抗生物質含有ハイドロキシアパタイトの開発

山村恵子^{*1)}, 趙 学洙・岩田 久^{*2)}*The development of antibiotics loaded hydroxyapatite beads*

Hydroxyapatite(HAP) has been used recently in orthopaedic fields as an aid in bone grafts following surgery of bone tumors and bony defect at the time of revision surgery, often promoting osteoconduction as a result. It seems reasonable to incorporate antibiotics into porous HAP beads to prevent local infection. This report describes *in vitro* and *in vivo* release behavior of cefotiam(CTM, 3.5 mg/bead) loaded into HAP beads(9.3 mm in diameter).

To control release rate of CTM, egg phosphatidylcholine(EPC) was also incorporated into the beads with the drug. Drug release from EPC-free HAP beads attained 100% in 3h *in vitro*, and with increasing EPC incorporated the release rate was sustained. *In vivo* study where the beads were implanted into rat femur muscle, the drug from EPC-free HAP beads was released almost 100% in 7h and the EPC incorporated bead gave an extended release. The release behavior of CTM *in vivo* study was compatible with temporal courses of serum level following implantation of beads.

We conclude that EPC can be useful in controlling the release rate of the drug from HAP beads.

Keiko Yamamura^{*1)}, Gakushu, Chou・
Hisashi Iwata^{*2)}

key words : hydroxyapatite(HAP),
controlled release, cefotiam, antibiotics,
egg phosphatidylcholine

hydroxyapatite(HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)は、生体への親和性が高く、それ自身ゆるやかに代謝する bioactive ceramics である。特に多孔質

HAP は、骨欠損部への骨補填材として臨床に使用され、移植後は骨との置換が期待される。

一方、移植に伴う外科手術において、術中・術後の感染予防は、手術の成否を決定づける一つの大きな要因である。そこで術中・術後の局所の感染予防のため抗生物質含有 HAP ビーズを調製し、さらにビーズ内からの薬物放出をコントロールすることによって、手術部位に有効濃度を持続させることが臨床的に有効であると考えられる。生体膜の主成分である phosphatidylcholine(PC)は、水溶液中で水和し、2分子膜の閉鎖小包体を形成する¹⁾。この2分子膜は liposome とよばれ、parenteral^{2,3)}, oral⁴⁾, topical application⁵⁾ の biodegradable drug carrier として、広く研究されている。

今回の実験目的は、porous HAP ビーズを担体とし、egg PC を用いてビーズからの薬物放出制御を試みることである。モデル薬物として塩酸セフォチアム(CTM)を用い、porous HAP ビーズに含有させた CTM の放出挙動を *in vitro*, *in vivo* にて測定し、臨床応用への可能性を検討した。

材料と対象

hydroxyapatite ビーズ(XVC-56, 日本特殊陶業)は、直径 9.3 mm, 重量 0.536 g, 見掛け比重 2.97, 吸水率 22.0%を使用した。注射用塩酸セフォチアム(CTM)および塩酸セフォチアム原末はチバガイギーより供与されたものを使用した。

egg phosphatidylcholine(EPC)は Coatsome NC-10 S(日本油脂)を使用した。tetrabutyl ammonium phosphate は PIC A(Waters Co.)を使用し、その他の試薬はすべて市販 HPLC 用試薬(片山化学)を使用した。

ラットは、Lewis 系雌を 6 週齢で購入し、約 2 週

^{*1)} Pharmacy Department Nagoya University Branch Hospital, Higashi-ku, Nagoya 461 名古屋大学医学部附属病院分院薬剤部

^{*2)} Department of Orthopaedic Surgery, Nagoya University School of Medicine, Showa-ku Nagoya 466 名古屋大学医学部整形外科教室

間予備飼育したのち、8週齢(体重168~183g)で実験に供した。

方 法

(1) CTM ビーズの調製

注射用蒸留水に溶解した注射用 CTM 溶液($4.2 \times 10^{-2} \text{M}$)に減圧下で約30分間ビーズを浸漬する。つぎに、ビーズを別のバイアルに移したのち、凍結乾燥操作によって水分を除去し、CTM ビーズ(CTM 3.5 mg/ビーズ)を調製した。

(2) CTM-EPC ビーズの調製

CTM メタノール溶液($4.2 \times 10^{-2} \text{M}$)に、EPC がそれぞれ 6.65×10^{-2} , 2.26×10^{-2} , $6.65 \times 10^{-3} \text{M}$ になるように EPC を溶解し、CTM-EPC メタノール溶液を調製した。

つぎに、減圧下でビーズを30分間浸漬し、速やかに別のバイアルに移したのち、減圧吸引によってメタノールを除去した。調製された3種類の CTM-EPC ビーズ(CTM 3.5 mg, EPC 7.5, 3.0, 1.5 mg/ビーズ)は、EPC の光による影響を考慮し、遮光下で保存した。

(3) *in vitro* ; CTM 放出速度

拡散セルの水相(37°C, 45 ml)中にビーズを静かに吊り下げ、水相を stirrer (300 rpm) で攪拌する。つぎに、経時的に水相を採取し、ビーズより放出された CTM および EPC 定量用サンプルとした。CTM は HPLC (LC6A System, 島津製作所) を用いて定量した。HPLC の条件は、カラム: μ -Bondapak C_{18} (10 μm , 30 cm $\times$ 3.9 mm i. d, Waters Co.), 波長: 254 nm, 移動相: 40% methanol-0.005 M tetrabutyl ammonium phosphate, 流速: 1.5 ml/min, aufs: 0.02 で行った。

また、EPC は Mrsny らのリン定量法⁶⁾に従い、分光光度計(UV 260, 島津製作所)で測定した。

(4) *in vivo* : ラット大腿筋肉内移植ビーズからの CTM 放出

ラットを1群(CTM ビーズ), 2群(CTM-EPC ビーズ, EPC 7.5 mg/ビーズ)に分類し、エーテル麻酔下でそれぞれの群のビーズを1個ずつ、大腿筋肉内に移植した。さらに、15, 30, 45 min, 1, 2, 3, 4, 4.5, 5, 6, 7, 10 h 後に、1群、2群のビーズをそれぞれ5個採取した。

つぎに、CTM, CTM-EPC ビーズを粉碎したの

ち、約50 mg を正確に秤量し、CTM ビーズ末を蒸留水に、CTM-EPC ビーズ末をメタノール 20 ml に分散・溶解する。つぎに、apatite をフィルター(0.2 μm , Millipore)で濾過し、濾液を HPLC 定量用サンプルとした。

(5) CTM 血中濃度

ラット大腿筋肉内に、CTM ビーズ, CTM-EPC ビーズを移植したのち、経時的に10 h 後まで約0.2~0.3 ml を採血した。つぎに、血清に同量のアセトニトリルを添加・混和し、遠心分離(10,000 rpm)後、上清を HPLC 定量用サンプルとした。

(6) HAP ビーズの溶解

HAP は生体と反応し、その表面はゆるやかに溶解すると考えられている。そこで、ビーズの溶解が薬物放出速度に与える影響を考慮し、3種類の異なる条件下で経時的に HAP 表面の SEM 像を観察した。drug-free HAP ビーズを蒸留水、血清に浸漬、また、ラット大腿筋肉内に移植したのち、3, 6, 10, 24 h 後に、それぞれのビーズを取り出し、十分に洗浄・乾燥する。そののち、①ビーズ表面、②ビーズ破面(表面より約300 μm 内部)、③ビーズ破面(表面より1 mm 内部)の3カ所を SEM ($\times 350$, $\times 2000$) 像の観察対象とした。

結 果

(1) *In vitro* ; CTM 放出速度

図1に EPC-free CTM ビーズおよび濃度の異なる3種類の CTM-EPC ビーズからの CTM 放出速度を示した。

CTM ビーズからの CTM 放出は約3 h 後に、ほぼ100%に達した。一方、CTM-EPC ビーズからの放出は、3 h 後にビーズ1個当たりの EPC 含有量が1.5 mg で80%, 3.0 mg で50%, 7.5 mg で10%を示し、EPC 増加による明らかな放出制御がみられた。EPC は24 h 後もほとんど放出されなかった。

(2) *In vivo* : ラット大腿筋肉内移植ビーズからの CTM 放出

CTM ビーズおよび CTM-EPC ビーズ (EPC 7.5 mg/ビーズ)の移植後の CTM 残存量を図2および図3に示した。

CTM ビーズからの放出は約7 h で100%に達し、*in vitro* より遅れる傾向を示したが、筋肉内

図 1 Release rates of cefotiam from cefotiam-loaded bead and various cefotiam-egg phosphatidylcholine-loaded beads

temperature : 37 °C. stirring rate : 300 rpm
 cefotiam : ■, △, ○, ● : 3.5 mg/bead
 egg phosphatidylcholine : ■ : 0 mg/bead, △ : 1.5 mg/bead, ○ : 3 mg/bead, ● : 7.5 mg/bead

図 3 Remaining of cefotiam in implanted cefotiam-egg phosphatidylcholine beads
 cefotiam : 3.5 mg/bead
 egg phosphatidylcholine : 7.5 mg/bead

図 5 Concentration of cefotiam in serum after implantation of cefotiam-egg phosphatidylcholine-loaded beads
 cefotiam : 3.5 mg/bead
 egg phosphatidylcholine : 7.5 mg/bead

において薬物は孔より速やかに放出された。CTM-EPC ビーズからの放出は CTM ビーズと比較し、*in vitro* と同様コントロールされることが確認さ

図 2 Remaining of cefotiam in implanted cefotiam-loaded beads
 cefotiam : 3.5 mg/bead

図 4 Concentration of cefotiam in serum after implantation of cefotiam-loaded beads
 cefotiam : 3.5 mg/bead

れた。また、筋肉内組織の非特異的反応は CTM の存在により大きな差は観察されなかった。

(3) CTM 血中濃度

CTM ビーズ移植後の CTM 血中濃度は、2~3 h 後に最高値を示したが、そののち速やかに消失し、約 7 h 後には検出限界(0.2 μg/ml)以下になった(図 4)。

一方、CTM-EPC ビーズ移植後の CTM 血中濃度は、CTM ビーズと比較し、長時間血中に確認され、*in vivo* における CTM 残存量との間に高い相関性を示した(図 5)。

(4) HAP ビーズの溶解

蒸留水および血清に浸漬したビーズは、24 h 後もコントロールビーズと比較し、SEM 像による変化は観察されなかった(図 6 a~c)。

しかしながら、ラット大腿筋肉内に移植したビーズはわずかではあるが、6h 後に HAP 溶解の

図6 Scanning electron micrographs of surfaces of various HAP beads

a : control. b : soaked in distilled water(24 h). c : soaked in serum(24 h). d : implanted into rat femur muscle(6 h) (bar=10 μ m)

結果と推測される気孔の拡大が観察された(図6 d).

考 察

今回の実験に CTM を選択した理由として、CTM は術中の局所の contamination のおもな原因菌と考えられている staphylococcus に活性を示すこと、また、HAP との間に特異的な化学反応を示すことなくつねに一定量添加されることである。

ビーズ孔内で EPC は thin film を形成し、CTM は film に含有されていると考えられる。phospholipid film は、水の存在下で multilamellar (MLV) 型 liposome を形成することは、Bangham らによって詳細に述べられている^{1,7)}。すなわち、CTM-EPC ビーズに侵入した水および血液に接した EPC film は、MLV 型 liposome

を形成すると推測される。その結果、CTM は liposome に取り込まれる取り込まれないにかかわらず、liposome の物理的障害を受け、気孔より徐々に放出されたと考えられる。

in vitro, *in vivo* における CTM 放出はともに EPC により制御され、両者間に良好な相関性を示した。しかしながら、10 h 後の放出量が *in vitro* に比較し、*in vivo* において高値を示した理由として、SEM 像(6h 後)の観察結果が示す気孔の拡大が薬物放出に影響を与えたものと考えられる。

以上の結果より、EPC の使用が HAP ビーズからの薬物放出コントロールに有効であることを、また、EPC が天然のリン脂質の 1 つであることを考慮すれば、抗生物質含有 HAP は初期の局所感染予防のために、臨床応用への可能性が期待される有用な剤型であると考えられる。

文 献

- 1) Bangham, A. D., Horne R. W. : Negative staining of phospholipid and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 8 : 660-668, 1964.
- 2) Balley M. B., Nayar, R., Masin, D. Hope, M. J., Cullis, P. R. Mayer, L. D. : Liposomes with entrapped doxorubicin exhibit extended blood residence times. *Biochim. et Biophys. Acta* 1023 : 133-139, 1990.
- 3) Fishman, P., Peyman, G. A., Hendricks, R., Hui, S. L. : Liposome-encapsulated ^3H -5 FU in rabbits. *Int. Ophthalmol.*, 13 : 361-365, 1989.
- 4) Nagata, M., Yotsuyanagi, T., Nonomura, M., Ikeda, K. : Coagulation recovery after warfarin-induced hypoprothrombinaemia by oral administration of liposomally-associated vitamin K_1 to rabbits. *J. Pharm. Pharmacol.* 36 : 527-533, 1984.
- 5) Komatsu, H., Okamoto, H. Miyagawa, K., Hashida, M., Sezaki, H. : Percutaneous absorption of butylparaben from liposomes, *in vitro* Chem. Pharm. Bull. 34 : 3423-3430, 1986.
- 6) Mrsny, R. J., Volwek, J. J., Griffith, O. H. : A simplified procedure for lipid phosphorous analysis shows that digestion rates vary with phospholipid structure, *Chem. Phys. Lipids* 39 : 185-191, 1986.
- 7) Bangham, A. D., Hill, M. W., Miller, N. G. A. : Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Method Membr. Biol.* 1 : 1-60, 1974.