ラット癌性腹膜炎におけるカルボプラチン含有 α -リン酸
三カルシウム細粒の腹腔内投与における基礎的検討植田拓也・水野 勇^{*1)}、四ツ柳智久^{*2)}、真辺忠夫^{*1)}、中村 聡^{*3)}

Intraperitoneal administration of α -tricalcium phosphate particles incorporated with carboplatin in rats bearing abdominal carcinomatosis

We used the possibility of α -tricalcium phosphate(α -TCP) particles incorporated with carboplatin(CBDCA) as a drug carrier using a rat experimental model of AH-130 abdominal carcinomatosis. α -TCP is known to have excellent biocompatibility and biodegradable and its chemical properties are similar to hydroxyapatite. The α -TCP particles used in this study was 50-150 μ m in diameter, which seemed to offer adequate space to incorporate drug. We studied the biodegradation behavior of the particles in the abdominal cavity and the distribution kinetics of platinum(Pt) in serum, ascites, and various organs following ip administration. The α -TCP particles were predominantly taken up in the milky spot of greater omentum in a few days, and dissolved gradually in six months, during which no adhesion and side effects were observed. The Pt levels in ascites and the greater omentum were higher in the α -TCP-CBDCA ip group from 0.5 to 168 hours than those in the free-CBDCA ip and iv groups. The Pt levels in serum were almost the same both in the α -TCP-CBDCA ip and the free-CBDCA ip, but those in organs were lower in the α -TCP-CBDCA ip.

These results suggest that the localization of CBDCA may be enhanced by using porous α -TCP particles as a drug delivery carrier and may be allow for the drug to contact with cancer cells for extended times.

Takuya Ueda・Isamu Mizuno^{*1)},
Toshihisa Yotsuyanagi^{*2)}, Tadao Manabe^{*1)},
Satoshi Nakamura^{*3)}

key words : α -tricalcium phosphate, drug carrier,
carboplatin, abdominal carcinomatosis,
intraperitoneal administration

腹膜播種は進行消化器癌における手術時の非治癒因子であるばかりでなく再発形式としても多い。しかし現在その治療法は確立されておらず、延命効果さえ期待しにくい予後不良因子である。腹膜播種に対する治療法としてこれまで各種抗癌剤が試みられ、またその投与方法も全身投与のみならず腹腔内投与といった drug delivery system の手法が施行されてはきたが、成績は良好とはいえない。この原因として、腹腔内に投与された薬剤は腹膜より急速に吸収されて全身の血液循環系に乗り、腎臓などより容易に体外に排除されるためと思われる。つまり抗癌効果をあげるために必要な薬剤濃度を、必要な時間局所に保持することができないと推測される。そこで筆者らは新たな drug carrier を用い、抗癌剤を徐放化して腹腔内に高濃度に留め薬剤の濃度・時間係数(area under the curve, 以下 AUC)をあげることを検討した。

drug carrier には生体親和性にすぐれた水酸アパタイト^{1,2)}類似の α -リン酸三カルシウム(α -tricalcium phosphate, 以下 α -TCP)細粒を用い、その腹腔内における組織変化、局在性・生体親和性や副作用を検討した。つぎに白金系抗癌剤 carboplatin(CBDCA)を α -TCP 細粒に封入して徐放化抗癌剤 α -TCP-CBDCA を調整し、癌性腹膜炎モデルへの腹腔内投与による CBDCA の体内

^{*1)} First Department of Surgery, Medical School, ^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University ^{*3)} 名古屋市立大学医学部第一外科, ^{*2)} 同薬学部製剤学

^{*3)} Institute for Medical and Dental Engineering, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学医用器材研究所無機材料部門

Offprint requests to : Takuya Ueda, M.D., First Department of Surgery, Nagoya City University, Medical School, 1 Kawasumi, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467

図1 Electromicrograph of α -TCP particles
 α -TCP particles have numerous micropores, 1-
 3 μm on the surface (— 20 μm)

動態などについて基礎的に検討した。癌性腹膜炎モデルには、Donryu rat を用い AH-130 腹水肝癌細胞の腹腔内移植による癌性腹膜炎モデルを作製し検討した。

対象と方法

(1) α -TCP 細粒の作製法と性状

実験に使用した α -TCP 細粒は以下のように作製した。まず水酸化カルシウム懸濁液中にリン酸水溶液を滴下し、TCP 組成のスラリーを得た。得られたスラリーを spray dry 法により造粒乾燥し、ふるいにより分級して 74~149 μm の大きさの粉末を選別した。これを大気中で 1200°C で 3 時間加熱後急冷し、 α -TCP 粉末を得た。50% 平均粒子径は 90 μm であった。

TCP ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) には 4 種類の多形が存在するが、 α 型は高温型で 1135°C 以上 1470°C 以下で安定な物質であり、急冷することにより室温でもその構造を保持することができる。 α -TCP の結晶構造は骨の無機成分である水酸アパタイト (以下 HAp) に類似しており、加水分解により HAp になりやすいが、HAp に比べて溶解度が大きく、皮下に埋め込んだ実験でも吸収速度が約 2~10 倍速いと報告されている³⁾。

電子顕微鏡像では、 α -TCP 細粒は表面に無数の小孔を有する凹凸不整な球状物質であった。小孔の直径は 1~3 μm で、割面で見ると小孔は α -

TCP の内部へ入り込み空洞となっていた。この小孔が α -TCP 細粒の表面積や空隙率を高めているものと考えられた (図 1)。

(2) α -TCP 細粒腹腔内投与における肉眼的・組織学的および血液生化学的变化

α -TCP 細粒を drug carrier として用いる際、本剤の腹腔内投与における安全性と生体内、特に腹腔内での変化と臓器に及ぼす影響を検討した。

α -TCP 細粒 200 mg を生理食塩水 3 ml に溶解度、6 週齢・約 200 g・雄性 Donryu rat の腹腔内に投与し、その後 6 カ月までの肉眼的および組織学的変化を観察した。組織学的には hematoxylin-eosin 染色により大網を経時的に採取し検討した。また同時に腹部大動脈から採血し、副作用に関し血液生化学検査も検討した。

(3) α -TCP-CBDCA の製法方法について

α -TCP-CBDCA の作製は以下の方法により無菌的に調製し製剤化した。滅菌した 200 mg の α -TCP 細粒を注射用バイアルに各々入れ、これに注射用蒸留水に溶解した 16 mg/ml の CBDCA 水溶液を 0.25 ml ずつ注入した。CBDCA 溶液が十分に α -TCP 細粒内の空隙に浸透するよう強く攪拌させた後、このバイアルを freeze drying chamber に入れ凍結乾燥した。これにより α -TCP-CBDCA 1 vial は、200 mg の α -TCP 細粒と 4 mg の CBDCA を含有した。

(4) α -TCP-CBDCA の徐放効果

前述した α -TCP-CBDCA の腹腔内投与 (α -TCP-CBDCA ip) における CBDCA の血中濃度、腹水中濃度、臓器内濃度を Donryu rat の癌性腹膜炎モデルを用い原子吸光光度計によりプラチナ (Pt) 濃度を経時的に測定した。血清・腹水は 1 ml 中の Pt 濃度を測定し、各種臓器を採取し各薬剤投与後 1 時間、1 日の臓器 1 g 中の Pt 濃度を測定した。対照として、CBDCA 4 mg の腹腔内投与群 (free-CBDCA ip) および同量の静脈内投与群 (free-CBDCA iv) における濃度と比較検討した。

ラット癌性腹膜炎モデルは、6 週齢・約 200 g・雄性 Donryu rat と、AH130 腹水肝癌細胞 (東北大学抗酸菌病研究所附属癌細胞保存施設 工藤俊雄助教授より供与された) を用い以下のように準

図 2 Pathological findings of greater omentum of normal rat, 1 week after ip administration ($\times 40$)
 α -TCP exist in greater omentum like island.

図 3 Pathological findings of greater omentum of normal rat, 1 week after ip administration ($\times 200$)
 α -TCP was trapped in milky spots of greater omentum.

備作製した。

AH130 細胞を Donryu rat 腹腔内にて継代培養し、7～10 日後にエーテル麻酔下で rat の腹腔を開腹して癌性腹水を採取した。0.2% trypan blue にて染色し、腫瘍細胞の viability が 95% 以上であることを確認後、pH7.4 リン酸緩衝液を加え 1.0×10^7 個/ml とした。その 1 ml を新たに rat 腹腔内に移植し、腫瘍細胞移植後 7 日目の rat を AH130 癌性腹膜炎モデルとして使用した ($n=6$)。

結 果

(2) α -TCP 細粒腹腔内投与における肉眼的・組織学および血液生化学的变化
 投与後 3 日目の腹腔内の肉眼所見では、 α -TCP

図 4 Platinum concentration changes in ascites according to various administration routes of carboplatin in AH-130 rats
 Each experiment: $n=6$

は白色の結節もしくはびまん性の点状となり存在した。局在では大網表面に多く付着し、ついで腸間膜、肝表面、腹膜、gonadal fat (Douglas 窩) の順に認め、他の部位には存在しなかった。移植 7 日後では α -TCP 細粒は大網などの表面より埋没しはじめ、1 カ月後には α -TCP 細粒自体の白色調が薄れ組織と同化した。肉眼的には 6 カ月後には消失していた。

大網の組織学的所見では、投与後 3 日目以降で α -TCP 細粒は散在性に島状に存在した (図 2)。強拡大では、大網において α -TCP 細粒は円形の管腔に取り込まれていた。その腔は最内層に内皮細胞が認められ、また腔内に赤血球などが認められないことよりこれはリンパ管と考えられた。つまり個々の α -TCP 細粒は大網のリンパ管内に取り込まれたと思われる (図 3)。

大網内でリンパ管に富む部位は milky spot であり、一方 α -TCP 細粒の島状の集簇様式からも、 α -TCP 細粒は大網の milky spot に捕捉されたものと思われた。炎症細胞浸潤は 7 日までは軽度存在したがそれ以降では消退した。 α -TCP 細粒自体は徐々に形態を崩しつつ縮小し 6 カ月後では大部分消失していた。

副作用検査として α -TCP 細粒投与後 3 日、7 日、1 カ月に測定した血液生化学的検査では特に異常は認められなかった。

図 5 Tissue distribution of Pt in AH-130 rats, one and 24 hours after administered with different routes

図 6 Platinum concentration changes in greater omentum according to various administration routes of carboplatin in AH-130 rats

Each experiment : n=6

(4) α-TCP-CBDCA の徐放効果

血清中の Pt 値は、α-TCP-CBDCA ip 群では他群に比し 30 分までの最高 Pt 値は低値で、30 分より 3 時間まではやや高値を示したが以後差は認めなかった。

腹水中の Pt 濃度に関して、α-TCP-CBDCA ip 群は free-CBDCA ip 群に比べ 30 分以内は低値であったが、1 時間以降 7 日 (168 時間) までは有意に高値であった ($p < 0.05$)。また free-CBDCA iv 群は上記二者より常に低値を示した ($p < 0.01$) (図 4)。

臓器内濃度では、大網・腹膜を除き採取したす

表 1 AUC(area under the curve) with various administration in AH130 rats

Treatment	AUC(µgh/ml)		
	Serum (Fold-enhancement)	Ascites (Fold-enhancement)	G. Omentum (Fold-enhancement)
α-TCP-CBDCA ip	27.4 (1.3)	193.9 (8)	706.1 (14.4)
free-CBDCA ip	34.6 (1.6)	74.2 (3)	140.5 (2.9)
free-CBDCA iv	21.8 (1)	24.2 (1)	49.0 (1)

べての臓器で α-TCP-CBDCA 投与群は free-CBDCA の他群に比し低値を示した (図 5)。一方、大網内 Pt 濃度は α-TCP-CBDCA ip 群は他群にくらべ、30 分以降 7 日 (168 時間) まで高値であった ($p < 0.01$) (図 6)。

血清 Pt 濃度の AUC は α-TCP-CBDCA ip 群 : free-CBDCA ip 群 : free-CBDCA iv 群の順に、27 : 35 : 22 (µg · h/ml) でその比は 1.3 : 1.6 : 1 と差は認めなかった。一方腹水 Pt 濃度の AUC は、194 : 74 : 24 (µg · h/ml) でその比は 8.0 : 3.1 : 1 であり α-TCP-CBDCA ip 群が高く、さらに大網内では、706 : 140 : 49 (µg · h/ml) でその比は 14.4 : 2.9 : 1 であり、徐放化製剤 α-TCP-CBDCA は腹腔内投与後の Pt 濃度を大網内に長時間高値に維持させることができた (表 1)。

考 察

α -TCP 細粒は(2)の実験で示したように、腹腔内投与においても癒着や強い炎症反応は惹起せず、組織との同化傾向を示した。また6カ月後では大部分が消失していた。これらより α -TCP 細粒は生体親和性にすぐれ、biodegradable な物質であるといえる。この組織との適合性は、血液生化学検査上で毒性や副作用のないことから裏付けられた。

腹腔内投与時の局在性に関しては、 α -TCP 細粒はその多くが大網の milky spot に取り込まれていた。milky spot とは、大網に多く存在するリンパ管末端の腹水・異物吸収機構の入り口であると考えられている。この入り口にマクロファージ・リンパ球が集簇しており、炎症が起こるとマクロファージなどの炎症細胞がこのリンパ管末を通り腹腔内へ動員されるなど免疫にも関与する⁴⁾。腹腔内に播種された癌細胞は、この大網内の milky spot に多く取り込まれる⁵⁾。しかし捕捉されることなく生き残った癌細胞は大網で腫瘍結節をつくり、またリンパ管内へと入り込み、全身へ転移していく経路にもなりうる。

図4で示したように、 α -TCP 細粒は大網の milky spot に多く取り込まれ癌細胞と同様の局在性を示すことから、細粒から放出された薬物と癌細胞を効率よく接触させることができると考えられる。換言すれば腹腔内投与された α -TCP 細粒は、癌腫の多く存在する部位に向かうすぐれた targeting 性をもつことを意味する。またこれは大網に限らず、つぎに多く取り込まれる腸間膜、腹膜、gonadal fat (Douglas 窩) などでも同様のことが考えられる。これらの点からも α -TCP 細粒は合理的な drug carrier といえ、腹膜播種の防止と治療にも期待できるものと思われる。(4)の実験からは α -TCP 細粒に CBDCA を含有させた α -TCP-CBDCA は、腹水中などで free-CBDCA 群

より長時間にわたり高濃度を持続させ CBDCA の徐放効果を認めた。一方、血清中では一過性の高濃度は認めず緩徐な濃度変化を示したことより、全身に対する毒性、特に骨髄抑制や腎機能障害など CBDCA の副作用の低いことが予想された。

臓器内濃度については、腹腔内臓器でも肝・脾などは低値であった。逆に大網・腹膜・腹水など癌性腹膜炎時に癌腫の標的となる臓器に関しては高濃度であり targeting 効果も認められた。

以上より CBDCA の局在は α -TCP 細粒を使用することによって control release と targeting の両効果が得られるものと推測された。

結 語

α -TCP 細粒は生体親和性にすぐれ、腹腔内投与による副作用がなく薬剤の徐放化も得られることより、すぐれた drug carrier となりうると考えられ、将来の臨床応用も期待される。

文 献

- 1) Mohri N, Mizuno I, Manabe T et al.: Intraperitoneal administration of carboplatin-loaded hydroxyapatite particles in rats bearing AH130 carcinomatous peritonitis. 1st. Int. Gastric Cancer Congress 2: 1647-1651, 1995.
- 2) Mizuno I, Yamamoto T, Yotsuyanagi T et al.: Intraperitoneal administration of lentinan loaded hydroxyapatite particles as a drug carrier in rats bearing carcinomatous peritonitis. Artif. Organs Today 3: 185-192, 1994.
- 3) 秦 美治, 青木秀希, 赤尾 勝・他: 経皮的に埋入したハイドロキシアパタイト, β -リン酸カルシウム及びガラス状カーボン周囲の組織反応. 人工臓器 18: 88-91, 1989.
- 4) 米村 豊: 腹膜播種形成の超微形態学的検討. 腹膜播種, pp.7-17, へるす出版社, 東京, 1996.
- 5) Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K et al.: Milky Spots as the Implantation Site for Malignant Cells in Peritoneal Dissemination in Mice. Cancer Research 53: 687-692, 1993.