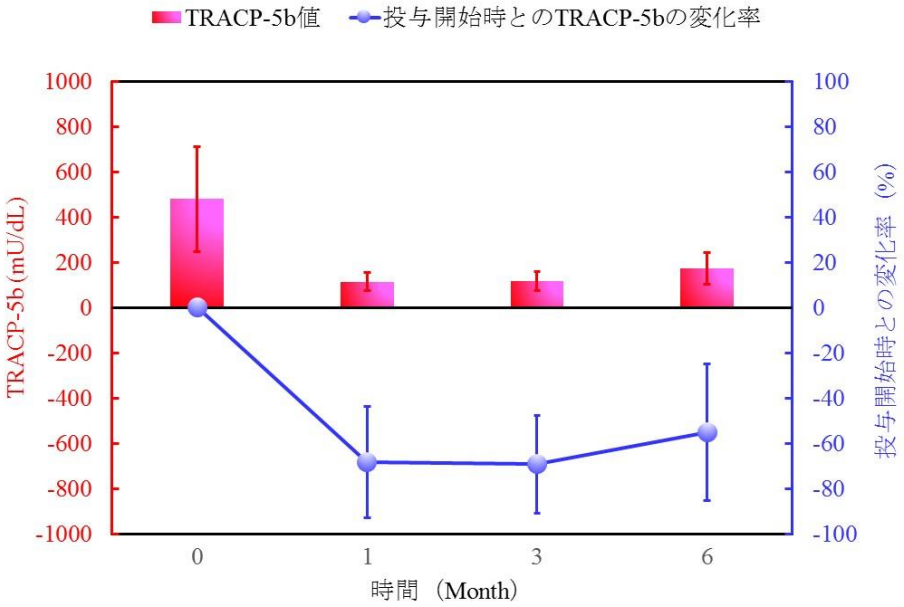


Fig. 1-15 原発性骨粗鬆症患者に対して Dmab 投与後の骨吸収マーカーTRACP-5b の推移

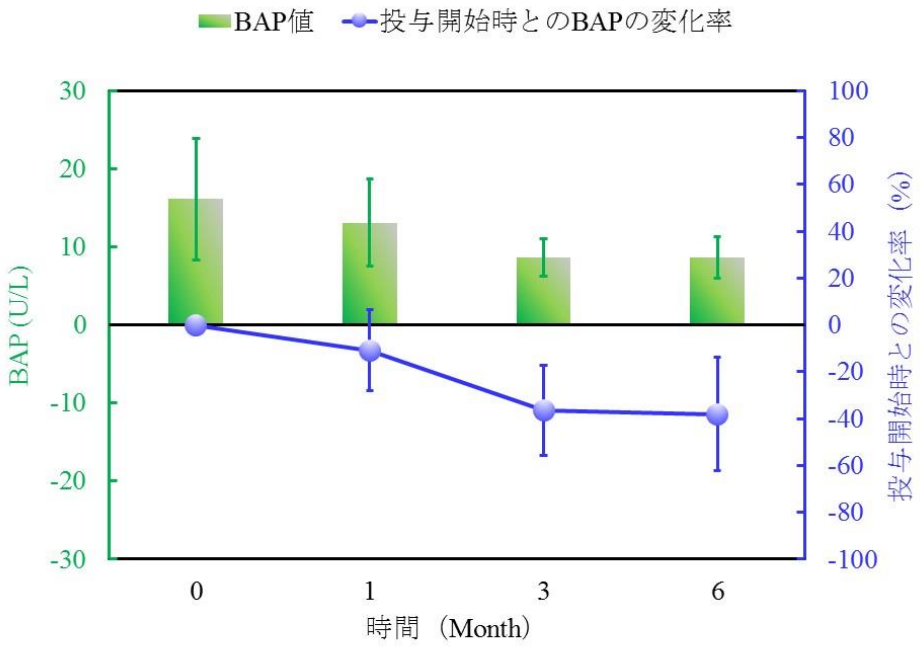


Fig. 1-16 原発性骨粗鬆症患者に対して Dmab 投与後の骨形成マーカーBAP の推移

Fig. 1-17 に，Dmab 投与後の血清補正 Ca 濃度の推移を示す．血清補正 Ca 濃度は，血清アルブミン濃度が 4.0 g/dl 未満の時，血清補正 Ca 値 (mg/dl) = 実測血清 Ca 値 (mg/dl)＋4－血清アルブミン値 (g/dl) で表される．Ca 濃度統計学的な有意差は t 検定法を用いた．観察期間において血清補正 Ca 濃度の有意な変化は認めなかった．Fig. 1-17 に，Dmab 投与後の推算糸球体濾過量（estimated glomerular filtration rate; eGFR）の推移を示す．統計学的な有意差は t 検定法を用いた．Dmab 投与して 1, 3 か月後では有意な腎機能の低下を認めたが，6 か月後では投与時と比べて有意差は認めなかった．

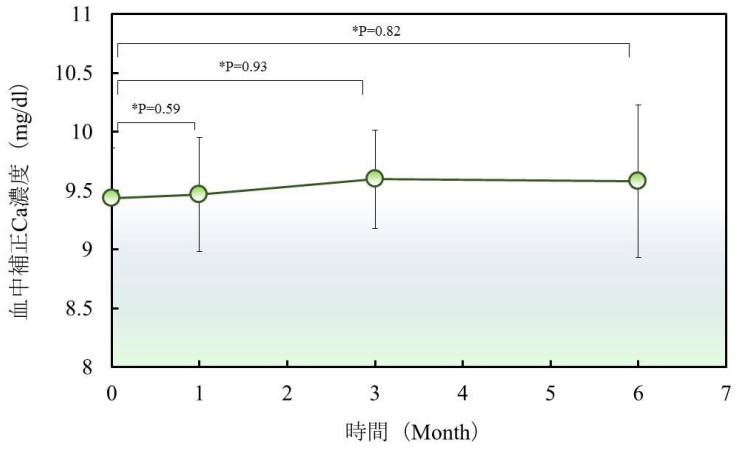


Fig. 1-17 Dmab 投与後の血清補正 Ca 濃度の推移

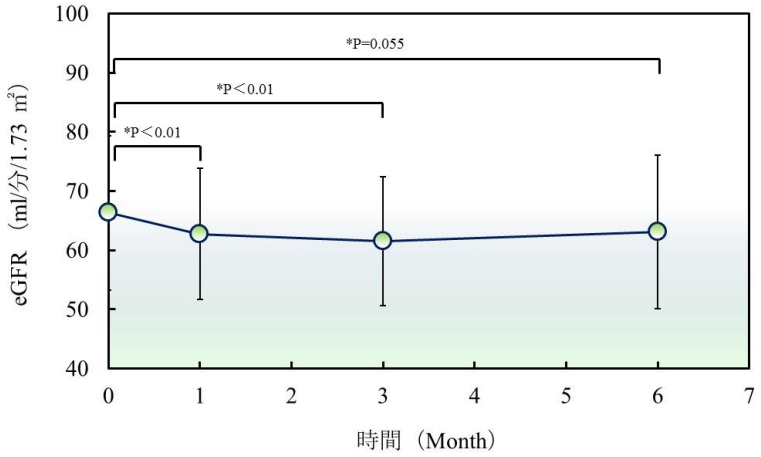


Fig. 1-18 Dmab 投与後の eGFR の推移

Fig. 1-19, 1-20, 1-21 に，Dmab を投与した患者における腰椎 BMD の上昇率と骨代謝マーカーの変化率との間における相関を示す．右の図は，Dmab 投与して 1, 3, 6 か月後の骨代謝マーカーと半年間の腰椎 BMD の上昇率との相関係数 R^2 について示す．スピアマン順位相関係数を計算したところ，1, 3, 6 か月後の TRACP-5b と腰椎 BMD の上昇率との間で負の相関関係を認めた．一方，BAP については，腰椎 BMD の変化との間で統計学的な相関関係を認めなかった．

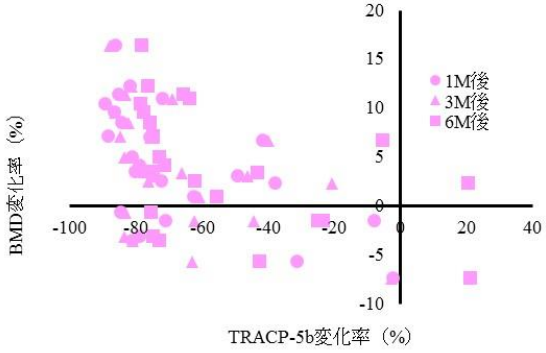


Fig. 1-19 Dmab 投与後の TRACP-5b 変化率と腰椎 BMD の上昇率との関係

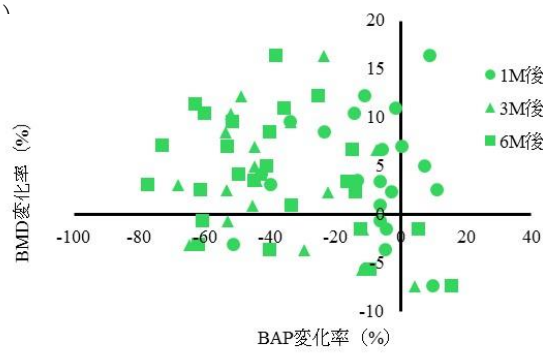
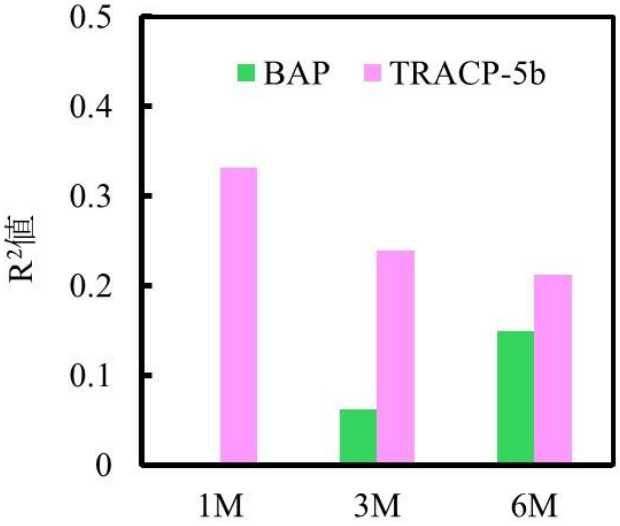


Fig. 1-20 Dmab 投与後の BAP 変化率と腰椎 BMD の上昇率との関係



BMD の上昇率との相関係数 R^2 値

Fig. 1-22, 1-23, 1-24 に，Dmab を投与した患者における大腿骨近位部 BMD の上昇率と骨代謝マーカーの変化率との間における相関を示す．右の図は，Dmab 投与して 1, 3, 6 か月後の骨代謝マーカーと半年間の大腿骨近位部 BMD の上昇率との相関係数 R^2 について示す．スピアマン順位相関係数を計算したところ，1 か月後の TRACP-5b のみと大腿骨近位部 BMD の上昇率との間で負の相関関係を認めた．一方，BAP については，腰椎 BMD の変化との間で統計学的な相関関係を認めなかった．注意すべき点は，相関係数 R^2 値は投与 1 カ月後の BAP の方が TRACP-5b よりも高値を示したが，統計的な相関関係については TRACP-5b にのみ認めたことである．

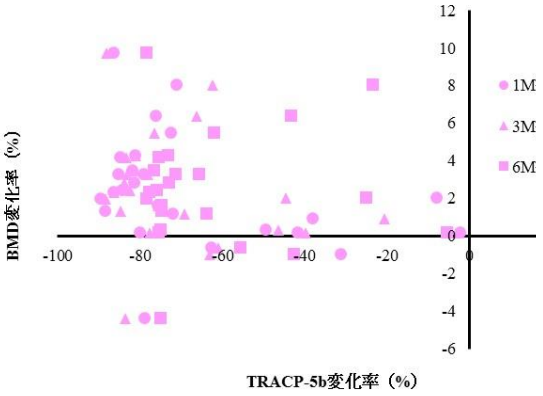


Fig. 1-22 Dmab 投与後の TRACP-5b 変化率と大腿骨近位部 BMD の上昇率との関係

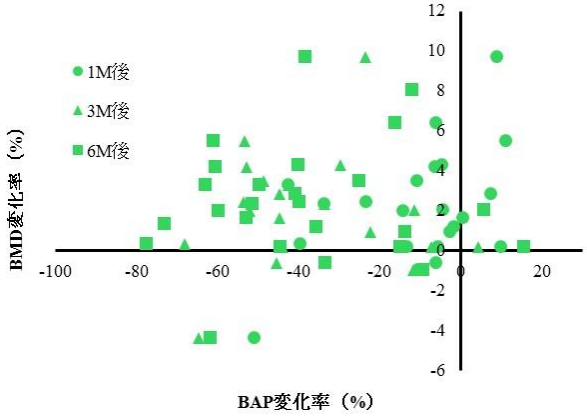


Fig. 1-23 Dmab 投与後の BAP 変化率と大腿骨近位部 BMD の上昇率との関係

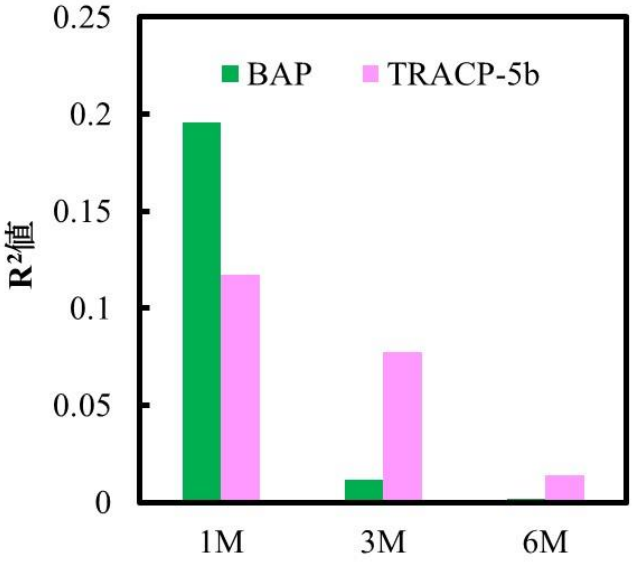


Fig. 1-24 Dmab 投与後の骨代謝マーカー変化率と大腿骨近位部 BMD の上昇率との相関係数 R^2 値

Table 1-2 に，Dmab 投与後の骨代謝マーカーの変化率と BMD の上昇率との相関関係の有無についてまとめた．辻らは，Dmab を投与して 3 か月後の BAP と TRACP-5b の血中濃度を測定したところ，TRACP-5b には相関関係はなく，BAP にのみ統計学的に相関関係を認めたと報告している[33]．一方，今回の調査では，観察期間において全ての時期において TRACP-5b の変化率と腰椎 BMD の上昇率との間で相関関係を認めた．また，Dmab 投与 1 カ月後において TRACP-5b と大腿骨近位部 BMD の上昇率において相関関係を認めた. BAP においては観察期間において BMD と相関関係を認めなかった. これらの結果は，Dmab を初回投与して 1 カ月後に TRACP-5b を測定することで半年後の BMD の上昇率をある程度は推測できることを示唆する．また，初回投与後，患者に早期から治療効果を説明でき，治療継続の意欲につながる．

Table 1-2 Dmab 投与後の骨代謝マーカーの変化率と BMD の上昇率との相関関係の有無

	TRACP-5b			BAP		
	1M	3M	6M	1M	3M	6M
腰椎BMD	○	○	○	×	×	×
大腿骨近位部BMD	○	×	×	×	×	×

Fig. 1-25 に，健康な日本人閉経後女性に Dmab 1.0 mg/kg を単回皮下投与したときの血中 Dmab 濃度の推移を示す[34]．Dmab の血中濃度は皮下投与して 2-3 週間後でピークに到達して以降は減少傾向を示し，6 か月後にはほぼ消失した． Dmab を投与して 1 カ月後の TRACP-5b の変化率が，半年後の BMD と相関関係を認めたことが，Dmab の血中濃度が投与して 2-3 週間後にピークに到達したことと関連していると考えられる．TRACP-5b は破骨細胞の活性に比較的早期に反応して変動する骨吸収マーカーである．

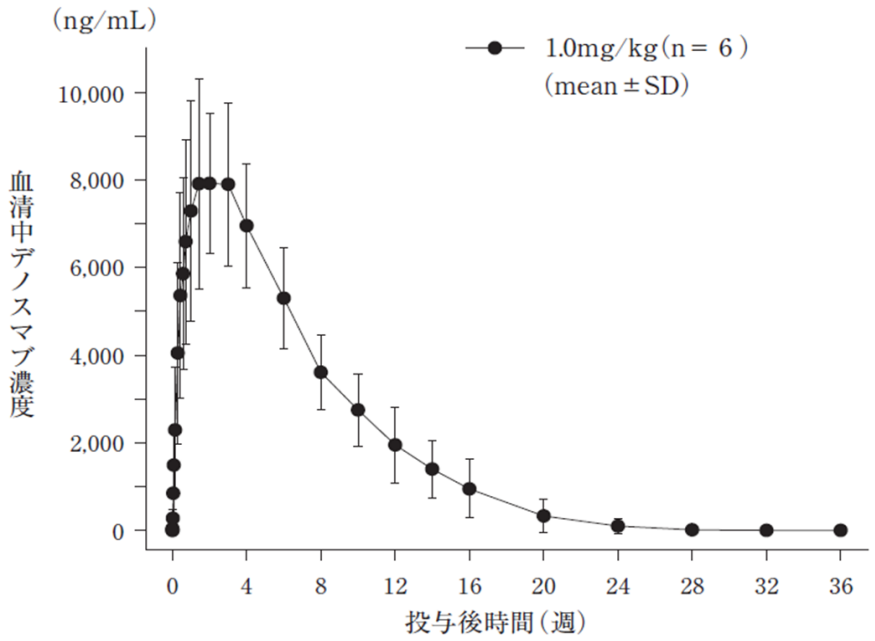


Fig. 1-25 健康な日本人閉経後女性に Dmab 1.0 mg/kg を単回皮下投与したときの血中 Dmab 濃度の推移（プラリア®の添付文書より抜粋）

このように, Dmab は原発性骨粗鬆症患者に投与して半年で高い BMD 上昇効果を示す．また，Dmab の血中濃度が高い時期の TRACP-5b の変化率が半年後の BMD の上昇率と有意に相関していることからも，Dmab が濃度依存性に効果を発現することが伺える．

１．７．本研究の目的

骨関連疾患に対する局所･全身投与可能な放出制御型担体および普遍的に応用可能なタンパク質医薬の製剤化技術の開発を目指す．骨の無機主成分である HAp と軟骨成分の一つである ChS のナノ複合体から作製した HAp/ChS 多孔質微粒子を抗体の担体に適用し，各種タンパク質と担体との相互作用を解析して粒子の適切な担持条件を検討した．また，Zn を用いて, HAp/ChS およびタンパク質との相互作用を分析して製剤化条件を確立した．これらの結果を基にして，Sclmab を担持させた製剤化粒子を作製し，その動物学的評価から製剤化による担体と放出された抗体の有効性を明らかにした．

参考文献

[1] Assessment of fracture risk and its application to screening of r postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO study group. WHO technical report series 843, 1994.

[2] Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Cohort Profile: Research on Osteoarthritis/osteoporosis Against Disability (ROAD) Study. Int J Epidemiol, Int J Epidemiol, 39, p988-95, 2010.

[3] Yoshimura N, Muraki S, Oka H, et al. Prevalence of Knee osteoarthritis, lumbar spondylosis and osteoporosis in Japanese men and women; the research on osteoarthritis osteoporosis against disability study. J Bone Miner Metab, 27, p620-628, 2009.

[4] 日本の将来推計人口 2006-2055 年, 国立社会保障・人口問題研究所（編）, 厚生統計協会 2007.

[5] Hagino H, et al. The risk of a second hip fracture in patients after their first hip fracture. Calcif Tissue Int 90 (1), p14-21, 2012.

[6] McLellan AR et al. The fracture liaison service: success of a program for the evaluation and management of patients with osteoporotic fracture. Osteoporos Int 14, p1028-1034, 2003.

[7] Steven R. Cummings, M.D., Javier San Martin, M.D., Michael R. McClung, M.D., Ethel S. Siris, M.D., Richard Eastell, M.D., Ian R. Reid, M.D., Pierre Delmas, M.D., Ph.D., Holly B. Zoog, Ph.D., Matt Austin, M.S., Andrea Wang, M.A., Stepan Kutilek, M.D., Silvano Adami, M.D., Ph.D., Jose Zanchetta, M.D., Cesar Libanati, M.D., Suresh Siddhanti, Ph.D., and Claus Christiansen, M.D., for the FREEDOM Trial, Denosumab for Prevention of Fractures in Postmenopausal Women with Osteoporosis, N Engl J Med, 361, p756-765, 2009.

[8] Michael R. McClung, M.D., Andreas Grauer, M.D., Steven Boonen, M.D., Ph.D., Michael A.

Bolognese, M.D., Jacques P. Brown, M.D., Adolfo Diez-Perez, M.D.,Ph.D., Bente L. Langdahl, Ph.D., D.M.Sc., Jean-Yves Reginster, M.D., Ph.D., Jose R. Zanchetta, M.D., Scott M. Wasserman, M.D., Leonid Katz, M.D., Judy Maddox, D.O., Yu-Ching Yang, Ph.D., Cesar Libanati, M.D., and Henry G. Bone, M.D., Romosozumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density, New England of Journal of Medicine, 370, p412-420, 2014.

[9] Berinstein, N. L. et al., Ann. Oncol., 9, p995-1001, 1998.

[10] Baselga, J. & Albanell, J., Ann. Oncol., 12, S35-S41, 2001.

[11] Arun S Singh, Neal S Chawla, Sant P Chawla, Giant-cell tumor of bone: treatment options and role of denosumab, Biologics: Targets and Therapy, Volume 9 p69-74, 2015.

[12] ランマーク®の適正使用について，第一三共株式会社

[13] Yutaka Kuroda, Ryuta Asada, Kazutaka So, Atsushi Yonezawa, Manabu Nankaku, Kumi Mukai, Toshiko Ito-Ihara, Harue Tada, Michio Yamamoto, Toshinori Murayama, Satoshi Morita, Yasuhiko Tabata, Masayuki Yokode, Akira Shimizu, Shuichi Matsuda, Haruhiko Akiyama, International Orthopaedics (SICOT) 40, p1747-1754, 2016.

[14] Vanna Bottai, Giacomo Dell'Osso, Fabio Celli, Giulia Bugelli, Niki Cazzella, Elena Cei, Giulio Guido, Stefano Giannotti, Total hip replacement in osteoarthritis: the role of bone metabolism and its complications, Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. 12(3), p247-250, 2015.

[15] Yutaka Inaba, MD, PhD, Naomi Kobayashi, MD, PhD, Masatoshi Oba, MD, Hiroyuki Ike, MD, PhD, So Kubota, MD, Tomoyuki Saito, MD, PhD, Difference in Postoperative Periprosthetic Bone Mineral Density Changes Between 3 Major Designs of Uncemented Stems: A 3-Year Follow-Up Study The Journal of Arthroplasty xxx, p1-6, 2016.

[16] Neil Cobelli, Brian Scharf, Giovanna M. Crisi, John Hardin and Laura Santambrogio, Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices Nat. Rev. Rheumatol. 7, p600-608, 2011.

[17] Eva Grimaud, Luc Soubigou, Se´verine Couillaud, Patrick Coipeau, Anne Moreau, Norbert Passuti, Franc¸ois Gouin, Franc¸oise Redini, and Dominique Heymann, Receptor Activator of Nuclear Factor κB Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis, American Journal of Pathology, Vol. 163, No. 5, November 2003.

[18] Salemyr M, et al., Vitamin-E diffused highly cross-linked polyethylene liner compared to

standard liners in total hip arthroplasty. A randomized, controlled trial. Int Orthop (in press)

[19] Prietro-Alhambra DP, et al., Association between bisphosphonate use and implant survival after total arthroplasty of the knee or hip : population based retrospective cohort study. Br Med J 343: d7222 doi: 10. 1136/bmj. d7222, 2011.

[20] Prietro-Alhambra DP, et al., Oral bisphosphonate use and total/knee implant survival. Validation of results in an external population-based cohort. Arthritis Rheum 66, p3223-3240, 2014.

[21] Khatod M. et al., Association with bisphosphonate use and risk of revision after THA: Outcomes from a US total joint replacement registry. Clin Orthop, DOI 10. 1007/s11999-015-4263-4, 2015.

[22] T. Matsumotoa, M. Okazakib, M. Inouec, S. Yamaguchic, T. Kusunosec, T. Toyonagaa, Y. Hamadaa, J. Takahashi, Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein, Biomaterials, 25, p3807-3812, 2004.

[23] Keishiro Tomoda, Hidehiko Ariizumia, Takatomo Nakaji, Kimiko Makino, Hydroxyapatite particles as drug carriers for proteins Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 76, p226-235, 2010.

[24] Allison L. Jones, Mark D. Hulett‡, and Christopher R. Parish, Histidine-rich Glycoprotein Binds to Cell-surface Heparan Sulfate via Its N-terminal Domain following Zn^{2+} Chelation, THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 279, No. 29, Issue of July 16, p30114-30122, 2004.

[25] 田中順三, 生駒俊之, 植村寿公, 大森健一, バイオセラミックス, コロナ社, p158-162, 2009.

[26] Takeuchi T, et al., Effect of denosumab on Japanese patients with rheumatoid arthritis: a dose–response study of AMG 162 (Denosumab) in patients with RheumatoId arthritis on methotrexate to Validate inhibitory effect on bone Erosion (DRIVE)—a 12-month, multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase II clinical trial, Ann Rheum Dis, 0, p1-8, 2015.

[27] Lipton A, Fizazi K, Stopeck AT, et al., Superiority of denosumab to zoledronic acid for prevention of skeletal-related events: a combined analysis of 3 pivotal, randomised, phase 3 trials. Eur J Cancer. 48, p3082-3092, 2012.

[28] Karen A. AutioSevere, Hypocalcemia Associated with Denosumab in Metastatic

Castration-Resistant, Prostate Cancer: Risk Factors and Precautions for Treating Physicians, Clinical Genitourinary Cancer. 13(4), November, 2014.

[29] Roland Baron & Michaela Kneissel, WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments, Nature Medicine, Vol.19, No.2, p179-192, FEB, 2013.

[30] Gao Feng, Zhang Chang-Qing, Chai Yi-Min, Li Xiao-Lin, Systemic administration of sclerostin monoclonal antibody accelerates fracture healing in the femoral osteotomy model of young rats, International Immunopharmacology 24, p7-13, 2015.

[31] W. S. Simonet et al. Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density, Cell, Vol. 89, p309-319, April 18, 1997.

[32] Nakamura T et al. J Clin Endocrinol Metab 99 (7), p2599-2607, 2014.

[33] 辻王成 et al. 整形外科と災害外科 64 (3), p398-401, 2015.

[34] Kumagai Y et al. Bone 49 (5), p1101-1107, 2011.

第２章

多孔質微粒子の作成とタンパク質との相互作用と放出特性

１．緒言・目的

医薬品としてタンパク質を局所投与する場合, その効果が発現されるためには局所の有効血中濃度が維持されるように一定期間タンパク質が放出されるような放出制御型の担体が必要である．また，担体はそれ自体が良好な生体適合性を有し，タンパク質を安定かつ長期間担持できることが望ましい．さらに，タンパク質の種類，生体内環境によって必要な量のタンパク質が異なるのでそれに応じてタンパク質の放出を制御できるような製剤化技術も必要である.

まず, 優れた生体適合性を有する素材としては, 生体由来であり投与部位の組織成分が好ましい. 本研究は骨疾患をターゲットとした放出制御型担体を目指しているので, 骨の主成分である水酸アパタイト（hydroxiapatite: HAp）が担体の基盤材料に適している．これを局所投与するにあたり生理食塩水などに浸してシリンジから注射投与できれば, 手術中だけでなく外来診療においても経皮的に穿刺して投与できる. 担体のサイズ・形状としては数μm 程度の微粒子であれば十数 nm 程度のタンパク質を担持でき，中空の注射針を強い抵抗なく通過することができる. さらに, 粒子が多孔質であれば比表面積が高くなる分，より多量のタンパク質を担持できる．また，タンパク質が多孔質微粒子の気孔内に均一に分布するように担持されれば, タンパク質が粒子内の気孔内拡散に依存して放出される．さらに，HAp の微粒子は水に浸しても均一になりにくいため，簡便にスラリー状もしくはペースト状にするには親水性を付加させる必要がある.

これまでに，HAp だけでなく親水性の酸性ムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸（chondroitin sulfate: ChS）とのナノ複合体（HAp/ChS）について，自己組織化現象を利用して人工的に合成できることを報告している．HAp/ChS ナノ複合体からスプレードライ法によりその球状多孔質微粒子を作製できる. スプレードライ法は粒子の回収率が優れていることから商業的に大量生産が可能である.

本章では，これまでに報告している方法で作製した HAp/ChS 多孔質微粒子について，タンパク質の放出制御型担体としての物性を純粋な HAp と比較して評価した．また，各種タンパク質と HAp/ChS との間の相互作用を分析するため，多孔質微粒子へのタンパク

質の吸着特性を数理解析により評価した．さらに，タンパク質を担持させた多孔質微粒子に対して，亜鉛（Zn）を用いた製剤化処理を行い，そのタンパク質の試験管内での放出特性を評価した．

２．２．実験方法

２．２．１．HAp/ChS 多孔質微粒子の作製

炭酸カルシウム（$CaCO_3$：102g）をアルミナ容器に入れ，昇温速度 100℃/hour にて 1050℃で 3 時間保持した後，300℃付近で容器を電気炉から取り出した．反応式を（2-1）に示す．

$$CaCO_3 \rightarrow CaO + CO_2\uparrow \quad \text{(2-1)}$$

これにより酸化カルシウム（CaO）を作製した．得られた酸化カルシウムを 56g 秤量してステンレス寸胴に入れ，18ml の蒸留水をシリンジで加えてすぐに封をして 1 分間振り続けた（発熱反応）．その後，10 分間静置した．この加水分解操作を（合計 3 回）繰り返した．1 リットルの蒸留水で希釈して 24 時間攪拌して 1mol/l の水酸化カルシウム懸濁液を調整した．加水消化反応により $Ca(OH)_2$ が得られる．

$$CaO + H_2O \rightarrow Ca(OH)_2 \quad \text{(2-2)}$$

HAp/ChS ナノ複合体を湿式法により合成した（Fig. 2-1 参照）．(2-2)式で得られた水酸化カルシウム（1M）を蒸留水で 0.25M に希釈し，1 リットルの水酸化カルシウム懸濁液（0.25M）に ChS（生化学工業社製，鮫軟骨由来，分子量：15kDa）をそれぞれ 0.5, 1.25, 2.5, 5.0g 分加えて 30 分間攪拌して溶解させた．ここで，ChS は理論的に生成する HAp に対する重量%がそれぞれ 2.0, 5.0, 10, 20wt%になるように加えた（HAp/ChS2%, HAp/ChS5%, HAp/ChS10%, HAp/ChS20%）．ChS を溶解させた 1 リットルの水酸化カルシウム懸濁液（0.25M）を攪拌させた状態で，リン酸水溶液（0.15M）を 20ml/min の送液速度で滴下して最終 pH が 8.45~8.55 になるように調整した．HAp の生成反応式は次の通りである．リン酸滴下後，12 時間攪拌した．

$$10Ca(OH)_2 + 6H_3PO_4 \rightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + 18H_2O \quad \text{(2-3)}$$

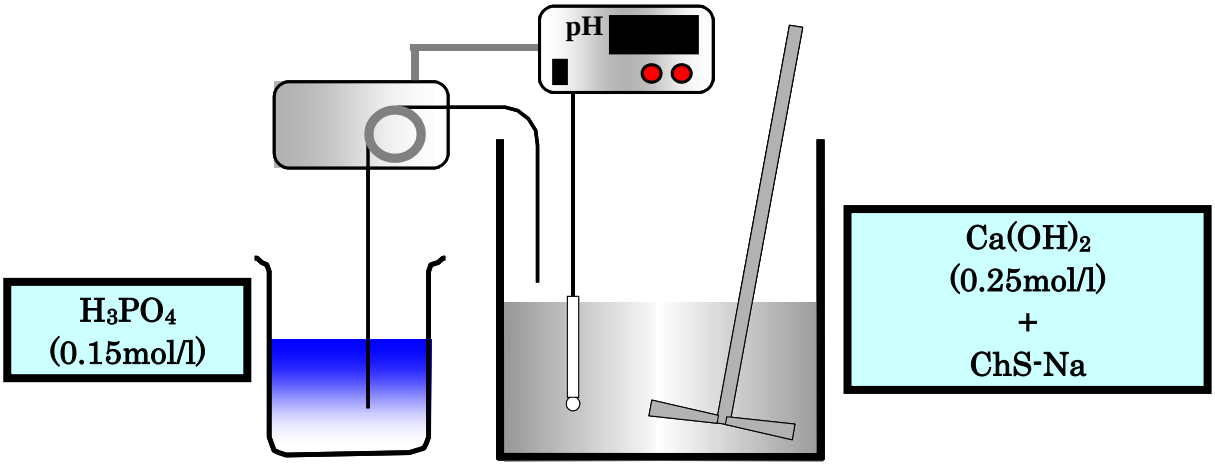


Fig. 2-1 湿式法による HAp/ChS ナノ複合体の合成

多孔質微粒子はスプレードライ装置（Büch 社製，Mini Spray Dryer, B-290）を用いて作製した. スプレードライ条件は, ノズル口径 1.5mm, 噴霧圧 0.046MPa, 送液速度 5.0ml/min, ガス流量 30m^3/h で，入口・出口温度はそれぞれ 180℃と 75℃とした.

Fig. 2-2 Mini Spray Dryer (B-290 Büch).

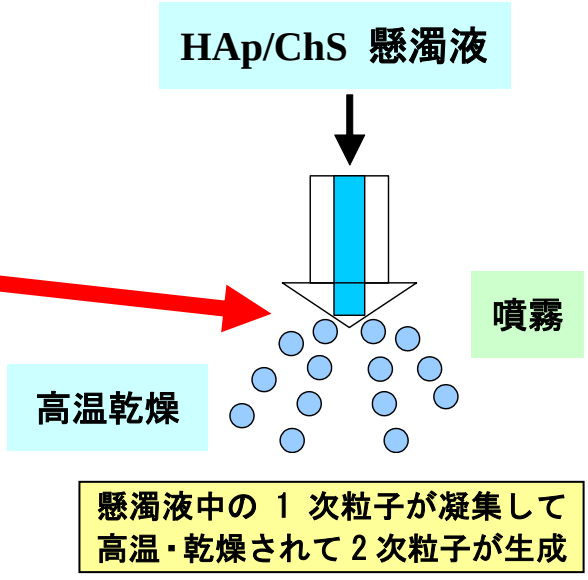


Fig. 2-3 スプレードライ法.

２．２．２．多孔質微粒子の基礎物性評価

HAp/ChS 複合体懸濁液中の１次粒子は，透過型電子顕微鏡（TEM）により観察した．少量の懸濁液をエタノールに分散させて，グリットに滴下・乾燥させて観察した（加速電圧：200kV）．

スプレードライ装置で作製した多孔質微粒子の形態は，走査型電子顕微鏡（SEM）（JEOL 社製，JSM-5600LV）で観察した．加速電圧は，20kV とした．カーボンテープ上に各粉末試料を載せて白金のコーティングを行った．コーティング装置は（ELIONIX 社製，ESC-101）を用いた．

多孔質微粒子の粒度分布は，レーザー回折式の装置（㈱島津社製，SALD-2001）で測定した．粉末を蒸留水中に分散させて，超音波照射させて調整した．本実験では，作製した粒子の均一性についても検討した．

多孔質微粒子を試料ホルダーに充填し，X 線回折測定（リガク社製 SA-HF3）により結晶相を同定した．測定角度は 10°～90°，ステップ幅は 0.03°，CuKα1（λ=1.54060Å）を用いた．また，HAp の 002 面と 300 面での回折線の半値幅のデータを用いて，結晶子サイズを以下の Scherrer の式(2-4)から求めた．

$$t = \frac{0.9\lambda}{B\cos\theta_B} \quad \cdots\cdots (2\text{-}4)$$

t：結晶子サイズ（nm），λ：波長（=1.54060nm），B：半値幅（rad），θ_B：回折角（rad）

BET 法により粒子の比表面積･気孔率を測定した（Beckman Coulter 社製, SA3100 Surface Area Analyzer）．約 150mg の粒子をオーブンに入れて 150℃程度で一晩乾燥させた．乾燥させた粒子から約 100mg を秤量し，180℃，120min で前処理を行った．気孔率に関しては，簡易上 HAp の密度（3.16 g/cm^3）を用いて以下の式から計算した．

$$V_{relative} = \frac{V_{total}}{V_{total} + 1/d} \quad \cdots\cdots (2\text{-}5)$$

$V_{relative}$：気孔率（%），V_{total}：総容積（cm^3/g），d：HAp の密度（g/cm^3）

２．２．３．HAp/ChS 多孔質微粒子の溶液中での ChS の溶出試験

緩衝溶液に粒子を含浸させた時に粒子から溶出する ChS を以下の方法で定量分析した．50mg の粒子を 10ml の蒸留水（DW），生理食塩水（NS），10%PBS，リン酸バッファー（PB : 20mM），PBS（NaCl: 136.89mM，KCl: 2.68mM，Na_2HPO_4: 7.67mM，K_2HPO_4: 1.39mM）にそれぞれ加えて 1 時間回転攪拌させた．1 時間後，粒子と溶液のミクスチャーを遠心分離（3500rpm, 10min）させることで粒子を沈殿させて上澄み液を分抽し，上澄み液の ChS 濃度をフェノール硫酸法により定量することで ChS 溶出率を算出した．

Zn^{2+}を吸着させた HAp/ChS 粒子からの溶出率も測定した．200mg の HAp/ChS5%粒子を 10ml の $ZnCl_2$ 水溶液（1.0 or 5.0 mg/ml, pH5.5）に浸漬させて 2 時間室温で転倒撹拌させた（回転速度：30rpm）．そのミクスチャーは遠心分離にかけ（3500rpm, 10min），上澄み液を除去して粒子は凍結乾燥した．ここで，上澄み液の ChS 濃度をフェノール硫酸法により測定した．乾燥した粒子は，HAp/ChS5% + 10Zn および HAp/ChS5% + 50Zn と略記する．50 mg の粒子を 10ml の PBS に浸漬させて 1 時間転倒撹拌させた．その後，遠心分離にかけて上澄み液の ChS 濃度を測定して粒子からの溶出量を算出した．

フェノール硫酸法の手順は以下の通りである．まず，1ml のサンプル溶液を試験管に加え，続けて 1ml の 5%フェノール（100ml のエタノール中に 5g のフェノールを溶解させた）を加える．そして，5ml の濃硫酸を徐々に滴下し，黄色に呈色させて室温で 10 分間静置させる．10 分後，30℃に調整された水浴中で 20 分間静置する．20 分後，波長 490nm における吸光度を分光光度計で測定し，予め作成した検量線から濃度を算出する．この定量法は，強酸処理で単糖に加水分解されるので実際には全糖の定量がなされているといえる．

２．２．４．タンパク質の吸着試験および吸着等温式を用いた解析

タンパク質を 10%PBS に溶解させて濃度 2.0 mg/ml とした．タンパク質は，pI の低い方から順にウシ血清アルブミン（BSA，pI: 4.8），ヘモグロビン（Hb，pI: 6.8-7.0），シトクロム c（cyt *c*，pI: 10.2）を用いた．このタンパク質溶液を各割合（30.0, 12.0, 6.0, 4.0, 3.0, 2.4, 2.0, 1.5, 1.0 倍）で希釈し，検量線作成用と吸着試験用に分抽した．6ml の各種タンパク質溶液に 20mg の多孔質粒子を加えて室温で 4 時間回転攪拌（回転速度：約 30rpm）した．遠沈管は15ml ポリプロピレン・コニカルチューブ（Falcon 製）を用いた．遠心分離（3500rpm,

10min）により固液分離を行い，上澄み液の吸光度を分光光度計にて測定した．吸光度の波長はcyt *c* の溶液のみ520nmで他のタンパク質溶液は全て276nmで行った. 吸着時間は, 0－12時間と変化させた.

Langmuirの吸着等温式[1]は, エネルギー的に均一な単分子層吸着に対する理論式である. そのため，吸着平衡濃度Cにおける吸着量Qは次式（3-1）で表される.

$$Q = \frac{Q_m KC}{1 + KC} \quad \cdots\cdots (2\text{-}6)$$

ここで，Q_m：最大吸着量，K：吸着親和力である．式(2-6)はさらに次のように変形される.

$$C/Q = 1/Q_m K + (1/Q_m)C \quad \cdots\cdots (2\text{-}7)$$

$(1/Q)$をCに対してプロットして直線関係が得られれば，Langmuir 式が適応できる．勾配は$(1/Q_m)$を，切片は$(1/Q_m K)$を与えるので，両者から最大吸着量Q_mおよび吸着平衡定数Kを求めることができる.

Langmuir-Freundlich の吸着等温式[2]は，エネルギー的に不均一な単分子吸着層に対する理論式である．Freundlichの吸着等温式と違って吸着質の最大限界濃度を避けることができると考えられている.

$$Q = \frac{Q_m (KC)^n}{1 + (KC)^n} \quad \cdots\cdots (2\text{-}8)$$

ここで，Q_m：最大吸着量，K：吸着親和力，$1/n$：吸着定数である.

Freundlich の吸着等温式[3]は，吸着量の解析に一般的に用いられているもう一つの理論式であり，単分子層吸着に限定されず，非理想的で可逆的な吸着に対して描出される．この経験的なモデル式はエネルギー的に不均一な表面において不均一に分布する吸着熱･親

和力を伴う多層吸着にも適用できる[4].

$$Q = KC^{1/n} \quad \text{(2-9)}$$

上記３つの吸着等温モデルのうち, Akaike Information Criterion (AICc) は実験値に対して理論的にアプローチしてどの理論式が最適かを決めるのに用いられる[5, 6]．ここでは最小の AICc を示す理論式が最適であるとみなす.

$$AIC_c = l \ln \frac{RSS}{l} + 2k + 2k\left(\frac{k+1}{l-k-1}\right) \quad \text{(2-10)}$$

l は実験値のポイント数, RSS は残差平方和（the residual sum of square），k は説明変数の数である．これらの式に基づいた回帰分析により K, Q_m, n,および AICc を計算した.

ヒト免疫グロブリン（Immunoglobulin；IgG, Wako 社）を NS もしくは PBS に溶解させて IgG 水溶液（1.0mg/ml）を作成する．また，これを各濃度になるように希釈していき異なる濃度の IgG 水溶液を作成する．10mg の多孔質微粒子を 10ml の IgG 水溶液に浸漬させて室温（20℃）で転倒撹拌した（0, 10, 60, 120, 240 分間）．粒子と IgG 水溶液の混合液を遠心分離（3500rpm, 10min）して上澄みの濃度を Advanced Protein Assay Reagent (ADV01, cytoskeleton inc.)で測定（590nm）した．遠心チューブ（2.0ml, Certified, RNase/DNase & Pyrogen Safe）に 0.2ml の ADV01 原液を加えた後，0.8ml のタンパク質水溶液を加えて 5 秒間穏やかに攪拌して青色に呈色させた. 呈色した溶液の吸光度を分光光度計により波長を 590nm にして直ちに測定した．予め作成した検量線からタンパク質濃度を算出した．IgG の多孔質微粒子への吸着量を算出し，上述の吸着理論モデルを用いた数理解析も行った.

タンパク質（BSA, Hb, cyt *c*）を 10%PBS に溶解させて，濃度が 1.0 mg/ml となるように調整した．作製したタンパク質溶液に関して，動的光散乱光度（Dynamic light scattering, DLS：（株）大塚電子，DLS-7000series）法により緩衝溶液中に溶解したタンパク質の粒度分布・メディアン径を測定した. レーザーはアルゴン源（Spectra-Physics 社, BeamLok2080）を用いた.

２．２．５．タンパク質を担持した多孔質微粒子からの試験管内での放出試験

200mg の HAp/ChS（ChS 含有量：2wt%）もしくは pure HAp を 800 μg/ml の各種タンパク質溶液（5ml，10%PBS）に加え，室温で 4 時間回転攪拌（回転速度：約 30rpm）させた．溶液中のタンパク質が全て多孔質微粒子に吸着されれば，粒子 1mg 当たり 20μg のタンパク質が担持される．次に，3ml の塩化亜鉛水溶液（10 mg/ml, 0.1M HCl 水溶液で pH=5.5 に調整）を加えてさらに 2 時間転倒攪拌させて製剤化処理を行った．遠心分離後（3500rpm, 10min），粒子を凍結乾燥させた．製剤化しない多孔質微粒子は吸着後に遠心分離（3500rpm, 10min）を行い，凍結乾燥させた．粒子のタンパク質吸着量は，上澄み液の吸光度を分光光度計にて（波長 276nm，cyt *c* のみ 520nm）測定することで算出した．

10mg の作製した製剤化粒子を 5ml の PBS に加えて 37.0℃の温度条件化で回転攪拌させた．タンパク質が失活・変性しないように浸漬後約 15 分は，粒子が溶液中に分散するように約 30rpm で回転させた．その後，約 2.14rpm とした．遠沈管はタンパク質低吸着性のもの（住友ベークライト製，スミロンプロテオセーブ 15mL 遠沈管）を使用した．放出期間は，1 時間～1 週間で試験した．サンプルは遠心分離（3500rpm, 10min）した後，上澄み液のタンパク質濃度を ADV01 により定量することで放出量を算出した．

２種類の IgG（ヒト免疫グロブリン : IgG， Denosumab : Dmab）を NS に溶解させて IgG 水溶液を作成した．10ml の IgG 水溶液（濃度 : 800, 400 or 200 μg/ml）に 100mg の HAp/ChS（ChS 含有量：2wt%）もしくは pure HAp を加えて 4 時間転倒攪拌した（回転速度：約 30rpm）．続けて，3.0ml の $ZnCl_2$ 水溶液（1.0 mg/ml, pH5.5）を加えて更に 2 時間転倒攪拌した．その混合液を遠心分離（3500rpm, 10min）にかけて上澄み液を除去し，沈殿物を一晩かけて凍結乾燥（設定温度：－15 度）させて製剤化粒子を得た．吸着後の上澄み液を ADV01 により定量することで IgG の吸着量を算出した．また，上澄み液の Zn 濃度を Inductively Coupled Plasma 発光分光分析装置（ICP）により測定することで，Zn の粒子への吸着量を算出した．

なお，Dmab は転移性骨腫瘍の治療に用いられているランマーク®を用いた．ヒト IgG2 モノクローナル抗体であり，その軽鎖及び重鎖をコードする cDNA を導入した CHO 細胞により産生される．分子量は約 150kDa であり，448 個のアミノ酸残基からなる重鎖（γ2 鎖）2 分子及び 215 個のアミノ酸残基からなる軽鎖（κ鎖）2 分子で構成される糖蛋白質である．

5mg の製剤化粒子を 5ml の PBS に浸漬させて 37.0℃で転倒撹拌した．観察期間は 1 週間とし，各時期において粒子と PBS の混合液を遠心分離にかけて上澄み液の IgG 濃度を測定することで製剤化粒子からの IgG の放出量を算出した．ここで，上澄み液を除去してからまた粒子に新しい PBS を加えて転倒撹拌して各時期の IgG の放出量も測定した．また, 上澄み液の Zn 濃度を ICP により測定することで Zn の放出量も算出した. さらに, ELISA 法による測定も行い，(ELISA で測定した濃度) / (ADV01 で測定した濃度)を計算して製剤化粒子から放出された Dmab の構造安定性を評価した.

多孔質微粒子からのタンパク質の放出のメカニズムを調べるために, 下記に示すゼロ次放出速度式および Higuchi 式[7-9]を用いてタンパク質の放出量を分析した．ゼロ次放出速度式はリザーバー型, Higuchi 式はモノリシック型の薬物担体に用いられる理論式である.

$$Q = K_0 t \quad \text{(Zero order release model)} \quad \cdots\cdots (2\text{-}11)$$

$$Q_t = K_H t^{1/2} \quad \text{(Higuchi model based on Fickian diffusion)} \quad \cdots\cdots (2\text{-}12)$$

ここで, Q はある時間 t において粒子から放出されたタンパク質量，K_0 は放出速度を表す定数，K_H は Higuchi 係数で分子の拡散速度を示す．Q_t はある時間 t において粒子から放出されたタンパク質量を示す.

２．３．結果

２．３．１．ナノ複合体およびその多孔質微粒子の形態観察

Fig. 2-4 に異なる ChS 重量%濃度を振った HAp/ChS 懸濁液の TEM 観察像を示す．ChS 含有量が 2-10wt%/HAp の懸濁液に関しては，全長約 150nm で幅が約 50nm の紡錘状の HAp/ChS 自己組織化体を観察した．ChS 重量%濃度が 10%である懸濁液中の結晶子サイズは幅約 5nm，長さ 20nm であった．このナノ結晶が ChS 分子鎖状に沿って一方向に整列して自己組織化を形成していることがわかる．一方，HAp/ChS20%に関して自己組織化体は認めなかった.

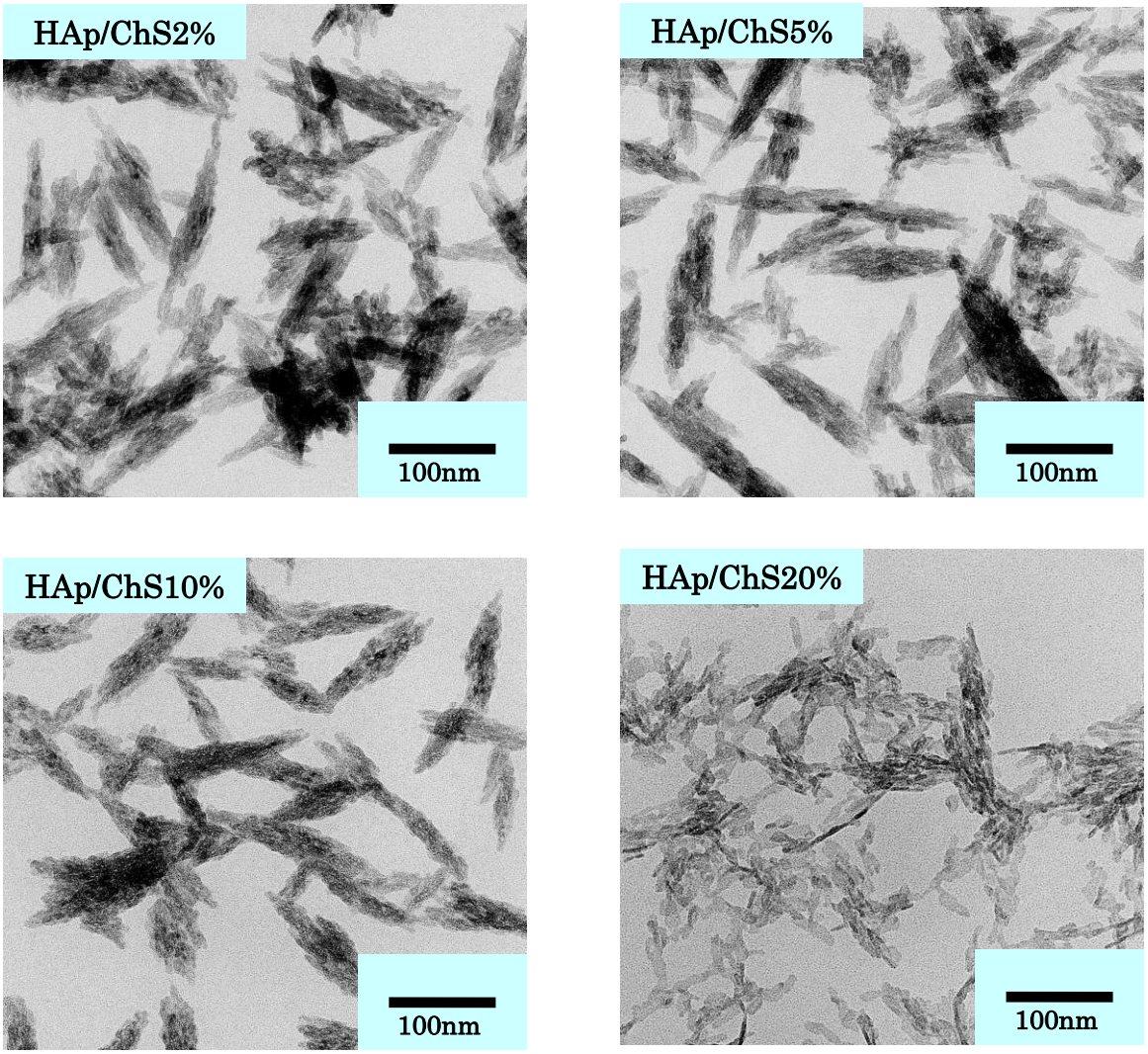


Fig. 2-4 湿式法で得られた HAp/ChS ナノ粒子（サスペンジョン）の TEM 写真

Fig. 2-5 に ChS の重量%濃度を変化させた各粒子の SEM 観察結果を示す．倍率 4000 倍における観察像で粒子の均一性を観察した．粒子はどの ChS 濃度においても真球状であり，均一な粒子径であった．SEM 観察像の粒子サイズは粒度分布結果とよく一致していた．

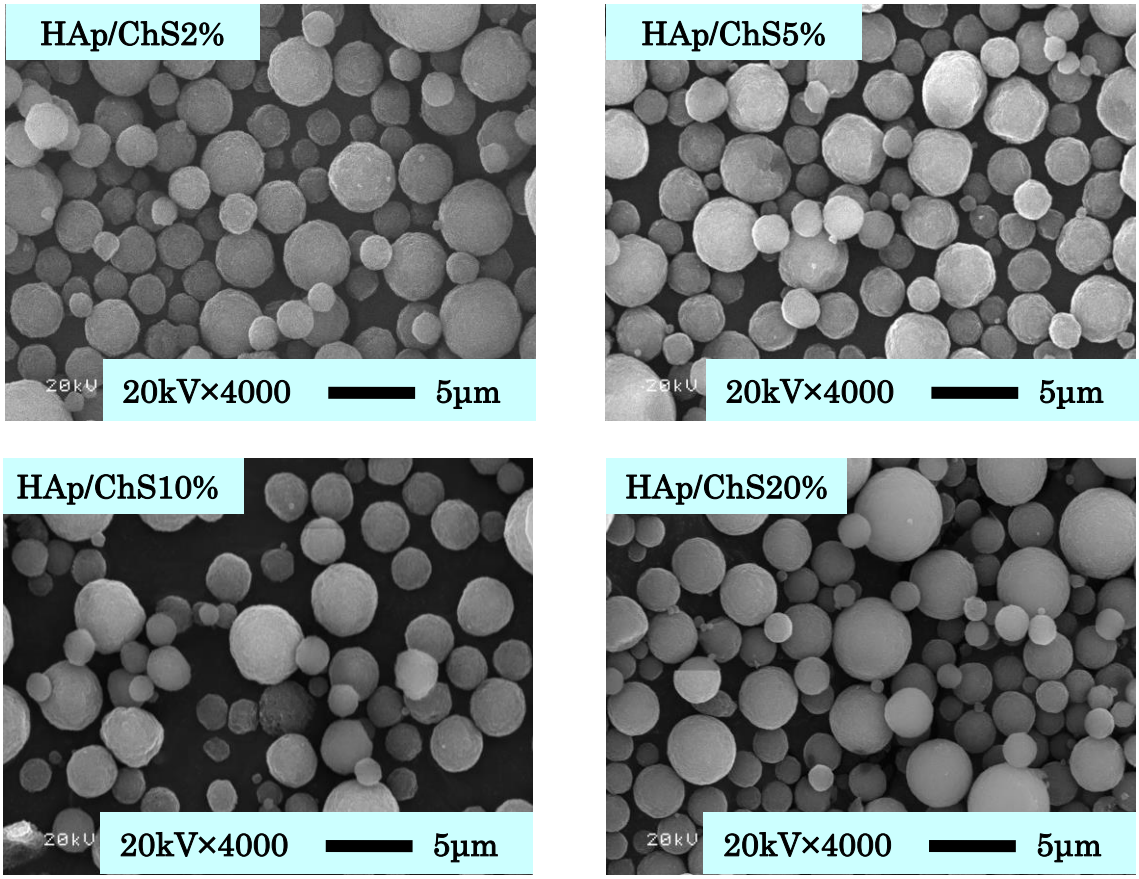


Fig. 2-5 スプレードライ法により得られた HAp/ChS 多孔質微粒子の SEM 写真

Fig. 2-6 に ChS 含有量変化による粒子表面の FE-SEM 像を示す．スプレードライ前の懸濁液の段階では，TEM 観察結果（Fig. 2-4）からも紡錘状のナノ複合体を認めたが，この像から, スプレードライによりこのナノ複合体が凝集して微粒子が形成されているのがわかる．また， ChS の含有量が増加することによって表面がより緻密になっているのがわかった.

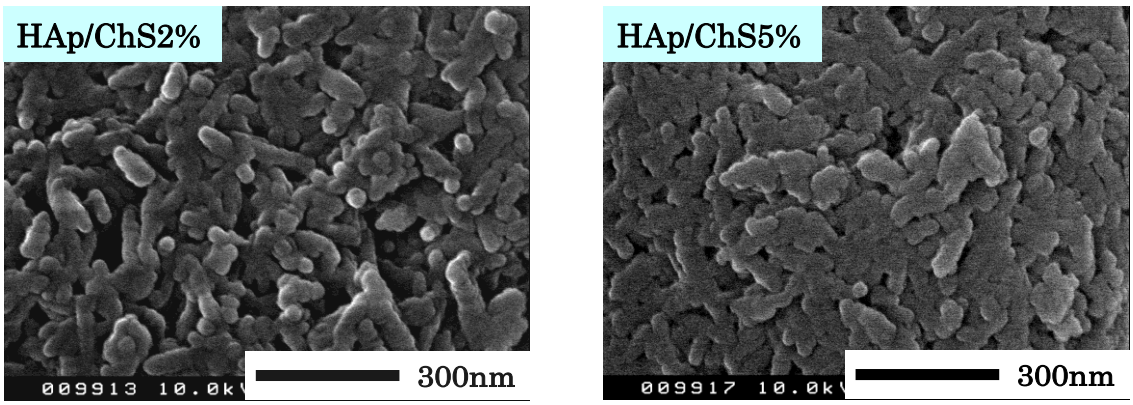


Fig. 2-6 多孔質微粒子の表面の FE-SEM

２．３．２．多孔質微粒子の粒度分布

Fig. 2-7 に HAp/ChS 粒子の粒度分布を示す．この時のスプレードライ条件は，入口温度 180℃，ガス流量 30m^3/h，噴霧圧 0.046MPa，送液速度 5.0ml/min とした．スプレードライ前の HAp/ChS 懸濁液は濃縮せず，重量%濃度は約 1.3%であった．どの ChS 含有量においても平均粒子径は約 4.0μm であり，ChS の含有量の変化は粒子径へ影響しなかった．しかし，ChS 含有量が増加するに従って粒子サイズの均一性が若干低下した．

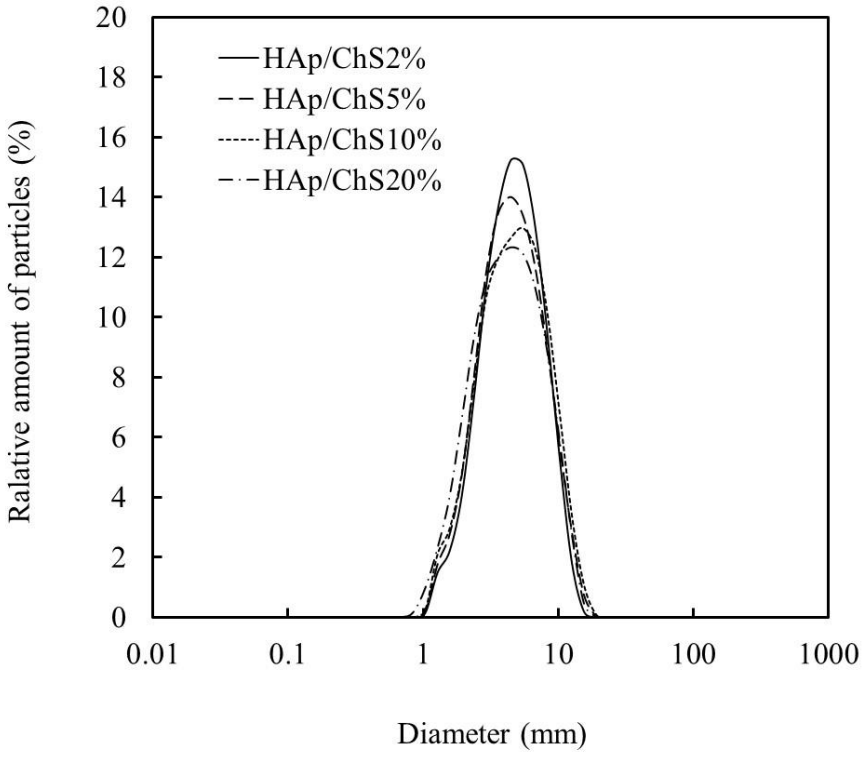


Fig. 2-7　粒度分布

２．３．３．　XRD 分析

Fig. 2-8, 2-9 に ChS 重量%濃度を変化させた時の HAp/ChS 微粒子の XRD パターン及び HAp 結晶子サイズを示す．HAp/ChS 微粒子の XRD パターンはどれも低結晶性であった．ChS10%に注目すると(300)方向は約 5nm，(002)は約 20nm であり，これは TEM 観察結果と一致する．このことから，スプレードライ前後で HAp 結晶子のサイズは変化しないことがわかる．ChS 含有量の増加につれて HAp 結晶の長軸（C 軸方向；(002)）は減少する一方，短軸（A 軸方向；(300)）は増加した．つまり，ChS 重量%濃度の増加につれて結晶子サイズのアスペクト比（(002)/(300)）は減少した．つまり，ChS 含有量の増加に従っ

て a 面の面積が減少して正の帯電が弱くなり，c 面の面積が増大して負の帯電が強くなった．

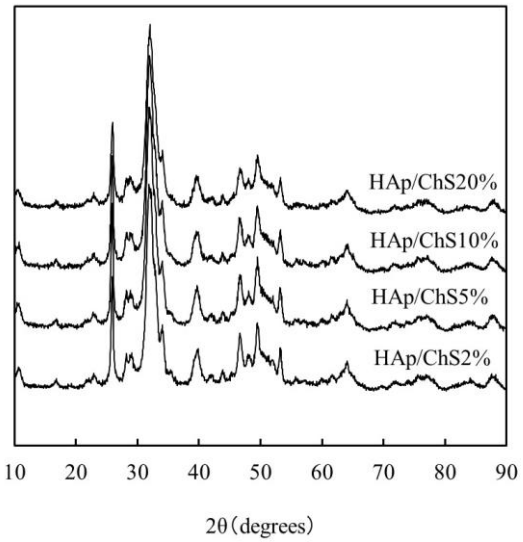


Fig. 2-8 多孔質微粒子の XRD パターン

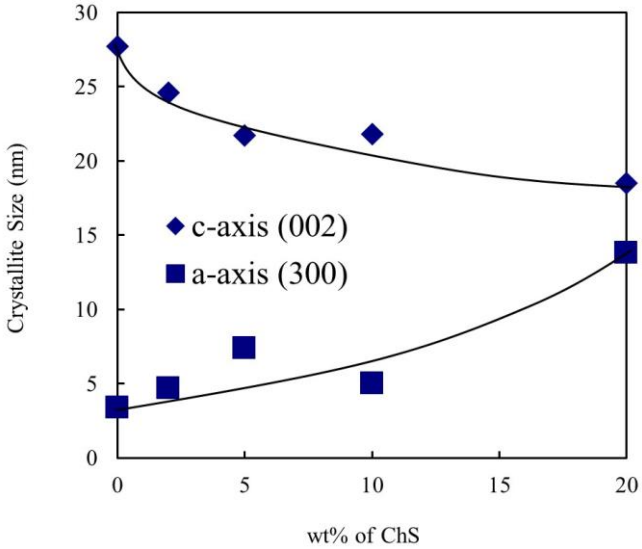


Fig. 2-9 多孔質微粒子中の HAp 結晶子サイズ

２．３．４．比表面積・気孔容積・気孔率

Table 2-1 に HAp/ChS 粒子の比表面積・気孔容量・気孔率を示す．どの粒子においても，100m^2/g 以上の高い比表面積が得られ, ChS 含有量が高いほど高い比表面積を示した．Fig. 2-10 に HAp/ChS 粒子の気孔径分布をそれぞれ示す．HAp/ChS 粒子に着目すると，HAp に対する ChS 重量%が 20%の時，細孔分布は最もシャープになり，小さい気孔サイズ側へシフトした．その一方で，ChS 重量%が 2%の時，pure HAp 粒子と比べて気孔サイズは大きい方へとシフトした．

Table 2-1 比表面積，気孔容積と気孔率

ChS wt%	0	2%	5%
Specific surface area (m^2/g)	102.51	108.7	116.0
Total pore volume (ml/g)	0.7436	0.754	0.687
Porosity （%）	70.1774	70.47	68.49

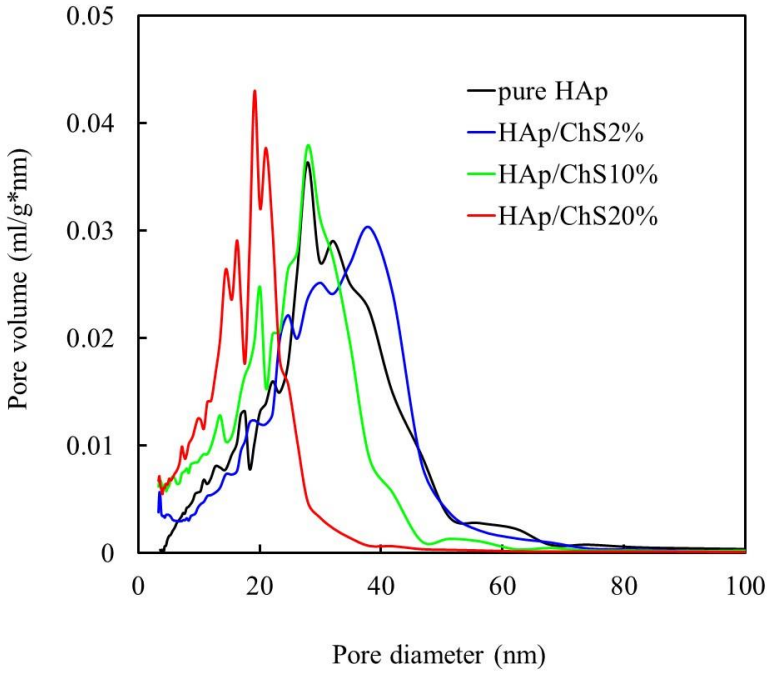


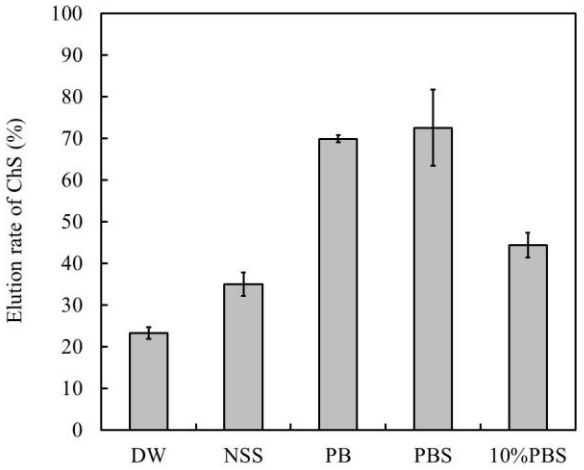
Fig. 2-10 ChS 含有量の違いによる気孔サイズ分布の変化

２．３．５．多孔質微粒子からの ChS 溶出特性

HAp/ChS2%粒子，HAp/ChS5%粒子の ChS wt%測定値はそれぞれ 1.7±0.4%，4.0±0.4%であり，どちらも理論値（実際に添加した ChS 量）より若干少ない含有量であった．溶出試験では，これらの ChS 含有量から ChS 溶出率を算出した．

Fig. 2-11 は溶液の違いによる HAp/ChS5%粒子からの ChS 溶出率の違いについて示す．溶液は左から順に，DW，NS，PB，PBS，10%PBS である．リン酸濃度が高いほど高い溶出率であり，NS は DW より若干高い溶出率であった．Fig. 2-12 は ChS 含有量を変化させた時の ChS 溶出率の変化を示す．DW と 10%PBS においては HAp/ChS2%は HAp/ChS5%よりも低い溶出率を示したが，PBS では逆の結果となった．

Fig. 2-13 に示すように，Zn^{2+}を吸着させた HAp/ChS5%粒子からの ChS の溶出率を示す．Zn^{2+}を吸着させた時，$ZnCl_2$ 水溶液では粒子からの ChS 溶出率は検出感度以下であった．Zn^{2+}を吸着させた粒子は，Zn^{2+}を添加していない粒子と比較して，PBS 中における粒子からの ChS の溶出率は低下した．しかし，Zn^{2+}の添加量を増加させた時の ChS の溶出率に有意差は見られなかった．



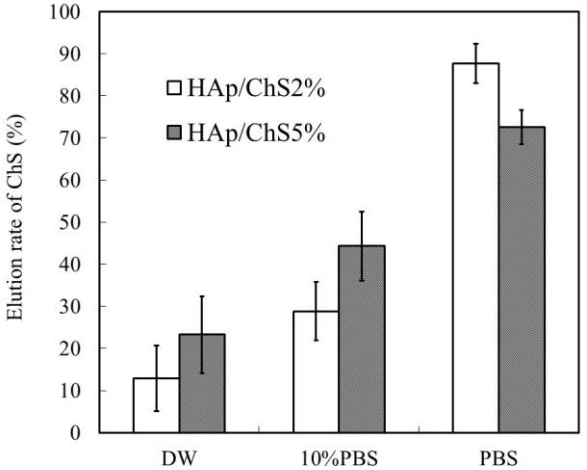


Fig. 2-11 HAp/ChS5%粒子からの ChS 溶出率 (n=4)

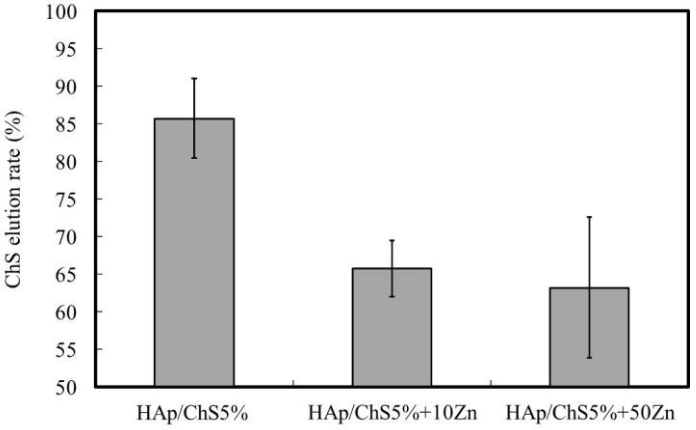


Fig. 2-13 Zn^{2+}を吸着させた HAp/ChS5%粒子からの ChS 溶出率 (n=4)

２．３．６．タンパク質の吸着特性

Fig. 2-14 に多孔質微粒子の cyt *c* に対する吸着量の経時変化を示す．Pure HAp，HAp/ChS2%では約 4 時間で平衡状態になり，HAp/ChS5%では 12 時間まで吸着量が増加した．長時間の撹拌によるタンパク質の変性を考慮して，以降のタンパク質の吸着実験では浸漬時間を 4 時間に固定して行った．

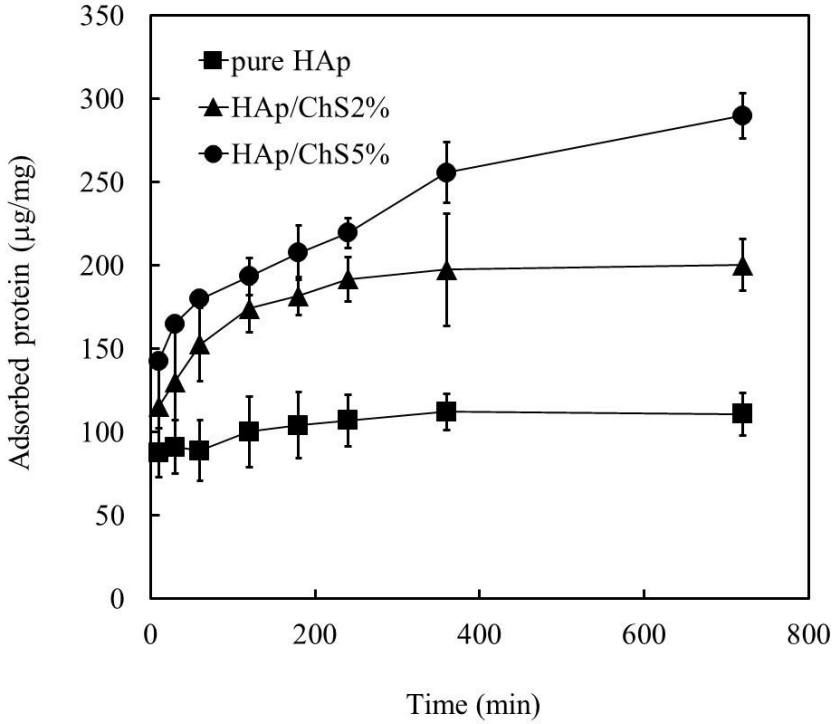


Fig. 2-15 に多孔質微粒子に対する, BSA, Hb および cyt *c* の吸着等温線を示す. HAp/ChS 多孔質微粒子におけるタンパク質の吸着量は pure HAp と比較して，BSA では減少，Hb では同等，cyt *c* では増加した．Hb では他のタンパク質と比較して高い吸着量を示した．これらの吸着等温線を２．２．４．で前述した３つの吸着等温式のいずれかに該当するか検討するために，AICc および各吸着等温式から吸着パラメータを算出した．

DLS 測定によると，10%PBS 中に溶解した BSA（濃度 1.0 mg/ml）のサイズは 6.9±0.3nm であった．これは，文献値と同等の値（4.0nm×11.5nm[10]）であることから，10%PBS 中において濃度 1.0 mg/ml では BSA の凝集は起こっていないといえる．10%PBS 中に溶解した Hb（濃度 1.0 mg/ml）のサイズは 31.4±1.2nm であった．これは，文献値（長軸：7.9nm，中軸：3.0nm，短軸：2.9nm）[11]と比較して高い値であるため，溶液中で凝集していた可

能性がある．10%PBS 中に溶解した cyt *c*（濃度 1.0 mg/ml）のサイズはそれぞれ 2.7±0.2nm であった．濃度 0.5 mg/ml の cyt *c* 溶液中（1MGdn-HCl）での cyt *c* のサイズは，DLS 測定により 2.91nm と報告されているため[12, 13]，cyt *c* の凝集はしていないといえる．

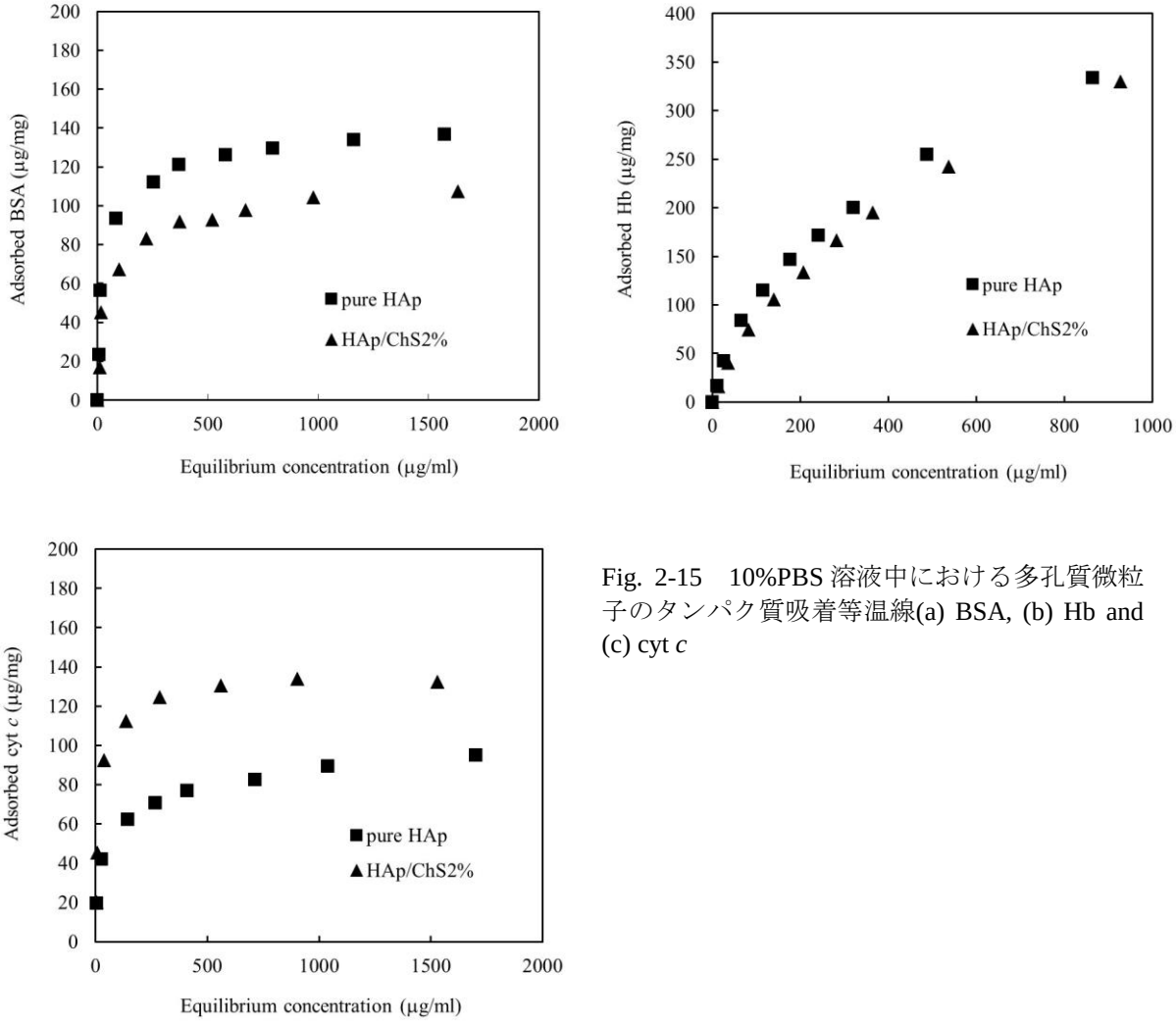


Fig. 2-15　10%PBS 溶液中における多孔質微粒子のタンパク質吸着等温線(a) BSA, (b) Hb and (c) cyt *c*

Table 2-2 多孔質微粒子の BSA 吸着量から算出した各吸着変数

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
Pure HAp	K(mL/mg)	40.4±7.6	28.3±7.8	1.32±0.06
	Q_m(mg/m^2)	1.29±0.03	1.40±0.08	
	n		0.71±0.11	4.94±0.79
	r^2	0.970	0.982	0.904
	AICc	-43.9	-44.2	-33.5
HAp/ChS2%	K(mL/mg)	26.5±6.6	16.1±7.5	0.97±0.04
	Q_m(mg/m^2)	0.95±0.04	1.09±0.12	
	n		0.67±0.15	4.45±0.69
	r^2	0.947	0.967	0.905
	AICc	-44.6	-44.1	-39.3

Table 2-2 に各粒子に対する BSA の吸着等温線から各吸着等温式を用いて算出した吸着変数を示す．HAp 粒子では AICc 値が Langmuir-Freundlich で-44.2 と最も低値でありフィッティングするのに対して，HAp/ChS 粒子では Langmuir で AICc 値が-44.6 と最も低値でフィッティングしていた．つまり ChS の介入によって異なる吸着等温式に従う．吸着モデルが異なるため吸着特性の厳密な比較は困難であるが，pure HAp では K 値と Q_m 値が高い傾向で高い吸着親和力・最大吸着量を示した．

Table 2-3 多孔質微粒子の Hb 吸着量から算出した各吸着変数

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
Pure HAp	K(mL/mg)	2.57±0.35	1.09±0.44	3.60±0.07
	Q_m(mg/m^2)	4.58±0.31	6.56±1.09	
	n		0.78±0.06	1.83±0.06
	r^2	0.990	0.998	0.995
	AICc	-37.0	-46.0	-44.1
HAp/ChS2%	K(mL/mg)	1.65±0.18	1.05±0.35	3.17±0.05
	Q_m(mg/m^2)	4.83±0.30	5.90±0.91	
	n		0.87±0.06	1.64±0.04
	r^2	0.995	0.998	0.997
	AICc	-44.7	-49.7	-50.7

Table 2-3 では各粒子に対する Hb の吸着等温線から各吸着等温式を用いて算出した吸着変数を示す．Hb では，BSA と後に述べる cyt *c* と比べると両粒子とも高い最大吸着量を示した．HAp 粒子では AICc 値が-46.0 と最も低値である Langmuir-Freundlich に一致する

のに対して，HAp/ChS 粒子では AICc が-50.7 と最も低値である Freundlich に一致し，Hb 分子の不均一多層吸着を示唆する結果である. ChS の介入によって異なる吸着等温式に従う．そのため，吸着特性の精細な比較は困難であるが，大きな変化は認めなかった.

Table 2-4 多孔質微粒子の cyt *c* 吸着量から算出した各吸着変数

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
Pure HAp	K(mL/mg)	27.2±8.4	7.8±2.6	0.87±0.02
	Q_m(mg/m^2)	0.85±0.04	1.18±0.08	
	n		0.48±0.04	4.63±0.44
	r^2	0.932	0.997	0.968
	AICc	-38.7	-57.3	-44.5
HAp/ChS2%	K(mL/mg)	25.5±7.3	9.3±8.5	1.58±0.06
	Q_m(mg/m^2)	1.53±0.08	2.06±0.41	
	n		0.49±0.13	4.76±0.56
	r^2	0.945	0.980	0.963
	AICc	-34.7	-39.2	-38.0

Table 2-4 では各粒子に対する cyt *c* の吸着等温線から各吸着等温式を用いて算出した吸着変数を示す. BSA と Hb では ChS の介在により異なる吸着等温式に従っていたが，cyt *c* では，HAp 粒子と HAp/ChS 粒子は AICc 値がそれぞれ-57.3, -39.2 と最も低値で共に Langmuir-Freundlich に一致しており，エネルギー的に不均一な表面での吸着現象を示唆する結果である．ChS の介在により，K 値では大きな変化は認めなかったが，Q_m が 1.18±0.08 → 2.06±0.41 mg/m^2 と上昇した.

Table 2-5 多孔質微粒子に対する球状タンパク質の吸着特性のまとめ

粒子	pure HAp			HAp/ChS		
比表面積 (m^2/g)	102.51			110.63		
タンパク質	BSA	Hb	cyt *c*	BSA	Hb	cyt *c*
分子量(kDa)	66	65	12	66	65	12
実測の分子サイズ (nm)	6.9±0.3	31.4±1.2	2.7±0.2	6.9±0.3	31.4±1.2	2.7±0.2
文献値 (nm)	4.0×11.5	7.9×3.0×2.9	2.9	4.0×11.5	7.9×3.0×2.9	2.9
1分子あたりの占有面積 (nm^2)	46	23.7	8.4	47.6	986	7.3
理論最大単分子層吸着 (mg/m^2)	2.38	4.56	2.37	2.38	4.56	2.37
吸着モデル	Langmuir- Freundlich			Langmuir	Freundlich	Langmuir-Freundlich
最大吸着量 (mg/m^2)	1.40±0.08	6.56±1.09	1.18±0.08	0.95±0.04	-	2.06±0.41
吸着様式	単分子層（不均一）			単分子層（均一）	多層吸着？	単分子層（不均一）

Table 2-5 に粒子に対する球状タンパク質の吸着特性のまとめを示す．Pure HAp では，タンパク質の種類に関わらず吸着モデルは Langmuir-Freundlich に一致していた．一方，HAp/ChS では，タンパク質によって異なる吸着モデルに従っていた．HAp/ChS に対する cyt *c* の吸着では，理論最大単分子層吸着量に比較的近い値であった．BSA の吸着では，最大吸着量は 0.95±0.04 mg/m^2 と理論最大吸着量 2.38 mg/m^2 の半分程度であった．

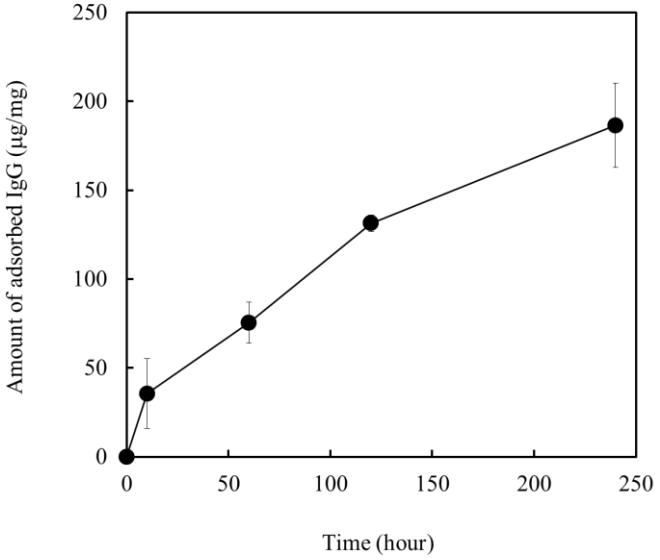


Fig. 2-16 多孔質微粒子に対する IgG の吸着等温線

Fig. 2-16 に室温で NS に溶解した IgG の HAp/ChS 多孔質微粒子への吸着量の経時変化を示す．観測期間において，IgG の吸着量は継時的に増加した．この結果に加えて長時間の撹拌による IgG の変性の危険性を考慮し，今後の実験からは IgG の多孔質微粒子へ担持させる際の吸着時間を 4 時間と設定した．

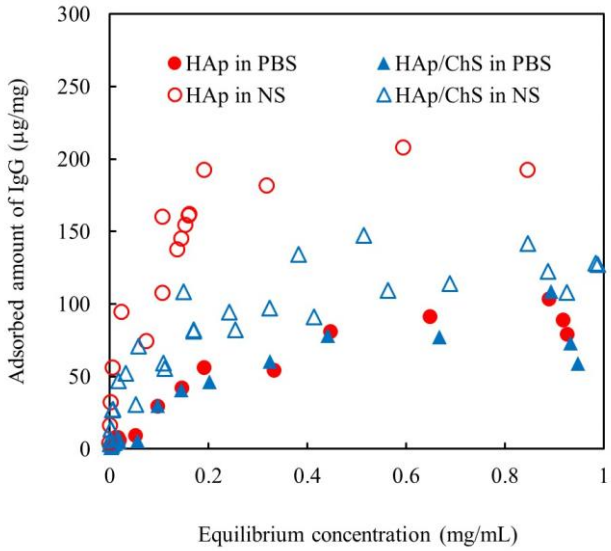


Fig. 2-17 多孔質微粒子に対する IgG の吸着等温線

Fig. 2-17 に，PBS もしくは NS 中における pure HAp および HAp/ChS 多孔質微粒子への IgG の吸着等温線を示す．NS および PBS どちらにおいても，全体的に pure HAp の方が HAp/ChS よりも IgG の吸着量が高かった．溶媒については NS の方が高い吸着量を示した．

Table 2-7 PBS における多孔質微粒子への IgG の吸着パラメータと AICc 値

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
HAp	K(mL/mg)	3.4±0.7	4.6±1.3	0.99±0.05
	Q_m(mg/m^2)	1.20±0.09	1.05±0.13	
	n		1.23±0.25	1.89±0.20
	r^2	0.971	0.973	0.884
	AICc	-105.1	-94.2	-84.8
HAp/ChS	K(mL/mg)	4.0±1.4	6.1±1.6	0.81±0.06
	Q_m(mg/m^2)	0.95±0.12	0.78±0.09	
	n		1.59±0.55	1.97±0.31
	r^2	0.918	0.926	0.878
	AICc	-82.9	-81.9	-75.8

Table 2-8 NS における多孔質微粒子への IgG の吸着パラメータと AICc 値

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
HAp	K(mL/mg)	17.4±5.8	8.8±9.3	2.34±0.16
	Q_m(mg/m^2)	2.08±0.18	2.71±0.73	
	n		0.56±0.16	3.64±0.49
	r^2	0.888	0.916	0.884
	AICc	-49.4	-50.7	-48.3
HAp/ChS	K(mL/mg)	11.7±3.0	3.8±4.9	1.23±0.05
	Q_m(mg/m^2)	1.22±0.07	1.74±0.56	
	n		0.54±0.15	3.29±0.35
	r^2	0.869	0.895	0.956
	AICc	-105.6	-108.6	-107.3

Table 2-7 と Table 2-8 に，それぞれ NS，PBS 中における各吸着モデルによる吸着パラメータおよび AICc 値などを示す．PBS 中においては，AICc 値から pure HAp と HAp/ChS の両方ともその吸着等温線が Langmuir モデルに最も一致していた．一方，NS 中においては，Langmuir-Freundlich モデルに最も一致していた．これらの結果から，IgG が多孔質微粒子の気孔内表面に単分子層で最大に吸着した時の IgG 1 分子あたりの被覆面積を計算した．

Table 2-9 二つの多孔質微粒子における各吸着パラメータ，吸着タイプの比較

Microparticle	HAp		HAp/ChS	
Specific surface area (m^2/g)	102.51		110.63	
Solvent	NS	PBS	NS	PBS
pH	6.0-6.8	7.3	6.0-6.8	7.3
Charge of IgG	＋	-	＋	-
Charge of Microparticle	＋	＋	-	-
Adsorption model	Langmuir Freundlich	Langmuir	Langmuir Freundlich	Langmuir
Homo or Hetero?	Heterogeneous	Homogeneous	Heterogeneous	Homogeneous
Q_m(mg/m^2)	2.71 (＞＞1.85)	(0.27＜) 1.20 (＜1.85)	1.74 (≒ 1.85)	(0.27＜) 0.95 (＜1.85)
Coverage area per one molecule (nm^2)	10.6 (＜15.2)	(15.2＜) 24.0 (＜103)	17.8 (≒15.2)	(15.2＜) 32.7 (＜103)
Adsorption type	Multi layer ?	End-on and/or Side-on	Mainly End-on	End-on and/or Side-on

Table 2-9 に，多孔質微粒子および溶媒の違いにおける各吸着パラメータおよび考えられる吸着様式などを示す. HAp/ChS 多孔質微粒子が NS 中で IgG が最大吸着されたとき，IgG 1 分子あたりの被覆面積が IgG の分子サイズに最も近い値であった．すなわち，吸着様式も End-on 吸着が主であり，IgG 分子の側鎖と粒子表面との相互作用を受けず IgG 分子が安定に担持できると考えられた．また，デノスマブを始めとした IgG の医薬品は NS を溶解させて用いることが多いことも鑑みて，以降の実験において溶媒は NS に設定した.

２．３．７．タンパク質の放出特性

Table 2-10 に BSA を担持した製剤化粒子の担持量，放出速度定数，放出タイプを示す. 担持効率は Zn を添加した HAp が最も高かった．Fig. 2-18 に PBS 中における製剤化粒子からの BSA の放出挙動および pure HAp 粒子との比較を示す．Zn を添加していない製剤化粒子は投与後初期に 4 μg/mg 程度の放出を示すが, その後の放出は認めなかった. 一方, Zn を添加することにより，投与初期の放出が抑えられるだけでなくその後の放出量の増加も認めた．Zn を添加していない粒子の放出挙動はどちらの理論式にも一致しなかったが，Zn を添加した製剤化粒子はどちらも Higuchi 式に一致していた．Pure HAp との比較では，算出した放出速度からもわかる通り HAp/ChS の方が高い放出速度を示した.

Table 2-10 BSA を担持した製剤化粒子の担持量・放出定数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp/ChS	17.6	88.2	2.2×10^{-2}	0.0×10^{-0}	-
			0.001	0.000	
HAp/ChS + Zn	18.2	91.1	3.2×10^{-2}	1.2×10^{-2}	Monolithic
			0.913	0.767	
pure HAp + Zn	19.5	97.6	2.4×10^{-1}	7.6×10^{-2}	Monolithic
			0.759	0.610	

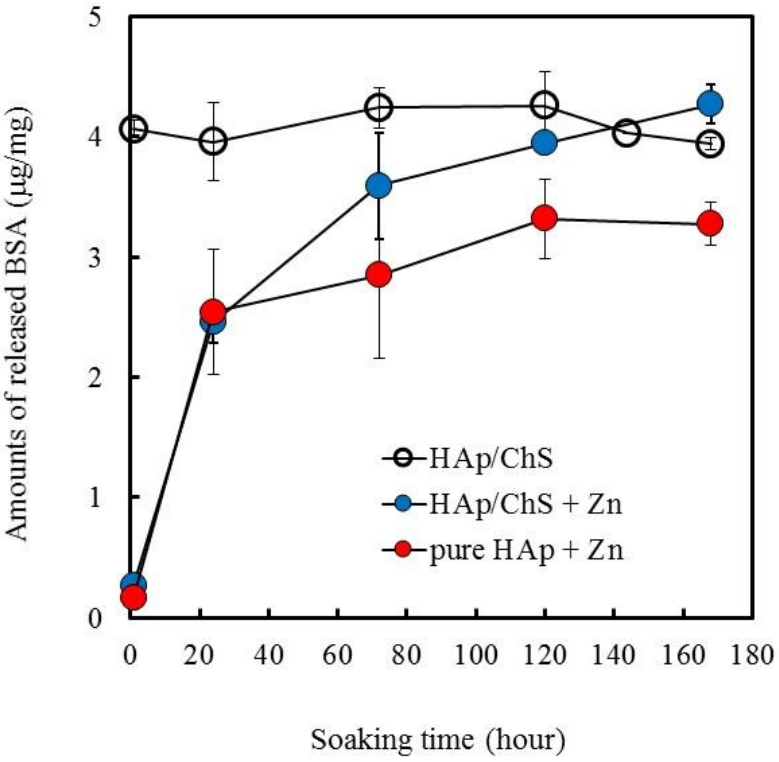


Fig. 2-18 製剤化粒子からの BSA の放出挙動

Table 2-11 に Hb を担持した製剤化粒子の担持量，放出速度定数，放出タイプを示す．Hb の担持効率はどれも 95%前後であった．Fig. 2-19 に PBS 中における製剤化粒子からの Hb の放出挙動および pure HAp 粒子との比較を示す．Zn を添加していない製剤化粒子は投与後初期に 8 μg/mg 程度の放出を示すが，その後の放出は緩やかであった．Zn を添加することにより，投与初期の放出が抑えられるがその後の放出量はわずかであった．HAp/ChS では Zn の添加に関わらずどちらの相関係数 R^2 値もほぼ同等であったものの，ゼロ次放出速度式に一致しておりリザーバー型と判定された．一方，Pure HAp は Higuchi

式に一致しておりモノリシック型であった．Pure HAp との比較では，放出量に大きな違いは見られなかった．

Table 2-11 Hb を担持した製剤化粒子の担持量・放出定数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp/ChS	18.4	94.7	7.3×10^{-1}	1.9×10^{-1}	Reservoir
			0.867	0.872	
HAp/ChS + Zn	19.1	95.6	3.2×10^{-2}	1.1×10^{-2}	Reservoir
			0.891	0.901	
pure HAp + Zn	19.3	97.6	3.0×10^{-2}	9.2×10^{-3}	Monolithic
			0.900	0.774	

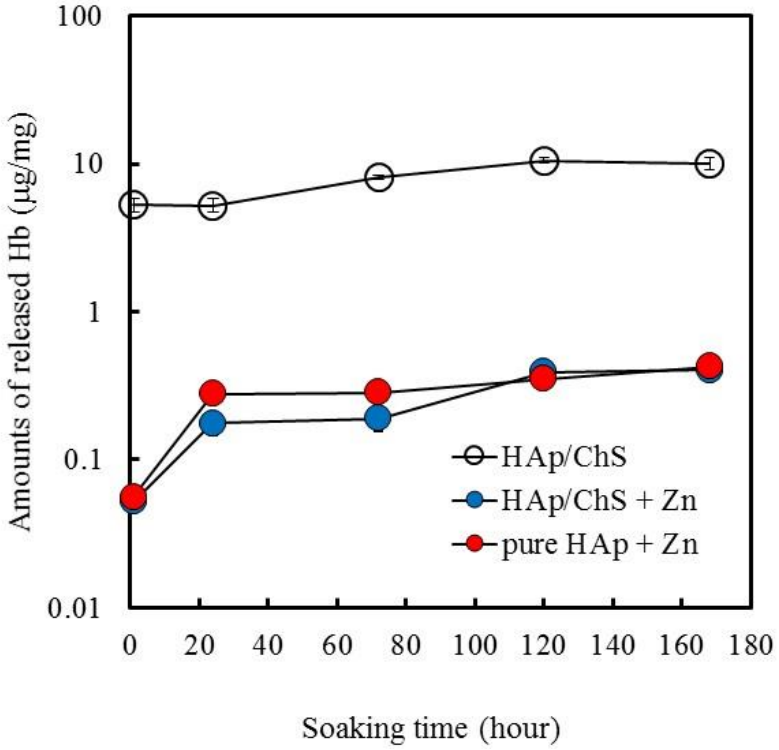


Fig. 2-19 製剤化粒子からの Hb の放出挙動

Table 2-12 に cyt *c* を担持した製剤化粒子の担持量，放出速度定数，放出タイプを示す．cyt *c* ではどの粒子も担持効率は 100%であった．Fig. 2-20 に PBS 中における製剤化粒子からの cyt *c* の放出挙動および pure HAp 粒子との比較を示す．Zn を添加していない製剤化粒子は投与後初期に 8.0 μg/mg 程度の放出を示すが，その後の放出は認めなかった．Zn を添加することにより，投与初期の放出が抑えられるだけでなくわずかながらその後の放出も認めた．Zn を添加していない HAp/ChS 粒子の放出挙動はどちらの理論式においても

低い相関係数 R^2 値であった．Zn を添加した製剤化粒子は Higuchi 式に一致しており，モノリシック型の放出タイプであった． Pure HAp との比較では，HAp/ChS の方が低い放出速度を示した．

Table 2-12 cyt *c* を担持した製剤化粒子の担持量・放出定数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp/ChS	20.0	100	1.1×10^{-1}	6.1×10^{-3}	Reservoir
			0.066	0.466	
HAp/ChS + Zn	20.0	100	2.0×10^{-1}	4.5×10^{-2}	Monolithic
			0.980	0.914	
pure HAp + Zn	20.0	100	3.6×10^{-2}	5.6×10^{-2}	Monolithic
			0.845	0.694	

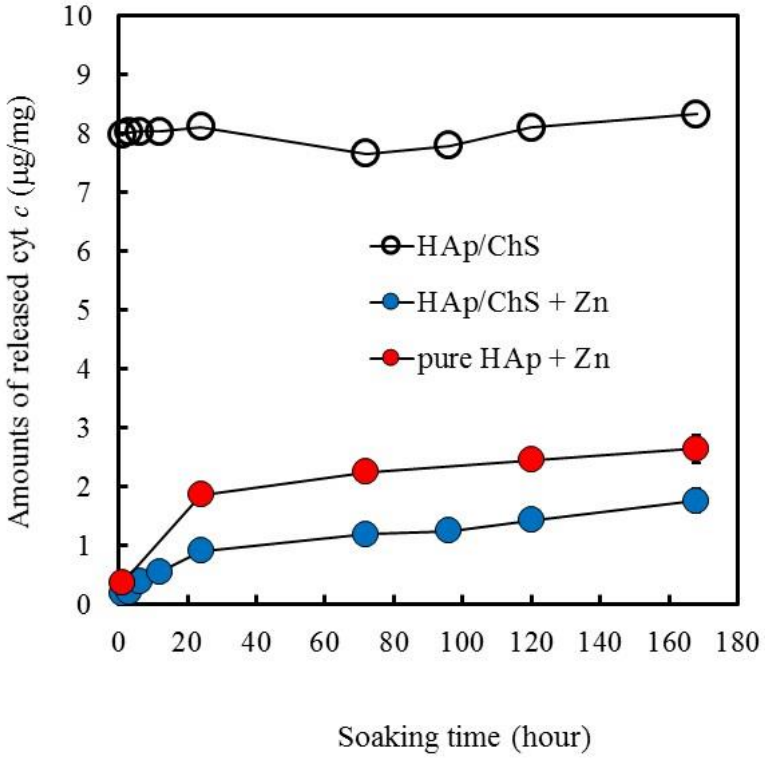


Fig. 2-20 製剤化粒子からの cyt *c* の放出挙動

Table 2-13 に IgG を担持した製剤化粒子の担持量，放出速度定数および放出タイプを示す．IgG の担持量は，製剤化処理の際に Zn を添加することで上昇した．Zn を添加した製剤化粒子はどちらも Higuchi 式に一致しておりモノリシック型であったが，Zn を添加していない製剤化粒子はどちらの理論モデル式にも一致しなかった．また，Fig. 2-21 に PBS 中における製剤化粒子からの IgG の放出挙動を示す．Zn を添加していない粒子では投与

初期の 10-15 μg/mg 程度の放出を示すが，その後の放出は認めなかった．ところが，Zn を添加した製剤化粒子では, 初期の放出が抑えられるだけでなくその後の継時的な放出も認め，その放出挙動は，ゼロ次放出速度式に一致していた．放出速度は HAp/ChS の方が高い値を示した．Fig. 2-21(c)にて IgG 放出量の測定時に上澄み液を新しい PBS に交換した時の IgG の放出挙動を示す. ここでは担持量は 20, 40 and 80 μg/mg の製剤化粒子を用いた．Zn を用いなかった 20 and 40 μg/mg の HAp/ChS 製剤化粒子は投与 24 時間後でそれぞれ 1.5 and 4.0 μg/mg 程度の放出を示した後，わずかながらの継時的な増加を認めた．80 μg/mg の HAp/ChS 製剤化粒子では，投与 24 時間後に 9.0 μg/mg 程度の放出を示したが，その後の継時的な増加は認めなかった．一方，Zn を用いた pure HAp と HAp/ChS 製剤化粒子については, 投与 24 時間後でそれぞれ 6.0 and 7.5 μg/mg 程度と Zn を用いることで若干の放出が抑えられ，その後の継時的な放出量の増加はわずかであった．IgG の担持量が増加するにつれて IgG の放出量は増加した．Zn を用いた製剤化粒子において，pure HAp と比較したところ，HAp/ChS の方が高い放出量を示した

.

Table 2-13 IgG を担持した製剤化粒子の担持量・放出定数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp	76.3	95.3	-	-1.3×10^{-2}	-
			-	0.046	
HAp + Zn	78.8	98.5	1.1×10^{0}	5.4×10^{-2}	Reservoir
			0.868	0.923	
HAp/ChS	57.5	71.9	-	-2.1×10^{-2}	-
			-	0.260	
HAp/ChS + Zn	76.6	96.1	1.8×10^{0}	9.3×10^{-2}	Reservoir
			0.912	0.929	

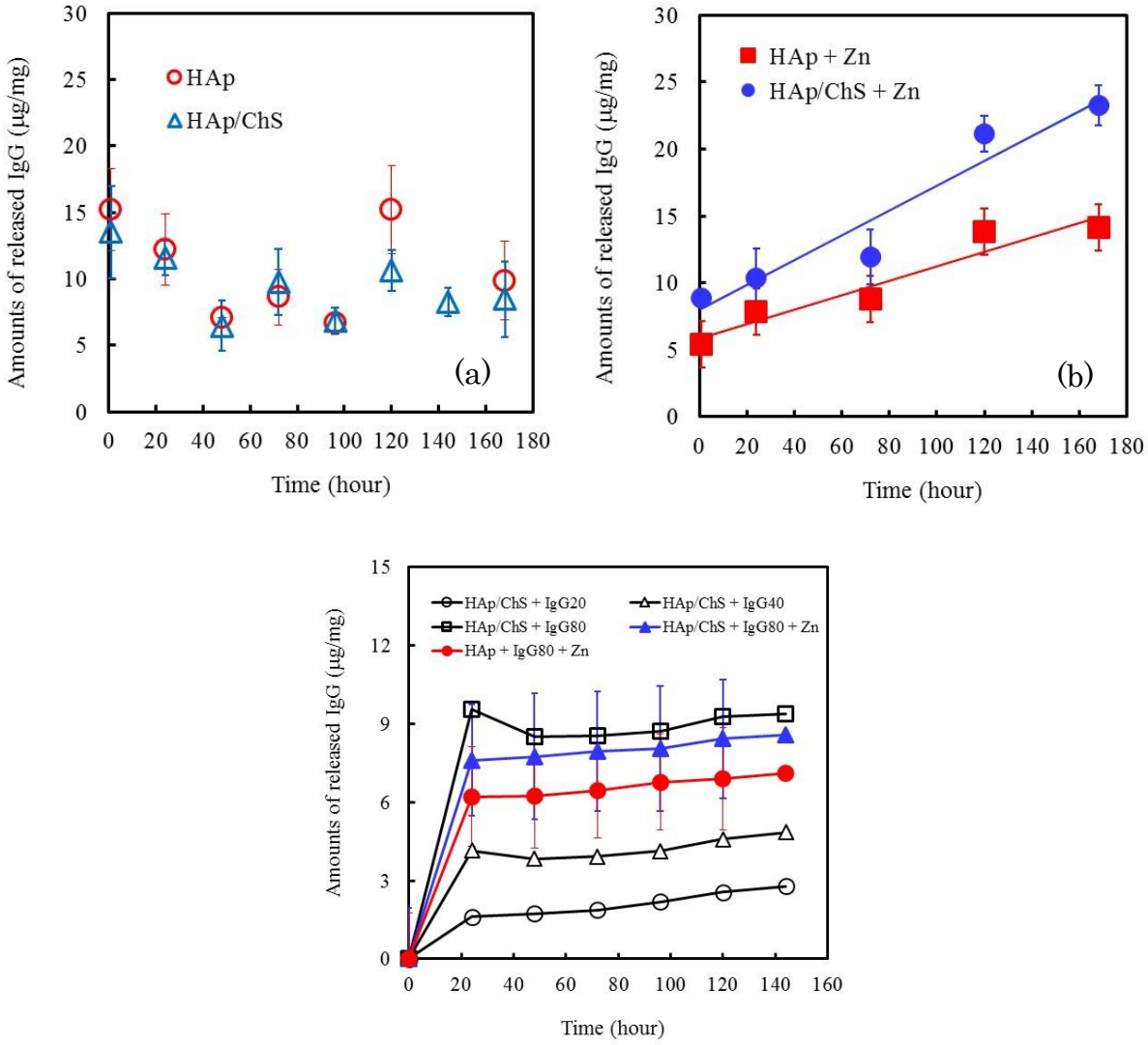


Fig. 2-21 製剤化粒子からの放出量 (a) Zn 未使用粒子からの IgG 放出量，(b) Zn 使用粒子からの IgG 放出量，(c)上澄み液を新しい PBS に交換したときの IgG 放出量（IgG 担持量を変化させた時）

Table 2-14 に Dmab を担持した製剤化粒子の担持量，放出速度定数，および放出タイプを示す．担持量は Zn を添加することで向上した．放出タイプは Zn を添加していない pure HAp がモノリシック型であることを除いて全てゼロ次放出速度式に一致してリザーバー型であった．Zn を添加することで放出速度は上昇し，HAp/ChS の方が pure HAp より高い放出速度を示した．Fig. 2-22, 2-23 に製剤化粒子からの Dmab の放出挙動および放出された Dmab の構造安定性の比較を示す．どちらも初期の IgG 放出量は 3.0-4.0 μg/mg 程度に抑えられつつその後継時的に増加したが，HAp/ChS + Zn の方が放出速度が有意に高く，投与 1 週間後で放出量が 22 μg/mg 程度まで増加した．放出された Dmab の構造安

定性は，投与 1 日目では，HAp/ChS に Zn を添加すると構造安定性が有意に向上した．投与 7 日目では有意差を認めなかった．

Table 2-14 Dmab を担持した製剤化粒子の担持量・放出定数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp	52.1	65.1	4.7×10^{-1}	2.6×10^{-2}	Monolithic
			0.850	0.809	
HAp + Zn	78.2	97.7	1.3×10^{-1}	8.0×10^{-2}	Reservoir
			0.721	0.809	
HAp/ChS	23.6	29.6	3.5×10^{-1}	1.6×10^{-2}	Reservoir
			0.849	0.878	
HAp/ChS + Zn	73.0	91.2	1.6×10^{0}	9.3×10^{-2}	Reservoir
			0.802	0.900	

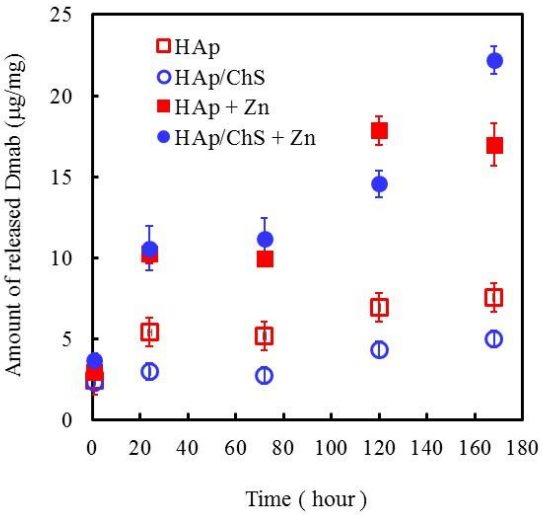


Fig. 2-22 製剤化粒子からの Dmab の放出量 (n=4)

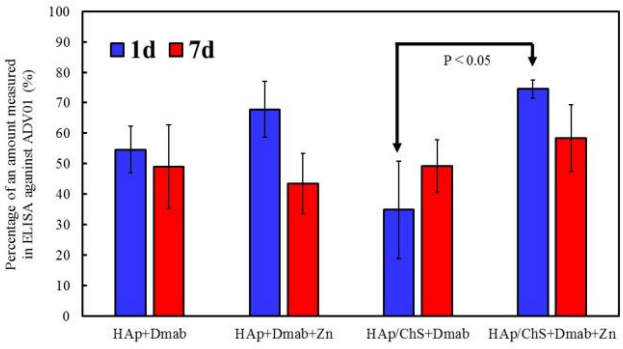


Fig. 2-23 製剤化粒子からの放出された Dmab の構造安定性評価 (n=4)

Fig. 2-24 に，Zn を使用した HAp/ChS 製剤化粒子（IgG 担持：80 μg/mg）からの Zn^{2+}の溶出率を示す．縦軸は製剤化処理時で添加した Zn^{2+}のうち放出された割合を示す．実際に粒子に吸着した Zn^{2+}の量は 14.3 μg/mg であった．投与 1 週間後における放出率は 0.1%程度でありその後わずかに増加するものの投与後 4 週間にわたり Zn^{2+}の溶出率は 0.3%未満であった．

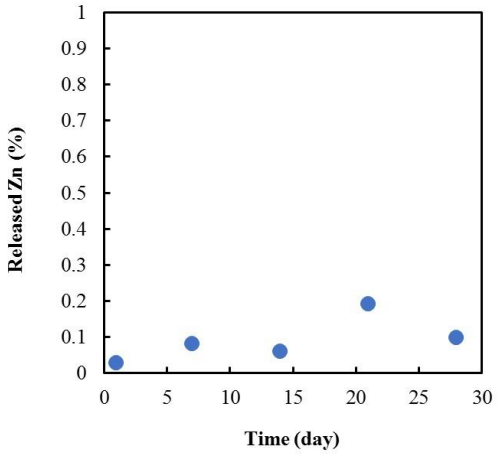


Fig. 2-24 Zn を添加した製剤化粒子からの Zn の溶出率

２．４．考察

２．４．１．生体現象を模倣した HAp/ChS ナノ複合化のメカニズム

HAp は骨の無機主成分であるが，本来ヒトの骨には無機物だけでなくコラーゲンやムコ多糖類などの有機物も含まれており HAp と複合化することによって機械的強度を維持している[19]．骨の強度は骨密度だけでなく骨質にも依存するが，それは HAp の結晶構造だけでなく有機物との複合化の形態によっても左右する．例えば，ヒトの骨は HAp の Ca イオンがコラーゲンのカルボキシル基と相互作用して複合化し自己組織化されていることは有名である[19].

そこで我々は，生体現象を模倣すべくHApを湿式法により合成する過程において，水酸化カルシウム懸濁液にChS粉末を添加・溶解させてからリン酸水溶液を滴下することでHAp/ChSナノ複合体を合成した．このように，HApがChSと人工的に自己組織化する現象はSH Rheeらによって報告されている[20, 21]．Fig. 2-25に示すように，水酸化カルシウム懸濁液にChSを溶解させるとChSのカルボキシル基やスルホニル基は負に帯電しているので，正に帯電するCaイオンと配位結合する[20, 21]．これをHAp核形成の場としてHApナノ結晶が一軸方向に整列するように長軸100-150nm程度の紡錘状の複合体を形成する．但し，ChSの添加量が過剰になると，ChS分子鎖間で同符号イオンによる静電反発力が生じてナノ複合体の形成が妨げられる．

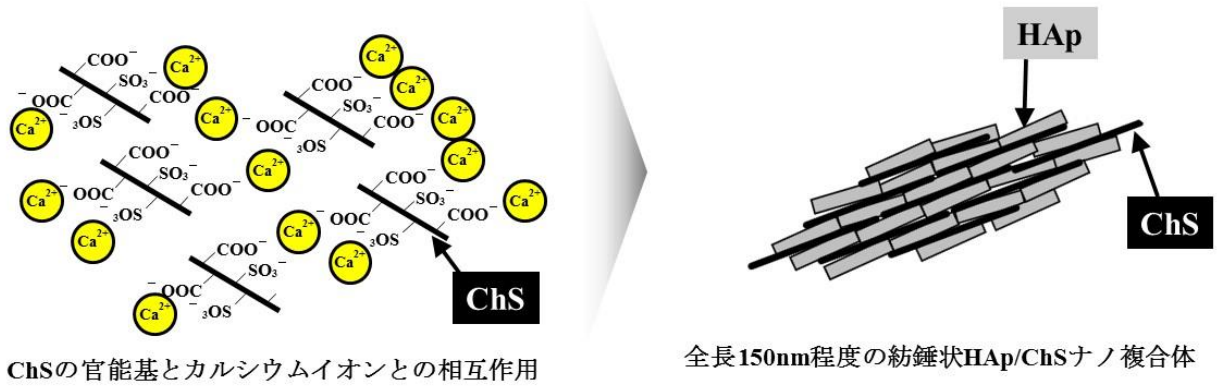


Fig. 2-25 HAp/ChS ナノ複合体形成のメカニズム

２．４．２．HAp/ChS 多孔質微粒子と Zn のタンパク質製剤への有用性

HAp 多孔質粒子をタンパク質の放出担体として応用する研究は 1990 年代から行われていた．W Paul らは，300mm 程度の HAp 多孔質顆粒を作製してポリ乳酸で表面コーティングすることで製剤化処理してヒト血清アルブミンを担持（391 μg/mg）させて 60 日間の徐放が得られたことを報告している[22]．また，同担体にインスリンを担持（6 IU/g）させて polyethylene vinylacetate でコーティングして製剤化処理し，ラットに皮下投与したところ低血糖のリスクが軽減したことも報告している[23]．Vladimir S. Komlev らは，粒子径 50-2000μm の HAp 顆粒を作製してメチレンブルーを担持させてラットに投与したところ，メチレンブルーの血中濃度が 5 日間維持させることに成功している[24]. T. Matsumoto らは，HAp 結晶粒子を作製して cyt *c* の放出特性を評価し，骨形成促進作用を有する細胞増殖因子の放出担体としての有用性を報告している[25]．一方，タンパク質だけでなく抗生物質であるゲンタマイシンを担持させてアルギン酸でコーティングして製剤化処理する技術も報告されている[26]．以上のように，HAp 多孔質粒子の作製に成功し，タンパク質の優れた徐放特性があることから細胞増殖因子の徐放性担体として期待されていた．

実際に，細胞増殖因子を担持させて動物学的評価を行う研究は 2000 年代に報告されていた．ただし，細胞増殖因子は失活・変性しやすく，低濃度域で維持できるような放出制御が必要とされていたが，HAp だけではこのような要件を満たすことができないと考えられたため，生分解性を有する高分子で製剤化処理を行ったり，ハイドロゲルなどと混合して徐放特性を付与させるなどの工夫がなされていた．Kaito T らは，HAp と生分解性を

有するポリ乳酸-ポリエチレングリコール共重合体との複合多孔質体スキャフォールドを作製して骨形成因子（bone morphogenetic protein; BMP）を担持させてウサギの骨欠損部に移植したところ，スキャフォールドの気孔に骨が入り込むように成長する bone ingrowth が認められ，骨欠損部の治療に有用であることを報告している[27]．Jung RE らは，BMP の徐放特性を付与させるために，HAp とβ-tricalciumphosphate（β-TCP）の複合体顆粒だけでなくポリエチレングリコールハイドロゲルと複合化させてウサギの頭蓋骨骨孔に投与したところ，骨量増加作用を示したことを報告している[28]．このように，HAp は生分解性を有する高分子などと複合化させることで徐放特性が付与され，BMP を担持させて動物に投与したところ，優れた骨形成作用を示すことがわかった．しかしながら，上述のように BMP は失活・変性しやすく，放出制御による局所濃度の維持が難しく，BMP による異所性骨化などの副作用が問題となり，我が国では未だに BMP の局所投与製剤は承認されていない．

上記の研究は HAp と高分子材料とを分子レベルで複合化させたものではない．また，ポリ乳酸などの生分解性の高分子は，骨欠損部での骨誘導・骨再生の阻害因子となることも懸念されている．そこで，本研究では骨形成作用を有する BMP，繊維芽細胞増殖因子（FGF-β），トランスフォーミング成長因子β（TGF-β）などの細胞増殖因子は塩基性タンパク質であることから，それらとの静電相互作用を働かせて吸着・放出特性を向上させる目的で HAp に生体軟骨由来の成分である ChS と分子レベルで複合化させたナノ複合体を合成した．また，純粋な HAp 粒子を生理食塩水などに浸漬させて注射で局所投与する際に粉末状の HAp は水と馴染みにくいため中空針を通過しにくい．そこで，親水性の ChS と複合化させると容易に馴染んで利便性が向上する．

ChS は，グルコシド-1, 3 結合されたグルクロン酸と N-アセチルガラクトサミン硫酸を主要な二糖の繰り返し単位とする代表的な GAG である．水に可溶だが，有機溶媒には不溶で保水性・弾性を有する．ChS はアルカリには比較的強いが，無機酸の溶液中で長時間加熱すると加水分解されて等モルのガラクトサミン・酢酸・硫酸を生じる[29]．この際ウロン酸部分はほとんど分解されるが，室温下で希エタノール塩酸処理すると，グリコシド結合がほとんど切断されずに脱硫酸化される[30]．ガラクトサミンにおいて，4 配位炭化水素基に硫酸基を有するものをコンドロイチン-4-硫酸（ChS-4）又はコンドロイチン硫酸 A，6 配位炭化水素基に硫酸基を有するものをコンドロイチン-6-硫酸（ChS-6）又はコンドロ

イチン硫酸 C と呼ぶ. ChS-4 の構造からグルクロン酸中の 2 配位炭化水素基に硫酸基を加えたものがデルマタン硫酸である．ChS-4 構造中のグルクロン酸の pK は約 3 と報告されている[31]. 生体中に存在する ChS のうち, 20－40%が軟骨に含まれている. 他にも, ChS-4 はウマ・ウシ[32]・クジラ[33]の鼻軟骨，ウシ気管軟骨，新生児の肋軟骨[34]に含まれ，ChS-6 は靭帯・腱・心臓弁・軟骨・皮膚・脊索腫・軟骨肉腫[34]・髄核[35]・動脈[36]などに含まれている．また，ヒト血清[37]・尿[38]またはウシの脳・脊髄[39]からも見出されている．ChS の電場における易動度は HyA よりも高く，電気泳動で容易に分離される[40-42]．骨組織中で，骨修復や石灰化プロセスを促進する役割をもつ[43]．この促進効果は，糖鎖に存在する硫酸基とカルボキシル基が核形成場であるためと考えられている. 哺乳動物の軟骨には主として ChS-4, サメ･エイのような軟骨魚類には主として ChS-6 が含まれている[33, 44-46]. ChS-4 と ChS-6 では，溶解度・旋光度が若干異なるが[34, 47]，分子の大きさ・形・粘度・電荷易動度はほぼ等しい[48]．ChS とタンパク質の結合に関しては，セリンの水酸基が関与していることが示されている[49-51].

HAp/ChS ナノ複合体をタンパク質の担体として応用する場合，HAp/ChS ナノ複合体を凝集させた多孔質微粒子の形態が望ましい. なぜなら, ナノ複合体ではその表面にタンパク質を吸着させても生理条件下に曝されるとタンパク質が直ぐに離れて放出される可能性があるためである. 強い相互作用でタンパク質がナノ複合体の表面に吸着されれば放出（脱着）されにくいが, タンパク質の担体として普遍的に応用するには限界がある. また, ナノ複合体ではサイズが 100-150nm 程度だと生体内で容易に好中球やマクロファージに貪食されてしまい，細胞外環境で薬効を発揮できなくなる恐れがある．一方，粒子径が 20μm 以上になると，好中球やマクロファージに貪食はされないものの粒子が血管内に誤投与された場合に毛細血管でつまってしまい血管閉塞の原因となる危険性もある. 以上から，粒子径は毛細血管を通過できる赤血球（6μm 程度）と同程度の 4.0-5.0μm 程度の微粒子が適切と考える.

多孔質微粒子として気孔内にタンパク質を封入させ, タンパク質の気孔内拡散を制御できれば長期間の徐放も期待できる．HAp/ChS ナノ複合体からスプレードライ法により乾燥・凝集させて作成した多孔質微粒子は，平均粒子径が 4.0μm 程度であり Fig. 2-6 からも HAp/ChS ナノ複合体が凝集していることが確認できた．Fig. 2-10 に示すように, HAp/ChS2%粒子の気孔サイズは 20-60nm 程度でありタンパク質のサイズよりも大きい.

HAp/ChS 多孔質微粒子はどちらも生体骨由来の素材であるため生体適合性に優れるものの，粒子自体による骨再生への影響は検討する必要がある．H. Omi らは，HAp/ChS 多孔質微粒子をウサギの大腿骨孔に投与したところ，4 週間後に骨形成及び骨芽細胞の活性および骨量増加を認めたと報告している[52]．これは，骨欠損部の骨再生治療において，HAp/ChS 微粒子が薬物担体として投与された際に担体自体が骨再生の阻害因子となる可能性が低いことを示唆する．なお，第 4 章でも HAp/ChS 多孔質微粒子をラット大腿骨孔に投与した結果について報告する．

ChS 含有量については，Fig. 2-12 に示すように ChS 含有量が高いほど粒子からの ChS 溶出が増加してタンパク質の初期バーストが起こる可能性が懸念される．また，ChS と Zn との帯電バランスを調整してタンパク質の気孔内拡散を制御するにあたり，ChS 含有量が高いほど Zn の添加量が増加して Zn による毒性の影響が懸念される．以上の理由から，第 3 章以降では ChS 含有量を 2wt%と設定した．

細胞増殖因子では血中濃度が非常に低くても薬効が発現されることから微量に放出されるように制御する必要があったが，抗体医薬では高い血中濃度でないと薬効が発現されないため，抗体を大量に担持できて高い放出速度で長期間放出される必要がある．HAp/ChS 多孔質微粒子だけではこの要求を満たすことは困難と考え，気孔内に担持されたタンパク質の気孔内拡散を変化させたり，タンパク質との相互作用を持たせて放出を制御できるような物質として Zn^{2+}が有用であることに着想した．HAp/ChS 多孔質微粒子の気孔内は酸性多糖類である ChS の存在により負に帯電している．そこで，負に帯電した気孔内を，陽イオンである Zn^{2+}の添加により中性に近づけることでタンパク質の気孔内拡散が促進されるという仮説を立てた．

Zn^{2+}を用いたタンパク質の放出制御に関する研究が報告されている．Mizushima Y らは，HAp 多孔質粒子にヒト血清アルブミンと Zn^{2+}を添加することでタンパク質の徐放性が付与され，抗ウイルス剤で C 型肝炎の治療薬であるインターフェロンα（IFNα）を担持させてマウスに皮下投与したところ，IFNαの血中濃度の上昇が抑制できたことを報告している[53]．Katrin M らは，アルギン酸と Zn の複合体粒子をスプレードライ法により作製し，Zn^{2+}によるアルギン酸の架橋現象をタンパク質の放出制御へ応用することに成功している[54]．Zn^{2+}はタンパク質と強く相互作用して錯体を形成する．特に，タンパク質中のヒスチジン残基が強く関与しており，この現象をクロマトグラフィーに利用してタンパク質を

精製することは有名である[55].

Zn は 2 価陽イオンとなる金属元素である．ヒトの生体内には 1.4-2.3 g/70kg の Zn が含まれており，臓器の中では肝臓が約 70 mg/kg と最も高く，骨・筋肉・腎臓・心臓には 30-50 mg/kg，肺・脳・皮膚には 10-15 mg/kg 含まれている．血液中には約 2.5 mg/kg しか含まれず最も少ない．正常人の爪には 90-300 mg/kg，毛髪には 90-260 mg/kg 含まれている．その他，膵臓・眼・男性性器・精子中にも含まれる．小人症も Zn 欠乏症の一つである．血液中では，Zn は血漿中に 12-20%，赤血球中に 75-80%，白血球中に約 3%と偏在している[56, 57].

血漿中の Zn は主としてアルブミンとの結合によりタンパク質錯体として存在し，その他にもシステイン（のスルフヒドリル基）・ヒスチジン（のイミダゾール基）・α_2-マクログロブリンと結合している．膵臓中で，Zn はインスリンを結晶化することで構造を安定化している．眼の脈絡膜中にも高濃度の Zn が存在する．Zn^{2+}は網膜をその位置に保持する架橋の役割をすると考えられている．なぜなら，眼に，Zn^{2+}と強くキレートするジチゾンを注入すると網膜が剥離するからである．この他に，Zn は酵素に対する活性剤として作用し，視覚においても重要な役割を持つ.

Zn は主として十二指腸から吸収され，胃・小腸・大腸からも少量ながら吸収されて各部位へ輸送される．成人における Zn の摂取量は食物から 6-27 mg/day，飲料水から約 0.5 mg/day，大気中から約 8.4 μg/day である．吸収率は摂取量の 50-70%と言われている．Zn^{2+}の吸収を阻害する物質として，食品中のフィチン酸・植物タンパク質繊維・リン酸塩・カドミウムイオン等がある. 排泄は主に糞便からなされる. Zn^{2+}は腎臓で再吸収されるため，尿からの排泄量は正常なヒトで約 500 mg/day である．汗からの排泄は，1 日当たり約 1.2 mg/kg である．Zn^{2+}の排泄を促進する物質としてヒスチジン・システイン・メチオニン・ビタミン C 等がある.

生体中の Zn が欠乏すると，骨・関節の異常，性機能発達の不全，皮膚・爪・毛髪の損傷，味覚・嗅覚の減退，食欲不振，成長の抑制・停止，創傷治癒の遅延，情緒不安定などの障害が起こる．Zn を過剰摂取すると，発熱・嘔吐・腹痛・下痢・眠気・疲労感などの症状が現れる．急性中毒になると，これらの症状に加えて全身倦怠・腱反射遅延・血性陽炎・白血球減少・中枢神経障害などが現れる.

Zn の中には酵素中に含まれるものもある．例えば，カルボキシペプチダーゼ A は 1 分

子当たり 1 個の亜鉛を含有し，構造中で Zn は 3 つのアミノ酸配位子 69-ヒスチジン，72-グルタミン酸, 169-ヒスチジンと結合し, 第 4 番目の配位位置は水分子が結合している[58]. この酵素は, ペプチド・エステル結合のカルボキシル基末端を加水分解することでタンパク質をアミノ酸に遊離させる．また，赤血球中にあるカルボニックアンヒドラーゼ（炭酸脱水酵素）は 1 分子当たり 1 個の Zn^{2+}を含み，Zn を除去すると失活する． Zn^{2+}は主に四面体構造をとり，3 つのヒスチジンと配位し，第 4 番目の位置は周りの水分子又は水酸基と結合している[59]．肝臓アルコールデヒドロゲナーゼ（2 量体）は，単量体当たり 2 個の亜鉛と結合している（1 分子当たり 4 個の亜鉛を含有）．そのうち 2 つは触媒作用，他の 2 つは 2 量体構造の保持を担っている[60]．触媒作用に関与する Zn のうち一方は，46, 174-システインの硫黄原子，67-ヒスチジンのイミダゾール基及び水分子に配位して四面体構造を形成している．もう片方は，97, 100, 103, 111-システインの硫黄原子に配位して四面体構造を形成している．

HAp の表面モデルを使って，その表面とカルボキシル基との相互作用について分子軌道計算したところ, 2 価の金属イオンではその結合次数は Zn^{2+}が最も高いことがわかっている[61]．本研究でも，リゾチームを担持させた製剤化粒子からの初期バーストについて Ca^{2+}，Cu^{2+}，Mg^{2+}，Mn^{2+}，Fe^{2+}，Zn^{2+}を用いたところ，Zn^{2+}が最も初期バーストが抑制された（data not shown）．また，Zn^{2+}は上述のようにタンパク質構造の安定化や骨形成促進作用も有しており生体微量必須元素であり微量の添加では毒性はないことから, 本研究においてタンパク質の製剤化に最も適した金属イオンとして採用した．さらに，タンパク質との相互作用だけでなく, 気孔内の電荷バランスを変化させてタンパク質の気孔内拡散を制御できることにも期待できる．

２．４．３．タンパク質の多孔質微粒子への吸着現象

HAp の表面電位（ζ 電位）は，pH=6.0 でほぼゼロとなり，それ以下では正に，それ以上では負に帯電する[62, 63]．PBS（pH6.8）中での HAp 粒子の表面電位は，酸性タンパク質のアルブミンを吸着させると低下する（−7.8mV → −12.3mV）．一方，塩基性タンパク質のリゾチームの吸着では表面電位の変化は見られないため，アルブミンと吸着形態が異なることが報告されている[63]．

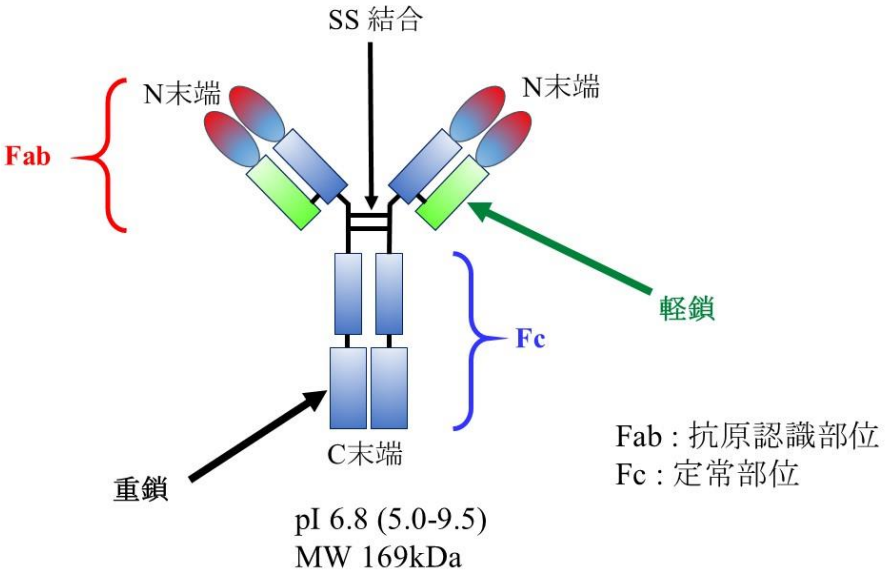
HAp 表面のタンパク質の吸着等温線は Langmuir 吸着等温式に従うことが報告されてい

るが[64-67]，本研究の多孔質微粒子でも同様に Langmuir 吸着等温式，もしくはその他の理論モデルに従っていた．２．４．２でも述べたように多孔質微粒子の気孔サイズはタンパク質のサイズよりも大きいため，多孔質微粒子をタンパク質溶液に浸漬させると，タンパク質分子が粒子の気孔内に入り込んで拡散して HAp/ChS ナノ複合体表面に吸着される．HAp/ChS 多孔質微粒子は pure HAp と比較すると，BSA では吸着量が低下し，Hb ではほぼ同等の吸着量を示し，cyt *c* では吸着量が増加した．これは，生理条件下で負に帯電する ChS がタンパク質と静電相互作用したためと考えられる．Table 2-2～2-4 に示すように，pure HAp においては 3 種類の全てのタンパク質で Langmuir-Freundlich 型モデルに従った吸着等温線を示し，粒子内気孔の不均一表面での吸着に相応する結果であった．一方で，HAp/ChS ではタンパク質によって吸着モデルが異なっていた．これは，ChS の介在により吸着形態に影響を与えたことを示唆する．なお，Hb は分子サイズが文献値よりも高い値であり Hb 分子が凝集していた可能性がある．

ただし，球状タンパク質が多孔質微粒子に担持される際，タンパク質が気孔内に均一に担持されていたかどうかは本研究の結果からは証明できない．Table 2-5 に示すように，吸着等温線の解析で算出した最大吸着量は，Hb を除いてタンパク質のサイズから計算した理論最大単分子吸着量と比較して小さい値であった．そのため，球状タンパク質においては気孔内に自由に入り込んで均一に担持されていなかった可能性が高い．Hb については，実測の分子サイズが文献値よりも高い値であったため，Hb 分子が凝集していた可能性が高い．それが，最大吸着量が理論最大単分子吸着量より上回ったことに関連しているかもしれない．

一方，IgG における多孔質微粒子の気孔内表面での吸着について論じる．Fig. 2-26 に，抗体医薬の基本構造である IgG の模式図および IgG の吸着様式を示す．重鎖と軽鎖で構成されてジスルフィド結合で連結されている．末端にアミノ基を有する N 末端側は抗原認識部位であり F_{ab} と呼ばれる．対して，末端にカルボキシル基を有する C 末端側は定常部位で F_c と呼ばれる．等電点は 7.1 程度であるが，電気泳動は 5.0-9.5 間でブロードなパターンを示して様々なサブクラスによって等電点の分布が異なるため, 一概に等電点の値で議論することはできない．IgG は HAp 表面に End-on もしくは Side-on の状態で吸着する[68]．また，各々の吸着様式における理論最大吸着量および 1 分子あたりの被覆面積も示す[10]．End-on については，IgG の F_{ab} 側で吸着する anti-End-on もある．IgG の N 末端は

生理条件下で正に，C 末端は負に帯電する．pure HAp ではゼータ電位より正に帯電することが判っており，IgG の C 末端側つまり F_c 側を好んで吸着された可能性がある．一方，HAp/ChS では負に帯電するため，F_{ab} 側を好んで吸着された可能性がある．IgG 分子は N 末端・C 末端の面積は側鎖よりも小さいため，End-on 吸着が主なる場合は Side-on 吸着よりも最大吸着量が大きい．また，End-on 吸着の方が IgG 側鎖と HAp 表面との相互作用に対して安定に存在するために必要なエネルギーが小さいため，より安定に IgG 分子が担持できることが期待される．Table 2-8 に示すように，担体を HAp/ChS 粒子，溶媒を NS とした場合の最大吸着量が，End-on 吸着した場合の理論的な最大吸着量に最も近い値であった．そのため，IgG が多孔質微粒子の気孔内に入り込んで均一の担持された可能性が高い．この吸着条件が本研究において最も適切であると判断し，以降の実験において標準的な製剤化条件として採用した．



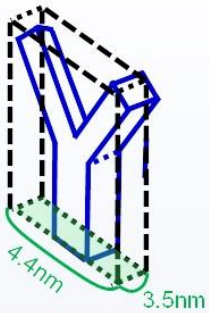
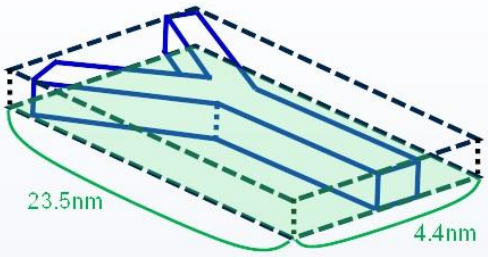
Adsorption Type	End-on 	Side-on 
Covarage area (nm^2)	15.2	103
Max. monolayer adsorption (mg/m^2)	1.85	≫ 0.27

Fig. 2-26 抗体医薬の基本構造（免疫グロブリン; IgG）と，多孔質微粒子の気孔内表面に対する IgG の吸着様式および IgG が粒子の気孔内表面に最大吸着されたときの理論的に算出された吸着量と 1 つの IgG 分子あたりの被覆面積[10]

２．４．４．多孔質微粒子からの球状タンパク質放出現象と Zn 介在の影響

多孔質微粒子からのタンパク質の放出は，初期の放出（initial release）とそれ以降の放出（subsequent release）の 2 つに分けて考察する．初期の放出は粒子の表面もしくは浅層に吸着したタンパク質の放出による．一方，それ以降の放出では粒子の深層に吸着したタンパク質の放出による．

まず，製剤化粒子を PBS 中に浸漬させると，粒子表面に吸着したタンパク質が PBS 中に放出される．これは主に初期バーストに関連する．次にその後の放出挙動はタンパク質の粒子中の気孔内拡散に依存する．気孔内拡散速度が高いほど，粒子の外に放出される単位時間当たりのタンパク質量も増大する．したがって，タンパク質の気孔内拡散を制御できればタンパク質の放出速度を制御することが可能となる．

Zn を用いていない製剤化粒子では，Fig. 2-18 と Fig. 2-20 に示すように，BSA と cyt *c* は初期にある程度が放出されるものの，その後の放出は見られなかった．この現象は，Fig. 2-28 に示すように，初期の放出では粒子の表面に担持されたタンパク質は ChS の存在により容易に溶液中に放出される一方で，粒子深層に担持されているタンパク質は粒子の気孔内が負に帯電した環境において，正または負に帯電したタンパク質が静電相互作用を受けて気孔内拡散が阻害されたためと考えられる．Fig. 2-27 に示すように，pure HAp では正に帯電しているが HAp/ChS 多孔質微粒子は酸性多糖類である ChS の介在により負に帯電している[69]．まず，BSA は負に帯電するため負に帯電する ChS との静電反発により容易に溶液中に放出される．正に帯電する cyt *c* では，粒子から溶出した ChS 一緒に放出される．ところが，Hb は中性タンパク質であるため静電相互作用を受けずに気孔内拡散されてその後の放出も起こる．

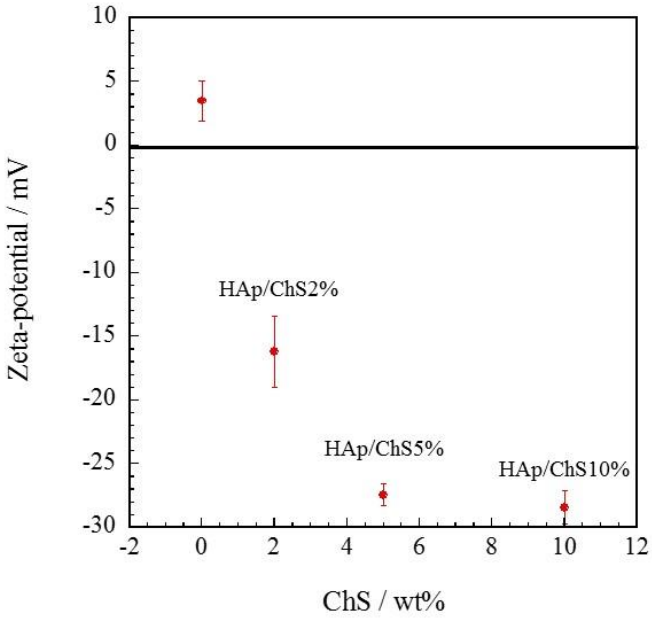


Fig. 2-27 HAp/ChS 多孔質微粒子のゼータ電位[67]

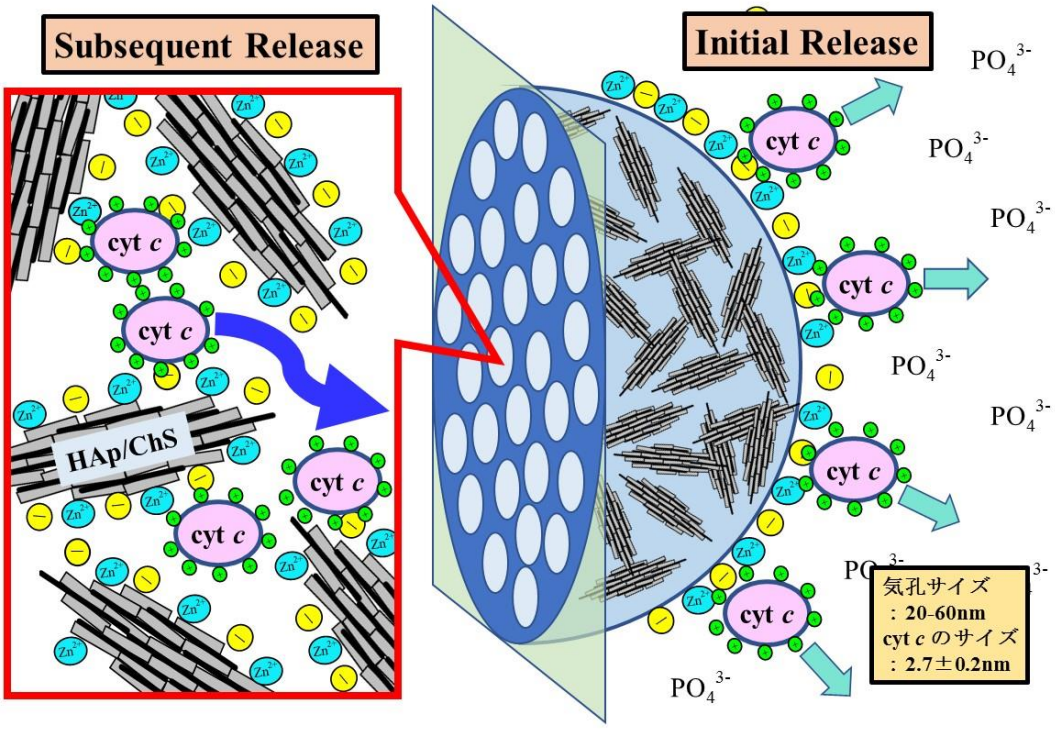


Fig. 2-28 Zn イオン介在下における HAp/ChS 多孔質微粒子からの球状タンパク質の放出メカニズム

Zn を用いた製剤化粒子では，Zn イオンが粒子表面に担持されたタンパク質と静電相互作用もしくはキレート形成して初期の放出が抑制される．さらに，Zn イオンの介在により気孔内の帯電バランスが中性に傾き，その静電相互作用が弱まってタンパク質の気孔内拡散速度が大きくなりその後の放出が起こると考えられる．ただし，その後の放出速度が IgG と比較して小さいのは気孔内のタンパク質と Zn との直接的な相互作用による影響も考えられる． Fig. 2-18～2-20 に示すように，pure HAp と比較すると HAp/ChS からのタンパク質放出量は，酸性タンパク質である BSA では増加し，中性タンパク質である Hb では同等，塩基性タンパク質である cyt *c* では減少した．この結果から，タンパク質の放出に ChS との静電相互作用も影響を与えていることがわかる．

２．４．５．HAp/ChS 多孔質微粒子からの IgG 放出および Zn 介在の影響

IgG ではその放出機構が前述の球状タンパク質とは異なる．Fig. 2-29 に，HAp/ChS 多孔質微粒子からの IgG の放出メカニズムを示す．まず，粒子表面に担持された IgG については，Fig. 2-21 と Fig. 2-22 に示したように， Zn による製剤化処理で初期の放出が抑制されたが，Dmab では初期の放出は抑制されなかった．Table 2-15A と Table 2-15B に示すように，免疫グロブリンには IgG 以外にも他の種類の抗体（IgA，IgE，IgM など）を含んでいるのに対し，Dmab はそれ自体が純粋な IgG である．IgG 以外の抗体が Zn イオンと相互作用して放出が抑制されたか，もしくは IgM のように分子量が大きい場合，気孔内に入り込めずに粒子の表面に吸着した分が初期に放出された可能性がある．いずれにせよ，IgG は Zn イオンとの直接的な相互作用は無く，初期の放出は抑制されなかったと考えられる．

Table 2-15A ヒト免疫グロブリンの分画

Isotype	含有率 (%)	分子量 (kDa)
IgG	70-75	146
IgM	10	970
IgA	10-15	160
IgD	＜1	184
IgE	＜0.001	190

Table 2-15B ヒト免疫グロブリンの分画

サブクラス	H鎖	L鎖	分子量 (kDa)	H鎖の分子量 (kDa)	糖含量 (%)	等電点
IgG_1	γ_1	κ, λ	146	50	2-3	5.0-9.5
IgG_2	γ_2	κ, λ	146	50	2-3	5.0-8.5
IgG_3	γ_3	κ, λ	170	60	2-3	8.2-9.0
IgG_4	γ_4	κ, λ	146	50	2-3	5.0-6.0
IgM	μ	κ, λ	900	68	12	5.1-7.8
IgA_1	α_1	κ, λ	160	56	7-11	5.2-6.6
IgA_2	α_2	κ, λ	160	52	7-12	5.2-6.6
sIgA	α_1, α_2	κ, λ	370	52-56	11	4.7-6.2
IgD	δ	κ, λ	184	68	12	n.d.
IgE	ε	κ, λ	190	72	12	n.d.

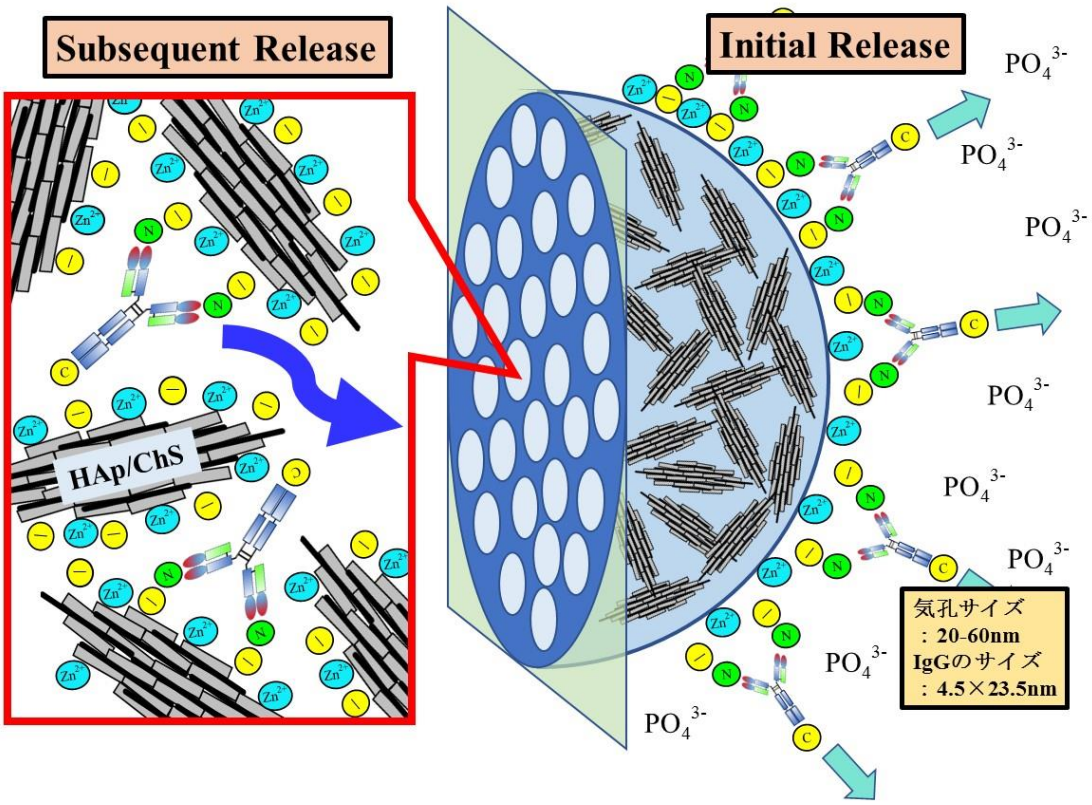


Fig. 2-29 Zn イオン介在下における HAp/ChS 多孔質微粒子からの IgG の放出メカニズム

その後の放出では，主に気孔内の帯電バランスによって IgG の気孔内拡散速度が変化して放出速度に影響する．IgG の pI は中性付近であるが，電気泳動での電荷スペクトルはブロードなパターンを示しており，Table 2-15B に示すように，正に帯電するサブタイプの IgG や負に帯電するサブタイプの IgG も存在する．Zn が存在しない場合，ChS の存

在で負に帯電した気孔内では静電相互作用から IgG 拡散が阻害されてその後の放出が得られにくい．そこで陽イオンである Zn イオンを添加すると，負に帯電した気孔内は中性付近に近づくため，その静電相互作用が弱まり IgG 分子の気孔内拡散の速度が上昇して放出量が増加する．Dmab も IgG_2 であり等電点は 5.0-8.5 とブロードなため，正に帯電する IgG_2 と負に帯電する IgG_2 が混在するため, Zn の介在がない気孔内では静電相互作用により拡散が抑制される．

Table 2-16 に，これまでの IgG の放出担体に関する研究の報告例を示す．最も多い担体の形態はハイドロゲルで，他にはナノ粒子，多孔質体，粒子であった．HAp はもとより，リン酸カルシウム・炭酸カルシウム系の担体に関する研究例は今のところ無い．Brenda らは，抗 TNF-α抗体をリポソームに封入してナノ粒子を作製したところ，ゼロ次放出様の挙動を示したことを報告している[70]．Daniel らは，アルギン酸ハイドロゲルを作製して Ca^{2+}による架橋現象を IgG の放出制御に応用する研究を報告している[71, 72]．Sotirios らは, 2 層性のペプチドハイドロゲルを作製して IgG のゼロ次放出を観測したことを報告している[73]．これは，単層のハイドロゲルとは違って外層が IgG の拡散律速因子となるためリザーバー型担体に分類される．Simovic らは，ナノポーラス構造のアルミナアレーを作製して rituximab を担持させ，気孔出口のサイズをアリルアミンでコーティングして小さくすることでゼロ次放出による放出制御が可能であることを報告している[74]．この担体は気孔構造を有する担体でありモノリシック型に分類されるが, ゼロ次放出の実現に成功している．Qi Wang らは，キトサンとコラーゲンの多孔質スキャフォールドを作製して抗 TNF-α抗体の放出挙動を報告している[75]．Keming Xu らは，ヒアルロン酸ハイドロゲルを作製して乳がんの治療薬である trastuzumab の放出特性を報告している[76]．Özge Erdemli らは，生分解性を有する poly(ε-caprolactone)から粒子を作製して IgG の放出特性を報告している[77]．Jaso C Stanwicka らは，脊髄損傷の治療を目的としてヒアルロン酸とメチルセルロースの複合体ハイドロゲルを作製して抗 Nago A 抗体の放出挙動について報告している[78]．このように，IgG の放出担体に関する研究は近年散見されてきているが，骨疾患治療を目的とした担体の開発についての報告は，知る限りでは今のところない．

Table 2-16 従来の IgG 放出担体と抗体およびその放出挙動

researchers	carrier material	antibody	Release kinetics
Brenda R et al.	polyanhydride nanoparticles	anti-TNF-α antibody	likely zero-order model
Daniel Schweizer et al.	alginate hydrogel	human IgG	likely Higuchi model
Sotirios Koutsopoulos et al.	two layer peptide hydrogel	human IgG	zero-order model
S. Simovic et al.	nanoporous anodic alumina arrays	rituximab	zero-order model
Qi Wang et al.	chitosan and collagen porous scaffold	anti-TNF-α antibody	likely Higuchi model
Keming Xu et al.	hyaluronic acid–tyramine hydrogels	trastuzumab	likely Higuchi model
Özge Erdemli	poly(ε-caprolactone) microspheres	human IgG	Higuchi model
Jason C. Stanwicka et al.	hydrogel of hyaluronan and methylcellulose	anti-NogoA antibody	one-dimensional Fickian diffusion model

Ito らは過去に NS 中での β-TCP/HAp 複合体（Zn 含有量 : 1.26wt%）からの 30 日間における亜鉛の徐放率は 100ppb 程度であったことを報告しており[79]，30 日間における PBS 中での HAp/ChS 製剤化粒子（Zn 含有量：1.43wt%）からの Zn の放出量（13.8ppb）よりも高い値であった．これは担体材料と溶媒の違いによるものと思われる．いずれにせよ，本製剤からの亜鉛放出量は非常に微量であり，毒性を示すことは考えにくい．

Fig. 2-23 に示すように，Zn を添加した製剤化粒子から放出された Dmab は，Zn を添加しなかった製剤化粒子よりも ELISA による検出率が上昇した．これは，製剤化処理において Zn を添加することでより安定に Dmab が担持されていたことを示唆する．

Table 2-17 にこれまでのタンパク質の放出挙動の特性をまとめた表を示す．概して，球状タンパク質ではモノリシック型，抗体ではリザーバー型の放出タイプであった．次章以降では，これらの結果をもとに実際に臨床で用い得るタンパク質を担持した製剤化粒子を作製することとした．

Table 2-17 多孔質微粒子からのタンパク質の放出特性のまとめ

タンパク質	球状タンパク質			抗体	
	BSA	Hb	cyt *c*	IgG	Dmab
Znとの相互作用	有			無	
ChSとの相互作用	無		有	無	
放出タイプ	Monolithic			Reservoir	
放出制御因子	Znとの相互作用			気孔内帯電バランス	
	第3章 OPG（球状タンパク質）担持製剤粒子			第4章 Sclmab（抗体）担持製剤粒子	

２．５．結言

湿式法により合成した HAp/ChS ナノ複合体からスプレードライ法により多孔質微粒子を作製した．HAp/ChS 多孔質微粒子は pure HAp よりも塩基性タンパク質の吸着特性に優れ，製剤化処理時に Zn を使用することで，タンパク質の初期バーストを軽減できるだけでなく気孔内の帯電バランスを変化させてタンパク質の放出速度を制御できることに成功した．

参考文献

[1] I. Langmuir, The constitution and fundamental properties of solids and liquids, J Am Chem Soc 38(11), p2221-2295, 1916.

[2] Sips R. Combined form of Langmuir and Freundlich equations. J Chem Phys 16, p490-495, 1948.

[3] H.M.F. Freundlich,Over the adsorption in solution, J Phys Chem 57, p385-471, 1906.

[4] A.W. Adamson, A.P. Gast, Physical Chemistry of Surfaces, sixth ed.Wiley-Interscience, New York, 1997.

[5] Akpa OM, Unuabonah EI. Small-Sample Corrected Akaike Information Criterion: An appropriate statistical tool for ranking of adsorption isotherm models. Desalination 272, p20-26, 2011.

[6] Akaike H. A new look at the statistical model identification. IEEE Trans Autom Control 1974:

19; 716-723.G. Zigang et al. Biomaterials 25, p1049-1058, 2004.

[7] J. Siepmann, F. Siepmann, Int. J. Pharm. 364, p328-343, 2008.

[8] S. Dash, P.N. Murthy, L. Nath, P. Chowdhury, Acta Pol. Pharm. 67, p217-223, 2010.

[9] P. Costa, J.M.S. Lobo, Eur. J. Pharm. Sci. 13, p123–133, 2001.

[10] 石原一彦・畑中研一・山岡哲二・大矢裕一，バイオマテリアルサイエンス，東京化学同人, p133, 2003.

[11] Protein Data Bank Japan, http://www.pdbj.org/index_j.html

[12] B.Y. Wang and F. Caruso, Adv. Mater. 18, p795-800, 2006.

[13] R. Shibsekhar et al. Biophysical Chemistry 119, p14-22, 2006.

[14] T. Tsuchibuchi, Shimadzu Application News, No.A388 Spectrophotometric Analysis, 2006.

[15] A. Striolo et al. J. of Supercritical Fluids 27, p283-295, 2003.

[16] V. Di Noto et al. Vibrational Spectroscopy 18, p1, 1997.

[17] V. Di Noto et al. J. Raman Spectroscopy 30, p209, 1999.

[18] 泉美治・小川雅彌・加藤俊二・塩川二朗・芝哲夫，機器分析のてびき（データ集）-IR, NMR, MS, UV-（株）化学同人，1996.

[19] Park JB. Biomaterials science and engineering. New York: Plenum Press, p. 148, 1984.

[20] Sang-Hoon Rhee, Effect of Chondroitin Sulfate on the Crystal Growth of Hydroxyapatite, Jounal of American Sosciety 83 [8] p2100-2102, 2000.

[21] Sang-Hoon Rhee, Yasushi Suetsugu, Junzo Tanaka, Biomimetic con"gurational arrays of hydroxyapatite nanocrystals on bio-organics, Biomaterials 22, p2843-2847, 2001.

[22] W. Paul, C. P. Sharma, Development of porous spherical hydroxyapatite granules: application towards protein delivery, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 10, p383-388, 1999.

[23] Willi Paul, Jerry Nesamony, Chandra P. Sharma1, Delivery of insulin from hydroxyapatite ceramic microspheres: Preliminary in vivo studies, J Biomed Mater Res 61, p660-662, 2002.

[24] Vladimir S. Komlev, Serguei M. Barinov, Elena V. Koplik, A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release, Biomaterials 23, p3449-3454, 2002.

[25] T. Matsumoto, M. Okazaki, M. Inoue, S. Yamaguchi, T. Kusunose, T. Toyonaga, Y. Hamada, J. Takahashi, Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein, Biomaterials 25,

p3807-3812, 2004.

[26] Willi Paul, Chandra P. Sharma, Infection resistant hydroxyapatite-alginate plastic composite, Journal of Materials Science Letters 16, p2050-2051, 1997.

[27] Kaito T, Myoui A, Takaoka K, Saito N, Nishikawa M, Tamai N, Ohgushi H, Yoshikawa H., Potentiation of the activity of bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration by a PLA-PEG/hydroxyapatite composite, Biomaterials 26(1), p73-79, 2005.

[28] Jung RE, Weber FE, Thoma DS, Ehrbar M, Cochran DL, Hämmerle CH. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone formation when delivered by a synthetic matrix containing hydroxyapatite/tricalciumphosphate, Clincal Oral Implants Research, 19(2), p188-195, 2008.

[29] 江上不二夫・鈴木旺・松村剛・山科郁男, 多糖生化学 1 化学編,（株）共立出版, p430, 1969.

[30] T.G. Kantor and M. Schubert, Journal American Chemistry Society 79, p152, 1957.

[31] M. B. Mathews Biochim. Biophys. Acta 35, p9, 1959.

[32] G. Bernardi et al. Nature 180, p1341, 1957.

[33] 瀬野信子, 生化学 33, p471, 1961.

[34] K. Meyer et al. Biochim. Biophys. Acta 21, p506, 1956.

[35] S.A. Barker et al. Carbohyd. Res. 1, p312, 1965.

[36] K. Meyer and D. Kaplan Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 105, p78, 1960.

[37] S. Schiller Biochim. Biophys. Acta 28, p413, 1958.

[38] G.S. Berenson and E.R. Dalferes Biochim. Biophys. Acta 101, p183, 1965.

[39] M.M. Szabo and E. Roboz-Einstein Arch. Biochem. Biophys. 98, p406, 1962.

[40] S. Schiller et al. J. Biol. Chem. 211, p717, 1954.

[41] N. Seno and K. Meyer Biochim. Biophys. Acta 78, p258, 1963.

[42] S.D. Schultz-Haudt Acta Chem. Scand. 11, p1070, 1957.

[43] J. P. Bali et al. Seminars in Arthritis and Rheumatism 31 (1) AUG, p58-68, 2001.

[44] K. Anno and N. Seno ''Biochemistry and Medicine of Mucopolysaccharides'' Maruzen Co. Ltd. p26, 1962.

[45] A.G. Lloyd et al. Biochim. Biophys. Acta 69, p496, 1963.

[46] 古橋保・内田和子，生化学 33, p537, 1961.

[47] K. Meyer and M.M. Rapport Science 113, p596, 1951.

[48] M. B. Mathews Biochim. Biophys. Acta 58, p92, 1962.

[49] A.G. Lloyd et al. Biochim. Biophys. Acta 46, p108, 1961.

[50] H. Muir Biochem. J. 69, p195, 1958.

[51] B. Anderson et al. Biochim. Biophys. Acta 74, p309, 1963.

[52] Omi H, Itoh S, Ikoma T, Asou Y, Nishikawa S, Tanaka J, Shinomiya K, Toh S. Biocompatibility and Soteoconductivity of Hydroxyapatite/Polysaccharide Nanocomposite Microparticles. Key Engineering Materials, 309-311, p561-564, 2006.

[53] Yutaka Mizushima, Toshiyuki Ikoma, Jyunzo Tanaka, Keiko Hoshi, Tsutomu Ishihara, Yasuaki Ogawa, Akinori Ueno, Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs, Journal of Controlled Release 110, p260-265, 2006.

[54] Katrin Möbus, Jürgen Siepmann, Roland Bodmeier, Zinc–alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 81, p121-130, 2012.

[55] Esmat S. Hemdan, Yun-juan Zhao, Eugene Sulkowski, and Jerker Porath, Surface topography of histidine residues: A facile probe by immobilized metal ion affinity chromatography, Biochemistry, Vol. 86, p1811-1815, 1989.

[56] 松島美一・高島良正，生命の無機化学，廣川書店, p187, 1984.

[57] 今井弘，生体関連元素の化学，培風館, p84-85, 1997.

[58] D. R. Williams “An Introduction to Bioinorganic Chemistry” C. C. Thomas Pub., p161, 1976.

[59] M.N. Hughes ‘’The Inorganic Chemistry of Biological Processes” J. Wiley, p124, 1972.

[60] H. Siegel “Metal Ions in Biological Systems” Vol. 6, p101, 1976.

[61] 田中順三，生駒俊之，植村寿公，大森健一，バイオセラミックス，コロナ社，p115, 2009.

[62] 青木秀希，驚異の生体物質アパタイト，医歯薬出版株式会社, 1999.

[63] H. Aoki, Science and Medical Applications of Hydroxyapatite, Japanese Association of Apatite Science, p33-34, 1991.

[64] A. Barroug et al. Journal of Colloid and Interface Science 208, p147-152, 1998.

[65] V. Midy et al. J. Biomed. Mater. Res. 41, p405-411, 1998.

[66] Qilie Luo et al. Journal of Colloid and Interface Science 200, p104-113, 1998.

[67] K. Kandori et al. Calcif Tissue Int 76, p194-206, 2005.

[68] Kazuhiko Kandori, Kaori Miyagawa, and Tatsuo Ishikawa, Adsorption of immunogamma globulin onto various synthetic calcium hydroxyapatite particles, Journal of Colloid and Interface Science 273, p406-413, 2004.

[69] T. Ikoma et al. Preparation of Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Nanocomposite and its Spherical Porous Microparticle, Transactions of the Mater. Research Society of Japan 29[6], p2911-2914, 2004.

[70] Brenda R et al. Sustained release and stabilization of therapeutic antibodies using amphiphilic polyanhydride nanoparticles, Chemical EngineeringScience 125, p98-107, 2015.

[71] Daniel Schweizer et al. Protein−Polyanion Interactions for the Controlled Release of Monoclonal Antibodies Biomacromolecules 14, p75-83, 2013.

[72] Daniel Schweizer et al. Pharmacokinetics, biocompatibility and bioavailability of a controlled release monoclonal antibody formulation Journal of Controlled Release 172, p975-982 2013.

[73] Sotirios Koutsopoulos et al. Two-layered injectable self-assembling peptide scaffold hydrogels for long-term sustained release of human antibodies, Journal of Controlled Release 160, p451-458, 2012.

[74] S. Simovic et al. Controlled release and bioactivity of the monoclonal antibody rituximab from a porous matrix: A potential in situ therapeutic device, Materials Letters 130, p210-214, 2014.

[75] Qi Wang et al. Locally controlled delivery of TNFα antibody from a novel glucose-sensitive scaffold enhances alveolar bone healing in diabetic conditions, Journal of Controlled Release 206, p232-242, 2015.

[76] Keming Xu et al. Hyaluronidase-incorporated hyaluronic acid–tyramine hydrogels for the sustained release of trastuzumab, Journal of Controlled Release 216, p47-55 2015.

[77] Özge Erdemli et al. Influence of excipients on characteristics and release profiles of poly(ε-caprolactone) microspheres containing immunoglobulin G, Materials Science and Engineering C 48, p391-399, 2015.

[78] Jason C. Stanwicka et al. *In vitro* sustained release of bioactive anti-NogoA, a molecule in clinical development for treatment of spinal cord injury, International Journal of Pharmaceutics

426, p284-290, 2012.

[79] Atsuo Ito, Haruo Kawamura, Makoto Otsuka, Masako Ikeuchi, Hajime Ohgushi, Kunio Ishikawa, Kazuo Onuma, Noriko Kanzaki, Yu Sogo, Noboru Ichinose, Zinc-releasing calcium phosphate for stimulating bone formation, Materials Science and Engineering C 22, p21-25, 2002.

第３章

多孔質微粒子からの破骨細胞形成抑制因子の放出特性

３．１．緒言・目的

生体組織の恒常的な機能維持（ホメオスタシス）に関して分子レベルで解明され，細胞の増殖・分化・移動・形態などを制御するサイトカイン・細胞増殖因子の有効性が明らかになってきた．これらは，生体内での半減期が短く，多様な細胞応答を示すため，組織内最適濃度の持続や局所的な活性発現が求められる．そのためには，薬効安定性・標的供給性に優れたタンパク質担体材料によるこれらタンパク質の徐放化が不可欠である．臨床応用されているタンパク質医薬品の多くは抗原性・安定性・供給性などに問題があるが，遺伝子組み換え技術の進歩により抗原性は改善されてきた[1]．タンパク質医薬品に対して投与方法の改善や長期徐放性の付与により薬効の向上や副作用の克服が試みられている．そのためには，タンパク質が生体内で薬物の最適濃度範囲（Effective Dose 50%；ED_{50}：使用した動物の半数に効果が出る薬物投与量）に合わせて薬物が徐放されるよう製剤化条件を最適化する必要がある．

骨組織の代謝は生体内でも比較的ゆっくりとしている．骨折の癒合も 3-6 か月を要する．骨組織には骨を形成する骨芽細胞，骨を吸収する破骨細胞，および両者の司令塔の役割を担う骨細胞がある．通常，骨組織の骨量が恒常的に保たれるように骨形成と骨吸収は 1 対 1 の比率で骨代謝が回転している．ところが，高齢になると骨芽細胞の作用が弱くなり相対的に骨吸収が優位になることで骨量が減少して骨粗鬆症となる．主な原因として，女性の閉経後に伴う女性ホルモンの血中濃度の低下によるものが挙げられる．当然ながら骨粗鬆症は女性が大半を占める．骨代謝を調節して骨量を増加させるには，骨芽細胞もしくは破骨細胞を制御する必要がある．両者は様々な受容体・リガンドの反応により活性を示す．

骨形成促進因子（Bone Morphogenic Protein; BMP ファミリー）は成長因子の中で最も強力な骨形成誘導能を持つ．骨組織中（同所性）のみならず骨組織以外（異所性）においても骨形成能を持つため[2]，局所滞在における徐放化が求められる．BMP は小動物・中動物に対しては高い骨再生能を示すが，霊長類では多量の BMP を必要とし，炎症性やコスト等が臨床応用上の問題点とされる[3, 4]．これまでに，L－乳酸－パラジオキサノンラン

ダム共重合体とポリエチレングリコール（PEG）とからなる AB タイプのブロック共重合体を BMP と組み合わせることで，良好な異所性骨形成が報告されている[5]．コラーゲンスポンジ[6]あるいはポリ乳酸スポンジ[7]と BMP とを組み合わせることでウサギの尺骨欠損（20mm）の骨修復が促進されたと報告されている．Z. Renwen らは，HAp で被膜したチタニウム合金ディスクに BMP-7 を吸着させて放出特性を検討した[8]．しかしながら，75-80%の BMP-7 が浸漬後初期（1 時間後）に放出されてしまい（*in vitro*），副作用のない骨修復を実現するには問題点が残されている．

線維芽細胞増殖因子－２（FGF-2）は，血管新生・骨再生・軟骨再生などを促進する塩基性タンパク質である. Tabata らはアミロペクチンで構成される生体吸収性ハイドロゲルを用いた徐放技術を開発した[9]．これは，FGF-2 と銅イオンの間で形成されるキレート錯体により FGF-2 を徐放化するものであった. V. Midy らは, 炭酸カルシウムや HAp の FGF-2 吸着・放出特性（*in vitro*）を報告しているが[10]，栓塞処理による薬物の徐放化を図る研究ではなかった.

成熟骨芽細胞から分泌された RANKL が破骨細胞表面に存在する RANK に作用することで破骨細胞が活性化する[11]．ここで RANKL のデコイ受容体として作用するタンパク質である破骨細胞形成抑制因子（osteoprotegerin; OPG）が発見された[11]．これは，破骨細胞の分化･増殖を抑制して骨吸収を抑制する方向へ働くことで骨量増加作用を有するため, 骨吸収に伴う疾患，骨粗鬆症，関節炎，多発性骨髄腫や白血病骨浸潤などの治療薬として期待されていた[12]．しかし，OPG は生体内半減期が極めて短いため，頻回の投与が必要という問題点が残されていた．一方，類似した作用を有するモノクローナル抗体である抗 RANKL 抗体（denosumab; Dmab）が半年に 1 回の投与で高い骨密度上昇効果が認められ，中和抗体が産生されなかったことから，Amgen 社は OPG 製剤の開発を中止してその代わりに Dmab の臨床開発を進展させることとした.

しかしながら，OPG はその骨代謝において重要な骨吸収抑制因子であることから，上記のような全身性疾患だけでなく, 悪性骨腫瘍のような骨吸収性の局所疾患にも臨床応用できる可能性を秘めている．他にも，人工関節置換術後のインプラント周囲では OPG/RANKL 比が低下している[13-15]．インプラント周囲では骨融解が起こるが，OPG の徐放製剤を局所投与できればその骨融解を予防・治癒できる可能性がある．これまでに，OPG をポリ乳酸－ポリエチレングリコール共重合体に担持させ，in vivo で 3 日間の放出

が報告されている[16]．しかしながら，骨代謝の回転速度が非常にゆっくりであることを考えると，OPG による十分な効果を発現させるには 3 日間の放出では不十分であり更なる長期の放出が望まれる．

我々は第 2 章で示したように, タンパク質の優れた担体および製剤化技術を確立することに成功している．HAp/ChS 多孔質微粒子は，比表面積が高く多量のタンパク質を担持でき，Zn を用いた製剤化技術によりタンパク質の放出を制御することができる．したがって, これらを OPG の全身･局所投与製剤への開発に応用することが可能と考えられる．

本章では，OPG と HAp/ChS 微粒子との相互作用について評価するために，HAp/ChS 多孔質微粒子に対する OPG の吸着特性を調べて OPG の担持条件を検討した．更に，OPG, recombinant human BMP-2（BMP-2）または FGF-2を粒子に担持させて Zn を用いた製剤化処理を行い，製剤化粒子からの試験管内でのそれぞれの放出挙動を評価した．そして，OPG の全身循環における血中動態をみるために製剤化粒子をラットに皮下注射で全身投与した時の血中濃度の推移を評価した．

３．２．実験方法

３．２．１．OPG 吸着試験および吸着等温式を用いた解析

前章で得られた HAp/ChS 多孔質微粒子（ChSwt%: 2%）を用いた．更に，それと比較するために同様な条件で作成した純粋な HAp 微粒子も用いた．OPG は，R&D 社製から購入した Sf21 細胞で発現させた遺伝子組み換え型の OPG（OPG-Fc : 全長 OPG とヒト IgG の Fc 領域との融合タンパク質）と三共株式会社からご供与頂いた Chinese Hamster Ovary 細胞（CHO 細胞）で発現させて精製した遺伝子組み換え型の OPG を用いた．

15mL の遠沈管（プロテオセーブ, 住友ベークライト）を用いて, 3mg の HAp と HAp/ChS 粒子を 5ml の OPG 水溶液（10%PBS）に加えて室温で 4 時間攪拌（回転速度：約 30rpm）させた．遠心分離（3500rpm, 10min）させた後，上澄み液の OPG 濃度を Advanced Protein Assay Reagant（ADV01, Cytoskeleton）で定量することにより吸着量を算出した. ここでは, 初期濃度が 5-100 μg/ml であったため，感度の高すぎる ELISA 法によりもμg/ml 濃度領域の定量に優れた ADV01 を用いた．Table 3-1 に OPG の吸着試験条件を記載する．吸着等温線については，２．２．４．で述べた理論モデルを用いて各吸着変数を算出した．

Table 3-1 OPG 吸着試験の条件.

Initial concentration (μg/ml)	Volume of OPG solutions (ml)	Total amount of OPG dissolved in the solution (μg)	Added amount of the microparticles (mg)
5	5	25	3
10	5	50	3
25	5	125	3
50	5	250	3
75	5	375	3
100	5	500	3

３．２．２．**OPG** を担持した製剤化粒子の作製と試験管内放出試験

３．２．２．１．小さい担持量における **OPG-Fc** の放出試験

250mg の HAp/ChS 粒子を 5ml の OPG-Fc 溶液（5 μg/ml，10%PBS）に加え，室温にて 4 時間転倒攪拌（回転速度：約 30rpm）を行った（理論担持量：0.1 μg/mg）．続けて $ZnCl_2$ 水溶液（10 mg/ml，pH 5.5）を 3ml 加えて 2 時間転倒攪拌させ栓塞処理を行った．遠心分離（3500rpm,10min）にて上澄み液を分抽し，蒸留水にて洗浄して，沈殿物を一晩凍結乾燥（設定温度：－15℃）させた．また，未栓塞処理粒子も同様の方法により作製した．上澄みに残存している OPG-Fc は ELISA 法（Human Osteoprotegerin ELISA, Biovendor Laboratory Medicine, Inc.）にて定量を行い，粒子への OPG-Fc の吸着量を算出した．放出試験は，製剤化粒子 10mg（または 20mg）を秤取り，5ml の PBS に分散させ，37℃で転倒攪拌（回転速度：約 30rpm）を 1 時間～7 日間行った．遠心分離して上澄み液を分抽し，OPG-Fc 濃度を ELISA 法で定量した．

３．２．２．２．**BMP-2** の製剤化処理及び放出試験

BMP-2 は山之内製薬（株）：現アステラス製薬（株）から供与して頂いたものをそのまま使用した．製剤化処理は，100mg の HAp と HAp/ChS 粒子を 3ml の BMP-2 水溶液（20 μg/ml,

10%PBS）に加えて室温で 4 時間転倒攪拌（回転速度 : 2.14rpm）した．続けて 6ml の $ZnCl_2$ 水溶液（1.0 mg/ml, pH5.5）を加えて 2 時間転倒攪拌させて製剤化処理を行った．遠心分離（3500rpm, 10min）により上清を除去し，蒸留水（10ml）を加えてボルテックスで粒子を洗浄した．遠心分離により上清を除去し，沈殿物を一晩凍結乾燥（設定温度：－15℃）させた．Zn を添加しない製剤化粒子も同様の処理により作製した．

放出試験は，5 or 10 mg の製剤化粒子を 10ml の PBS に分散させ，37℃で転倒攪拌（回転速度：2.14rpm）を 1 時間から 7 日間で行った．各測定時期において，遠心分離により上澄み液を分抽し，BMP-2 濃度を ELISA 法で測定して放出量を算出した．沈殿物は 10ml の新しい PBS を加えて同様の条件で転倒撹拌した．ELISA 定量は市販の ELISA キット（Quantikine® BMP-2 Immunoassay Cat. No. DBP200，R&D 社製）を用いた． Calibrator Diluent RD5P(1×)で濃度を調整して検量線用サンプルを作製した．（62.5-4000 pg/ml）96well プレートの各 well に 100μl の Assay Diluent (RD1-19)を滴下した．50μl の検量線用サンプル及び測定サンプルを滴下して室温で 4 時間穏やかに振倒攪拌させた. Wash Buffer で 4 回洗浄後，200μl の Conjugate を加えて室温で 2 時間振倒攪拌させた．洗浄にはプレート洗浄機（BIO RAD 社製，Immuno Wash Model 1575）を用いた．4 回洗浄後，200μl の Substrate Solution を加えて暗室で 30 分間静置させる．50μl の Stop Solution を加えて発色させ，30 分以内にプレートリーダー（BIO RAD 社製，Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer）で吸光度（波長：450nm）を測定した．

３．２．２．３．FGF-2 の製剤化処理及び放出試験

FGF-2 は，Biovision 社から購入したものを使用した（産生細胞；大腸菌由来）．製剤化処理は，50mg の HAp と HAp/ChS 粒子を 5ml の FGF-2 水溶液（10 μg/ml, 10%PBS）に加えて室温で 4 時間転倒攪拌（回転速度 : 2.14rpm）した. 続けて 3ml の $ZnCl_2$ 水溶液（1.0 mg/ml, pH5.5）を加えて 2 時間転倒攪拌させて栓塞処理を行った．遠心分離（3500rpm, 10min）により上清を除去し，蒸留水（10ml）を加えてボルテックスで粒子を洗浄した．遠心分離により上清を除去し，沈殿物を一晩凍結乾燥（設定温度：－15℃）させた．Zn を添加しない製剤化粒子も同様の処理により作製した．

放出試験は，5mg の製剤化粒子を 5ml の PBS に分散させ，37℃で転倒攪拌（回転速度：2.14rpm）を 1 時間から 7 日間で行った．遠心分離により上澄み液を分抽し，FGF-2 濃度

を ELISA 法で定量した．ELISA 定量は市販の ELISA キット（Quantikine® FGF basic Immunoassay Cat. No. DFB50，R&D 社製）を用いた．Calibrator Diluent RD5P(1×)で濃度を調整して検量線用サンプルを作製した．(10-640 pg/ml）96well プレートの各 well に 100□l の Assay Diluent (RD1-19)を滴下した．50μl の検量線用サンプル及び測定サンプルを滴下して室温で 4 時間穏やかに振倒攪拌させた. Wash Buffer で 4 回洗浄後, 200μl の Conjugate を加えて室温で 2 時間振倒攪拌させた. 洗浄にはプレート洗浄機（BIO RAD 社製, Immuno Wash Model 1575）を用いた．4 回洗浄後，200μl の Substrate Solution を加えて暗室で 30 分間静置させる．50μl の Stop Solution を加えて発色させ，30 分以内にプレートリーダー（BIO RAD 社製，Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer）で吸光度（波長：450nm）を測定した.

３．２．２．４．OPG-Fc と OPG との間における放出挙動の比較

３．２．２．１．に対して，4 倍の担持量で OPG-Fc と OPG との間における放出挙動の違いを検討した．125mg の HAp/ChS 粒子を 5ml の OPG-Fc もしくは OPG の水溶液（10 μg/ml，10%PBS）に加え，室温にて 4 時間転倒攪拌を行った（理論担持量：0.4 μg/mg）．続けて $ZnCl_2$ 水溶液（10 mg/ml，pH5.5）を 3.0 ml 加えて 2 時間転倒攪拌した．遠心分離（3500rpm,10min）にて上澄み液を分抽し，蒸留水にて洗浄を行い，沈殿物を一晩凍結乾燥させた．また，未栓塞粒子も同様の方法で作製した．放出試験は，製剤粒子 10mg を秤取り，5ml の PBS に分散させ，37℃で転倒攪拌（回転速度：約 30rpm）を 1 時間～7 日間行った．遠心分離して上澄みの rh-OCIF の定量を ELISA 法により行った.

３．２．２．５．大きい担持量における OPG の放出試験

３．２．２．２．に対して，20 倍の担持量となるような製剤化粒子を作製した．50mg の HAp/ChS 粒子（ChS 含有量：2wt%）または HAp 粒子を 5ml の OPG 溶液（80 μg/ml, 10%PBS）に加え，室温にて 4 時間転倒攪拌（回転速度：約 30rpm）を行った（理論担持量：8μg/mg）．Zn を添加しない製剤化粒子は，混合液を遠心分離（3500rpm, 10min）にかけて上澄み液を分抽し，蒸留水にて洗浄して，沈殿物を一晩凍結乾燥（設定温度：－15℃）させた．得られる製剤化粒子のサンプル名は HAp/ChS と称する．Zn を添加する製剤化粒子は，続けて異なる濃度の $ZnCl_2$ 水溶液（1.0, 2.3, 5.0, 10 mg/ml，pH5.5）を 3ml 加えて２

時間転倒攪拌させ，Zn を添加しない製剤化粒子と同様の処理で凍結乾燥させた．ここで得られる製剤化粒子のサンプル名をそれぞれ HAp/ChS+3Zn, HAp/ChS+7Zn, HAp/ChS+15Zn, HAp/ChS+30Zn と称する．上澄みの OPG 濃度を ELISA 法で測定することで粒子に担持された OPG 量を算出した．5ml の PBS に 5mg の製剤化粒子を浸漬・分散させ，37℃で転倒攪拌（回転速度：約 30rpm）を 1 時間～7 日間行った．各測定時期に遠心分離して上澄み液を分抽し，OPG 濃度を ELISA 法で測定して放出量を算出した．

３．２．３．OPG を担持した HAp/ChS 多孔質微粒子のラットへの単回投与試験

まず，ラットに投与する製剤化粒子を作成する．10%PBS で希釈した OPG 水溶液（濃度 800 μg/ml）を作成する．12.5ml の OPG 水溶液に 125 mg の HAp/ChS 粒子を浸漬させて室温で 4 時間転倒撹拌する．Zn を添加しない製剤化粒子は遠心分離にて上澄み液を除去して凍結乾燥した．得られた製剤化粒子を OPG-HAp/ChS と称する．なお，上澄み液の OPG 濃度を ADV01 で測定し，粒子に担持された OPG 量を算出した．Zn を添加する製剤化粒子については，続けて 0.75ml の $ZnCl_2$ 水溶液（10 mg/ml，pH 5.5） を滴下して更に 2 時間転倒撹拌する．沈殿物（粒子）は蒸留水で 3 回洗浄し，凍結乾燥して製剤化粒子を得た．サンプル名を OPG-HAp/ChS+Zn と称する．

動物実験には, 日本チャールズリバーより購入した 12 週齢の牡ラット (F344)を用いた．製剤化粒子を 200 mg/kg でラットの背部に皮下注射，もしくは腹部へ腹腔内注射した（n=5）．投与後 1, 2, 3, 4, 7 日目で採血（0.2 ml）し，OPG の血中濃度を ELISA 法で測定した．

OPG 単独投与した時のラット体内での半減期を評価するため, PBS に溶解した OPG 水溶液を 16.0 mg/kg でラットに皮下投与し（n=5），0.5, 1, 2, 4, 6, 24 時間目で採血して OPG 血中濃度を ELISA 法で測定した．

３．３．結果

３．３．１．BMP-2 の放出試験

Fig. 4-1 に HAp/ChS 製剤化粒子からの BMP-2 放出挙動を示す（担持量； 0.2 μg/mg（；BMP-2／粒子）, $ZnCl_2$ 添加量；0.06 mg/mg（；$ZnCl_2$／粒子））. 製剤処理後の上清には BMP-2 は残存していなかったため, 添加した BMP-2 のうち 100%が粒子に担持されたといえる．

横軸は放出期間，縦軸は PBS 中の BMP-2 濃度を表す．浸漬直後では，Zn で製剤化処理した粒子は Zn を用いなかった製剤化粒子よりも低い放出量を示した．その後 9 時間に渡り継時的な放出量の増加を認めた．放出試験で PBS に加えた製剤化粒子の重量を 10mg と 50mg に変化させたところ，放出量は加えた製剤化粒子の重量に比例していた．

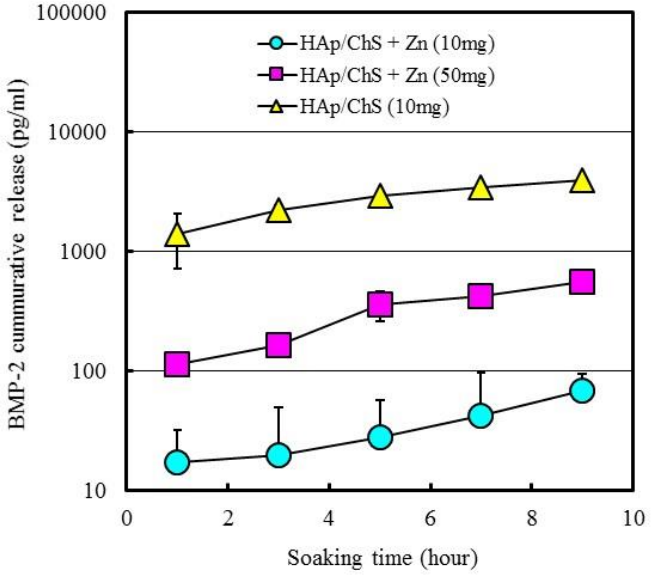


Fig. 3-1 PBS 中における製剤化粒子からの BMP-2 放出挙動

３．３．２．FGF-2 の放出試験

担持・製剤化処理において，吸着後の上清の FGF-2 濃度は，HAp + Zn；4.7 pg/ml，HAp/ChS；1299.6 pg/ml，HAp/ChS + Zn；24.0 pg/ml であった．洗浄後の上清の濃度は，HAp + Zn；4.1 pg/ml，HAp/ChS；74.6 pg/ml，HAp/ChS + Zn；26.4 pg/ml であった．栓塞粒子は，添加した FGF-2 のうちほぼ 100%が担持されたのに対し，未栓塞粒子では，若干の FGF-2 が上清に残存していた．ただし，全ての粒子において担持効率は 99%以上であった．

Fig. 3-2 に製剤化粒子からの FGF-2 放出挙動を示す（担持量； 1.0 μg/mg（；FGF-2／粒子），$ZnCl_2$ 添加量；0.06 mg/mg（；$ZnCl_2$／粒子））．横軸は放出期間，縦軸は PBS 中の FGF-2 濃度を表す．Zn を使用しなかった製剤化粒子（HAp/ChS2%）は，浸漬直後（1 時間後）に，初期バースト（；995.4 pg/ml）が観測された．その後，時間経過と共に放出量

が減少した．Zn を使用した製剤化粒子は，Zn を使用しなかった製剤化粒子と比べて初期バーストが軽減された（HAp + Zn；2.6 pg/ml，HAp/ChS + Zn；14.9 pg/ml）．24 時間まで放出量が増加したが, その後 1 週間までは放出量がほぼ一定となった. Zn を使用した HAp 製剤化粒子と HAp/ChS 製剤化粒子（HAp + Zn と HAp/ChS + Zn）では，HAp/ChS 粒子の方が高い放出量を示した.

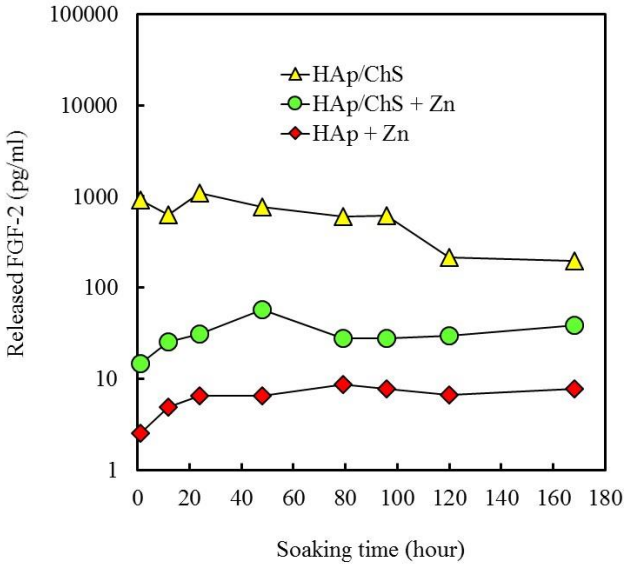


Fig. 3-2 PBS 中における製剤化粒子からの FGF-2 放出挙動

３．３．３．OPG の吸着試験

Fig. 3-3 に多孔質微粒子に対する OPG の吸着等温線を示す．OPG の吸着量は pure HAp の方が高く平衡濃度の増加に伴い 150 μg/mg まで上昇した．一方，HAp/ChS では吸着量は平衡濃度の増加に伴い 120 μg/mg 近くまで上昇した. これらの吸着等温線をもとにモデル式を用いて数学的に解析した結果を Table 3-2 に示す．吸着モデルはどちらの粒子も Langmuir-Freundlich に従っていた. また, どちらの粒子も非常に高い吸着親和力であった.

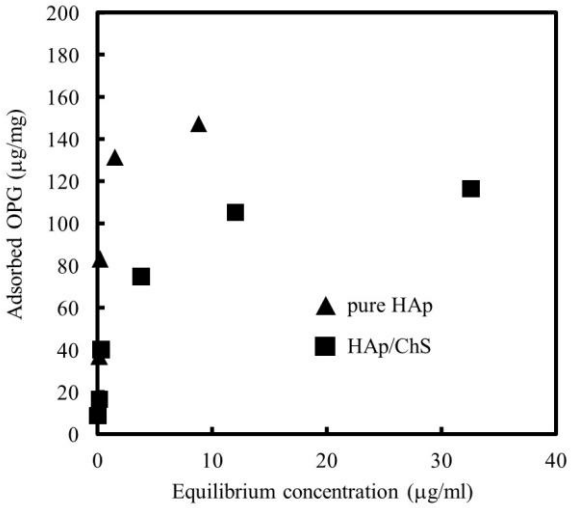


Fig. 3-3 10%PBS 水溶液における多孔質微粒子に対する OPG の吸着等温線

Table 3-2 OPG 吸着試験の各吸着変数

Sample	Parameter	Langmuir	Langmuir-Freundlich	Freundlich
Pure HAp	K(mL/mg)	2775.5±846.6	4734.1±392.4	6.40±3.39
	Q_m(mg/m^2)	1.54±0.14	1.36±0.06	
	n		2.55±0.51	3.38±0.99
	r^2	0.952	0.989	0.8
	AICc	-18.1	-17.2	-9.4
HAp/ChS	K(mL/mg)	1167.3±429.0	339.5±291.4	3.01±0.55
	Q_m(mg/m^2)	0.99±0.06	1.31±0.25	
	n		0.58±0.13	3.51±0.50
	r^2	0.961	0.985	0.957
	AICc	-29.7	-29.5	-29.0

３．３．４．OPG の放出試験

Fig. 3-4 に，HAp と HAp/ChS 及び未栓塞粒子と亜鉛栓塞粒子での OCIF-Fc 放出特性の比較を示す（担持量：0.1 μg/mg，$ZnCl_2$ 添加量：0.12 mg/mg）．横軸は放出期間，縦軸は PBS 中の OPG-Fc の濃度を示す．HAp は HAp/ChS よりも初期（24 時間後）の放出量が高

い（HAp ; 0.46 ng/ml，HAp/ChS ; 0.36 ng/ml）反面，1 週間後の放出量に関しては HAp/ChS の方が若干高い放出量（HAp ; 2.13 ng/ml，HAp/ChS ; 2.40 ng/ml）を示した．全ての粒子系において初期バーストは観測されず，時間経過に伴う直線的な放出挙動（ゼロ次放出）であった．また，Zn を用いることで放出挙動は直線性を維持したまま傾きが減少した．ChS の含有量の違いによる OPG 放出量の変化は認めなかった．

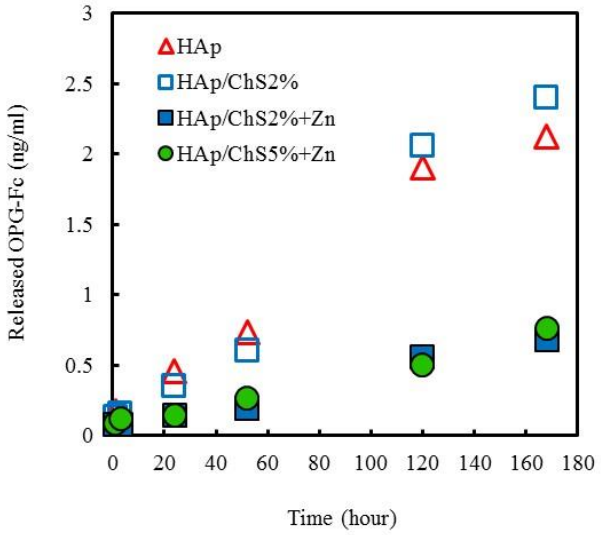


Fig. 3-4 ChS 含有量の違いによる OPG-Fc の放出量への影響

Fig. 3-5 に 10mg と 20mg の製剤化粒子（担持量：0.1 μg/1mg，Zn 添加量：0.12 mg/mg）からの OPG-Fc の時系列的な放出量を示す. PBS 中での各粒子による徐放はいずれも直線的であった. Zn 未使用の製剤化粒子の場合は, 7 日後 2.5 ng/ml (10mg) と 5.0 ng/ml (20mg) となり, Zn 使用の製剤化粒子の場合は, 7 日後 0.7 ng/ml (10mg)と 1.4 ng/ml (20mg)となり, 加える粒子量により正の相関があることが分かる.

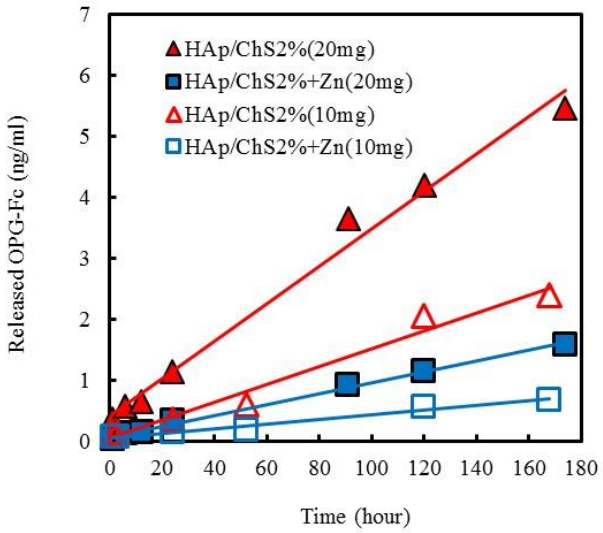


Fig. 3-5 製剤化粒子の重量を変化させたときの
OPG-Fc の放出量への影響

Fig. 3-6 に，Fig. 3-2 よりも更に担持量の高い製剤化粒子（HAp/ChS）の放出挙動を示す（担持量：0.4 μg/mg，$ZnCl_2$ 添加量：0.24 mg/mg）．Zn 使用の製剤化粒子では直線的な OPG-Fc の放出が観察されたが, Zn 未使用の製剤化粒子では放出量の増加率が不安定であった．このことから，Zn を加えることにより明らかに放出量が制御されていることが分かった.

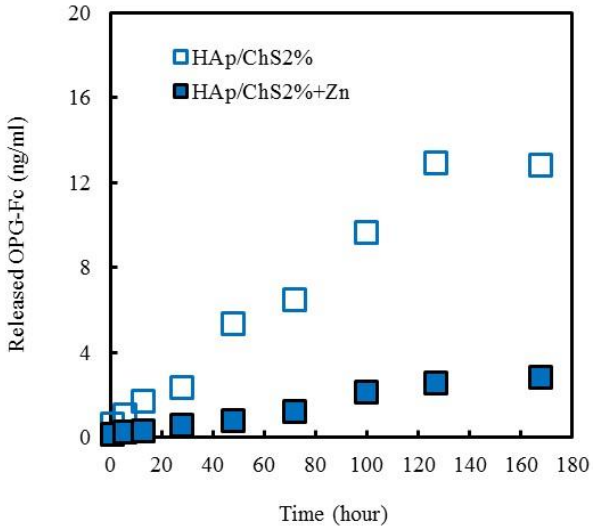


Fig. 3-6 Zn 添加による OPG-Fc の放出挙動の変化
（OPG-Fc 担持量：0.4 μg/mg）

Fig. 3-7 に製剤化粒子からの OPG 放出挙動を示す（担持量：0.4 μg/mg，$ZnCl_2$ 添加量：

0.24 mg/mg). Zn 未使用および Zn 使用の製剤化粒子における 1 週間後の放出量は 2.4 ng/ml と 1.5 ng/ml であった．これらは，OPG-Fc よりも低い値（Zn 未使用 ; 12.8 ng/ml，Zn 使用 ; 2.8 ng/ml）を示した．Zn 未使用の製剤化粒子は放出量の増加率が不安定であった．一方，Zn 使用の製剤化粒子は直線的な放出量の増加を示した．

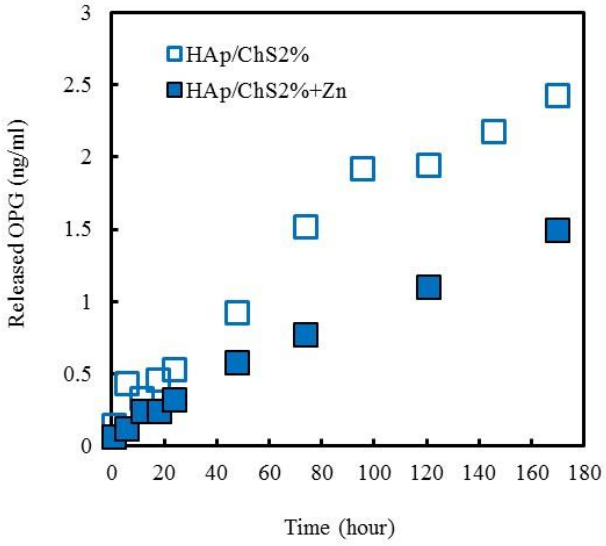


Fig. 3-7 Zn 添加による OPG の放出挙動の変化
（OPG 担持量：0.4 μg/mg）

Fig. 3-8 に，Fig. 3-7 よりも更に担持量の高い製剤化粒子（HAp/ChS）の OPG 放出挙動を示す（担持量：8.0 μg/mg）．また，Zn 添加量を変化させた時（$ZnCl_2$ 添加量 ; 0.00, 0.06, 0.14, 0.30 and 0.60 mg/mg（ ; $ZnCl_2$／粒子））の OPG 放出挙動の変化も示す．OPG の担持量は最大 8.0 μg/mg となるように OPG 水溶液の濃度を調整してあるが，どの粒子も溶液中の OPG が 99%以上の割合で粒子に担持されていた．

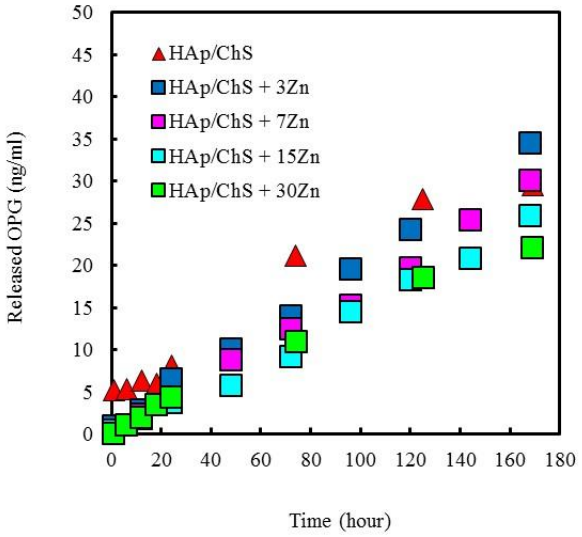


Fig. 3-8 Zn 添加量を変化させたときの HAp/ChS
製剤化粒子からの OPG の放出挙動

Zn を添加していない製剤化粒子では投与 1 時間後で 5 ng/ml 程度の放出を認め, その後継時的なの放出量の増加を認めたが直線的な増加ではなく, モノリシック型の放出挙動に一致していた．Higuchi 式を用いた解析では K_H=2.42 であった．一方，Zn を添加した製剤化粒子では初期の放出が抑えられるだけでなくその後直線的に放出量が増加する, リザーバー型の放出挙動を示した.

また，添加した Zn の量が上昇するにつれて直線的な放出量の増加を維持しつつ放出速度が低下した．$ZnCl_2$ 添加量が 0.06, 0.14, 0.30 and 0.60 mg/mg（：$ZnCl_2$／粒子）に対応する放出近似直線の近似式（y: 放出量，x: 徐放期間）およびその相関係数（R^2 値）を算出したところ，それぞれ y=0.2048x, R^2=0.9955，y=0.1735x, R^2=0.9948，y=0.1487x, R^2=0.9916 and y=0.1391x, R^2=0.9875 であり, どの製剤粒子においても精度の高い直線性が得られた．また，Zn 添加量の減少に従って，放出量増加の直線性を失うことなく近似直線の傾きが増加した（つまり放出速度が増加した.）．この結果から，$ZnCl_2$ 添加量は 0.06 mg/mg まで減少させても初期バーストが観測されず, 1 次直線的な放出量の増加を示すことがわかった．Fig. 3-9 に，OPG の放出速度と添加した Zn 量との相関を示す．Zn の添加量が増加するほど放出側とは低下する傾向が得られた．Table 3-3 に各粒子の担持量および放出速度定数を示す.

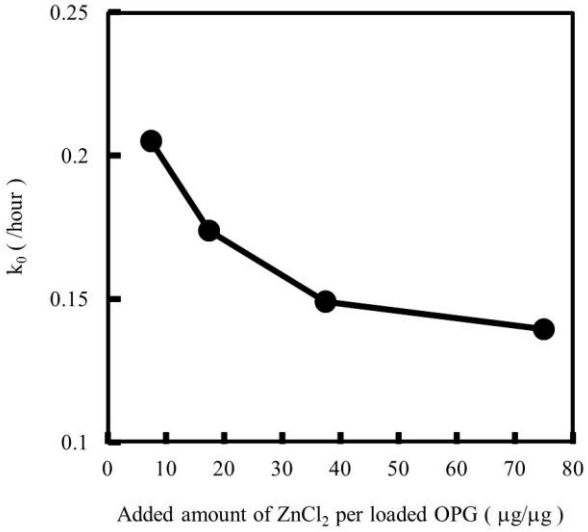


Fig. 3-9 製剤化処理時の Zn 添加量と多孔質微粒子からの OPG 放出速度との関係

Table 3-3 OPG 担持粒子の担持量・放出速度変数および放出タイプ

Microparticle	Protein loading (μg/mg)	Encapsulation efficiency (%)	K_H ($h^{-1/2}$)	K_0 (h^{-1})	Release Type
			R^2	R^2	
HAp/ChS	8.0	100	2.4×10^{0}	1.7×10^{-1}	Monolithic
			0.969	0.953	
HAp/ChS + 3Zn	8.0	100	2.6×10^{0}	2.0×10^{-1}	Reservoir
			0.905	0.997	
HAp/ChS + 30Zn	8.0	100	1.7×10^{0}	1.3×10^{-1}	Reservoir
			0.975	0.992	

Fig. 3-10 に，Zn を用いた製剤化粒子における HAp と HAp/ChS との放出挙動の比較を示す（担持量：8.0 μg/mg）．HAp と HAp/ChS では，OPG の放出挙動に有意な変化を認めなかった．

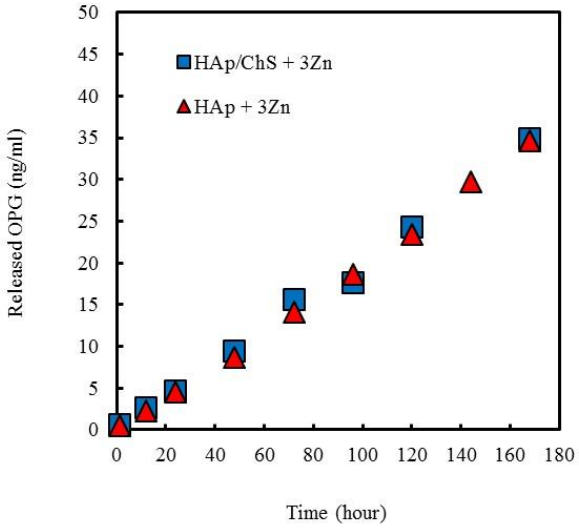


Fig. 3-10 pure HAp と HAp/ChS との間における OPG 放出挙動の比較

以上の結果から，OPG の放出速度は OPG の担持量および Zn の添加量を変化させるだけでなく製剤化粒子の投与量を調節することで，OPG の効果が十分に発揮される濃度範囲（ED_{50}：8-24 ng/ml）に到達・維持できる可能性が示唆された.

３．３．５．単回投与されたラットの OPG の血中濃度変化

Fig. 3-11 にラットへ投与する 2 種類の製剤化粒子の OPG 担持量を示す．溶液中の OPG および $ZnCl_2$ が 100%吸着されたとき，1mg 粒子あたりの OPG の担持量は 80 μg/mg，Zn イオンは 29.4 μg/mg となる．どちらの製剤化粒子も担持量は 79.5 μg/mg 以上であり溶液中の OPG の 99%以上が粒子に担持された．製剤化処理時に Zn を添加することで担持量が若干増加した.

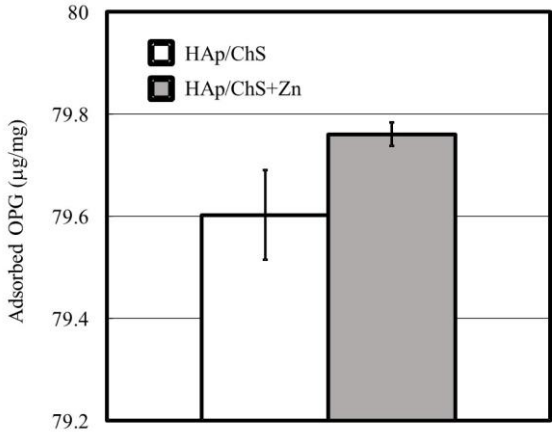


Fig. 3-11 製剤化処理後の HAp/ChS 多孔質微粒子
に対する OPG の吸着率（n=3）

Fig. 3-12 に製剤化粒子をラットの皮下に単回投与したときの血中濃度の推移を示す．Zn を添加していない製剤化粒子では投与 1 日目にして血中濃度が 385.97±62.50 ng/ml まで上昇するが，2 日目以降ではその 1/4 程度まで低下しその後も低下傾向を示した．7 日目では，血中濃度は 28.36±3.98 ng/ml まで低下した．一方，Zn を添加した製剤化粒子では投与 1 日目の血中濃度は 138±16.98 ng/ml までに抑えられ，4 日目までその血中濃度が 100-150 ng/ml 程度で維持されていた．しかし，7 日目には血中濃度は急激に低下し，Zn を添加していない粒子よりも低い血中濃度となった．

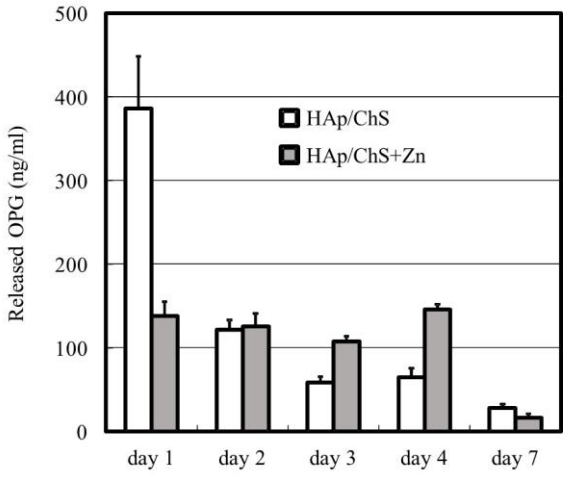


Fig. 3-12 ラット背部に皮下投与した多孔質微粒子からの OPG の放出挙動（n=5）

Fig. 3-13 に製剤化粒子をラットの腹腔内に単回投与したときの血中濃度の推移を示す．投与 1 日後において，製剤化粒子からの OPG 放出量は皮下投与の結果とは逆に Zn を用いた製剤化粒子の方が高い放出量を示した．また，皮下投与した場合と比べてどちらの製剤化粒子も高い OPG 放出量を示した．Zn を用いた製剤化粒子では投与 1 日後で 1381.90±60.88 ng/ml，Zn を用いていない製剤化粒子では 1133.64±71.71 ng/ml であった．投与 2 日後で血中濃度は共に 1 日後の半分以下まで低下した. 以降は時間経過とともに血中濃度が低下し, 両者とも投与 7 日後で血中濃度は Zn を用いた製剤化粒子では 0.85±0.32 ng/ml, Zn を用いていない製剤化粒子では 0.514±0.056 ng/ml まで低下した.

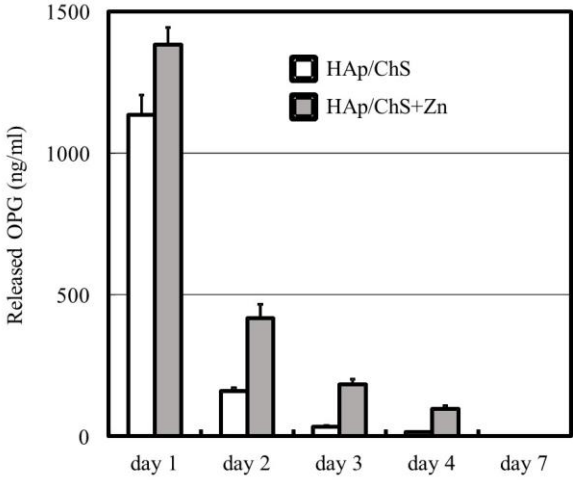


Fig. 3-13 ラットに腹腔内投与した多孔質微粒子からの OPG の放出挙動（n=5）

Fig. 3-14, 3-15 にラットの皮下もしくは腹腔内に OPG 水溶液のみを単回投与したときの血中濃度の推移を示す．多孔質微粒子に担持されていない OPG では，皮下投与 6 時間後（最高血中濃度到達時間：T_{max}）で血中濃度が 1465.8±215.8 ng/ml（最高血中濃度：C_{max}）と最大となり，その後 18 時間経過（半減期：$T_{1/2}$）して血中濃度が 799.8±122.4 ng/ml と半分に低下した．投与 24 時間後（1 日目）の血中濃度は Fig. 3-11 に示すように Zn を添加していない製剤化粒子よりも高い値を示した．

一方，腹腔内に投与した場合は，投与 4 時間後で血中濃度が 26422±7766.9 ng/ml 程度まで上昇し，その後 20 時間経過して血中濃度が 603.2±145.6 ng/ml まで減少した．すなわち，腹腔内に投与された OPG は，速やかに血中へ移行して 24 時間以内にほとんどの OPG が代謝された．

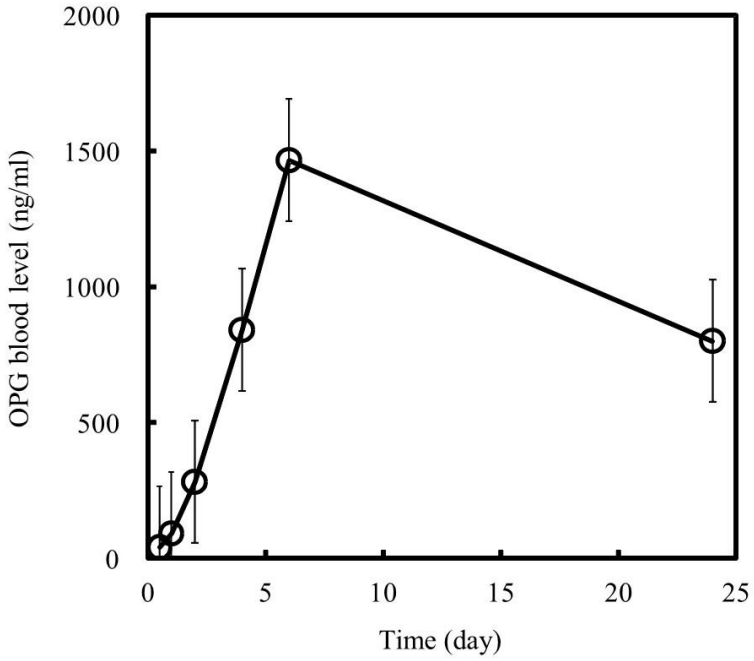


Fig. 3-14 OPG 溶液のみをラットの皮下に単回投与した時の
OPG の血中濃度

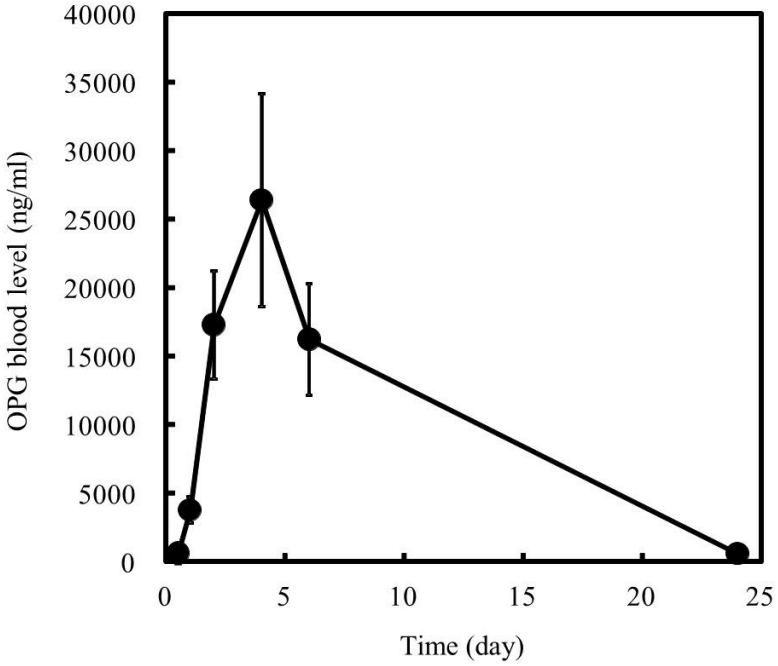


Fig. 3-15 OPG 溶液のみをラットの腹腔内に単回投与した時
の OPG の血中濃度

３．４．考察

３．４．１．BMP-2 放出特性

HAp/ChS 粒子はそれ自体で骨形成能を有しているため[17]，骨修復用徐放製剤に適している．Zn を用いた製剤化処理により，BMP-2 の初期バーストが抑制され，1 週間に渡る徐放を認めた．これは，Zn が BMP-2 と強く相互作用していることを示唆する．Zn を吸着させた HAp/ChS 粒子からも，PBS 中で ChS が溶出される（第 2 章参照）． BMP-2 の ED_{50} は 0.3-1.0 μg/ml であるため，粒子の生分解速度に合わせて BMP-2 担持量・製剤粒子添加量を変化させれば，ED_{50} に合わせた薬物の徐放が期待できる．

骨組織中の ChS は石灰化・骨修復を促進することが報告されており[18]，細胞質・細胞の分裂において重要な役割を果たしている[19]．XH Zou らは，培養系で ChS の添加により線維芽細胞の増殖が促進されたことを報告している[20]．しかし，コンドロイチナーゼにより分解された後では，このような増殖促進は見られなかった．これらの報告は，骨の無機主成分である HAp と ChS との併用により骨修復能が向上する可能性を示唆している．in vivo で，体液中に溶出された ChS は成長因子を介した骨修復を促進する一方，粒子内の ChS はタンパク質の活性を保持することが期待される．HAp/ChS を DDS 製剤として設計後，骨欠損部等もしくは他の患部に直接注射投与し，その場の生体内環境を利用して効率よく骨組織再生が起こることを狙う．

３．４．２．FGF-2 放出特性

Zn を使用した製剤化粒子は, Zn を使用しなかった製剤化粒子よりも低い放出量を示したことから，Zn^{2+}が FGF-2 の放出を抑制していると考えられる．Zn を使用しなかった製剤化粒子では，時間経過に従って FGF-2 放出量が減少したのに対し，栓塞粒子では時間経過に伴った放出量の減少が見られなかった．Zn^{2+}は，タンパク質の構造安定化因子であることから，放出された FGF-2 の構造を安定化している可能性がある．一方，栓塞処理した HAp と HAp/ChS では，HAp/ChS の方が高い放出量を示した．これは，FGF-2 が ChS と結合したまま放出されたが，もしくは Zn^{2+}添加による気孔内の電荷バランスが中性に傾いて FGF-2 の気孔内拡散が亢進したために，放出量の増加に繋がったと考えられる．FGF-2 の ED_{50} は 0.5 ng/ml である．BMP-2 と同様に ED_{50} に合わせて FGF-2 担持量・製剤粒子添加量を調整して放出速度を最適化できることが示唆された．

GAG と FGF-2 との相互作用は GAG の硫酸化度と関連することが報告されている. 様々な GAGs による FGF-2 の酵素分解への影響を検討したところ，ヘパリン＞ヘパラン硫酸＞デルマタン硫酸＝ChS＞ヒアルロン酸の順に分解の阻害率が減少した[21]. これは, GAG の硫酸化度が高い程 FGF-2 との相互作用が強まることを示唆する．また，ChS による FGF-2 の細胞増殖能の促進も報告されている．ラット終脳から精製した ChS を神経幹細胞の培養系に添加したところ，FGF-2 を介した神経幹細胞増殖の促進が見られた[22]．これらの結果は，神経組織の再生において，FGF-2 と ChS の併用による薬物徐放化の有用性を示している．実臨床では，大腿骨頭壊死症に対して FGF-2 を担持させたゼラチンハイドロゲルを数 cm の皮膚切開にてレントゲン透視像で局所投与したところ骨頭壊死部分の骨再生が得られている[23].

３．４．３．HAp/ChS 多孔質微粒子への OPG の吸着メカニズム

OPG の吸着等温線に示すように，HAp/ChS 粒子は pure HAp 粒子よりも OPG の吸着量が低かった. 言い換えると, ChS の介在により粒子の OPG に対する吸着特性は低下した. 理論モデルを用いた吸着特性の評価を行ったところ，どちらの粒子も Langmuir 型に従っており，OPG に対して非常に高い吸着親和力を示した．この結果から，OPG は多孔質微粒子の気孔内の HAp/ChS ナノ複合体表面において，エネルギー的に均一な単分子層吸着されることがわかった．また，HAp/ChS 多孔質微粒子が OPG に対して強い親和力を有する点は，HAp/ChS 多孔質微粒子からの OPG の長期間の徐放特性を示唆する結果である. なお，製剤化処理では，Zn を添加することで吸着量がさらに向上した.

３．４．４．Zn 介在による HAp/ChS 多孔質微粒子からの OPG 放出への影響

本実験で用いた OPG は，Sf21 細胞で発現させた遺伝子組換え型 OPG-Fc 及び CHO 細胞で発現させて精製した遺伝子組換え型 OPG であり，発現させた細胞が異なる.

OPG-Fc では, Zn を用いていない製剤化粒子において HAp と HAp/ChS とで放出特性に若干の違いが見られた．HAp は HAp/ChS よりも初期（24 時間後）の放出量が高い反面その後の放出量に関しては HAp/ChS の方がわずかながら高い放出量を示した．第 2 章で示したように，HAp/ChS は PBS 中に浸漬させるとある程度の ChS が溶出される．粒子から OPG だけでなく ChS も同時に放出されることで，1 週間の間の放出挙動にわずかながら

影響を与えた可能性がある．その一方で，Zn を用いた製剤化粒子においては，HAp と HAp/ChS とでは放出速度に有意な差は認められなかった．Zn は OPG の放出に対して支配的に影響していると考えられる．

また，担持量の増加に従って放出量も増加した．さらに，$ZnCl_2$ の添加量を 0.06 mg/mg（；$ZnCl_2$／粒子）にまで抑えた系でも初期バーストなく放出量の直線的な増加が見られた．これらの結果から，OPG の ED_{50}（：8-24 ng/ml）合わせた薬物供給の実現可能性が示唆された．

試験管内での製剤化粒子からの OPG 放出挙動は, Zn を添加していない製剤化粒子では投与 1 時間後である程度の OPG が放出されその後の放出が維持されたものの OPG の一定放出は認めなかった．これは，モノリシック型の放出挙動を示しており，Higuchi 式に従っていた．一方，Zn を添加すると投与 1 時間後の OPG の放出が抑えられつつその後の一定放出を 1 週間認め，粒子量と放出量の正の相関が見られた．すなわち，リザーバー型の放出挙動を示した．さらに，1 週間での放出率は 1%未満と微量であった．これは，OPG の吸着等温線の解析で HAp/ChS 多孔質微粒子が非常に高い親和力を示している点と相関する結果である．pure HAp の方が HAp/ChS よりも高い吸着親和力を示していたが，放出速度に大きな差は認めなった．そして，Zn を用いた製剤化粒子では，Fig. 3-8 に示すように，$ZnCl_2$ の添加量が 0.06 mg/mg の場合は初期の放出量が抑えられるものの，1 週間後の放出量は Zn を用いていない製剤化粒子よりも高い放出量を示した．しかし，Zn の添加量を更に増やすと OPG の放出速度は低下した．これは，多孔質微粒子からの OPG の放出をコントロールできる可能性を示唆する結果であり, Zn イオンの OPG との相互作用および気孔内拡散制御によるものと考えられる．

３．４．５．ラットへ投与された製剤化粒子からの OPG 放出

OPG 水溶液をラットの皮下に投与した場合の半減期は 24 時間程度であり OPG 単独の投与では血中濃度を維持させることは困難である．Zn を添加していない製剤化粒子を皮下投与したところ，投与 24 時間後の血中濃度は 400 ng/ml で OPG 水溶液を投与した場合よりも抑えられたもののその後時間の経過とともに血中濃度は低下した．

Zn を用いた製剤化粒子では，その初期バーストが 138 ng/ml まで軽減され，投与 4 日目まで血中濃度が 100 ng/ml 程度まで維持されていた．体重 270g のラットの循環血液量は

およそ 17.28ml である．これはラットの 1g あたりの平均循環血液量が 64 ml/kg であることから計算される[24]

．これに基づいてラットの循環血液量を計算し，投与 1 日目で製剤化粒子から放出された OPG の総量を OPG の血中濃度から算出すると，Zn を用いた製剤化粒子では 2.38μg (0.055%)で，Zn を用いていない製剤化粒子では 6.67μg (0.16%)であった（これは OPG の生体内代謝を考慮に入れていない）．この結果は，試験管内の OPG 放出試験の結果と相関する．

しかし, ラットへの皮下投与試験では投与 7 日目にして血中濃度の急激な低下を認めた. OPG の血中濃度から計算しても投与 7 日目で製剤化粒子に担持された OPG の全てが放出されたとは考えにくい．投与後 7 日目にして放出速度が低下したか，もしくは OPG の代謝が製剤化粒子からの OPG の放出速度を上回ったためと考えられる．ラット体内における製剤化粒子からの OPG 放出特性を明らかにするためには，サンプル数を増やしてより長期の血中濃度の推移を評価する必要がある．

一方，ラットへの腹腔内投与においては，投与 1 日目から血中濃度が Zn を用いた製剤化粒子では投与 1 日後で 1381.90±60.88 ng/ml, Zn を用いていない製剤化粒子では 1133.64 ±71.71 ng/ml であった．これをラットの循環血漿量から粒子から放出された量を算出したところ，Zn を用いた製剤化粒子では 0.55%，Zn を用いていない製剤化粒子では 0.46%で同等の放出量であったが，4 日間では Zn を用いた製剤化粒子の方が高い血中濃度で推移していた．粒子に担持された OPG のうち放出された割合はどちらも 1%未満であったものの，投与 1 日目から血中濃度が急激な上昇であった．腹腔内投与においては Zn を用いることで初期バーストは抑制されなかった. その原因となるデータは得られていないが, 本製剤化粒子は腹腔内のような体液が貯留するような cavity への投与には適していないことが示唆された.

OPG 水溶液を皮下に投与した場合, 皮下に存在する OPG はゆるやかに血中に移行する. しかし，腹腔内に投与した場合は，腹腔内の OPG は速やかに血中濃度に移行して血中濃度が著しく上昇する．その後の 24 時間以内にほとんどの OPG が代謝されてしまう．

OPG を担持した HAp/ChS 多孔質微粒子は，人工関節周囲の骨溶解（osteolysis）や応力遮蔽（stress shielding）による骨吸収の予防に役立つと期待できる．osteolysis は，ポリエチレン摺動部を用いた人工股関節置換術では摩耗粉に対する異物反応により生じる. これ

は，力学環境変化への反応を主とする stress shielding とは病態が異なる．Osteolysis では病変部に多数のサイトカインや細胞増殖因子が産生されており, RANKL/OPG 比が有意に上昇していることがわかっている[25]．つまり，骨吸収が亢進した状態であるため，骨吸収抑制作用を有する OPG の全身もしくは局所投与によって予防できる可能性がある．人工股関節置換術後にビスフォスフォネート製剤を投与して stress shielding によるステム周囲骨量減少の抑制効果が示されている[26-30]．B. Peter らは，インプラント周囲にゾレドロン酸を投与することでインプラント周囲の機械的固定性が向上したことを報告している．HAp でコーティングしたインプラントにビスフォスフォネートの一種であるゾレドロン酸を投与したところ, ゾレドロン酸の投与量が高いほどインプラント周囲の骨密度が上昇した[31]．ビスフォスフォネートは OPG と同様に骨吸収抑制薬で類似した作用機序を有しているため，OPG でも同様の効果が期待できる．本研究では，OPG 担持製剤化粒子の局所投与は行っていないため, 髄腔内に局所投与してステム挿入するモデルで行うことが今後の課題とされる．

Zn は骨形成促進因子として生理的に重要な役割を果たしている．血清中の Zn 濃度は $1.0\text{-}1.2\times10^{-4}$M である．この濃度で骨組織を培養すると，骨組織中の Ca 量，骨石灰化促進酵素のアルカリホスファターゼ活性や骨基質タンパク質のコラーゲン量が増大し, 骨石灰化が増進される[32]．これは，微量の Zn が骨タンパク質の合成を増進させるためと考えられている．Zn は骨芽細胞のタンパク質合成翻訳過程の律速酵素であるアミノアシル－tRNA 合成酵素を活性化し，アミノ酸－tRNA の形成を促進し，タンパク質合成を促進させる[33]．また，Zn は骨芽細胞のタンパク質分子を増加させる．中でも，骨代謝に重要なオステオカルシン・インスリン様成長因子・トランスフォーミング成長因子などの産生増大を引き起こす[34].

Zn は骨吸収を抑制する作用も有している. マウス骨髄細胞培養系において Zn を添加すると，副甲状腺ホルモン・活性型ビタミン D3・インターロイキン 1a・リポ多糖類などの骨吸収促進因子により骨髄細胞から破骨細胞様細胞への形成が抑制された[35]．骨髄細胞から破骨細胞への分化の過程で，Zn は RANKL の作用を抑制すると考えられている[36]．これらの結果は Zn と細胞増殖因子・サイトカインの相乗効果を示唆し，HAp/ChS 粒子からタンパク質と Zn イオンが同時に徐放されることで効率的な骨再生・骨修復が期待される．なお，第 2 章で示したように，Zn を用いた製剤化粒子からの Zn の放出量は吸着した

Zn イオンのうち 1 週間で 0.1%未満しか放出されないことがわかっている. OPG による代謝調節効果だけでなく，徐放された Zn イオンによる薬理効果も期待できる.

以上から，OPG を担持した製剤化粒子は骨粗鬆症・多発性骨髄腫・白血病などの全身性疾患に対して臨床応用できる可能性を秘めている．また，本動物実験では局所投与ではなく皮下投与で試験を行った．OPG が転移性骨腫瘍・インプラント周囲骨融解・骨粗鬆症性骨折などの局所疾患の治療にも効果が発揮できる可能性を考えると, 今後局所投与においても検討する必要がある.

３．５．結言

HAp/ChS 多孔質微粒子は，製剤化処理時に Zn の添加量を変化させることで OPG の放出制御に成功し，ラットへの全身投与にて血中濃度を維持できる可能性を示した.

参考文献

[1] 立石哲也・田中順三，図解再生医療工学，工業調査会，p56. 2004.

[2] C.A. Kirked-Head, Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins, Adv. Drug Deliver Rev. 43, p65-92, 2000.

[3] I. Seto et al. Reconstruction of the primate mandible with a combination graft of recombinant human bone morphogenetic protein-2 and bone marrow, J. Oral Maxillofac Surg. 59, p53-61, 2001.

[4] E. Marukawa et al. Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2, J. Oral Maxillofac Surg. 31, p287-295, 2002.

[5] N. Saito et al. A biodegradable polymer as a cytokine delivery system for inducing bone formation, Nature biotechnol. 19, p332-335, 2001.

[6] J.O. Hollinger et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 and collagen for bone regeneration, J Biomed. Mater. Res. 43, p356-364, 1998.

[7] D.L. Wheeler et al. Radiomorphometry and biomechanical assessment of recombinant human bone morphogenetic protein 2 and polymer in rabbit radius ostectomy model, J. Biomed. Mater. Res. 43, p365-373, 1998.

[8] Z. Renwen et al. Ectopic bone formation using osteogenic protein-1 carried by a solution precipitated hydroxyapatite, J. Biomed. Mater. Res. 71A, p412-418, 2004.

[9] Y. Tabata et al. Growth factor release from amylopectin hydrogel based on copper coordination, Journal of Controlled Release Dec 4;56(1-3), p135-148, 1998.

[10] V. Midy et al. Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate, J. Biomed. Mater. Res. 41, p405-411, 1998.

[11] W. S. Simonet et al., Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density, Cell, Vol. 89, p309-319, April 18, 1997.

[12] 菅村和夫・宮園浩平・宮澤恵二・田中伸幸，サイトカイン・増殖因子用語ライブラリー，羊土社，p115-117. 2005.

[13] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis. American Journal of Pathology, 163(5), 2003.

[14] Roland Baron & Michaela Kneissel, WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments, nature medicine Vol. 19 | Number 2 | February 2013.

[15] Schmalzried TP, Callaghan JJ., Wear in total hip and knee replacements, Journal of Bone Joint Surgery AM : 81, p115-136, 1999.

[16] M. Sandor et al. A Novel Polyethylene Depot Device for the Study of PLGA and P(FASA) Microspheres *in Vitro* and *in Vivo*, Biomaterials 23 (22) p4413-4423, 2002.

[17] Omi H, Itoh S, Ikoma T, Asou Y, Nishikawa S, Tanaka J, Shinomiya K, Toh S. Biocompatibility and Soteoconductivity of Hydroxyapatite/Polysaccharide Nanocomposite Microparticles. Key Engineering Materials, 309-311, p561-564, 2006.

[18] J.P. Bali et al. Biochemical basis of the pharmacologic action of chondroitin sulfates on the osteoarticular system, Seminars in Arthritis and Rheumatism 31 (1), p58-68, 2001.

[19] S. Mizuguchi et al. Chondroitin proteoglycans are involved in cell division of Caenorhabditis elegans, Nature 22 423 (6938) p443-448, 2003.

[20] XH Zou et al. Chondroitin sulfate in palatal wound healing, Journal of Dental Research 83 (11), p880-885, 2004.

[21] D. Coltrini et al. Biochemical bases of the interaction of human basic fibroblast growth factor with glycosaminoglycans. New insights from trypsin digestion studies, European Journal of Biochemistry 214 (1), p51-58, 1993.

[22] M. Ida et al. Identification and functions of chondroitin sulfate in the milieu of neural stem

cells, J. Biol. Chem. 281 p5982-5991, 2006.

[23] Kuroda Yutaka et al. A pilot study of regenerative therapy using controlled release of rhFGF-2 for patients with precollapse osteonecrosis of the femoral head, International Orthopaedics. 40, p1747–1754, 2016.

[24] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology, 21; p15-23, 2001.

[25] Grimaud E, Soubigou L, Couillaud S, Coipeau P, Moreau A, Passuti N, Gouin F, Redini F, Heymann D. Receptor Activator of Nuclear Factor B Ligand (RANKL)/Osteoprotegerin (OPG) Ratio Is Increased in Severe Osteolysis. American Journal of Pathology 2003: 163(5).

[26] Yamasaki S et al. Risedronate reduces postoperative bone resorption after cementless total hip arthroplasty, Osteoporos Int 18, p1009-1015, 2007.

[27] Trevisan C et al. Decreased periprosthetic bone loss in patients treated with clodronate: a 1-year randomized controlled study, Calcif Tissue Int 86: p436-446, 2010.

[28] Wilkinson JM et al. Effect of pamidronate in preventing local bone loss after total hip arthroplasty: a randomized, double-blind, controlled trial, Journal of Bone Mineral Research 16, p556-564, 2001.

[29] Arabmotlagh M et al. Alendronate prevents femoral periprosthetic bone loss following total hip arthroplasty: prospective randomized double-blind study, Orthopaedic Research 24, p1336-1341, 2006.

[30] Iwamoto N et al. A comparison of the effects of alendronate and alfacalcidol on bone mineral density around the femoral implant and in the lumbar spine after total hip arthroplasty, Journal of Bone Joint Surgery Amerilcan 93, p1203-1209, 2011.

[31] Peter B, Pioletti DP, Laib S, Bujoli B, Pilet P, Janvier P, Guicheux J, Zambelli PY, Bouler JM, Gauthier O. Calcium phosphate drug delivery system: influence of local zoledronate release on bone implant osteointegration. Bone 36, p52-60, 2005.

[32] M. Yamaguchi et al. Stimulatory effect of zinc on bone formation in tissue culture, Biochem. Pharmacol. 36, p4007-4012, 1987.

[33] M. Yamaguchi et al. Zinc stimulation of bone protein synthesis in tissue culture. Activation of aminoacyl-tRNA synthetase, Biochem. Pharmacol. 37, p4075-4080, 1988.

[34] M. Yamaguchi et al. Effect of beta-alanyl-L-histidinato zinc on protein components in osteoblastic MC3T3-El cells: increase in osteocalcin, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-beta, Mol. Cell Biochem. 136, p163-169, 1994.

[35] S. Kishi and M. Yamaguchi, Inhibitory effect of zinc compounds on osteoclast-like cell formation in mouse marrow cultures, Biochem. Pharmacol. 48, p1225-1230, 1994.

[36] 鈴木肇, 治療 7 特集 日常臨床で知っておきたい微量元素の知識, 南山堂, p1964-1969, 2006.

第４章

骨形成促進薬と多孔質微粒子を用いた骨再生

４．１．緒言・目的

これまでに，難治性骨折・巨大骨欠損に対して細胞増殖因子を用いた薬物治療の研究が行われているが，その血中濃度を制御できないがために様々な問題点が残されている．特に，骨形成因子（bone morphogenetic protein: BMP）は強力な骨形成促進作用があるため骨折治癒促進への臨床応用が期待されていたが，局所濃度が高すぎると異所性骨化を起こして炎症反応を惹起する危険性も指摘されていた．そこで，β-tricalcium phosphate（β-TCP）[1]や HAp[2]の多孔質体を担体として BMP を担持させて骨欠損モデルに投与したときの有用性が報告されている．しかしながら，生物種によって細胞増殖因子に対する感受性が大きく異なる点が臨床応用への弊害となっている．

一方，ホルモン投与による骨折治癒促進効果も報告されている．副甲状腺ホルモン（parathyroid hormone: PTH）は，Ca イオンを骨から血中へ移行させる作用を持つが，これを間欠的に連日皮下投与すると骨密度の上昇作用を有するため[3]，骨粗鬆症治療薬として本邦でも承認されている．また，骨折治癒促進効果も有しており[3]，日常臨床において術後の骨折治癒促進を目的として用いることもある．しかしながら，連日の皮下投与による患者への負担がかかるだけでなく，非常に高額であることから入院中の患者に対して投与するにあたって保険診療上の問題点が残されている．

そこで，世界初の骨形成促進作用を有する完全ヒト型モノクローナル抗体である抗 Sclerostin 抗体（anti-sclerostin monoclonal antibody: Sclmab）は，高い骨密度上昇作用を有しており新しい骨粗鬆症治療薬として注目されている[4]．また，骨形成促進作用も有しているため，骨折治癒促進も期待できる．ただし，第 1 章の１．２．でも述べたように，局所の疾患に対して抗体医薬を用いて十分な効果を得るためには大量かつ頻回の投与が必要となるため，局所の投与が望ましい．我々の知る限りでは，Sclmab を担持した放出制御担体を骨組織に局所投与した報告はないようである．第 2 章で，我々は HAp/ChS 多孔質微粒子に抗体医薬の基本単位である IgG を担持させて Zn を用いて製剤化処理することで，その放出を制御できることを明らかにした．そのため，Sclmab でも同様に多孔質微粒子に担持させて Zn を用いて製剤化処理を行うことで，その放出制御ができるだけでな

く動物学実験でも骨量上昇効果をもたらす可能性がある．

本章では，Sclmab を担持した HAp/ChS 多孔質微粒子（ChS 含有量 : 2wt%）をラット大腿骨骨孔に投与して周囲の骨組織の定量・定性評価を行った．また，Zn を用いた製剤化技術が骨組織での Sclmab の放出により骨量変化に与える効果についても検討した．

４．２．実験方法

４．２．１．多孔質微粒子への Sclmab の担持・製剤化

Charles River Laboratories より 7 週齢の牡ラット（F344）を購入した．本動物実験は東京医科歯科大学動物実験センターの倫理委員会の承認を得ている．ラットは室温 22℃で 12 時間ライト点灯下でケージ内環境($25 \times 30 \times 60$ cm^2)で予め 1 週間飼育した．

HAp/ChS 多孔質微粒子を予め線量 25kGy でガンマ線滅菌（コバルト照射）した．Sclmab は BioRad Laboratories Inc より購入したものでサブクラスは IgG_{2a} である．20mg の HAp/ChS 粒子を 5ml の Sclmab 水溶液（NS で希釈，濃度 : 20 μg/ml）に添加して室温で 4 時間転倒攪拌した．続いて，37.5μL の $ZnCl_2$ 水溶液（1 mg/mL, pH5.5）を添加して更に２時間転倒攪拌した．遠心分離（3500rpm, 10min）して上澄み液をエッペンドルフで可能な限り除去し，沈殿物に 5mL の蒸留水を加えてボルテックスで分散し再び遠心分離した．上澄み液を可能な限り除去し沈殿物に 40μL の NS を添加して製剤化粒子と NS の混合液を作成した．以下よりこのサンプル名を HAp/ChS + Sclmab + Zn と称する．なお，Zn を添加しないサンプル名は HAp/ChS + Sclmab と称する．Sclmab の担持量は全て担持された場合 4.0 μg/mg となる．

４．２．２．ラット大腿骨骨孔への製剤化粒子の投与試験

笑気麻酔下のラットの両側大腿部を 2cm 程度で皮膚切開して皮下組織を剥離して大腿筋膜を同定した．次に，大腿筋膜を切開して大腿筋を鈍的に剥離して大腿骨遠位部を露出させた．Fig. 4-1 のように，大腿骨遠位端より 5mm 近位部の外側の皮質をドリリングし，直径 1.5mm，深さ 5mm 程度の骨孔を作成した．骨粉を除去するため NS で骨孔内を洗浄し，気孔内に各サンプルと 10μl の NS との混合液を高粘度液体用ピペット(Microman E® GILSON)を用いて投与して骨孔を bone wax で閉鎖した．なお，骨孔から持続的な出血が生じるため，キムワイプで 2 分間程度圧迫止血してから投与した．その後，筋膜・表皮を順にナイロン糸で縫合して閉創した．各群は以下のように設定する．

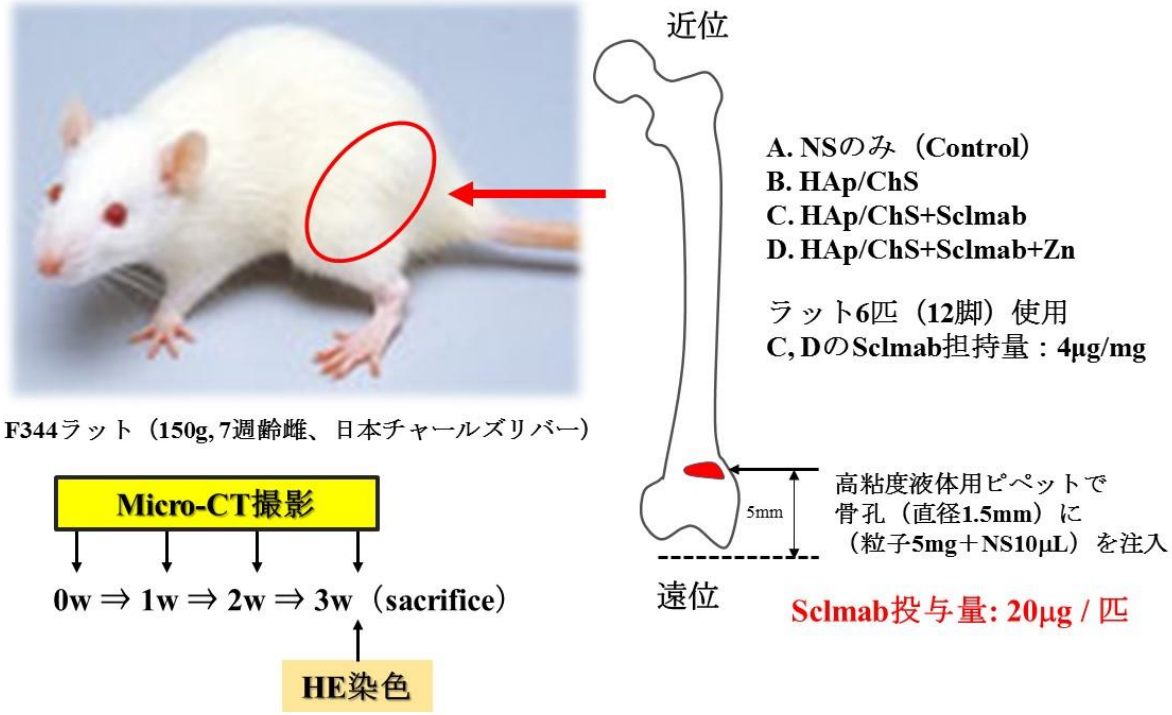


Fig. 4-1 ラット大腿骨への製剤化粒子の単回投与実験方法および画像評価

A 群：NS (10μl)

B 群：NS (10μl) + [HAp/ChS (5mg)]

C 群：NS (10μl) + [HAp/ChS + Sclmab (5mg)]

D 群：NS (10μl) + [HAp/ChS + Sclmab + Zn (5mg)]

閉創直後，および投与 1，2，3 週間後それぞれにおいて大腿骨の骨孔周囲のμCT 撮影を行

った. 投与 3 週間後に屠殺して骨孔周囲の組織を採取して脱灰して切断面の hematoxylin and eosin （HE）染色を行った．各群から無作為に 10 個の HE 染色写真を抽出し，ImageJ を用いて画像解析処理を行い骨量を評価した．骨量評価においては，多重比較検定（Dunnett 法，Steel-Dwass 法）[5]により有意差検定を行った．

４．３．結果

Fig. 4-2 に，製剤化粒子を投与したラット大腿骨孔周囲における投与直後と投与 3 週間後の代表的なμCT 写真（矢状断）を示す．全群において片側皮質に作成した骨孔は対側皮質まで貫通せず骨端線より近位に骨孔を作成できていることが確認された. 大腿骨辺縁の白色調の強い部分は皮質骨であり髄腔は比較的黒色を示している. 投与 3 週間後の写真では，A 群，B 群は骨孔の髄腔側の辺縁には若干の骨硬化を認めたが，C 群，D 群は欠損部の辺縁に A 群，B 群よりやや強い骨硬化像を認めた．骨孔内には骨誘導を示唆するような新生骨の形成は認めなかった．皮質骨の厚みはどの群も大きな差は認めなかった．製剤化粒子だけでなく担体のみを投与した群全てで観察期間において明らかな骨吸収像は認めなかった．また，全群において観察期間中の新規骨折は認めなかった．

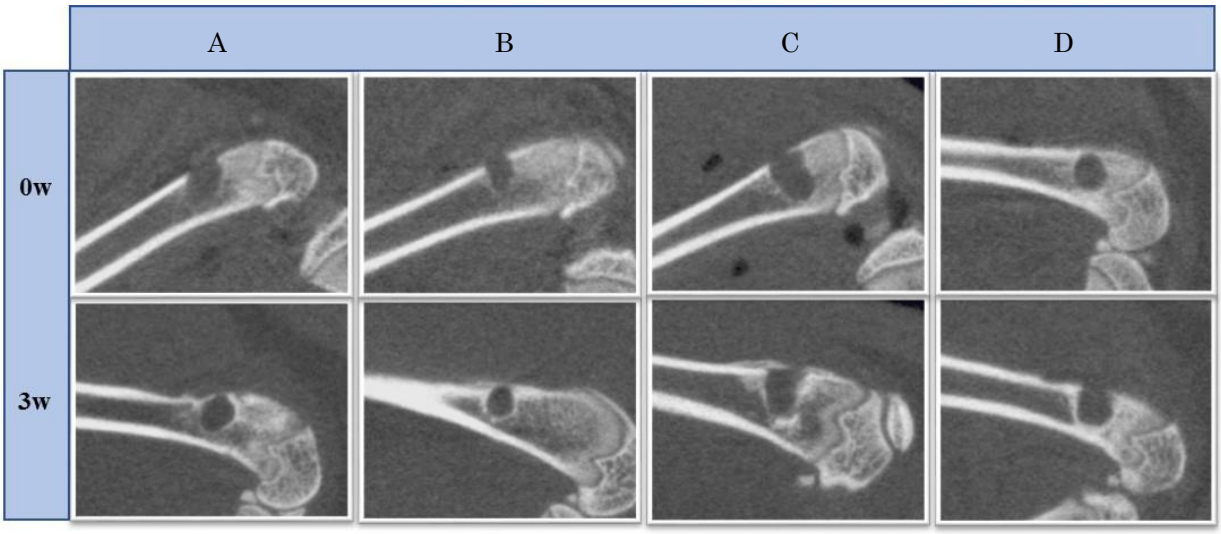


Fig. 4-2 製剤化粒子を投与して 3 週間後のラット大腿骨孔のμCT 写真

Fig. 4-3 に，製剤化粒子を投与して 3 週間後における大腿骨骨孔周囲の HE 染色写真を示す．拡大写真を観察したところ，単球・貪食細胞など炎症細胞の増殖・遊走を示唆する所見は認めなかった．また，破骨細胞の増殖を示唆する所見も認めなかった．手術中，気孔作成時に骨髄からの出血があったが，血腫の残存を示唆する所見は認めなかった．気孔内（欠損部）には新生骨の形成は確認されなかった．これは Fig. 4-2 の写真と一致する所見であった．しかし，全群において，骨孔周辺の骨髄側は新生骨（類骨）の形成，欠損側は繊維組織の増生を認めた．さらに，類骨周囲に骨芽細胞が配列している様子も全群で認めた．この類骨の骨量を定量的に評価するために，Fig. 4-3, 4-4 に示すように骨孔の骨幹部側半分のうち，ImageJ により画像処理を行って皮質骨に近い濃淡部を検出し定量化した. 骨端側は骨端線周囲に投与直後から皮質骨様組織が認められたため定量評価の対象としなかった.

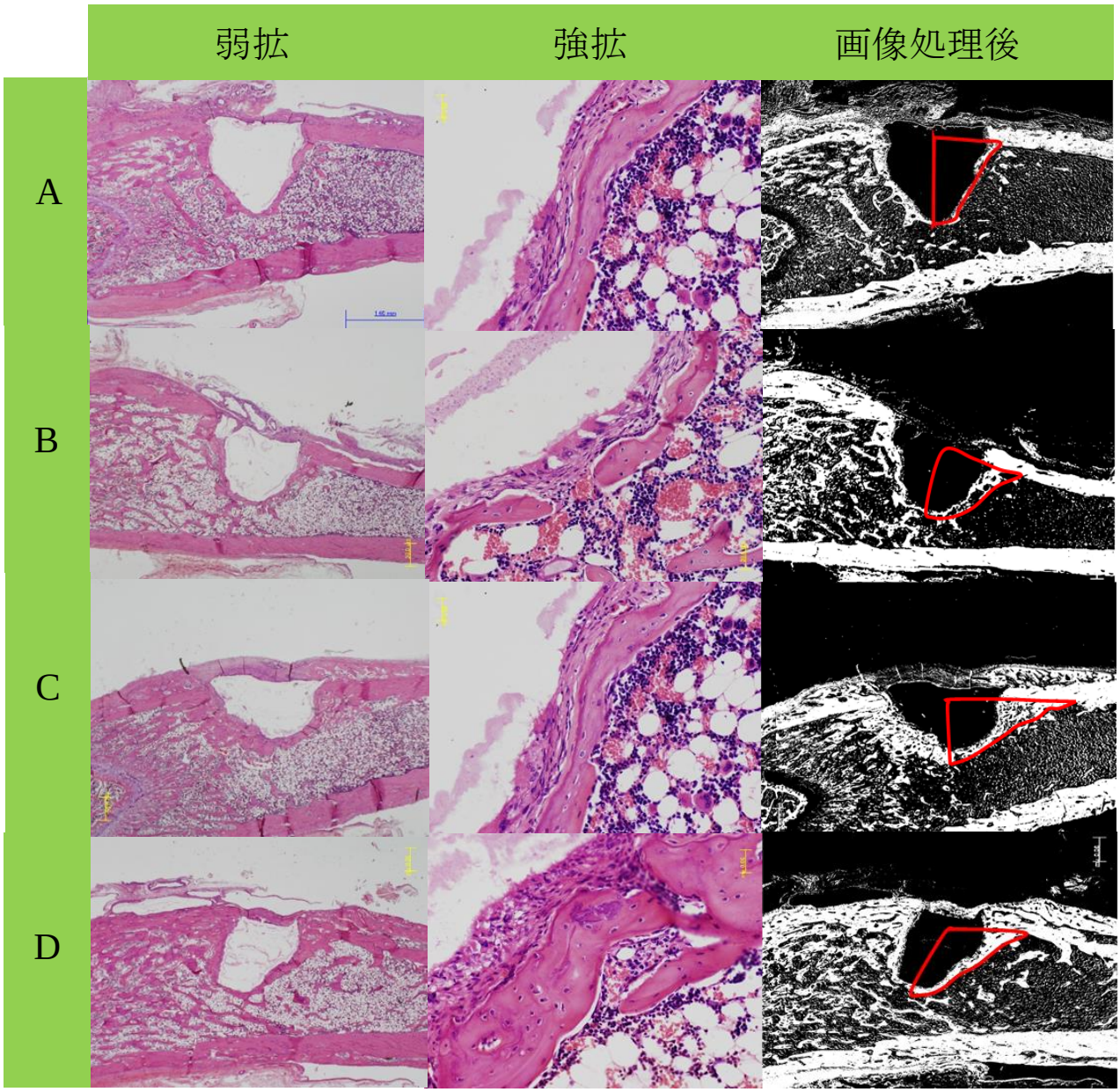


Fig. 4-3 製剤化粒子を投与して 3 週間後のラット大腿骨孔周囲の HE 染色写真（脱灰後）

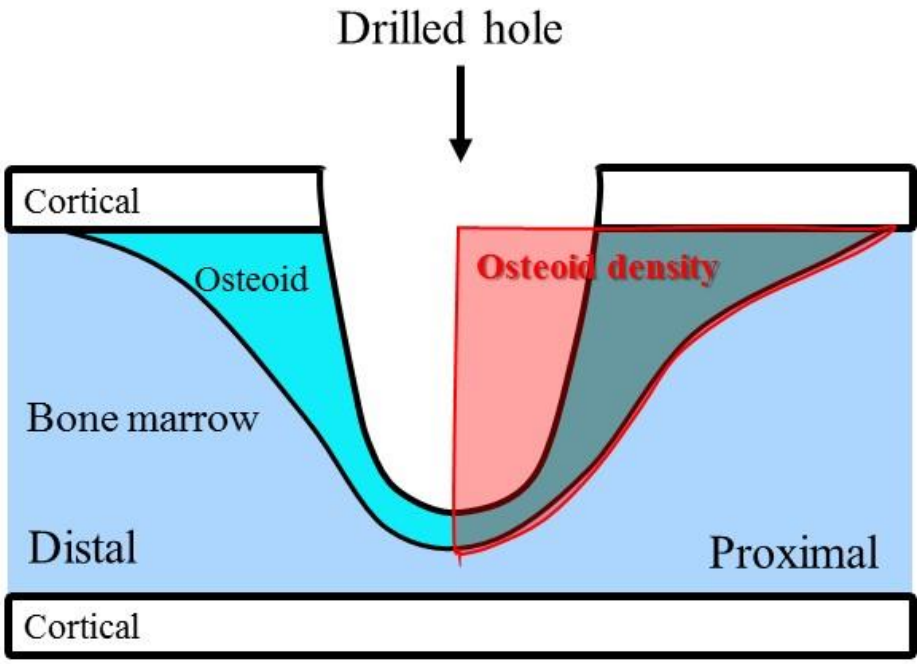


Fig. 4-4 投与箇所の模式図と赤枠部分における類骨密度の測定

Fig. 4-5 に各群における骨孔周囲の骨量を示す．Dunnett 法[5]による検定により，NS を投与した群と比較して他の 3 つの群において危険率 1%において有意な骨量増加を認めた．特に，D 群の類骨骨密度は A 群の 1.83 倍であった．さらに，Steel-Dwass 法[5]による検定も行った．C 群は B 群と比較して有意差は認めなかったが，D 群は B 群よりも危険率 1%において有意な骨量増加を認めた．

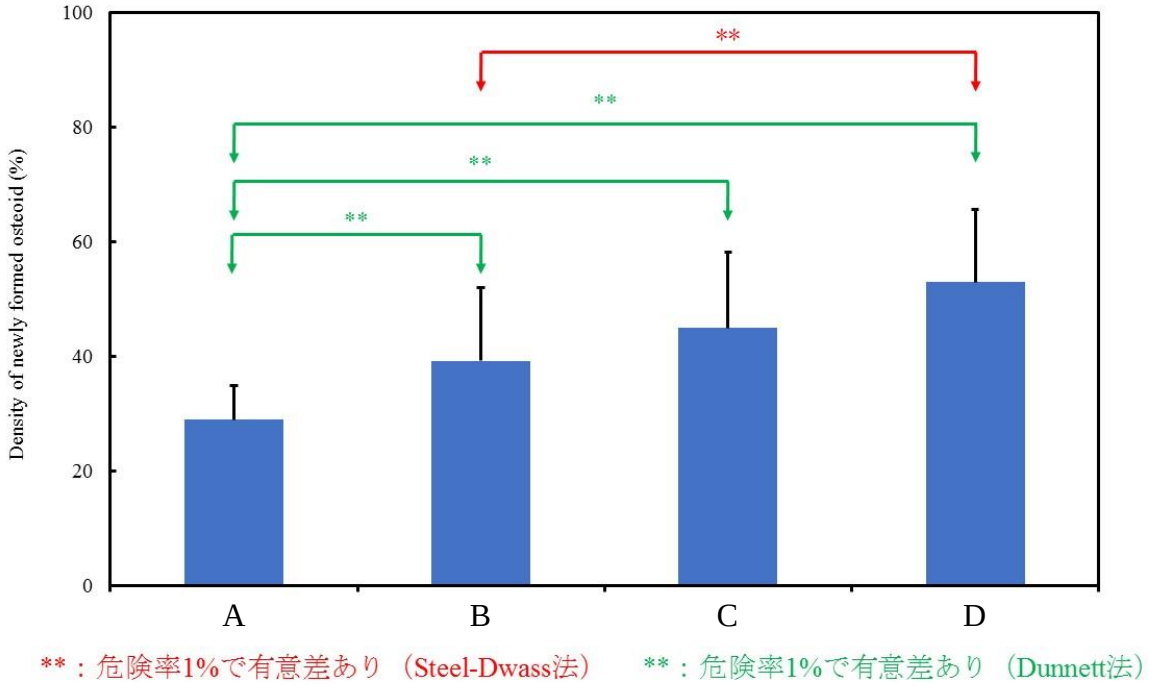


Fig. 4-5 製剤化粒子を投与した骨孔周囲の類骨密度の比較 (n= 10).

４．４．考察

４．４．１．Sclmab の局所投与による骨折治癒促進の必要性

骨癒合促進治療を狙った薬物の全身投与は, 今のところ一般的な治療法として確立されていない．PTH の間欠的皮下投与によるラットの開放骨折に対する骨癒合の有効性は報告されているが[6, 7]，臨床治験では，レントゲン写真の画像上で骨癒合が短縮するような結果は得られていない[8]．さらに，カニクイザルへの PTH の間欠的投与によって，仮骨のリモデリングは促進するものの, 大腿骨の骨強度が向上するような結果は得られなかった．

BMP のような細胞増殖因子による骨折・骨欠損部に対する治療も行われていたが[9], 投与部位に浮腫・感染・異所性骨化をきたすリスクが問題視されていた[10]．当然ながら, 関節周囲骨折に対しても BMP の投与によって関節内に異所性骨化をきたして機能障害が起こるリスクも考えられる．

そこで, 世界で初めて骨形成促進作用を有する抗体医薬としてSclmabの有効性が数多く報告されている．Wnt経路から産生されたsclerostinは骨芽細胞に作用してその活性を阻害

する．Sclmabはそのsclerostinを不活化させることで骨芽細胞を活性化させて骨形成を促進する．ラットに対してSclmabを全身投与した場合の骨量上昇作用も報告されている[12]．また，カニクイザルに対するSclmabの皮下投与によって，骨粗鬆症性骨折が起こりやすい部位である腰椎・大腿骨頚部・橈骨遠位端の骨量を有意に増加させる[13]．以上より，動物への投与による有効性が認められたためヒトに対する治験も行われた．閉経後女性に対して1年間Sclmabを210 mg/月で皮下投与したところ，腰椎の骨密度は11.3%増加した[4]．これは，従来の骨粗鬆症治療薬を凌駕する結果であり，1年の単剤投与で骨密度が10％以上上昇したことは世界で初めての報告である．

このように，Sclmabの全身投与にから骨量増加へ作用する代謝効果は，Table 4-1に示すように，骨折･骨欠損のような局所性病変に対しても効果があると報告されている．まず，ラットへの全身投与により大腿骨骨切りモデルにおける骨折の治癒が促進したことも報告されている[7]．ラットだけでなくマウスの骨折モデルに対しても，100 mg/kgの投与量で週1回の皮下投与によって骨折の修復が促進されることがわかっている[14]．さらに，ラットの開放骨折への有効性も報告されていることから[15]，ヒトの開放骨折に対する臨床応用も期待されている．

Sclmab の全身投与による骨欠損部での骨量増加作用も報告されている．McDonald MM らは，卵巣摘出したラット（OVX ラット）の脛骨近位部に直径 3mm の骨欠損部を作成して週 2 回 Sclmab を全身投与したところ，投与 1 週間後でコントロール群（生食のみ）と比較して有意な骨形成を認めた[16]．大腿骨欠損部を作成したラットに Sclmab を 25 mg/kg で週 2 回皮下投与したところ，欠損部での有意な骨量増加作用も報告されている [17, 18]．また，大腿骨離断モデルでも Sclmab の皮下投与の有効性が報告されている．Alaee F らは，ラットの大腿骨に 3mm の間隙を伴う離断を作成して Sclmab を投与したところ，欠損部での骨修復の促進を認めた[19]．

Table 4-1 Sclmab の動物の局所疾患に対する全身投与に関するこれまでの報告

researchers	animal	dose	administration route	model
Farhang Alaee et al.	12-week-old male Sprague–Dawley rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	femoral defects
Pui Kit Suen et al.	6-month-old male Sprague–Dawley rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	open osteotomy
Mohammad M. Alzahrani MD et al.	10-week-old male sclerostin knockout and wild type mice	once weekly at 100 mg/kg	intravenous	midshaft tibial osteotomy
Michelle M. McDonald et al.	ovariectomized (OVX) rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	3 mm circular defects in the proximal tibia
Agholme, Fredrik et al.	3-month-old Sprague Dawley rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	screw insertion
Mandeep S. Virk et al.	male Lewis rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	femoral defects
Gao Feng et al.	8-week-old male Sprague–Dawley rats	twice weekly at 25 mg/kg	subcutaneous	femoral osteotomy

以上から，Sclmab の全身投与は開放骨折に対する低侵襲の骨癒合促進療法として有用である可能性を秘めている. しかしながら, 骨癒合促進を狙った Sclmab の投与量は 25-100 mg/kg であり，骨粗鬆症治療の投与量（3 mg/kg）の 8-33 倍と非常に高用量である．このような高用量におけるヒトへの安全性は確立されていない．また，骨粗鬆症の学会では統計的な有意差は見出されていないものの，変形性関節症の進行，血管内の石灰化，悪性腫瘍が散見されているため, その使用期間についても一定した見解が得られてなく混沌としている.

たしかに，開放骨折では感染による骨髄炎のリスクも伴うため，製剤化粒子の局所投与は避けたいところである. 粒子自体が感染の温床になる可能性も否定できず，金属の固定材はもちろんのこと，人工骨も極力避ける傾向がある．しかし，非開放性の粉砕骨折・偽関節・骨欠損については，それ自体で骨量増加作用を有する HAp/ChS 担体に Sclmab を担持させて局所投与した方が, 全身への大量投与による副作用のリスクが軽減される可能性はもちろんのこと，全身投与よりも少ない投与量で高い効果が期待できる.

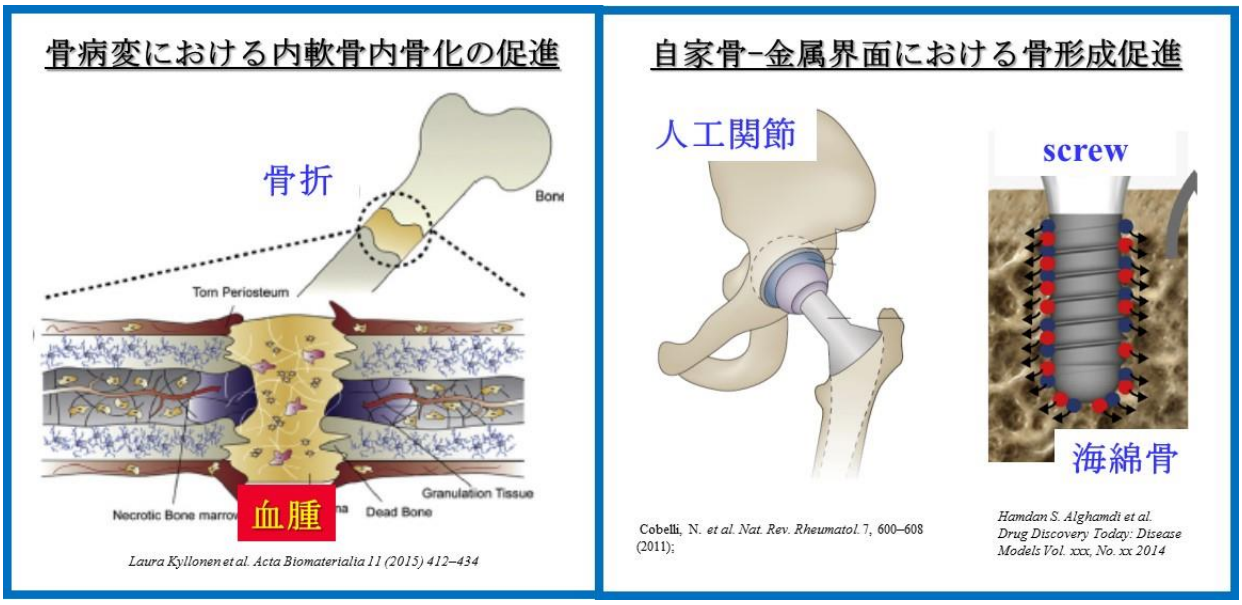


Fig. 4-6 Sclmab 局所投与製剤の臨床応用への可能性

骨形成促進作用が活躍するような疾患は脆弱性骨折のような局所性疾患が多い. 例えば, 粉砕骨折, 偽関節（骨癒合不全), 骨欠損などは手術を施行しても治療に難渋する例が少なくない. 特に, 荷重骨である下肢の骨折ではこういった症例には術後ほぼ必ず免荷の期間を要する. また, 脆弱性骨疾患では骨強度が低下しているために手術による十分な内固定が得られないことが多い. そのため, 荷重開始後に骨折部の再転位が生じることもある. そこで, Sclmab を担持した製剤化粒子を術中に骨折部・骨欠損部に局所投与すれば, 担体から Sclmab が長期間徐放されて局所の血中濃度が維持されて薬効の向上が期待できる. 粉末状の製剤化粒子を NS などと混合してシリンジにて骨折部に直接投与するだけでなく, 骨欠損部に対しても人工骨を充填してからその間隙に投与することもできる. その製剤化粒子が病変部に滞留して Sclmab が数週間放出されれば, 骨形成促進作用から術後の骨折部の仮骨形成を早めることが期待できる. そうすれば, 骨癒合不全・偽関節のリスクが軽減するだけでなく, より早期の荷重に挑戦できる.

他にも, 自家骨とインプラントの間の界面反応を促進させて強固に固着させることも期待できる. たしかに, 近年ではインプラントの自家骨に接する部分にポーラス表面加工させることでインプラント表面の多孔構造の中に骨が形成して固着される（bone ingrowth). しかし, それはインプラント周囲の海綿骨の強度を上昇させるわけではないため, 長期的に見てインプラント周囲の海綿骨が圧潰する危険性も危惧される. 特に, 今後ますます増えてくる骨粗鬆症患者に対する人工関節置換術では, 海綿骨の強度が金属と比べて著しく

低くなっていき，そのような危険性がさらに高まる．そこで，インプラントを設置する前に，海綿骨に生理食塩水と混合させてペースト状にした製剤化粒子を投与して Sclmab の放出により骨形成が促進されれば, 界面での固着が強まるだけでなくインプラント周囲の海綿骨の骨量が上昇してインプラントの安定性が向上する．

もちろん，外来診療における低侵襲の局所投与も可能である．例えば，偽関節に対する投与も想定できる. 偽関節は皮質骨の連続性が絶たれているので経皮的に注射針を進めて偽関節の欠損部に到達することができる．エコーを用いて病変部を描出し，そこに注射針を進めていき針先が病変部に到達したことを確認してから製剤化粒子を局所投与する. 製剤化粒子と生理食塩水とのスラリーが入っていく様子もエコー下で確認できるので, 精度の高い経皮的皮下投与が可能である．HAp/ChS 多孔質微粒子の平均粒子径は 4μm 程度であり，ChS と分子レベルで複合化させて親水性も付与されているため，細い中空針を通過することができる．23-27G の中空針であれば患者への負担・疼痛も比較的軽いことが多い．

４．４．２．Sclmab を局所投与したラット大腿骨骨孔の動物学的評価

骨折の治癒過程には，炎症期・修復期・リモデリング期がある[20]．骨折直後は，破綻した骨髄，骨皮質，骨膜，周辺軟部組織に存在する血管からの出血が生じる．圧潰によって壊死した骨組織から放出される炎症性サイトカインの作用により，好中球・貪食細胞・繊維芽細胞が遊走して凝血塊を形成する[21]．局所で BMP をはじめとした種々の細胞増殖因子が作用して未分化間葉系細胞や前骨芽細胞が増殖する．次に，壊死組織は吸収されて骨髄内や骨膜に毛細血管の新生が起こる．この炎症期は骨折直後から数日の期間である．修復期では，未分化間葉系細胞が軟骨細胞や骨芽細胞に分化する．骨折部周辺の骨膜は増殖・肥厚し，膜性骨化が生じる．軟部組織や血腫内では主として軟骨形成が起こり，軟骨内骨化により徐々に骨に置換されていく．これらの骨形成・軟骨形成は骨折部を橋渡しするように連続性に生じて仮骨となる. 仮骨が形成されると骨折部は安定して連続性を得る. 初期の仮骨は軟骨・線維性骨が主体で力学的にはまだ脆弱である．この仮骨が臨床的に安定になるまでは 6-8 週間を要する．リモデリング期では，形成された線維性骨が再造形により層板骨に置換される．破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返し，皮質骨と骨髄腔が形成されていく．つまり，解剖学的構造が構築されて本来の骨強度へと限

りなく近づく．このような再造形の完了には数か月から数年を要する．

骨折の治癒を促進させるには，この初期の治癒過程である炎症期と修復期を制御することが重要であり，Sclmab の全身投与により BMP-2 の発現や骨芽細胞の増殖が促進されることがわかっている[22]．しかしながら，Sclmab を局所投与するにあたり，骨切りモデルでは粒子の滞留の不均一性が懸念されたため，ドリリングで作成した大腿骨骨孔に製剤化粒子を投与した．投与直後に bone wax で骨孔を封鎖するため，製剤化粒子は骨髄内に滞留して Sclmab を放出すると考えられる．作成した骨孔は直径 1.5mm 程度で深さが 5mm 程度であり，おおよその体積は 0.75×0.75×3.14×5≒10mm^3（10μl）である．

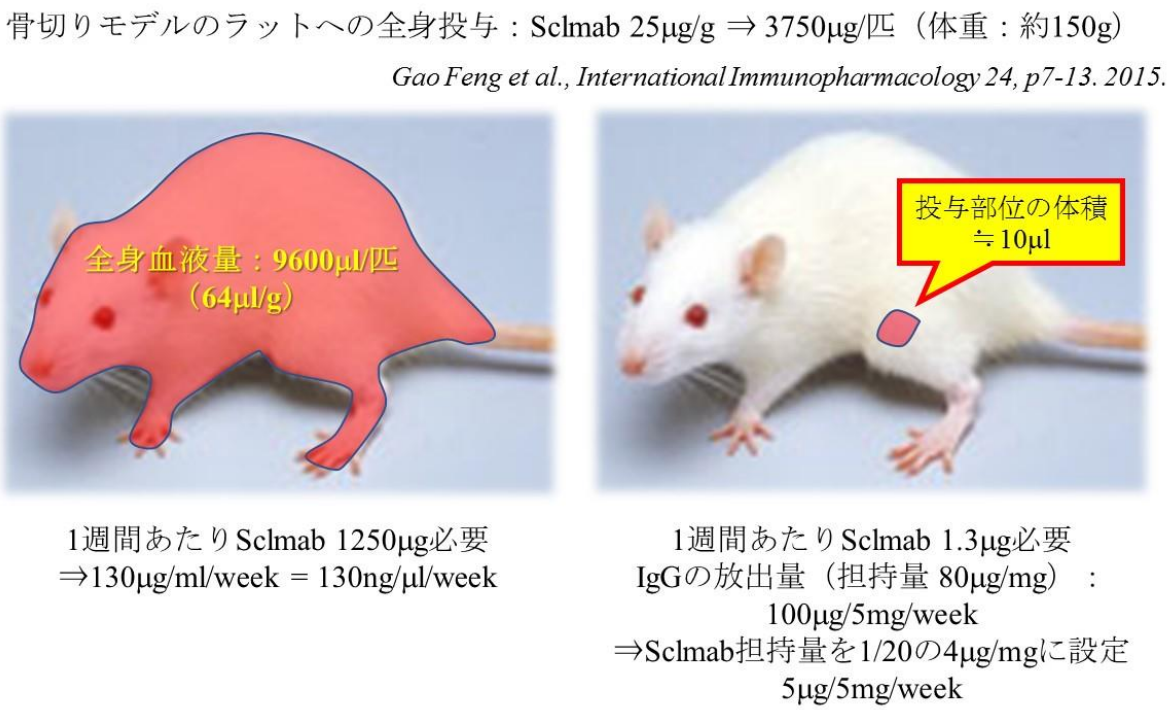


Fig. 4-7 本実験における製剤化粒子の Sclmab の担持量の設定方法

マウス MC3T3-E1 細胞に対する Sclmab の投与実験では，濃度が 5μg/ml 以上で有意な効果が認められ，その濃度が上昇するにつれて析出した Ca 量が上昇する[23]．骨折治癒促進を評価する目的でラットに全身投与した報告では，投与量は 25 mg/kg（ラットの体重を 150g と換算した場合 3750 μg/匹）であった[22]．Fig. 4-7 に，本実験における製剤化粒子の Sclmab の担持量の設定方法を示す．体重 1g あたりの循環血液量は 64μl であり[24]，1 匹あたりの循環血液量は 9600μl となる．したがって，1 回あたり 25 mg/kg で全身投与して 3 週間で骨量の変化を観察するにあたり，1 週間あたり 3750/3 = 1250μg 分が必要となる．

これを循環血液量で割ると，1250/9.6≒130 μg/ml/week すなわち，130 ng/μl/week となる．一方, 局所投与では作成した骨孔の体積は約 10μl であるから, 1 週間あたり 1.3μg の Sclmab が必要となる．第 2 章で，製剤化粒子（担持量：80 μg/mg）からの IgG の試験管内での 1 週間の放出量は 20 μg/mg であった．つまり，ラットへの局所投与実験で必要とされる量よりも多量の IgG が放出されることがわかっている．そのため，80 μg/mg での担持量であれば局所にて十分な量の Sclmab が放出されて，高い効果を得ることが予想された．しかしながら, 本実験ではまず必要最小限の担持量での効果発現が得られるように, 担持量は試験管内の放出試験の 1/20 である 4 μg/mg に設定した．製剤化粒子は 5mg 使用するので Sclmab の投与量は 4×5 = 20μg となり，1 週間あたり 1×5＝5μg 程度の Sclmab が放出されることが予想される．これは，計算して得られた予想される Sclmab の必要量 1.3 μg/week よりもやや高い値であるが，局所で製剤化粒子から放出された Sclmab のうちある程度は，骨髄腔内へ拡散することも想定して設定した値である．本実験の結果は，Zn を用いた製剤化粒子（Sclmab 投与量 20μg）を投与した群において有意な骨量上昇を認め，ラットに全身投与したモデルの投与量である 3750μg の 1/200 程度でも局所投与により有意な骨量増加作用を示すことが明らかになった．この結果は，担体を用いた Sclmab の局所投与によって, 全身投与よりも少ない投与量でも局所疾患に対して十分な治療効果が得られることを示唆する．

微粒子を担体として投与するにあたり, 微粒子自体が免疫反応を惹起して好中球や貪食細胞を遊走する可能性が危惧されている．しかし，本実験の HE 染色組織写真からはこういった炎症細胞および破骨細胞の遊走は認めなかった．また，μCT 写真からも製剤化粒子だけでなく担体のみを投与した群においても骨吸収像は認めなかった. これらの結果は, HAp/ChS 多孔質微粒子はそれ自体で骨再生に悪影響を及ぼさないことを示唆する．一方，骨孔側に繊維組織の増生，骨髄側に類骨の形成を認めた．また，類骨の辺縁に骨芽細胞も認めた．製剤化粒子の所在は，脱灰処理後の写真であるため同定が困難であったが，気孔内部の辺縁に散在していたと思われる．

製剤化粒子を投与した骨孔周囲の定量評価では, 投与３週間後でコントロール群と比較して他の全ての群で有意な骨量増加を示した．これは，Sclmab だけでなく担体自体にも骨量増加作用があることを示唆する．また，Zn を添加した製剤化粒子が最も高い骨量増加を認めた．さらに，Steel-Dwass 法による検定から担体のみの群と比較して Zn を添加し

た製剤化粒子が有意な骨量増加を示した．この結果は，Sclmab の効果を発現させるにあたり Zn の添加が必要であることを示唆している．第二章で，製剤化処理の際に Zn を添加することで，試験管内で IgG の放出速度が上昇するだけでなく，IgG が担体に安定に担持されることが判っている．Sclmab における製剤化粒子からの試験管内での放出試験は行っていないものの，その基本構造は IgG であり同様の放出挙動を示すことが予想される．Zn の添加により，抗体の安定性向上，放出速度の上昇，担持量増加が得られ，その結果骨量増加に貢献した可能性がある．

本研究で, 骨形成を促進する作用を有するモノクローナル抗体である Sclmab について, 世界で初めて多孔質微粒子である担体に担持させて動物に局所投与した．しかしながら, 本研究にはいくつかの制限・課題が残されている．まず，Sclmab の骨量増加効果への用量依存性については評価されていない．また，Sclmab の担持量は試験管内での放出試験に用いた製剤化粒子の担持量よりも 1/20 に設定していたため，より高い担持量での単回投与実験も望ましい．さらに，用いたラットは閉経後でも骨折モデルでもないため，骨粗鬆症性骨折へ十分な効果を発揮するかどうかは議論の余地がある．さらなる研究として，卵巣摘出したラットに対してより高用量の Sclmab を投与する実験が望ましい.

４．５．結言

骨形成促進作用を有する Sclmab を担持した HAp/ChS 製剤化粒子は，Zn を用いた製剤化処理により良好な骨形成促進効果を示した. この製剤化粒子は局所の脆弱性骨疾患に対して臨床応用できると期待される.

参考文献

[1] Hoshino M, Egi T, Terai H, et al. Regenerative repair of long intercalated rib defects using porous cylinders of beta-tricalcium phosphate: an experimental study in a canine model. Plast Reconstr Surg, 119, p1431-1439, 2007.

[2] Hoshino M, Egi T, Terai H, et al. Repair of long intercalated rib defects in dogs using recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered by a synthetic polymer and beta-tricalcium phosphate, J Biomed Mater Res 90, p514-521, 2009.

[3] Andreassen TT, Ejersted C, Oxulund H. Inetermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures. J Bone Miner Res 14:

p960-968, 1999.

[4] Michael R. McClung, M.D., Andreas Grauer, M.D., Steven Boonen, M.D., Ph.D., Michael A. Bolognese, M.D., Jacques P. Brown, M.D., Adolfo Diez-Perez, M.D.,Ph.D., Bente L. Langdahl, Ph.D., D.M.Sc., Jean-Yves Reginster, M.D., Ph.D., Jose R. Zanchetta, M.D., Scott M. Wasserman, M.D., Leonid Katz, M.D., Judy Maddox, D.O., Yu-Ching Yang, Ph.D., Cesar Libanati, M.D., and Henry G. Bone, M.D.Romosozumab in Postmenopausal Women with Low Bone Mineral Density, New England of Journal of Medicine, 370, p412-420, 2014.

[5] 柳井久江, エクセル統計第４版, オーエムエス出版, 2015 年 10 月 15 日出版

[6] Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, Shimizu S, Moriya H, Einhorn TA, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1–34). Journal of Bone Minerral Research ;17: p2038-47, 2002.

[7] Tagil M, McDonald MM, Morse A, Peacock L, Mikulec K, Amanat N, et al. Intermittent PTH (1–34) does not increase union rates in open rat femoral fractures and exhibits attenuated anabolic effects compared to closed fractures, Bone 46: p852-859, 2010.

[8] Aspenberg P, Genant HK, Johansson T, Nino AJ, See K, Krohn K, et al. Teriparatide for acceleration of fracture repair in humans: a prospective, randomized, double-blind study of 102 postmenopausal women with distal radial fractures. J Bone Miner Res 25: p404-14, 2010.

[9] Mont MA, Ragland PS, Biggins B, Friedlaender G, Patel T, Cook S, et al. Use of bone morphogenetic proteins for musculoskeletal applications. An overview. Journal of Bone Joint Surgery Am 86-A (Suppl. 2) p41-55, 2004.

[10] Garrison KR, Donell S, Ryder J, Shemilt I, Mugford M, Harvey I, et al. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review. Health Technol Assess ;11:1‐150 [iii-iv], 2007.

[11] Roland Baron & Michaela Kneissel, WNT signaling in bone homeostasis and disease: from human mutations to treatments, Nature Medicine Vol.19, No.2, p179-192, FEB, 2013.

[12] Pui Kit Suen, Tracy Y. Zhu, Dick Ho Kiu Chow, Le Huang, Li-Zhen Zheng & Ling Qin, Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength of Intact Bones in Adult Male Rats, Scientific Reports | 5:15632 | DOI: 10.1038/srep15632.

[13] Ominsky MS, Vlasseros F, Jolette J, Smith SY, Stouch B, Doellgast G, et al. Two doses of sclerostin antibody in cynomolgus monkeys increases bone formation, bone mineral density, and

bone strength, J Bone Miner Res 25, p948-59, 2010.

[14] Mohammad M. Alzahrani MD, MSc, Frank Rauch MD, Reggie C. Hamdy MB, Does Sclerostin Depletion Stimulate Fracture Healing in a Mouse Model?, Clin Orthop Relat Res 474, p1294-1302, 2016.

[15] Pui Kit Suen, Yi-Xin He, Dick Ho Kiu Chow, Le Huang, Chaoyang Li, Hua Zhu Ke, Michael S. Ominsky, Ling Qin, Sclerostin Monoclonal Antibody Enhanced Bone Fracture Healing in an Open Osteotomy Model in Rats, J Orthopeadic Research 32: p997-1005, 2014.

[16] McDonald MM , Morse A, Mikulec K, Peacock L, Yu N, Baldock PA, Birke O, Liu M, Ke HZ, Little DG, Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. Journal of Orthopeadic Research Oct 30 (10) p1541-1548, 2012.

[17] Mandeep S. Virk, MBBS, Farhang Alaee, MD, Hezhen Tang, BS, Michael S. Ominsky, PhD, Hua Zhu Ke, PhD, and Jay R. Lieberman, MD, Systemic Administration of Sclerostin Antibody Enhances Bone Repair in a Critical-Sized Femoral Defect in a Rat Model, Journal of Bone Joint Surgery Am. 95 p694-701, 2013.

[18] Muhammad U. Jawad, Kate E. Fritton, Ting Ma, Pei-Gen Ren, Stuart B. Goodman, Hua Z. Ke, Philip Babij, Mark C. Genovese, Effects of Sclerostin Antibody on Healing of a Non-Critical Size Femoral Bone Defect, Journal of Orthopeadic Research 31 p155-163, 2013.

[19] Alaee F, Virk MS, Tang H, Sugiyama O, Adams DJ, Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, Ke HZ, Lieberman JR, Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model, Journal of Orthopaedic Research Volume 32, Issue 2, Version of Record online: 8 OCT 2013.

[20] 松野丈夫・中村利孝，標準整形外科学第 12 版，p44-47，2014 年 2 月 15 日発行

[21] Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. Injury, 36: p1392-1404, 2005.

[22] Gao Feng, Zhang Chang-Qing, Chai Yi-Min, Li Xiao-Lin, Systemic administration of sclerostin monoclonal antibody accelerates fracture healing in the femoral osteotomy model of young rats, International Immunopharmacology 24, p7-13, 2015.

[23] Xiaodong Li, Michael S Ominsky, Kelly S Warmington, Sean Morony, Jianhua Gong, Jin Cao, Yongming Gao, Victoria Shalhoub, Barbara Tipton, Raj Haldankar, Qing Chen, Aaron

Winters, Tom Boone, Zhaopo Geng, Qing-Tian Niu, Hua Zhu Ke, Paul J Kostenuik, W Scott Simonet, David L Lacey, and Chris Paszty, Sclerostin Antibody Treatment Increases Bone Formation, Bone Mass, and Bone Strength in a Rat Model of Postmenopausal Osteoporosis, JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, Volume 24, Number 4, 2009.

[24] Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. Journal of Applied Toxicology, 21; p15-23, 2001.

第５章　総括

本論文では, 骨疾患治療用のタンパク質医薬品の担体の創出とその吸着と放出制御技術の確立を目的とした．骨成分である水酸アパタイト（HAp）とコンドロイチン硫酸（ChS）のナノ複合体から，高比表面積な多孔質微粒子を作製し，タンパク質とナノ複合体，生体必須微量元素である亜鉛（Zn）との相互作用を明らかにして，局所・全身性骨疾患双方の治療に有用な徐放化技術を確立した.

第 1 章「序論」では，本研究の背景と目的について述べた．モノクローナル抗体やサイトカインをはじめとした代表的なタンパク質医薬品の皮下注射製剤に関する作用機序, 全身性の骨代謝・骨免疫疾患および局所性の骨疾患の治療の現状と課題を述べるとともに, 局所性の骨疾患に対して治療効果を向上させるために必要な担体の形態, 素材およびタンパク質の投与経路・放出特性を提案した．HAp と ChS とのナノ複合体とタンパク質の相互作用，さらに Zn^{2+}による徐放化を目指す本論文の意義について記述した.

第 2 章「多孔質微粒子の作製とタンパク質との相互作用と放出特性」では，湿式法で合成したナノ複合体（HAp/ChS）懸濁液をスプレードライ法により，平均粒子径が 4μm で気孔径が 30-60nm の真球状の多孔質微粒子を作製した．ゼータ電位測定では，ChS との複合化により多孔質微粒子の表面は負に帯電しており, 酸性タンパク質や中性タンパク質と比べて, 塩基性タンパク質の吸着特性に優れていること, 気孔内で吸着したタンパク質に対して Zn^{2+}を作用させるとタンパク質の放出を制御できることを明らかとした．さらに，免疫グロブリン（IgG）の吸着現象を吸着理論モデルで数理学的に解析し，ナノ複合体の表面に end-on で吸着されることを見出した．Zn^{2+}の処理は，IgG の吸着量の増加だけでなく, 初期の過剰な放出を抑制して持続的な放出が可能であること，また微粒子内に結合した Zn^{2+}が溶液中には放出されないことを示した．このことから，負に帯電したナノ複合体の表面に Zn^{2+}が介在すると，気孔内での電荷バランスが中性に近づき，静電的相互作用から IgG の気孔内拡散が亢進するリザーバー型の放出特性を示すモデルを提案した．すなわち，粒子に吸着していない IgG は Zn^{2+}の介在で気孔内に入り込み担持量を増加させる．また，IgG の放出曲線にゼロ次速度式・Higuchi 式を用い，気孔内における IgG の拡散速度と，放出速度を増加させることを明らかとした.

第 3 章「多孔質微粒子からの破骨細胞形成抑制因子の放出特性」では，骨吸収抑制作用

を有する破骨細胞形成抑制因子（OPG）を多孔質微粒子に担持させ，第 2 章で確立した Zn を用いた製剤化処理を行い，試験管と動物実験により，その有効性を検討した．Zn^{2+}を添加することで，初期の過剰な放出が抑制され，直線的に OPG が 7 日間にわたり放出されることを明らかとした．すなわち，薬物送達システムにおけるモノリシック型の放出特性を示す多孔質微粒子が，Zn^{2+}を添加することでリザーバー型の放出特性を付与できることが示唆された．さらに，OPG を担持した微粒子をラットの皮下に全身投与したところ，発熱や炎症性などの毒性反応は認められず，OPG の血中濃度が 4 日間にわたり持続することを明らかとした．これは，試験管内での放出特性と相関する結果であった．

第 4 章「骨形成促進薬と多孔質微粒子を用いた骨再生」では，骨芽細胞に作用して骨形成を促進する抗スクレロスチン抗体（Sclmab）を担持させ，第 2 章で確立した独自の Zn を用いた製剤化処理を行った微粒子をラット大腿骨遠位部の骨孔に投与し，投与部位の炎症性や骨量変化を評価した．3 週における組織切片の観察の結果，炎症性細胞の遊走は認められず，作製した担体と Zn を用いた製剤化技術は生体に対して安全であることを明らかとした．投与部位の新生骨量を定量的に評価するため，組織切片の写真を画像解析して数値化したところ，Zn^{2+}で処理した微粒子はコントロール群だけでなく微粒子のみ投与した群に対しても有意に骨量を増加させた．また，マイクロ CT の写真から，投与部位の周囲で骨吸収は認められなかった．すなわち，Zn で製剤化処理した微粒子製剤の局所投与は，骨吸収を惹起せず，骨孔内に滞在した微粒子から Sclmab を適量だけ放出させ，局所濃度を上昇させて骨形成を促すことを明らかとした．

第 5 章「総括」においては，各章の結果をまとめ今後の研究課題を提言した．

以上のように，本論文は，骨成分である HAp と ChS のナノ複合体からなる多孔質微粒子とタンパク質の吸着現象と，生体微量必須元素である Zn^{2+}を添加する技術を検討し，気孔内の静電的相互作用の電気的中性を制御することで，局所又は全身に投与するタンパク質の徐放化に応用できる技術を確立した．この知見は，Zn^{2+}を用いた安全・安心な徐放化技術として，今後の粉砕骨折・偽関節・骨欠損の治療に広く応用されることが期待される．

渡邉元　研究業績

2017.7.5

A. 学術論文

(1) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen, Akira Monkawa and Junzo Tanaka, “Hydroxyapatite /Chondroitin Sulfate Microparticles with Different Particle Size and its Adsorption Ability of Proteins” *Key Engineering Materials*, Vols. 309-311 (2006) p533-536.（第 2 章）

(2) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen and Junzo Tanaka, “Protein Adsorption onto Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles” *Transactions of the Materials Research Society of Japan*, 31[2] (2006) p341-344.（第 2 章）

(3) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen and Junzo Tanaka, “Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles as Time-Controlled Release Carrier of Proteins” *Key Engineering Materials*, Vols. 330-332 (2007) p1009-1012.（第 2 章）

(4) Toshiyuki Ikoma, Toru Tonegawa, **Hajime Watanabe**, Guoping Chen, Junzo Tanaka and Yutaka Mizushima, “Drug-Supported Microparticles of Calcium Carbonate Nanocrystals and Its Covering with Hydroxyapatite” *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 7 (2007) p1-6.（第 2 章）

(5) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Mizue Tanaka, Taro Yoshioka and Junzo Tanaka “Controlled release of a protein using a ceramic carrier and zinc ions as a novel approach to the treatment of osteoporosis” *Key Engineering Materials*, Vols. 631 (2015) p332-337.（第 3 章）

(6) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Eisuke Tsuda, Yoshiharu Hiruma, Mizue Tanaka, Taro Yoshioka, Junzo Tanaka, “OsteoprotegerinAntiresorptive protein releases *in vitro* and *in vivo* from hydroxyapatite / chondroitin sulfate nanocomposite microparticles including zinc cations as a formulation additive” *in preparing*（第 3 章）

(7) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Shinichi Sotome and Okawa A, “Local administration and enhanced release of a monoclonal antibody from Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate nanocomposite microparticles using zinc cations”, *in preparing*（第 4 章）

(8) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Mizue Tanaka, Taro Yoshioka and Junzo Tanaka, “Adsorption and release mechanism of proteins in Hydroxyapatite/Glycosaminoglycans

microparticles at the presence of zinc cations", *in preparing*（第 2 章）

B. 研究発表

(1) 渡辺 元・生駒俊之・陳国平・田中順三,『水酸化アパタイト/多糖類複合多孔質微粒子の合成と評価』（ポスター発表），第 27 回日本バイオマテリアル学会大会，2005 年 11 月 28, 29 日，京都テルサ，大会長：堤定美（京都大学再生医科学研究所）

(2) 渡辺 元・生駒俊之・陳国平・田中順三,『ハイドロキシアパタイト/グリコサミノグリカン複合微粒子の薬物キャリアへの応用』（口頭発表）, 第 9 回生体関連セラミックス討論会，2005 年 12 月 1, 2 日，日本大学駿河台キャンパス，主催機関：日本セラミックス協会生体関連材料部会

(3) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen, Akira Monkawa and Junzo Tanaka, "Hydroxyapatite /Chondroitin Sulfate Microparticles with Different Particle Size and its Adsorption Ability of Proteins" (Poster presentation), 18th International Symposium on Ceramics in Medicine, December 5-8 (2005), Kyoto, Japan, President: Takashi Nakamura, MD, PhD

(4) 渡辺 元・生駒俊之・陳国平・田中順三，"Protein Adsorption onto Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles"（ポスター発表），第 16 回日本 MRS 学術シンポジウム，2005 年 12 月 9-11 日，日本大学駿河台キャンパス，主催機関：日本 MRS

(5) 渡辺 元・生駒俊之・陳国平・田中順三,『ハイドロキシアパタイト/ヒアルロン酸複合多孔質微粒子の合成と評価』（ポスター発表），日本セラミックス協会 2006 年年会，2006 年 3 月 14 日，東京大学駒場 I キャンパス・駒場エミナース，主催機関：社団法人日本セラミックス協会

(6) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen and Junzo Tanaka, "Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles as Time-Controlled Release Carrier of Proteins" (Oral presentation), 19th International Symposium on Ceramics in Medicine, October 10-13 (2006), Chengdu, China, President: Xingdong Zhang, Professor, FBSE

(7) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Guoping Chen and Junzo Tanaka, "Novel Formulation Method of Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles" (Poster presentation), The 3rd China-Japan Mini-Symposium on Biomaterials, October 14-16 (2006), Jiuzhai Paradise Hotel, Jiuzhai, Sichuan, China, Conference sponcer: Sichuan University

(8) 渡辺 元・生駒俊之・陳国平・立石哲也・田中順三,『ハイドロキシアパタイト/コンド

ロイチン硫酸微粒子を用いたタンパク質の徐放化技術』（ポスター発表）, つくばバイオマテリアル研究会，2006 年 11 月 24 日，物質・材料研究機構並木地区，主催機関：物質・材料研究機構生体材料センター

(9) **渡辺 元**・生駒俊之・陳国平・田中順三,『ハイドロキシアパタイト/コンドロイチン硫酸球状微粒子のタンパク質放出特性制御』（ポスター発表），第 28 回日本バイオマテリアル学会大会，2006 年 11 月 27, 28 日，アルカディア市ヶ谷（私学会館），大会長：岡野光夫（東京女子医科大学先端生命医科学研究所，所長）

(10) **渡辺 元**・生駒俊之・陳国平・立石哲也・田中順三,『有機/無機ナノ複合体を用いたタンパク質の徐放化』（口頭発表），第 9 回生体関連セラミックス討論会，2006 年 12 月 1 日，東京工業大学すずかけ台キャンパス，主催機関：日本セラミックス協会生体関連材料部会

(11) **Hajime Watanabe**, Toshiyuki Ikoma, Mizue Tanaka, Taro Yoshioka and Junzo Tanaka, “Controlled release of a protein using a ceramic carrier and zinc ions as a novel approach to the treatment of osteoporosis” (Oral presentation), 26th International Symposium on Ceramics in Medicine, November 6-8 (2014), Barcerona, Spain,

(11) **渡邉 元**・生駒俊之・田中瑞栄・吉岡太郎・田中順三,『骨代謝関連因子の担体材料の開発およびその製剤化処理による放出制御』（ポスター発表），第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会，2015 年 10 月 22, 23 日，富山国際会議場ほか，大会長：木村友厚（富山大学大学院医学薬学研究部整形外科・運動器病学，教授）

(12) Hajime Watanabe, Toshiyuki Ikoma, Tomoaki Sugiyama, Shinichi Sotome and Atsushi Okawa, “Formulation Method of Hydroxyapatite/Chondroitin Sulfate Microparticles using Zn for Sustained Release of Monoclonal antibodies” (Oral presentation), 15th Asian BioCeramics Symposium (ABC2015), December 9-11 (2015), Tokyo, Japan

(13) **渡邉 元**・杉山 友明・生駒 俊之,『ナノ複合体キャリアに担持させた骨代謝関連タンパク質の放出制御でその血中濃度を維持できるか』第 34 回整形外科バイオマテリアル研究会，2015 年 12 月 12 日，ソラシティカンファレンスセンター，大会長：大川淳（東京医科歯科大整形外科学教室，教授）

(14) **渡邉 元**・生駒 俊之,『IgG を担持した多孔質微粒子の IgG 放出特性とそのメカニズムに関する考察』, 日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2016, 2016 年 11 月 21 日(月), 22 日(火), 福岡国際会議場，大会長：石川邦夫（九州大学歯学研究院，教授）

C. 特許

(1) 生駒俊之・<u>渡辺元</u>・田中順三・伊藤聰一郎・四宮謙一

『徐放性粒子及びその製造方法』

特願 2006-271077（平成 18 年 10 月 2 日）

物質・材料研究機構，東京医科歯科大学，第一三共株式会社

2) 生駒俊之・<u>渡辺元</u>・田中順三・伊藤聰一郎・四宮謙一・熊谷誠一郎・津田英資

『骨伝導能を有する徐放性粒子及びその製造方法』

特願 2006-271102（平成 18 年 10 月 2 日）

物質・材料研究機構

(3) 生駒俊之・<u>渡辺元</u>・田中順三・伊藤聰一郎・四宮謙一

“Controlled Release Preparation”

国際公開番号：WO2008/041704 A1

物質・材料研究機構，東京医科歯科大学，第一三共株式会社

(4) 生駒俊之・<u>渡辺元</u>・田中順三・伊藤聰一郎・四宮謙一・熊谷誠一郎・津田英資

“Controlled Release Preparation”

国際公開番号：WO2008/041774 A1

物質・材料研究機構

D. 総説

<u>渡邉元</u>・生駒俊之，『●人工臓器 ―最近の進歩，人工骨』，人工臓器 45 巻 3 号，2016 年，p183-187.

E. 受賞

(1) Best Student Award (Poster), 18th International Symposium on Ceramics in Medicine, December 5-8 (2005), Kyoto, Japan, President: Takashi Nakamura, MD, PhD (Kyoto University)

(2) 優秀発表賞，第 9 回生体関連セラミックス討論会，2006 年 12 月 1 日，東京工業大学すずかけ台キャンパス，部会長：尾坂明義（岡山大学工学部生物機能工学科，教授）

謝辞

本研究の遂行に際し，終始御懇切な御指導・御鞭撻を賜りました生駒俊之准教授（東京工業大学理工学研究科，准教授），並びに本研究に携わる機会を与えて下さった，田中順三名誉教授（東京工業大学理工学研究科）に深く感謝の意を申し上げます.

共同研究先として,動物学的評価に関して懇切丁寧に御指導を賜りました早乙女進一准教授（東京医科歯科大学医学部整形外科），OPG 試薬を御供与下さった津田英資博士（三共製薬株式会社）に謝意を申し上げます.

勤務医という立場にありながら大学院への進学を快諾してくださった浅妻直樹先生（河北総合病院血液内科），ご寛大にも 1 年間の大学院での研究活動を勧めて下さった吉岡太郎先生（同院整形外科部長）に大変感謝申し上げます．大学院での研究活動を応援して下さっただけでなく，研究試薬としてランマーク®の購入にご協力いただいた清水利夫院長（同院院長）に深謝申し上げます．骨粗鬆症において師事を賜りましただけでなく進路についてもご親切に相談に乗って下さった田中瑞栄先生（同院整形外科臨床部長）に大変感謝申し上げます．そして，博士課程の審査において配慮して下さっただけでなく，突然の病気で緊急入院した際にもご厚意頂きました柳本繁先生（東京都済生会中央病院整形外科部長）をはじめとした職場の諸先生方に深く感謝申し上げます.

2017 年 9 月吉日