

## Liposome 封入制癌剤体内分布に対する 組織血流量変化の影響

— Angiotensin II 併用効果について —

川崎医科大学 消化器外科  
(指導: 佐野開三教授)

清水 裕 英

(昭和59年2月27日受付)

### The Effects of Angiotensin II on the Blood Clearance and Tissue Distribution of Liposomes

Hirohide Shimizu

Division of Gastroenterological Surgery  
Department of Surgery, Kawasaki Medical School  
(Director: Prof. Kaiso Sano)

(Accepted on February 27, 1984)

癌化学療法の効果を増強するために、制癌剤封入 liposome と angiotensin II を併用し、angiotensin II の腫瘍、ならびに正常組織の血流に与える変化、および liposome 血中クリアランス、組織分布に対する影響について実験的に検討し、以下の結果を得た。

1) Angiotensin II 投与により、血圧は著明に上昇したが、心拍数、心拍出量に変化は認められなかった。

2) 腫瘍組織血流量は、angiotensin II  $2 \mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$  持続投与により、約 60% 増加した。

3) Liposome と liposomal 5-FU の血中クリアランスは、angiotensin II により高く推移した。

4) Empty liposome の分布では、angiotensin II 併用により、肝で 5.61%/g から 4.49%/g に減少し、腫瘍では 0.30%/g から 0.80%/g に増加した。

5) Liposomal 5-FU の分布では、angiotensin II 併用により、腎で 6.79%/g から 3.79%/g に減少し、腫瘍では 1.09%/g から 1.87%/g に増加した。

6) 5-FU 封入 liposome と angiotensin II を併用することにより、他の群に比し高い T/N 比が得られた。

以上の結果から、制癌剤封入 liposome と angiotensin II の併用により、制癌剤を腫瘍組織へ選択的に到達させることが可能であると考えられた。

In an attempt to optimize the chemotherapy for malignant neoplasms, liposome-associated 5-FU was used in combination with angiotensin II. The effects of angiotensin II on the changes in tissue blood flow of the tumor and normal organs and its influence on blood clearance and tissue distribution of liposomes were studied experimentally.

The results were as follows:

- 1) Angiotensin II-treated rats showed a significant rise in blood pressure, but heart rate and cardiac output were not affected.
- 2) The continuous injection of  $2\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$  of angiotensin II produced an increase in tumor blood flow of about 60%.
- 3) Angiotensin II caused a slowing of the rate of clearance of empty liposomes and liposomal 5-FU.
- 4) Angiotensin II reduced hepatic uptake of empty liposomes from 5.61%/g to 4.49%/g and increased tumor uptake from 0.30%/g to 0.80%/g.
- 5) Angiotensin II reduced renal uptake of liposomal 5-FU from 6.79%/g to 3.79%/g and increased tumor uptake from 1.09%/g to 1.87%/g.
- 6) Treatment with liposome-associated 5-FU plus angiotensin II resulted in a higher tumor-to-liver ratio than in other combinations of angiotensin II, liposomal 5-FU and free 5-FU.

The results of this study suggest liposome-associated agents combined with angiotensin II may cause selective accumulation of antitumor agents in tumor tissue.

Key Words ① Liposome ② Angiotensin II ③ Tissue blood flow

## 緒 言

癌化学療法の進歩は、新しいより有効な制癌剤の開発に待たれるところが大きい、一方、既存の制癌剤の効果を増強し、副作用の軽減を図る努力も怠ってはならない。

効果増強の方法としては、剤型変更、非制癌剤の併用、他の治療法との併用などがあげられるが、このうち、特に剤型を変える事で腫瘍内制癌剤濃度を選択的に高め、正常組織に対する障害を軽減しようとする試みが広く行われ、今日最も注目される研究課題の一つとなった。すなわち、マイトマイシン C-microcapsule<sup>1)</sup>、固型制癌剤<sup>2)</sup>、制癌剤エマルジョン<sup>3)</sup>などが次々に開発され、このうちすでにマイトマイシン C-microcapsule や固型剤は、臨床的にもかなり効果が認められるに至っている。しかし、合成物質を使用する場合、異物としての生体への影響<sup>4)</sup>、製剤の大きさによる投与方法上での制約など、なお検討されるべき幾多の問題が残されている。

いわゆる microcapsule の一種である liposome は 1968 年 Bangham<sup>5)</sup> により生体膜モ

デルとして開発された脂質閉鎖小胞で、1972年 Gregoriadis, Ryman<sup>6)</sup> により、drug carrier system としての可能性が示唆されて以来、インスリン<sup>7)</sup>、キレート剤<sup>8)</sup>、制癌剤<sup>9)</sup> などの投与に有効に利用するため種々の研究がなされている。

Liposome は、生体構成物である脂質を使用するので biodegradable であり、蛋白質をはじめ種々の物質を封入でき、また体内分布を変化させうる事から、他の剤型に比し安全でしかも、投与方法に制約が少ない carrier として有望と考えられ、*in vitro*<sup>10)</sup>、腹水型腫瘍<sup>11)</sup>、リンパ節転移腫瘍<sup>12), 13)</sup> などの実験では、制癌剤を単独投与する場合よりも有効である事が知られている。しかし、liposome を静脈内や動脈内に投与した場合、肝、脾など細網内皮系の発達した臓器に集積する傾向があるため<sup>14)</sup>、制癌剤の carrier として、目標とする腫瘍細胞への特異的到達がえられず、かえって正常細胞に対する毒性が強くなるという報告もある<sup>15)</sup>。このような liposome の特異的な体内分布を改変する試みとして、各種薬剤による細網内皮系のブロック<sup>16)</sup>、局所加温の併用<sup>17)</sup>、標的細胞に

対する抗体を liposome 膜にコーティングする方法<sup>9)</sup>などが検討されているが、いずれも満足すべき成果をあげるに至っていない。

一般に薬剤の生体内分布には、組織の血流量が影響している事は言を待たない。したがって、liposome の分布に対しても血流量は大きく関与しているものと考えられるが、その影響についての研究はほとんどなされていない現状である。そこで、制癌剤の carrier としての liposome の生体内分布を変える目的で、昇圧化学療法に應用されている angiotensin II (以下 AT II と略す)<sup>18)</sup> を併用し、AT II による臓器血流量の変化、および血流量変動の liposome ならびに liposome 封入制癌剤体内動態に及ぼす影響について、実験的に検討した。

### 実験材料・方法

#### 1. 実験モデル

##### a. 実験動物

近交系 Donryu ラット雄性で、体重 200 g 前後のものを用い(日本ラットより購入)、飼料および水は ad libitum に投与した。

##### b. 肝腫瘍モデル作製

腹水型で継代された吉田肉腫を無菌的に開腹採取し、これを細胞数  $1 \times 10^7$  個/ml になるよう Hanks' 液にて希釈調節した。ラットを pentobarbital sodium 30 mg/kg 腹腔内投与にて入眠させ、上腹部正中切開で開腹、肝左葉前区の被膜下実質内に、26G 針付ツベルクリン注射

器により、上記細胞浮遊液 0.1 ml ( $1 \times 10^6$  個) を注入、針を抜去後に液の漏出を防ぐため、刺入部を電気凝固にて閉鎖した。

移植後 5 日目に再開腹し、孤立性腫瘍の形成を確認した後、約 90 匹を以下の実験に使用した (Fig. 1)。

##### c. 肝腫瘍の microangiography

ラットを pentobarbital sodium 麻醉下に開腹し、門脈または腹腔動脈内に 3 Fr catheter (Cook 社) を留置、80% 硫酸バリウム液 2 ml を用手的に注入、直ちに脈管を結紮し肝臓を摘出した。摘出肝を 10% ホルマリン液にて 10 日間固定後、軟線にて microangiogram を作成した。使用フィルムはフジソフテックスで、40 kv, 100 mA, 0.08 sec の条件にて撮影した。

#### 2. 組織血流量の測定

##### a. 麻醉方法

以下の実験では、pentobarbital sodium 30 mg/kg 腹腔内投与にてラットを入眠させた後、気管切開にて挿管し、酸素: 笑気 = 1:1 の混合ガスを用いた人工呼吸器による調節呼吸を行った。

##### b. 組織血流量測定方法

測定方法には、particle distribution 法を用いた。本法は、毛細血管にて捕捉される大きさの、放射性同位元素で標識された microsphere を左心室内に投与し、その後、各臓器の放射能を測定する事により microsphere の臓器分布を計測、下記の式を用いて心拍出量、および組織血流量を算出するものである<sup>19)</sup>。

$$F = C_1/C_2 \times f \times 100$$

$$CO = D/C_2 \times f$$

F: 組織血流量 (ml/min/100g wet tissue)

CO: 心拍出量 (ml/min)

$C_1$ : 組織 1g 当たりの放射能 (cpm)

$C_2$ : reference blood の放射能 (cpm)

f: reference blood の採取速度 (ml/min)

D: 投与した microsphere の放射能 (cpm)

Tracer microsphere としては、<sup>125</sup>I にて標識された直径  $15 \pm 5 \mu$ 、比放射能 10 mCi/g の

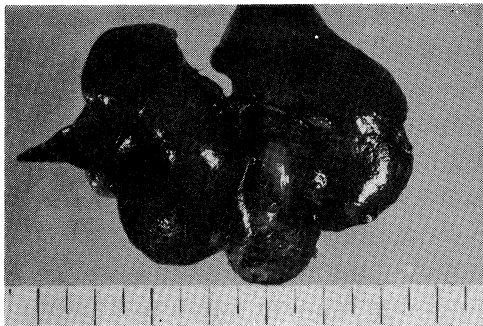


Fig. 1. Photograph of gross specimen of experimental liver tumor.

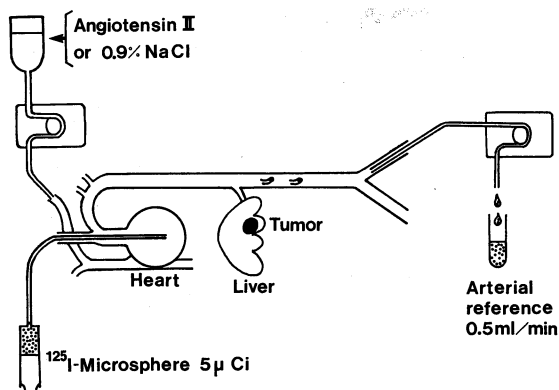


Fig. 2. Schematic representation of particle distribution method.

carbonized microsphere 生理食塩水懸濁液 (3M社) を使用した。

実験は、ラットを前記の方法にて麻酔後、右総頸動脈および左外頸静脈を露出させ、右総頸動脈から左心室へ3Fr catheter を挿入して microsphere 投与用とし、一方左外頸動脈には3Fr silicone tube (富士システムズ) を挿入留置、Holter ポンプ (model 903型) を用いての薬剤投与に使用した。次に、左大腿動脈を露出し3Fr catheter を留置して圧 transducer に接続、血圧測定および reference blood の採取に用いた。

以上の条件下にて、control 群では生理食塩水、AT II 群では、AH II (2 μg/min/kg) を持続投与し、control 群は生理食塩水投与5分後、AT II 群では収縮期血圧が投与前より50%増加した時点で、<sup>125</sup>I microsphere 5 μCi を10秒間かけて左心室内に投与した。microsphere 投与と同時に左大腿動脈より、Holter ポンプ (model 911型) を用いて一定流速で5分間動脈血 (reference blood) を採取した。採血終了後、直ちにラットを脱血屠殺して各臓器を摘出、臓器湿重量測定後、Auto gamma counter (Aloka ARC 300) にて <sup>125</sup>I 放射能を測定し、組織血流量および心拍出量を算出した (Fig. 2)。

### 3. Liposome の体内動態測定

#### a. Liposome の調製

Liposome は、MLV (multilamellar vesicle, 多重膜リポソーム) を、Gregoriadis ら<sup>20)</sup>の方法により作成した。すなわち、dipalmitoyl-phosphatidylcholine (Sigma) 10 μmol, cholesterol (和光純薬) 5 μmol, dicetyl phosphate (Sigma) 1 μmol をクロロホルム 5 ml に溶解し、50 ml の共栓ナス型フラスコに入れ、35°C の水浴中でロータリーエバポレーターによりクロロホルムを減圧除去、さらに減圧したデシケーター内に、フラスコを1時間放置する事でフラスコ底に脂質フィルムを形成させる。次に、50°C 以上に加温した制癌剤の phosphate buffer saline (以下 PBS と略す) 溶液 2 ml を加え、10分間の Voltexing を行い MLV を調製した (Fig. 3)。

本研究では liposome の体内分布測定のために、L-α-phosphatidyl [N-methyl-<sup>3</sup>H] choline, dipalmitoyl (Amersham) で脂質を標識した liposome (以下 Empty Liposome と略す) と、liposome 封入制癌剤分布測定のために、5-fluoro [6-<sup>3</sup>H] uracil (Amersham) を封入した 5-FU 封入 liposome (以下 5-FU Liposome

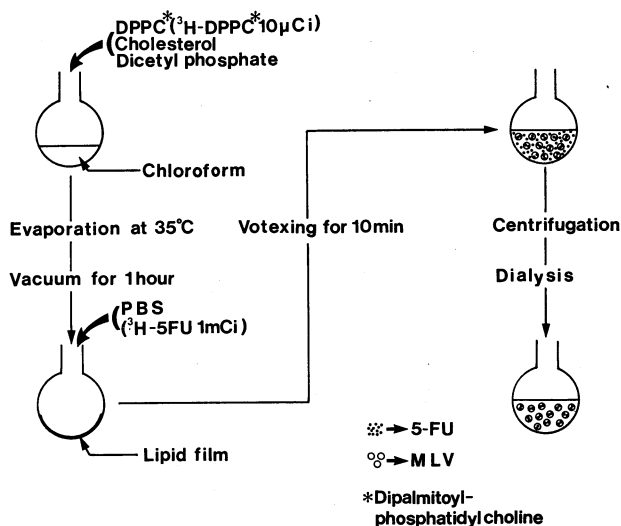


Fig. 3. Schematic representation of preparation of liposomes (MLV).

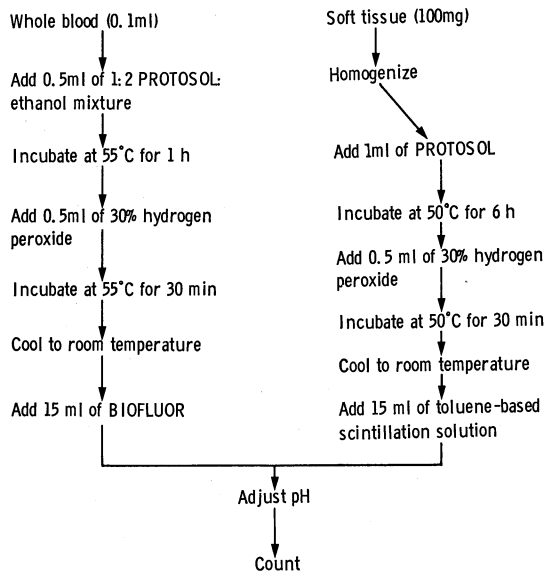


Fig. 4. Preparation of samples for LSC.

と略す)との、2種類のMLVを作製した。

なお巨大な liposome は、350Gで10分間遠心除去し、5-FU Liposome に封入されなかった  $^3\text{H}$  5-FU は、約100倍量のPBSに対しMWCO 2000の cellulose dialysis tube (Spectropor) を用い、1回6時間、計3回の透析を行い除去した。

MLVの一部は、カーボングリッド上で酢酸ウラニルによるネガティブ染色を行い、透過型電子顕微鏡にて大きさを測定した。

#### b. Liposome および封入制癌剤分布の測定

2. b. と同様の手技で、右総頸動脈および左外頸静脈に catheter を留置、血流量測定と同じ条件下にて control 群と AT II 群とに、Empty Liposome, 5-FU Liposome, あるいは free 5-FU を約  $10 \mu\text{Ci}/\text{ml}$  尾静脈より投与した。投与直後および投与5, 10, 15, 30, 45, 60分後の計7回、右総頸動脈より0.1 ml 採血し、血中クリアランスを測定した。また、Empty Liposome, 5-FU Liposome (測定値は、liposomal 5-FU と表示する), free 5-FU の組織分布測定のため、投与60分後にラットを脱血屠殺し、開胸にて右房内に catheter を挿入、生理食塩水で十分に臓器を還流後、各臓



Fig. 5. Top, microangiogram of hepatic artery. Bottom, microangiogram of portal vein.

器を摘出し湿重量を測定した。血液および組織は Fig. 4 に示す方法により処理後、liquid scintillation counter (Aloka LSC 900) にて  $^3\text{H}$  放射能を測定した (Fig. 4)。

なお、血中クリアランスは、投与直後の血中  $^3\text{H}$  放射能に対する各時点での値を%で示し、組織分布は、投与した  $^3\text{H}$  放射能に対する各組織 1g 当たりの値を%で示した。

## 結 果

### 1. 肝腫瘍の microangiography

肝動脈造影像では、腫瘍血管の壁不整、走行異常、血管径の大小不同がみられ、門脈造影像では、腫瘍部分は avascular であり腫瘍周囲血管の圧排像があることから、この腫瘍はほとんど肝動脈により栄養されているものと考えられた (Fig. 5)。

### 2. 循環動態および組織血流量の変化

#### a. 循環動態

心拍出量は、control 群  $55.70 \pm 32.51$  (平均値  $\pm$  標準偏差) ml/min に対し、AT II 群では  $44.31 \pm 14.32$  ml/min と減少傾向を示したが、有意な差ではなかった。また、心拍数も両

群間に著差を認めなかったが、血圧は平均血圧で見ると、control 群  $100 \pm 27.20$  mmHg, AT II 群  $160 \pm 16.69$  mmHg と AT II 群で有意に

上昇した ( $p < 0.001$ ) (Table 1).

b. 組織血流量

腫瘍血流量は、control 群が  $14.22 \pm 2.13$  ml/min/100 g であるのに対し、AT II 群では  $21.41 \pm 2.07$  ml/min/100g と著明に増加した ( $p < 0.01$ ). 一方、肝臓では両群間の肝動脈血流量に著差はなかったが、胃、小腸、大腸、盲腸、脾および脾血流量より算出した門脈血流量は、control 群に比し AT II 群では著明に減少した ( $p < 0.05$ ). したがって、門脈血流量と肝動脈血流量とを合わせた肝全血流量をみると、control

Table 1. Changes in hemodynamic data

	Control (n=9)	AT II (n=8)
C. O. ml/min	$55.70 \pm 32.51$	$44.31 \pm 14.32$
Heart rate /min	$351.11 \pm 38.97$	$362.85 \pm 57.07$
Systolic B. P. mmHg	$110.46 \pm 24.85$	$170.00 \pm 16.48^*$
Diastolic B. P. mmHg	$92.73 \pm 26.68$	$151.25 \pm 15.29^*$
Mean B. P. mmHg	$100.00 \pm 27.20$	$160.00 \pm 16.69^*$

Mean  $\pm$  S. D.; Paired Student's t-test

\*  $P < 0.001$

C. O.: Cardiac output B. P.: Blood pressure

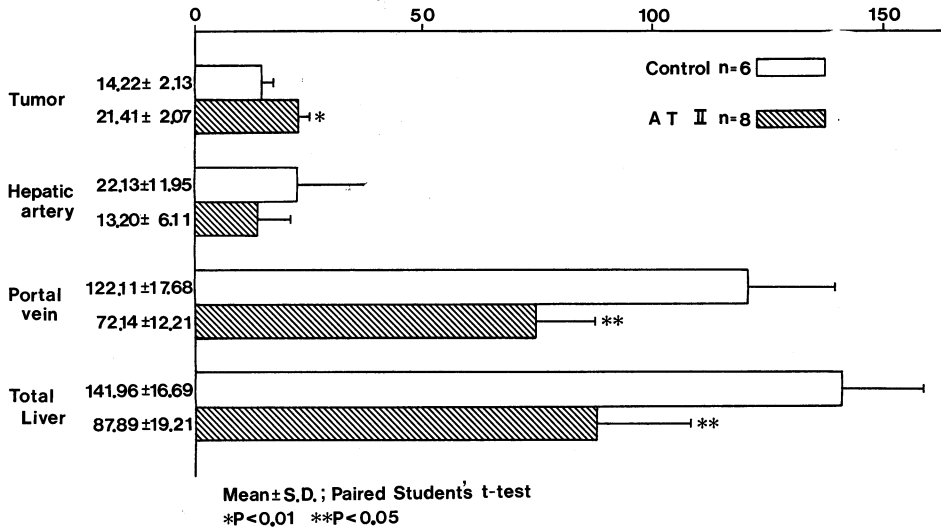


Fig. 6. Changes in blood flows of tumors and normal livers. (ml/min/100g wet tissue)

Table 2. Changes in blood flows of normal organs (ml/min/100g wet tissue)

	Control (n=6)	AT II (n=8)		Control (n=6)	AT II (n=8)
Brain	$49.67 \pm 26.85$	$34.96 \pm 7.84$	Cecum	$74.28 \pm 40.21$	$49.01 \pm 13.50$
Spinal cord	$28.24 \pm 13.31$	$28.31 \pm 8.86$	Spleen	$53.01 \pm 27.87$	$51.49 \pm 18.56$
Heart	$782.35 \pm 302.07$	$1017.29 \pm 229.31$	Pancreas	$156.68 \pm 56.19$	$53.94 \pm 13.72^*$
Lung	$22.13 \pm 11.95$	$13.20 \pm 6.11^*$	Kidney	$312.53 \pm 101.75$	$125.99 \pm 29.08^*$
Esophagus	$47.23 \pm 26.82$	$40.67 \pm 20.30$	Bone marrow	$22.01 \pm 8.61$	$16.83 \pm 7.96$
Stomach	$55.59 \pm 20.61$	$33.35 \pm 9.78^*$	Muscle	$91.59 \pm 54.77$	$104.52 \pm 44.90$
Small int.	$166.57 \pm 32.41$	$96.16 \pm 21.20^{**}$	Skin	$11.14 \pm 7.42$	$7.40 \pm 2.71$
Large int.	$48.35 \pm 17.55$	$39.05 \pm 8.82$	Testis	$14.10 \pm 4.26$	$13.75 \pm 4.99$

Mean  $\pm$  S. D.; Paired Student's t-test

\*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$

群  $141.96 \pm 16.69$  ml/min/100g に対し, AT II 群では  $87.89 \pm 19.21$  ml/min/100g と約40%の減少を認めた ( $p < 0.05$ ) (Fig. 6).

他の消化器系臓器では, AT II 群で胃 ( $p < 0.05$ ), 小腸 ( $p < 0.01$ ), 脾 ( $p < 0.05$ ) の血流量減少を認め, 脾, 大腸, 盲腸血流量では両群間に著差はなかった. その他の主要臓器では, 肺(気管支動脈)および腎血流量が AT II 群で有意な減少を示し ( $p < 0.05$ ), 中枢神経系, 筋肉, 皮膚, 骨髄, 睾丸血流量では両群間に差を認めなかった (Table 2).

### 3. Liposome および封入制癌剤分布の変化

a. Liposome の電顕像, 制癌剤封入率  
電顕像では, 直径  $1000\text{\AA} \sim 0.5\mu$  におよぶ大小不同の球形小胞が観察された (Fig. 7).

また,  $^3\text{H}$  5-FU の liposome 内封入率は1.51%であった.

b. Liposome および封入制癌剤血中クリアランス

Empty liposome では, 投与後5分から30分にわたり AT II 群が有意に高値を示し, 投与後60分までこの傾向が続いている.

Liposomal 5-FU でも, Empty Liposome と同様 AT II 群で血中濃度が高く推移しているが, 投与後45分から60分にわたり liposomal 5-FU が Empty Liposome に比し, 血中濃度が高値を示した ( $p < 0.1$ ) (Fig. 8).

c. Liposome および封入制癌剤の組織内分布

Empty Liposome の分布をみると, 腫瘍では control 群  $0.30 \pm 0.17\%/g$ , AT II 群  $0.80 \pm 0.29\%/g$  と, AT II 群が有意に高値を示した ( $p < 0.01$ ).

肝臓では, control 群  $5.61 \pm 0.93\%/g$ , AT II 群  $4.49 \pm 0.58\%/g$  と, AT II 群で有意に減少していた ( $p < 0.05$ ). 他臓器では, いずれも両群間に著差は認められなかった.

Liposomal 5-FU の分布は Empty Liposome と同様, 腫瘍において AT II 群が有意に高値を示したが ( $p < 0.05$ ), 肝臓では著差はなかった. 一方, 腎臓では AT II 群に有意な取り込みの減少が認められた ( $p < 0.05$ ).

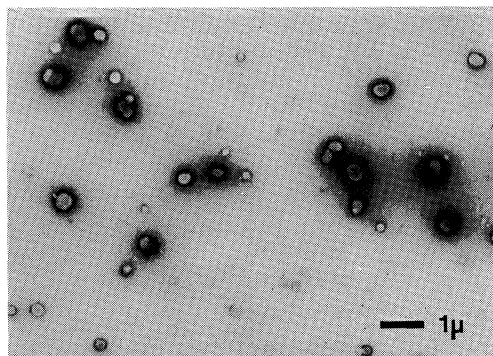


Fig. 7. Electron micrograph of multilamellar vesicle (MLV). MLV composed of dipalmitoyl-phosphatidylcholine, cholesterol and dicetyl phosphate. Negatively stained with uranyl acetate.

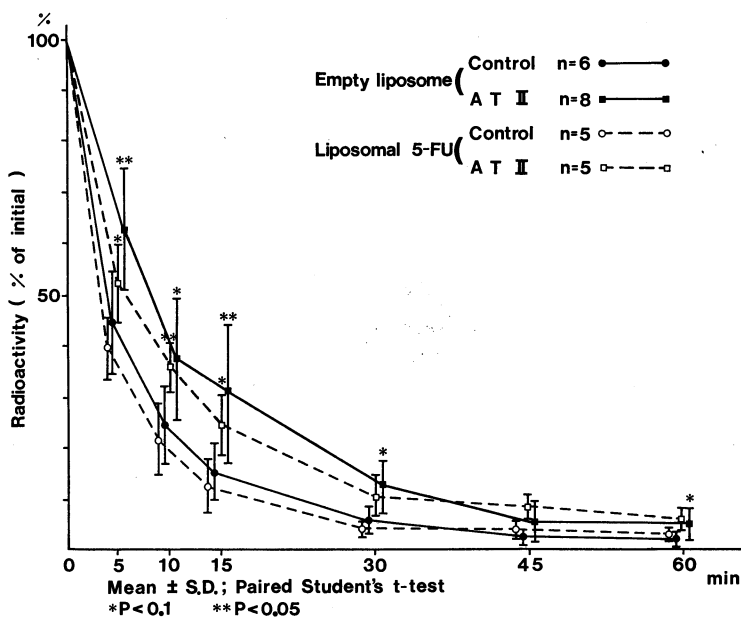


Fig. 8. Blood clearance of empty liposomes and liposomal 5-FU

**Table 3.** Tissue distribution of empty liposomes, liposomal 5-FU and free 5-FU

Tissue	<sup>3</sup> H-radioactivity (% of injected dose/g tissue)					
	Empty liposome		Liposomal 5-FU		Free 5-FU	
	Control(n=6)	AT II (n=8)	Control(n=5)	AT II (n=5)	Control(n=7)	AT II (n=7)
Tumor	0.30±0.17	0.80±0.29**	1.09±0.23	1.87±0.33*	0.41±0.10	0.69±0.33
Liver	5.61±0.93	4.49±0.58*	7.53±2.38	6.29±1.01	3.01±1.28	2.93±1.61
Spleen	8.95±0.20	5.42±2.31	5.59±1.44	4.55±1.38	0.37±0.18	0.40±0.10
Lung	2.14±0.57	2.71±1.38	1.79±0.43	1.54±0.30	0.51±0.22	0.45±0.24
Kidney	0.33±0.09	0.34±0.12	6.79±2.03	3.79±1.29*	2.91±0.89	2.47±1.06
Heart	0.36±0.07	0.27±0.11	0.77±0.26	0.51±0.19	0.43±0.31	0.24±0.08
Diaphragm	0.21±0.16	0.13±0.05	0.59±0.43	0.39±0.19	0.27±0.12	0.27±0.12

Mean±S. D.; Paired Student's t-test

\* P&lt;0.05 \*\* P&lt;0.01 compared with control

Empty Liposome と liposomal 5-FU 分布を比較すると、肝臓、腎臓における取り込みに差がみられ、両者は必ずしも同様な分布を示さないことがわかった (Table 3)。

#### d. 制癌剤腫瘍選択性の比較

Liposomal 5-FU と free 5-FU について、T/N 比(腫瘍内 5-FU 濃度/肝臓内 5-FU 濃度)を算出した。

**Table 4.** Effect of AT II on tumor-to-liver <sup>3</sup>H 5-FU ratio

	Control	AT II
Free 5-FU	0.17±0.06 (n=5)	0.25±0.07* (n=5)
Liposomal 5-FU	0.17±0.04 (n=5)	0.31±0.09** (n=5)

Mean±S. D.; Paired Student's t-test

\* P&lt;0.1 \*\* P&lt;0.05 compared with control

Free 5-FU では、control 群 0.17±0.06, AT II 群 0.25±0.07 であり、liposomal 5-FU では、Control 群 0.17±0.04, AT II 群 0.31±0.09 といずれも AT II 群で有意に増加し、なかでも、5-FU Liposome と AT II を併用した場合に、最も T/N 比が高値となった (Table 4)。

## 考 察

Liposome を制癌剤の carrier として用いる試みは、Gregoriadis 以来盛んに行われている

が、肝臓の Kupffer cell や脾臓の macrophage による 特異的 取り込みが問題で、target site への制癌剤集積は期待されたほど高まらず、そのためなお今日まで臨床応用には至っていない。

Liposome は、その大きさや表面荷電を変える事で、体内での分布をかなり変化させうるが<sup>21)</sup>、制癌剤の carrier として liposome を単独で用いても好結果が得られないため、主な集積部位である細網内皮系をブロックする薬剤である dextran<sup>16)</sup>、methyl palmitate<sup>22)</sup>、Empty MLV<sup>23)</sup>などを、liposome 投与に先立って併用投与することが試みられている。すなわち、Souhami ら<sup>16)</sup>は、dextran sulphate を前投与し、肝での liposome 取り込みが50%抑制されたと報告している。しかし、この方法では腫瘍集積を positive に高めることは不可能であろう。また、Yatvin ら<sup>17)</sup>は、dipalmitoyl phosphatidyl choline と distearoyl phosphatidyl choline の7対1混合物を用い、約42°Cで制癌剤を放出する liposome を作製し、これを局所加温と併用した結果、加温部位に選択的な制癌剤の取り込み増加をみたし報告しているが、加温しにくい体内臓器を目標とするとき、なおこの方法にも限界があると思われる。

Gregoriadis<sup>9)</sup>は、liposome の体内分布を左右する因子として、① carrier 因子 (blood, membrane barrier), ② target 因子 (cell



membrane, receptor, endocytic capacity)などをあげている。しかし, liposome に対する臓器血流量の関与については, 原発性肝癌と転移性肝腫瘍における liposome 分布の比較で, 当然のことながら, 血流量の多い腫瘍において liposome 集積が高くなると報告されているだけで<sup>24)</sup>, 両者の関係についての十分な検討は未だなされていない。

血流量を変化させ, 体内における制癌剤の分布を改善しようとする試みは以前から行われ, 種々の血管作動薬について検討されてきている<sup>18), 25), 26)</sup>。なかでも, AT II は腫瘍血流量を増加させる作用が強い反面, 正常組織の血流量は減少させるということが広く知られている。この事実から, AT II は一般制癌剤と同様, liposome の体内分布を変えることに対しても有利に作用するものと考えられた。

組織血流量の測定方法には, ① 交叉熱電対法, ② 水素ガスクリアランス法, ③ particle distribution 法などがある。経時の変化をみる上では①, ②の方法が有利であるが, probe 挿入による臓器障害, 一度に多臓器の測定ができないこと, さらに腫瘍組織では部位により血流量が異なる<sup>27)</sup>などの点で問題がある。そこで, 本研究では比較的簡便で, 多臓器血流量を絶対値で測定できる particle distribution 法<sup>19)</sup>を用いた。なお, 実験動物としてラットを使用したため, reference blood 採取による循環系への影響を考慮し, double isotope technique は用いなかった。

AT II の循環系に与える影響をみると, 心拍出量は減少傾向を示し, 血圧の上昇が認められた。AT II は最も強力な昇圧剤で, その主な作用は末梢血管収縮であり, それによる血圧上昇, 静脈還流の減少の結果, 心拍出量の減少を来したのと考えられる。また AT II は交感神経刺激作用を有し, 心拍数が増加する<sup>26)</sup>と言われているが, 本実験のデータからは明らかな変化は認められなかった。

AT II による腫瘍血流変化に関しては, 鈴木ら<sup>27)</sup>がラットの皮下, 肝, 筋肉内移植腫瘍について, また瀬尾<sup>28)</sup>, 宮崎<sup>29)</sup>は家兎肝移植腫

瘍において検討しており, 血流の変化率は実験方法あるいは測定方法の違いが関与するためまちまちであるが, いずれも AT II の強い腫瘍血流量増加作用が観察されている。本研究においても, AT II 2  $\mu\text{g}/\text{min}/\text{kg}$  の静脈内投与により, ラット肝腫瘍で60%の血流量増加を認めた。

血管収縮剤による腫瘍血流量増加は, 血管収縮剤により正常組織の血管が収縮するのに対し, 腫瘍血管では収縮反応があらわれず, 血圧上昇のため受動的に血流量が増加するものと考えられている。この反応性低下の原因として Wickersham<sup>29)</sup> は, 腫瘍血管壁における平滑筋の未発達をあげているが, 発育の遅い腫瘍の血管は正常血管と構造的に同一であり, この様な腫瘍血管の場合は epinephrine や norepinephrine に対する収縮がおこる<sup>30)</sup>。したがって, これらの薬剤に対する腫瘍血管反応に関し, 異なった意見がみられるのは, 血管構造の差によるものと考えられる。一方, 腫瘍血管は AT II に対し, epinephrine や norepinephrine と違った反応を示すとされ<sup>30)</sup>, 腫瘍血管における平滑筋の有無が, 直接 AT II に対する反応欠落に影響しているとは考え難く, むしろ, AT II に対する receptor の腫瘍血管壁における欠如がその原因と推測される。

多くの正常組織では, AT II による毛細血管前細動脈の収縮により, 血流量の減少が認められているが, AT II receptor の有無や感受性の違い, あるいは中枢神経を介する作用の影響で, 臓器によりその程度はさまざまである<sup>31)</sup>。本研究では, AT II receptor を介する末梢性反応が強い胃, 小腸などの消化管, また中枢神経を介して反応する腎臓<sup>32)</sup>で血流量の減少が測定された。さらに, 消化管血流量が減少した結果, 門脈系を中心とした肝血流量の減少を認め, Suzuki ら<sup>18)</sup>のいう“Autoregulation”はみられなかったが, AT II の作用は dose dependent であり, response と duration に逆相関があることから<sup>32)</sup>, おそらく, 投与量, 投与方法の違いが原因したものと考えられる。一方, 中枢神経系の血管は, *in vitro* の実験で

AT II に対し収縮反応を示す事が観察されているが<sup>32)</sup>、今回の研究では血流量の減少は認められず、*in vivo* では神経性調節などが関与し、homeostasis が保たれているものと考えられる。

生体内での、liposome および liposome 封入制癌剤分布に対する血流量の影響をみると、AT II により血流量の増加した腫瘍で Empty Liposome 集積が有意に増加し、Liposomal 5-FU も血流量変化に相応した変化がみられ、AT II により liposome 封入制癌剤の腫瘍集積が高められる事が証明された。正常組織では、AT II によりかなり Liposome および liposome 封入制癌剤集積を抑制でき、特に最も問題となる肝臓では強い集積の低下がみられた。血中クリアランスにおいても、主たる取り込み臓器である肝での取り込み低下が影響し、AT II により血中制癌剤濃度は高く推移している。このように AT II の併用は、liposome および liposome 封入制癌剤分布に対し非常に有利に作用しているが、正常組織では、血流量減少から推定されるほどの抑制効果は得られず、やはり細網内皮系細胞が強い影響を有することがわかった。

ところで、liposome と liposomal 5-FU の分布を比較すると、血中クリアランスでは投与後 45 分から 60 分にわたり liposomal 5-FU が高値を示し、組織分布をみても両者に差を認め、liposomal 5-FU は、Empty Liposome と同様に肝、脾、肺における集積が高い一方で、free 5-FU 集積の多い腎における取り込みも増加していた。この原因は、血中のマクログロブリンやリポ蛋白質による liposome 膜の不安定化<sup>33)</sup> と、本研究では liposome に徐放性を期待し、37°C で制癌剤を放出する liposome<sup>34)</sup> を使用したことにより、一度臓器に取り込まれた 5-FU Liposome の一部が、free の制癌剤として血中に放出され、その再分布現象が惹起されたためと思われる。

次に、liposome に制癌剤を封入するという事が、腫瘍への選択的到達性にどの程度有効であるかについて、T/N 比を用い free 5-FU と比

較すると、AT II を使用しない場合、liposomal 5-FU は free 5-FU とほぼ同じ T/N 比を示し、したがって liposome 単独では、副作用を抑制しつつ、抗腫瘍効果をも増強することは困難であると考えられる。一方、AT II を併用すると、free 5-FU、liposomal 5-FU とともに T/N 比の改善がみられ、特に liposomal 5-FU では最も高い T/N 比が得られ、liposome と AT II の併用は、制癌剤の選択的腫瘍到達性の改善に最も有効な手段の一つであると考えられた。本研究では、制癌剤の分布に対する liposome と AT II の影響について主に検討したが、liposome には血中での制癌剤不活化を抑制する効果もあることから、腫瘍内の制癌剤活性という点でも、本法の有効性は高いと考えられる。

しかし、選択的到達性という点ではなお完全とは言えず、安全で無害な carrier として liposome を実用化するには、今後さらに liposome 自体の改良や他の方法との併用などについて、検索を進める必要があると思われる。

## 結 語

制癌剤封入 liposome の腫瘍集積性を高める目的で AT II を併用し、血流量の変化が制癌剤の体内分布に及ぼす影響について検討し、以下の結論を得た。

1. 腫瘍血流量は、AT II により 60% 増加し、正常組織血流量は減少した。
2. Liposome および liposome 封入制癌剤分布は、血流量の変化と同様、腫瘍で増加し、正常組織では減少する傾向を認めた。
3. Liposome と liposome 封入制癌剤との分布は、肝、腎で若干の差がみられた。
4. Liposomal 5-FU と free 5-FU の比較では、liposomal 5-FU と AT II の併用により高い T/N 比が得られ、本法の有用性が示された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った川崎医科大学消化器外科教授、佐野開三先生に深謝し、同時に、当教室の先生方の御協力に感謝します。

なお、本論文の要旨の一部は第21回日本癌治療学会総会、第58回中国四国外科学会にて発表した。

## 文 献

- 1) 加藤哲郎, 根本良介, 玉川芳春: MMC マイクロカプセルによる微小化学塞栓療法について. 臨放26: 59—65, 1981
- 2) 平野 誠, 若狭林一郎, 市橋 匠, 渡辺洋宇, 岩 喬, 中原理人, 坂井勝也: 新しい埋込み用 制癌剤—高分子複合体の開発とその適用—. 人工臓器 11: 221—224, 1982
- 3) Takahashi, T., Mizuno, M., Fujita, Y., Ueda, S., Nishioka, B. and Majima, S.: Increased concentration of anticancer agents in regional lymphnodes by fat emulsions, with special reference to chemotherapy of metastasis. *Gann* 64: 345—350, 1973
- 4) 藤井 茂, 遠藤文夫, 森本雍憲, 杉林堅次, 橘川征夫, 奥井勝二: 制癌剤を含む biodegradable microsphere の検討. 癌と化学療法 10: 1328—1333, 1983
- 5) Bangham, A. D.: Membrane models with phospholipids. *Prog. Biophys.* 18: 29—95, 1968
- 6) Gregoriadis, G. and Ryman, B. E.: Lysosomal localization of  $\beta$ -fructofuranosidase-containing liposomes injected into rat. *Biochem. J.* 129: 123—133, 1972
- 7) Dapergolas, G. and Gregoriadis, G.: Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats. *Lancet* 2: 824—827, 1976
- 8) Rahman, Y. E. and Wright, B. J.: Liposomes containing chelating agents, cellular penetration and a possible mechanism of metal removal. *J. Cell Biol.* 65: 112—122, 1975
- 9) Gregoriadis, G.: Targeting of drugs: Implications in medicine. *Lancet* 2: 241—247, 1981
- 10) Papahadjopoulos, D., Poste, G., Vail, W. J. and Biedler, L.: Use of lipid vesicles as carriers to introduce actinomycin D into resistant tumor cells. *Cancer Res.* 36: 2988—2994, 1976
- 11) Ritter, C., Leelyengar, C. and Rutman, R. J.: Differential enhancement of antitumor effectiveness by phospholipid vesicles (liposomes). *Cancer Res.* 41: 2366—2371, 1981
- 12) Khato, J., Priester, E. R. and Sieber, S. M.: Enhanced lymph node uptake of melphalan following liposomal entrapment and effects on lymph node metastasis in rats. *Cancer Treat. Rep.* 66: 517—527, 1982
- 13) Kaledin, V. I., Matienko, N. A., Nikolin, V. P., Gruntenko, Y. V. and Budker, V. G.: Intralymphatic administration of liposome-encapsulated drugs to mice: possibility for suppression of the growth of tumor metastases in the lymph nodes. *J. Natl. Cancer Inst.* 66: 881—887, 1981
- 14) Segal, A. W., Wills, E. J., Richmond, J. E., Slavin, G., Black, C. D. V. and Gregoriadis, G.: Morphological observations on the cellular and subcellular destination of intravenously administered liposomes. *Br. J. exp. Pathol.* 55: 320—327, 1974
- 15) Freise, J., Schmidt, F. W. and Magerstedt, P.: Effect of liposome-entrapped methotrexate on ehrlich ascites tumor cells and uptake in primary liver cell tumor. *J. Cancer Res. clin. Oncol.* 94: 21—27, 1979
- 16) Souhami, R. L., Patel, H. M. and Ryman, B. E.: The effect of reticuloendothelial blockade on the blood clearance and tissue distribution of liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 674: 354—371, 1981
- 17) Yatvin, M. B., Mühlensiepen, H., Porschen, W., Weinstein, J. N. and Feinendegen, L. E.: Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorodiammineplatinum (II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Cancer Res.* 41: 1602—1607, 1981
- 18) Suzuki, M., Hori, K., Abe, I., Saito, S. and Sato, H.: A new approach to cancer chemotherapy: selective enhancement of tumor blood flow with angiotensin II. *J. Natl. Cancer Inst.* 67: 663—669, 1981

- 19) Bartrum, R. J., Berkowitz, D. M. and Hollenberg, N. K.: A simple radioactive microsphere method for measuring regional flow and cardiac output. *Invest. Radiol.* 9: 126—132, 1974
- 20) Gregoriadis, G.: Drug entrapment in liposomes. *FEBS lett.* 36: 292—296, 1973
- 21) Kimelberg, H. K.: Differential distribution of liposome-entrapped [<sup>3</sup>H] methotrexate and labelled lipids after intravenous injection in a primate. *Biochim. Biophys. Acta* 448: 531—550, 1976
- 22) Tanaka, T., Taneda, K., Kobayashi, H., Okumura, K., Muranishi, S. and Suzuki, H.: Application of liposomes to the pharmaceutical modification of the distribution characteristics of drugs in the rats. *Chem. pharm. Bull.* 23: 3069—3074 1975
- 23) Gregoriadis, G., Neerunjun, D. E. and Hunt, R.: Fate of a liposome-associated agent injected into normal and tumor-bearing rodents. Attempts to improve localization in tumor tissues. *Life Sci.* 21: 357—370, 1977
- 24) Segal, A. W., Gregoriadis, G., Lavender, J. P., Tarin, D. and Peters, T. J.: Tissue and hepatic subcellular distribution of liposomes containing bleomycin after intravenous administration to patients with neoplasms. *Clin. Sci. mol. Med.* 51: 421—425, 1976
- 25) Hafström, L., Persson, B. and Sundovist, K.: Influence of vasoactive drugs on blood flow in subcutaneous tumors—an experimental study in rats. *J. surg. Oncol.* 14: 359—366, 1980
- 26) 瀬尾泰雄: 動注癌化学療法における血流変化の与える影響に関する研究 (第1報). *川崎医学会誌* 9: 133—148, 1983
- 27) 鈴木磨郎, 堀 勝義, 阿部郁夫, 斉藤祥子, 佐藤春郎: 腫瘍血管の機能病理学的研究. *癌の臨床* 28: 592—598, 1982
- 28) 宮崎 勝: 肝悪性腫瘍に対する制癌剤動注療法の検討—特に肝内薬剤動態と血管作動性薬剤の併用効果について. *日外会誌* 83: 1295—1306, 1982
- 29) Wickersham, J. K., Barrett, W. P., Furukawa, S. B., Puffer, H. W. and Warner, N. E.: An evaluation of the response of the microvasculature in tumors C3H mice to vasoactive drugs. *Bibl. Anat.* 15: 291—293, 1977
- 30) Ekelund, L. and Lunderquist, A.: Pharmacoangiography with angiotensin. *Radiology* 110: 533—540, 1974
- 31) Kaplan, J. H. and Bookstein, J. J.: Abdominal visceral pharmacoangiography with angiotensin. *Radiology* 103: 79—83, 1972
- 32) Bohr, D. F. and Uchida, E.: Individualities of vascular smooth muscles in response to angiotensin. *Circ. Res.* 20—21 (Suppl 2): 135—143, 1967
- 33) Scherphof, G., Roerdink, F., Hoekstra, D., Zborowski, J. and Wisse, E.: Stability of liposomes in presence of blood constituents: consequences for uptake of liposomal lipid and entrapped compounds by rat liver cells. *In Liposomes in biological systems*, ed. by Gregoriadis, G. and Allison, A. C. New York, John Wiley and Sons. 1980, pp. 179—209
- 34) 井上圭三: リポゾーム実験法と応用. 蛋白質 核酸 酵素 別冊 (生体膜実験法): 185—198, 1974