ハイドロキシアパタイト微結晶体の各種薬剤吸着特性
および徐放性加納誠介・山崎淳司・大塚良平^{*1)}、青木秀希・赤尾 勝^{*2)}

Use of hydroxyapatite small crystals as drug carrier

Hydroxyapatite small crystals (HAp-sol) applied as a drug carrier are being developed. The HAp-sol was synthesized by a wet method and amounts of drug adsorbed onto the hydroxyapatite small crystals were measured. The HAp-sol was characterized by X-ray powder diffraction, transmission electron microscopy, and infrared absorption. From the TEM observation, the crystal had a stick-like shape (average length was 730 Å and width was 140 Å). The amount of drug adsorbed onto the crystals was measured by an ultraviolet-visible radiation spectrophotometer. The drugs used were doxorubicin hydrochloride, mitomycin C, and fluorouracil (Kyowa Hakkou) which are glycoside antibiotics. An adsorption curve as a function of time, adsorption isotherm, and eluted amount of adsorbed drug were measured. Investigation of the adsorption was carried out at pH 7.50 (1.0 mmol/l phosphoric buffer solution) and incubated at 37°C. The concentration of HAp-sol was 5 mg/ml. The saturation time of doxorubicin-hydrochloride-adsorption onto HAp-sol required 2 hours. The amount of doxorubicin hydrochloride saturated adsorption was 0.2 mg per 1 mg HAp-sol. In the measurement of the eluted amount of doxorubicin hydrochloride, half of the saturated adsorbed drug was eluted into the phosphoric buffer solution. This result indicates that HAp-sol adsorbed with doxorubicin hydrochloride is useful as a drug delivery system.

Seisuke Kano・Atsushi Yamazaki
Ryohei Otsuka^{*1)}, Masaru Akao・
Hideki Aoki^{*2)}

key words : hydroxyapatite, HAp-sol, drug carrier,
antibiotics, adsorption

ハイドロキシアパタイト ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) は骨や歯の無機成分であり、その焼結体は生体親和性にすぐれた材料として、整形外科¹⁾・歯科^{2,3)}領域において人工骨や人工歯根として、すでに広く応用されている。また、ハイドロキシアパタイトは、蛋白質や核酸の吸着剤⁴⁻⁶⁾にも利用されている。ハイドロキシアパタイトは加熱処理を行い、各種生体関連材料として利用されてきた⁷⁻¹⁰⁾。

本研究では、ハイドロキシアパタイトの未仮焼微結晶体を drug delivery system (DDS) へ応用するための基礎研究として、各種薬剤の吸着特性を調べた。

材 料

(1) ハイドロキシアパタイト微結晶体

ハイドロキシアパタイト微結晶体は、水酸化カルシウム懸濁液 (0.5 mol/l) およびリン酸水溶液 (0.8 mol/l) より室温において合成した。生成した微粒子間の凝集を防ぐ目的で、超音波型ホモジナイザー (日音医理科器械製作所; GSD-600 (周波数 20 kHz $\pm$ 2 kHz)) による攪拌・分散を行った。超音波型ホモジナイザー処理に伴う水温上昇の防止のため、照射中、反応槽の水冷を行った。合成の模式図を図 1 に示す。

合成したハイドロキシアパタイトは、24 時間攪拌後静置し、上澄み溶液を取り除き 5 wt% のハイドロキシアパタイト・ゾルとし、これを本研究の薬剤吸着材とした。

(2) 薬 剤

本研究に用いた薬剤は、抗悪性腫瘍剤である塩酸ドキソルビシン (協和醗酵 (株))、マイトマイシン C (協和醗酵 (株))、フルオロウラシル (協和醗酵 (株)) の 3 薬である。

^{*1)} Department of Mineral Resources Engineering, School of Science and Engineering, Waseda University 3-4-1 Ohkubo Shinjuku-ku, Tokyo 169 Japan 早稲田大学理工学部資源工学科

^{*2)} Institute for Medical and Dental Engineering, Tokyo Medical and Dental University 2-3-10 Surugadai, Kanda, Chiyoda-ku, Tokyo 101 Japan 東京医科歯科大学医用器材研究所無機部門

図1 Schematic setup of hydroxyapatite-sol preparation

図3 Particle distribution of hydroxyapatite-sol
Dispersion medium was distilled water.

方法

合成したハイドロキシアパタイト微結晶体に対し、粉末X線回折測定、粒度分布測定、 ζ 電位測定、比表面積測定、透過型電子顕微鏡像観察を行った。

また、ハイドロキシアパタイト微結晶体への抗悪性腫瘍剤の吸着量測定として、吸着平衡時間測定、等温吸着量測定、吸着薬剤溶出量測定を行った。

結果

(1) ハイドロキシアパタイト微結晶体のキャラクタリゼーション

図2 X-ray powder diffraction patterns of hydroxyapatite-sol dried at 60°C and heated at 1,200°C.

ハイドロキシアパタイト・ゾルを 60°C にて 24 時間乾燥して得られた粉末、およびこれを 1,200°C にて 2 時間加熱処理して得られた粉末の 2 試料に対して粉末 X 線回折測定を行った。この結果を図 2 に示す。この回折パターンより、結晶相の同定および結晶子径 (D) の計算を行った。これら二つの回折パターンは典型的なハイドロキシアパタイトのパターンを示し、得られた粉末がともにハイドロキシアパタイト単相であることが確認された。

回折パターン中の (002) 面および (222) 面のピークよりハイドロキシアパタイト微結晶体の結晶子径をシングルライン法を用いて計算すると、 $D_{002}=610\text{Å}$ 、 $D_{222}=280\text{Å}$ であった。

粒度分布測定は、レーザー回折散乱法により行った。ハイドロキシアパタイト・ゾルの分散媒として蒸留水を用い、濃度 0.05 wt% にて超音波および攪拌子による分散・攪拌を行った。この結果を図 3 に示す。この図より平均粒子径を計算すると 3.9μm であった。この粒子径は、微結晶体が蒸留水中で凝集した粒子の大きさを反映していると考えられる。

ζ 電位測定は、電気泳動顕微鏡法により行った。電解質として KNO_3 (2mmol/dm^3) を用い、溶媒

図4 ξ -potential titration of hydroxyapatite-sol
Concentration of electrolyte (KNO_3) was 2 mmol/l.

図5 TEM image of hydroxyapatite-sol

図6 Absorptive equilibrium time of antibiotics onto hydroxyapatite-sol

には蒸留水, pH の調整には KOH, HNO_3 を用いた. その結果を図4に示す. 合成したハイドロキシアパタイト微結晶体の等電点は, pH 11 付近にあり, アルカリ側で負の電位, 酸側で正の電位を持っていた.

比表面積測定は窒素分子吸脱着連続容量法により行った. その結果, この粒子の比表面積は, $90 \text{ m}^2/\text{g}$ と非常に大きいことがわかった.

透過型電子顕微鏡(日立製作所; H600AS)像観察は, 加速電圧 100 kV にて行った. 図5に示すように, 明視野像には棒状のハイドロキシアパタイト微結晶体が観察される. 微結晶体の粒子径を

200 個の粒子から求めた結果, 伸張方向 70 nm, 幅 14 nm の棒状粒子であることがわかった.

(2) 薬剤の吸脱着量

ハイドロキシアパタイト微結晶体への抗癌性腫瘍剤の吸着量測定は, 温度 37°C の恒温振盪器中にて行った. 薬剤濃度は, pH 7.5, 1 mmol/l のリン酸バッファーを用いて調整した. ハイドロキシアパタイト微結晶体の濃度は, 5 mg/ml とした. また, 各薬剤の吸着量の測定には, 紫外可視分光光度計(島津製作所; UV-730)を用いた. 塩酸ドキソルビシンは 470 nm の, マイトマイシンCは 360 nm の, フルオロウラシルでは 270 nm 波長光を用いて測定した.

吸着平衡時間測定では, 各薬剤の初期濃度を各薬剤の溶解度付近とし, 塩酸ドキソルビシン 5 mg/ml, マイトマシシンC 1 mg/ml, フルオロウラシル 31.25 mg/ml とし, 測定を開始した. 測定時間は, 吸着開始より 5, 30, 60, 120, 360, 540, 720 分後とした. 各経過時間においてサンプリングを行い, 薬剤吸着量を求めた. この結果を図6に示す. 縦軸はハイドロキシアパタイト 1 mg に対する各薬剤の吸着量を, 横軸は吸着開始からの経過時間を示す. 塩酸ドキソルビシンは, 吸着開始より 2 時間後に平衡に達した. この時の吸着量は $0.2 \text{ mg}/\text{mgHAP}$ であった. マイトマシシンCはほとんど吸着せず, その最大吸着量は, $0.4 \mu\text{g}/\text{mgHAP}$ であった. フルオロウラシルの吸着量は $0.17 \text{ mg}/$

図7 Isothermal adsorption of antibiotics onto hydroxyapatite-sol

図8 Release equilibrium time of antibiotics from hydroxyapatite-sol

mgHAp であった。

等温吸着量測定においては、吸着時間を6時間として吸着量を求めた。図7に示すように、塩酸ドキソルビシンは薬剤濃度が4 mg/mgHAp 以上において飽和吸着平衡に達した。マイトマイシンCは、この条件下では、ほとんど吸着しなかった。また、フルオロウラシルはほぼ平衡に達し、30 mg/mgHAp 以上において飽和吸着平衡に達した。

吸着薬剤溶出量測定は、以下のように行った。各薬剤をハイドロキシアパタイト・ゾルとともに37°C恒温にて6時間振盪し、遠心後上澄み液を除去し、新たに同量のリン酸バッファーを加えた。リン酸バッファーを加えたあと、各試料を再度37°C恒温にて振盪し、3, 12, 24, 48, 60時間後のリン酸バッファー中への薬剤溶出量を測定した。図8には、塩酸ドキソルビシンおよびフルオロウラシルの吸着薬剤溶出量測定の結果を示す。マイトマイシンについてはハイドロキシアパタイトへの吸着量が少ないため、溶出量測定は行わなかった。塩酸ドキソルビシンでは、測定開始直後の吸着量0.197 mg/mgHApが、48時間後には0.132 mg/mgHApに減少し、吸着薬剤の33%が溶出した。また、フルオロウラシルでは、測定開始直後の吸着量0.074 mg/mgHApが、12時間後には0.018 mg/mgHApに減少し、吸着薬剤の75%が溶出した。

考 察

薬剤担体として開発されている材料の中心は有機化合物である¹²⁾が、無機化合物を利用する研究も行われている。特にハイドロキシアパタイトに対する研究が進められており^{13,14)}、これに抗悪性腫瘍剤を吸着させた研究も行われている¹⁵⁾。これらは加熱処理を行った材料を用いているが、本研究では未加熱処理ハイドロキシアパタイトを用いた。

合成したハイドロキシアパタイト微結晶体の粒子径は、伸張方向に70 nm、幅14 nmであった。凝集体の平均粒子径は3.9 μmであった。また比表面積は90 m²/gであった。

ハイドロキシアパタイト微結晶体への吸着薬剤として、抗悪性腫瘍剤である塩酸ドキソルビシン、マイトマイシンC、フルオロウラシルを用いた。このうちマイトマイシンCはその吸着量が少ないため、飽和吸着量を求めることができなかった。この原因として、マイトマイシンCが水に対して難溶性であり、疎水コロイドを形成するためと考えられる。

ハイドロキシアパタイト微結晶体への塩酸ドキソルビシンの吸着量は、0.2 mg/mgHApであった。

塩酸ドキソルビシンの吸着薬剤溶出量測定の結果、吸着量のうち33%が溶出した。また、フルオロウラシルでは、75%が溶出した。これは、溶出量測定を閉じた系(バッチ系)において行ったため、吸着量と溶液濃度とが平衡に達したためであ

る。溶液濃度の変化する系での溶出量は、これらの値より増加するものと考えられる。

まとめ

ハイドロキシアパタイト微結晶体を薬剤キャリアとして応用する目的で、合成・キャラクタリゼーション・薬剤吸着量・吸着薬剤溶出量を調べた。

湿式法により合成し、ホモジナイザーによる分散を行ったハイドロキシアパタイト微結晶体の粒子径は、伸張方向 73 nm、幅 14 nm の棒状粒子であった。比表面積は、90 m²/g であった。

各薬剤の等温吸着量は、塩酸ドキシソルピシン 0.20 mg/mgHAP、フルオロウラシル 0.16 mg/mgHAP であった。マイトマイシンは、数 μ g/mgHAP の吸着であった。塩酸ドキシソルピシンは脱着率も大きく、ハイドロキシアパタイト微結晶体と組み合わせた応用が有望である。

本研究を行うに当たり、名古屋市立大学医学部第一外科教室の水野勇先生より、貴重なご助言、ご意見をいただきましたことを感謝いたします。また、(株)日科機の迫雄二氏、楊逸明氏には ϕ 電位測定および比表面積測定にあたりご便宜をはかっていただきました。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Sato, R., Furuya, K., Shinomiya, K., Ukegawa, Y., Sato, M., Okamoto, A., Hasegawa, S., Aoki, H.: Clinical Studies on Porous Hydroxyapatite for Bone Spacer in Ilac Bone Defect. *Orthop. Traum. Surg.* 30 : 1439-1443, 1987.
- 2) Aoki, H., Ogiso, M.: Hydroxyapatite and Artificial Tooth Root. *Chemistry Today Japan* 147 : 17-21, 1983.
- 3) Akao, M., Miura, N., Aoki, H.: Artificial Tooth Root and Bone Based on Synthetic Hydroxyapatite. *Japan Chemistry and Industry* 37 : 243, 1984.
- 4) Kawasaki, T.: Hydroxyapatite as a liquid chromatographic packing. *Journal of Chromatograph* 544 : 147-184, 1991.
- 5) Makino, K., Kim, B. H.: Separation of Proteins on Hydroxyapatite Columns. *Journal of Chromatograph Science* 27(11) : 659-664, 1989.
- 6) Hjerten, S., Lindeberg, J., Shopova, B.: High-Performance Adsorption Chromatography of Proteins on 2 μ m Spherical Beads of Hydroxyapatite. *Journal of Chromatography* 440 : 305-313, 1988.
- 7) Aoki, H., Shimura, N., Kuboki, Y.: Basic and Clinical Studies on Hydroxyapatite and Plaque. *Japan Dental Journal* 15(4) : 463-474, 1982.
- 8) Lindeberg, J., Srichaiyo, T., Hjerten, S.: High-Performance adsorption Chromatography of Transfer Ribonucleic Acids and Proteins on 2 μ m Spherical Beads of Hydroxyapatite. Influence of Sodium Chloride and Magnesium Ions on the Resolution. *Journal of Chromatography* 499 : 153-163, 1990.
- 9) Okuyama, N., Ogawa, T., Ebihara, M.: Apatite Used for Chromatography. *Gypsum and Lime* 210 : 323-331, 1987.
- 10) Noto, H.: Studies on the Adsorption of Proteins to Synthetic Hydroxyapatite. *Medical of Dental* 49 (4) : 531-549, 1986.
- 11) Yajima, H., Itoharu, H., Kanamori, I., Masuhara, K., Nagatsuru, Y., Shiomi, T.: Treatment of Osteomyelitis with Gentamicin-PMMA Beads. *Rinshou Seikei Geka* 17(7) : 643-651, 1982.
- 12) Misra, D. N.: Adsorption and Orientation of Tetracycline on Hydroxyapatite. *Calcified Tissue International* 48 : 362-367, 1991.
- 13) Yamamura, K., Iwata, H., Yotsuyanagi, T.: Synthesis of Antibiotic-Loaded Hydroxyapatite Beads and in vitro Drug Release Testing. *Journal of Biomedical Materials Research* 26 : 1053-1064, 1992.
- 14) 次田 正, 鶴 純明, 高崎 健, 四ノ宮成祥, 六反田亮, 小林誠一郎, 羽生富士夫: ハイドロキシアパタイト粒子を用いた肝化学塞栓療法に関する基礎的検討. *癌と化学療法* 16, (10) : 3423-3428, 1989.