水酸アパタイト細粒を drug carrier とした徐放化 carboplatin の腹腔内投与の基礎的検討と癌性胸膜炎の 防止と治療を目指した臨床応用

水野 勇^{*1,3)}, 毛利紀章^{*1)}, 四ツ柳智久^{*2)}, 中村 聡^{*4)}, 真辺忠夫^{*1)}

Intraperitoneal administration of carboplatin-loaded hydroxyapatite particles as a drug carrier in rats and prophylaxis and treatment of pleural carcinomatosis for the purpose of clinical application

Hydroxyapatite (HAp) particles has excellent compatibility with human tissue and can be safely administered into the peritoneal cavity of rats with no significant complications (Artif. Organs Today 3: 185-192, 1994). We explored the possibility of HAp as a drug carrier for carboplatin using AH130 abdominal carcinomatosis. HAp particles are biodegradable following intraperitoneal administration (i. p.) and were taken up especially in greater omentum.

The pharmacokinetics of HAp-CBDCA were examined using Donryu rat models with AH130 abdominal carcinomatosis. The platinum (Pt) levels in serum and ascites were higher in HAp-CBDCA i. p. than free-CBDCA i. v. groups. HAp-CBDCA i. p. were effective in prolonging the survival of rats model with AH130 abdominal carcinomatosis. HAp-CBDCA administration was experimentally confirmed to be safe.

For the clinical application, HAp-CBDCA (HAp-particles: 5 g, CBDCA: 150 mg) was administered into the pleural cavity (i. pc.) at operation on the two advanced esophageal cancer and the pharmacokinetics of CBDCA were also examined. The serum levels of Pt were higher in the HAp-CBDCA (i. pc.) from 5 minute to 30 minute than those in the free-CBDCA (i. pc.). These results demonstrated the

efficacy of HAp particles as a drug carrier for anticancer drugs, with ultimate improvement in overall survival.

Isamu Mizuno^{*1,3)}, Noriaki Mohri^{*1)},
Toshihisa Yotsuyanagi^{*2)}, Satoshi Nakamura^{*4)},
Tadao Manabe^{*1)}

key words : hydroxyapatite particles, drug carrier,
carboplatin, pleural carcinomatosis

進行消化器癌の外科的治療では、癌の病巣が進行するに伴い、術後に腹膜転移・播種、肝転移、リンパ節転移再発などをきたす危険性がより高くなり、予後も不良となる。このうち、特に腹膜転移・播種は、手術時の非治癒因子となるばかりでなく、進展すると癌性腹膜炎、癌性胸膜炎へと移行する。したがって、この進行消化器癌の外科的治療成績向上のためには、術後の腹膜転移・播種の防止と治療がきわめて重要といえる。この腹膜播種・転移、癌性腹膜炎、癌性胸膜炎の防止と治療を目指して、抗癌剤を直接、腹腔内、胸腔内に投与して高濃度かつ長時間作用させるために、drug carrier として biodegradable な水酸アパタイト (HAp) 細粒を用い徐放化 Carboplatin を製作・調整し、臨床応用を目指して検討してきた。さらに、進行食道癌例の手術に際し、術後縦隔内再発の防止を目指して臨床応用を試みた。

材料と方法

(1) HAp 細粒の作成法と性状

実験に使用した HAp 細粒は、Ca(OH)₂ の懸濁液と H₃PO₄ の水溶液を室温下に 24 時間反応させたのちに熟成を行い、得られた沈澱物を濾過し

^{*1)} First Department of Surgery, School of Medicine, ^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University ^{*3)} 名古屋市立大学医学部, ^{*4)} 同 薬学部

^{*3)} Nagoya City Midori Municipal Hospital 名古屋市立緑市民病院外科

^{*4)} Institute for Medical and Dental Engineering, Tokyo Medical and Dental University 東京医科歯科大学医工器材研究所

Offprint requests to : Isamu Mizuno Ph.D., Nagoya City Midori Municipal Hospital, 1-77 Shiomigaoka, Midori-ku, Nagoya 458-0037

図1 Scanning electronmicrograph of HAp particles

spray dry 法にて乾燥し、さらに約 800°C にて 3 時間かけて焼成し作成した。HAp 細粒は肉眼的には白い粉末で、光学顕微鏡では透光性はなくほぼ球形の粒子としてみられる。電子顕微鏡では、表面は凹凸不平整像で micropore を多数認め、1 g あたり約 2.5 m² と広い表面積を有する。HAp 細粒の粒度分布をレーザー回折法にて測定した結果、その粒度分布は 23~59 μm の間に 73.6% を占め、平均粒子径は 36.1 μm であった(図 1)。

(2) HAp 細粒の腹腔内投与による組織学的、血液生化学的变化

HAp 細粒の腹腔内投与後の組織学的変化および血液生化学的变化について検討するため、HAp 細粒 200 mg と生理食塩水 0.5 ml を約 200 g の雄性呑竜ラットの腹腔内に投与した。その後、経日的に腹腔内の組織学的変化を観察すると同時に腹部大動脈から採血し、血液生化学的变化についても検討した。

(3) HAp-Carboplatin(CBDCA)の調整法

滅菌した HAp 細粒 200 mg を入れた注射用 vial に、蒸留水を用い溶解した 10 mg/ml の CBDCA 溶液を 0.4 ml ずつ注入した。CBDCA 溶液が十分に HAp 細粒の micropore に浸透するよう強く攪拌し、この vial を freeze drying chamber に入れて凍結乾燥した。調整された HAp-CBDCA の 1 vial には、HAp 細粒を 200 mg と、CBDCA を 4 mg が含まれるようにした。

(4) HAp-CBDCA の徐放効果

HAp 細粒 200 mg と CBDCA 4 mg を含む HAp-CBDCA と free-CBDCA 4 mg を、AH130 ラット癌性腹膜炎モデルの腹腔内に投与し、経時的に腹水を採取し、そのプラチナ(Pt)濃度を原子吸光光度計にて測定し、free-CBDCA の腹腔内投与群(i. p.)および静脈内投与群(i. v.)と比較した。また、同様の投与量にて大網をはじめ、各種臓器の Pt 濃度の推移も経時的に測定し比較検討した。

(5) HAp-CBDCA の抗腫瘍効果

AH130 癌細胞を用い、1×10⁷個をラット腹腔内に移植して 1 週間後に移植ができたことを確認し、ラット癌性腹膜炎モデルを作成した。HAp-CBDCA (HAp 200 mg, CBDCA 4 mg)の腹腔内投与による治療効果を検討するため、下記の 4 群について、① control 群(生理的食塩水)、② HAp 単独群、③ free-CBDCA 群、④ HAp-CBDCA 群の各群 6 匹を用い、60 日間観察し死亡の原因、合併症などを調べ、生存率を検討した。

(6) HAp-CBDCA の臨床応用

臨床応用として進行食道癌症例の術後縦隔内再発の防止を目指して、基礎的に HAp-CBDCA の i. p. の安全性、徐放効果、治療効果が確認できたので、患者のインフォームド・コンセントを得て臨床応用を試みた。臨床応用の方法としては、freeze-dry 法にて無菌的に調整した HAp-CBDCA はいつでも簡便に使用できるように、HAp 細粒を 1 g ごと無菌的にバイアル瓶に入れ、使用時に CBDCA 溶液を注入し、混和して使用するようにした。

実際には 2 例の進行食道癌切除後の閉胸時に、HAp-CBDCA (HAp 細粒 5 g, CBDCA 150 mg) を約 50 ml の生理的食塩水に溶解し、縦隔内に散布した。投与後、1 分から 7 日まで経時的に血中 CBDCA の推移をみるために末梢血液を採取し、遠心分離して血清を採取し血中結合型 Pt 濃度を、さらに採取した血清を amicon 社製 CENTRIFREE の Micropartition Device の濾過スピッツを用い遠心分離し、蛋白を除去して遊離型 Pt 濃度を測定した。また、free-CBDCA の

図2 Histological findings on days 3 and 28 after intraperitoneal administration of HAp particles

A(day 3): Lymphocyte are clustered around HAp particles. (H & E, $\times 400$)

B(day 28): HAp particles are surrounded by fibroblast, with seeming integration with the peritoneum. (H & E, $\times 400$)

150 mg を同様な方法にて縦隔内に投与した症例と、末梢血中 Pt 濃度の推移を比較した。

結 果

(1) HAp 細粒の腹腔内投与による組織学的、血液生化学的变化

HAp 細粒の腹腔内投与後の1週間の所見では、腹腔内に癒着は認めなかったが、HAp 細粒は大網、腸間膜、腹膜などに島状に散在していた。投与後3日の顕鏡の強拡大では、HAp 細粒の周囲にリンパ球の浸潤を軽度と認めたが、28日後には大網や腸間膜のリンパ管末端である milky spot に取り込まれていた(図2)。また、ヘモグロビン量、赤血球数、白血球数、血小板数の軽度の変化を認めたが、Alb, TB, BUN, Cre, Na, Cl, Ca などの

図3 Ascites levels of Pt in the HAp-CBDCA i.p. and free-CBDCA i.p., i.v. groups

血液生化学検査では、有意の変化は認めなかった。

(2) HAp-CBDCA の徐放効果

腹水中 Pt 濃度の推移は、free-CBDCA の i.v. 群、i.p. 群の両群は、1日後には 0.109 , $0.098 \mu\text{g/ml}$ と急激に低値となり、3日後には両群とも $0.05 \mu\text{g/ml}$ 未満となった。しかし、HAp-CBDCA の i.p. 群の腹水中 Pt 濃度は、6時間から3日までは free-CBDCA の i.p. および i.v. の両投与群より有意に高く維持され、その後7日間まで腹水中より徐々に消失した(図3)。

(3) HAp-CBDCA の抗腫瘍効果

平均生存日数は、① control 群では 14.9 ± 2.6 日、② HAp 単独群では 16.8 ± 4.5 日、③ free-CBDCA 群では 20.8 ± 5.3 日、④ HAp-CBDCA 群では 27.0 ± 8.5 日であり、生存曲線は図4のようになった。① control 群、② HAp 単独群、③ free-CBDCA 群の3群間には有意差はなかったが、free-CBDCA 群では生存期間の延長傾向が認められた。また HAp-CBDCA 群は ①、② にくらべ $p < 0.01$, $p < 0.05$ と、有意差をもって生存期間の延長が認められ、③ と比較しても生存期間の延長傾向が認められた(図4)。

(4) HAp-CBDCA の臨床応用

血中の結合型 Pt 濃度の推移では、HAp-CBDCA 投与群の2例では free-CBDCA 投与例にくらべ、投与後60分までは Pt 濃度が低く、CBDCA が遅れて血中に放出される傾向にあった。また、末梢血中遊離 Pt 濃度の推移でも、HAp-CBDCA の投与例では free-CBDCA 投与例にく

図 4 Survival curves of rats bearing AH130 tumor with HAp, free-CBDCA, and HAp-CBDCA groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

図 5 Serum levels of Pt into the pleural cavity on the advanced esophageal cancer with HAp-CBDCA and free-CBDCA (HAp : 5 g, CBDCA : 150 mg)

らべ、投与後 30 分まではやはり CBDCA が遅れて血中に放出される傾向にあり、HAp-CBDCA の投与により徐放効果が示唆された(図 5)。

これら HAp-CBDCA の縦隔内投与の臨床応用を行った 2 例、および同様に free-CBDCA の投与を行った 1 例でも、術後、投与に伴う副作用もなく軽快退院し、外来に通院中である。

考 察

以上の (1) から (4) の各々の結果についてみると、(1) の結果では、HAp 細粒は生体親和性に富み、腹腔内投与では腹腔内臓器に癒着を認めず、biodegradable であった。さらに、その後の検討で腹腔内投与された HAp 細粒は、腹膜転移・播種をきたしやすいとされる大網の milky spot や腸間膜、横隔膜などの stomata に取り込まれているこ

とが確認できた¹⁾。したがって、HAp-CBDCA として徐放化製剤に調整した剤形が、腹膜転移・播種が起きる前に、このような転移の起きやすい部位に選択的に HAp-CBDCA が取り込まれるものと考えられ、腹膜転移・播種の防止治療の面からも興味深い事実として期待ができる。

(2)および(3)の結果では、HAp 細粒を drug carrier とした HAp-CBDCA の i. p. では CBDCA の徐放化が認められ、腹水、大網に長時間、高濃度に CBDCA を停滞させることができた。また、ラット癌性腹膜炎モデルにおける HAp-CBDCA の i. p. の検討では、生存日数の延長が認められ治療効果も期待され、今後臨床応用として HAp-CBDCA の癌性腹膜炎、癌性胸膜炎などの防止と治療に、主に体腔内投与を中心とした臨床応用への期待ができる。

(4)の臨床応用では、進行食道癌の術後の縦隔内再発の防止を目的として、HAp-CBDCA を閉胸時に胸腔内に投与したが、投与に伴う副作用もなく、徐放効果も示唆され治療効果に結びつくものと期待ができる。

以上、各々の結果に対し若干考察も加えたが、本来、HAp 細粒は人の骨や歯の無機質の主成分であるためすぐれた生体親和性があり、すでに整形外科、歯科口腔外科領域では骨や歯牙の充填剤などとして臨床応用され、良好な治療成績が得られている。しかし、drug carrier を目的として、水酸アパタイトを細粒として HAp 細粒などとして作成し、徐放化抗癌剤を製作・調整し、治療に用いようとする報告は少ない^{2,3)}。今回の検討に用いた HAp 細粒はすぐれた生体親和性があり、細粒の作成に際しては低い温度で焼成しているため、体内では比較的容易に溶解され、biodegradable であった。また、HAp 細粒は深部まで多孔体であるため広い表面積を有するが、一般的に作成に際して焼成温度を変えることにより porosity を変えることができ、さらに形状、粒子径などの変更も可能である⁴⁾。基礎的な検討では HAp 細粒の i. p. による副作用もなく、これを drug carrier として調整した HAp-CBDCA の i. p. の検討では free-CBDCA の i. p. にくらべ徐放効果が認めら

れ, AH130 ラット癌性腹膜炎モデルでの検討でも治療効果が確認できた。今後, 進行消化器癌に伴う癌性腹膜炎, 癌性胸膜炎などの治療と防止に, HAp-CBDCA の種々の臨床応用の普及が考えられ, 期待もできるものと思われる⁵⁾。

おわりに

HAp-CBDCA の i. p. の基礎的検討では安全性, 徐放効果, 治療効果などが確認でき, 臨床応用でも今後治療効果が期待できる。しかし, 治療成績をさらに向上させるためには, HAp 細粒からの CBDCA の放出制御の工夫, また HAp 細粒自体の比重が大きいことなどに関与した投与法の工夫, 改善などの検討も重要と考えられる。

文 献

- 1) Hagiwara A, Takahashi T, Sawai K et al.: Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice. *Cancer Res.* 53: 687-692, 1993.
- 2) 水野 勇, 谷口正哲, 由良二郎, 中村 聡, 青木秀希: 薬剤 carrier としての水酸アパタイト細粒を用いた徐放化レンチナンによる癌性腹膜炎の治療に関する実験的検討. *人工臓器* 22(2): 339-343, 1993.
- 3) 毛利紀章, 水野 勇, 山本哲也, 四ツ柳智久, 青木秀希: Drug carrier として水酸アパタイト細粒を用いた癌性腹膜炎に対する癌局所化学療法の基礎的検討. *DDS* 9(1): 45-49, 1994.
- 4) Mizuno I, Yamamoto T, Yotsuyanagi T, Akamo Y, Ichino 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.
- 5) 植田拓也, 水野 勇, 毛利紀章, 四ツ柳智久, 真辺忠夫・他: 癌性腹膜炎の治療を目的とする α -リン酸三カルシウム(α -TCP)細粒-Carboplatin(CBDCA)腹腔内投与の基礎的検討. *癌と化学療法* 23(11): 1512-1515, 1996.