

学 位 論 文 題 名

ハイドロキシアパタイトを担体とした

エリスロポエチン徐放性製剤の開発

学位論文内容の要旨

近年、慢性腎臓病 (Chronic Kidney Disease : CKD) という病気の概念が提唱され、注目されている。CKDとは、糸球体ろ過量が健康な人の60%以下に低下するか、あるいはタンパク尿が出るといった腎臓の異常が一定期間以上続く状態の総称である。放置したままにしておくと、末期腎不全となり人工透析や腎移植が必要となってくる。現在、日本には約1,330万人 (成人の約8人に1人) のCKD患者がいると言われている。人工透析を受けている患者数は26万人を超えており、その数は毎年1万人ずつ増え続けている。

造血作用を有するerythropoietin (EPO) は主に腎臓で産生されるため、腎機能の低下に伴い高頻度でEPO欠乏性の貧血を併発し、腎性貧血と言われている。腎性貧血のみならず、悪性腫瘍やリウマチといった様々な原因による貧血においてrecombinant human EPOが静脈内投与または皮下投与されており高い治療効果を示している。しかし、投与されたEPOは速やかに排泄されるため、貧血でない状態を維持するためには1週間に3回の投与を繰り返す必要があり、患者のみならず医療現場にとっても大きな負担となっている。このことからdrug delivery system (DDS) の手法を用いた投与頻度を軽減できるシステムの開発が期待されている。

DDS研究では、これまでpoly (lactic glycolic acid)、ポリエチレングリコール、ヒアルロン酸、ゼラチンなどの高分子ポリマーがEPOの担体としてしばしば用いられてきた。しかし、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題がいくつかある。そこで、新たな担体としてハイドロキシアパタイト (HAp) に着目した。HApは多孔性であり、多様な物質を吸着・保持する性質を有することから、さまざまな物質の徐放性製剤の担体として利用されている。本研究ではHApを担体としたEPO徐放性製剤の開発を試みた。

まずHApがEPO徐放性製剤の担体として有効であるか否かについて検討を行った。HApを担体とした5種類の方法によってのEPO徐放性試料を調製し (未処理試料、亜鉛 (Zn) 処理試料、Zn/Poly lactic acid (PLA) 処理試料、焼結/Zn/PLA処理試料、PLA処

理試料)、健常マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中EP0濃度の測定を行うことにより、EP0単独投与より長い造血持続効果を有する試料を検索した。その結果、未処理試料を除く4つの試料では、投与後に造血のピークに達した日数が延長し、ピーク時およびピーク後の血液学的パラメータがEP0単独投与群と比較して高い値で推移する傾向が認められた。また、Zn処理試料投与群では血漿中EP0の検出期間が延長した。Zn/PLA処理試料投与群では同様に血漿中EP0の検出期間が延長したことに加え、投与1日後の血漿中EP0濃度が大きく減少した。これは、初期過剰放出が軽減されたことによると考えられた。

次に、EP0単独投与と比較して徐放効果が高い試料について、腎性貧血モデル動物を用いて持続的貧血改善効果を有するか否かについて検討した。血漿中EP0濃度がより長期間検出された2種類の試料(Zn処理試料、Zn/PLA処理試料)を腎性貧血モデルであるICGNマウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中EP0濃度の測定を行うことにより、EP0単独投与より長い貧血改善効果が得られるか否かを検討した。その結果、EP0単独投与群の血液学的パラメータは投与7および14日後では、投与前と同等の値であり、投与21日後には低下傾向が見られた。投与7日後には造血効果はすでに消失し、投与前の状態に戻っていると考えられた。一方、Zn処理試料およびZn/PLA処理試料投与群では、投与後の血液学的パラメータのピークは投与7日後に見られ、その後徐々に減弱していったが、投与21日後においてもEP0単独投与群と比較して優位に高い値を維持していた。血漿中EP0はEP0単独投与群では投与7、14および21日でいずれも検出されなかったが、Zn/PLA処理試料投与群では投与7日後まで、Zn処理試料投与群では投与14日後まで検出された。試料周囲の病理組織学的検査では、投与21日後まで背部皮下に担体が残存していたものの、担体周囲に見られた組織反応は、異物処理反応が主体であった。

以上のことから、Zn処理試料およびZn/PLA処理試料は持続的な貧血改善効果を有すると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 安居院 高 志

副 査 教 授 伊 藤 茂 男

副 査 教 授 滝 口 満 喜

副 査 准教授 佐々木 宣 哉

学 位 論 文 題 名

ハイドロキシアパタイトを担体とした エリスロポエチン徐放性製剤の開発

腎性貧血は医学及び獣医学領域において発生頻度の高い重要な疾患の一つである。腎性貧血の治療法としては、リコンビナントエリスロポエチン（EPO）を投与する方法が一般的であるが、EPO の分解が速いため、十分な血中濃度を維持するためには週 3 回の投与が必要である。これは患者及び患者・飼主にとって大きな負担となっている。申請者は、これを解決するために、EPO の徐放製剤の開発を行った。

申請者は徐放製剤の担体として、ハイドロキシアパタイト（HAp）に着目した。HAp は多孔性で様々な物質を吸着・保持する性質を有し、生体による異物反応が少なく、徐々に分解され消失するという性質を有している。申請者は 5 種類の EPO 吸着 HAp 製剤を作製し、それらを ICR マウス皮下に投与し、造血及び種々の副作用について検討を行った。その結果、亜鉛を処理した HAp 試料（Zn-HAp）、及びそれを更にポリ乳酸（PLA）でコーティングした試料（Zn/PLA-HAp）の 2 つが最も持続的な造血作用と、持続的な血中 EPO 濃度の上昇を示し、特に顕著な副作用も見られなかった。これらの結果より、申請者は Zn-HAp と Zn/PLA-HAp が EPO の徐放製剤担体として有効であるとの結論に至った。

次に、申請者は上記 2 つの EPO 徐放製剤の有効性を検証するために、遺伝的に腎不全を呈する ICGN マウスから腎性貧血モデルを作製し、このモデルに上記 2 製剤を皮下投与した。上記 2 製剤ともに EPO 単独投与に比べ、有意に持続的な貧血改善効果がみられ、血中 EPO 濃度も有意に高値で持続した。更に、特に顕著な副作用も観察されなかった。これらの結果より、申請者は Zn-HAp もしくは Zn/PLA-HAp は、EPO の徐放製剤の担体として有効であり、これらの EPO 徐放製剤は臨床的にも十分利用可能である事を示した。

以上一連の研究成果は獣医学の分野において一定の水準を超えたものと判断された。よって、審査員一同は、上記博士論文提出者、長崎健一君の博士論文は、北海道大学大学院獣医学研究科規定第 6 条の規定による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。