

アクリラルピシン含有ポリ- β -ヒドロキシ酪酸マイクロスフェアの調製と肝動注による評価

久保田 美穂^{*1)}福島 昭二^{*2)}中野 眞汎^{*3)}従 二 和 彦^{*4)}

1. はじめに

今日の癌化学療法では、非腫瘍部への副作用を軽減し、腫瘍部への選択的な薬物の到達を目的として様々な工夫がなされている。抗癌薬含有マイクロカプセルおよびマイクロスフェアによる動注塞栓化学療法は、その有用な方法のひとつであり、臨床的にも高い評価を受けている^{1,2)}。動注塞栓化学療法は、肝癌や腎癌などその腫瘍に固有な栄養動脈を有するものに特に効果的であり、塞栓物質であるマイクロスフェア（以下 MS と略す）から薬物が持続的に放出され、また、薬物放出速度が制御されることによりさらに、その効果は高まるものと考えられる。

さて、このようなシステムにおいて高分子は薬物の担体として利用されており、用いられる高分子は生体内適合性にすぐれ、薬物放出後、生体内で分解されてしまうことが望まれる。これまで、ゼラチン³⁾、アルブミン⁴⁾、コラーゲン⁵⁾などの天然高分子や、ポリ乳酸⁶⁾、ポリグリコール酸⁷⁾などの合成高分子が生体内分解性高分子として利用されている。

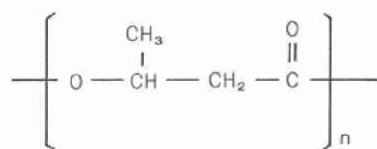
今回、新たな高分子として微生物によって生合成されるポリ- β -ヒドロキシ酪酸を用い、塩酸アクリラルピシン含有マイクロスフェア（以下 ACR-MS と略す）を調製し、薬物放出性のコン

トロールおよび家兎肝癌モデルに対する抗腫瘍効果について検討した。

2. ポリ- β -ヒドロキシ酪酸について

ポリ- β -ヒドロキシ酪酸（以下 PHB と略す）は、D（-）- β -ヒドロキシ酪酸の直鎖状ポリエステルであり（図 1）、微生物の細胞内で貯蔵物質として生合成されるものであり、生分解性にすぐれ、起炎性をまったく示さない高分子として認められている⁸⁾。今回、われわれの用いた PHB は *Alcaligenes eutrophus* により生合成されたもので、固有粘度の測定値より算出した重量平均分子量は約44万である。また、PHB の薬物投与剤形に関する利用については、Korsatko ら^{9,10)}が圧縮錠剤として用いることにより薬物の徐放化が得られる

Polymer: Poly- β -hydroxybutyric acid (PHB)



Obtained from *Alcaligenes eutrophus*

mp 175-177°C

$\overline{M}_w = 4.4 \times 10^5$

$([\eta] = 7.7 \times 10^{-5} \overline{M}_w^{0.82})$
(Marchessault et al., 1970)

図 1 ポリ- β -ヒドロキシ酪酸の構造式

*熊本大学医学部附属病院 ¹⁾薬剤部(くぼた・みほ) ²⁾試験研究室長(ふくしま・しょうじ) ³⁾教授(なかの・まさひろ) 城西大学薬学部 ⁴⁾助教授(じゅうに・かずひこ)

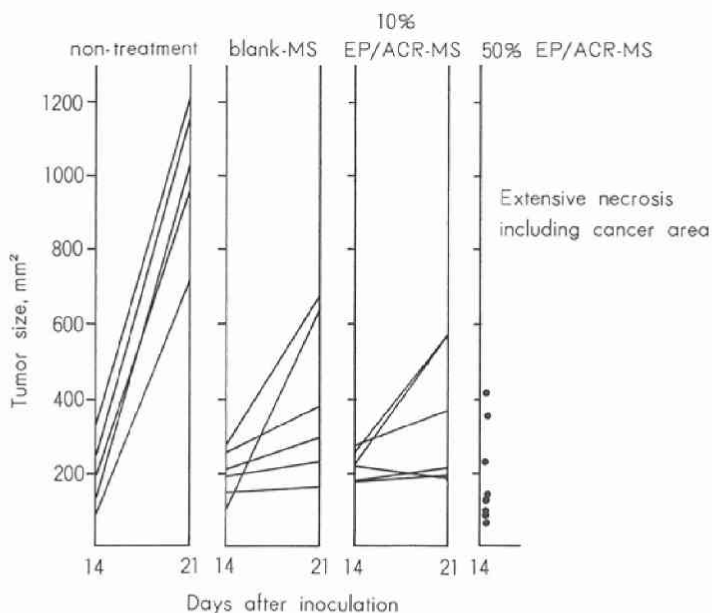


図6 MSの抗腫瘍効果

表1 MSの抗腫瘍効果

	増殖率 (%) ^{注)} mean ± SEM
non-treatment	635.7 ± 85.8
blank-MS	146.3 ± 93.3
10% EP/ACR-MS	51.6 ± 27.5
50% EP/ACR-MS	*

注) (腫瘍サイズ_{21day} - 腫瘍サイズ_{14day}) × 100腫瘍サイズ_{14day}

*extensive necrosis

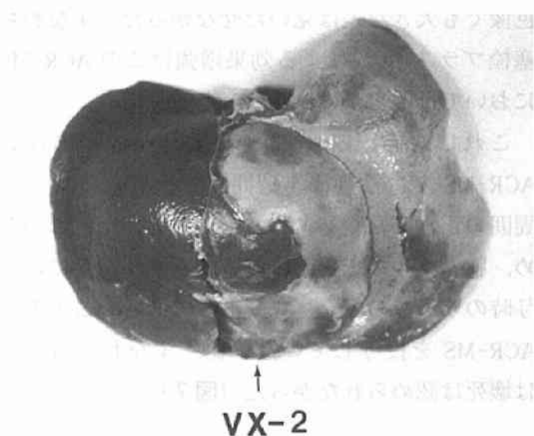


図7 50%EP/ACR-MS投与後7日目の家兎肝臓

7. 家兎肝癌モデルでの抗腫瘍効果

PHB-MS からの ACR の放出速度と抗腫瘍効果との関係について、家兎肝癌モデルを用いて検討した。用いた MS は、図 4 中の放出速度の速い MS としてエステル添加量 50% のもの、遅い MS として添加量 10% のものおよび ACR を含有しない MS (以下 blank-MS と略す) の 3 種類である。

図 5 は、blank-MS 投与後 1 日目での摘出肝の硫酸バリウム動注による血管造影像である。blank-MS による塞栓は、このモデルおよび粒子径においては第 3 次分枝以後での比較的末梢側で

起っていることが確かめられた。また、MS を投与していない右葉側は、当然のことながら塞栓は起っていない。図 6 に各 MS 投与後 1 週間での増殖挙動を示す。また、表 1 には増殖率を示す。

未治療群に比べ、blank-MS 群では増殖が有意に抑制されており、塞栓による抗腫瘍効果がみられた。しかし、HE 染色像では腫瘍は中心性の壊死に陥っているものの、周囲に viable な腫瘍細胞が観察された。

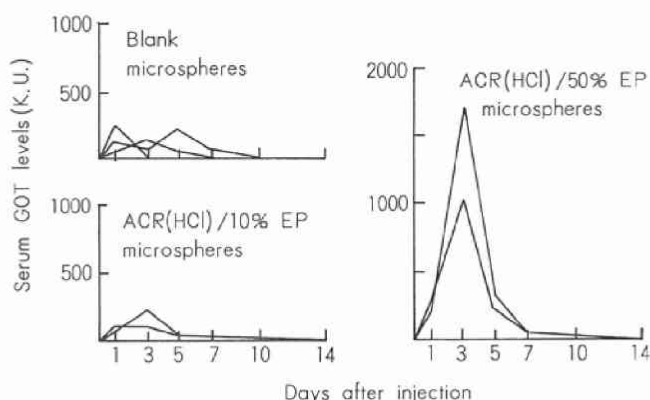


図8 正常家兎にMS投与後の血清GOT値の変化

パルミチン酸エチルエステル（以下 EP と略す）を10%添加した放出の遅い ACR-MS では、増殖率は未治療群に比べ有意に抑制されたが、しかし、blank-MS との間には有意差はなく HE 染色像でも大きな差は見いだせなかった。すなわち、塞栓プラス ACR による効果増強はこの ACR-MS においては明らかではなかった。

これに対し、EP を50%添加した放出の速い ACR-MS では投与後1週間目で腫瘍部分はその周囲の正常肝細胞も含めて壊死していた。このため、腫瘍サイズを正確に測定できず、図6には投与時のサイズのみをプロットしてある。この際、ACR-MS を投与していない側、すなわち右葉には壊死は認められなかった（図7）。

8. 正常肝に対する MS の障害性

図8は、正常家兎の肝臓にMSを投与し、GOT値を測定した結果である。blank-MSと放出の遅い ACR-MS は、放出の速い ACR-MS に比べ、GOT 値の上昇は小さく肝障害性は少ないことがわかる。しかし、いずれでも GOT 値のピークは3日から5日目ぐらいでみられた。この場合、14日目に摘出された肝臓は、抗腫瘍効果の検討でみられた場合と同様に blank-MS および放出の遅い ACR-MS では正常肝にほとんど壊死がみられなかった。それに対し、放出の速い ACR-MS では投与部位である左葉に壊死が観察された。

9. おわりに

肝癌に対する動注塞栓化学療法は、肝臓の血行二重支配を利用して、腫瘍に選択的な阻血効果と抗癌薬による効果とを併用させたものであり、さらにマイクロカプセル、マイクロスフェアでは抗癌薬の持続放出による効果増強を期待している。しかし、抗癌薬の放出速度と抗腫瘍効果との間の関係を、まだ明確にするに至っていない。

従二ら^{2,13)}は、ACR 含有ポリ乳酸 MS からの ACR の放出速度を脂肪酸エステルを添加することにより増大し得ることを見だし、さらに、脂肪酸エステルの種類および添加量によりコントロールし得ることを見だした。さらに、ラットおよびイヌでの基礎検討ののち、臨床に応用した。

今回、われわれは新しい生体内分解性高分子であり、今後の展開が期待される PHB を用いて ACR 含有 MS を調製した。PHB-MS からの ACR の放出は、従二らの報告と同様に脂肪酸エステルの種類および量でコントロールすることが可能であった。この放出速度と抗腫瘍効果との関係を検討した結果、EP を10%添加した ACR-MS では、blank-MS と同程度の抗腫瘍効果があったが、50%添加の ACR-MS では著明な抗腫瘍効果増強がみられた。その反面、50%添加 ACR-MS では正常肝に対しても強い障害性を示した。この正常肝に対する障害性は、ACR-MS からの ACR の放

こと、マウスの皮下投与により生体内での分解性が確認されたことを報告している。

3. MSの調製

MSは液中乾燥法¹¹⁾により調製した。すなわち、PHBの3%塩化メチレン溶液中にACRおよび放出速度をコントロールするための添加物を溶解し、その溶液を1%ゼラチン水溶液中へ分散させ、攪拌下に塩化メチレンを蒸発させた。生成したMSをろ取し、水で洗浄後、減圧下に乾燥させた。添加物としては各種脂肪酸エステルを用いた。また、ACRは塩化メチレンに溶解しているため、生成したMS中に均一に分散していると考えられ、そのことは電子顕微鏡によっても確かめられた¹¹⁾。

4. 放出実験

放出液として0.01%ポリソルベート80含有生理食塩液を用い、37℃の恒温槽中で振盪した。経時的に放出液中のACR濃度を分光光度計で測定した。

5. 家兎肝癌モデルでの抗腫瘍効果の検討

福島ら¹²⁾の方法に準じて行った(図2)。すなわち、白色雄性家兎の肝内側左葉に約1mm角のVX-2腫瘍切片を移植し、14日後、左固有肝動脈より0.01%ポリソルベート80含有生理食塩液と

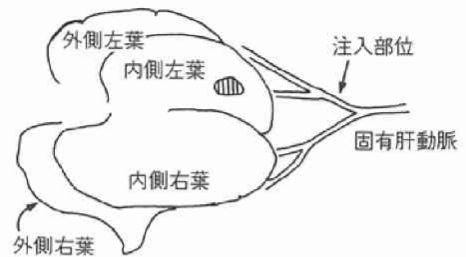
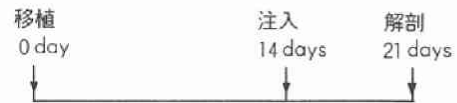


図2 VX-2腫瘍移植部位および製剤注入部位

60%ウログラフィン®の混液1mlに、MSを懸濁させて投与した。投与量は、MSとして12.5mg (ACRとして2mg)とし、MSの粒子径は53μmから105μmの間のものを用いた。投与前および投与後7日目の腫瘍の長径と短径を測定し、腫瘍増殖挙動および組織標本の染色像により抗腫瘍効果の評価を行った。

6. 脂肪酸エステル添加によるACR放出速度のコントロール

図3は、各種の直鎖飽和脂肪酸エチルエステルを、PHB重量に対し25%の割合で添加した場合のACRの放出挙動を示している。無添加の

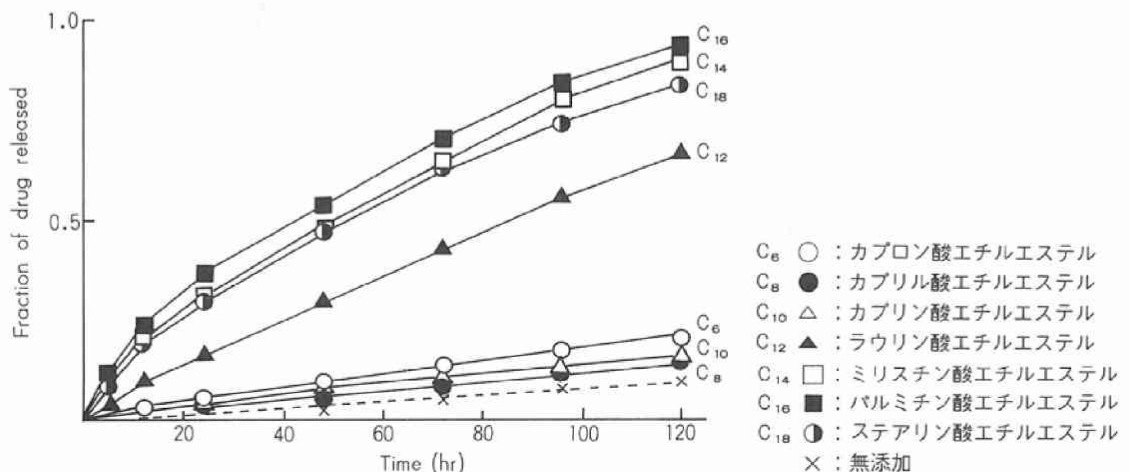


図3 PHB-MSからのACRの放出挙動

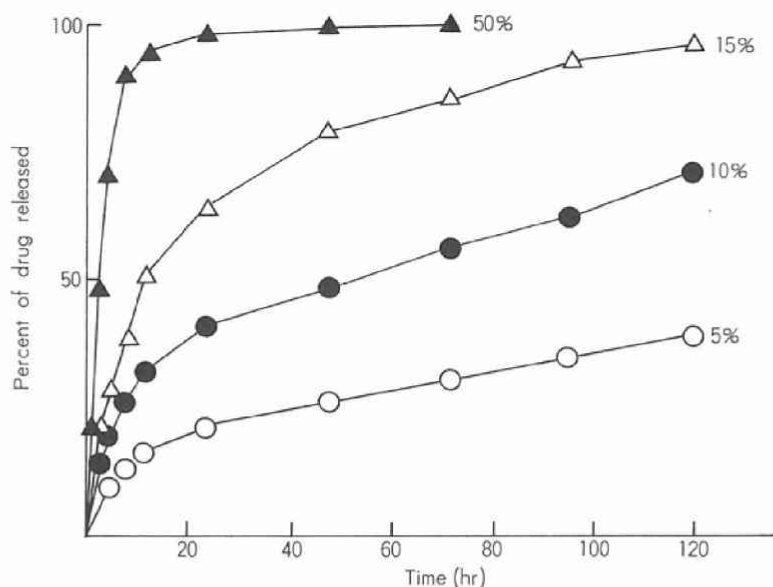


図4 PHB-MSからのACRの放出に及ぼすパルミチン酸エチルエステル含有量の影響

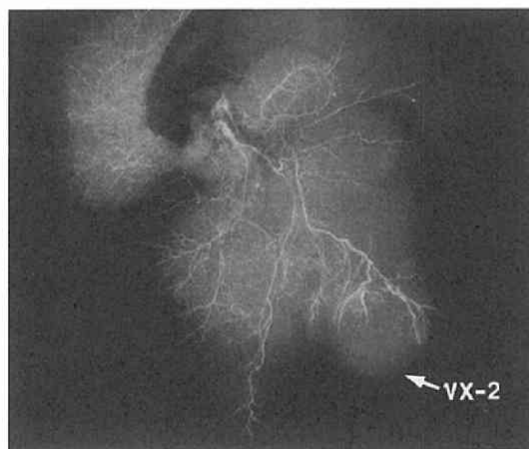
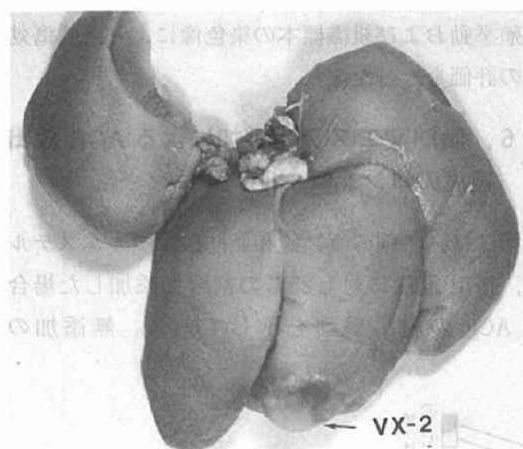


図5 Blank-MS投与後1日目の血管造影像

ACR-MSからは、ほとんどACRが放出されなかった（点線）のに対し、脂肪酸エステルを添加したMSでは放出速度が増大し、炭素鎖の長さの違いによって放出速度のコントロールが可能なが示唆された。このメカニズムについて種々検討したところ、ACRはMS中の添加物で満たされたchannelを通じて拡散し、溶出すると考えられた¹¹⁾。したがって、添加物自身のMS内含有率と、添加物に対するACRの溶解度が大きく寄与して

いると考えられ、この両者の兼ね合いによって各添加物の放出促進効果に差が生じるものと思われる。

次に、高い放出促進効果を示したもののひとつであるパルミチン酸エチルエステルをPHB重量に対し各割合で添加した場合の放出挙動を図4に示すが、添加量の違いによっても放出速度のコントロールが可能であった。

出速度と、門脈からの血流による ACR の正常肝からのクリアランスとの関係でその程度が決まると思われる。

現在検討中であるが、抗腫瘍効果は増強し、正常肝に対する障害性は少ない放出速度が、今回検討した放出速度の中間にあるものと予想される。しかし、一方では臨床において超選択的に腫瘍部に MS が投与できる場合には、EP を 50% 添加した ACR-MS のような強力な抗腫瘍効果をもつものに、より確実な効果が期待されるときも考えられる。

今後、MS の種々の性質と抗腫瘍効果、あるいは副作用との関係を明確にし、さらに臨床へと応用していきたいと考える。

文 献

- 1) 加藤哲郎ほか：MMC マイクロカプセルによる Chemoembolization. 癌と化学療法, 11 (4), 798, (1984).
- 2) 市原知文ほか：ポリ乳酸マイクロスフィアによる経カテーテル的肝動脈塞栓療法. 癌と化学療法, 12 (10), 1944, (1985).
- 3) Yoshioka, T. et al. : Specific delivery of mitomycin C to the liver, spleen and lung : nano and microspherical carriers of gelatin. Int. J. Pharmaceut., 81, 131, (1981).
- 4) Fujimoto, S. et al. : Effects of intraarterially infused biodegradable microspheres containing mitomycin C. Cancer, 55 (3), 522, (1985).
- 5) Kincle, F. A. et al. : Collagen as a Drug Carrier. Arch. Pharm., 317 (8), 657, (1984).
- 6) Juni, K. et al. : Preparation and evaluation *in vitro* and *in vivo* of polylactic acid microspheres containing doxorubicin. Chem. Pharm. Bull., 33 (1), 313, (1985).
- 7) 岩 喬ほか：体内吸収性高分子化合物と制癌薬の複合体による癌治療法の開発. 医学のあゆみ, 121, 1136, (1982).
- 8) 富田謙吉ほか：微生物によってつくられるポリヒドロキシブチレートとその応用. 高分子, 33 (5), 370, (1984).
- 9) Korsatko, W. et al. : Poly-D (-)-3-hydroxybuttersäure (PHB)-ein biologisch abbaubarer arzneistoffträger zur liberationsverzögerung. Pharm. Ind., 45 (5), 525, (1983).
- 10) Korsatko, W. et al. : Poly-D (-)-3-hydroxybuttersäure-ein biologisch abbaubarer arzneistoffträger zur liberationsverzögerung. Pharm. Ind. 45 (10), 1004, (1983).
- 11) Kubota, M. et al. : Mechanism of enhancement of the release rate of aclarubicin from poly- β -hydroxybutyric acid microspheres by fatty acid esters. Chem. Pharm. Bull., 35 (12), 印刷中.
- 12) Fukushima, S. et al. : Selective anticancer effects of 3', 5'-dioctanoyl-5-fluoro-2'-deoxyuridine, a lipophilic prodrug of 5-fluoro-2'-deoxyuridine, dissolved in an oily lymphographic agent on hepatic cancer of rabbits bearing VX-2 tumor. Cancer Res., 47, 1930, (1987).
- 13) Juni, K. et al. : Modification of the release rate of aclarubicin from polylactic acid microspheres by using additives. Chem. Pharm. Bull., 33 (4), 1734, (1985).