



Title	ハイドロキシアパタイトを担体としたエリスロポエチン徐放性製剤の開発
Author(s)	長崎, 健一
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第9304号
Issue Date	2009-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k9304
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/42590
Type	doctoral thesis
File Information	nagasaki_thesis.pdf



ハイドロキシアパタイトを担体とした エリスロポエチン徐放性製剤の開発

長崎 健一

北海道大学大学院獣医学研究科

動物疾病制御学講座 実験動物学教室

目次

略 語 表	5
総 諸	7
第 1 章 亜鉛含有ハイドロキシアパタイトからの EPO の持続的放出	9
緒 言	10
材料および方法	12
1. 供試動物	12
2. EPO 徐放性試料の調製	12
2.1 EPO 徐放性試料の種類	12
2.2 担体の作製	13
2.3 EPO の吸着	13
2.4 Zn 処理	14
2.5 PLA 処理	14
2.6 試料の粒子解析	14
3. EPO 徐放性試料の投与および血液検査	14
4. 器官重量測定	15
5. 病理組織学的検査	16
6. 統計学的解析	16
結 果	17
1. EPO 徐放性試料の調製	17
2. 血液検査	17
3. 器官重量測定	18
4. 病理組織学的検査	18

考 察	20
小 括	24
図および表	25
第 2 章 腎性貧血モデルマウスを用いた EPO 徐放性試料の持続的な貧血改善効果の検討.....	33
緒 言	34
材料および方法	35
1. 供試動物	35
2. 貧血の確認	35
3. EPO 徐放性試料の調製	36
4. EPO 徐放性試料の投与および血液検査	36
5. 器官重量測定	37
6. 病理組織学的検査	37
7. 統計学的解析	37
結 果	38
1. 高タンパク尿マウスと低タンパク尿マウスの比較.....	38
2. EPO 徐放性試料投与後の血液検査	38
3. 器官重量測定	39
4. 病理組織学的検査	39
考 察	40
小 括	43
図および表	44
総 括	51
謝 辞	53

参考文献	54
英文抄録	61

略 語 表

1.	BET: Brunauer-Emmett-Teller
2.	BFU-E: burst forming unit-erythroid
3.	Cal: calcination 焼結
4.	CFU-E: colony forming unit-erythroid
5.	CKD: Chronic Kidney Disease 慢性腎臓病
6.	DDS: drug delivery system 薬物送達システム
7.	ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay 酵素免疫測定法
8.	EPO: erythropoietin エリスロポエチン
9.	HA: hematoxylin-eosin
10.	HAp: hydroxyapatite ハイドロキシアパタイト
11.	HCT: hematocrit ヘマトクリット
12.	HGB: hemoglobin ヘモグロビン
13.	MCV: mean corpuscular volume 平均赤血球容積
14.	MCH: mean corpuscular hemoglobin 平均赤血球血色素量
15.	MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration 平均赤血球ヘモグロビン濃度
16.	PBS: phosphate-buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
17.	PLA: polylactic acid ポリ乳酸
18.	PLGA: poly(lactic glycolic acid) ポリ乳酸グリコール酸共重合体
19.	QOL: quality of life 生活の質
20.	RBC(s): red blood cell(s) 赤血球
21.	RET: reticulocyte 網状赤血球
22.	rhEPO: recombinant human erythropoietin リコンビナントヒトエリスロポエチン
23.	rpm: revolutions per minute 毎分回転数
24.	SPF: specific pathogen-free
25.	Zn: zinc 亜鉛

26. Zn-HAp: zinc-containing hydroxyapatite 亜鉛含有ハイドロキシアパタイト

総 諸

近年、慢性腎臓病（Chronic Kidney Disease : CKD）という病気の概念が提唱され、注目されている。CKD とは、糸球体ろ過量が健康な人の 60%以下に低下するか、あるいはタンパク尿が出るといった腎臓の異常が一定期間以上続く状態の総称である。放置したままにしておくと、末期腎不全となり人工透析や腎移植が必要となってくる。現在、日本には約 1,330 万人(成人の約 8 人に 1 人)の CKD 患者がいると言われている。人工透析を受けている患者数は 26 万人を超えており、その数は毎年 1 万人ずつ増え続けている。

造血作用を有する erythropoietin (EPO)は主に腎臓で産生されるため、腎機能の低下に伴い高頻度で EPO 欠乏性の貧血を併発し、腎性貧血と言われている。腎性貧血のみならず、悪性腫瘍やリウマチといった様々な原因による貧血において recombinant human erythropoietin (rhEPO)が静脈内投与または皮下投与されており高い治療効果を示している(Hahn, S. K. et al. 2006)。しかし、投与された EPO は速やかに排泄されるため、貧血でない状態を維持するためには 1 週間に 3 回の投与を繰り返す必要があり、患者のみならず医療現場にとっても大きな負担となっている(Jacobs, C. et al. 2000)。腎性貧血に対する rhEPO 治療は獣医学の領域においても導入されており、特にネコではヒトと同様の治療が行われることがあるが、やはり頻回投与が必要とされているのが現状である。このことから drug delivery system (DDS)の手法を用いた投与頻度を軽減できるシステムの開発が期待されている。DDS とは、治療薬を持続的に放出(徐放)すること、体内半減期が短い治療薬の寿命を延長すること、特定の部位での治療薬の吸収を促進すること、治療薬を目的とする標的組織や細胞のみに送達すること、といった手法を用いて、治療薬を必要としている部位に、必要な量を、必要な時に送達する

システムである。

DDS 研究では、これまで EPO の担体として高分子ポリマーがしばしば用いられてきた(Morlock, M. et al. 1997, Morlock, M. et al. 1998, Pistel, K. F. et al. 1999, Qiu, B. et al. 2003, Hahn, S. K. et al. 2006, Lin, X. et al. 2007)。しかし、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題がある。そこで、新たな担体としてハイドロキシアパタイト(HAp)に着目した。

HAp は多孔性であり、多様な物質を吸着・保持する性質を有することから、さまざまな物質の徐放性製剤の担体として利用されている(Guicheux, J. et al. 1997, Gautier, H. et al. 1998, Matsumoto, T. et al. 2004, Mizushima, Y. et al. 2006)。そこで、本研究では HAp を担体とした EPO 徐放性製剤の開発を試みた。

まず HAp が EPO 徐放性製剤の担体として有効であるか否かについて検討を行った。HAp を担体とした 5 種類の EPO 徐放性試料を調製し、健常マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行うことにより、EPO 単独投与より長い造血持続効果を有する試料を検索した。

次に、EPO 単独投与と比較して高い徐放効果が得られた試料について、腎性貧血モデル動物を用いて持続的貧血改善効果を有するか否かについて検討した。試料を腎性貧血モデルである ICGN (ICR-derived glomerulonephritis)マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行うことにより、EPO 単独投与より長い貧血改善効果が得られるか否かを検討した。同時に、EPO 徐放性試料の造血関連器官に対する影響を調べる目的で、試料投与後の肝臓、腎臓および脾臓の重量測定を行った。また、皮下投与部位の周囲組織に対する影響を調べる目的で、試料投与部位である皮下組織について病理組織学的検査を行った。

第 1 章

亜鉛含有ハイドロキシアパタイトからの EPO の持続的放出

緒 言

造血作用を有する EPO は主に腎臓で産生されるため、CKD 等による腎機能の低下に伴い高頻度で EPO 欠乏性の貧血を併発し、腎性貧血と言われている。この治療として rhEPO が静脈内又は皮下投与されており、これにより腎性貧血患者の quality of life (QOL)が大きく向上している。しかし、EPO は血中半減期が短く速やかに生体から消失するため、1 週間に 3 回の投与を繰り返す必要があり患者および医療現場にとって大きな負担となっている(Jacobs, C. et al. 2000)。ネコを主体とした獣医学の領域でも、rhEPO を用いた腎性貧血治療が実施されているが、同様に、頻回投与が必要とされているのが現状である。そこで、本研究では DDS の手法を用いて EPO 投与頻度を軽減できるシステムの開発を試みた。

DDS 研究では、これまで PLGA(Morlock, M. et al. 1997, Morlock, M. et al. 1998, Pistel, K. F. et al. 1999)、ポリエチレングリコール(Qiu, B. et al. 2003)、ヒアルロン酸(Hahn, S. K. et al. 2006)、ゼラチン(Lin, X. et al. 2007)などの高分子ポリマーが EPO の担体としてしばしば用いられてきた。しかし、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題がある。そこで、新たな担体として HAp に着目した。

HAp は多孔性であり、多様な物質を吸着・保持する性質を有することから、さまざまな物質の徐放性製剤の担体として利用されている(Guicheux, J. et al 1997, Gautier, H. et al. 1998, Matsumoto, T. et al. 2004, Mizushima, Y. et al. 2006)。そこで、本実験では Hap の EPO 徐放性製剤の担体としての有効性について検討を行った。スプレードライ法により調製した HAp を担体として、5 種類の EPO 徐放性試料を調製した。これらの試料を健常マウスに皮下投与し、投与から 1、3、8 および 14 日後に血液学的検査および

血漿中 EPO 濃度の測定を行うことにより、EPO 単独投与より長い造血持続効果を有する試料を検索した。

材料および方法

1. 供試動物

5 週齢の specific pathogen-free (SPF)雄 ICR マウスを日本エスエルシー株式会社から購入し、一般状態に異常のないことを確認した後、6 週齢にて当試験に使用した。供試動物はポリカーボネート製ケージに 5 匹ずつ収容し、室温 20~26℃、湿度 30~80 %、照明時間 12 時間/日(午前 8 時点灯、午後 8 時消灯)に設定した財団法人日本食品分析センター千歳研究所の飼育施設で飼育した。飼料(マウス・ラット・ハムスター用ガンマ線照射飼料 ; CRF-1, オリエンタル酵母工業株式会社)および飲料水(水道水)は自由摂取とした。

なお、本実験は財団法人日本食品分析センターの千歳研究所動物実験倫理規程および標準操作手順書に従って実施された。また、本実験は財団法人日本食品分析センター千歳研究所の動物実験倫理委員会の承認を経て実施された。

2. EPO 徐放性試料の調製

2.1 EPO 徐放性試料の種類

以下に示した 5 種類の EPO 徐放性試料を調製した(図-1)。

- Zinc-containing hydroxyapatite (Zn-HAp)を担体として EPO を吸着させたのみの試料(未処理試料)
- Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、zinc (Zn)処理を施した試料(Zn 処理試料)
- Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、Zn 処理および poly(lactic acid) (PLA)処理を施した試料(Zn/PLA 処理試料)

- Calcination (Cal, 焼結)後の Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、Zn 処理および PLA 処理を施した試料(Cal/Zn/PLA 処理試料)
- Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、PLA 処理を施した試料(PLA 処理試料)

2.2 担体の作製

スプレードライ法により、HAp($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) 中のカルシウムのうち約 0.5 %が Zn に置換された Zn-HAp ($\text{Ca}_{9.5}\text{Zn}_{0.5}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)を調製した。すなわち、6.8 g の塩化亜鉛を含有したリン酸溶液(0.15 M、1L)を水酸化カルシウム懸濁液(0.25 M、1L)に加えた後、噴霧乾燥器(B-290、Büchi)を用いて噴霧圧 0.56 MPa、入口温度 180°C、出口温度 70°C、流速 30 m³/h にて噴出し、多孔性の Zn-HAp を作製した。さらに、得られた Zn-HAp の一部を 400°C で 1 時間焼結した(Tonegawa, T. et al. 2007)。このようにして得られた Zn-HAp または焼結後の Zn-HAp を EPO の担体とした。

2.3 EPO の吸着

EPO (Pestka Biomedical Laboratories., Product No.: 11965-9)を 10 % phosphate-buffered saline (PBS)に溶解させ、EPO 50U に対して 1 mg の割合で担体を浸漬させた後、3,000 revolutions per minute (rpm)、10 分間の遠心分離した。その後、液層中に EPO が残存していないことを enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Human erythropoietin ELISA kit, Stemcell Technologies Inc.)法により確認し、実験に使用した。ELISA は、kit 添付の取り扱い説明書に従った。

なお、担体に吸着させる EPO の量は予備検討の結果から決定した。担体に各濃度の EPO を浸漬させ、液層に残存する EPO の量を ELISA 法にて測定したところ、担

体 1 mg は少なくとも 50 U の EPO を吸着した。このことから、担体 1 mg に吸着させる EPO の量は 50 U とした。

2.4 Zn 処理

製剤化処理として、得られた担体に Zn 処理を施した。2.3 項で得られた沈殿物に 2 mL の塩化亜鉛溶液(10 mg/mL、pH 5.5)を加え 3 分間分散させた後、2,000 x g、10 分間の遠心分離により液層を廃棄し、精製水およびエタノールを用いて洗浄した。洗浄後、2,000 x g、10 分間の遠心分離により液層を廃棄し、室温で乾燥させ、粉末とした。

2.5 PLA 処理

製剤化処理として、得られた担体に PLA 処理を施した。PLA 30 mg を 1 mL の塩化メチレン溶液に溶解させ、100 mg の担体/EPO 複合体を浸漬させた後、エバポレーター(Buchi)を用いて乾燥させた。

2.6 試料の粒子解析

調製した試料について、走査型電子顕微鏡(JEOL JSM5600LV)およびパーティクルアナライザ(Shimadzu、Salada-2000)を用いて粒子解析を行った。粒子の表面積は窒素ガスを用いた Brunauer-Emmett-Teller (BET)法により測定した。

3. EPO 徐放性試料の投与および血液検査

Zn-HAp に一度吸着したタンパクは、水中では脱着しないが生体内においては徐々に脱着することが報告されており、担体の分解に伴い吸着タンパクを徐々に放出する

ことが示唆されている(Nagao et al., 2006)。本実験においても、生理食塩液中における EPO 徐放性試料からの経時的な EPO 放出量を測定したが、ほとんど放出されなかった。予備検討として、500 U/body の EPO を Zn-HAp に吸着させてマウスに皮下投与したところ、造血効果の持続が認められた。そこで、本実験における EPO 投与量は 500 U/body とした。この投与量は臨床で使用される量の 8~40 倍程度である。

5 種類の EPO 徐放性試料を生理食塩液に懸濁させ、供試動物に 500 U/body の用量で背部に皮下投与した。また、rhEPO(エポジン、中外製薬)を単独で 500 U/body の用量で皮下投与し、非徐放系の対照とした。また、EPO を含有しない担体単独を皮下投与する群および生理食塩液のみを皮下投与する群も設定した(表-1)。

投与から 1、3、8 および 14 日後に、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下にて後大静脈より全採血を行い安楽殺した後、多項目自動血球計数装置(KX-21NV; シスメックス)を用いて赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。その後、2.3 項と同様に、ELISA 法を用いて血漿中 EPO 濃度を測定した。赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値については、投与 1 日後の値に対する投与 14 日後の値の割合(造血持続率、%)を算出し、造血持続効果の指標とした。

4. 器官重量測定

EPO 徐放性試料の造血関連器官に対する影響を調べる目的で、試料投与後の肝臓、腎臓および脾臓の重量測定を行った。未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料および EPO 単独投与群について、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で全採血を行い安楽殺した後、肝臓、腎臓および脾臓を摘出し、重量を測定した。

5. 病理組織学的検査

皮下投与部位の周囲組織に対する影響を調べる目的で、試料投与部位である皮下組織について病理組織学的検査を行った。未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料および EPO 単独投与群について、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で全採血を行い安楽殺した後、試料周囲の皮下組織を 10 %中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンブロックを作製後、ミクロトームを用いて薄切した。薄切片に hematoxylin-eosin (HA)染色を施し、病理組織標本を作製した後、光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を行った。

6. 統計学的解析

全てのデータは各群の平均値±標準偏差 (Mean±S.D.)で表した。EPO を投与した 6 群間(未処理試料投与群、Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群、PLA 処理試料投与群および EPO 単独投与群)において、分散分析法を用いて群間の比較を行った(有意水準 5%)。有意差が見られた場合は、Tukey の検定により、各々 2 群間の比較を行った(有意水準 5%)。統計学的解析はデータ分析ソフトウェア SPSS 11.0J for Windows (エス・ピー・エス・エス株式会社)を用いた。

結 果

1. EPO 徐放性試料の調製

スプレードライ法により調製した 100 粒子の Zn-HAp について走査型電子顕微鏡を用いて観察したところ、粒子の直径は 1~20 μm (平均: 5.2 μm)であった(図-2)。Zn-HAp 粒子の直径は 400°Cでの焼結後も変化は見られなかった。Zn-HAp 粒子の表面積を窒素ガスを用いた BET 法により測定したところ 168 m^2/g であったが、焼結後は加熱による結晶成長により 104 m^2/g 、PLA 処理後は表面のコーティングにより 68 m^2/g に減少した。担体に吸着した EPO の量を測定するために、EPO 吸着後の液層に残存している EPO 量を ELISA 法を用いて測定した。その結果、いずれの試料においても液層に残存している EPO の量は検出限界以下であった。このことから、添加した EPO はすべて担体に吸着したと考えられた。

2. 血液検査

EPO 徐放性試料の徐放効果を確認するために、EPO 単独投与群を対照として EPO 徐放性試料投与群の造血持続効果を比較した。投与後の血液学的検査結果(赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値)を図-3 および表-2 に示した。EPO 単独投与群では造血のピークは投与 3 日後に見られ、その後、経時的に減少した。未処理試料投与群では、投与後の血液学的値は EPO 単独投与群より低い値で推移した。一方、製剤化処理を施した EPO 徐放性試料投与群(Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群および PLA 処理試料投与群)では造血のピークが投与後 8 日に延長し、ピーク時の値が EPO 単独投与群と比較して高くなる傾向が見られ、ピーク後も EPO 単独投与群と比較して高い値で推移した。造血持続効果の指標として、投

与 1 日後の値に対する投与 14 日後の値の割合(造血持続率、%)を算出したところ、EPO 単独投与群では 110 %前後であったが、製剤化処理を施した EPO 徐放性試料投与群(Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群および PLA 処理試料投与群)では EPO 単独投与群より高い値が得られた。特に、Zn/PLA 処理試料投与群では 120 %を超える値が得られた(図-4)。

投与後の血漿中 EPO 濃度の推移を図-3 および表-2 に示した。EPO 単独投与群では投与 1 日後をピークとして投与 3 日後には大きく減少し、投与 8 日後以降は検出されなかった。血液学的検査結果と同様、未処理試料投与群では EPO の徐放効果は見られなかったが、製剤化処理を施した EPO 徐放性試料投与群(Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群および PLA 処理試料投与群)では投与 3 日後の血漿中 EPO 濃度は EPO 単独投与群と比較して高い値を示し、Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群では投与 8 日後まで血漿中 EPO が検出された。

3. 器官重量測定

EPO 徐放性試料の造血関連器官に対する影響を調べる目的で、未処理投与群、Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群について、投与後の肝臓、腎臓および脾臓の重量測定を行い、その結果を表-3 に示した。肝臓および腎臓では目立った変化は見られなかったが、脾臓では EPO を投与したいずれの群においても投与 3 日後に脾重量の増加が見られた。有意差は認められなかったが、脾重量の増加の度合いは Zn/PLA 処理試料投与群が低かった。

4. 病理組織学的検査

未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料および EPO 単独投与群について、試料

投与部位である皮下組織について病理組織学的検査を行った。いずれの担体も線維芽細胞の増生を伴う線維性被膜に覆われており、マクロファージの浸潤が見られたが、変性および壊死は認められなかった(図-5)。

考 察

血液幹細胞は前期赤芽球系前駆細胞(BFU-E)、後期赤芽球系造血前駆細胞(CFU-E)、赤芽球と分化し、網状赤血球を経て赤血球へと成熟する。EPO は、30~40 kDa の糖タンパクホルモンであり、BFU-E や CFU-E に作用し分化を促すことにより造血作用を示す(Krantz, S. B. 1991, Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004)。EPO の産生部位は腎臓の尿細管間質細胞であるため慢性腎疾患では EPO 欠乏性の貧血を併発し、腎性貧血とされている(Lacombe, C. et al. 1988, Krantz, S. B. 1991, Masuda, S. et al. 1994, Zhang, F. et al. 1996)。腎性貧血という病態は外因性の EPO を補充することにより症状が改善されることから、内因性の EPO が不足していることに起因していると考えられている。このため、腎性貧血の治療としては rhEPO が静脈内又は皮下投与されており高い治療効果を示している。しかし、貧血でない状態を維持するためには 1 週間に 3 回の投与を繰り返す必要があり、患者および医療現場の負担となっている(Jacobs, C. et al. 2000)。そこで、投与頻度軽減を実現する DDS の手法を用いた新しい EPO 治療方法の開発が期待されている。

DDS 研究においては、これまで生分解性の高分子ポリマーが担体としてしばしば用いられてきた。PLGA は成長ホルモン(Cleland, J. L. et al. 1997, Johnson, O. L. et al. 1997, Takada, S. et al. 2003, Yamagata, Y. et al. 2003)、インスリン(Yamaguchi, Y. et al. 2002)の徐放システムの担体としての実績を有している。PLGA のコポリマーは EPO の担体としても実績があり、*in vitro* では 2 週間から 1 ヶ月程度 EPO を放出することが確認されている(Morlock, M. et al. 1997, Morlock, M. et al. 1998, Pistel, K. F. et al. 1999)。*In vivo* ではポリエチレングリコールを用いたコポリマーを担体とした場合、2 週間造血効果が得られている(Qiu, B. et al. 2003)。天然由来の高分子ポリマーも EPO の担体として

利用されておりヒアルロン酸ハイドロゲルやゼラチンハイドロゲルを担体とした場合、1~4週間程度の期間、*in vivo*にてEPOが徐放されている(Hahn, S. K. et al. 2006, Lin, X. et al. 2007)。しかし、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題を有している。そこで、EPO徐放性製剤の新たな担体としてHApに着目した。

HApは歯や骨の構成成分の一つであり生体適合性の高いことから、バイオマテリアルとして多く利用されている(Lawton, D. M. et al. 1989, Laschke, M. W. et al. 2007, Sudo, A. et al. 2008)。また、多孔性であり、多様な物質を吸着・保持する性質を有することから、抗生物質(Shinto, Y. et al. 1992, Kim, H. W. et al. 2004, Chai, F. et al. 2007, Sudo, A. et al. 2008)、抗ガン剤(Yamamura, K. et al. 1994, Itokazu, M. et al. 1998)、タンパク製剤(Guicheux, J. et al. 1997, Gautier, H. et al. 1998, Matsumoto, T. et al. 2004, Mizushima, Y. et al. 2006)などの徐放性製剤の担体として利用されている。HApは生体内で徐々に分解する性質を有するが(Nagao, T. et al. 2006)、その分解速度は焼結温度により調整できることが知られている(Patel, N. et al. 2001, Mizushima, Y. et al. 2006, Wang, A. J. et al. 2008)。Mizushimaらは、注射針を通過できる大きさのHAp微粒子を用いてタンパクの徐放に成功しており、400℃で焼結したHAp微粒子は*in vivo*にて徐々に分解されること、HApに吸着させたタンパクは*in vivo*にて徐放できることが確認されている(Mizushima, Y. et al. 2006)。さらに、NagaoらによりHAp中のカルシウムの一部をZnに置換することによりタンパク吸着量が増大すること、一度吸着すると水中では放出しないが生体内では徐々に放出すること、HAp表面をPLAでコーティングすることにより徐放期間を延長することができることが明らかとなった(Nagao, T. et al. 2006)。しかし、HApの有するEPO徐放効果についてはまだ知られていない。よって、本実験ではHApがEPO徐放能を有するか否かについて検討した。

本実験では HAp をスプレードライ法により調製した。スプレードライ法により 60 m²/g 以上の表面積を有する HAp 微粒子を調製することができる(Patel, N. et al. 2001, Wang, A. J. et al. 2008)。Zn-HAp または 400°C で焼結した Zn-HAp を担体として、5 種類の EPO 含有 HAp 試料(未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Cal/Zn/PLA 処理試料、PLA 処理試料)を調製した。これらの試料について、*in vitro* にて EPO 徐放効果を検討したところ、EPO はほとんど放出されなかった。詳細なメカニズムは解明されていないが、HAp に吸着したタンパクは水中では放出されないが生体内では徐々に放出されることが知られており(Nagao, T. et al. 2006)、本実験でも同様の事象が発生したと考えられた。

そこで *in vitro* にて実験を行った。5 種類の EPO 含有 HAp 試料を、健常マウスに皮下投与し、投与後の造血持続効果を検討した。その結果、対照の EPO 単独投与群では造血のピークは投与 3 日後に見られ、その後、徐々に減少した。未処理試料投与群では EPO 単独投与群より低い値で推移した。よって、未処理試料では高い EPO 徐放効果は期待できないと考えられた。一方、製剤化処理を施した EPO 含有 HAp 試料(Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Cal/Zn/PLA 処理試料、PLA 処理試料)では造血のピークは投与 8 日後に延長し、ピーク時の値が EPO 単独投与群と比較して高くなり、ピーク後(投与 14 日後)も EPO 単独投与群と比較して高くなる傾向が認められた。造血持続効果の指標として、投与 1 日後の値に対する投与 14 日後の値の割合(造血持続率、%)を算出したところ、EPO 単独投与群では 110 %前後であったが、製剤化処理を施した EPO 徐放性試料投与群(Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群および PLA 処理試料投与群)では EPO 単独投与群より高い値が得られた。特に、Zn/PLA 処理試料投与群では 120 %を超える値が得られた。血漿中 EPO 濃度は EPO 単独投与群では投与 1 日後にピークが見られ、投与 3 日には大きく減少し、投与

8日以降は検出されなかった。しかし、Zn 処理試料投与群では検出期間が延長し、投与 8 日後まで血漿中 EPO が検出された。また、Zn/PLA 処理試料投与群では同様に投与 8 日後まで血漿中 EPO が検出されたのに加え、投与 1 日後の値が大きく減少し、初期過剰放出軽減効果が見られた。これらのことから、製剤化処理を施した EPO 徐放性試料投与群では EPO の徐放が成功したと考えられた。

EPO を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、脾臓において赤脾髄の拡張や脾臓重量の増加を伴う髄外造血像が見られることが知られている (Vogel, J. et al. 2003)。本実験でも EPO 単独投与群、未処理試料投与群、Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群で投与 3 日後の脾臓重量が大きくなり、同様の事象が発生したと考えられた。しかし、Zn/PLA 処理試料投与群における投与 3 日後の脾臓重量の増加の度合いはその他の群と比較して少なくなる傾向が見られた。これは、初期過剰放出軽減効果により、放出される EPO の量が少なくなったことによると考えられた。

未処理試料投与群、Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群のいずれにおいても、投与 14 日後まで背部皮下に担体が残存していたが、担体周囲に見られた組織反応は線維性被膜による被包化やマクロファージの浸潤といった異物処理反応が主体であったが見られた。

以上のことから、Zn-HAp は製剤化処理を施すことにより、EPO を持続的に放出する担体となり得ると考えられた。また、担体の生体適合性は高いことが確認された。造血持続効果が延長したこと、血漿中 EPO の検出期間が延長したことから、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料の効果がより高いと考えられた。本実験では、若例の健康マウスを用いたが、外因性の EPO による貧血改善効果を示すためには、腎性貧血モデル動物を用いたさらなる検討が必要である。

小 括

Zn-HAp が EPO 徐放性試料の担体として有効であるか否かについて検討を行った。

Zn-HAp を担体とした 5 種類の EPO 徐放性試料(未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Ca/Zn/PLA 処理試料および PLA 処理試料)を調製し、500 U/body の用量で ICR マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行った。

その結果、未処理試料投与群では投与後の血液学的パラメータは EPO 単独投与群より低い値で推移したことから、EPO 徐放効果は低いと考えられた。一方、製剤化処理を施した試料(Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Ca/Zn/PLA 処理試料および PLA 処理試料)では EPO 単独投与群と比較して造血のピークが投与 3 日後から 8 日後に延長し、ピーク時の血液学的パラメータも高くなる傾向が見られた。また、Zn 処理試料投与群および血漿中 EPO 濃度 Zn/PLA 処理試料投与群では血漿中 EPO 濃度が検出される期間が延長した。試料周囲の病理組織学的検査では、投与 14 日後まで背部皮下に担体が残存していたものの、担体周囲に見られた組織反応は異物処理反応が主体であったことから生体適合性は高いと考えられた。

以上のことから、Zn-HAp は Zn 処理または PLA 処理といった製剤化処理を施すことにより EPO を持続的に放出する担体となり得ると考えられた。中でも、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料の効果がより高いと考えられた。

図および表

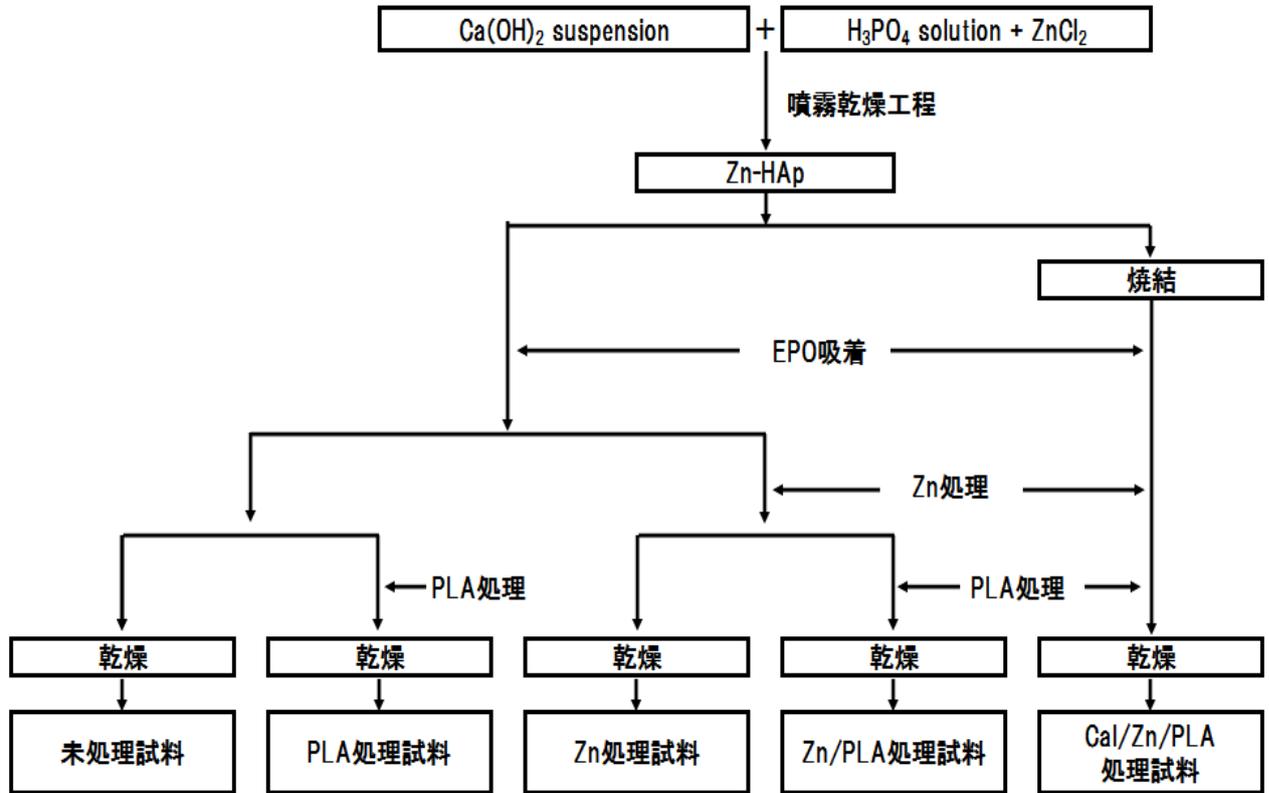


図-1 EPO 含有 HAp 試料の調製

スプレードライ法により得られた Zn-HAp または焼結後の Zn-HAp を EPO の担体とし、担体 1 mg に対して 50U の EPO を吸着させた。EPO 吸着後、製剤化処理として Zn 処理または PLA 処理を施した。

表-1 試驗設定

群	EPO投与量	投与経路	週齡	n			
				day 1	day 3	day 8	day 14
未処理試料投与群	500 U/body	皮下	6	3	3	3	2
Zn処理試料投与群	500 U/body	皮下	6	3	3	3	3
Zn/PLA処理試料投与群	500 U/body	皮下	6	2	6	6	6
Gal/Zn/PLA処理試料投与群	500 U/body	皮下	6	2	3	3	3
PLA処理試料投与群	500 U/body	皮下	6	2	3	3	3
EPO单独投与群	500 U/body	皮下	6	3	3	3	5
担体单独投与群	0 U/body	皮下	6	3	3	3	3
生理食塩液投与群	0 U/body	皮下	6	3	3	3	3

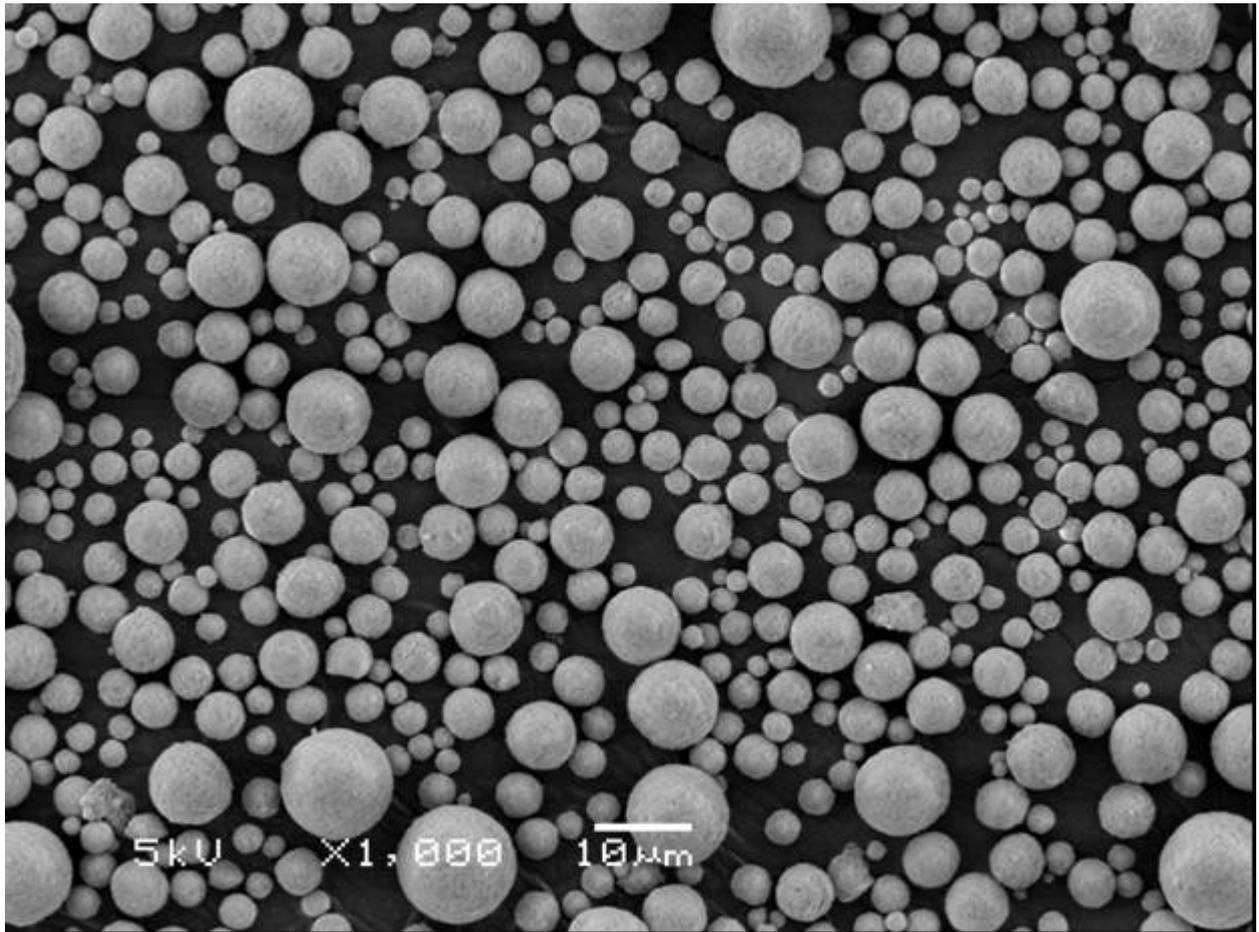


図-2 Zn-HAp の走査型電子顕微鏡写真

粒子の直径は 1~20 μm (平均 : 5.2 μm)であった。粒子の直径は 400°Cでの焼結後も変化は見られなかった。

エラー!

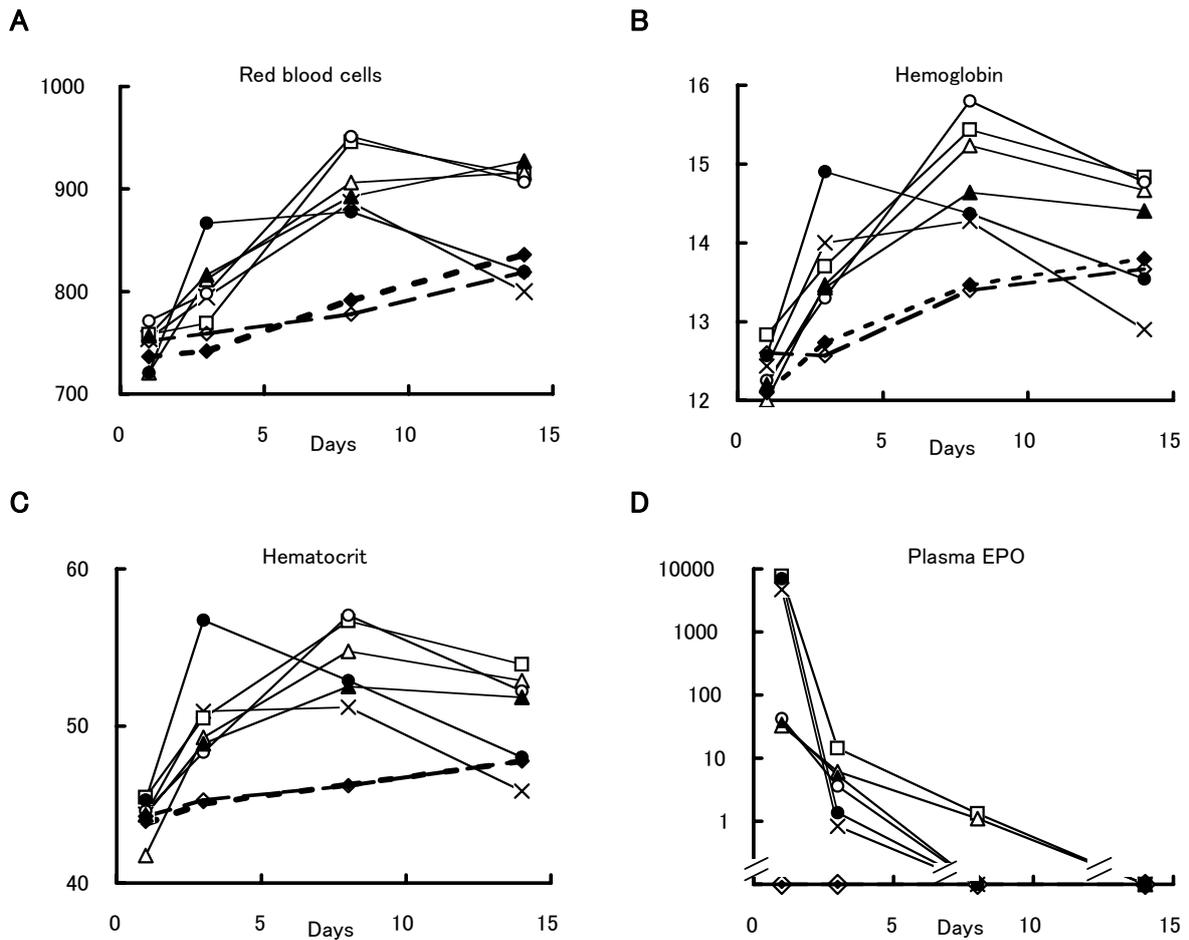


図-3 EPO 徐放性試料投与後の正常マウスの血液検査結果

赤血球数(A)、ヘモグロビン濃度(B)、ヘマトクリット値(C)および血漿中 EPO 濃度(D)を示す。×; 未処理試料投与群、□; Zn 処理試料投与群、△; Zn/PLA 処理試料投与群、○; Cal/Zn/PLA 処理試料投与群、▲; PLA 処理試料投与群、●; EPO 単独投与群、◇; 担体単独投与群、◆; 生理食塩液投与群。Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群では EPO 徐放効果が見られた。

表-2 投与後の血液検査結果

群	投与試料	Days	Red blood cells ($10^4/\mu\text{L}$)	Hemoglobin (g/dL)	Hematocrit (%)	Plasma EPO (mU/mL)
1	未処理試料	1	754±32	12.4±0.3	44.4±1.2	4686.4±1434.7
		3	795±15	14.0±0.4	50.9±1.8	0.8±0.4
		8	887±29	14.3±0.1	51.2±0.4	ND
		14	800±14	12.9±0.4 *2, 3, 4	45.9±2.1 *2	ND
2	Zn処理試料	1	758±49	12.8±0.8	45.5±2.7	7632.7±948.0
		3	769±37	13.7±0.6	50.5±3.1 *6	14.5±15.5
		8	946±64	15.4±0.4	56.7±1.5	1.3±0.6
		14	914±64	14.8±0.8 *1	53.9±3.4 *1	ND
3	Zn/PLA処理試料	1	721±21	12.0±0.1	41.8±0.9	33.0±9.8
		3	812±34	13.5±0.5 *6	49.3±1.8 *6	6.1±4.3
		8	906±67	15.2±1.1	54.8±4.1	1.1±1.3
		14	916±52 *6	14.7±0.8 *1	52.9±3.6	ND
4	Cal/Zn/PLA処理試料	1	772±33	12.3±0.2	44.6±1.7	42.0±5.7
		3	798±6	13.3±0.4 *6	48.3±1.0 *6	3.6±1.4
		8	951±76	15.8±0.7	57.0±3.4	ND
		14	907±73	14.8±0.5 *1	52.2±2.6	ND
5	PLA処理試料	1	757±20	12.2±0.3	44.4±0.8	37.1±25.3
		3	816±55	13.4±0.6 *6	48.9±3.2 *6	5.4±7.4
		8	893±45	14.6±0.9	52.5±3.4	ND
		14	927±42	14.4±0.3	51.8±1.1	ND
6	EPO単独	1	721±26	12.6±0.1	45.3±1.3	6977.3±1236.7
		3	867±68	14.9±0.5 *3, 4, 5	56.7±2.1 *2, 3, 4, 5	1.4±0.9
		8	878±7	14.4±0.3	52.9±0.9	ND
		14	820±26 *3	13.5±0.5	48.0±1.8	ND
7	担体単独	1	752±48	12.6±1.0	44.3±2.7	ND
		3	759±31	12.6±0.7	45.3±2.6	ND
		8	778±14	13.4±0.2	46.2±0.5	ND
		14	819±2	13.7±0.3	47.8±0.5	ND
8	生理食塩液	1	737±50	12.1±0.4	43.8±2.0	ND
		3	742±38	12.7±0.3	45.1±1.1	ND
		8	792±9	13.5±0.3	46.3±0.7	ND
		14	836±27	13.8±0.4	47.8±1.1	ND

平均値±標準偏差で示した。ND: 検出せず。有意差が見られた群を、*にて示した。

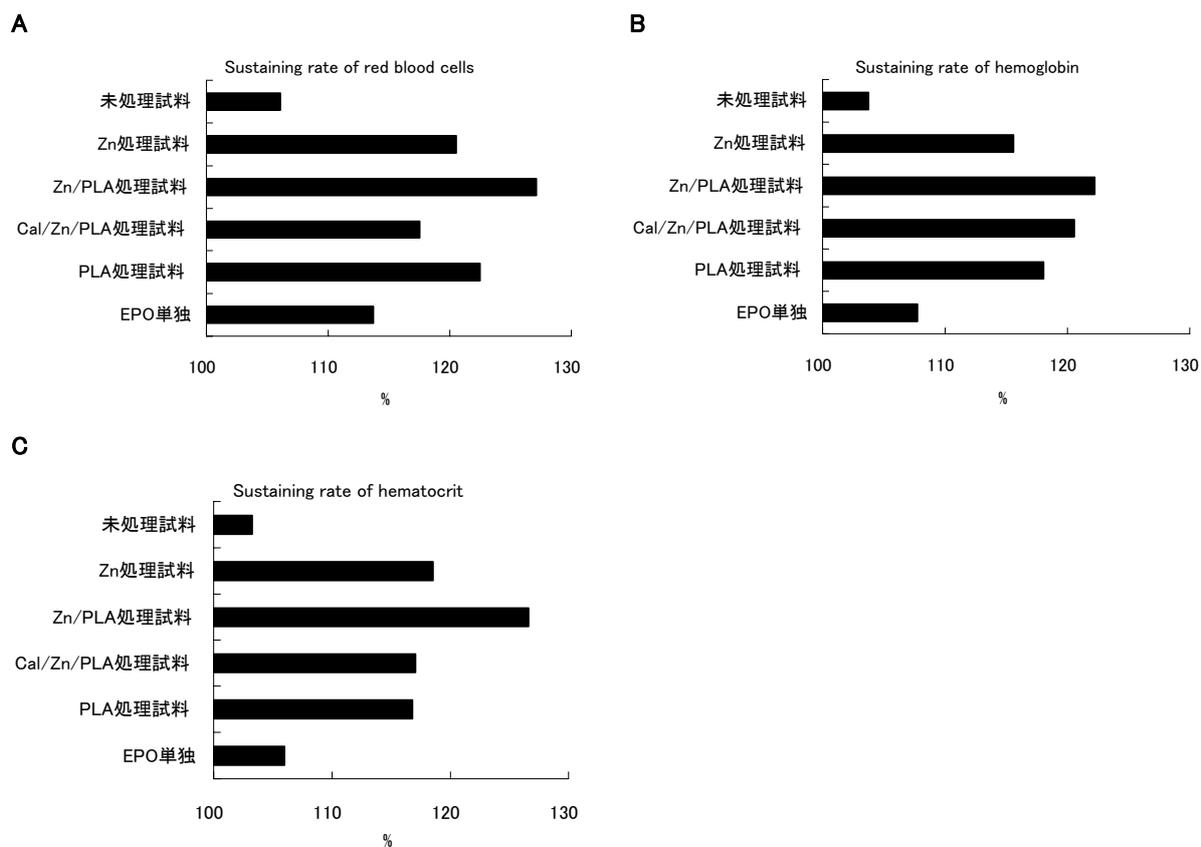


図-4 造血持続率

投与1日後の値に対する投与14日後の値の割合(造血持続率、%)を算出した。赤血球数(A)、ヘモグロビン濃度(B)およびヘマトクリット値(C)を示す。Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群、Cal/Zn/PLA 処理試料投与群および PLA 処理試料投与群では EPO 単独投与群より高い値が得られた。

表-3 器官重量

群	Days	Liver (mg)	Kidneys (mg)	Spleen (mg)
未処理試料投与群	1	2267±153	527±65	161± 25
	3	2271±352	545±77	383± 93
	8	2379±282	564±66	160± 16
	14	2486±231	509±60	138± 15
Zn処理試料投与群	1	2122±308	512±24	218± 73
	3	2175±261	536±89	369±102
	8	2402± 19	563±82	168± 36
	14	2217± 71	583± 1	133± 17
Zn/PLA処理試料投与群	1	2183±183	548± 4	155± 44
	3	2305± 62	558±54	290± 36
	8	1983± 79	534±28	169± 60
	14	2024±256	524±93	124± 11
EPO単独投与群	1	2626±303	548±81	233± 29
	3	2242±161	484±48	377± 46
	8	2155±281	499±76	116± 13
	14	2031±173	526± 7	132± 19
担体単独投与群	1	2120±237	480±36	118± 12
	3	2128± 50	450±31	147± 9
	8	2257±178	537±75	124± 16
	14	2184±330	543±61	129± 10
生理食塩液投与群	1	1982±266	482±64	120± 12
	3	2058±299	490±19	133± 12
	8	2110± 39	543±47	116± 12
	14	2228±141	507±23	123± 20

平均値±標準偏差で示した。

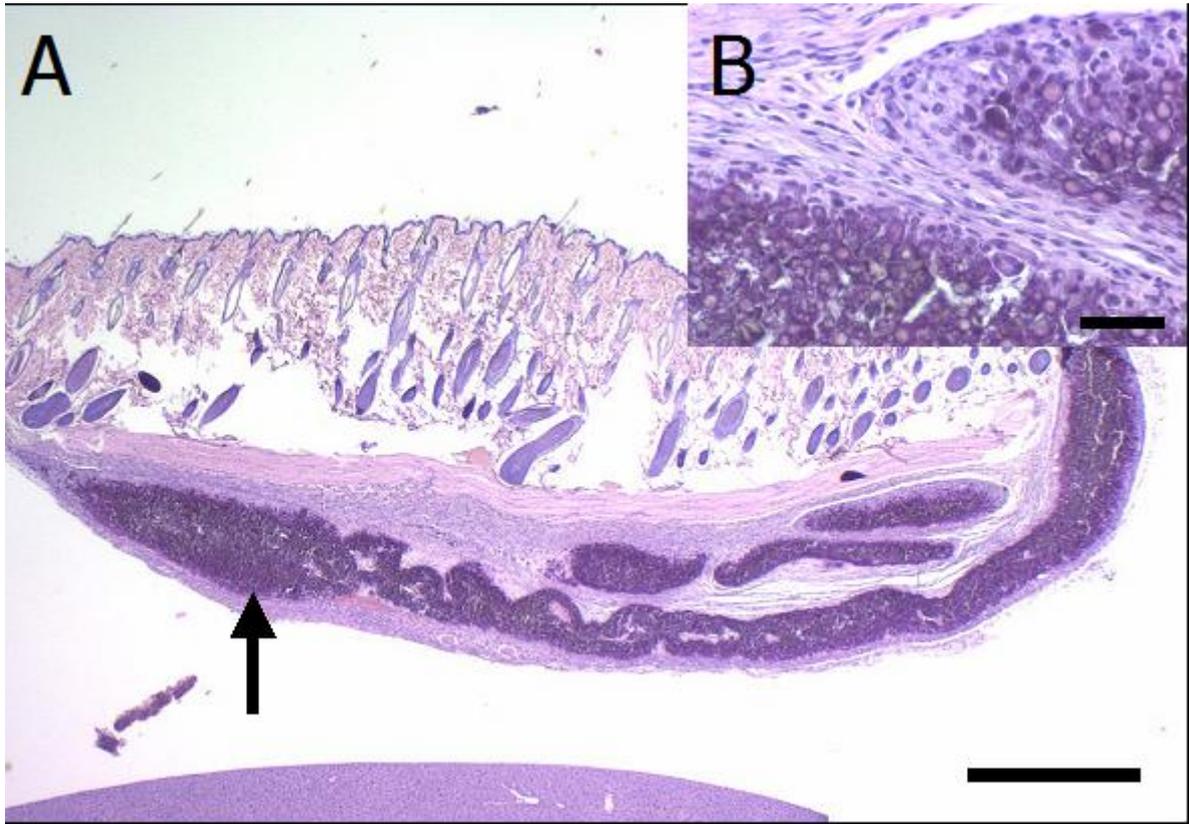


図-5 Zn/PLA 処理試料周囲の組織像(投与 14 日後)

投与 14 日後においても担体(矢印)は背部皮下に残存していた。バーは 1 mm を示す(A)。担体は線維芽細胞の増生を伴う線維性被膜に覆われており、マクロファージの浸潤が見られたが、変性および壊死は認められなかった。バーは 50 μm を示す(B)。

第 2 章

腎性貧血モデルマウスを用いた EPO 徐放性試料の
持続的な貧血改善効果の検討

緒 言

腎性貧血は高頻度で慢性腎疾患を併発することが知られている(Lacombe, C. et al. 1988, Krantz, S. B. 1991, Masuda, S. et al. 1994, Zhang, F. et al. 1996)。腎性貧血の治療として rhEPO が静脈内又は皮下投与されており大きな治療効果を示しているが、1 週間に 3 回の投与を繰り返す必要があり、患者および医療現場の大きな負担となっている。この問題を解決するために、2 週間程度血中 EPO が維持できるような EPO 徐放システムの開発が期待されている(Morlock, M. et al. 1998)。そこで、HAp を担体とした EPO 徐放性製剤の開発を試みた。

第 1 章の結果より、Zn-HAp は製剤化処理を施すことにより EPO を持続的に放出する担体となり得ると考えられた。本実験では、EPO 徐放効果がより高いと考えられた 2 試料(Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料)について、持続的な貧血改善効果を有するか否かについて検討を行った。腎性貧血モデル動物として ICGN マウスを用いた。ICGN マウスは ICR 系マウス突然変異体由来の腎炎モデル動物であり、加齢とともにタンパク尿、低タンパク血症、高脂血症、全身性浮腫および腎性貧血の症状が認められる(Ogura, A. et al. 1989, Mizuno, S. et al. 1999, Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004)。ICGN マウスでは病態が進行すると正球性・正色素性貧血を呈することが判明しており、これはヒトの腎性貧血の病態と近似している(Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004)。Zn 処理試料または Zn/PLA 処理試料を腎性貧血モデルとしての ICGN マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行うことにより、EPO 単独投与より長い貧血改善効果を有する試料を検索した。

材料および方法

1. 供試動物

ICGN マウス (SPF) を独立行政法人医薬基盤研究所実験動物研究資源バンク(大阪府茨木市)より購入し、過去の報告(Yamaguchi-Yamada et al. 2004, Miyamoto et al. 2005)に従って腎性貧血モデルマウスを作製した。すなわち、雄の ICGN マウスと雌の ICR マウス(SPF、日本エスエルシー株式会社)を交配させて F1 世代を得た後、さらに雄の ICGN マウスと雌の F1 マウスを交配させて F2 マウスを得た。雄の F2 マウスから採尿した尿について、尿検査紙(Bayer Medical)を用いて尿中タンパクを測定し、高タンパク尿(尿中タンパク > 1000 mg/dL)を呈するマウスを腎性貧血モデルマウスとした。また、低タンパク尿マウス(尿中タンパク < 30 mg/dL)を対照とした。マウスは第 1 章に記載した飼育条件にて飼育を行った。

なお、本実験は財団法人日本食品分析センターの千歳研究所動物実験倫理規程および標準操作手順書に従って実施された。また、本実験は財団法人日本食品分析センター千歳研究所の動物実験倫理委員会の承認を経て実施された。

2. 貧血の確認

高タンパク尿マウス(11~28 週齢、n=5)および低タンパク尿マウス(11~15 週齢、n=5)について、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下にて後大静脈より全採血を行い安楽殺した後、多項目自動血球計数装置(KX-21NV; シスメックス)を用いて赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。その後、第 1 章と同様に、ELISA 法を用いて血漿中 EPO 濃度を測定した。また、ブレッヒャーニューメチレンブルー (Muto Pure Chemicals CO., LTD.)染色による血液塗抹標本を作製し、光学顕微鏡を用い

て網状赤血球数を測定した。

3. EPO 徐放性試料の調製

以下に示した 2 種類の EPO 徐放性試料を調製した。調製方法は、第 1 章に記載した。

- ・ Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、Zn 処理を施した試料(Zn 処理試料)
- ・ Zn-HAp を担体として EPO を吸着させた後、Zn 処理および PLA 処理を施した試料(Zn/PLA 処理試料)

4. EPO 徐放性試料の投与および血液検査

2 種類の EPO 徐放性試料を生理食塩液に懸濁させ、腎性貧血モデルマウスに 500 U/body の用量で背部に皮下投与した。また、rhEPO(エポジン、中外製薬)を単独で 500 U/body の用量で皮下投与し、非徐放系の対照とした。また、EPO を含有しない担体単独を皮下投与する群および生理食塩液のみを皮下投与する群も設定した。

投与前ならびに投与から 7、14 および 21 日後に、ジエチルエーテルによる吸入麻酔下にて後大静脈より全採血を行い安楽殺した後、多項目自動血球計数装置(KX-21NV; シスメックス)を用いて赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。その後、第 1 章と同様に ELISA 法を用いて血漿中 EPO 濃度を測定した。赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値については、投与前の値に対する投与 21 日後の値の割合(造血持続率、%)を算出し、貧血改善効果の指標とした。また、ブレッヒャーニューメチレンブルー(Muto Pure Chemicals CO., LTD.)染色による血液塗抹標本を作製し、光学顕微鏡を用いて網状赤血球数を測定した。

5. 器官重量測定

EPO 徐放性試料の造血関連器官に対する影響を調べる目的で、試料投与後の肝臓、腎臓および脾臓の重量測定を行った。ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で全採血を行い安楽殺した後、肝臓、腎臓および脾臓を摘出し、重量を測定した。

6. 病理組織学的検査

皮下投与部位の周囲組織に対する影響を調べる目的で、試料投与部位である皮下組織について病理組織学的検査を行った。ジエチルエーテルによる吸入麻酔下で全採血後、試料周囲の皮下組織を 10 % 中性緩衝ホルマリン中で固定し、パラフィンブロックを作製後、ミクロトームを用いて薄切した。薄切片に HA 染色を施し、病理組織標本を作製した後、光学顕微鏡を用いて病理組織学的検査を行った。

7. 統計学的解析

全てのデータは各群の平均値±標準偏差 (Mean±S.D.)で表した。EPO を投与した 3 群間(Zn 処理試料投与群、Zn/PLA 処理試料投与群および EPO 単独投与群)において、分散分析法を用いて群間の比較を行った(有意水準 5 %)。有意差が見られた場合は、Tukey の検定により、各々 2 群間の比較を行った(有意水準 5 %)。統計学的解析はデータ分析ソフトウェア SPSS 11.0J for Windows (エス・ピー・エス・エス株式会社)を用いた。

結 果

1. 高タンパク尿マウスと低タンパク尿マウスの比較

高タンパク尿マウスが腎性貧血モデルとして適しているか否かを確認した。高タンパク尿マウスと低タンパク尿マウスの血液学的パラメータの比較を図-6に示した。高タンパク尿マウスの血液学的パラメータ（赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値）は低タンパク尿マウスと比較して20%程度低値を示した。血漿中EPO濃度は、いずれのマウスでも検出限界以下であった。このことから、高タンパク尿マウスは腎性貧血モデルとして適していると考えられた。

2. EPO徐放性試料投与後の血液検査

EPO徐放性試料の持続的な貧血改善効果を確認するために、EPO単独投与群を対照として、EPO徐放性試料投与群の血液学的検査を行った。試料投与後の血液学的パラメータの経時変化を図-7および表-4に示した。EPO単独投与群では投与前から投与7および14日後とほぼ同様の値で推移し、投与21日後にやや低下した。一方、EPO徐放性試料投与群では、投与7、14および21日後に有意な貧血改善効果が認められた。特にZn処理試料の効果が大きかった ($P<0.05$)。貧血改善効果の指標として、投与前の値に対する投与21日後の値の割合(造血持続率、%)を算出したところ、EPO単独投与群では100%より低い値となったが、EPO徐放性試料投与群では110%を超える値が得られた(図-8)。また、血漿中EPO濃度の経時的推移を測定したところ、EPO単独投与群ではいずれの期間においても血漿中EPOは検出されなかったが、Zn/PLA処理試料投与群では投与7日後まで、Zn処理試料投与群では投与14日後まで血漿中EPOが検出された(表-4)。

網状赤血球数の赤血球数に対する比率の経時変化を確認したところ、EPO 徐放性試料投与群では経時的に減少した(表-4)。これは貧血が改善されていることを示唆するものである。一方、EPO 単独投与群では投与 14 日後までは減少したが、投与 21 日後には再度上昇した(表-4)。これは再度貧血状態に陥ったと考えられた。

各群の投与後の体重変化を表-5 に示した。EPO 徐放性試料投与群では体重減少は見られなかったが、EPO 単独投与群では投与 14 日以降体重減少が認められた。

3. 器官重量測定

EPO 徐放性試料投与による造血関連器官に対する影響をより詳細に調べるために、投与後の肝臓、腎臓および脾臓の重量測定を行った。いずれの器官も有意差は認められなかったが、投与 7 日後における EPO 徐放性試料投与群の脾臓重量は、EPO 単独投与群と比較して重くなる傾向が見られた(図-9)。これは、脾臓における髄外造血に起因すると考えられた。

4. 病理組織学的検査

試料投与部位である皮下組織について病理組織学的検査を行った。投与 21 日後まで、いずれの担体も線維芽細胞の増生を伴う線維性被膜に覆われており、マクロファージの浸潤が見られたが、変性および壊死は認められなかった(図-10)。

考 察

我が国の慢性腎疾患の患者数は増え続けており、275,000 人以上が透析治療を受けており、毎年 1 万人ずつ増加している。赤血球数の増加に関わる EPO は主として腎臓の尿細管間質細胞で産生されるため慢性腎疾患では高頻度で貧血を併発し、腎性貧血と言われている(Lacombe, C. et al. 1988, Krantz, S. B. 1991, Masuda, S. et al. 1994, Zhang, F. et al. 1996)。腎性貧血のみならず、がんやリウマチといった様々な原因による貧血において、rhEPO が静脈内投与または皮下投与されており高い治療効果を示している(Hahn, S. K. et al. 2006)。しかし、適切な血中 EPO 濃度を維持するためには 1 週間に 3 回の投与が必要である(Jacobs, C. et al. 2000)。この問題を解決するために、2 週間程度血中 EPO が維持できるような EPO 徐放システムの開発が期待されている(Morlock, M. et al. 1998)。

これまで、EPO の徐放性製剤の担体としては生分解性の高分子ポリマー(Morlock, M. et al. 1998, Qiu, B. et al. 2003, Geng, Y. et al. 2008)や天然由来の高分子ポリマー(Hahn, S. K. et al. 2006, Motokawa, K. et al. 2006, Ito, Y. et al. 2007, Lin, X. et al. 2007)が用いられてきたが、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題を有している。そこで、生体適合性が高く、徐放性製剤の担体としての実績を有する HAp (Lawton, D. M. et al. 1989, Shinto, Y. et al. 1992, Yamamura, K. et al. 1994, Guicheux, J. et al. 1997, Gautier, H. et al. 1998, Itokazu, M. et al. 1998, Kim, H. W. et al. 2004, Matsumoto, T. et al. 2004, Mizushima, Y. et al. 2006, Chai, F. et al. 2007, Laschke, M. W. et al. 2007, Sudo, A. et al. 2008)を担体とした EPO 徐放性試料の開発を試みた。第 1 章では、5 種類の EPO 徐放性試料(未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Ca/Zn/PLA 処理試料および PLA 処理試料)を調製した。こ

のうち、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Ca/Zn/PLA 処理試料および PLA 処理試料では EPO 単独で投与した場合と比較して EPO 徐放効果が示唆された。すなわち、投与後の造血のピークが遅延し、ピーク後も血液学的データは高い値で推移した。なかでも Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群では血漿中 EPO 濃度が検出される期間の延長が見られた。よって、本実験では、EPO 含有 HAp 試料が持続的な貧血治療効果を有するか否かについて、腎性貧血モデル動物を用いて検討を行った。

ICGN マウスは ICR 系マウス突然変異体由来の腎炎モデル動物であり、加齢とともにタンパク尿、低タンパク血症、高脂血症、全身性浮腫および腎性貧血の症状が認められる(Ogura, A. et al. 1989, Mizuno, S. et al. 1999, Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004)。ICGN マウスは病態の進行にともない様々な段階の糸球体病変（糸球体基底膜の肥厚、糸球体足突起消失やメサンギウム細胞の増殖をともなわないメサンギウム領域の拡張など）を呈し、病態末期においては尿細管拡張、尿細管間質部病変が認められる(Ogura, A. et al. 1989, 1994 and 1995, Uchio, K. et al. 2000)。この原因遺伝子は *tensin 2* であることが明らかとなっている(Cho, A. R. et al. 2006)。ICGN マウスでは病態が進行すると正球性・正色素性貧血を呈することが分かっており、これはヒトの腎性貧血の病態と一致している(Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004)。また、ICGN マウスは腎性貧血モデルとしての使用実績があり、rhEPO の皮下投与により ICGN マウスの貧血が改善されたという報告がある(Yamaguchi-Yamada, M. et al. 2004, Miyamoto, Y. et al. 2005)。以上のことから、ICGN マウスは薬物投与、瀉血、腎臓摘出などによる腎性貧血モデルと比較して、より適切な腎性貧血モデルであると考えられた。

本実験では、第 1 章で EPO 徐放効果が高いと考えられた Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料について、持続的な貧血改善効果を有するか否かについて検討を行った。その結果、EPO 単独投与群の血液学的パラメータは投与 14 日後まではほぼ変化が見ら

れず、投与 21 日後には低下傾向が見られた。第 1 章の結果では EPO 単独投与群における造血のピークは投与 3 日後であったことから、投与 7 日後にはピークを終えて投与前の状態に戻っていると考えられた。一方、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料投与群では投与後の血液学的パラメータのピークは投与 7 日後に見られ、その後徐々に減弱していったが、投与 21 日後においても EPO 単独投与群と比較して有意に高い値を維持していた。血漿中 EPO は EPO 単独投与群では投与 7 日以降いずれも検出されなかったが、Zn/PLA 処理試料投与群では投与 7 日後まで、Zn 処理試料投与群では投与 14 日後まで検出された。器官重量測定では第 1 章と同様、髄外造血に起因すると考えられる脾臓重量の増加が投与 7 日に見られた。これは EPO 含有 HAp 試料投与群にのみ見られ、EPO 単独投与群では見られなかった。また、病理組織学的検査では第 1 章と同様、EPO 含有 HAp 試料の高い生体適合性が確認できたが、投与 21 日後においても背部皮下に担体が残存していた。HAp 微粒子は、*in vivo* にて徐々に分解されることが知られているが(Mizushima, Y. et al. 2006)、長期間残存した場合の影響や担体の排泄メカニズムについてのさらなる検討が必要である。

以上のことから、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料は持続的な貧血改善効果を有すると考えられた。

小 括

Zn-HAp を担体とした EPO 徐放性試料(Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料)が持続的な貧血改善効果を有するか否かについて検討を行った。

Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料を調製し、腎性貧血モデルとしての ICGN マウスに 500 U/body の用量で皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行った。

その結果、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料では EPO 単独投与群と比較して血液学的パラメータが投与 7 日後から 21 日後まで有意に高い値で推移した。また、EPO 単独投与群では血漿中 EPO 濃度は投与 7 日後にはすでに検出限界以下となったが、Zn/PLA 処理試料投与群では投与 7 日後まで、Zn 処理試料投与群では投与 14 日後まで検出された。試料周囲の病理組織学的検査では、投与 21 日後まで背部皮下に担体が残存していたものの、生体適合性が高いことが確認できた。

以上のことから、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料は持続的な貧血改善効果を有すると考えられた。

図および表

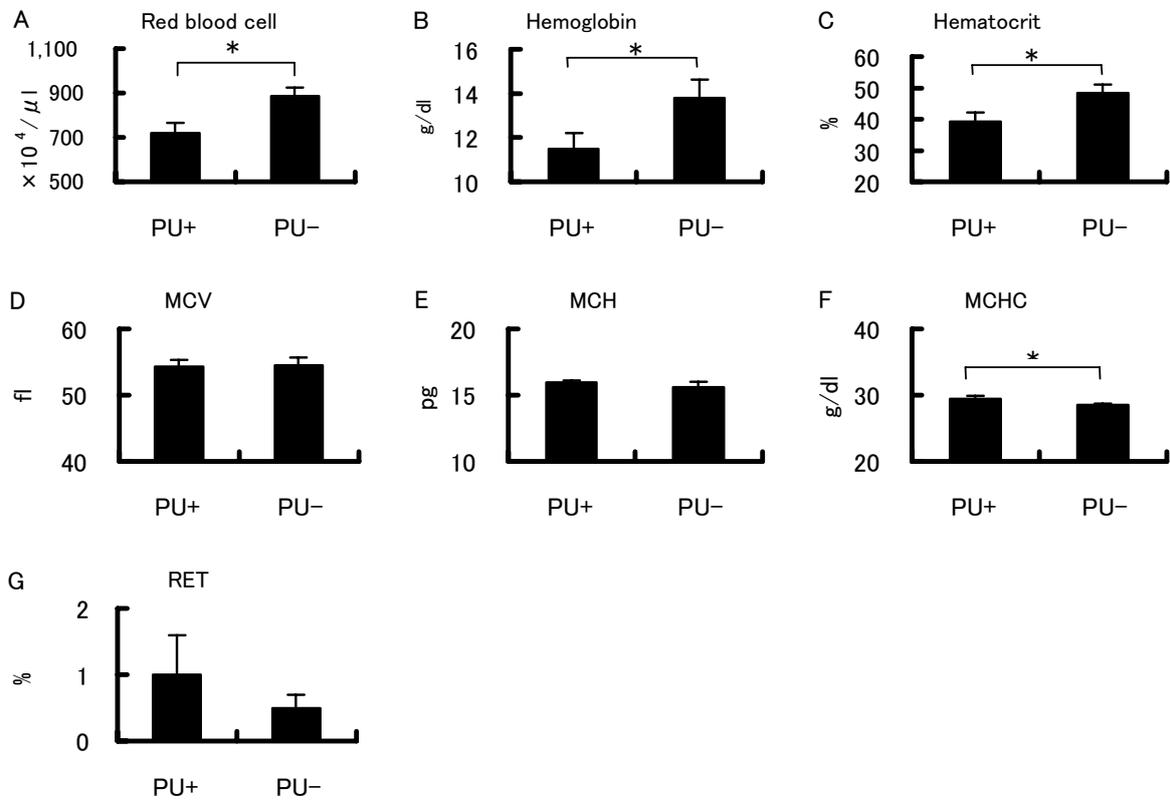


図-6 高タンパク尿マウスと低タンパク尿マウスの血液検査結果の比較

赤血球数(A)、ヘモグロビン濃度(B)、ヘマトクリット値(C)、平均赤血球容積 (MCV, mean corpuscular volume) (D)、平均赤血球血色素量 (MCH, mean corpuscular hemoglobin) (E)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration) (F)、網状赤血球 (RET, reticulocyte) (G)を示す。低タンパク尿マウス(PU-)と比較して、高タンパク尿マウス(PU+)では赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値が 20 %程度低値を示した。*で示した項目は 2 群間で有意差が見られたことを示す(p<0.05)。

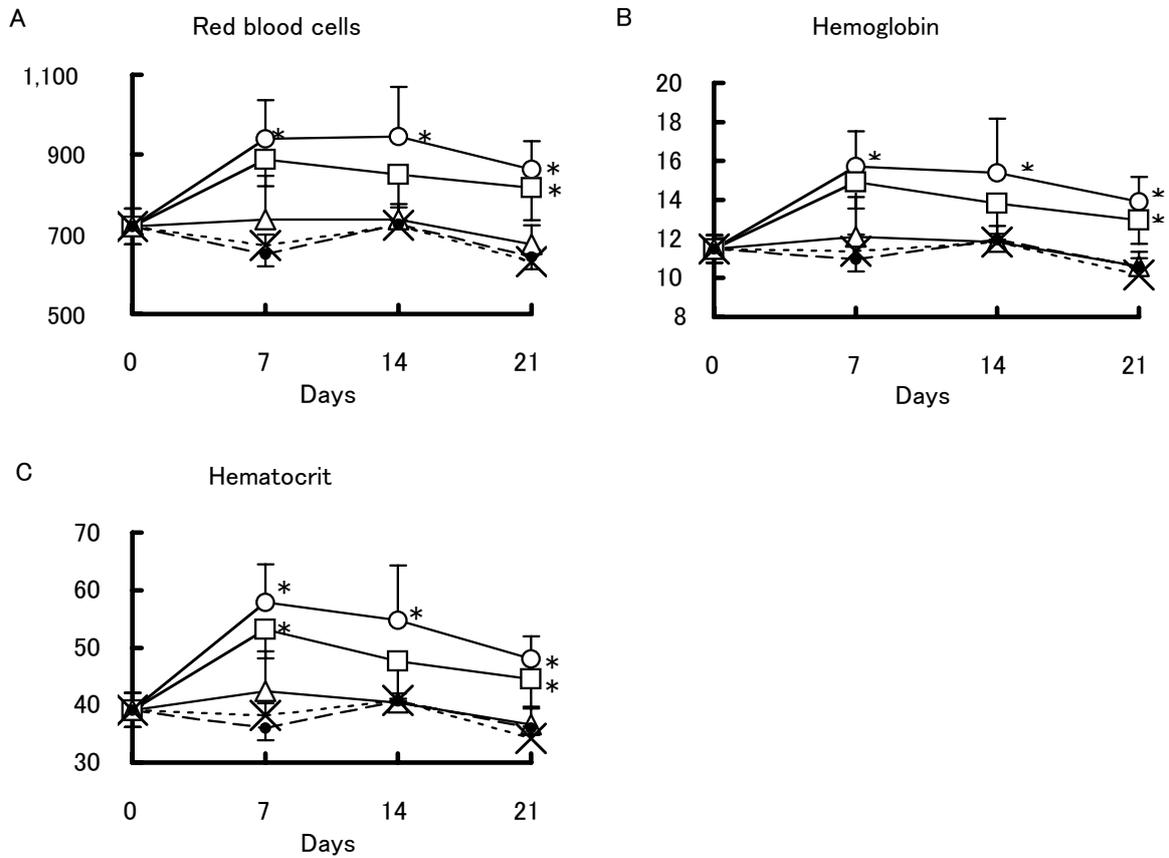


図-7 EPO 徐放性試料投与後の腎性貧血モデルマウスの経時的血液検査結果

赤血球数(A)、ヘモグロビン濃度(B)およびヘマトクリット値(C)を示す。○; Zn 処理試料投与群、□; Zn/PLA 処理試料投与群、△; Epo 単独投与、●; 担体単独投与群、×; 生理食塩液投与群。Zn 処理試料投与群および Zn/PLA 処理試料投与群では投与 21 日後まで貧血改善効果が見られた。*で示した項目は Epo 単独投与と比較して有意差が見られたことを示す(p<0.05)。

表-4 投与後の血液検査結果

投与試料	Days	n	Week age	WBC ($\times 10^2/m^3$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	Plasma rhEPO (mU/mL)	RET (%)
Zn処理試料	7	5		96±49	61.5±3.0	16.7±0.9	27.2±0.6*	1.4±0.9	3.6±1.9
	14	5	15±8	99±39	57.7±2.8	16.2±0.9	28.1±0.4*	0.3±0.3	0.8±0.6
	21	5		98±13	55.6±1.0	16.1±0.4	28.9±0.5	ND	0.3±0.4*
Zn/PLA処理試料	7	5		85±49	59.9±1.8	16.8±0.5	28.1±0.6	0.5±0.7	3.8±3.4
	14	5	13±4	89±21	56.0±1.5	16.2±0.5	29.0±0.6	ND	0.9±0.5
	21	5		72±36	54.5±2.0	15.9±0.4	29.2±0.7	ND	0.6±0.3*
EPO単独	7	5		65±23	57.5±1.7	16.4±0.6	28.6±0.8	ND	2.9±2.5
	14	5	14±7	60±12	55.0±1.3	16.1±0.6	29.3±0.9	ND	1.1±0.2
	21	5		72±13	54.3±1.5	15.7±0.7	29.0±1.4	ND	2.7±0.9
担体単独	7	3		73±9	55.3±0.8	16.9±0.4	30.4±0.3	ND	0.4±0.1
	14	3	13±2	65±29	56.2±0.6	16.5±0.1	29.3±0.1	ND	0.6±0.1
	21	3		110±44	56.0±0.8	16.4±0.2	29.3±0.1	ND	0.7±0.2
生理食塩液	7	3		62±15	56.9±3.0	16.9±0.6	29.8±0.6	ND	0.3±0.1
	14	3	13±1	52±24	56.4±1.2	16.4±0.2	29.0±0.3	ND	0.6±0.1
	21	3		91±47	54.1±1.6	16.1±0.8	29.7±0.7	ND	0.8±0.1

平均値±標準偏差で示した。*で示した項目はEpo単独投与と比較して有意差が見られたことを示す(p<0.05)。ND: 検出せず。

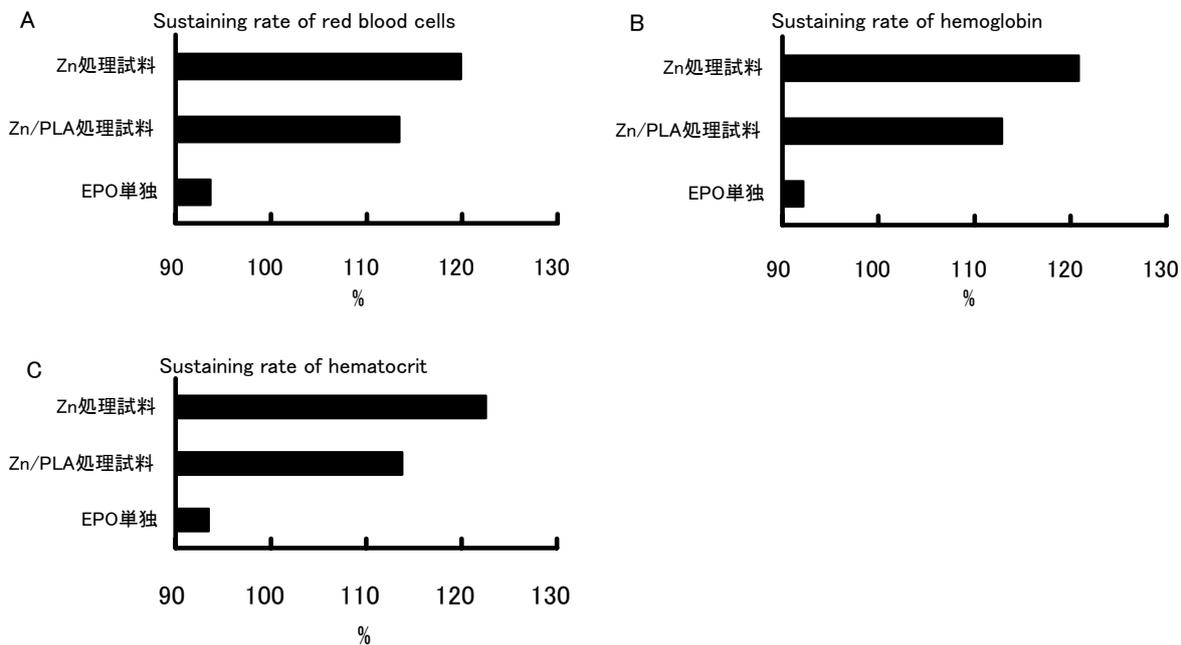


図-8 造血持続率

投与前の値に対する投与 21 日後の値の割合(造血持続率、%)を算出した。赤血球数(A)、ヘモグロビン濃度(B)およびヘマトクリット値(C)を示す。EPO 単独投与群では 100 %より低い値となったが、EPO 徐放性試料投与群では 110 %を超える値が得られた。

表-5 投与後の体重推移

投与試料	Day 0 (g)	Day 7 (g)	Day 14 (g)	Day 21 (g)
Zn処理試料	31.2±5.1 (n=15)	32.3±4.7 (n=15)	32.4±5.8 (n=10)	34.3±3.2 (n=5)
Zn/PLA処理試料	30.8±3.4 (n=15)	32.0±3.6 (n=15)	33.3±2.9 (n=10)	34.4±1.5 (n=5)
EPO単独	30.7±5.0 (n=15)	31.3±5.9 (n=15)	31.0±4.2 (n=10)	30.2±3.2 (n=5)
担体単独	29.4±3.1 (n=9)	29.8±2.9 (n=9)	28.9±3.2 (n=6)	30.3±3.8 (n=3)
生理食塩液	29.5±2.9 (n=9)	30.0±2.7 (n=9)	29.8±3.0 (n=6)	30.1±1.6 (n=3)

平均値±標準偏差で示した。

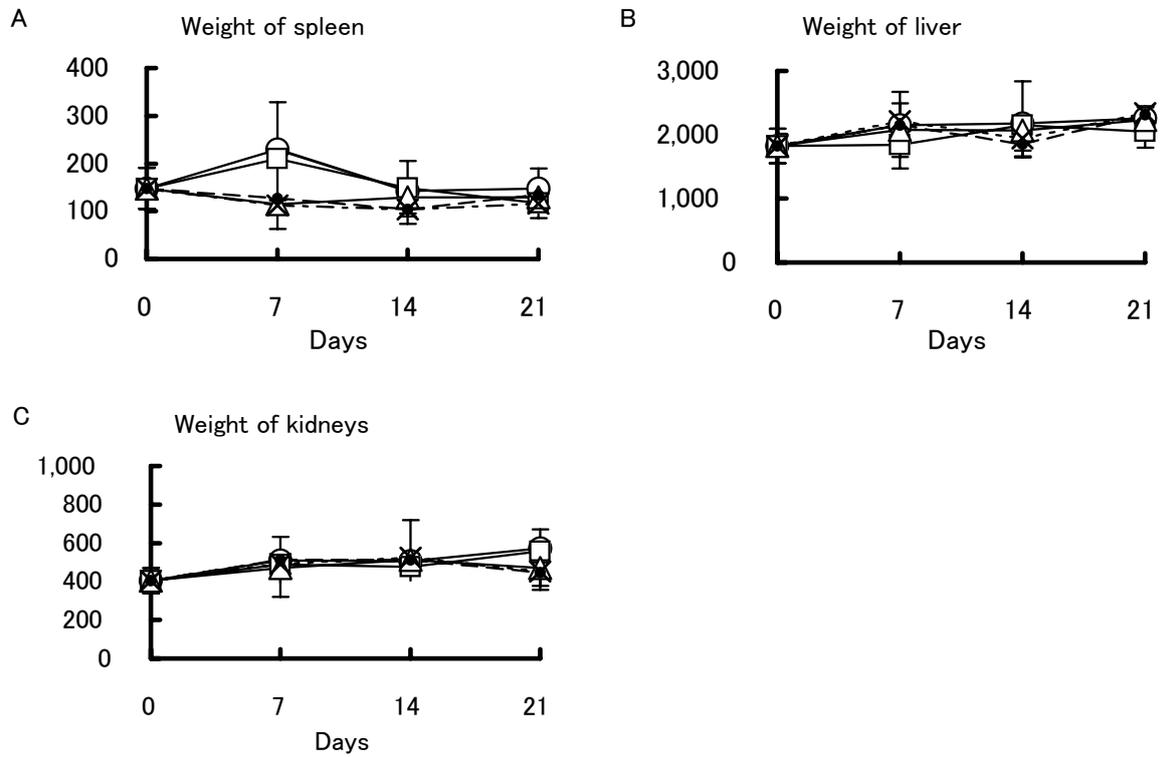


図-9 器官重量

○; Zn 処理試料投与群、□; Zn/PLA 処理試料投与群、△; Epo 単独投与、●; 担体単独投与群、×; 生理食塩液投与群。投与 7 日後における EPO 徐放性試料投与群の脾臓重量は、EPO 単独投与群と比較して重くなる傾向が見られた。

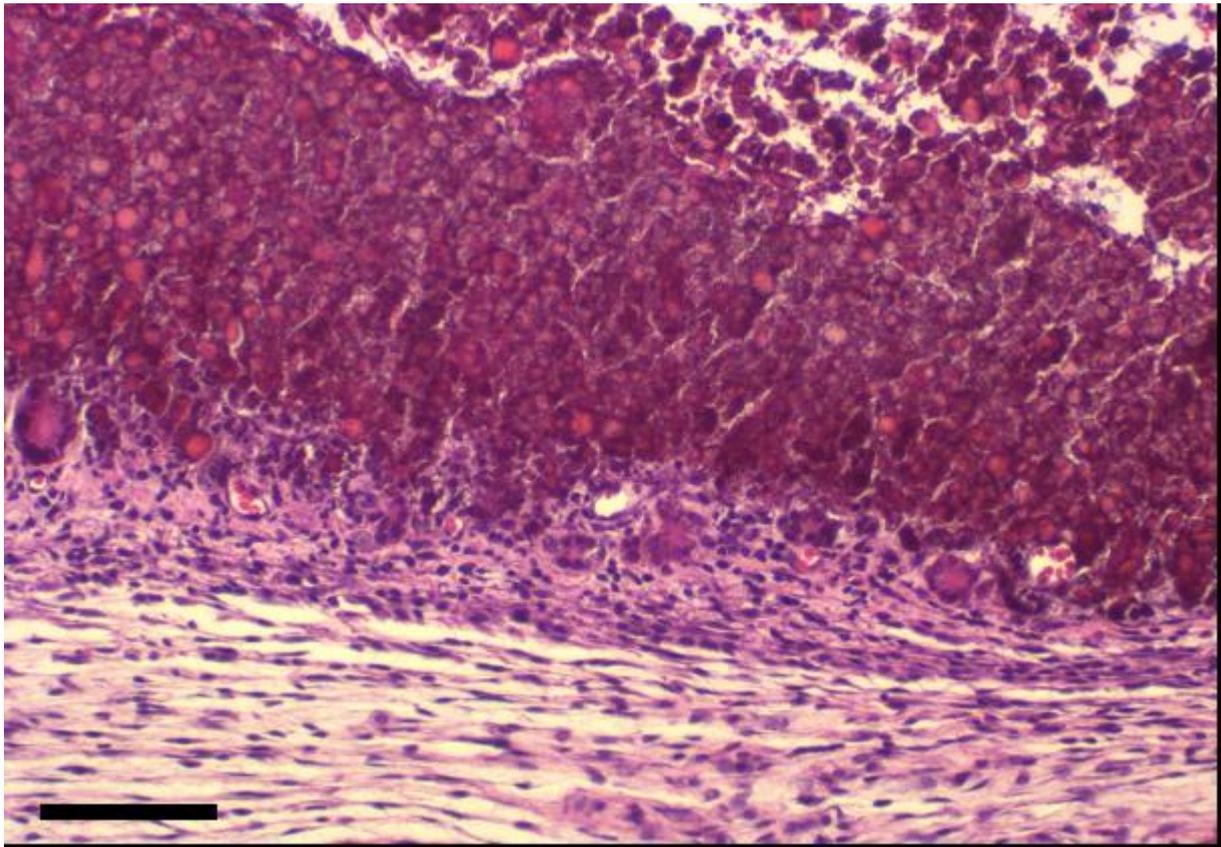


図-10 Zn 処理試料周囲の組織像(投与 21 日後)

投与 21 日後においても担体は背部皮下に残存していた。担体は線維芽細胞の増生を伴う線維性被膜に覆われており、マクロファージの浸潤が見られたが、変性および壊死は認められなかった。バーは 100 μm を示す。

総 括

我が国の慢性腎疾患の患者数は毎年 1 万人ずつ増加している。造血作用を有する EPO は主に腎臓で産生されるため慢性腎疾患では高頻度で EPO 欠乏性の貧血を併発し、腎性貧血と言われている。腎性貧血のみならず、ガンやリウマチといった様々な原因による貧血において rhEPO が静脈内投与または皮下投与されており高い治療効果を示している(Hahn, S. K. et al. 2006)。しかし、貧血でない状態を維持するためには 1 週間に 3 回の投与を繰り返す必要があり、患者のみならず医療現場にとっても大きな負担となっている(Jacobs, C. et al. 2000)。このことから DDS の手法を用いた投与頻度を軽減できるシステムの開発が期待されている。

DDS 研究では、これまで PLGA(Morlock, M. et al. 1997, Morlock, M. et al. 1998, Pistel, K. F. et al. 1999)、ポリエチレングリコール(Qiu, B. et al. 2003)、ヒアルロン酸(Hahn, S. K. et al. 2006)、ゼラチン(Lin, X. et al. 2007)などの高分子ポリマーが EPO の担体としてしばしば用いられてきた。しかし、これらの方法はタンパクの失活や変性、担体の起炎性や分解、担体が含有できるタンパク量が少ないことなどの問題がある。そこで、新たな担体として DDS における担体として実績を有する HAp に着目した。

まず HAp が EPO 徐放性製剤の担体として有効であるか否かについて検討を行った。HAp を担体とした 5 種類の EPO 徐放性試料(未処理試料、Zn 処理試料、Zn/PLA 処理試料、Ca/Zn/PLA 処理試料、PLA 処理試料)を調製し、健常マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行った。その結果、Zn-HAp は Zn 処理や PLA 処理といった製剤化処理を施すことにより EPO を持続的に放出する担体となり得ることが明らかとなった。中でも Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料の効果が高かった。

そこで、これら 2 試料について腎性貧血モデル動物を用いて持続的貧血改善効果を有するか否かについて検討した。試料を腎性貧血モデルとしての ICGN マウスに皮下投与後、経時的に血液学的検査および血漿中 EPO 濃度の測定を行った。その結果、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料は EPO 単独投与と比較して持続的な貧血改善効果が認められた。担体周囲組織の病理組織学的検査では、担体試料周囲に見られる組織反応は異物処理反応が主体であり、炎症性の反応は見られなかった。

以上のことから、Zn 処理試料および Zn/PLA 処理試料は貧血治療における EPO 投与頻度の軽減に寄与できる可能性があると考えられた。ただし、投与 21 日後においても背部皮下に担体が残存していたことから、長期間残存した場合の影響や担体の排泄メカニズムについてのさらなる検討が必要である。また、HAp 微粒子は、*in vivo* にて徐々に分解されることが知られており (Mizushima, Y. et al. 2006)、HAp 含有能と分解時間を考慮した上で最適な HAp の直径を検討することも必要である。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、多大な御指導、御鞭撻を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座実験動物学教室 安居院高志 教授に深謝いたします。

また、本論文のご校閲を賜りました北海道大学大学院獣医学研究科比較形態機能学講座薬理学教室 伊藤茂男 教授、北海道大学大学院獣医学研究科診断治療学講座獣医内科学教室 滝口満喜 教授ならびに北海道大学大学院獣医学研究科動物疾病制御学講座実験動物学教室 佐々木宣哉 准教授に心より御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、多くの助言と励ましを頂きました独立行政法人物質・材料研究機構生体材料センター 生駒俊之さま、財団法人日本食品分析センター 佐藤秀隆 理事、財団法人日本食品分析センター千歳研究所 勝田真一さまをはじめとする安全性試験部の皆様、ならびに財団法人日本食品分析センター千歳研究所の服部秀樹さまをはじめとする動物飼育管理部門の皆様に心から感謝いたします。

最後に、本研究を支えた多くの動物達に哀悼の意を表し、深く感謝いたします。

参考文献

1. Chai, F., Hornez, J. C., Blanchemain, N., Neut, C., Descamps, M. and Hildebrand, H. F. 2007. Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics. *Biomol. Eng.* 24: 510-514.
2. Cho, A. R., Uchio-Yamada, K., Torigai, T., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Matsuda, J., Kurosawa, T., Kon, Y., Asano, A., Sasaki, N. and Agui, T. 2006. Deficiency of the *tensin2* gene in the ICGN mouse: an animal model for congenital nephrotic syndrome. *Mamm Genome.* 17: 407-416.2.
3. Cleland, J. L., Johnson, O. L., Putney, S. and Jones, A. J. S. 1997. Recombinant human growth hormone poly(lactic-co-glycolic acid) microsphere formulation development. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 28: 71-84.
4. Gautier, H., Guicheux, J., Grimandi, G., Faivre-Chauvet, A., Daculsi, G. and Merle, C. 1998. In vitro influence of apatite-granule-specific area on human growth hormone loading and release. *J. Biomed. Mater. Res.* 40: 606-613.
5. Geng, Y., Yuan, W., Wu, F., Chen, J., He, M. and Jin, T. 2008. Formulating erythropoietin-loaded sustained-release PLGA microspheres without protein aggregation. *J. Control. Release* 130: 259-265.
6. Guicheux, J., Grimandi, G., Trécant, M., Faivre, A., Takahashi, S. and Daculsi, G. 1997. Apatite as carrier for growth hormone: in vitro characterization of loading and release. *J. Biomed. Mater. Res.* 34: 165-170.
7. Hahn, S. K., Oh, E. J., Miyamoto, H. and Shimobouji, T. 2006. Sustained release formulation of erythropoietin using hyaluronic acid hydrogels crosslinked by Michael

- addition. *Int. J. Pharm.* 322: 44-51
8. Ito, Y., Shiroyama, K., Yoshimitsu, J., Ohashi, Y., Sugioka, N. and Takada, K. 2007. Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies following percutaneous absorption of erythropoietin micropiles to rats. *J. Control. Release* 121: 176-180.8.
 9. Itokazu, M., Sugiyama, T., Ohno, T., Wada, E. and Katagiri, Y. 1998. Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents. *J. Biomed. Mater. Res.* 39: 536-538.
 10. Jacobs, C., Hörl, W. H., Macdougall, I. C., Valderrábano, F., Parrondo, I., Abraham, I. L. and Segner, A. 2000. European best practice guidelines 9-13: anaemia management. *Nephrol. Dial. Transplant.* 15 : 33-42.
 11. Johnson, O. L., Jaworowicz, W., Cleland, J. L., Bailey, L., Charnis, M., Duenas, E., Wu, C., Shepard, D., Magil, S., Last, T., Jones, A. J. S. and Putney, S. D. 1997. The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres. *Pharm. Res.* 14: 730-735.
 12. Kim, H. W., Knowles, J. C. and Kim, H. E. 2004. Development of hydroxyapatite bone scaffold for controlled drug release via poly(epsilon-caprolactone) and hydroxyapatite hybrid coatings. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 70: 240-249.
 13. Krantz, S. B. 1991. Erythropoietin. *Blood* 77: 419-434
 14. Laschke, M. W., Witt, K., Pohlemann, T. and Menger, M. D. 2007. Injectable nanocrystalline hydroxyapatite paste for bone substitution: in vivo analysis of biocompatibility and vascularization. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 82: 494-505.
 15. Lacombe, C., Da Silva, J. L., Bruneval, P., Fournier, J. G., Wendling, F., Casadevall, N.,

- Camilleri, J. P., Bariety, J., Varet, B. and Tambourin, P. 1988. Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney. *J. Clin. Invest.* 81: 620-623.
16. Lawton, D. M., Lamaletie, M. D. J. and Gardner, D. L. 1989. Biocompatibility of hydroxyapatite ceramic: response of chondrocytes in a test system using low temperature scanning electron microscopy. *J. Dent.* 17: 21-27.
17. Lin, X., Fujita, M., Kanemitsu, N., Kimura, Y., Tambara, K., Premaratne, G. U., Nagasawa, A., Ikeda, T., Tabata, Y. and Komeda, M. 2007. Sustained-release erythropoietin ameliorates cardiac function in infarcted rat-heart without inducing polycythemia. *Circ. J.* 71:132-137.
18. Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M. and Ssaki, R. 1994. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J. Biol. Chem.* 269: 19488-19493.
19. Matsumoto, T., Okazaki, M., Inoue, M., Yamaguchi, S., Kusunose, T., Toyonaga, T., Hamada, Y. and Takahashi, J. 2004. Hydroxyapatite particles as a controlled release carrier of protein. *Biomaterials* 25: 3807-3812.
20. Miyamoto, Y., Kuramitsu-Miyamoto, K., Iwanaga, E., Uchio-Yamada, K., Yamaguchi-Yamada, M., Ogura, A. and Manabe, N. 2005. Effect of human erythropoietin (hEPO) treatment on anemia in ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice. *Exp Anim.* 54: 181-184.
21. Mizuno, S., Mizuno-Horikawa, Y., Yue, B. F., Okamoto, M. and Kurosawa, T. 1999. Nephrotic mice (ICGN strain): a model of diffuse mesangial sclerosis in infantile nephrotic syndrome. *Am J Nephrol.* 19: 73-82.
22. Mizushima, Y., Ikoma, T., Tanaka, J., Hoshi, K., Ishihara, T., Ogawa, Y. and Ueno, A.

2006. Injectable porous hydroxyapatite microparticles as a new carrier for protein and lipophilic drugs. *J. Control. Release* 110: 260-265.
23. Morlock, M., Kissel, T., Li, Y. X., Koll, H. and Winter, G. Erythropoietin loaded microspheres prepared from biodegradable LPLG-PEO-LPLG triblock copolymers: protein stabilization and in-vitro release properties. 1998. *J. Control. Release* 56: 105-115.
24. Morlock, M., Koll, H., Winter, G. and Kissel, T. 1997. Microencapsulation of rh-erythropoietin, using biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide): protein stability and the effects of stabilizing excipients. *Eur. j. Pharm. Biopharm.* 43: 29-36.
25. Motokawa, K., Hahn, S. K., Nakamura, T., Miyamoto, H. and Shimoboji, T. 2006. Selectively crosslinked hyaluronic acid hydrogels for sustained release formulation of erythropoietin. *J. Biomed. Mater. Res. A* 78: 459-465.22.
26. Nagao, T. and Goto, M. 2006 *Yakuzaigaku* 66: 139-142 (in Japanese).
27. Ogura, A., Asano, T., Matsuda, J., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Takano, K. and Nakagawa, M. 1989 Development of nephrotic ICGN mice: the origin, reproductive ability, and incidence of glomerulonephritis. *Exp. Anim.* 38: 349-352.
28. Ogura, A., Asano, T., Matsuda, J., Takano, K., Nakagawa, M. and Fukui, M. 1989. Characteristics of mutant mice (ICGN) with spontaneous renal lesions: a new model for human nephrotic syndrome. *Lab Anim.* 23: 169-174.
29. Ogura, A., Asano, T., Suzuki, O., Yamamoto, Y., Noguchi, Y., Kawaguchi, H. and Yamaguchi, Y. 1994. Hereditary nephrotic syndrome with progression to renal failure in a mouse model (ICGN strain): clinical study. *Nephron* 68: 239-244.
30. Ogura, A., Fujimura, H. Asano, T. Koura, M., Naito, I. and Kobayashi, Y. 1995. Early

- ultrastructural glomerular alteration in neonatal nephrotic mice (ICGN strain). *Vet. Pathol.* 32: 321-323.
31. Patel, N., Gibson, I. R., Ke, S., Best, S. M. and Bonfield, W. 2001. Calcining influence on the powder properties of hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12: 181-188.
 32. Pistel, K. F., Bittner, B., Koll, H., Winter, G. and Kissel, T. 1999. Biodegradable recombinant human erythropoietin loaded microspheres prepared from linear and star-branched block copolymers: influence of encapsulation technique and polymer composition on particle characteristics. *J. Control. Release* 59: 309-325.
 33. Qiu, B., Stefanos, S., Ma, J., Lalloo, A., Perry, B. A., Leibowitz, M. J., Sinko, P. J. and Stein, S. 2003. A hydrogel prepared by in situ cross-linking of a thiol-containing poly(ethylene glycol)-based copolymer: a new biomaterial for protein drug delivery. *Biomaterials* 24: 11-18.
 34. Shinto, Y., Uchida, A., Korkusuz, F., Araki, N. and Ono, K. 1992. Calcium hydroxyapatite ceramic used as a delivery system for antibiotics. *J. Bone Joint Surg. Br.* 74: 600-604.
 35. Sudo, A., Hasegawa, M., Fukuda, A. and Uchida, A. 2008. Treatment of infected hip arthroplasty with antibiotic-impregnated calcium hydroxyapatite. *J. Arthroplasty.* 23: 145-150.
 36. Takada, S., Yamagata, Y., Misaki, M., Taira, K. and Kurokawa, T. 2003. Sustained release of human growth hormone from microcapsules prepared by a solvent evaporation technique. *J. Control. Release* 88: 229-242.
 37. Tonegawa, T., Ikoma, T., Chen, G. and Tanaka, J. 2007. Synthesis and characterization of metal ions containing hydroxyapatite microparticles with high specific surface area. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 7: 1-5.

38. Uchio, K., Manabe, N., Tamura, K., Miyamoto, M., Ogura, A., Yamamoto, Y. and Miyamoto, H. 2000. Decreased matrix metalloproteinase activity in the kidneys of hereditary nephrotic mice (ICGN mice). *Nephron* 86: 145-151.
39. Vogel, J., Kiessling, I., Heinicke, K., Stallmach, T., Ossent, P., Vogel, O., Aulmann, M., Frietsch, T., Schmid-Schönbein, H., Kuschinsky, W. and Gassmann, M. 2003. Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood*. 102: 2278-2284.
40. Wang, A. J., Lu, Y. P., Zhu, R. F., Li, S. T., Xiao, G. Y., Zhao, G. F. and Xu, W. H. 2008. Effect of sintering on porosity, phase, and surface morphology of spray dried hydroxyapatite microspheres. *J. Biomed. Mater. Res. A*. (in press)
41. Yamagata, Y., Misaki, M., Kurokawa, T., Taira, K. and Takada, S. 2003. Preparation of a copoly (dl-lactic/glycolic acid)-zinc oxide complex and its utilization to microcapsules containing recombinant human growth hormone. *Int. J. Pharm.* 251: 133-141.
42. Yamaguchi, Y., Takenaga, M., Kitagawa, A., Ogawa, Y., Mizushima, Y. and Igarashi, R. 2002. Insulin-loaded biodegradable PLGA microcapsules: initial burst release controlled by hydrophilic additives. *J. Control. Release* 81:235-249.
43. Yamaguchi-Yamada, M., Manabe, N., Goto, Y., Anan, S., Miyamoto, K., Miyamoto, Y., Nagao, M., Yamamoto, Y. and Ogura, A. 2004. Improvement of anemia associated with chronic renal failure by recombinant human erythropoietin treatment in ICR-derived glomerulonephritis (ICGN) mice. *J Vet Med Sci.* 66: 883-886.
44. Yamaguchi-Yamada, M., Manabe, N., Uchio-Yamada, K., Akashi, N., Goto, Y., Miyamoto, Y., Nagao, M., Yamamoto, Y., Ogura, A. and Miyamoto, H. 2004. Anemia with chronic renal disorder and disrupted metabolism of erythropoietin in ICR-derived

glomerulonephritis (ICGN) mice. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 423-431

45. Yamamura, K., Iwata, H., Osada, T., Yotsuyanagi, T. and Nabeshima, T. 1994. Anticancer effects of adriamycin-loaded hydroxyapatite implants determined in a Swarm rat chondrosarcoma model. *Jpn. J. Pharmacol.* 65: 289-291.
46. Zhang, F., Gagnon, R. F., Richards, G. K. and Brox, A. G. 1996. Anemia of chronic renal failure: characterization in the mouse and correction with human recombinant erythropoietin. *Nephron* 72: 654-661.

英文抄録

For chronic kidney disease (CKD) patients with renal anemia, recombinant human erythropoietin (rhEPO) is a very effective drug; however, the treatment regime is troublesome, requiring multiple administrations each week. In veterinary field, rhEPO treatment has been also introduced; however, multiple administrations each week is necessary like human case. To resolve this problem, the method of sustained release of biologically active rhEPO over a period of two weeks or more should be necessary.

Hydroxyapatite (HAp) is a biocompatible ceramic, widely used in the biomaterial field. HAp particles have been examined for application in the sustained release of various therapeutic agents, such as antibiotics, anticancer drugs and proteins. HAp has the ability to absorb therapeutic agents without deactivation and shows regulated release by biodegradation. The biodegradation speed of HAp can be regulated by calcination temperature. Spray-drying has been shown to be a good fabrication method for spherical porous HAp powder with a large surface area.

In the present study, the efficiency of HAp as a drug delivery carrier for the sustained release of rhEPO was examined to reduce the frequency of administration. Spray-dried HAp microparticles, formed from zinc-containing HAp (Zn-HAp) or Zn-HAp calcined at 400°C, were used as carriers of EPO, and five Zn-HAp formulations incorporating rhEPO were prepared; no formulation, zinc (Zn) formulation, poly-L-lactic acid (PLA) formulation, Zn/PLA formulation, and calcined/Zn/PLA formulation. ICR mice were administered subcutaneously these formulations or rhEPO alone as a control from dorsal neck, and hematological and histopathological analyses, including enzyme-linked immunosorbent assay for plasma EPO concentration, were performed. The efficiency of the sustained release was the lowest in no formulation among the five formulations. For the other formulations, the peak hematopoiesis was delayed and higher hematological values remained until day 14. Further, plasma EPO levels were higher in these formulations than those in control on day 3. A reduction in the initial burst was observed in Zn/PLA formulation, and plasma EPO levels

remained high until day 8 in Zn formulation and Zn/PLA formulation. This indicates that sustained EPO release could be achieved by using the Zn and/or PLA formulations on the Zn-HAp microparticles.

The ICGN (ICR-derived glomerulonephritis) mouse is an inbred strain showing the hereditary nephrotic syndrome due to a mutation of the *tenascin2* gene. With the deterioration of renal function, ICGN mice developed a normochromic and normocytic anemia, which is consistent with clinical reports on patients with renal anemia. The expression of EPO mRNA in the kidneys was significantly reduced in ICGN mice. Thus, ICGN mice are an authentic model for human anemia with CKD. In the present study, Zn and Zn/PLA formulations were examined whether these formulations could ameliorate the severe anemia in ICGN mice more efficiently compared with EPO alone.

As a result, the hematological parameters in anemic ICGN mice administered rhEPO alone were not different from that of day 0, indicating that anemic ICGN mice might be resistant to rhEPO treatment similar to human CKD patients. As a matter of fact, rhEPO should be administered to patients three times a week to maintain suitable levels of serum rhEPO. The hematological parameters in ICGN mice administered both formulations increased and the peak of hematopoiesis was observed on day 7 and slightly decreased after day 14; however; they were always higher than that of rhEPO alone until day 21. These data suggest that both formulations are useful for sustaining the release of rhEPO *in vivo*.

Although macroscopic observation showed that both formulations still remained in the subcutaneous tissue on day 21, these formulations did not cause any significant inflammatory reactions. The biodegradability of HAp microparticles injected subcutaneously was known, however, more detailed examinations for degradation of both formulations remaining in the subcutaneous tissue are necessary as well as the adverse long-term effects and the excretion mechanism to be studied.

In conclusion, HAp was recognized as a novel drug carrier to achieve sustained release of rhEPO. According to *in vivo* release test of rhEPO from HAp in ICGN mice, elevated hematopoiesis were maintained for 21 days. There was no adverse effect during and after the

administration. Further optimization study is necessary to achieve longer sustained release of rhEPO to establish curative DDS for anemia.