

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)	渡邊元
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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻： Department of	材料工学	専攻	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 工学 ）
学生氏名： Student's Name	渡邊 元		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	生駒 俊之	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)	鶴見 敬章	

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

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、さらに亜鉛イオン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 $4\mu\text{m}$ 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亜鉛イオン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にした。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。亜鉛イオンの処理は、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亜鉛イオン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亜鉛イオンが介在すると、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モデルを提案した。すなわち、粒子に吸着していない IgG は亜鉛イオン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 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にした。

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 章で確立した亜鉛処理を行い、試験管と動物実験により、その有効性を検討した。亜鉛イオンを添加することで、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にした。すなわち、薬物送達システムにおけるモノシック型の放出特性を示す多孔質微粒子が、亜鉛イオン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にした。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テチン抗体 (ScImab) を担持させ、第 2 章で確立した独自の亜鉛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、作製した担体と亜鉛処理は生体に対して安全であることを明らかにした。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、亜鉛イオン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、亜鉛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 ScImab 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にした。

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、生体必須微量元素である亜鉛イオン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、亜鉛イオンを用いた安全・安心な徐放化技術として、今後の粉碎骨折・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。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ (T2R2) にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

専攻 : Department of	材料工学	専攻	申請学位 (専攻分野) : Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名 : Student's Name	渡邊 元		指導教員 (主) : Academic Supervisor(main)	生駒 俊之	
			指導教員 (副) : Academic Supervisor(sub)	鶴見 敬章	

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

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 amount 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 based on Higuchi's equation (**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, which was correlated with the *in vitro* release property. 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.

備考 : 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意 : 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).