HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Development of Microfluidic Devices to Accelerate Clinical Application of Lipid-Based Nanomedicines [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	澤田, 由佳
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(工学)
Dissertation Number	甲第15416号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89856
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	SAWADA_Yuka_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（工学）　　氏名　澤田 由佳

学位論文題目

Development of Microfluidic Devices to Accelerate Clinical Application of Lipid-Based Nanomedicines
（脂質ナノ粒子製剤の臨床応用を加速化するマイクロ流路デバイスの開発）

脂質ナノ粒子とは、脂質から構成されるナノメートルサイズの粒子の総称であり、生体適合性の高さに加えて、水溶性および難溶性の薬物を搭載できる特性を持つために、医薬品や化粧品などの幅広い分野で注目されている。脂質ナノ粒子の調製方法として、近年注目を集めている技術がマイクロ流路デバイスを用いた有機溶媒希釈法（以下、マイクロ流路法）である。マイクロ流路法を用いることで、従来の調製法よりも再現性良く、高い粒子径制御が可能となった。しかし、製薬企業などの医薬品開発現場では、調製される脂質ナノ粒子の品質だけではなく、さらに 2 つの課題を解決する必要がある。1 つ目は、医薬品開発初期の脂質ナノ粒子の組成および物性の最適化である。脂質ナノ粒子は、複数の異なる機能を持つ脂質によって構成されており、脂質の種類、脂質の組成比率、および粒子物性が、標的部位への送達効率や生体内動態、搭載している核酸の有効性に大きく影響を与えることが報告されている。そのため、脂質ナノ粒子医薬品の開発成功率の向上やより効果の高い医薬品を開発するためは、脂質ナノ粒子を構成する脂質組成の最適化が不可欠である。2 つ目は、医薬品開発後期における脂質ナノ粒子の大量生産である。マイクロ流路法は、フロープロセスのため連続生産が可能であり、従来法よりもスケールアップ時の調製条件検討の省力化が期待できる。一方で、脂質ナノ粒子の調製においては新規技術であり、大量生産法は確立されていない。近年、マイクロ流路デバイスの並列化や積層化、および送液の高流量化などの大量生産を目指したプロセス開発が進んでいるが、高濃度脂質溶液を用いた大量生産に関してはほとんど検討がなされていない。これは、高濃度脂質溶液を用いた粒子作製では、脂質ナノ粒子同士が凝集しやすく、目的の粒子径の脂質ナノ粒子を調製することが難しいためである。従来の作製法においても、これらの 2 つの課題は、脂質ナノ粒子医薬品開発フローにおける障壁となっている。そのため、マイクロ流路法によって、これらの課題を解決することができれば、初期段階から大量生産段階まで、一気通貫かつ迅速に脂質ナノ粒子医薬品を開発することができる。

本学位論文では、脂質ナノ粒子製剤開発における一連の課題をマイクロ流路デバイスによって解決し、脂質ナノ粒子製剤の開発および臨床応用の加速化を目指した。本学位論文は全 5 章から構成されている。各章の概要を以下に示す。

第 1 章では、序論であり、本研究の背景および目的について述べた。

第 2 章では、オンデバイスで脂質ナノ粒子の脂質組成を効率よく探索するためのマイクロ流路デバイスを設計し、その概念実証を行った。設計したデバイスは、脂質ナノ粒子の組成をデバイスに送液する脂質溶液の比率によって簡便に制御することができ、調製した粒子は従来のマイクロ流路法で調製した脂質ナノ粒子と同様の物性を示した。脂質組成割合および表面修飾剤の添加量が異なる脂質ナノ粒子を調製に応用した結果、本デ

バイスを用いることで、1 回の原料溶液の仕込みだけで、１０条件以上の組成が異なる粒子を調製可能であった。培養細胞を用いて、調製した脂質ナノ粒子の標的遺伝子のノックダウン活性を評価した結果、粒子の組成および物性差に依存した活性の違いが確認された。これらの結果から、開発したマイクロ流路デバイスを用いることで、オンデバイスで簡便に脂質組成の探索および最適化が可能となり、脂質ナノ粒子製剤の開発初期段階の課題解決に成功した。

第 3 章では、高濃度脂質溶液を用いた脂質ナノ粒子調製において、ろ過滅菌が可能であり、また既承認製剤で用いられている粒子径（100nm 前後）程度に小さい粒子径の脂質ナノ粒子の調製を可能とする因子の解明に取り組んだ。4 種のマイクロ流路デバイスを用いて調製した脂質ナノ粒子の物性を比較した結果、高濃度脂質溶液原料を用いて小さい粒子を調製するためには、2 つの因子が影響している可能性が示唆された。1 つ目の因子は、有機溶媒の希釈速度であり、迅速に溶媒を希釈できる条件において、より小さな粒子を調製可能であった。2 つ目の因子は、水相と有機溶媒相の液-液界面積であると考えられた。液-液界面積が広いほど、脂質ナノ粒子形成過程の中間体や粒子同士の融合を抑制でき、小さい粒子が調製可能であることが推察された。これら仮説を検証するために、有機溶媒を希釈する水相の流路数を増やして液-液界面積を増加させたマイクロ流路デバイスを開発した。新たに開発したデバイスで脂質ナノ粒子を調製して、粒子物性の比較評価を行った結果、液-液界面積の増加によって、同じ調製条件であっても脂質ナノ粒子の粒径が小さくなった。これらの結果から、高濃度脂質溶液用いた脂質ナノ粒子調製において、粒子同士の融合を抑制できるデバイス設計指針を明らかにし、マイクロ流路法による脂質ナノ粒子の大量生産の実現可能性を示した。

第 4 章では、高濃度脂質溶液を用いてモデル薬物（パクリタキセル）を搭載した脂質ナノ粒子を調製し、粒子の物性および構造、そして薬物活性の評価を行った。水相と有機溶媒相の流量比（FRR）と脂質濃度を変化させて粒子を調製した結果、いずれの条件においても 120 nm 以下の脂質ナノ粒子を調製可能であった。また、FRR が大きい条件においてパクリタキセルの回収率が高くなることが明らかとなった。粒子の内部構造は、小角 X 線散乱と透過型電子顕微鏡によって評価した。その結果、脂質ナノ粒子は、低濃度脂質溶液では単層膜構造であり、高濃度脂質溶液では多層膜構造を示すことが明らかとなった。また、中間の脂質濃度条件においては、FRR が膜構造の枚数に影響することが分かった。薬物放出試験の結果、膜構造が多いほど放出速度は緩やかになり、また、薬物放出試験後期のパクリタキセル放出挙動には脂質膜の流動性が影響を与えることが示唆された。培養細胞を用いた薬物活性の評価においても、膜構造が異なる脂質ナノ粒子の薬物放出挙動の違いに対応した薬物活性を確認した。これらの結果から、マイクロ流路法のよって、脂質組成は同一でありながら、脂質溶液の濃度によって粒子の膜構造を制御し、薬物放出挙動および活性が異なる脂質ナノ粒子製剤を作り分けられることを見出した。

第 5 章では、本論文の総括および本研究の将来性について述べた。マイクロ流路デバイスによって、高効率に脂質ナノ粒子の処方スクリーニングが可能となり、従来法よりも短期間で、脂質組成が最適化された脂質ナノ粒子を開発する手法を提案した。高濃度脂質溶液を用いた研究においては、粒径が制御された脂質ナノ粒子を調製するためのマイクロ流路構造に関する設計指針を見出し、高濃度脂質溶液を用いた粒子の大量生産の実現可能性を示した。また、脂質溶液の濃度が、脂質ナノ粒子の物性および薬物活性に与える影響を明らかにした知見はこれまでに例がなく、粒子物性および薬物活性をより精密に制御するための礎を築くことができた。本研究によって、脂質ナノ粒子製剤の開発初期から大量生産までの製剤開発プロセスに応用できるマイクロ流路デバイスの開発に成功し、これによって脂質ナノ粒子製剤の製品化および臨床応用が加速することで、脂質ナノ粒子医薬品の更なる普及と発展に繋がることが大いに期待される。