Drug carrier として水酸アパタイト細粒を用いた癌性腹膜炎に
対する癌局所免疫化学療法の基礎的検討毛利紀章・水野 勇・山本哲也^{*1)}、四ツ柳智久^{*2)}、青木秀希^{*3)}*Intraperitoneal administration of hydroxyapatite particles as a drug carrier in rats bearing carcinomatous peritonitis*

Carcinomatous peritonitis with resultant ascites can be the result of progression of gastrointestinal malignancies, especially of gastric origin. Various methods, including intraperitoneal and intravenous routs, have been tried to improve the efficacy of chemotherapeutic agents or biological response modifiers. Nevertheless, prognosis of such patients remains grim.

Hydroxyapatite(HAp)has excellent compability with human tissues and has been used in orthopedic and dental procedures, and percutaneous devices for hyperalimentation. The drug carrier HAp particle has pores 23~59 μm in diameter with a surface area of 25 m^2/g . The efficacy of intraperitoneal administration of lentinan-loaded hydroxyapatite particles(HAp-LNTN)was explored using a Donryu rat model of tumor cell AH 130 carcinomatous peritonitis. The drug delivery system HAp-LNTN contained 200 mg HAp and 0.5 mg LNTN. The pharmacokinetics of LNTN following intraperitoneal administration of HAp-LNTN was studied. Serum levels of HAp-LNTN were elevated for 24hours compared with free-LNTN. Intraperitoneal administration of HAp-LNTN was effective in prolongation of survival of rats bearing AH-130 in the peritoneal cavity, day 35 to 55. Furthermore, the pharmacokinetics of carboplatin (CBDCA)following intraperitoneal administration of HAp-CBDCA was studied. Serum levels of CBDCA were higher in the HAp-CBDCA group compared to the free-CBDCA group from post-drug administration hour 6 until day 3.

These results suggest that the efficacy of anticancer drugs is enhanced by utilizing HAp as a drug delivery system.

Noriaki Mohri・Isamu Mizuno・

Tetsuya Yamamoto^{*1)}Tomohisa Yotsuyanagi^{*2)}, Hideki Aoki^{*3)}

key words : hydroxyapatite, carcinomatous peritonitis, lentinan, carboplatin, intraperitoneal administration

進行胃癌における腹膜播種は、手術時の非治癒因子となるばかりではなく治癒切除後の再発形式としてももっとも多く、その治療には難渋し予後も不良である。この腹膜播種の治療成績を向上させるために biological response modifier (BRM)、抗癌剤を直接癌細胞に作用させることのできる腹腔内に投与し、高濃度かつ長時間にわたり作用させるのが合理的と考えられる。したがって、同じ投与薬剤量でより治療効果が期待できる drug delivery system に着目し、薬剤の carrier として水酸アパタイト細粒(HAp 細粒)を将来の臨床応用を目的として作製した。

この HAp 細粒を基材とした徐放化レンチナン(HAp-LNTN)を製作、調製し、癌性腹膜炎の治療を目的として、本剤の腹腔内投与による副作用、レンチナンの体内動態、治療効果などについて基礎的に検討を加えた。また、同様に徐放化カルボプラチン(HAp-CBDCA)も製作し、その体内動態を検討した。水酸アパタイトは、分子式 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ であり、ヒトの骨や歯の無機質の主成分であるために生体親和性に富み¹⁻³⁾、時間とともに生体内で分解、吸収される優れた特性を持ち、すでに整形外科、歯科口腔外科領域での骨や歯牙の充填剤、経皮端子⁴⁻⁶⁾として臨床応用されている。

しかし、この水酸アパタイトを drug carrier として利用する試みは少なく、わずかに数件の報告をみるが⁷⁻⁹⁾、細粒化し、徐放化を目的として基礎的に検討をした報告はほとんどない。そこで、AH-

^{*1)} First Department of Surgery, Nagoya City University Medical School 名古屋市立大学医学部第一外科学教室

^{*2)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagoya City University 名古屋市立大学薬学部製剤科

^{*3)} 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

130 腹水肝癌細胞による癌性腹膜炎モデルを用いて、HAp 細粒とともに BRM, 抗癌剤を腹腔内投与し徐放化および治療効果について実験的に検討した。

対象と方法

(1) 水酸アパタイト細粒の作製法と性状

今回の実験に使用した水酸アパタイト細粒は、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ の懸濁液と H_3PO_4 の水溶液を室温下に24時間反応させたあとに熟成を行い、得られた沈澱物を濾過し 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製した。この作製された水酸アパタイト細粒の形状を観察するため、光学顕微鏡および電子顕微鏡を用い検討した。水酸アパタイト細粒の粒度分布は、レーザー回折法により測定し、測定には島津製作所 SALD-1100 を使用した。純水 100 ml に対してアパタイト細粒を約 0.1 mg 加えて試料懸濁液として、測定は超音波振動子および回転子により十分に攪拌しながら行った。

(2) 水酸アパタイト細粒の組織学的および血液生化学的变化

本剤の腹腔内投与の安全性を確認するために水酸アパタイト細粒 200 mg と生理食塩水 0.5 ml を約 200 g の雄性ドンリュウラットの腹腔内に投与し、その後の組織学的変化について経日的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) 水酸アパタイト-レンチナンの作製方法

HAp-LNTN の作製はすべて以下の方法により無菌的に製作、調製し製剤化した。滅菌した 200 mg の水酸アパタイト細粒を入れた注射用 vial を用意する。これらに注射用蒸留水に溶解した 1 mg/ml のレンチナン水溶液をそれぞれ 0.5 ml ずつ注入する。レンチナン溶液が十分に水酸アパタイト細粒内の micropore に浸透するように強く攪拌する。これらの vial を freeze drying chamber に入れ凍結乾燥することにより、HAp-LNTN 1 vial 中には 200 mg の水酸アパタイト細粒と 0.5 mg のレンチナンを含有する。

(4) 水酸アパタイトの除法効果

水酸アパタイト細粒 200 mg とレンチナン 0.5 mg を使用した HAp-LNTN の腹腔内投与と、

表 1 AH-130 癌性腹膜炎の治療モデル

Donryu rat	male BW 200 g
AH-130 carcinoma	$1.0 \times 10^7/\text{ml} \times 1 \text{ ml ip}$
↓ ↑	
group 1: control	saline 1.0 ml (ip)
group 2: HAp	HAp 200 mg + saline 1.0 ml (ip)
group 3: free-LNTN	LNTN 0.5 mg (ip)
group 4: HAp-LNTN	HAp 200 mg + LNTN 0.5 mg (ip)

レンチナン 0.5 mg 腹腔内投与におけるレンチナン血中濃度を経時的にドンリュウラットを用いて比較検討した。また、カルボプラチンも同様に水酸アパタイト細粒 200 mg とカルボプラチン 4 mg の HAp-CBDCA とカルボプラチン 4 mg で比較した。レンチナンの濃度測定は血漿中エンドトキシン定量試薬エンドトキシン-D (LS-1) キットを用い、カルボプラチンは、血中プラチナ濃度を原子吸光光度計を用い比較検討した。2群間の差は、t 検定で $P < 0.01$ をもって有意とした ($n = 5$)。

(5) HAp-LNTN の抗腫瘍効果

山之内製薬中央研究所より提供を受けた AH-130 腹水肝癌細胞は、継代移植されたドンリュウラットの腹水から採取し、その viability が 90% 以上あることを確認し、 1.0×10^7 個腹腔内に移植する。AH-130 腹水肝癌細胞移植7日後に、無治療の control 群、HAp 細粒単独群、free-LNTN 群、HAp-LNTN 群の四つの治療群にわけ経日的に観察し、おのおのの群の生存曲線を Kaplan-Meier 法にて比較検討した(表1)。

結 果

(1) 水酸アパタイトの性状について

使用した水酸アパタイト細粒は直径が 30~50 μm のほぼ球形の白い粉末状の多孔体であり、その粒度分布をみると 23~59 μm の間に 73.6% が分布し、その平均粒子径は 36.1 μm である(図1)。光学顕微鏡でも透光性はなく、ほぼ球形の粒子であるが、電子顕微鏡では表面が凹凸不整の球状物質としてみられ、この細粒の表面積は 1 g 当り約 25 m^2 である(図2)。

(2) 水酸アパタイト細粒の組織学的変化および血液生化学的变化

投与後3日の肉眼所見では、HAp 細粒は漿膜面に白色の結節または膜様にみられた。顕鏡では

図1 Hydroxyapatite particle diameter

HAp 細粒は fibroblast に取り囲まれて、ほぼ円形にみられ、わずかに炎症細胞浸潤を認めた。投与後 28 日には、炎症細胞浸潤は消失し、腹膜と同化しているようであった(図 3)。

また、HAp 細粒の安全性を確認するために、HAp 細粒 200 mg, レンチナン 0.5 mg, 生理食塩水 0.5 ml をおのおの約 200 mg 雄性ドンリュウラット腹腔内に投与後、経日的に腹部大動脈から採血した。ヘモグロビン濃度、赤血球数、白血球数、血小板数の変化を軽度認めたが、Alb, TB, BUN, Cre, Na, Cl, Ca などの血液生化学検査では有意な変化は認めなかった。

(4) 水酸アパタイトの除法効果について

HAp-LNTN の除法効果を free-LNTN と比較したところ、腹腔内に投与されたレンチナンの血中濃度は投与後 3 時間より約 24 時間まで有意に高値を維持することができた。

また、HAp-CBDCA と free-CBDCA の比較でも投与後 6 時間、24 時間、48 時間で HAp-CBDCA が高い血中濃度を示した(図 4)。

(5) HAp-LNTN の抗腫瘍効果

AH-130 腹水肝癌細胞による癌性腹膜炎を用いたおのおのの治療の比較検討では、control 群にくらべ、HAp 群、free-LNTN 群の腹腔内投与では生存率の改善は得られなかった。しかし、HAp-LNTN 群は control 群と比較すると、35 日から 55 日の間で有意に生存率が改善された。また、free-LNTN 群に対しては、有意差は認めないが良好な生存率を示す傾向がみられた(図 5)。

考 察

liposome^{10,11)}, 活性炭¹²⁻¹⁴⁾などを用い DDS を応用した種々の局所療法の研究がなされすばらし

図2 HAp 細粒の電顕像

い治療成績が得られつつある。

今回は、薬剤を徐放化させるため生体親和性の優れた HAp 細粒に着目した。実験に使用した HAp 細粒は約 800°C と比較的低温で焼成され、機械的強度に対しては弱く、生体支持材料としての価値は少ないが、biodegradable であり、生体内でよりはやく溶解・吸収され、高い porosity と広い表面積によりすぐれた drug carrier としての可能性がある。この低温焼成された HAp 細粒に関する安全性の確認や、drug carrier として利用した報告はほとんどない。そのため実験的に HAp 細粒を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した。組織学的には投与後初期では炎症細胞浸潤を軽度認めたが、28 日後には炎症細胞浸潤は消失しており、本剤がほとんど異物として認識されなかったものと考えられる。また、血液生化学的变化でも各個体間の差が認められたが、control 群にくらべ有意な差は認めなかった。

実験に用いた AH-130 腹水肝癌に対するレンチナンの抗腫瘍効果は iv-iv 系で延命効果が認められているが、ip-ip 系での free-LNTN の投与では今回の実験結果と同様に統計学的にも延命効果は認められていない¹⁵⁾。しかし、HAp-LNTN 投与群は control 群にくらべ統計学的に有意に延命効果を示した。これは HAp 細粒の徐放効果に

図3 HAp 細粒投与後28日の組織像
a : $\times 100$, b : $\times 400$

図4 a : Serum levels of lentinan (LNTN)
b : Serum levels of carboplatin (CBDCA)

図5 Survival curves of rats bearing AH-130 carcinoma

えられる。またカルボプラチンも HAp-CBDCA を投与するとより高い血中濃度を維持できることから、抗腫瘍効果の向上が期待できる。

結語

HAp 細粒は生体親和性に富み、焼成温度をかえることで porosity, 形状, 粒子径などの変更が可能であり, biodegradable で徐放効果を有する

関係し、投与後24時間にわたり free-LNTN にくらべ高い血中濃度が維持される結果によると考

ことから、今後、各種抗癌剤の drug carrier とし
ての可能性がさらに広がるものと考えられる。

文 献

- 1) 秦 美治, 青木秀希, 吉山直樹・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.
- 2) Tsuji, T., Aoki, H., Muneoka, K. et al.: Development of vascular access tube made of sintered hydroxyapatite tubing. J. Crean. Soc. Jap. Intrr. 85: 745-750, 1987.
- 3) 青木秀希, 秦 美治, 赤尾 勝・他: 経皮的に埋入した水酸アパタイト焼結体周囲の組織学的変化. 人工臓器 13: 1131-1134, 1984.
- 4) Aoki, H., Akao, M., Shin, Y. et al.: Sinterd hydroxyapatite for percutaneous device and its clinical application. Medical Progress Through Technology 12: 213-220, 1987.
- 5) Aoki, H., Shin, Y., Akao, M. et al.: Sinterd hydroxyapatite for percutaneous device. Advances in Biomaterials 7: 1-4, 1985.
- 6) Yoshiyama, N., Kitamura, M., Sakurai, S. et al.: Hydroxyapatite percutaneous access device applied for long-term intravenous hyperalimentation. Apatite 1: 377-382, 1992.
- 7) 内田淳正, 神藤佳孝, 荒木信人・他: アパタイトセラミックスを基剤とした徐放性抗癌剤の開発. 癌と化学療法 16: 3231-3235, 1989.
- 8) 次田 正, 鶴 純明, 高橋 健・他: 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: 3423-3428, 1989.
- 9) Tomita, Y., Ohgushi, H., Ozaki, J. et al.: Antibiotics α -TCP beads. A drug delivery system; Basic result. Apatite 1: 417-420, 1992.
- 10) Ichino, T., Yotsuyanagi, T., Mizuno, I. et al.: Antitumor effect of Liposome-entrapped Adriamycin administrated via the Portal Vein. JPN. J. Cancer Res. 81: 1052-1056, 1990.
- 11) 赤毛義実, 水野 勇, 市野達夫・他: 胃癌リンパ節を Target とした Liposomal Adriamycin 内視鏡下局中療法に関する検討. 癌と化学療法 18: 1822-1824, 1991.
- 12) 萩原明彦, 岩本昭彦, 高橋俊雄・他: 胃癌の腹膜播種に対する活性炭吸着マイトマイシンCの術中腹腔内投与. 癌と化学療法 16: 187-192, 1989.
- 13) 高橋俊雄, 岩本昭彦, 萩原明彦・他: 癌性腹膜炎に対する抗癌剤の腹腔内投与一活性炭吸着 MMC の腹腔内投与一. 癌と化学療法 11: 1550-1556, 1984.
- 14) 岩本昭彦, 萩原明彦, 高橋俊雄・他: 癌性腹水に対する活性炭吸着抗癌剤の作用機序に関する免疫学的検討. 日本消化器外科学会雑誌 20: 371, 1987.
- 15) 佐藤 博: レンチナンのラット腹水肝癌スペクトラム. 癌と化学療法 7: 1694-1697, 1980.