

目次

第 1 章 研究の背景

- 1-1. 転移性骨腫瘍の疫学的特徴 p6
- 1-2. 転移性骨腫瘍の治療と問題点 p7
- 1-3. 脊椎転移癌に対する局所療法 p10
- 1-4. 局所化学療法の対象となる脊椎転移癌と抗癌剤の選択 p16

第 2 章 研究の目的

p18

第 3 章 材料と方法

- 3-1. 材料 p20
- 3-2. 方法 p21
 - 3-2-1. 担体の作製 1. p21
 - 3-2-2. 担体の作製 2. p23
 - 3-2-3. パクリタキセルの担持 p24

3-2-4. 担体の物質特性の評価：実験 1	
3-2-4-1. フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)	p25
3-2-4-2. 示差熱重量同時測定解析 (TG-DTA)	p25
3-2-4-3. 走査型電子顕微鏡 (SEM)	p26
3-2-4-4. 短期薬剤放出試験	p26
3-2-4-5. 担体の直径の測定	p26
3-3. パクリタキセル含有担体の抗腫瘍活性の判定	
3-3-1. <i>in vitro</i> 抗腫瘍活性の検討：実験 2	p28
3-3-2. <i>in vivo</i> 抗腫瘍活性の検討：実験 3	p31
3-3-2-1. 脊椎転移癌モデル動物	p31
3-3-2-2. 下肢運動機能評価による局所療法の効果判定	p35
3-3-3. 脊椎標本の組織病理学的評価	p37
3-3-4. 椎体外腫瘍サイズの形体計測による局所療法の効果判定	p37
3-3-5. 体重減少量による局所療法の毒性の判定	p37
3-4. パクリタキセルの局所療法の効果判定：実験 3-1	p38
3-5. パクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果判定：実験 3-2	p40
3-5-1. 下肢運動機能の評価	p40

3-5-2. 脊椎転移乳癌ラットの椎体外腫瘍サイズの形態計測	p42
3-6. Sr ²⁺ とBa ²⁺ で架橋したビーズの局所療法の効果判定：実験 3-3	P43
3-7. パクリタキセルを高用量担持させたビーズの局所療法の効果判定：実験 3-4	p45
第4章 結果	
4-1. 担体へのパクリタキセル担持の確認	p47
4-1-1. ハイドロキシアパタイト微粒子の FTIR 解析結果	p47
4-1-2. ハイドロキシアパタイト微粒子の TG-DTA 解析結果	p48
4-2. 担体からのパクリタキセルの放出性	p49
4-3. パクリタキセル担持によるハイドロキシアパタイト微粒子の形態変化	P50
4-4. ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルの直径変化	p51
4-5. パクリタキセル含有ビーズのラット乳癌細胞株に対する細胞障害性	P52
4-6. 脊椎転移乳癌ラットに対するパクリタキセルの局所療法の効果	p55
4-7. 全身療法と比較したパクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果	p57
4-8. 脊椎の組織病理学的所見	p59

4-9. パクリタキセル含有ビーズの椎体外腫瘍に対する効果	p60
4-10. パクリタキセル含有ビーズの局所療法による毒性	p61
4-11. Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズの局所療法の効果	p63
4-12. パクリタキセルを高容量担持させたビーズを用いた局所療法の効果	P66
第5章 考察	p69
第6章 結論	p83
第7章 問題点と今後の検討	p83
謝辞	p85
学会発表	p87
引用文献	p98

Intraosseous delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate composite beads delaying paralysis caused by metastatic spine cancer in rats.

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Mihoko Kobayashi, Satoshi Nakamura, Naoyuki Ochiai: Journal of Neurosurgery Spine 9:502-510, 2008

Novel local treatment with paclitaxel-loaded hydroxyapatit-alginate gels for spinal bone metastases.

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Toru Tonegawa, Tomohiko Yoshioka, Junzo Tanaka, Naoyuki Ochiai: Key Engineering Materials 330-332:1343-1346, 2007

Preparation of hydroxyapatite-alginate gels as a carrier for controlled release of paclitaxel. Tomohiko Yoshioka, Toshiyuki Ikoma, Akira Monkawa, Yukinori Sato, Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Junzo Tanaka: Key Engineering Materials 330-332:1053-1056, 2007

第 1 章 研究の背景

1-1. 転移性骨腫瘍の疫学的特徴

骨組織は肺や肝臓に次ぐ癌転移の好発部位である。アメリカにおける骨転移による死亡数は年間約 35 万人と推定される[1]。癌種別では乳癌や肺癌、前立腺癌は骨転移しやすく、骨転移癌患者の半数はこれらの患者で占めると言われる[2]。日本における詳細な臨床疫学データはないが、内田らによれば 2004 年の日本の骨転移癌患者は約 15 万人と推定されている[3,4]。骨転移癌は進行すると激しい疼痛や病的骨折、高 Ca 血症などの併発が問題となる[5]。さらに脊椎への転移では、麻痺の発生が患者の QOL を著しく低下させ、生命予後を悪化させることが指摘されている[6]。

脊椎転移は骨転移の約 40% と最も多く、部位別では胸椎が約 70%、腰椎が約 20%、頸椎が約 10% の発生頻度と言われる[7]。麻痺は脊椎転移癌患者の 10-20% に発生し[2,9]、Klimo らの報告によればアメリカにおける脊椎転移による麻痺での年間死亡数は 2.5 万人以上と推定される[2]。さらに無症候性のものも含めるとアメリカにおける脊椎転移癌患者数は年間約 6 万人で、その数は癌患者全体の約 5% を占めると推定される[10]。

1-2. 転移性骨腫瘍の治療と問題点

転移性骨腫瘍の治療は他の癌治療と同様に、根治治療、延命治療、緩和治療の3つの中から患者の生命予後、全身状態などを考慮して選択される。脊椎転移癌の治療には、外科的治療、放射線治療、化学療法、ビスフォスフォネート製剤や麻薬性鎮痛剤の投与などがある。脊椎転移癌の疼痛には放射線治療が約80%の症例で有効であると言われるが[11]、脊椎転移癌の麻痺に対する治療としては、放射線治療単独よりも手術と放射線療法の併用療法のほうが下肢機能を改善または維持できることが Patchell らの RCT によって明らかとなっている[12]。外科的治療には、富田らによって報告されている脊椎骨全摘術 total en block spondylectomy (Fig.1) のような根治治療を目指した手術法[13,14]もあるが、compartment and barrier の概念を用いたこのような術式でも、は再発例が少なくないことや、侵襲が大きい手術と放射線療法の併用は術後の深部感染 (deep surgical site infection: D-SSI) が増加することが脊椎転移癌の問題点として指摘されている[15]。

全身化学療法は癌患者の生存率を改善してきたが、脊椎転移癌に対する効果は不明である。その理由の一つに骨組織への薬剤の移行性の悪さが挙げられる。抗癌剤の固形癌への移行は経静脈的投与量の1%程度と言われ、大部分の薬剤は標的部位に達する前に非特異的に細網内皮系を中心とする正常細胞や組織へ移

行するか、腎臓から体外へ排出されてしまう。薬剤は一般的に効果の得られる血中濃度以上で、なおかつ重篤な有害事象の出現する血中濃度以下の血中濃度（いわゆる **therapeutic window**）になるように至適投与量が決定されるが、抗癌剤の場合は、有効な血中濃度に上げると正常細胞や組織に致命的な副作用が発生しやすく、他の薬剤と比較してこの **therapeutic window** の幅が非常に狭い。そのため患者の **QOL** を損なわないか、損なっても中止により早期回復が得られる抗癌剤の量で経静脈投与による全身化学療法は行われる方向に変わってきている。また、肝細胞癌や膀胱癌などの一部の癌では局所化学療法が行われ成果を上げている[16,17]。

骨原発癌や骨転移癌の治療に限って言えば、骨腫瘍の研究でハイドロキシアパタイトを担体として利用した **DDS**（薬剤送達システム）の局所化学療法が内田ら[18]や糸数ら[19]によって報告され、臨床では骨転移癌に対するエタノール療法が **Gangi** らによって報告[20]されているが、いずれも確立された治療法とはなっていない。ハイドロキシアパタイトはリン酸カルシウムの1つで、骨や歯を構成する主成分である。リン酸カルシウムは骨親和性と骨伝導能を有するため、骨欠損部に補填する人工骨として整形外科や脳外科の領域で臨床使用されている生体材料である。ハイドロキシアパタイトには薬剤担持能があり、天然高分子のアルギン酸との複合化材料は担持した薬剤を徐々に放出する作用が見

出され、難治性骨髄炎に対する抗菌薬や抗真菌薬の徐放担体として局所への薬剤送達システム（Drug delivery system, DDS）としての可能性が期待されている[21-24]。

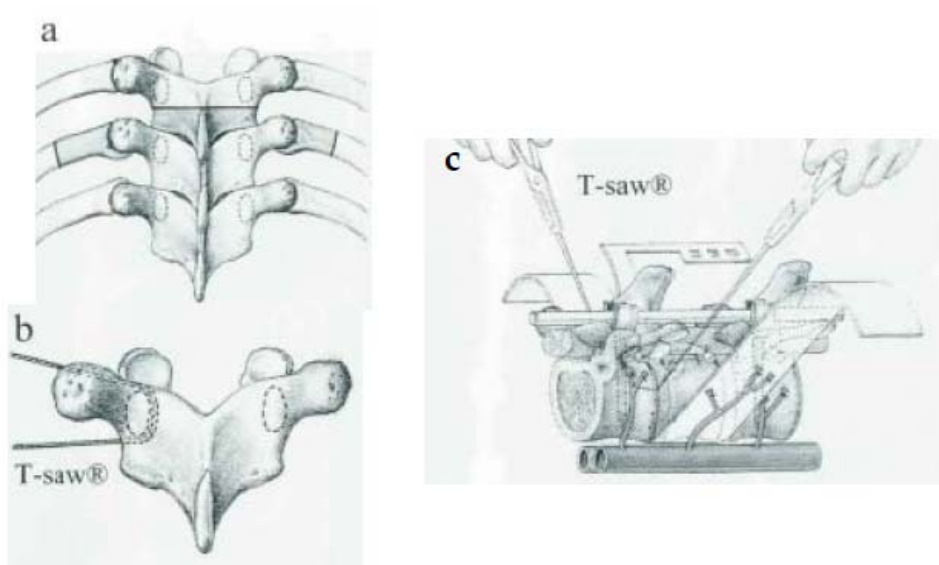


Fig.1) 富田らの脊椎腫瘍に対する後方からの腫瘍脊椎骨全摘術 (Total en bloc spondylectomy: TES)
徳橋泰明. 日本整形外科学会誌 81:573-584から転記

脊椎転移癌の根治を目指し、脊椎の後方要素は椎間孔に通したT-saw®を用いて全摘し(b)、椎体は頭尾側の椎間板レベルで全摘する(c)手術法である。

1-3. 脊椎転移癌に対する局所療法

癌の脊椎転移は患者の QOL を低下させる問題であるが、骨転移は癌の末期に分類されるため、これまでは放射線療法と鎮痛剤による緩和治療が中心となることが多かった。2001 年から 2004 年までに筑波大学臨床医学系整形外科に他科からコンサルテーションの中で骨転移関連が占める割合は 13.5% (969 症例中 131 例) で、その約 70% (90 例) は脊椎転移の治療に関する治療方針の相談であった。Fig.2 と 3 にその内訳を示す。

1990 年代に入って日本の整形外科医である徳橋ら[25]や富田ら[26]、片桐ら[27]によって脊椎転移癌患者の予後予測のための **scoring system** が提唱されている。彼らによれば、予後予測の鍵となる患者の全身状態 **Performance status (PS)** や骨転移の数、腫瘍臓器への転移、癌種、麻痺の程度などの因子の数を点数化することによって根治治療か延命治療、もしくは緩和治療の治療方針が決定される (Fig.4)。癌種によって骨転移癌患者の生命予後が大きく異なることが知られており、乳癌や前立腺癌、甲状腺癌は 2 年以上の予後が期待できる。脊椎転移の中でも特に単発性の脊椎転移は、積極的な局所療法の介入によってさらに生命予後の改善が期待できることが最近の国際多施設間の **prospective observational study** も示されている[28]。

脊椎転移癌の疼痛は緩和治療で軽減することができるが、歩行能力や排便・

排尿機能の維持する効果は期待できない。よって、これらの機能を維持・改善する目的で内視鏡下手術や小さな開創器を用いた腫瘍摘出術、切開を最小限にした経皮的な脊椎固定システム、経皮的椎体形成術などが脊椎転移癌患者の QOL を改善する低侵襲な局所治療として効果を上げている[29-31] (Fig.6,7)。

しかし、外科的治療で微少転移巣を含めた脊椎転移癌の完全切除・摘出は困難であり、肉眼的に確認できない局所の微少残存腫瘍を殺傷できる効果的な局所化学療法があれば、画像診断の進歩とともに脊椎転移癌の早期発見も可能となった現在、より早期の集学的な局所療法により患者の QOL と予後の改善が期待できるのではないかと考えた。我々はそのような集学的な局所療法のための局所化学療法を行う方法として、担体を用いた局所化学療法が効果を上げる可能性があると考えた。抗癌剤の担体には骨組織に最適な生体材料の一つであるハイドロキシアパタイトとアルギン酸の複合体を用い骨髄内で薬剤を放出させることで、外科的治療で残存した微少脊椎転移癌を殺傷し、下肢運動機能の維持が可能になるとの仮説を立てて本研究を開始した (Fig.8)。

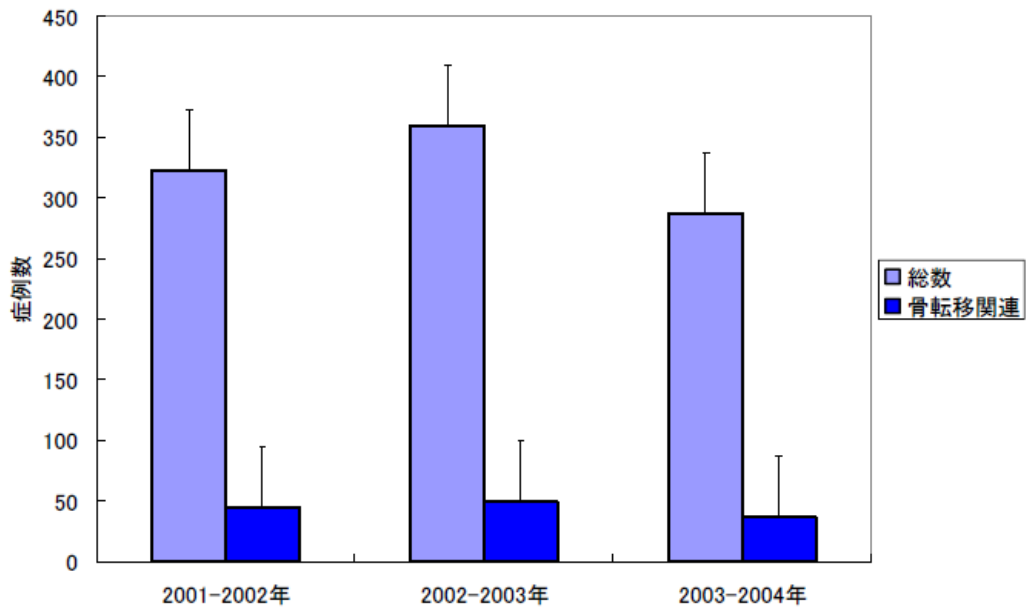


Fig.2) 筑波大学臨床医学系整形外科へのコンサルテーション総数と骨転移関連の症例数

他科からの相談の約10%は骨転移症例であった。

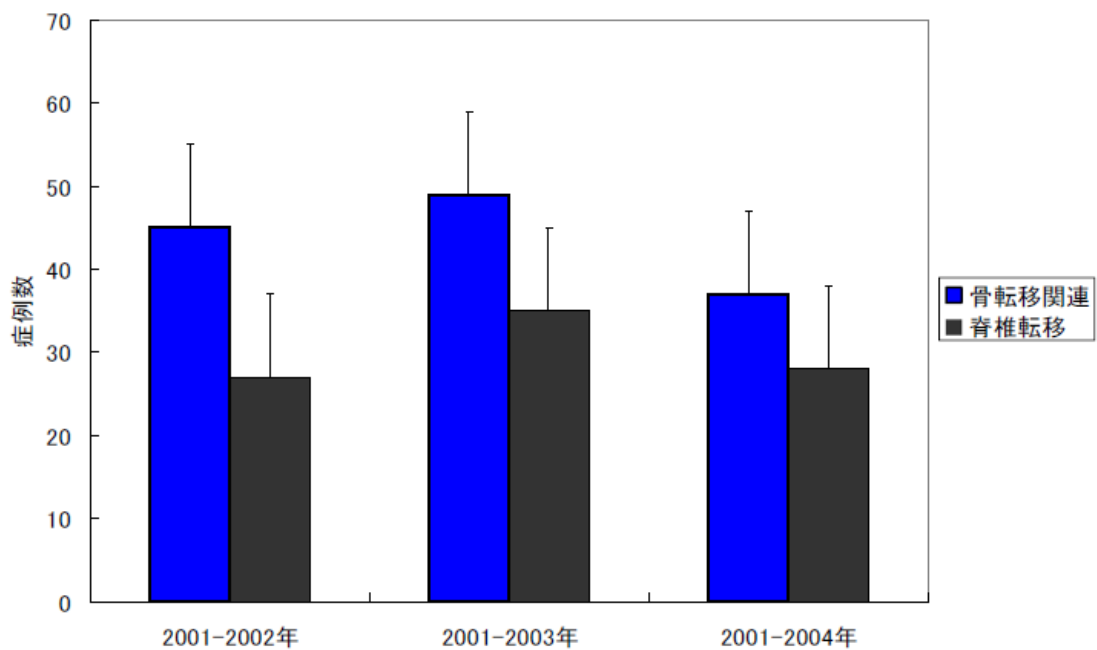


Fig.3) 骨転移関連のコンサルテーションにおける脊椎転移の症例数

骨転移関連の症例中の約70%は脊椎転移に関するものであった。

Characteristic	Score
General condition (performance status)	
Poor (PS 10%–40%)	0
Moderate (PS 50%–70%)	1
Good (PS 80%–100%)	2
No. of extraspinal bone metastases foci	
≥3	0
1–2	1
0	2
No. of metastases in the vertebral body	
≥3	0
2	1
1	2
Metastases to the major internal organs	
Unremovable	0
Removable	1
No metastases	2
Primary site of the cancer	
Lung, osteosarcoma, stomach, bladder, esophagus, pancreas	0
Liver, gallbladder, unidentified	1
Others	2
Kidney, uterus	3
Rectum	4
Thyroid, breast, prostate, carcinoid tumor	5
Palsy	
Complete (Frankel A, B)	0
Incomplete (Frankel C, D)	1
None (Frankel E)	2

Total Score	Predicted prognosis	Treatment
0 - 8	6months >	Conservative treatment
9 - 11	6months ≤	Palliative surgery
12 - 15	1 year ≤	Excisional surgery

Criteria of predicted prognosis: Total Score (TS) 0–8 = >6 mo; TS 9–11 = ≤6 mo; TS 12–15 = ≤1 yr.

Fig.4) 脊椎転移癌に対する予後判定点数表 文献[25]から転記

甲状腺癌や乳癌などは局所療法による生命予後の改善が期待できる。

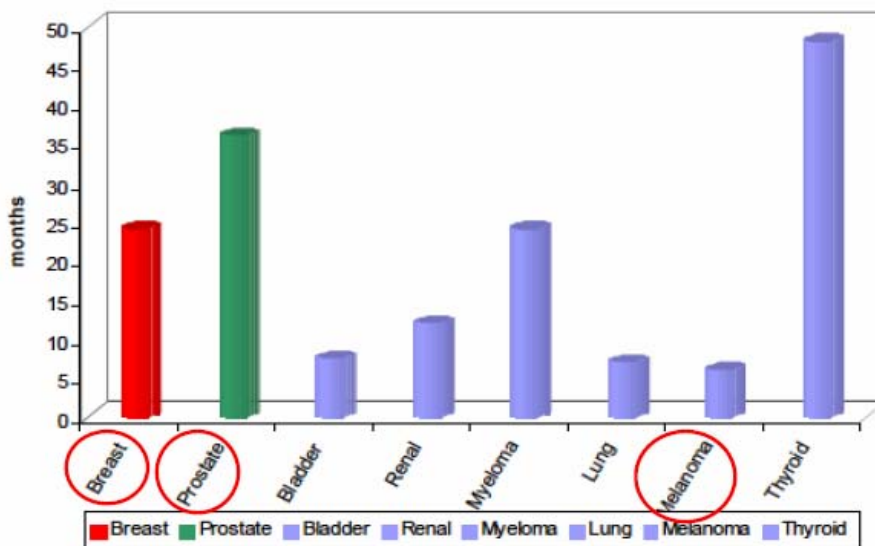


Fig.5) 骨転移癌患者の予後

Datamonitor発行(2003) The treatment and prevention of bone metastases in breast and prostate cancerより転記

乳癌、前立腺癌、甲状腺癌は骨転移後の生存期間が2年以上と長い。

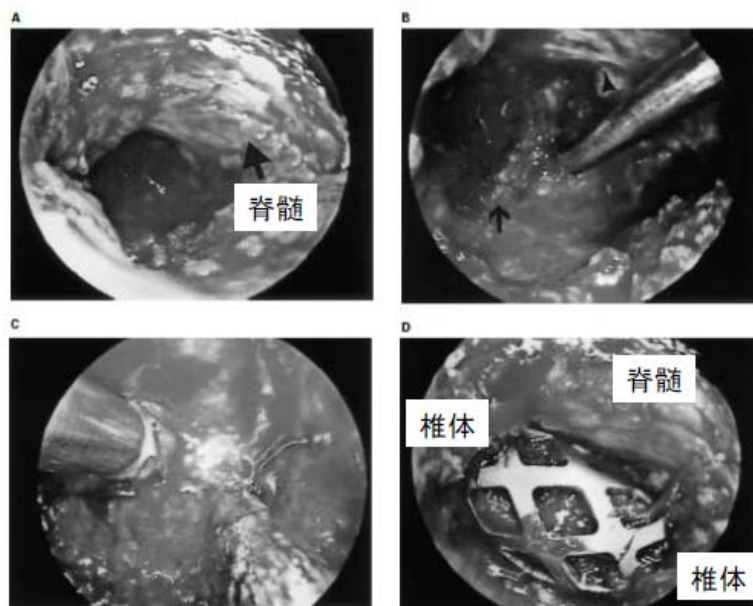


Fig.6) 内視鏡下の手術 文献[30]より転記

内視鏡下に脊椎神経を確認し(左a)、エアドリルによる骨切除(左c)を行い、椎体間にケージを挿入する(右d)。

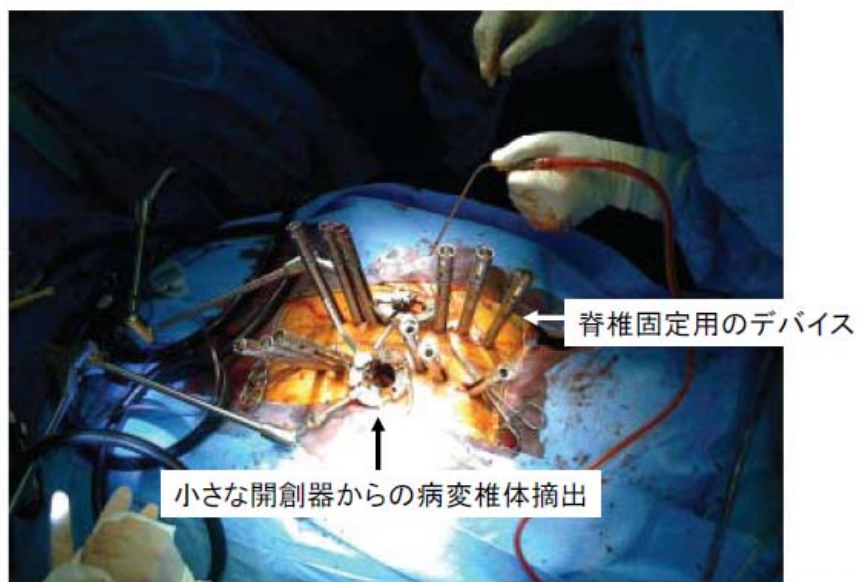
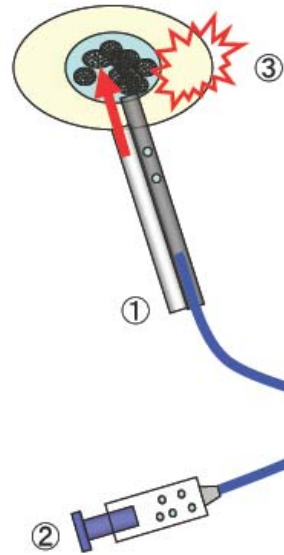


Fig.7) 小切開による後方からの椎体摘出と経皮的な脊椎固定術 文献[31]より転記

大量出血や術後感染といった合併症を減らすことができる。

metastatic bone lesion



骨転移癌に対する

①低侵襲アプローチによる外科的治療

②抗癌剤含有担体による局所療法

③残存腫瘍の殺傷→QOLの維持

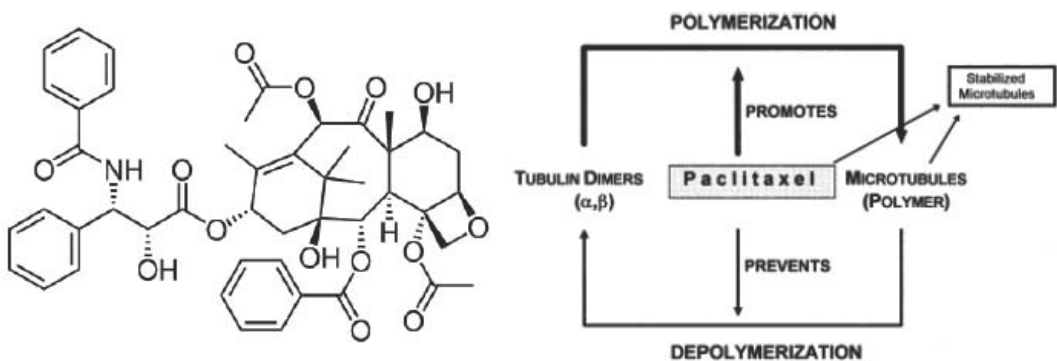
Drug-Delivery System using hydroxyapatite-alginate carrier

Fig.8) ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体を担体に用いた局所化学療法

1-4. 局所化学療法の対象となる脊椎転移癌と抗癌剤の選択

骨転移しやすい癌には肺癌、乳癌、前立腺癌などがあるが、乳癌や前立腺癌、甲状腺癌は骨転移してから 2 年以上の生命予後が期待できる。乳癌は肺癌に次いで世界で 2 番目に多い癌で、女性では最も多い。2006 年のアメリカにおける新規乳癌患者は年間約 100 万人を超え、死亡数は年間約 40 万人と推定される [32]。安達らの報告によれば、2004 年の日本における乳癌患者の罹患数は年間 3.2 万人、死亡数は年間 8,882 人と推定される [33]。世界的に増加傾向にある乳癌は骨転移の発生頻度は高く、再発の約 50% は骨転移で発見されると言われる。さらに骨転移しても 50% 生存期間が約 30-40 ヶ月と長い乳癌 [34] は、脊椎転移に対して有効な治療法の開発が必要であり、抗癌剤担体を用いた局所化学療法の対象になると考えた。

局所投与する抗癌剤には、乳癌をはじめ非小細胞肺癌、卵巣癌、胃癌など様々な固形癌に対する標準治療薬として使用されているパクリタキセル (Fig.9) を選択した。Dhanikula の報告によれば、パクリタキセルは抗増殖、抗血管新生、抗転移の 3 つの効果を局所投与によってバランスよく発揮することが示されている [35] (Fig.10)。その作用機序は微小管の安定化と過剰形成を惹起することによる細胞分裂の阻害で [36,37]、進行期乳癌に対する化学療法としても優れた効果が報告されている [38]。



(-)-(1S,2S,3R,4S,5R,7S,8S,10R,13S)-4,10-Diacetoxy-2-benzoyloxy-5,20-epoxy-1,7-dihydroxy-9-oxotax-11-en-13-yl(2R,3S)-3-benzoylamino-2-hydroxy-3-phenylpropionate

Panchagnula R: Pharmaceutical aspects of paclitaxel. Inter J Pharm 172:1-15, 1998

化学式: $C_{47}H_{51}NO_{14}$

Fig.9) パクリタキセル Paclitaxel

現在の適応症は乳癌、非小細胞肺癌、胃癌、卵巣癌、子宮体癌などである。

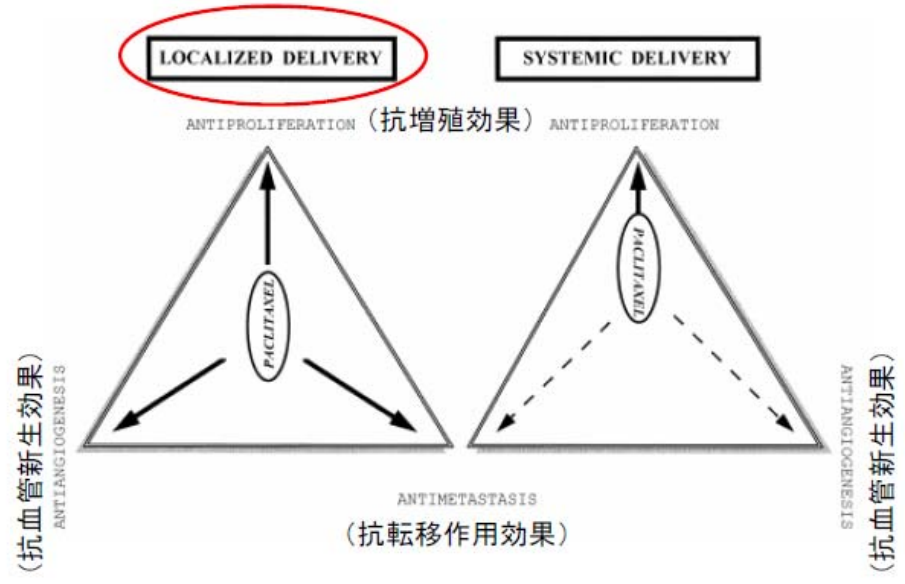


Fig.10) パクリタキセルの投与効果 文献[35]から転記

パクリタキセルは局所投与で3つの効果をバランスよく発揮する。

第2章 研究の目的

本研究の目的は、パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の脊椎転移癌モデル動物に対する局所投与が下肢麻痺の出現と下肢運動機能の維持に与える影響を検討することで、脊椎転移癌に対する局所化学療法の可能性を明らかにすることであった。

検討項目：

1. パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の物性評価

目的：

作製したハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の担体にスプレイドライ法でパクリタキセルが担持されているか、担持による形態に変化が生じるか、またハイドロキシアパタイトとアルギン酸の異なる混合比によって得られる担体の直径を明らかにすること（実験1）。

検討項目：

2. 抗腫瘍活性の判定

目的：

パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体を用いて癌細胞に対する *in vitro*（実験 2）と *in vivo* の抗腫瘍活性（実験 3）を検討し、脊椎転移癌モデル動物に対する局所療法の効果を明らかにすること。

第3章 材料と方法

3-1. 材料

パクリタキセル（分子量 853.91、純度 97%>、和光純薬社より入手）

水酸化カルシウム、リン酸水溶液、アルギン酸（すべて reagent グレード）

スプレイドライヤー（Büchi 社製 model B-290、Swiss）

細胞株：ラット乳癌細胞 CRL-1666（American Type Cell Culture より入手）

動物：Fischer344 ラット 8 週齢メス（Charles river Japan Inc. より入手）

3-2. 方法

3-2-1. 担体の作製 1. (3次元ゲル)

まず 0.25Mの水酸化カルシウム懸濁液 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ と 0.15Mのリン酸水溶液 H_3PO_4 を混合し、pH8.0、25°Cの室温下に攪拌する湿式法で hidroキシアパタイト懸濁液を合成した。さらにスプレイドライ法を用いてマイクロサイズの hidroキシアパタイト微粒子を作製した。スプレイドライ法はマイクロサイズの粒子を作製する方法の一つで、熱風とともに細い孔径のノズルから噴霧して流動性のよい球形粒子を得ることができる。この方法はインスタントコーヒーや粉ミルク、粉末調味料などの食品関係の製法に利用されており、安価に大量生産が可能な点が利点とされる。

次にこの hidroキシアパタイト微粒子をアルギン酸と混練して 2 価カチオン溶液に滴下して 3次元ゲルの担体を得た[39]。Fig.11 に hidroキシアパタイト-アルギン酸複合体ゲルの作製schemaと肉眼所見を示す。アルギン酸は 2 価カチオンの存在下に化学的架橋による 3次元のゲルを形成することが知られている[40] (Fig.12)。我々はこの現象を利用して球形の hidroキシアパタイト-アルギン酸ゲルを得た。3次元の担体を作製するための 2 価カチオンには元素の性質や反応性が似た Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} の 3種類の 2 価カチオンを選択し、溶液には 2Mの CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 を用いた。

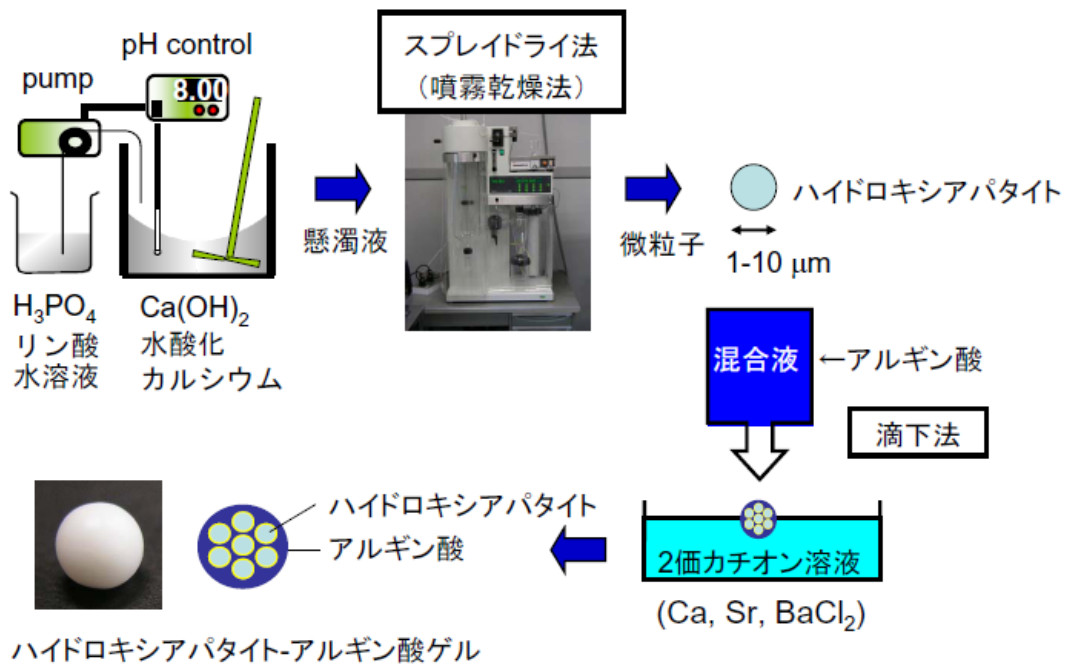
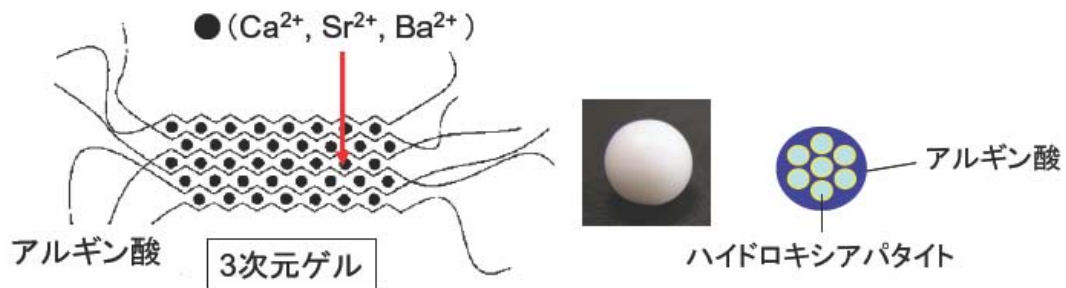


Fig.11) ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルの作製とその肉眼所見



Zheng H: Carbohydrate Research 302:97-101, 1997

Fig.12) アルギン酸と2価カチオンによる3次元ゲルの形成

3-2-2. 担体の作製 2. (3次元ビーズ)

さらに 24h 室温乾燥によるゲルからの除水で、乾燥体の担体（以下ビーズ）を得た。直径が平均 2.2mm の 2.4% weight/weight（以下 w/w）パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト 10%（w/w）-アルギン酸 1% weight/volume（以下 w/v）ゲルは、24h 乾燥除水することで直径が平均 1.7mm のビーズとすることができる（Fig.13）。同じ組成のゲルと比較してビーズの直径は約 22%小さくなる。得られたビーズの肉眼的所見を Fig.14 に示す。

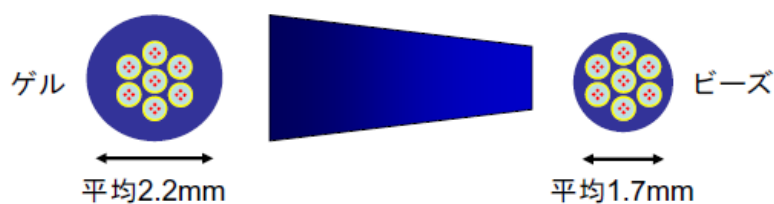


Fig.13) ハイドロキシアパタイト 10%(w/w)-アルギン酸 1%(w/v)複合体の直径の変化

直径は乾燥・除水で約20%縮小する。

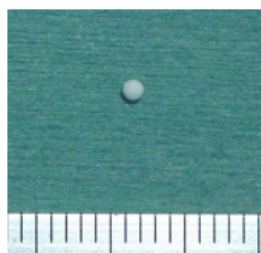


Fig.14) ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズの肉眼所見

白色、球形の複合体である。

3-2-3. パクリタキセルの担持

エタノールに溶解したパクリタキセルをハイドロキシアパタイト懸濁液へ添加して、スプレイドライ法を用いてパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト微粒子を作製した。この方法では溶液や懸濁液の濃度、噴霧速度、乾燥温度などにより粒子径を調節できると言われ、乾燥が速いため比較的熱に弱い薬剤にも適しており、DDS 研究の中でハイドロキシアパタイトへの薬剤担持に有用であることが報告されている[41]。Fig.15 にその作製 schema を示す。

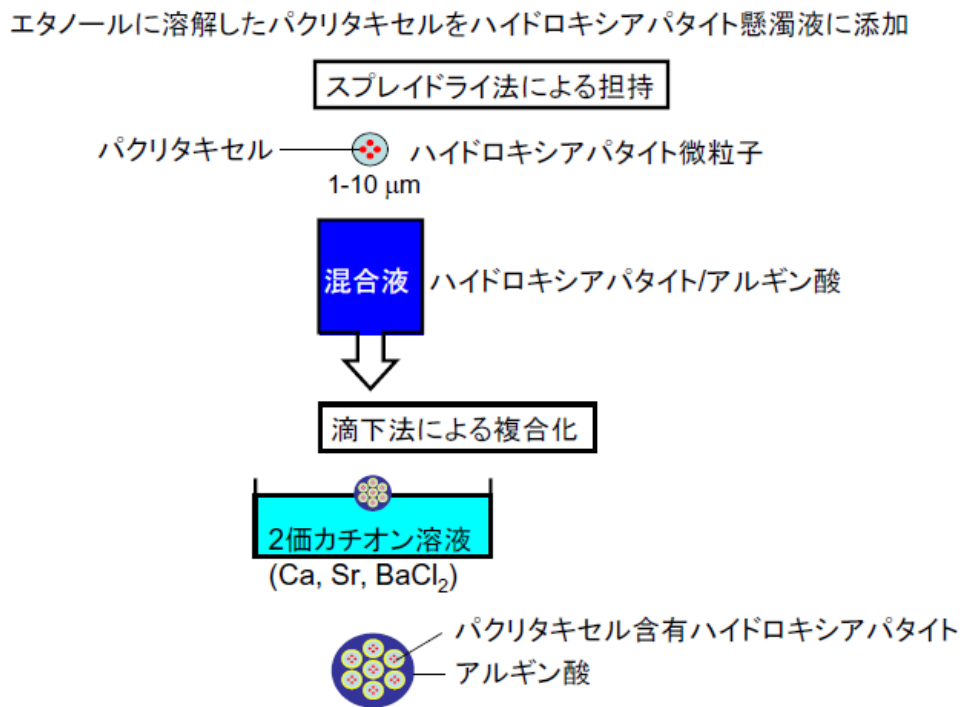


Fig.15) パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルの作製

3-2-4. 担体の物質特性の評価：実験 1

ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルへのパクリタキセル担持は、フーリエ変換赤外分光法 (Fourier transmission infra-red spectroscopy, FTIR) と示差熱重量同時測定解析 (Thermogravimetry differential thermal analysis, TG-DTA) で確認した。

パクリタキセル担持による形態変化の有無は走査型電子顕微鏡 (Scanning electron microscopy, SEM) 観察で確認した。

担体からのパクリタキセルの放出性は、50%エタノール溶液中への短期放出試験で検討した。

またハイドロキシアパタイトとアルギン酸の混合比を変化させて得られる担体の直径を測定した。

3-2-4-1. フーリエ変換赤外分光法 (FTIR)

Perkin Elmer社製 Spectrum 2000 (USA) を用いてパクリタキセルの吸収ピーク波長を検出できるか確認した。(128 scans at a resolution of 4 cm⁻¹)

3-2-4-2. 示差熱重量同時測定解析 (TG-DTA)

理学社製 Thermo Plus TG8120 (日本) を用いてパクリタキセル含有ハイド

ロキシアパタイト微粒子を毎分 20℃の速度で 1200℃まで加熱して、得られた熱重量の減少量からハイドロキシアパタイト微粒子へのパクリタキセル担持を推定した。

3-2-4-3.走査型電子顕微鏡 (SEM)

JEOL 社製 JEOL-5600LV (日本) を用いて走査型電子顕微鏡観察 (SEM) を行い、薬剤担持による形態変化を評価した。

3-2-4-4.短期薬剤放出試験

Amersham Pharmacia Biotech 社製 Ultrospec 2100 pro (Sweden) の UV 分光計を用いて、50%エタノール溶液中へのパクリタキセルの溶出量を 230nm の吸光度で検出した。ハイドロキシアパタイトとアルギン酸の複合体担体とハイドロキシアパタイト微粒子 (未複合化担体) からのパクリタキセル放出性を調査・比較して、アルギン酸との複合化がパクリタキセルの放出性に与える影響について検討した。

3-2-4-5.担体の直径の測定

ハイドロキシアパタイト濃度を 0.5 から 40% (w/w)、アルギン酸濃度を 1 か

ら 3% (w/v) に変化させて得られる担体の直径を **Stable Micro Systems** 社製 model TA-XT2i (UK) のテクスチャーアナライザーを用いて測定し、それぞれ 5 個の平均値を算出した。

3-3. 担体の抗腫瘍活性の判定

3-3-1. *in vitro* 抗腫瘍活性の検討：実験 2

細胞障害性試験

96 ウェル内の Dulbecco modified Eagle medium (SIGMA-ALDRICH, Tokyo, Japan) に 10% fetal bovine serum (以下すべて GIBCO, invitrogen Japan K.K. より入手), 80.5 pg/ml streptomycin, 80.5 U/ml penicillin, 1% L-glutamine を添加した培地で培養した増殖期のラット乳癌 CRL-1666 細胞 (2×10^4 個/100 μ m) にパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズを添加して 24h 共培養し、癌細胞に生存率からビーズの細胞障害性を評価した。発色検出には WST-1 試薬 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) を用いた。WST-1 はテトラゾリウム塩の 1 つで生細胞のミトコンドリア内に取り込まれると代謝されて赤色から暗赤色に変化することで生細胞数を定量評価することが可能である (Fig.16)。WST-1 は XTT、MTS、MTT といった細胞障害性試験に用いられる他の試薬と異なり前処理が不要なため、簡便かつ低侵襲に培養細胞に対する細胞障害性を評価することができる利点があり [42]、 10^2 - 10^4 個と比較的少ない細胞数でも検出感度が他のテトラゾリウム塩 (MTT、XTT) 試薬よりも感度がいいと言われる (Fig.17)。WST-1 試薬は、癌細胞を培養した各ウェルの培地に 10% (10 μ m) 添加して 5%CO₂ インキュベーター内で 1h 培養後、マイクロプレート

リーダーを用いて 570 / 610 nmの吸光度で解析した。細胞障害性は以下の式で算出した細胞生存率で評価した。

細胞生存率 : (共培養前の吸光度 - 共培養後の吸光度) / 共培養前の吸光度 × 100

ビーズの時間的な細胞障害性の変化を検討するために、あらかじめ 24h、48h、72h、96h 培地に浸漬しておいたビーズについても、癌細胞と 24h 共培養して細胞障害率を算出した (Fig.18)。各サンプルは 4-6 個とし、統計学的検討には Mann-Whitney's U test を用い、P<0.05 を有意差ありとした。

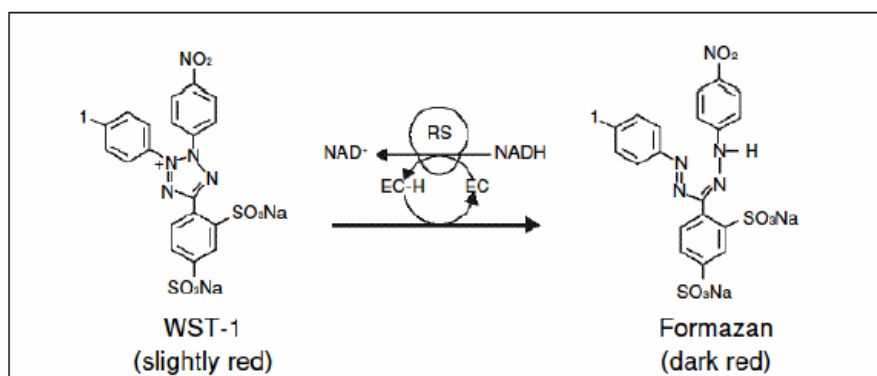


Fig.16) WST-1の発色変化

赤色のテトラゾリウム塩は生細胞のミトコンドリア内に取りこまれて代謝されると暗赤色のフォルマザンに変化する。

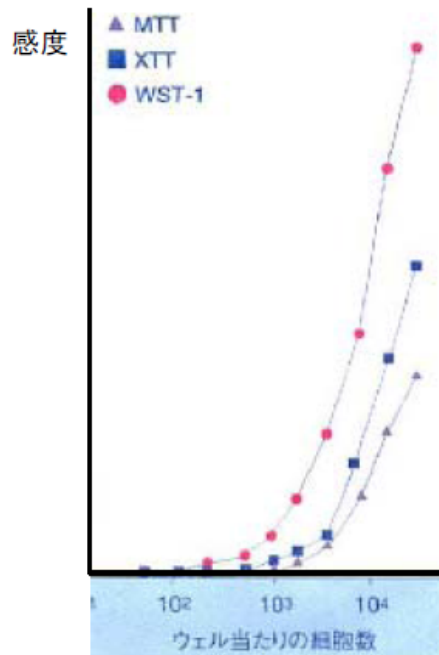


Fig.17) WST-1試薬の感度の細胞数の関係(MTT、XTT試薬との比較)
 10²-10⁴個の細胞に対してWST-1は他の試薬より感度がよい。

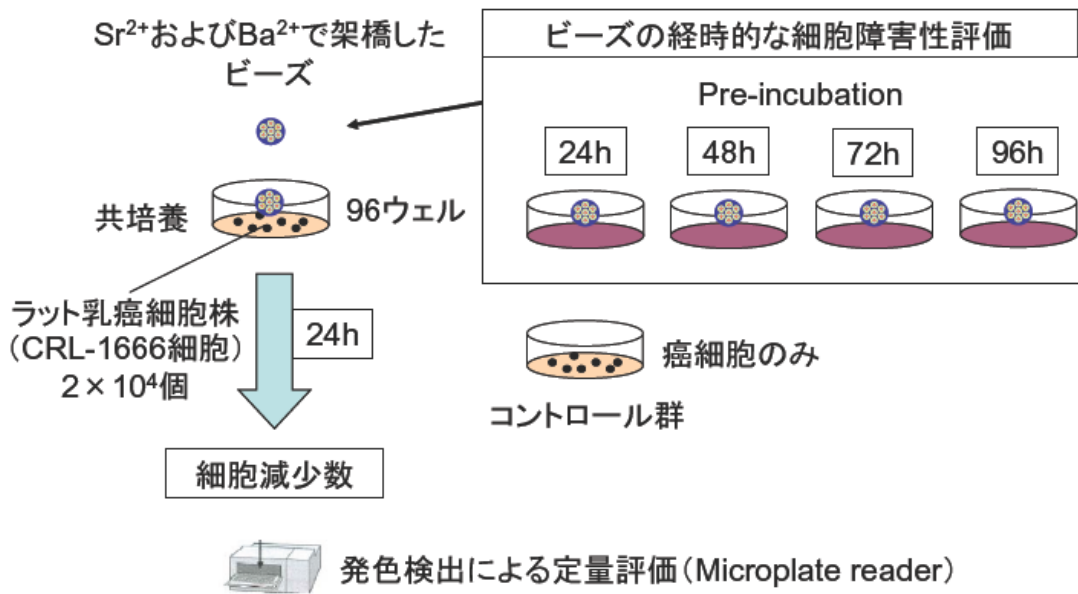


Fig.18) パクリタキセル含有ビーズの癌細胞株に対する細胞障害性試験

3-3-2. *In vivo* 抗腫瘍活性の検討：実験 3

3-3-2-1. 脊椎転移癌モデル動物

骨転移モデル動物にはマウスやラット、家兎などある。Arguelloらが1988年に報告[43]したヌードマウスの骨転移モデルは、骨転移の研究に数多く利用されてきた。しかし、このモデルは癌細胞を心腔内投与して得られる全身骨転移のモデルであり局所療法の検討には適さない。ラット[44]や家兎[45,46]のモデルは腫瘍を脊椎内へ実験的に直接移植して得られる単発の脊椎転移癌モデルである。ラットはマウス同様に安価であり、その腰椎は約 5mm^3 で脊椎転移癌に対する局所療法の介入効果を検討することができるサイズである。家兎はさらに大型のため局所療法の検討には適しているが、骨髄微小環境や接着分子はラットの方がヒトの病態を反映すると言われる[47]。よって本実験にはMantaの報告する脊椎転移癌モデル動物である脊椎転移乳癌ラットを選択した (Fig.19)。

このモデルは、まずCRL-1666細胞を培養し、増殖期となった細胞 1×10^6 個を浮遊液(0.1ml)としてドナーとなるラットの皮下に注入して皮下移植ラット乳癌の腫瘍塊を得る。触知できるようになって 10mm^3 大となった腫瘍(注入後9日目)を摘出し、腫瘍実質をメスとハサミを用いて移植用に 1mm^3 の腫瘍片とする (Fig.20)。腫瘍移植を行うラットをペントバルビタール(ソムノペンチル®)3.25mg/kgで麻酔し、開腹して腸管をよけて腰椎前方に存在する大動脈と大静脈

の血管束を同定する。大動脈の分岐部（bifurcation）の直上レベルでラットの左側を鈍的に剥離するとL6 腰椎の前面が確認できる。椎体は前方凸の形態をしているため我々は左側面に 18-G針を用いて骨孔を作製し、 1mm^3 とした腫瘍片を骨孔内の海面骨に移植した（Fig.21）。

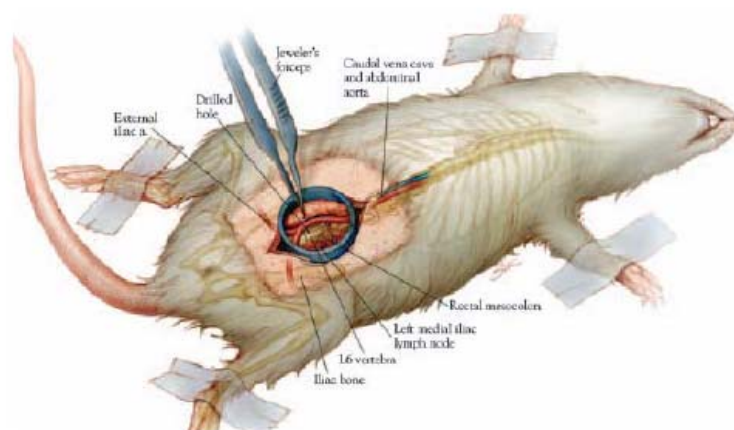


Fig.19) 脊椎転移乳癌ラットモデル

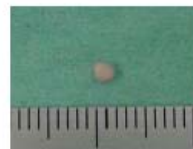
A rat model of metastatic spine cancer 文献[44]から転記



CRL-1666細胞を 1×10^6 個/0.1mlを皮下へ注入後9日目のドナーラット



腫瘍塊を摘出



$1 \times 1 \times 1$ mm大の移植片を作製

Fig.20) 皮下移植ラット乳癌の摘出と移植片の作製

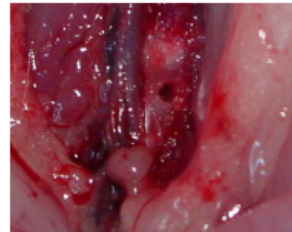
腰椎(L6)へ腫瘍片の移植



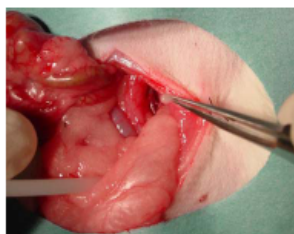
開腹



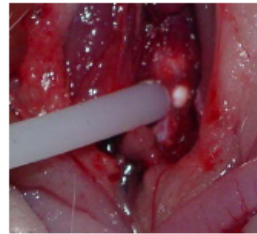
椎体をドリリング
(18-G針)



骨孔作製



腫瘍片を移植
($1 \times 1 \times 1$ mm)



骨孔を担体で封入

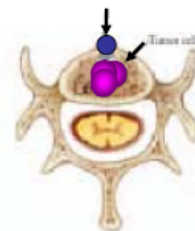


Fig.21) 脊椎転移癌モデルの作製

彼らのプロトコールで脊椎転移乳癌ラットを作製すると、術後約 10 日で下肢麻痺を発生し、約 14 日で下肢運動機能が消失することを確認した。実験的移植による腫瘍の生着率は非常に高く、本モデルの再現性はよい（自験例 100 匹の生着率は 97%）ため、外科的処置後にできた脊椎内の空間に残存した脊椎転移癌という臨床的状況をよく反映した疾患モデル動物である。腫瘍の進展形式も移植した椎体から硬膜外へ進展して脊髄を圧迫するため、ヒトの脊椎転移癌の病態をよく反映している。Fig.22 に麻痺を発生した脊椎転移乳癌ラットの病理所見を示す。摘出した腫瘍塊は移植の際に 1mm³のサイズに調整するため、一度に 30 匹程度の脊椎転移癌ラットが作製可能である。

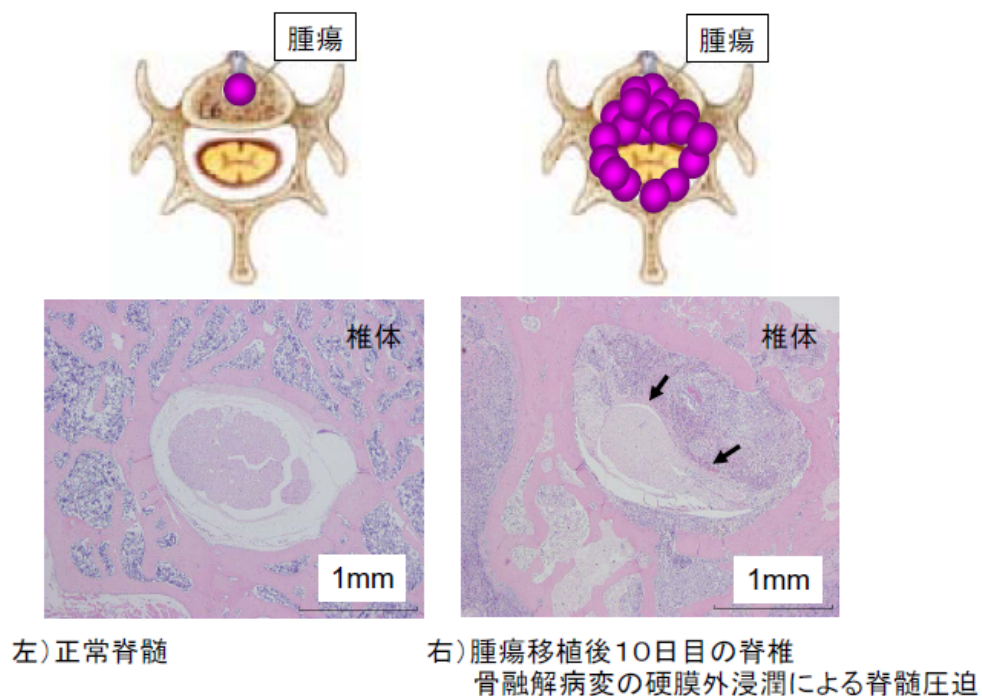


Fig.22) 麻痺を発生したラットの脊椎標本の病理所見

3-3-2-2. 下肢運動機能評価による局所療法の効果判定

本研究は筑波大学動物実験取扱の倫理規定に従って行った。脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能は Basso らが報告した BBB scale[48]を用いて評価した。これはラットの歩容を 21 点満点で評価するスケールで、20 点以下が麻痺発生となり、シッポが挙上できなくなると 19 点、跛行が出現すると 13 点、両下肢麻痺が出現すると 7 点となる (Fig.23)。麻痺は 20-14 点の初期、13-8 点の麻痺進行期、7-0 点の終末期の 3 病期に分けられ、脊椎転移乳癌ラットの麻痺は段階的に出現することが観察された。術後 2 日目よりラットの歩容を連日観察してスコアリングを行った。評価は神経学的所見をすることが可能な整形外科医によつて 2 重盲目試験で行い、平均値を算出した。

BBB scale が 21 点満点の期間を麻痺発生までの期間、両下肢完全麻痺の 3 点までを下肢運動機能維持期間と定義して局所療法の効果を判定した (Fig.24)。コントロール群は薬剤を含まない担体の脊椎内挿入群とした。

統計学的検討には Log-rank test を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

	0	No observable hindlimb (HL) movement
	1	Slight movement of one or two joints, usually the hip and/or knee
	2	Extensive movement of one joint or extensive movement of one joint <i>and</i> slight movement of one other joint
	3	Extensive movement of two joints
	4	Slight movement of all three joints of the HL
	5	Slight movement of two joints <i>and</i> extensive movement of the third
	6	Extensive movement of two joints <i>and</i> slight movement of the third
	7	Extensive movement of all three joints of the HL
両下肢麻痺	8	Sweeping with no weight support or plantar placement of the paw with no weight support
	9	Plantar placement of the paw with weight support in stance only (i.e., when stationary) or occasional, frequent, or consistent weight-supported dorsal stepping and no plantar stepping
	10	Occasional weight-supported plantar steps; no FL-HL coordination
跛行の出現	11	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> no FL-HL coordination
	12	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> occasional FL-HL coordination
	13	Frequent to consistent weight-supported plantar steps <i>and</i> frequent FL-HL coordination
	14	Consistent weight-supported plantar steps, consistent FL-HL coordination, <i>and</i> predominant paw position during locomotion is rotated (internally or externally) when it makes <i>initial contact</i> with the surface as well as just before it is <i>lifted off</i> at the end of stance; or frequent plantar stepping, consistent FL-HL coordination, and occasional dorsal stepping
	15	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination <i>and</i> no toe clearance or occasional toe clearance during forward limb advancement; predominant paw position is parallel to the body at initial contact
	16	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> rotated at lift off
	17	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs frequently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off
尾の麻痺	18	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait <i>and</i> toe clearance occurs consistently during forward limb advancement; predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> rotated at lift off
麻痺の発生	19	Consistent plantar stepping and consistent FL-HL coordination during gait, toe clearance occurs consistently during forward limb advancement, predominant paw position is parallel at initial contact <i>and</i> lift off, and tail is down part or all of the time
	20	Consistent plantar stepping and consistent coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel at initial contact and lift off, <i>and</i> trunk instability; tail consistently up
	21	Consistent plantar stepping and coordinated gait, consistent toe clearance, predominant paw position is parallel throughout stance, and consistent trunk stability; tail consistently up

Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: J Neurotrauma 12:1-21, 1995

Fig.23) 下肢運動機能(麻痺)の判定:BBB scale 文献[48]より転記

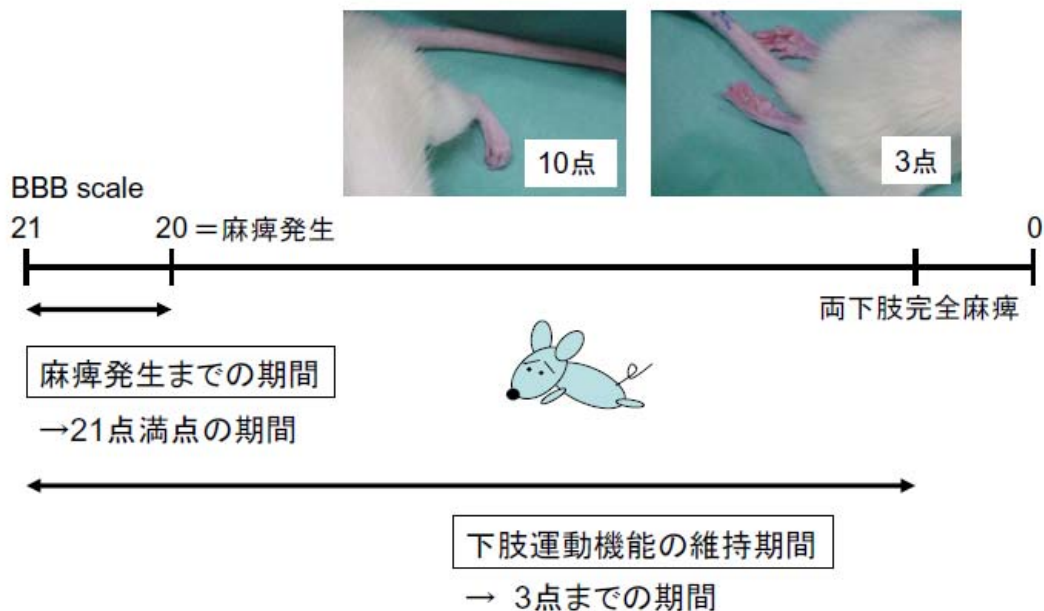


Fig.24) 下肢運動機能のEndpointの定義

3-3-3. 脊椎標本の組織病理学的評価

実験終了時に脊椎標本を採取して 4%パラホルムアルデヒド固定後、MMA 樹脂包埋して脊椎水平断（横断面）の 80 μm 切片を作製し、Cole H & E 染色による組織病理学的評価を行った。

3-3-4. 椎体外腫瘍サイズの形態計測による局所療法の効果判定

BBB scale で 3 点の完全下肢麻痺を生じたラットの脊椎および腫瘍を摘出し、骨外腫瘍の重量を計測した。

統計学的検討には Kruskal-Wallis test を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3-3-5. 体重減少量による局所療法の毒性の判定

毒性の指標として、ラットの実験開始時の体重から終了時の体重と骨外腫瘍重量を引いて体重減少量も算出した。

統計学的検討には Kruskal-Wallis test を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3-4. パクリタキセルの局所療法の効果判定：実験 3-1

目的：

脊椎転移乳癌ラットに対するパクリタキセルの局所療法に効果があるか明らかにすること。

材料：

ラットの腰椎に 18-G針で作製した直径約 2mmの骨孔サイズに合うように担体にはハイドロキシアパタイト濃度 10% (w/w)、アルギン酸濃度 1% (w/v) の組成を選択し、パクリタキセルを 2.4% (w/w) 担持させてCa²⁺で架橋した平均直径 2.2mmのゲルを用いた。担体を用いた局所療法は、担体で骨孔を塞ぐように脊椎内に挿入して行った。

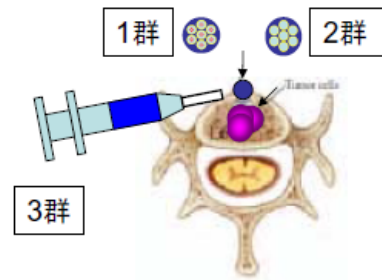
方法：

脊椎転移癌ラット 15 匹を、担体を用いた局所療法群 (n = 5)、コントロール群 (n =5) ならびに 0.2mg のパクリタキセル溶液の局所散布群 (n = 5) の 3 群に分けて、下肢運動機能に与える影響を比較した (Fig.25)。

1群:担体を用いた局所療法群 (n = 5)
パクリタキセル含有量:2.4% (w/w) = 0.022mg

2群:コントロール群 (n = 5)

3群:溶液の局所散布群 (n = 5)
パクリタキセル含有量:0.2mg



*局所療法日: Day 0

脊椎転移乳癌ラット: n = 15

Fig.25) パクリタキセルの局所療法の効果判定

3-5. パクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果判定：実験 3-2

材料：

担体にはハイドロキシアパタイト濃度 10% (w/w)、アルギン酸濃度 1% (w/v) の組成を選択し、パクリタキセルを 2.4% (w/w) 担持させてCa²⁺で架橋した平均直径 1.7mmのビーズを用いた。担体を用いた局所療法は、担体で骨孔を塞ぐように脊椎内に挿入して行った。

3-5-1. 下肢運動機能の評価

目的：

全身療法と比較してパクリタキセル含有ビーズを用いた局所療法が脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える影響を明らかにすること。

方法：

脊椎転移乳癌ラット 21 匹を局所療法群 (n = 6) と 5mg/kgのパクリタキセル懸濁液 0.3mlを尾静脈から投与する全身療法群 (n = 9)、コントロール群 (n = 6) の 3 群に分けて検討した (Fig.26)。全身投与群は腫瘍移植後にコントロール群と同様に薬剤を含まないビーズでその骨孔を塞いでいる。全身療法群の治療日はDay1, 7, 14 とし、パクリタキセル懸濁液 0.3mlをラットの尾静脈から約 30 秒間かけて投与した (Fig.27)。投与量の 5mg/kgは予備実験の結果から得られた

LD₅₀以下の値である。

1群:局所療法群 (n = 6)

パクリタキセル含有量: 2.4% (w/w) = 0.028mg

2群:全身療法群 (n = 9)

5mg/kgのパクリタキセル溶液の投与 Day1,7,14

3群:コントロール群 (n = 6)



*局所治療日: Day 0

脊椎転移乳癌ラット: n = 21

Fig.26) パクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果判定

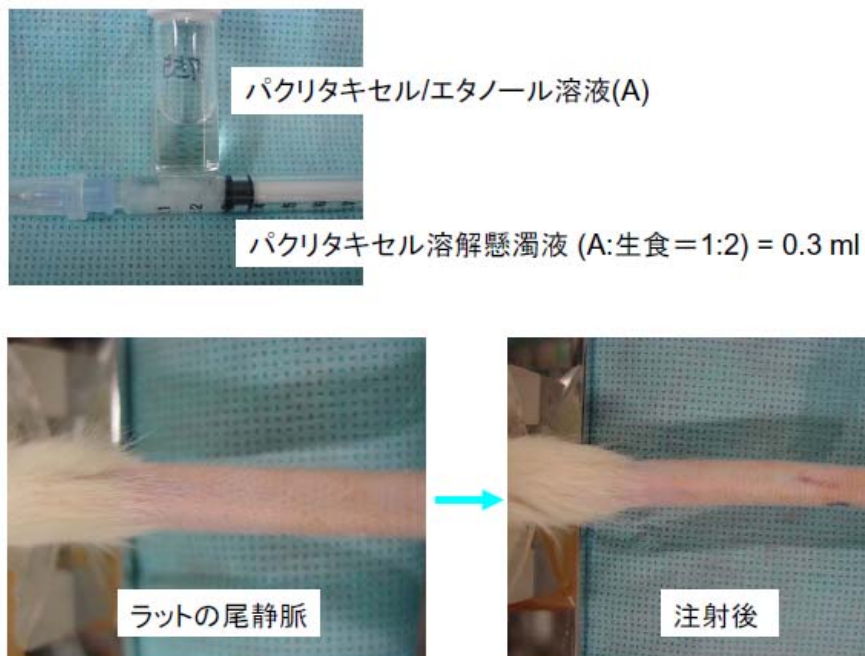


Fig.27) 全身療法群のパクリタキセル懸濁液の経尾静脈投与 Day1,7,14

3-5-2.脊椎転移乳癌ラットの椎体外腫瘍サイズの形態計測

目的：

パクリタキセル含有ビーズの局所療法が脊椎転移乳癌ラットの椎体外腫瘍の増殖に与える影響を明らかにすること。

方法：

脊椎転移乳癌ラット 28 匹を局所療法群 (n = 11) と全身療法群 (n = 9)、コントロール群 (n = 8) の 3 群に分けて検討した。

3-6. Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズの局所療法の効果判定：実験 3-3

目的：

架橋イオンを変えたパクリタキセル含有ビーズの脊椎転移乳癌ラットに対する局所療法に効果を明らかにすること。

材料：

担体にはハイドロキシアパタイト濃度 10% (w/w)、アルギン酸濃度 1% (w/v) の組成を選択し、パクリタキセルを 2.4% (w/w) 担持させて Sr^{2+} および Ba^{2+} で架橋した平均直径 1.7mmのビーズを用いた。担体を用いた局所療法は、担体で骨孔を塞ぐように脊椎内に挿入して行った。

方法：

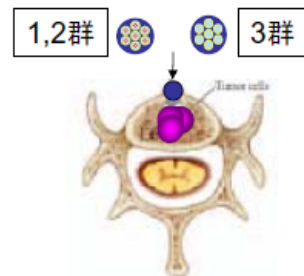
脊椎転移癌ラット 23 匹を、 Sr^{2+} および Ba^{2+} で架橋したビーズを用いた局所療法群 (n = 7, n = 8) とコントロール群 (n = 8) の 3 群に分けて下肢運動機能に与える影響を比較した (Fig.28)。

1群: Sr²⁺で架橋したビーズを用いた局所療法群 (n = 7)

2群: Ba²⁺で架橋したビーズを用いた局所療法群 (n = 8)

パクリタキセル含有量 2.4% (w/w) = 0.028mg

3群: コントロール群 (n = 8)



*局所治療日: Day 0

脊椎転移乳癌ラット: n = 23

Fig.28) Sr²⁺とBa²⁺で架橋したパクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果判定

3-7. パクリタキセルを高用量担持させたビーズの局所療法の効果判定

: 実験 3-4

目的 :

パクリタキセルを高用量担持させたビーズの脊椎転移乳癌ラットに対する局所療法の効果を明らかにすること。

材料 :

担体にはハイドロキシアパタイト濃度 10% (w/w)、アルギン酸濃度 1% (w/v) の組成を選択し、パクリタキセルを 21% (w/w) 担持させた平均直径 1.7mm のビーズを用いた。架橋イオンには実験 3-2 および 3-3 で局所療法が脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能の維持に効果を認めた Ca^{2+} および Sr^{2+} を用いた。

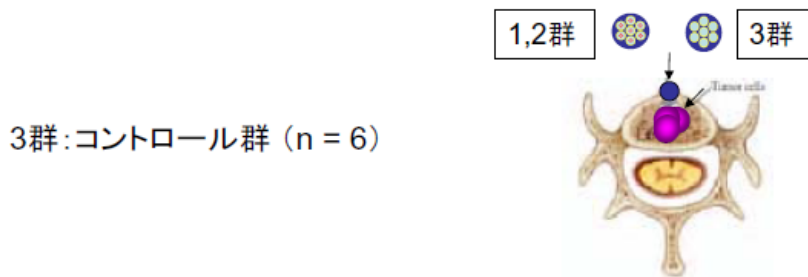
方法 :

脊椎転移乳癌ラット 17 匹を、 Ca^{2+} および Sr^{2+} で架橋したビーズの局所療法群 (それぞれ $n = 5$ 、 $n = 6$) とコントロール群 ($n = 6$) の 3 群に分け、下肢運動機能に与える影響を比較した (Fig.29)。

1群:Ca²⁺で架橋したビーズの局所療法群 (n = 5)

2群: Sr²⁺で架橋したビーズの局所療法群 (n = 6)

パクリタキセル含有量 21% (w/w) = 0.22mg



*局所治療日: Day 0

脊椎転移乳癌ラット: n = 21

Fig.29) 21% (w/w)パクリタキセル含有ビーズを用いた局所療法の効果判定

第4章 結果

4-1. 担体へのパクリタキセル担持の確認

4-1-1. ハイドロキシアパタイト微粒子の FTIR 解析結果

Fig.30 に FTIR 解析の結果を示す。横軸が波数、縦軸が吸光度で、1 番下の線がパクリタキセル、下から 2 番目がハイドロキシアパタイトの波長である。パクリタキセルの吸収ピーク波長は、1742、1711、1677、1347、1316、1276、1244、907、773、706 cm^{-1} に見られるが、上 2 つのパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト微粒子にはパクリタキセルの吸収ピーク波長を認め、その波長強度はパクリタキセルの担持量に比例して増加した。

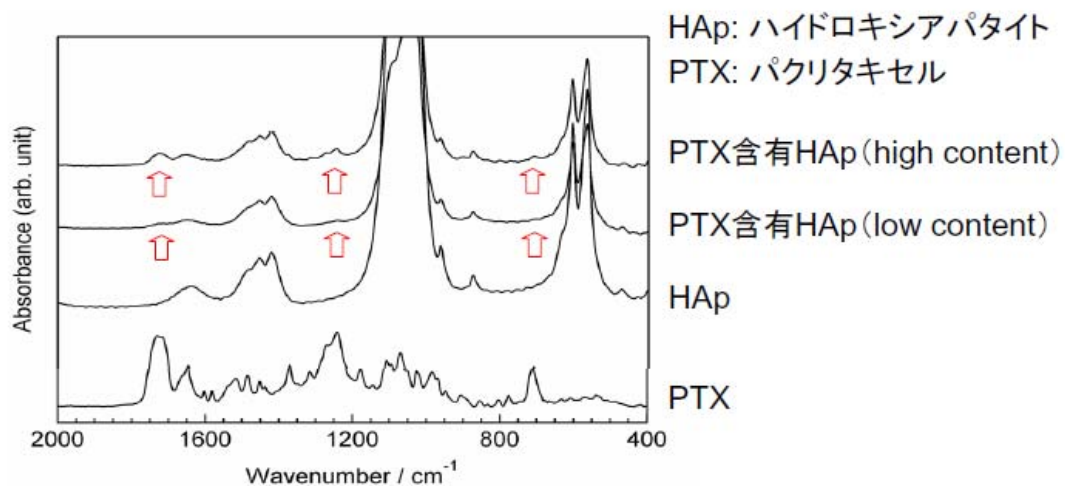


Fig.30) ハイドロキシアパタイト微粒子のFTIR解析

パクリタキセル含有アパタイト微粒子にはパクリタキセルの吸収ピーク波長を認め、その波長は担持量に比例して増強した。
(1742, 1711, 1677, 1347, 1316, 1276, 1244, 907, 773, 706 cm^{-1})

4-1-2. ハイドロキシアパタイト微粒子の TG-DTA 解析結果

TG-DTA 解析の結果を Fig.31 に示す。横軸が温度、縦軸は左が重量減少率、右が吸熱変化量を表す。パクリタキセル含有アパタイト微粒子の重量減少は、パクリタキセルの融点の 220°C を超えてから生じ、234、347、442°C で吸熱反応を認め、パクリタキセルの担持量に比例した熱重量の減少を認めた。

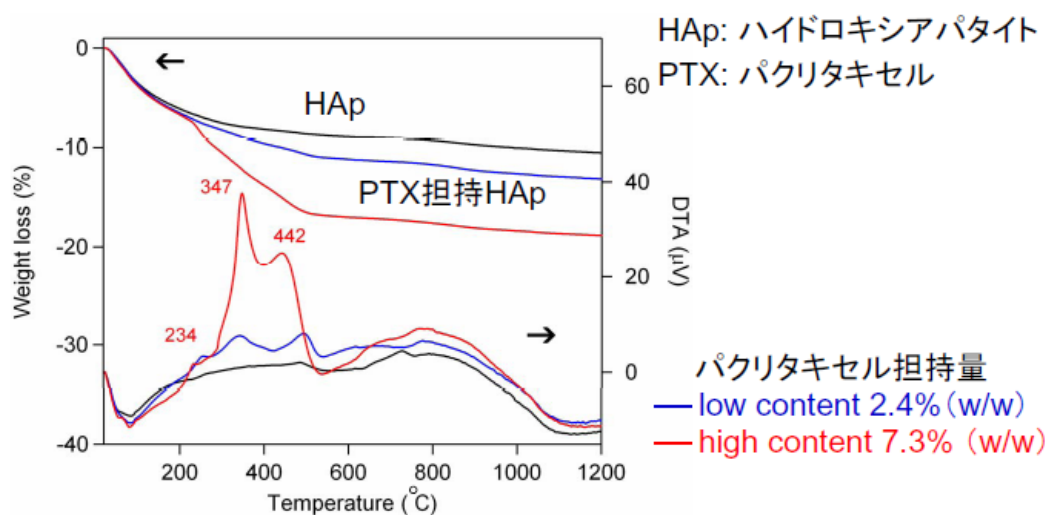


Fig.31) ハイドロキシアパタイト微粒子のTG-DTA解析

パクリタキセル含有アパタイト微粒子の重量減少はパクリタキセルの融点である220°Cを超えてから吸熱反応を伴って生じ、その重量減少量は担持量に比例した。

以上の結果から、我々はハイドロキシアパタイトへのスプレイドライ法によるパクリタキセルの担持を確認した。

4-2. パクリタキセル担持によるハイドロキシアパタイト微粒子の形態変化

SEM 像の観察よりハイドロキシアパタイト微粒子は平均直径 $4.0 \mu\text{m}$ の球形粒子であり、そのサイズ分布は $1\text{-}10 \mu\text{m}$ と均一であった。一方、パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト微粒子の直径とサイズ分布も同様であることが分かった。ハイドロキシアパタイト微粒子とパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト微粒子の SEM 像を Fig.32 に示す。SEM 像からスプレイドライ法によるハイドロキシアパタイト微粒子へのパクリタキセル担持は、ハイドロキシアパタイト微粒子のサイズや分布などの形態に影響を与えてなかった。

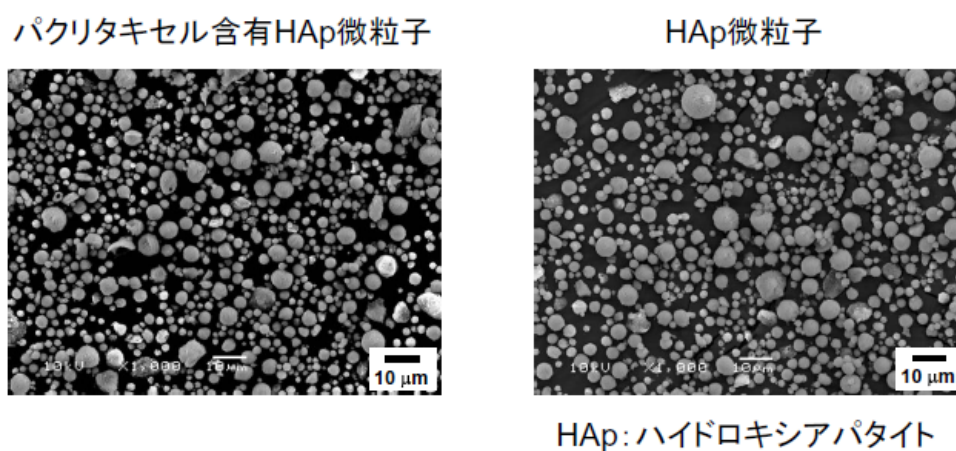


Fig.32) ハイドロキシアパタイト微粒子のSEM観察

ハイドロキシアパタイト微粒子は平均直径 $4.0 \mu\text{m}$ の球形粒子で、サイズ分布は $1\text{-}10 \mu\text{m}$ と均一であった。
パクリタキセルの担持によるハイドロキシアパタイト微粒子の形態に変化はなかった。

4-3. 担体からのパクリタキセルの放出性：アルギン酸との複合化による効果

50%エタノール溶液への短期放出試験結果を Fig.33 に示す。横軸が時間、縦軸がパクリタキセルの放出率で、複合化処理していないハイドロキシアパタイト微粒子からはパクリタキセルが 1 時間以内の初期にバースト放出され、アルギン酸で複合化したゲル担体からはパクリタキセルが 12h で約 80%、24h でほぼ 100%が放出される結果であった。

このことからハイドロキシアパタイト微粒子とアルギン酸の複合化はパクリタキセルの徐放化に有効であることが分かった。

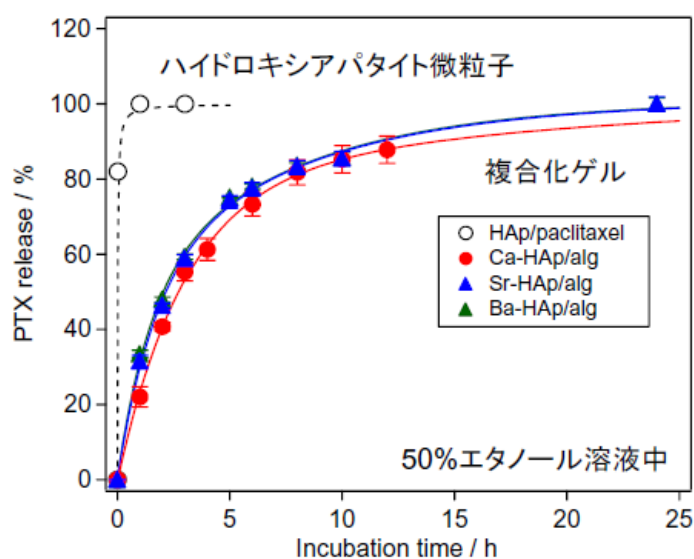


Fig.33) 担体からのパクリタキセルの放出性

パクリタキセルは複合化処理していないハイドロキシアパタイト微粒子から1時間以内の初期にバースト放出され、アルギン酸で複合化したゲル担体からは24時間で徐々に放出される結果であった。このことからハイドロキシアパタイト微粒子とアルギン酸の複合化はパクリタキセルの徐放化に有効であることが分かった。

4-4. ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルの直径変化

ゲルの直径は、架橋剤に用いた二価カチオン水溶液（ CaCl_2 、 SrCl_2 、 BaCl_2 ）に関わらずハイドロキシアパタイトの含有量に比例して増加した。アルギン酸濃度 1%（w/v）に対してハイドロキシアパタイト濃度を 0.5-40%（w/w）に変化させて作製したゲルの直径変化をFig.34 に示す。横軸がハイドロキシアパタイト濃度、縦軸が直径で、平均直径は 2.1-2.7mmであった。アルギン酸濃度 1-3%（w/v）による直径の変化はなかった。

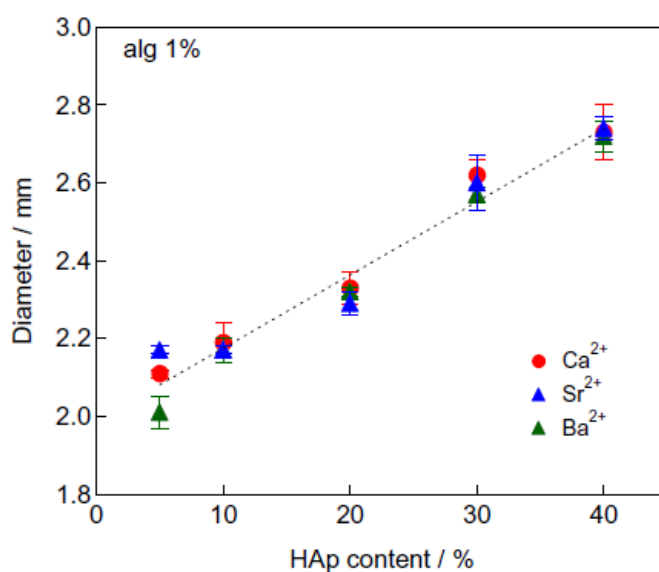


Fig.34) ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルの直径変化

ゲルの直径は二価カチオンに関わらずハイドロキシアパタイトの含有量に比例して増加した。
アルギン酸濃度1%に対してハイドロキシアパタイト濃度を変化させて作製したゲルの直径は平均2.1-2.7mmであった。

4-5. パクリタキセル含有ビーズのラット乳癌細胞株に対する細胞障害性

培地内にビーズを浸漬すると、 Ca^{2+} で架橋したビーズはすべて 24hで架橋が崩壊して微細化する現象が観察された。また Ca^{2+} で架橋したハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズはラットの皮下組織や筋肉内への移植実験でも同様の現象が観察された。一方 Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズは、徐々に水を含んで膨潤してゲル化（約 24h）する傾向は観察されたが、120hの培養でも微細化せずに安定性が保たれた。Fig.35 にビーズの肉眼的所見の変化を示す。よって*in vitro*の細胞障害性試験は Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズを用いて行った。

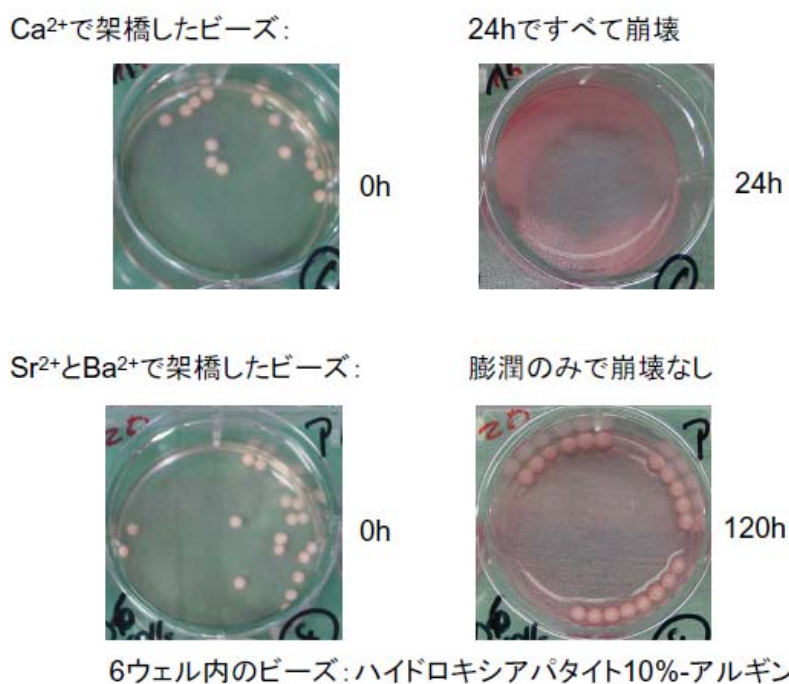


Fig.35) ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズの培地内での肉眼的変化

Sr²⁺とBa²⁺で架橋したビーズの結果をFig.36に示す。Sr²⁺とBa²⁺で架橋したビーズから放出されたパクリタキセルはラット乳癌細胞 2×10⁴個に対して 72hまでコントロール群と比較して統計学的に有意な細胞障害率を示すことが分かった。Sr²⁺とBa²⁺を架橋剤にそれぞれ用いたビーズの細胞障害率を比較すると、Sr²⁺で架橋したビーズは初期（0-24h）に約 35%の細胞障害性を示し、72hでは約 15%に減少する変化を認めた。一方、Ba²⁺で架橋したビーズは72hまで約 15%でほぼ一定の細胞障害性を示すことが分かった。

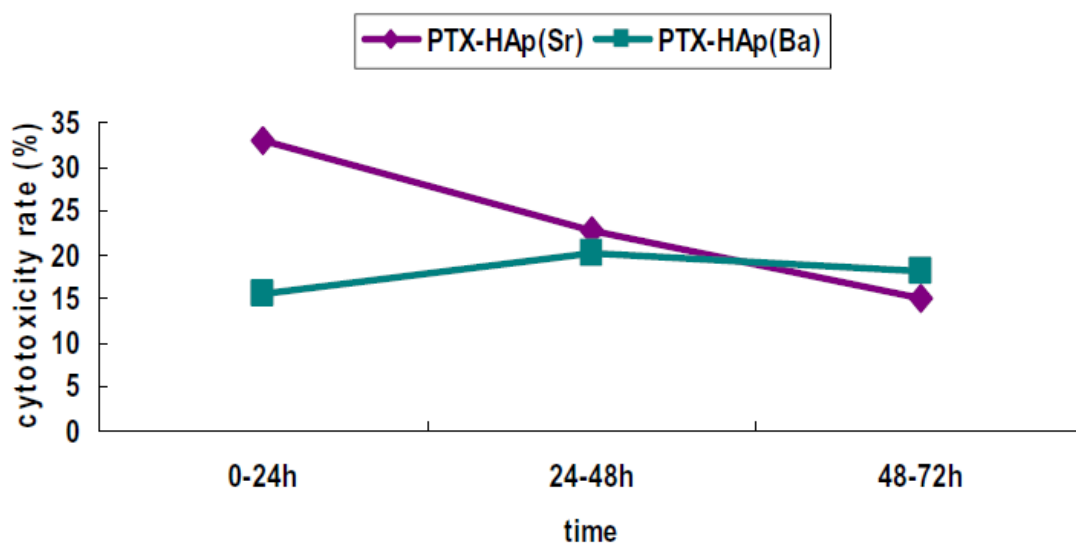


Fig.36) Sr²⁺とBa²⁺で架橋した2.4% (w/w)パクリタキセル含有ビーズの CRL-1666細胞 (2×10⁴個)に対する細胞障害性

Sr²⁺で架橋したビーズは初期(0-24h)に約35%の細胞障害性を示し、72hまで徐々に約15%に減少する変化を認めた。
一方 Ba²⁺で架橋したビーズは初期から72hまで約15%でほぼ一定の細胞障害性を示した。

次にパクリタキセルを低用量担持（2.4%）および高用量担持（21%）させたビーズの結果をFig.37に示す。架橋イオンは Sr^{2+} で、横軸は時間、縦軸は吸光度、上図が高担持（21%）させたビーズ、下図が低担持（2.4%）させたビーズである。低担持および高担持させたハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズからは、いずれもパクリタキセルが徐々に放出され、ラット乳癌細胞株 2×10^4 個に対してコントロールと比較して統計学的に有意な細胞障害性をそれぞれ 72h、96hまでの細胞障害性を認めた。いずれも 0-24hで最大の細胞障害性を示し、経時的に効果が減少する傾向であったが、担持量の増加によって細胞障害性を有するパクリタキセルの放出期間は 24h延長していた。

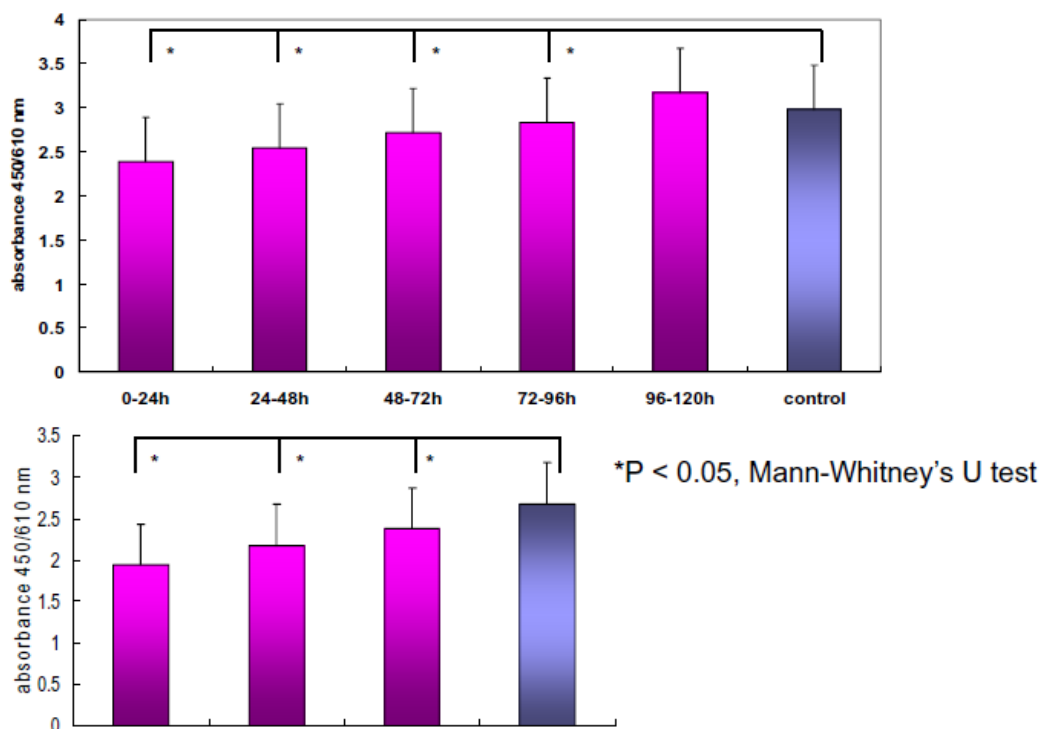


Fig.37) パクリタキセル担持量の異なるビーズのCRL-1666細胞 (2×10^4 個) に対する細胞障害性 (架橋イオンは Sr^{2+} 、上が21%、下が2.4%担持)

4-6. 脊椎転移乳癌ラットに対するパクリタキセルの局所療法の効果

TABLE 1 に 2.4% (w/w) パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ゲルおよびパクリタキセル溶液を用いた局所療法の脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える効果を示す。麻痺発生までの期間 (21 点の期間) は局所療法群が平均 19.4 ± 7.4 日、コントロールの 2 群が平均 10.8 ± 1.1 日、局所散布した 3 群が平均 15.0 ± 4.5 日であった。下肢運動機能の維持期間 (3 点までの期間) は 1 群が平均 21.6 ± 6.4 日、2 群が平均 13.4 ± 3.0 日、3 群が 20.6 ± 2.4 日であった。次に麻痺発生までの期間、生存期間の Kaplan-Meier 曲線[49]を Fig.38, 39 に示す。横軸が日数で縦軸が麻痺および下肢運動機能の生存率である。解析の結果から、赤と緑の線のパクリタキセルの局所療法群は麻痺発生までの期間と下肢運動機能の維持期間が延長することが分かった。両群に統計学的有意差はなく、治療効果は同様であった。

TABLE 1

脊椎転移乳癌ラットに対するパクリタキセルの局所療法の効果

Groups	n	治療日	麻痺発生までの期間	下肢運動機能の維持期間
1群:担体での局所投与*	5	Day 0	平均 19.4 ± 7.4 日	平均 21.6 ± 6.4 日
2群:コントロール	5	(-)	平均 10.8 ± 1.1 日	平均 13.4 ± 3.0 日
3群:溶液での局所散布**	5	Day 0	平均 15.0 ± 4.5 日	平均 20.6 ± 2.4 日

パクリタキセル含有量:

*担体への担持 2.4% (w/w) = 0.022mg、**溶液への担持 0.2mg

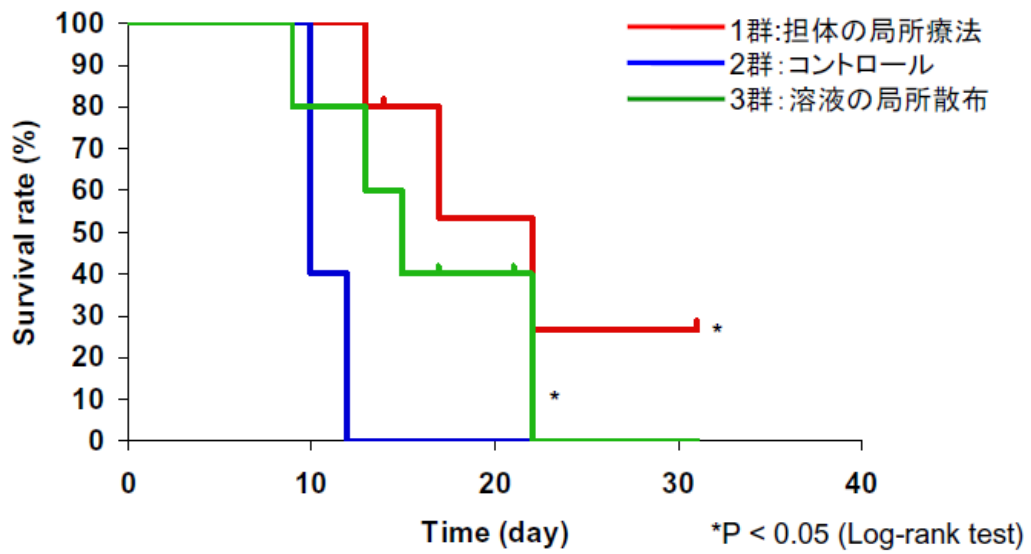


Fig.38) 麻痺発生までの期間 (Kaplan-Meier analysis)

パクリタキセルの局所療法群(1群と3群)は脊椎転移乳癌ラットの麻痺発生までの期間が延長した。

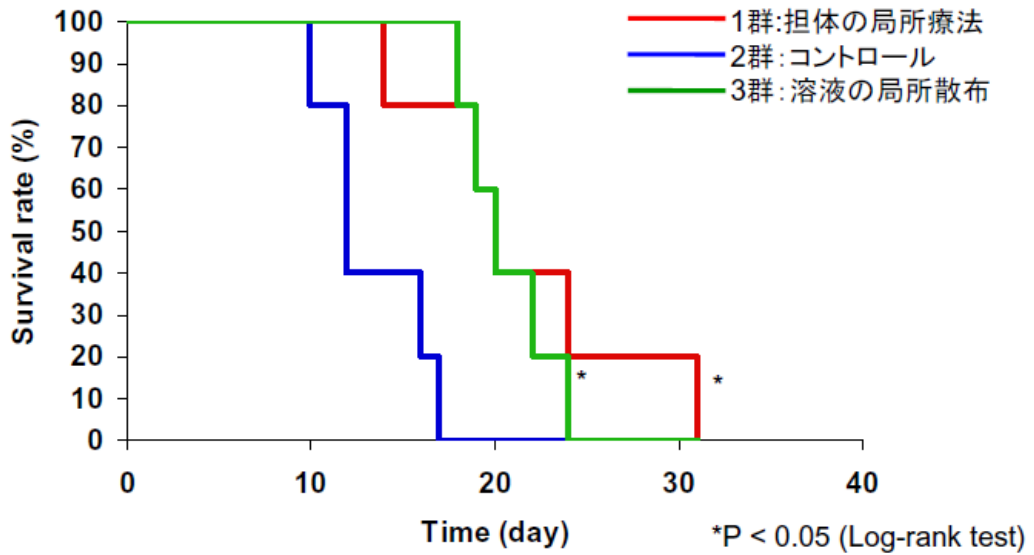


Fig.39) 下肢運動機能の維持期間 (Kaplan-Meier analysis)

パクリタキセルの局所療法群(1群と3群)は脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能の維持期間が延長した。

4-7. パクリタキセル含有ビーズの局所療法の効果

TABLE 2 に 3 群の脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える効果を示す。麻痺発生までの期間は局所療法群が平均 16.4 ± 5.1 日、全身療法群が平均 $10.3 \pm$ 日、コントロール群が平均 10.8 ± 1.3 日であった。下肢運動機能の維持期間は局所投与群が平均 22.2 ± 2.9 日、全身投与群が平均 14.2 ± 3.6 、コントロール群が 16.0 ± 2.5 日であった。3 群の麻痺発生までの期間と下肢運動機能の維持期間の Kaplan-Meier 曲線を Fig.40, 41 に示す。横軸が日数、縦軸が麻痺および下肢運動機能の生存率である。解析の結果から、赤線のパクリタキセル含有ビーズの局所療法群は麻痺発生までの期間が有意に延長し、他の 2 群と比較して下肢運動機能が維持される結果であった。(局所投与群の 1 匹は麻痺を発生せず実験観察終了まで生存したため、統計学的検討からは除外している。) 脊椎転移乳癌ラットに対して、パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズは同じ組成*のゲルと同様の抗腫瘍活性を示すことが分かった。

*組成：パクリタキセル担持 2.4%(w/w)、ハイドロキシアパタイト 10%(w/w)、アルギン酸 1%(w/v)

TABLE 2

パクリタキセル含有ビーズの局所療法と全身療法の
脊椎転移乳癌ラットに対する効果

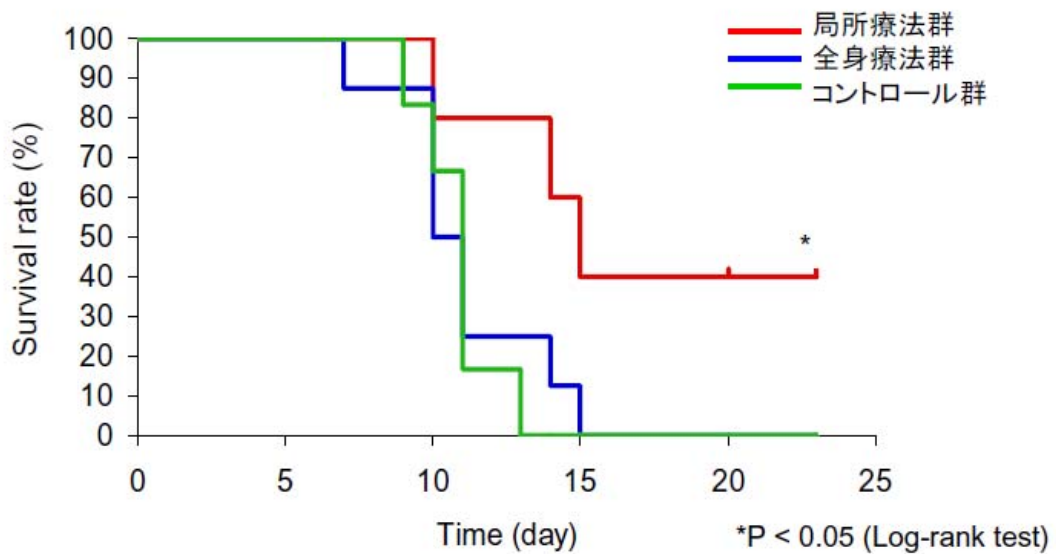
Groups	n	治療日	麻痺発生までの期間	下肢運動機能の維持期間
1群:局所投与	5*	Day 0	平均16.4±5.1日	平均22.2±2.9日
2群:全身投与	9	Day 1,7,14	平均10.3±2.7日	平均14.2±3.6日
3群:コントロール	6	(-)	平均10.8±1.3日	平均16.0±2.5日

*麻痺を発生しなかった1匹を除外した数

パクリタキセル含有量:

担体への担持 2.4%(w/w) = 0.028mg (1群)

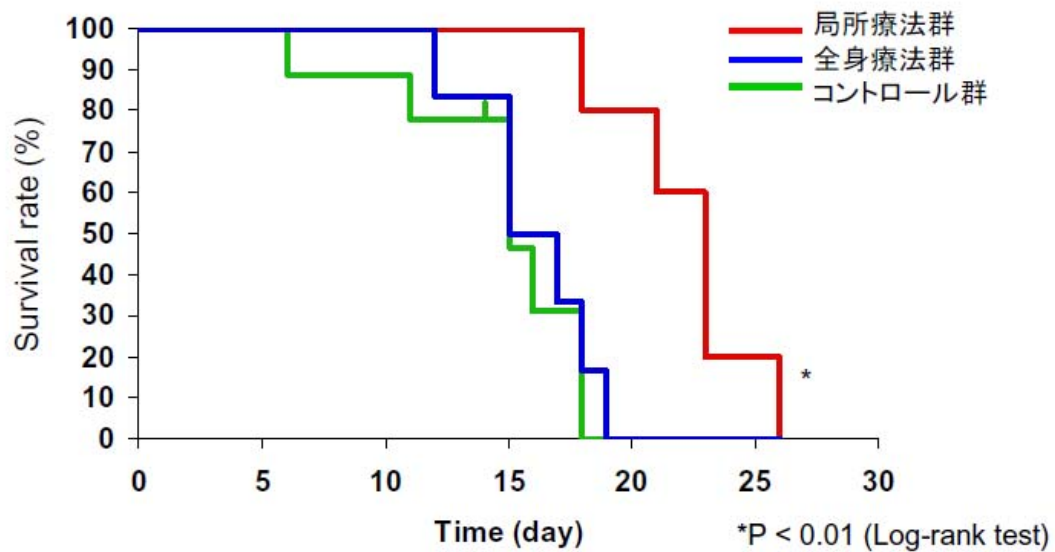
溶液への担持 5mg/kg = 0.75mg (2群)



Abe T, et al.: J Neurosurg Spine 9:502-510, 2008

Fig.40) 麻痺発生までの期間 (Kaplan-Meier analysis)

パクリタキセル含有ビーズの局所療法群は麻痺発生までの期間
が有意に延長した。



Abe T, et al.: J Neurosurg Spine 9:502-510, 2008

Fig.41) 下肢運動機能の維持期間(Kaplan-Meier analysis)

パクリタキセル含有ビーズの局所療法群は下肢運動機能の維持期間が有意に延長した。

4-8. 脊椎の組織病理学的所見

局所療法群とコントロール群の代表的な組織病理学的所見を Fig.42 と 43 に示す。水平断の脊椎標本の Cole H&E 染色である。赤褐色が脊椎の骨梁構造であり、上方がラットの腹側、下方が脊髄の存在する背側である。局所療法群のラット脊椎の 50% (3 匹) では、骨髄腔内に腫瘍細胞の浸潤を認めるものの骨梁構造は破壊されず脊髄周囲の構造は保たれていた (Fig.42)。一方、コントロール群のラット脊椎では、全例に骨髄内で増殖した腫瘍細胞が骨梁構造を破壊し、脊柱管内に進展して脊髄を圧迫していることが観察された (Fig.43)。

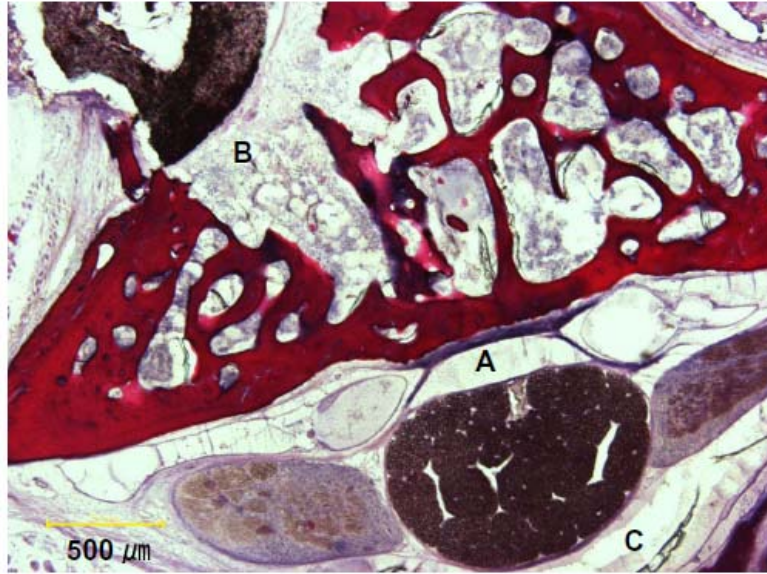


Fig.42) 局所療法群の代表的な組織病理所見

Cole H&E染色、Thickness; 80 μm, Scale bar = 500 μm

脊椎骨髄腔への癌細胞の浸潤は認めたが、骨梁構造(A)は保たれ、硬膜外腔への癌細胞の浸潤と脊髄圧迫は認めなかった(C)。左上のBは増殖した癌細胞によって腹側へ押し出されたビーズ。

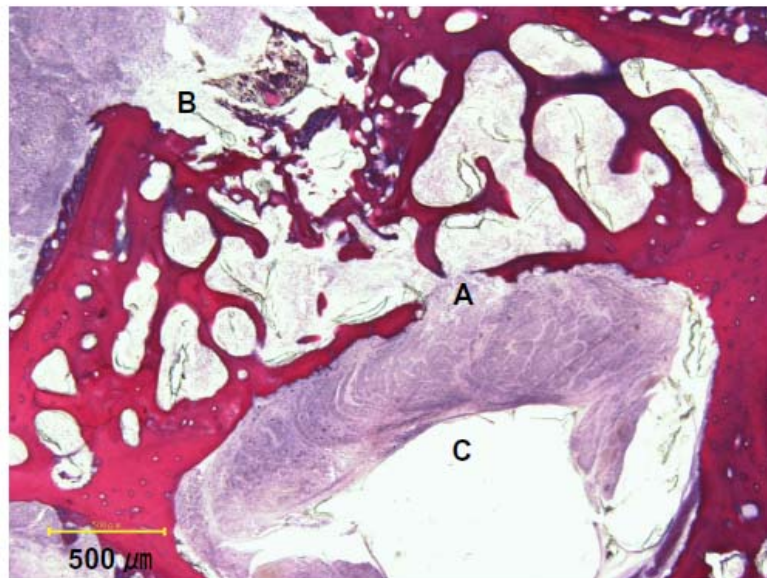


Fig.43) コントロール群の代表的な組織病理所見

Cole H&E染色、Thickness; 80 μm, Scale bar = 500 μm

脊椎骨髄腔で増殖した癌細胞は椎体の骨梁構造を破壊して(A)硬膜外腔へ浸潤し、脊髄を圧迫していた(C)。Bはビーズ。

4-9. パクリタキセル含有ビーズの椎体外腫瘍に対する効果

脊椎転移乳癌ラット中で BBB scale が 3 点の完全下肢麻痺となったのは局所療法群が 6/11 匹 (54.5%)、全身療法群 6/9 匹 (66.7%)、コントロール群 6/8 匹 (75%) の各群 6 匹ずつであった。平均腫瘍重量は局所療法群が 3.8 g (1.4~5.9 g)、全身療法群が 1.8 g (0.9~2.8 g)、コントロール群が 3.5 g (1.5~5.9 g) であった。腫瘍サイズは全身投与群で小さい傾向であったが 3 群間に統計学的有意差はなかった。

4-10. パクリタキセル含有ビーズの局所療法による毒性

脊椎転移乳癌ラットの平均体重減少量は局所療法群が 5.95 g (-4.7~12.9 g)、全身療法群が 15.0 g (-2.4~31.9 g)、コントロール群が 14.7 g (3.9~20.5 g) であった。局所療法群は他の 2 群と比較して体重減少量は低い傾向であったが、3 群間に統計学的有意差はなかった (P=0.16)。全身療法群では他の合併症として重度の静脈炎が観察された (Fig.44)。その頻度は 66.7% (6/9 匹) と高率で、投与回数に依存して発生していた。また麻痺が出現していなかった残りの 3 匹は抗癌剤投与後早期に死亡し、パクリタキセルの毒性が原因ではないかと推察された。

3 群の脊椎転移乳癌ラットの骨外腫瘍サイズと体重減少量を TABLE 3 に示す。

TABLE 3

脊椎転移乳癌ラットの椎体外腫瘍サイズと体重減少量

Groups	n	治療日	BBB scale 3点 での実験終了数	骨外腫瘍重量	体重減少量*
1群:局所療法	11	Day 0	6	平均3.8g	平均5.95g
2群:全身療法	9	Day 1,7,14	6	平均1.8g	平均15.0g
3群:コントロール	8	(-)	6	平均3.5g	平均14.7g

*実験開始時の体重から終了時の体重と腫瘍重量を引いた値

パクリタキセル含有量:

担体への担持 2.4% (w/w) = 0.028mg (1群)

溶液への担持 5mg/kg = 0.75mg (2群)

- ・骨外腫瘍重量は全身投与群で少ない傾向 (統計学的有意差なし)
- ・体重減少量は局所投与群が少ない傾向 (統計学的有意差なし)



Fig.44) 重篤な静脈炎を生じた全身投与群のラットの肉眼所見
静脈炎の発は抗癌剤投与回数とともに増加し比例し、発生率は6/9匹
(66.7%)と高率であった。

4-11. Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズの局所療法の効果

Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋した 2.4% (w/w) パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズを用いた局所療法 of 脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える効果をTABLE 4 に示す。脊椎転移乳癌ラットの麻痺発生までの期間は、 Sr^{2+} で架橋したビーズの局所療法群が平均 15.3 ± 5.3 日、 Ba^{2+} で架橋したビーズの局所療法群が平均 14.9 ± 6.5 日、コントロール群が平均 10.8 ± 1.2 日であった。下肢運動機能の維持期間は Sr^{2+} で架橋したビーズの局所投与群が平均 19.6 ± 5.1 日、 Ba^{2+} で架橋したビーズの局所投与群が平均 18.9 ± 5.4 日、コントロール群が 15.4 ± 2.3 日であった。Fig.45,46 に 3 群の麻痺発生まで期間と下肢運動機能の維持期間のKaplan-Meier曲線を示す。横軸が日数、縦軸が麻痺および下肢運動機能の生存率である。解析の結果から、局所療法群はコントロール群と比較して下肢運動機能が有意に維持されることが分かった。局所投与群を Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズそれぞれに分けて比較すると、ピンクの線で表す Sr^{2+} で架橋したビーズの局所療法群はコントロール群と比較して麻痺発生まで期間が有意に延長していたが、 Ba^{2+} で架橋したビーズの局所療法群は統計学的な有意差はなかった。また下肢運動機能の維持期間は、 Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したビーズの両群ともコントロール群と比較して統計学的に有意な延長ではなかった。

TABLE 4

Sr²⁺とBa²⁺で架橋した2.4% (w/w) パクリタキセル含有ビーズの局所療法の
脊椎転移乳癌ラットに対する効果

Groups	n	治療日	麻痺発生までの期間	下肢運動機能の維持期間
1群: 架橋イオン(Sr)	7	Day 0	平均15.3±5.3日	平均19.6±5.1日
2群: 架橋イオン(Ba)	8	Day 0	平均14.9±6.5日	平均18.9±5.4日
3群: コントロール	8	(-)	平均10.8±1.2日	平均15.4±2.3日

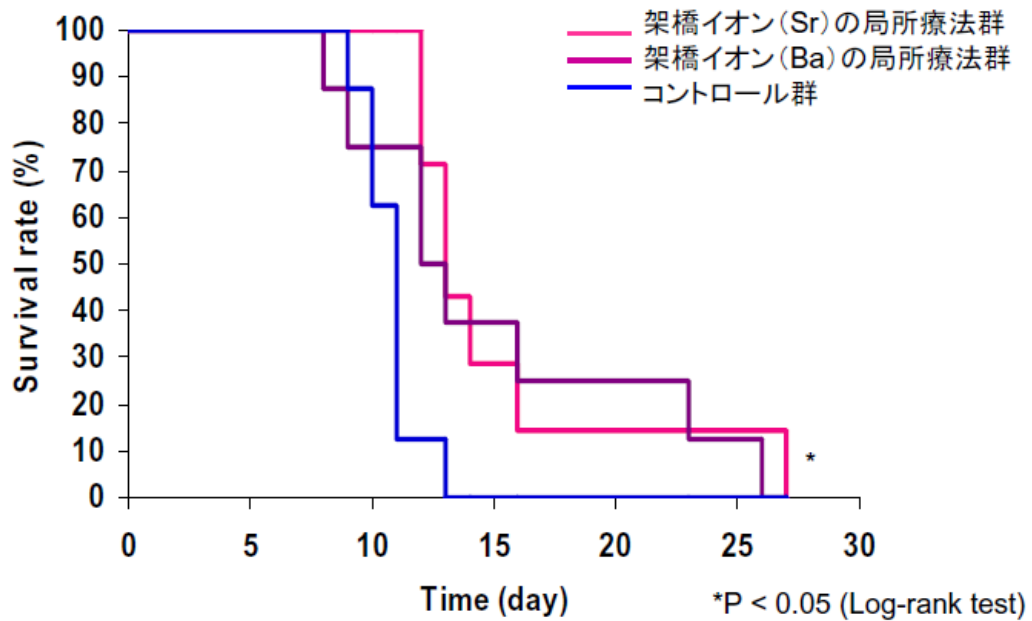


Fig.45) 麻痺発生までの期間 (Kaplan-Meier Analysis)

Sr²⁺で架橋したパクリタキセル含有ビーズの局所療法群は
脊椎転移乳癌ラットの麻痺発生の期間が延長した。

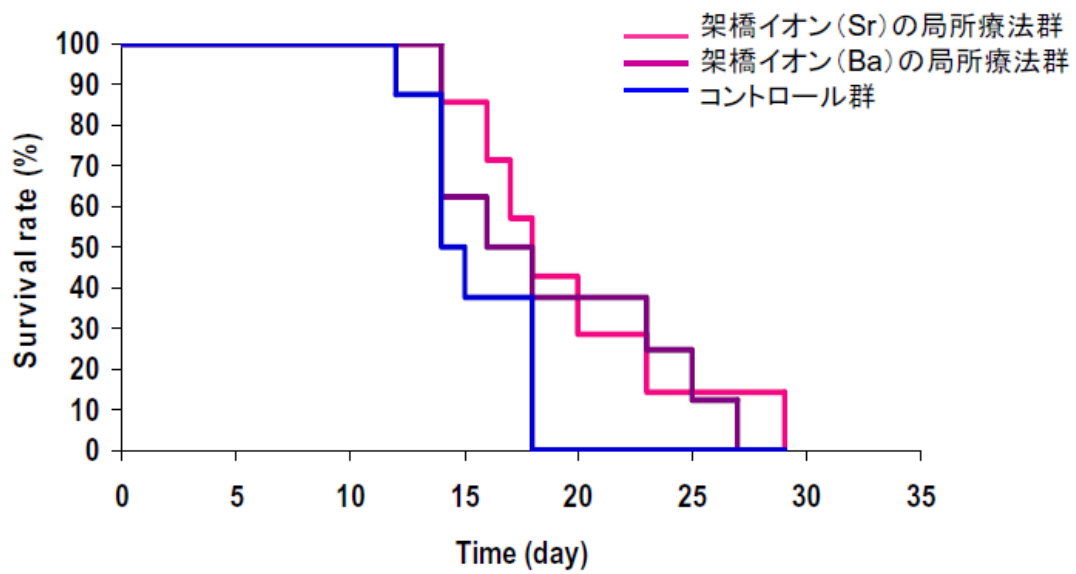


Fig.46) 下肢運動機能の維持期間 (Kaplan-Meier Analysis)

パクリタキセル含有ビーズの局所療法群は脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能を維持する傾向にあったが、統計学的有意差はなかった。

4-12. パクリタキセルを高容量担持させたビーズの局所療法の効果

Ca²⁺とSr²⁺で架橋した21% (w/w) パクリタキセル含有ビーズの局所療法群とコントロール群の脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える効果をTABLE 5に示す。麻痺発生までの期間はCa²⁺およびSr²⁺で架橋した21wt%パクリタキセル含有ビーズの局所療法群がそれぞれ平均17.8±3.7日、15.7±3.8日、コントロール群が平均10.8±1.3日であった。下肢運動機能の維持期間はCa²⁺およびSr²⁺で架橋したビーズの局所投与群がそれぞれ平均22.6±5.7日、21.8±2.6日、コントロール群が平均16.0±2.5日であった。麻痺発生まで期間と下肢運動機能の維持期間のKaplan-Meier曲線をFig.47, 48に示す。横軸が日数、縦軸が麻痺および下肢運動機能の生存率である。解析の結果から、Ca²⁺およびSr²⁺で架橋した21% (w/w) パクリタキセル含有ビーズはいずれも、コントロール群と比較して統計学的に有意な麻痺発生までの期間の延長と下肢運動機能の維持期間の延長を認めた。しかし、これらの効果はCa²⁺で架橋したビーズにパクリタキセルを低用量(2.4%)担持させた場合の局所療法の効果と同様で、これらの効果に統計学的有意差はなかった。

TABLE 5

Ca²⁺とSr²⁺で架橋した21% (w/w) パクリタキセル含有ビーズの局所療法の
脊椎転移乳癌ラットに対する効果

Groups	n	治療日	麻痺発生までの期間	下肢運動機能の維持期間
1群: 架橋イオン(Ca)	5	Day 0	平均17.8±3.7日	平均22.6±5.7日
2群: 架橋イオン(Sr)	6	Day 0	平均15.7±3.8日	平均21.8±2.6日
3群: コントロール	6	(-)	平均10.8±1.3日	平均16.0±2.5日

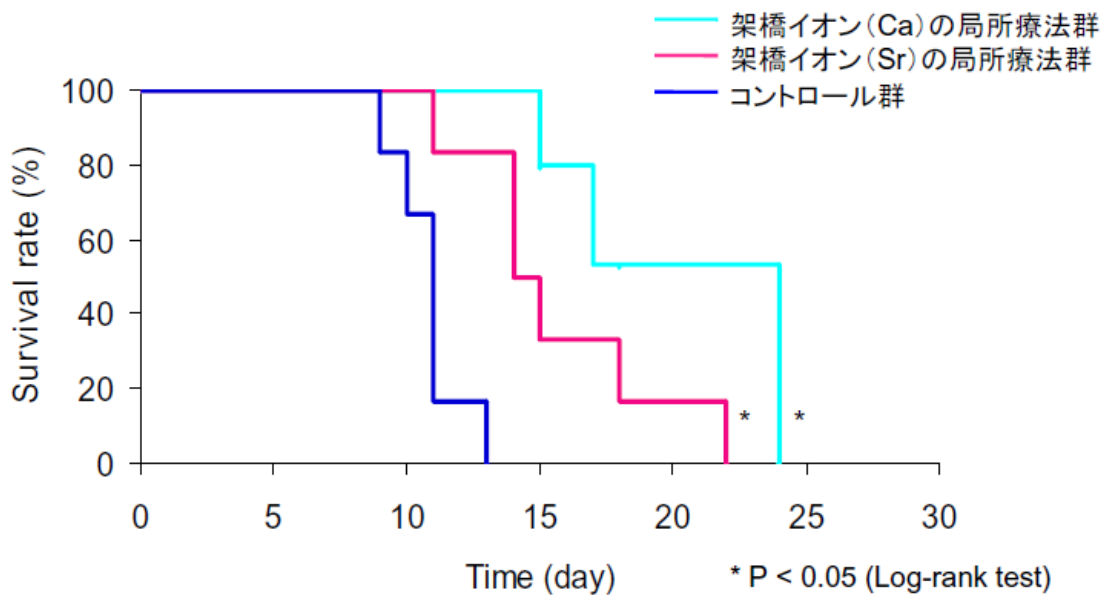


Fig.47) 麻痺発生までの期間 (Kaplan-Meier Analysis)

Ca²⁺とSr²⁺で架橋した21wt%パクリタキセル含有ビーズの
局所療法群は麻痺発生までの期間が延長した。

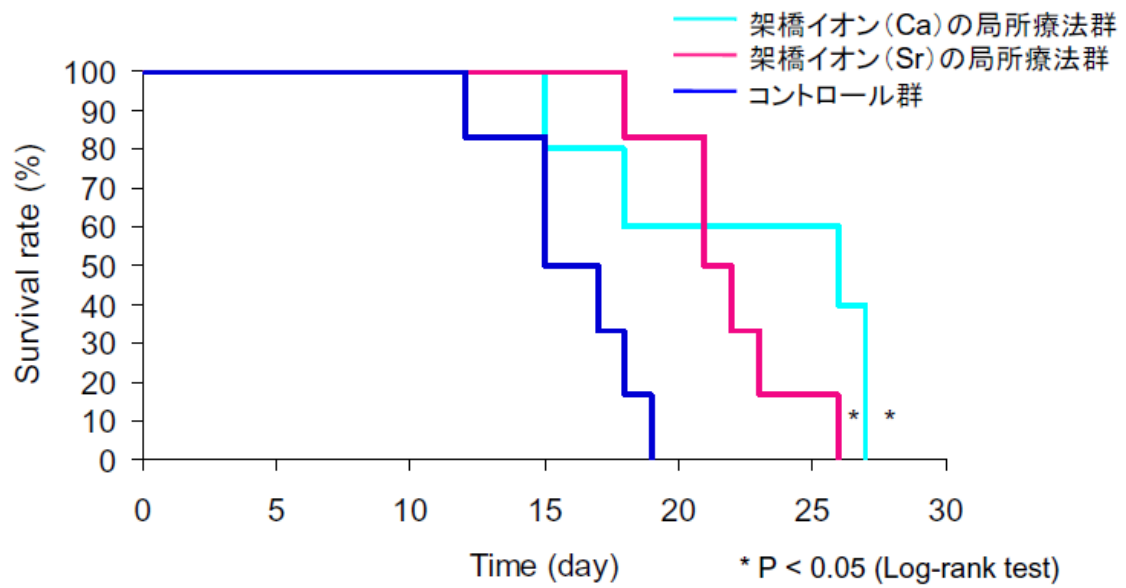


Fig.48) 下肢運動機能の維持期間(Kaplan-Meier Analysis)

Ca²⁺とSr²⁺で架橋した21wt%パクリタキセル含有ビーズの局所療法群は下肢運動機能の維持期間が延長した。

第5章 考察

我々の検討ではハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の担体にスプレイドライ法を用いてパクリタキセルを 2.4%から 21% (w/w) まで担持することができた。担体へのスプレイドライ法を用いたパクリタキセル担持の有用性はMuller-Liによって報告されている[50]。彼らはスプレイドライ法でパクリタキセルを担持させたポリ乳酸・グリコール酸共重合体 (PLGA) にTPGS (ビタミンE) とポリエチレングリコール (PEG) を添加した担体が、PBS中に担持量の約 30% のパクリタキセルを 30 日間にわたって徐放することを報告している。この方法の利点には薬剤の親水性や疎水性に関わらず使用できる点の他、耐熱性の少ない薬剤も使用できる点がある。PLGAにパクリタキセルを担持させたDDS研究は他にもいくつか報告され[51-53]、パクリタキセルを 10% (w/w) 担持させた担体の局所療法がヒトの肺癌や前立腺癌細胞株に対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている。臨床応用に成功したDDSの一つにPLGAを用いたLH-RL (黄体形成ホルモン放出ホルモン) アゴニストの徐放性注射薬 (リュープリン) があり、前立腺癌の治療で成果を上げている[54]。他にはポリマーを用いてパクリタキセルを 30 日間持続放出するステントのDDSがTaxus Express[®]という名前で2004年3月にBoston Scientific社から市販化され、血管形成術による冠動脈の再

狭窄率を減少させる成果を上げている (Fig.49)。

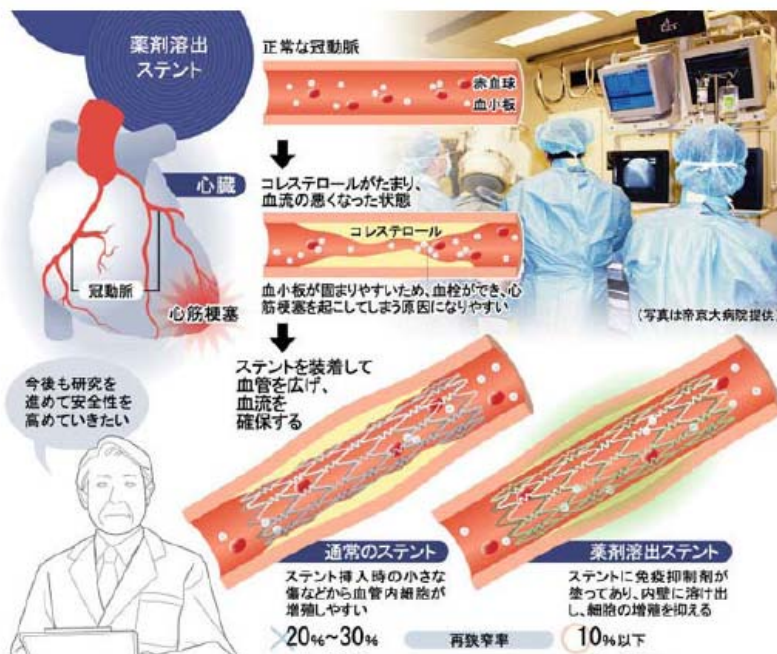


Fig.49) パクリタキセル溶出ステント Taxus Express® HPより転記

常温では水溶性の液体が体温とほぼ同じ転移温度 (37℃) になると非水溶性のゲルに変化する PLGA ポリマーを利用した DDS 担体が Utah 大学の研究グループによって開発され、Regel® という名前で MacroMed 社から市販化されている (Fig.50)。彼らの結果によれば、パクリタキセルを 0.1mg 担持させたこの担体 (Oncogel®) は *in vitro* で薬剤を約 50 日徐放し (Fig.51)、皮下移植ヒト乳癌 (MDA-MB-231) マウスに対して抗腫瘍効果を示すことが報告されている [55]。

Bagley らはパクリタキセルを 3% および 6% 含有する Oncogel® を用いて我々

と同じ Mantha の脊椎転移乳癌 (CRL-1666 細胞) ラットに対する腫瘍内注入効果を検討している[56]。彼らの結果によれば、術後 6 日目に局所治療を行うと下肢運動機能の維持期間が平均 14 日から 18 日に延長することから、脊椎転移癌に対する局所化学療法の効果を示唆されている。(Fig.52)

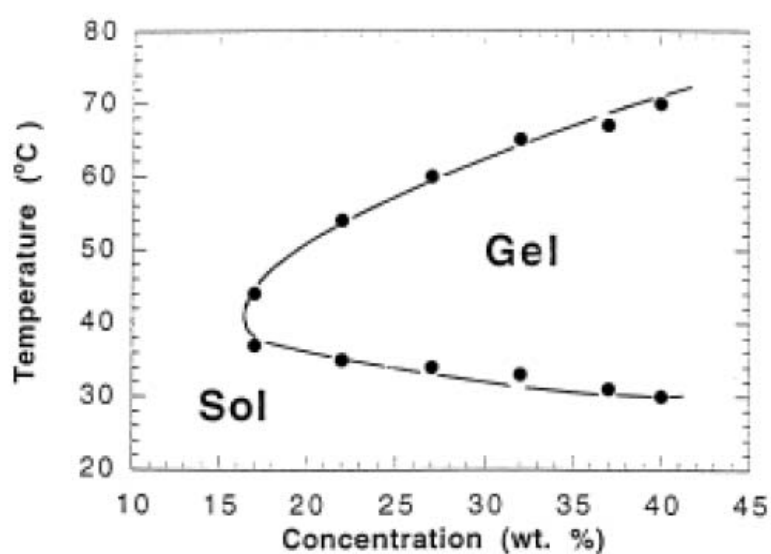


Fig.50) PLGAポリマー(Regel®)のsol-gel transition
文献[50]より転記

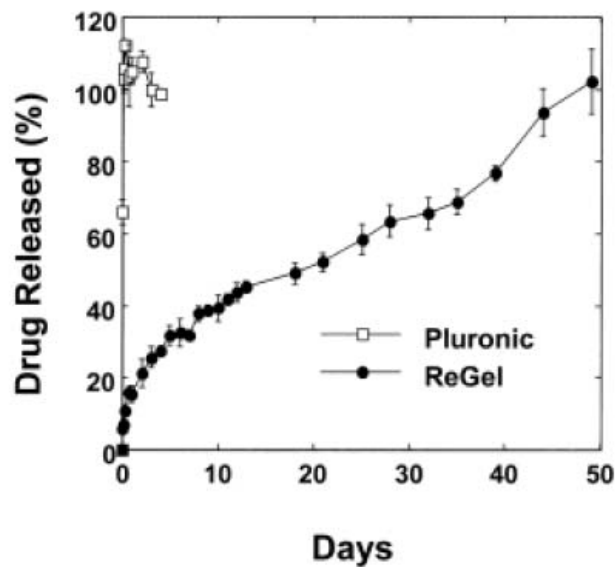


Fig.51) PLGAポリマー(ReGel®)からPBS中に放出されるパクリタキセル
文献[50]より転記

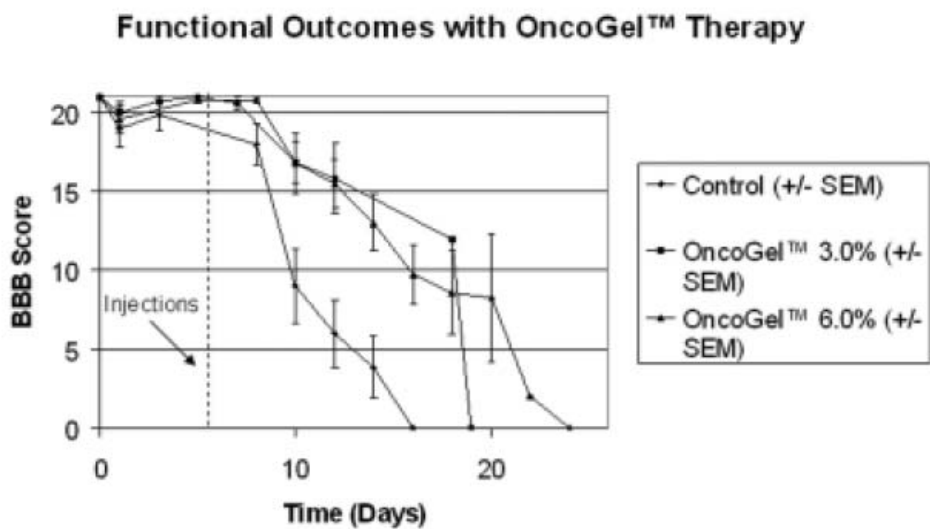


Fig.52) Oncogel®を腫瘍内注入した脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能の推移
文献[52]より転記

整形外科疾患の研究においても、ユーイング肉腫に対するパクリタキセル含有担体を用いた局所療法が報告されている[57]。しかし、これらはいずれも腫瘍内投与を前提とした担体材料の選択であり、我々のように骨（骨髄）内に投与して作用させたいと考える治療戦略の担体としては必ずしも最適ではないと考える。

実験 3-1 の結果から、脊椎転移癌ラットに対するパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸担体を用いた局所療法は、9 倍量の溶液の局所散布と同様に麻痺発生と下肢運動機能の維持期間を延長し、パクリタキセルの局所療法は脊椎転移癌に対して効果があることが分かった。また実験 3-2 の結果から、パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸担体を用いた局所療法は尾静脈からの全身療法と比較して少ない担持量で麻痺発生と下肢運動機能の維持期間を延長することが分かった。脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に与える局所療法の効果は同じ組成のゲルとその乾燥体であるビーズと同様であった。50%以上の延命効果が得られることを治療戦略の有効性ありと定義するならば、パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸担体を用いた局所化学療法は、脊椎転移乳癌ラットの麻痺発生と下肢運動機能の維持期間を 60-70%延長し、下肢運動機能の維持によって延命が得られていたことから本治療戦略は有効であると判断できる。しかし実験 3-2 の結果から、この治療

戦略では椎体外へ進展した腫瘍に対して効果はなく、むしろ経静脈投与による全身療法群のほうが腫瘍サイズを縮小することが示唆され、担体の骨内投与による局所療法は血管内投与による腫瘍の栄養血管への抗癌剤の送達も脊椎転移癌の増殖・進展を抑制するためには重要であることが示唆された。しかしヒトにおける薬剤の血管内投与による最大の問題点の一つは、大部分が非特異的に細網内皮系に取り込まれてしまうか、標的部位に到達する前に腎臓から体外に排出されてしまうことで、経静脈投与によるパクリタキセルの骨組織への移行は1%程度と言われる。その点で我々の考える局所化学療法は担体の標的組織への直接投与のため、より高濃度のパクリタキセルを骨髓内に移行させることが可能であると考えられる。

我々が外科的切除後の残存腫瘍に対する殺傷効果の期待する局所化学療法は、抗癌剤の骨髓内での腫瘍への作用と同時に正常の骨髓細胞への作用として骨髓抑制（好中球減少）の出現が危惧される。パクリタキセルの薬物動態と副作用に関しては、Gianni らが血漿中の薬物濃度と好中球減少の関連を検討し、血漿中のパクリタキセル濃度が42ng/mLを超えている時間に比例して骨髓抑制が重症化すると報告している[58]。またパクリタキセルの血中AUCが増加するのに伴い、好中球減少の程度が大きくなると言われる。これらはいずれもパクリタキセルを経静脈投与した場合の検討であるが、最高血中濃度ではなく血漿中に

おける曝露量が骨髄抑制の規定因子であることを示唆している。よって骨髄抑制という副作用は、骨髄から体循環血漿中への薬物放出を抑制することで防ぐことができると思う。骨組織の毛細血管は $5\ \mu\text{m}$ と言われるが、我々の担体は平均直径 $4\ \mu\text{m}$ のハイドロキシアパタイト微粒子をアルギン酸と複合化して平均直径約 $2\ \mu\text{m}$ としており、全身へ移行しないサイズである。我々の検討では、ラットの脛骨骨髄内にパクリタキセル含有ビーズを移植しても、投与直後から 72h まで循環血漿中にパクリタキセルは検出されなかったことから (HPLC で測定、 ng/ml レベル)、ハイドロキシアパタイト-アルギン酸の担体から放出されるパクリタキセルは局在し、全身移行率はとても低いと推察された。体循環血漿中への薬物移行を減少させ、脊椎転移癌に対して全身投与より少ない投与量で局所制御が可能であれば、治療効果と安全性を両立できる可能性がある。

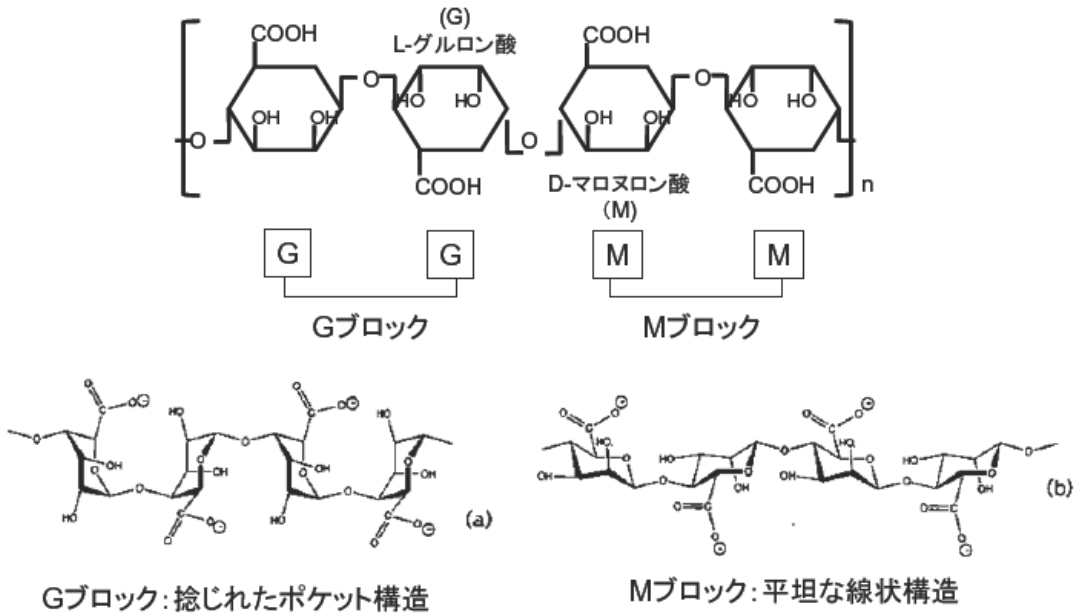
ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の架橋に用いた 3 種類の 2 カチオンのうち Sr^{2+} と Ba^{2+} は金属イオンであるが、生体に対する毒性は低い [59]。我々の実験でも明らかな有害事象は観察されず、 Ca^{2+} から Sr^{2+} や Ba^{2+} に変えることによって、生体内での安定性が改善する利点があり、そのことで担体の *in vitro* 実験 (実験 2) が可能であった。 Sr^{2+} と Ba^{2+} は Ca^{2+} よりも分子量が大きいため、臨床的には X 線透視が容易になる可能性がある。また我々の実験結果からは、 Sr^{2+} と Ba^{2+} で架橋したハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズからはパクリタキセ

ルが徐々に放出され、ラット乳癌細胞株CRL-1666 細胞 2×10^4 個に対して Sr^{2+} で架橋したビーズは 0-24hで 35%の細胞障害性を示し、48-72hにかけて経時的に15%に減少する一方、 Ba^{2+} で架橋したビーズから放出されるパクリタキセルの細胞障害性は15%でほぼ一定であったことから、架橋に用いる2カチオンによってハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体からのパクリタキセルの放出性が変化することが示唆された。

ポリマーからの薬剤放出は、担体の膨潤・侵食、薬剤の濃度勾配による拡散、担体の生分解の3段階で生じることが知られている[60]。PLGAの場合は分解に約4週間かかるため、薬剤の放出性は拡散か担体の膨潤・侵食に依存し、パクリタキセルの放出は約24hでの初期放出後に徐放を示すことが報告されている[61,62]。我々が担体に用いたハイドロキシアパタイトはPLGAよりさらに生体内で分解されない生体材料であるため、パクリタキセルの放出は拡散と担体の膨潤・侵食に依存すると考えられる。我々がスプレイドライ法で作製したハイドロキシアパタイト微粒子は均一な隙間 (pore) をもつため水が貫通しやすく、水の吸収に伴う微粒子の膨潤が粒子の隙間から薬剤を拡散させると考えられる。 Ca^{2+} 、 Sr^{2+} 、 Ba^{2+} で架橋した担体は同様に水を吸収して膨潤し、薬剤を拡散 (放出) すると考えられるが、それぞれのアルギン酸との架橋 (化学的結合) 強度が異なっている。アルギン酸はL-グルロン酸のユニットであるGブロックとD-

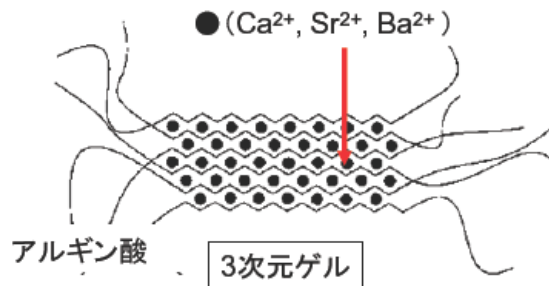
マロヌロン酸のユニットであるMブロックの 2 種類のブロックが直線的に結合した高分子である (Fig.53)。2 価カチオンの存在下でアルギン酸は 3 次元ゲルを形成するが、 Ca^{2+} の場合はアルギン酸のGブロックのみとの架橋、 Sr^{2+} の場合はGブロックとMブロックの架橋、 Ba^{2+} の場合は Sr^{2+} よりさらに多いGブロックと Mブロックとの架橋となる (Fig.54)。この架橋強度の違いが担体の辺縁からのパクリタキセルの濃度勾配による放出性に影響を与え、脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能に対して異なる結果を生じさせたと推察した。我々の結果からは、 Ca^{2+} から Sr^{2+} 、 Ba^{2+} と架橋が強くなるに従ってパクリタキセルの放出が制御されることが示唆された。そのことは、初期に高い細胞障害率を示すと考えられる Ca^{2+} や Sr^{2+} で架橋したビーズが、ラット乳癌細胞のように増殖の速い癌細胞を用いた脊椎転移癌ラットの下肢運動機能を維持した結果と矛盾しない。一方で、長期間にわたって一定の速度で薬物が放出されることを徐放と定義するならば、ハイドロキシアパタイト-アルギン酸の複合体は Ba^{2+} で架橋することがパクリタキセルの徐放に適した 2 価カチオンである。またパクリタキセルを高用量担持させても、低容量担持の場合とパクリタキセルの放出性は同様であったことから、ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体は担持量に関わらずパクリタキセル放出が制御され (バースト放出されず)、細胞障害性の期間の延長 (24h) は、担持量の増加に伴う担体辺縁からの濃度勾配によって生じたと推察

された。



GとMの2種類のブロックが直線的に結合した高分子である。

Fig.53) アルギン酸の構造



Ca ²⁺ :	Gブロックとの結合
Sr ²⁺ :	Gブロック+Mブロックとの結合(Gブロック優位の結合)
Ba ²⁺ :	Gブロック+Mブロックとの結合(Sr ²⁺ より架橋点が多い)

架橋強度: Ba²⁺ > Sr²⁺ > Ca²⁺

Fig.54) 2価カチオンによる3次元ゲルの架橋強度の違い

脊椎転移癌に対して我々の考える局所療法は全身療法の併用も必要である。

癌組織では血管透過性の亢進とリンパの停滞により正常細胞と比較して高分子物質が選択的に蓄積する EPR (enhanced permeability and retention effect) が見出されている[63]。PEG で修飾されたたんぱく質やリポソームの DDS 担体はその分子量により腎臓からの排出が低下して抗原性が低下するため、血中停滞性が著名に向上することが明らかとなっている[64-66]。PEG や PLGA などの高分子ポリマーで修飾した抗癌剤は、約 50-200nm サイズで全身投与することで EPR 効果により固形癌への高い集積と抗腫瘍効果を示すことが報告されている。

現在ドキソルビシンやアンフォテリシン B の封入 PEG リポソーム製剤(DOXIL® や AMBISOM®) が臨床で使用され、PEG 修飾したパクリタキセル含有ミセルが現在 Phase II の臨床試験中であるが、これら全身投与型の DDS 製剤との併用療法は脊椎転移癌に対しても効果を上げる可能性がある。

今回我々が実験に用いた組成のハイドロキシアパタイト-アルギン酸ビーズは、脊椎内視鏡の内径 **2.7mm** を通過させることが可能なサイズで (Fig.55)、ヒトの脊椎内へ低侵襲に投与できる発展性がある。この内視鏡は直径 **1cm** 程度の皮膚切開で椎体に達することが可能で、従来の手術と比較してはるかに患者への負担が少ない。さらに脊椎転移癌に対する局所療法として近年行われている経皮的治療の椎体形成術[67-69]やラジオ波焼灼術[70]といった最小侵襲脊椎手術と DDS 技術を応用した化学療法、さらには **Radiosurgery**[71,72]などを用いた集学的な治療がさらに脊椎転移癌の治療に有効性を発揮する可能性がある (Fig.56)。

最後に、我々の実験結果からはパクリタキセルの担体にハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体を用いた局所療法が、全身療法よりも脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能の維持に効果を上げることが明らかとなった。脊椎転移癌に対する局所療法は全身投与よりも少ない量で効果を示したことから、正常組織に対する安全域がさらに拡大することが示唆された。実際の臨床で患者の生存期間内における **QOL** を維持することができれば、入院回数やその期間を短縮することが可能で、結果的に医療費を削減する効果も期待される。



内径 2.7mm

Fig.55) 脊椎内視鏡先端の写真 (RICHARD WOLF社)
Yeung Endoscopic Spine Surgery System

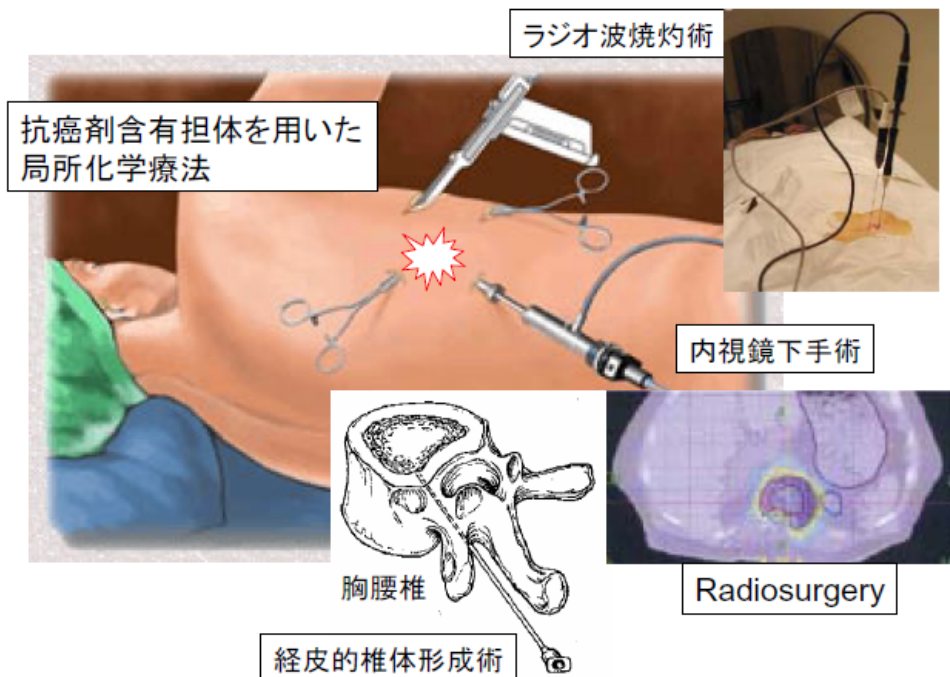


Fig.56) 脊椎転移癌に対する集学的な低侵襲局所療法のイメージ

第6章 結論

ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体にスプレイドライ法を用いて担持させたパクリタキセルは、ラットの癌細胞株やその脊椎転移癌ラットモデルに対して抗腫瘍活性を示すことが分かった。我々の動物実験の結果から、担体を用いたパクリタキセルの局所療法は脊椎転移癌の下肢運動機能を維持する効果を上げること明らかとなった。その効果は全身療法よりも少ない抗癌剤量で得られており、明らかな感毒性も観察されなかった。実験 2 の結果から担体からのパクリタキセル放出は制御され、複合化に用いる 2 価カチオンの種類や薬剤担持量を変えることで、パクリタキセルの抗腫瘍活性が変化することが示唆された。抗癌剤を担持させた担体の局所療法は、低侵襲の脊椎外科的治療やその他の全身療法と組み合わせて脊椎転移癌の新しい治療戦略となる可能性があり、今後さらに検討を要する。

第7章 問題点の今後の検討

我々の実験結果から担体を用いたパクリタキセルの骨髄内投与は、脊椎転移乳癌ラットの下肢運動機能を維持することに明らかとなった。この局所療法による明らかな毒性は観察されなかったことから、**therapeutic window** 内の血中濃度が標的組織で実現されたことが示唆された。ヒトにおいてパクリタキセルが効果を示す血中濃度は **0.025 から 25 μ g/ml** と言われるが[73]、今回我々の実験ではラットの血液検査は行っていない。局所療法の効果を証明するためにはパクリタキセルの静脈内投与による血漿中 **AUC** とパクリタキセル含有担体の骨髄内投与による局所濃度を調査し、比較・検討することが必要である。

我々の実験から得られた結果は、腫瘍片の実験的移植によって得られた脊椎転移癌の動物モデルに対する効果であり、ヒトの骨転移の自然発生の段階とは異なるため、治療効果は腫瘍の生着から増殖の段階に限定したものであると言える。また癌の増殖スピード（倍增時間）や薬剤の細胞障害性発現はそれぞれの種類によって異なり、個々の癌と薬剤にとっての至適な薬剤放出プロファイルはまだ分かっていない。我々はラットの脊椎転移乳癌を用いた実験を行ったが、**Engebraaten** らは **2 種類**のヒト乳癌細胞株を用いたヌードラットのモデルを報告している[74]。ヒトの癌細胞を用いたモデルの作製には時間がかかること

やヌードラットは高価であるなど問題はあるが、我々の考える局所療法の戦略が臨床へ応用可能かどうか検討するためにはヒト乳癌細胞株を用いて治療効果を検討しなければならないと考える。今回ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体の担体に担持させた抗癌剤のパクリタキセルは、血中半減期が 8.8-16.0 時間と比較的ゆっくり効果が発現することを期待した薬剤である。技術的には他の抗癌剤のハイドロキシアパタイトへの担持も可能であり、血中半減期がより短い抗癌剤の 5-FU (24 分) やシスプラチン (40 分)、カルボプラチン (2-3 時間) などを担持させることでより早期の効果を期待できるか検討することも今後の課題である。

さらに我々が (薬剤を担持・放出させる機能の他に) 担体に期待しているもう一つの作用であるハイドロキシアパタイトの骨伝導能・骨形成能が評価できていない。架橋に用いた Sr^{2+} には骨芽細胞を活性化して骨形成を促進する効果が見出されており [75]、その修飾物質ラネル酸ストロンチウム塩の経口投与は新規の椎体骨折を抑制する効果と大腿骨頸部骨折の発生を抑制する効果が認められ、新規の骨粗鬆症治療薬として期待されている [76,77]。これら担体成分の骨形成に与える影響について、大型の動物を用いて脊椎骨の組織学的・力学的強度の検討をしたいと考えている。そして内視鏡などの経皮的デバイスを用いた低侵襲アプローチによる担体投与の実現性についても検証したいと考えている。

謝辞

本研究の一部は、科学技術振興機構イノベーションサテライト茨城 JST の平成 19 年度育成研究課題として行われました。

本研究の進行と論文作成にあたり、ご指導とご検閲を賜りました坂根正孝博士（筑波大学臨床医学系整形外科ならびに次世代医療研究開発・教育統合センター准教授）に心から感謝いたします。

臨床への応用という高いモチベーションを持ち、坂根正孝博士のプロジェクトのもとで多大なるご協力を頂いた田中順三工学博士（東京工業大学大学院理工学研究科教授）ならびに生駒俊之工学博士（物質・材料研究機構 生体材料センター）、吉岡朋彦工学博士（東京工業大学大学院理工学研究科）、利根川亨氏（物質・材料研究機構 生体材料センター研究員）に厚く御礼申し上げます。彼らの優れた生体材料工学技術なしでは、抗癌剤徐放性アパタイト：パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体という生体材料を作製することはできませんでした。

また、本研究の動物実験を行うにあたり助手をして頂いた山田康貴博士、小林美穂子（科学技術振興機構イノベーションサテライト茨城）研究員に深謝します。

そして何より本研究への 4 年間の取り組みを支えて下さいました落合直之教授（筑波大学臨床医学系整形外科教授ならびに次世代医療研究開発・教育統合センター長）に厚く御礼申し上げます。

学会発表

1. The 11th International Congress of METASTASIS RESEARCH SOCIETY

Jointed with the 15th Annual Meeting of Japanese Association for Metastasis

Research Society

Tokushima, Japan September 3-6 2006

T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, T. Yoshioka, J. Tanaka, N. Ochai

Novel Chemoprevention with Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate Particles

in Metastatic Spine Cancer in Rats

2. 19th International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics 19th)

Chengdu, China October 10-13 2006

T. Yoshioka, T. Ikoma, A. Monkawa, S. Yunoki, T. Abe, M. Sakane and J. Tanaka

Preparation of Hydroxyapatite-alginate Gels as a Carrier for Controlled Release

of Paclitaxel

3. 19th International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics 19th)

Chengdu, China October 10-13 2006

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Toru Tonegawa, Tomonori

Yoshioka, Junzo Tanaka, Naoyuki Ochiai

Novel Local Treatment with Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate Gels for

Spinal Bone Metastases

4. 第13回つくばバイオマテリアル研究会

2006年11月24日 独立行政法人 物質・材料研究機構

吉岡朋彦、生駒俊之、紋川亮、安部哲哉、坂根正孝、田中順三

抗癌剤徐放担体としての複合マクロ粒子の作製: Macro-composite Beads as a

Carrier for Anti-Cancer Drugs

5. 第13回つくばバイオマテリアル研究会

2006年11月24日 独立行政法人 物質・材料研究機構

安部哲哉、坂根正孝、吉岡朋彦、生駒俊之、田中順三、落合直之

複合マクロ粒子を応用した局所化学療法: Application of Macro-composite

Beads for Local Chemotherapy

6. 第28回日本バイオマテリアル学会

平成 18 年 11 月 27 日、28 日 市ヶ谷、東京

吉岡朋彦、生駒俊之、紋川亮、安部哲哉、坂根正孝、田中順三

抗癌剤徐放担体としてのハイドロキシアパタイトーアルギン酸複合体の作製:

Hydroxyapatite-Alginate gels as a Carrier for Anti-Cancer Drugs

7. 第 28 回日本バイオマテリアル学会

平成 18 年 11 月 27 日、28 日 市ヶ谷、東京

安部哲哉、坂根正孝、吉岡朋彦、生駒俊之、田中順三、落合直之

ラット乳癌脊椎転移モデルにおけるパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト

ーアルギン酸複合体の局所投与効果: Efficacy of Local treatment with

Hydroxyapatite-Alginate Particles in Metastatic Spine Cancer in Rats

8. 4th Annual Cancer Drugs Research & Development conference and 2nd

Angiogenesis Research & Development conference

Philadelphia, U.S.A. February 8-9, 2007

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Tomohiko Yoshioka, Toshiyuki Ikoma, Junzo

Tanaka, Tetsuya Tateishi, Naoyuki Ochiai

Effect of paclitaxel-loaded HYDROXYAPATITE-alginate beads for local

chemotherapy in rats

9. The 53rd Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society

San Diego, U.S.A. February 11-14, 2007

Abe T; Sakane M; Ikoma T; Yoshioka T; Kaneoka K; Tonegawa T; Tanaka J;

Tateishi T; Ochiai N

EFFICACY OF LOCAL TREATMENT WITH PACLITAXEL-LOADED
HYDROXYAPATITE-ALGINATE GEL PARTICLES: IN VITRO AND IN VIVO
STUDY

10. 第36回日本脊椎脊髄病学会

2007年4月26日、27日 金沢

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、吉岡朋彦、金岡恒治、田中順三、立石哲也、

落合直之

骨転移治療用抗癌剤の開発とその局所投与効果：パクリタキセル含有ハイドロ

キシアパタイト-アルギン酸複合体: Development of a novel anticancer drug

formulation for metastatic spine cancer and its efficacy of local treatment:

Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-aliginate particles

11. 第 23 回日本 DDS 学会

2007 年 6 月 14 日、15 日 熊本

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、立石哲也、落合直之

転移性骨腫瘍に対する局所化学療法のための担体開発とその効果：パクリタキ

セル含有ハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体: Development of a novel

carrier of anticancer drug for bone cancer and its efficacy of local treatment:

Paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate beads

12. 第 8 回ホルモンと癌研究会

2007 年 7 月 27 日 品川

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、立石哲也、落合直之

ラット乳癌脊椎転移モデルに対する抗癌剤含有アパタイト担体の局所治療効果

13. 29th Annual Meeting of American Bone Mineral Research Society

Honolulu, Hawaii, USA September 16-19, 2007

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Tomohiko Yoshioka, Junzo

Tanaka, Naoyuki Ochiai

Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate Beads for Local Chemotherapy of

Metastatic Spine Cancer in Rats

14. 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会 The Journal of the Japanese
Orthopaedic Association

2007 年 10 月 25、26 日 浜松

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、立石哲也、落合直之

転移性骨腫瘍に対する局所療法のための抗癌剤担体開発とその効果

—パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト・ビーズ—

15. International Symposium on Sustainable Energy & Materials 2007

Ishigaki, Okinawa, Japan October 30 – November 1, 2007

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Mihoko Kobayashi, Satoshi

Nakamura, Tetsuya Tateishi, Naoyuki Ochiai

Hydroxyapatite-alginate beads as a sustainable carrier of paclitaxel

16. 20th International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics 20th)

Nantes, France October 24-26 2007

T. Ikoma, T. Yoshioka, S. Nakamura, N. Hanagata, T. Abe, M. Sakane, N. Ochiai,

J Tanaka

Rigid Hydroxyapatite-Alginate Beads for Sustained Release of Paclitaxel

17. 第 29 回日本バイオマテリアル学会

平成 19 年 11 月 26 日、27 日 千里、大阪

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、吉岡朋彦、利根川亨、

立石哲也、落合直之

脊椎転移癌に対する低侵襲治療のためのバイオマテリアル: **Biomaterial**

(Hydroxyapatite Composite Carrier) for Local Chemotherapy as a Minimally

Invasive Treatment for Metastatic Spine Cancer

18. 1st Asia Biomaterials Congress

December 6-8, 2007, Tsukuba, Japan

T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M. Kobayashi, S. Nakamura, T. Tateishi, N. Ochiai

Hydroxyapatite-alginate Carrier for Local Delivery of Paclitaxel to Treat

Metastatic Spine Cancer

19. The 54th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society

San Francisco, California, U.S.A. Mar 2-5, 2008

T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M. Kobayashi, S. Nakamura, T. Tateishi, N. Ochiai

Effect of Local Treatment with Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate beads:

in vivo studies

20. 第 37 回日本脊椎脊髄病学会

2008 年 4 月 24 日、25 日 新宿

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、落合直之

パクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト・ビーズの脊椎転移癌ラットに対

する局所投与効果 Effect of local delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatite

composite beads for metastatic spine cancer in rats

21. 1st World Congress of Minimally Invasive Spine Surgery and Techniques

(MISST)

Honolulu, Hawaii, USA June 3-7, 2008

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Atsuro Tsukada, Naoyuki Ochiai

Early Experiences of Transforaminal PELD (Percutaneous Endoscopic Lumbar

Discectomy)

22. The 8th World Biomaterials Congress (WBC 2008)

Amsterdam RAI, Netherlands May 28-June 1, 2008

T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M. Kobayashi, S. Nakamura, T. Tateishi, N. Ochiai

Hydroxyapatite Composite Beads for Local Delivery of Paclitaxel

23. 第 24 回日本 DDS 学会

2007 年 6 月 29 日、30 日 東京

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、落合直之

脊椎転移癌ラットに対するハイドロキシアパタイト-アルギン酸複合体を用いた

抗癌剤パクリタキセルの骨内投与効果: Effect of intraosseous delivery of

Paclitaxel-loaded hydroxyapatite-alginate beads in a rat model of metastatic

spine cancer

24. 第 41 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会

2008 年 7 月 17、18 日 浜松

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、中村聡、落合直之

ラット脊椎転移癌に対するパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト複合体

ビーズの局所投与効果

25. 30th Annual Meeting of American Bone Mineral Research Society

Montreal, Canada September 12-16, 2008

Tetsuya Abe, Masataka Sakane, Toshiyuki Ikoma, Mihoko Kobayashi, Naoyuki
Ochiai

Local Administration with Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-alginate Beads for
Metastatic Spine Cancer in Rats

26. 21st International Symposium on Ceramics in Medicine (Bioceramics 21st)

Brazil October 22-25 2008

T. Abe, M. Sakane, T. Ikoma, M.Kobayashi, N Ochiai

Therapeutic Effects of Paclitaxel-loaded Hydroxyapatite-Alginate Beads: *In Vitro*
and *In Vivo* studies

27. 第24回日本整形外科学会基礎学術集会

2008年10月25、26日 京都

安部哲哉、坂根正孝、生駒俊之、小林美穂子、落合直之

脊椎転移癌ラットに対するパクリタキセル含有ハイドロキシアパタイト・ビーズの骨内投与効: Effect of intraosseous delivery of paclitaxel-loaded hydroxyapatite composite beads in a rat model of metastatic spine cancer

引用文献

[1]Roodman: Mechanisms of bone metastasis. N Engl J Med 350:1655-1664, 2004

[2]Klimo Jr P, Schmit MH: Surgical management of spinal metastases. The Oncologist 9:188-196, 2004

[3]Uchida A, Wakabayashi H, Okuyama N, Okamura A, Matsumine A: Metastatic bone disease: pathogenesis and new strategies for treatment. J Orthop Sci 9:415-420, 2004

[4]荒木信人. がんの疫学と転移性骨腫瘍の頻度 骨転移治療ハンドブック. 金原出版, 東京, 2004, pp.3-4

[5]Mundy GR, Yoneda T: Facilitation and suppression of bone metastasis. Clin Orthop Relat Res 312:34-44, 1995

[6]Schiff D: Spinal cord compression. Neurol Clin 21:1-24, 2003

[7]Gerszten PC, Welch WC: Current surgical management of metastatic spinal disease. Oncology (Huntingt) 14:1013-1024, 2000

[9]Oka H, Kondoh T, Seichi A, Hozumi T, Nakamura K: Incidence and prognostic factors of Japanese breast cancer patients with bone metastasis. Orthop Sci

11:13-19, 2006

[10]Binning MJ, Gottfried ON, Klimo Jr P, Schmidt MH: Minimally invasive treatments for metastatic tumors of the spine. *Neurosurg Clin N Am* 15:459-465, 2004

[11]Falkmer U, Järhult J, Weräll P, Cavallin-Ståhl E: A systemic overview of radiation therapy effects in skeletal metastases. *Acta Oncologica* 42:620-633, 2003

[12]Patchell RA, Tibbs PA, Regine WF, Payne R, Saris S, Kryscio RJ, Mohiuddin M, Young B: Direct decompressive surgical resection in the treatment of spinal cord compression caused by metastatic cancer: randomized trial. *Lancet* 366:643-648, 2005

[13]Kawahara N, Tomita K, Baba H, Toribatake Y, Fujita T, Mizuno K, Tanaka S: Cadaveric vascular anatomy for total en bloc spondylectomy in malignant vertebral tumors. *Spine* 21:1401-1407, 1996

[14]Boriani S, Biagini R, De Iure F, Bertoni F, Malaguti MC, Di Fiore M, Zanoni A: En block resections of bone tumors of the thoracolumber spine: A preliminary report on 29 patients. *Spine* 21:1921-1931, 1996

[15]Sundaresan N, Rothman A, Manhart K, Kelliher K: Surgery for solitary

metastases of the spine. *Spine* 27:1802-1806, 2002

[16]Venook AP: Regional strategies for managing hepatocellular carcinoma. *Oncology* 14:347-354, 2000

[17]Vegt PD, Debruyne AP, van der Meijden: Bacillus Calmette-Guerin in superficial bladder cancer. *Eur Urol* 27:89-95, 1995

[18]Uchida A, Shinto Y, Araki N, Ono K: Slow release of anticancer drugs from porous calcium hydroxyapatite ceramics. *J Orthop Res* 10:440-445, 1992

[19]Itokazu M, Sugiyama T, Ohno T, Wada E, Katagiri Y: Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J Biomed Mater Res* 39:536-538, 1998

[20]Gangi A, Kastler B, Klinkert A, Dietemann JL: Injection of alcohol into bone metastases under CT guidance. *J Comput Assist Tomogr* 18:932-935, 1994

[21]Ribeiro CC, Barrias CC, Barobosa MA: Calcium phosphate-alginate microspheres as enzyme delivery matrices. *Biomaterials* 25:4363-4373, 2004

[22]Burabapanitkit B, Srinilta V, Ingviya N, Oungbho K, Geater A, Ovatlamporn C: The efficacy of a hydroxyapatite composite as a biodegradable antibiotics delivery system. *Clin Orthop Relat Res* 424:244-252, 2004

[23]Burabapanitkit B, Oungbho K, Ingviya N: The efficacy of hydroxyapatite

composite impregnated with amphotericin B. Clin Orthop Relat Res 437:236-241, 2005

[24]Silvakumar M, Panduranga Rao: Preparation, Characterization, and *in vitro* release of gentamicin from corallin hydroxyapatite-alginate composite microspheres. J Biomed Mater Res A 65:222-228, 2003

[25]Tokuhashi Y, Matsuzaki H, Toriyama S, Kawano H, Ohsaka S: Scoring system for the preoperative evaluation of metastatic spine tumor prognosis. Spine 15:1110-1113, 1990

[26]Tomita K, Kawahara N, Kobayashi T, Yoshida A, Murakami H, Akamaru T: Surgical strategy fo spinal metastases. Spine 26:298-306, 2001

[27]Katagiri H, Takahashi M, Inagaki J, et al.: Determining the site of the primary cancer in patients with skeletal metastasis of unknown origin: a retrospective study. Cancer 86:533-537, 1999

[28]Ibrahim A, Crockard A, Antonietti P, Boriani S, Büngrer C, Gasbarrini A, Grejs A, Harms J, Kawahara N, Mazel C, Melcher R, Tomita K: Does spinal surgery improve the quality of life for those with extradural (spinal) osseous metastases? An international multicenter prospective observation study of 223patients J Neurosurg Spine 8:271-278, 2008

[29]Rosenthal D, Marquardt G, Lorenz R, Nichtweiss M: Anterior decompression and stabilization using a microsurgical endoscopic technique for metastatic tumors of the thoracic spine. J Neurosurg 84:565-572, 1996

[30]McLain RF: Spinal cord decompression: an endoscopically assisted approach for metastatic tumors. Spinal Cord 39:482-487, 2001

[31]Hsieh PC, Koski TR, Sciubba DM, Moller DJ, O'Shaughnessy BA, Li KW, Gokaslan ZL, Ondra SL, Fessler RG, Liu JC: Maximizing the potential of minimally invasive spine surgery in complex spinal disorders. Neurosurg Focus 25:E19, 2008

[32]Kamangar F, Dores GM, Anderson WF: Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. J Clin Oncol 24:2137-2150, 2006

[33]安達勇, 高塚雄一. 再発乳癌治療ガイドブック, 南江堂, 東京, 2002, pp.15-80

[34]中馬広一, 川井章, 伊藤康正. 中谷文彦, 山口洋, 森本裕樹. 別府保男. 再発乳癌骨転移に対する治療のガイドラインと実際, 日本整形外科学会誌 79:555-560, 2005

[35]Dhanikula AB, Panchagnula R: Localized paclitaxel delivery Int J Pharm 183:85-100, 1999

[36]Wani MC, Taylor HL, Wall ME, Coggon P, McPhail AT: The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. J Am Chem Soc 93:2325-2327, 1971

[37]Schiff PB, Fant J, Horwitz SB: Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature 277:655-667, 1979

[38]Holmes FA, Walters RS, Theriault RL, Forman AD, Newton LK, Raber MN, Buzdar AU, Frye DK, Hortobagyi GN: Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer. J National Cancer Institute 83:1797-1805, 1991

[39]Yoshioka T, Ikoma T, Monkawa A, Yunoki S, Abe T, Sakane M, Tanaka J: Preparation of hydroxyapatite-alginate gels as a carrier for controlled release of paclitxel. Key Engineering Materials 330-332:1053-1056, 2007

[40]Zheng H: Interaction mechanism in sol-gel transition of alginate solutions by addition of divalent cations. Carbohydrate Research 302:97-101, 1997

[41]Pham HH, Luo P, Génin F, Dash AK: Synthesis and characterization of hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery systems by precipitation and spray drying

technique. AAPS Pharm Sci Tech 3:E1, 2002

[42]Francoeur AM, Assalian A: Microcat: A novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. Biochemica 3:19-225, 1996

[43]Arguell F, Baggs RB, Frantz C: A murine model of experimental metastasis to bone and bone marrow. Cancer Res 48:6876-6881, 1988

[44]Mantha A, Legnani FG, Bagley CA, Gallia GL, Garonzik I, Pradilla G, Amundson E, Tyler BM, Brem H, Gokaslan ZL: a novel rat model for the study of intraosseous metastatic spine cancer. J Neurosurg Spine 2:303-307, 2005

[45]Takahashi M, Ogawa J, Kinoshita Y, Takakura M, Mochizuki K, Satomi K: Experimental study of paraplegia caused by spinal tumors: an animal model of spinal tumors created by transplantation of VX2 carcinoma. The Spine J 4:675-680, 2004

[46]Amundson E, Pradilla G, Brastianos P, Bagley C, Riley LH, McCarthy E, Wolinsky JP, Gokaslan ZL: A novel intervertebral tumor model in rabbits. Neurosurgery 57:341-346, 2005

[47]Blouin S, Baslé MF, Chappard D: Rat models of bone metastases. Clin Exp Metastasis 22:605-614, 2005

[48]Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC: A sensitive and reliable locomotor

rating scale for open field testing in rats. *J Neurotrauma* 12:1-21, 1995

[49]Kaplan EL, Meier P: Non-parametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc* 53:457-481, 1958

[50]Mu L, Teo MM, Ning HZ, Tan CS, Feng SS: Novel powder formulations for controlled delivery of poorly soluble anticancer drug: Application and investigation of TPGS and PEG in spray-dried particulate system. *J Cont Release* 103:565-575, 2005

[51]Harper E, Dang W, Lapidus RG, Garver Jr RI: Enhanced efficacy of a novel controlled release paclitaxel formulation (PACLIMER Delivery System) for local-regional therapy for lung cancer tumor nodules in mice. *Clin Cancer Res* 5:4242-4248, 1999

[52]Mo Y, Lim LY: Preparation and in vitro anticancer activity of wheat germ agglutinin (WGA)-conjugated PLGA nanoparticles loaded with paclitaxel and isopropyl myristate. *J Cont Release* 107:30-42, 2005

[53]Jackson JK, Gleave ME, Yago V, Beraldi E, Hunter WL, Burt HM: The suppression of human prostate tumor growth in mice by the intratumoral injection of a slow-release polymeric paste formulation of paclitaxel. *Cancer Res* 60:4146-4151, 2000

[54]Ogawa Y, Yamamoto M, Takada S, Okada H, Shimamoto T:
Controlled-release of leuprolide acetate from polylactic acid or
copoly(lactic/glycolic) acid microcapsules: influence of molecular weight and
copolymer ratio of polymer. Chem Pharm Bull 36:1502-1507, 1988

[55]Zentner GM, Rathi R, Shih C, McRea JC, Seo MH, Oh H, Rhee BG,
Mestecky J, Moldoveanu Z, Morgan M, Weitman S: Biodegradable block
copolymers for delivery of proteins and water-insoluble drugs. J Control Release
72:203-215, 2001

[56]Bagley CA, Bookland MJ, Pindrik JA, Ozmen T, Gokaslan ZL, Witham TF:
Local delivery of OncoGel delays paresis in rat metastatic spinal tumor model. J
Neurosurg Spine 7:194-198, 2007

[57]Attawia MA, Borden MD, Herbert KM, Katti DS, Asrari F, Uhrich KE,
Laurencin CT: Regional drug delivery with radiation for the treatment of Ewing's
sarcoma: In vitro development of a taxel release system. J Cont Release
71:193-202, 2001

[58]Ganni L, Kearns CM, Giani A, et al.:Nonliner pharmacokinetics and
metabolism of paclitaxel and its pharmacokinetic/pharmacodynamic
relationships in humans. J Clin Oncol 13:180-190, 1995

- [59]Yamamoto A, Honma R, Sumita M: Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells. J Biomed Mater Res 39:331-340, 1998
- [60]Schwendeman SP, Cardonobe M, Klibanov A, Langer R, in :Cohen S, Bernstein H (Eds.), Microparticle Systems for the Delivery of Proteins and Vaccines, Marcel-Dekker, New York, 1994, pp.1-49
- [61]Feng SS, Huang GF: Effects of emulsifiers on the controlled release of paclitaxel (taxol®) Ann, Acad. Med. Singapore 29:633-639, 2000
- [62]Wang YM, Sato H, Horikoshi I: In vitro and in vivo evaluation of taxol release from poly (lactic-co-glycolic acid) microsphere containing isopropyl myristate and degradation of the microspheres. J Control Release 49:157-166, 1997
- [63]Matsumura Y, Maeda H: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumouritopic accumulation of proteins and the antitumour agent smancs. Cancer Res 46:6387-6392, 1986
- [64]Klibanov AL, Maruyama K, Torchilin VP, Huang L: Amphipathic polyethylenaenglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. FEBS Lett 268:235-237, 1990
- [65]Blum G, Ceve G:Liposomes for the sustained drug release *in vivo*. Biochim

Biophys Acta 1029:91-97, 1990

[66]Maruyama K, Yuda T, Okamoto A, Kojima S, Suginaka A, Iwatsuru M:
Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of
distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphiphathic poly
(ethylene glycol). Biochim Biophys Acta 1128:44-49, 1992

[67]Jang JS, Lee SH: Efficacy of percutaneous vertebroplasty combined with
radiotherapy in osteolytic metastatic spinal tumors. J Neurosurg 2:243-248, 2005

[68]Fourney DR, Schomer DF, Nadar R, Chlan-Fourney J, Suki D, Ahrar K,
Rhines LD, Gokaslan: Percutaneous vertebroplasty and kyphoplasty for painful
vertebral fractures in cancer patients. J Neurosurg 98(suppl 1):21-30, 2003

[69]松崎浩巳, 大川章裕, 岩橋正樹, 徳橋泰明, 根本泰寛, 星野雅洋.
Kyophoplasty と vertebroplasty の現状と未来 整形・災害外科 46:613-619, 2003

[70]Callstrom MR, Charboneau JW, Goetz MP, Rubin J, Wong GY, Sloan JA,
Novotny PJ, Lewis BD, Welch TJ, Farrell MA, Maus TP, Lee RA, Reading CC,
Petersen IA, Pickett DD: Painful metastases involving bone: feasibility of
percutaneous CT-and US-guided radio-frequency ablation. Radiology 224:87-97,
2002

[71]Degen JW, Gagnon GJ, Voyadzis JM, McRae DA, Lunsden M, Dieterich S,

Molzahn I, Henderson FC: CyberKnife stereostatic radiosurgical treatment of spinal tumors for pain control and quality of life. *J Neurosurg* 2:540-549, 2005

[72]Gerszten PC, Burton SA, Ozhasoglu C, Welch WC: Radiosurgery for spinal metastases: Clinical experience in 500 cases from a single institution. *Spine* 32:193-199, 2007

[73]Raymond E, Hanauske A, Faivre S, et al.: Effects of prolonged versus short-term exposure paclitaxel (taxol) on human tumor colony-forming units. *Anti-Cancer Drugs* 8:379-385, 1997

[74]Engebraaten O, Fodstad: Site-specific experimental metastasis patterns of two human breast cancer cell lines in nude rats. *Int J Cancer* 82:219-225, 1999

[75]Baron R, Tsouderos Y: In vitro effects of S12911-2 on osteoclast function and bone marrow macrophage differentiation. *Eur J Pharmacol* 450:11-17, 2002

[76]Meunier PJ, Roux C, Seeman E: The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med* 350:459-468, 2004

[77]Reginster JY, Seeman E, De Vernejoul MC: Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis. Treatment of peripheral osteoporosis (TROPOS) study *J Clin Endocrinol Metab*

90:2816-2822, 2005