

超選択的動注化学療法および化学塞栓療法の基礎的研究

(3) 一脂質製剤の使用一

粟飯原輝人

目的: 新しく調整したりポソーム-シスプラチン懸濁液 (liposome-CDDP {*cis*-Diamminedichloroplatinum} emulsion: Lip-CDDP) と VX2 腫瘍をもちいて, 超選択的動注化学療法 (superselective transcatheter arterial chemotherapy: STAC) およびイミペネム・シラスタチン懸濁液 (imipenem-cilastatin sodium: IPM/CS) 併用超選択的微小塞栓療法 (superselective transcatheter arterial chemo-microembolization: STACME) を行い結果を分析するとともに, 既報のシスプラチン (CDDP) 単体投与の結果と比較し, 抗癌剤封入脂質製剤の有用性を検討した。

材料と方法: 体重 4 kg の雄性日本白色家兎耳介に VX2 腫瘍細胞浮遊液を移植。移植 14 日後に, ①耳介動脈から Lip-CDDP のみを超選択的に動注した STAC/Lip 群 (n=9) および② IPM/CS 懸濁液 2 ml 先行投与後を超選択的に動注した STACME/Lip 群 (n=9) の 2 群を設定し, 投与直後, 5 分後, 15 分後の腫瘍, 腎, 血液プラチナ (platinum: Pt) 濃度を測定した。また, 移植 7 日後の担癌家兎を用い, STAC/Lip 群 (n=3) および STACME/Lip 群 (n=3) の薬剤投与 5 日後の腫瘍成長率, および腫瘍と腎 Pt 濃度を測定した。併せて, 以前報告した CDDP 単体投与における STAC (STAC/Cis 群) および STACME (STACME/Cis 群) の結果と比較検討した。

結果: 投与直後, 5 分後, 15 分後の STAC/Lip 群の腫瘍内 Pt 濃度は, それぞれ $17.0 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$, $18.7 \pm 2.6 \mu\text{g/g}$, $12.9 \pm 1.8 \mu\text{g/g}$ であり, STACME/Lip 群においては $18.2 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$, $14.3 \pm 4.4 \mu\text{g/g}$, $20.9 \pm 2.1 \mu\text{g/g}$ であった。CDDP 単体投与との比較では, 15 分後に STACME/Lip 群は STAC/Cis 群, STACME/Cis 群と比較してそれぞれ有意に高い濃度を示した ($p < 0.05$)。

投与 5 日後における STAC/Lip 群と STACME/Lip 群の腫瘍成長率は, $88.0 \pm 23.8\%$, $22.9 \pm 8.8\%$ であり, 両群間に有意差を認めた ($p < 0.05$)。CDDP 単体投与との比較では, STAC/Lip 群と STACME/Lip 群は, STAC/Cis 群 ($p < 0.01$) および対照群 ($p < 0.01$) と比較して有意に成長が抑制されていた。投与 5 日後の腫瘍内 Pt 濃度は, STAC/Lip 群, STACME/Lip 群ともに $0.99 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$, $1.27 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ と比較的高い濃度を維持しており, CDDP 単体投与と比較して有意に高い値を示した。

結論: リポソームを用いた CDDP の STAC および STACME は, 長期にわたる腫瘍内 Pt 濃度の維持と, 優れた腫瘍成長抑制効果を示し, 効果的な投与方法であることが示唆された。

(平成11年10月26日受理)

Table 1. Pt. concentration in tumor of each methods at 5 days after administration

	Pt conc.($\mu\text{g/g}$)
STAC/Cis	0.12<
STACME/Cis	0.43 \pm 0.20
STAC/Lip	0.99 \pm 0.22
STACME/Lip	1.27 \pm 0.14

* p<0.05
** p<0.01

び血中Pt濃度は測定限界以下であった。

投与5日後の血中BUNは、STAC/Lip群およびSTACME/Lip群間に統計学的な有意差を認めず、前述の投与直後、5分後、15分後の値と比較しても有意な変化はみられなかった。また、投与直後、5分後、15分後および5日後のSTAC/Cis群、STACME/Cis群との比較においても有意差を認めなかった。

考 察

1965年に初めてBanghamら⁸⁾によって報告されたリポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質が水和して形成される脂質二分子膜からなる微細な閉鎖小腔であり、細胞の基本構造を有する最も単純な系とされる特徴から、生体内分解性で、毒性や抗原性もほとんど無く非常に生体適合性に優れた素材とされている⁹⁾。リポソームは、脂質膜が水相を内包するために薬剤を化学的に無処理で封入させることができる。このような特徴から、本物質は様々な薬理的性質を持つ各種抗癌剤の悪性腫瘍に対する薬剤送達システム (drug delivery system: DDS) の一つとして広く応用されている^{10,11)}。さらに脂質膜の構成成分を変化させることにより、その薬剤放出機構を調節することが可能⁷⁾で、これに関する多様な報告が見られる^{12)~16)}。

コートソームELは、L- α -ジパルミトイルスホスファチジルコリン、コレステロール、ステアリルアミンをモル比52:40:8で混合してリポソームを作製後、凍結乾燥させた製剤であり、

粒子径100~300nm、相移転温度約40°Cの実験用製剤である(以上日本油脂株式会社コートソームEL技術資料から抜粋)。今回このリポソームを採用した理由としては、封入薬剤としてのCDDPの保持および放出が、粒子径数十nmの一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle: SUV) より、数百nmの一枚膜リポソーム (large unilamellar vesicle: LUV) の方が優れている為であり¹⁷⁾、均一で再現性のよい品質のCDDP封入LUVが簡便に調節できる利点がある。しかしCDDP等の水溶性薬剤はアドリアマイシン等の脂溶性薬剤と比較して封入率が極端に悪く¹⁸⁾、今回の実験でもCDDP封入率は約1%であり、40%~100%に近いアドリアマイシンのリポソーム封入率^{2),19)}と比較すると極端に低値であった。また、リポソームは徐放性であるため²⁰⁾、CDDP封入リポソームのみのSTACでは、超選択的動注療法の最大の利点である投与直後の高い腫瘍内薬剤濃度を得にくいことが推測される。しかしこれ迄の実験結果⁷⁾では、超選択的動脈内投与におけるCDDP単体および微小塞栓併用CDDP投与法が投与直後から高い腫瘍内Pt濃度を示すことが分かっている⁷⁾。すなわち投与直後は未封入CDDPの腫瘍間質への移行により、充分な腫瘍内薬剤濃度が得られ、それ以後は、封入CDDPによる徐放効果でさらに薬剤濃度の維持が得られるため、抗腫瘍効果を高めることが期待できる。

Lip-CDDPを用いた今回の実験(STAC/Lip群、STACME/Lip群)における、腫瘍内Pt濃度の経時的变化を既報のCDDP単体投与(STAC/Cis群、STACME/Cis群)と比較すると(Fig. 2)、投与直後のLip-CDDP群はCDDP単体投与群と比較しても有意差無く高い腫瘍内濃度を示し、CDDP単体投与群が時間経過とともに下降していくのに比べ、高い薬剤濃度の維持が可能であった。特にSTACME/Lip群は、5、15分後で投与直後よりも腫瘍内濃度が上昇し、15分後ではSTACME/Cis群と比較しても有意に高い値を示した。つまり、前述した投与直後に極めて高い腫瘍内薬剤濃度が得られる同療法の効果と、

微小塞栓併用による、腫瘍内停滞 Lip-CDDP からの CDDP の徐放性放出による効果が示されたものと思われる。同様に、投与5日後の腫瘍内 Pt 濃度については、CDDP 単体投与群の STAC/Cis 群が測定限界以下、STACME/Cis 群が $0.43 \pm 0.2 \mu\text{g/g}$ であったのに対し、STACME/Lip 群では $1.27 \pm 0.14 \mu\text{g/g}$ と有意に高い値を示しており、徐放効果の持続が示唆されている。一方、STAC/Lip 群が $0.99 \pm 0.22 \mu\text{g/g}$ と STAC/Cis 群、STACME/Cis 群より有意に高い腫瘍内薬剤濃度を示した理由は、LUV リポソーム単体の塞栓効果が関与していると考えられ²⁾、ここでも腫瘍局所で塞栓されたりポソームの徐放効果が出たものと推測される。また、STAC/Lip 群の腎 Pt 濃度が15分後で STAC/Cis 群、STACME/Cis 群より有意に高値で、5日後の測定でも唯一測定可能であったのは、投与後腫瘍内を通過した CDDP 封入リポソームが腎毛細血管に塞栓した結果生じたものと考えられる。今回腎障害の指標として計測した BUN は5日後でも異常値を示さなかったが、更に正確を期する為、長期の経過観察で確認する必要がある。

循環血中 Pt 濃度は CDDP 単体投与群 (STAC/Cis 群, STACME/Cis 群)、Lip-CDDP 使用群 (STAC/Lip 群, STACME/Lip 群) とともに各 time point の計測で有意な変動を示さなかった。これは、CDDP 単体投与群、Lip-CDDP 使用群における CDDP の毛細血管通過がほぼ一定であり、投与薬剤全体からみると、腫瘍内に停留した Pt が極めて少量であり、他の大部分は正常組織または全身の循環血液中に拡散しており、結果的に有意差がでなかったもの⁷⁾と判断される。

薬剤投与5日後の腫瘍成長率は、STACME/Lip 群は STAC/Lip 群と比較して有意に抑制されていた。しかし CDDP 単体投与群の中で最も抑制されていた STACME/Cis 群との比較では両群ともに有意差を証明できなかった。これまでの基礎実験において未治療耳介 VX2 腫瘍は移植14日後以降になると腫瘍内部の壊死巣が増大し、退縮することが確認されている。本腫瘍の cell loss factor の大きさを考え、腫瘍成長率

が測定できる腫瘍最大径が 10 mm 程度にしか設定できなかったことが関係している可能性がある。事実、投与後 STACME の CDDP 単体及び liposome 封入群でともに腫瘍径が大幅に縮小しており、測定時の小さな腫瘍径が原因で測定誤差の影響が加味され、結果的に統計学的有意差がでなかったものと思われる。しかしながら有意差はなかったものの、STAC の高い薬剤腫瘍内濃度を微小塞栓とリポソームの徐放効果で長時間維持できた STACME/Lip 群が結果的に最も腫瘍成長率が抑制されており、より効果的な投与方法であることには異論はないものと考えられる。今後リポソーム CDDP 封入率の改善および耳介 VX2 腫瘍の腫瘍成長率計測時期の再検討を行うことで更に詳しい検討が可能になるとと思われる。

ま と め

①リポソーム-シスプラチン懸濁液をもちいて STAC および STACME の実験を施行し、CDDP 単体投与群と比較検討した。

② STACME/Lip 群は優れた腫瘍成長率抑制効果と、長時間にわたり高い腫瘍内 Pt 濃度を示し、最も効果的な投与方法であることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導ご校閲を賜りました川崎医科大学放射線医学(治療)教室 今城吉成教授に深謝します。また終始懇切なご助言を賜りました川崎医科大学放射線医学(治療)教室 平塚純一助教授、同放射線医学(診断)教室 梶原康正教授、今井茂樹助教授、同耳鼻咽喉科学教室 原田 保教授、秋定 健助教授をはじめ医局員の諸先生に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、日本耳鼻咽喉科学会第25回中国四国地方部会連合学会(1999, 徳島)にて発表した。

本研究の一部は、川崎医科大学プロジェクト研究費[11-806]の援助を受けました。記して感謝の意を表します。

文 献

- 1) Iga, K : Optimum formulation of thermosensitive liposome for targeted tumor drug delivery. *J Takeda Res Lab* 51 : 45-72, 1992
- 2) 上野雅晴, 邹 一愚, 小野敦央, 堀越 勇 : 温度感受性リボソームを用いた肝癌化学塞栓療法の基礎的検討 - 動物実験 -. *癌と化学療法* 18 : 2183-2185, 1991
- 3) Iga K, Ogawa Y, Toguchi H : Heat-induced drug release rate and maximal targeting index of thermosensitive liposome in tumor-bearing mice. *Pharm Res* 9 : 658-662, 1992
- 4) 小野幸彦, 大草昭彦, 岡藤龍正, 山本 敬, 川上 朗, 新藤 啓, 石田 修, 小木曾太郎, 木下登裕, 吉岡寛康 : Cisplatin 封入 Liposome 肝動注によるラット肝癌への影響. *癌と化学療法* 20 : 965-967, 1993
- 5) 佐塚泰之, 中井慎一郎, 宮城島惇夫, 野澤靖夫, 広田貞雄 : Polyethyleneglycol 修飾 adriamycin 含有リボソームの抗腫瘍効果および副作用. *DDS* 10 : 181-187, 1995
- 6) 栗飯原輝人 : 超選択的動注化学療法および化学塞栓療法の基礎的研究 (1) - 動物実験モデルと微小塞栓物質の製作 -. *川崎医会誌* 25 : 47-54, 1999
- 7) 栗飯原輝人 : 超選択的動注化学療法および化学塞栓療法の基礎的研究 (2) - 実験的検討 -. *IVR 会誌* 14 : 466-473, 1999
- 8) Bangham AD, Standish M, Watkins JC : Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipid. *J Mol Biol* 13 : 238-252, 1965
- 9) 際田弘志 : DDS の進歩1995-96 II DDS の技術 1. リボソームによる DDS (水島 裕編). 東京, 中山書店. 1995, pp 44-48
- 10) 吉村哲郎 : ライフサイエンスにおけるリボソーム. 第10章 病気とリボソーム 10.2 リボソーム利用による治療 (寺田 弘, 吉村哲郎編). 東京, シュプリンガー・フェアラーク東京. 1994, pp 315-332
- 11) 熊井浩一郎, 多田隈卓史, 保田立二 : リボソームを担体とした DDS による癌治療. *DDS* 6 : 415-421, 1991
- 12) Yatvin MB, Weinstein JN, Dennis WH, Blumenthal R : Design of liposomes for enhanced local release of drugs by hyperthermia. *Science* 202 : 1290-1293, 1978
- 13) Iga K, Hamaguchi H, Igari Y, Ogawa Y, Toguchi H, Shimamoto T : Heat-specific drug release of large unilamellar vesicle as hyperthermia-mediated targeting delivery. *Int J Pharm* 57 : 241-251, 1989
- 14) 越智 章, 柴田尚武, 森 和夫, 佐藤智典, 砂本順三 : リボソーム封入シスプラチンによる脳腫瘍ターゲティング療法-2. プルラン被覆リボソームと脳腫瘍指向性-. *DDS* 5 : 261-265, 1990
- 15) 奥 直人, 土井香苗子 : アドリアマイシン内封 RES 回避リボソームの癌治療への応用. *DDS* 9 : 89-95, 1994
- 16) 森村有美子, 新植幸彦, 有馬英俊, 坂本直俊, 李 仁淑, 土屋晴嗣 : Plasmid DNA のカチオンリボソームとの複合体形成によるヌクレアーゼに対する安定性の獲得. *DDS* 14 : 165-169, 1999
- 17) Iga K, Hamaguchi N, Igari Y, Ogawa Y, Toguchi H, Shimamoto T : Increased tumor cisplatin levels in heated tumors in mice after administration of thermosensitive, large unilamellar vesicles encapsulating cisplatin. *J Pharm Sci* 80 : 522-525, 1991
- 18) Perez-Soler R, Lopez-Berestein G, Khokhar AR : Design and development of liposome-dependent antitumor agents. *In Liposomes in the Therapy of infectious diseases and cancer.* Lopez-Berestein G, Fidler IJ (eds). New York, Alan R Liss. 1989, pp 59-69
- 19) 丸本一雄, 岡本亜紀, 小島周二, 杉中昭典, 岩鶴素治 : アドリアマイシン封入ガングリオシド GM1 付与リボソームの体内動態と抗腫瘍効果. *DDS* 7 : 345-350, 1992
- 20) 福森哲也, 乾真登可, 関 豊, 西井正高, 野村城二, 森 厚, 田川俊郎 : シスプラチン封入リボソームを用いた化学療法に関する基礎的研究. *口腔外科学会誌* 43 : 537-542, 1994