

## リポソーム化抗癌剤の動態

藤村 朗、安藤禎紀、鍵谷忠慶、杉山育美<sup>1</sup>、佐塚泰之<sup>1</sup>、高橋千衣子<sup>2</sup>、後藤祥子<sup>2</sup>、  
世良耕一郎<sup>3</sup>

岩手医科大学歯学部口腔機能構造学講座口腔解剖学分野  
020-8505 岩手県盛岡市中央通 1-3-27

<sup>1</sup>岩手医科大学薬学部創剤学講座  
028-3694 紫波郡矢巾町大字西徳田 2-1-1

<sup>2</sup>(社)日本アイソトープ協会滝沢研究所  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

<sup>3</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター  
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-58

### 1 はじめに

悪性腫瘍に対する化学療法とは宿主に似た物質であるが同一ではない病原体、癌細胞の標的物質を攻撃する選択毒性というところにターゲットを置いている。しかしながら、もともと自分の細胞であるものがアポトーシスを起こすことを忘れて活発に増殖し続けるようになったものが腫瘍であるため、抗癌剤を投与すると、正常な細胞でも抗癌剤の攻撃を受ける可能性がある。これが副作用である。我々は抗癌剤による化学療法により引き起こされる副作用を最小限に抑え、患者の QOL を向上させることを目的として、抗癌剤の投与量を少なくするための方策としてリンパ管経由の薬剤投与を推奨しており、口腔領域の諸臓器におけるリンパ管構築を検索し<sup>1-9)</sup>、薬剤投与部位として有効な部位や投与方法について検討している。当初、薬剤投与方法として腫瘍周囲に抗癌剤を注射することで原発部位、転移リンパ節に十分な量の抗癌剤が到達することを明らかにしたが、いくつかの問題点が発生していた<sup>10-12)</sup>。我々が行ってきた実験は小動物による基礎実験であったため、最大の問題は、投与のたびに麻酔をかけなければならないことであった。これをヒトに置き換えて考えると、投与のたびに痛みを与えることになり、患者に苦痛を与えることになる。経口投与はこの観点からは有効な投与方法ではあるが、投与量が多く

なるという欠点がある。もう一点の問題は注射した際の刺入点の創傷治癒が遅れることである。注射後、針を抜く際に生食水を少し注入してから抜いても組織中に注入した薬液が圧力で創傷部に逆流し、薬剤のために治癒が遅れる。また、注入量は極力少なくしなければ痛みを増大させることにもなり、できれば不要な注入は行いたくない。そこで、今回我々は注入した薬剤が徐放化されていることにより一度の注入で注入部位に薬剤が原発巣をたたくために残ること、また、注入部位から転移リンパ節（所属リンパ節）に必要濃度で流れ込むものを想定した基礎実験を行い、薬剤が必要量流れることを検討した。

## 2 実験材料および方法

### 2.1 材料

#### 2.1.1 動物

本実験ではマウス (C57BL/6) を 16 匹用いた。本研究は岩手医科大学動物実験委員会（動物実験倫理委員会を含む）の承認（21-053）を受けて岩手医科大学動物実験指針に従って行った。

#### 2.1.2 リポソーム化シスプラチン の調製法

抗癌剤は Cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum: CDDP、 MW:300.05、 Nippon Kayaku ) 粉末で日本化薬より供与を受けた。

リポソーム化シスプラチン の調製法を Fig.1 に示す。

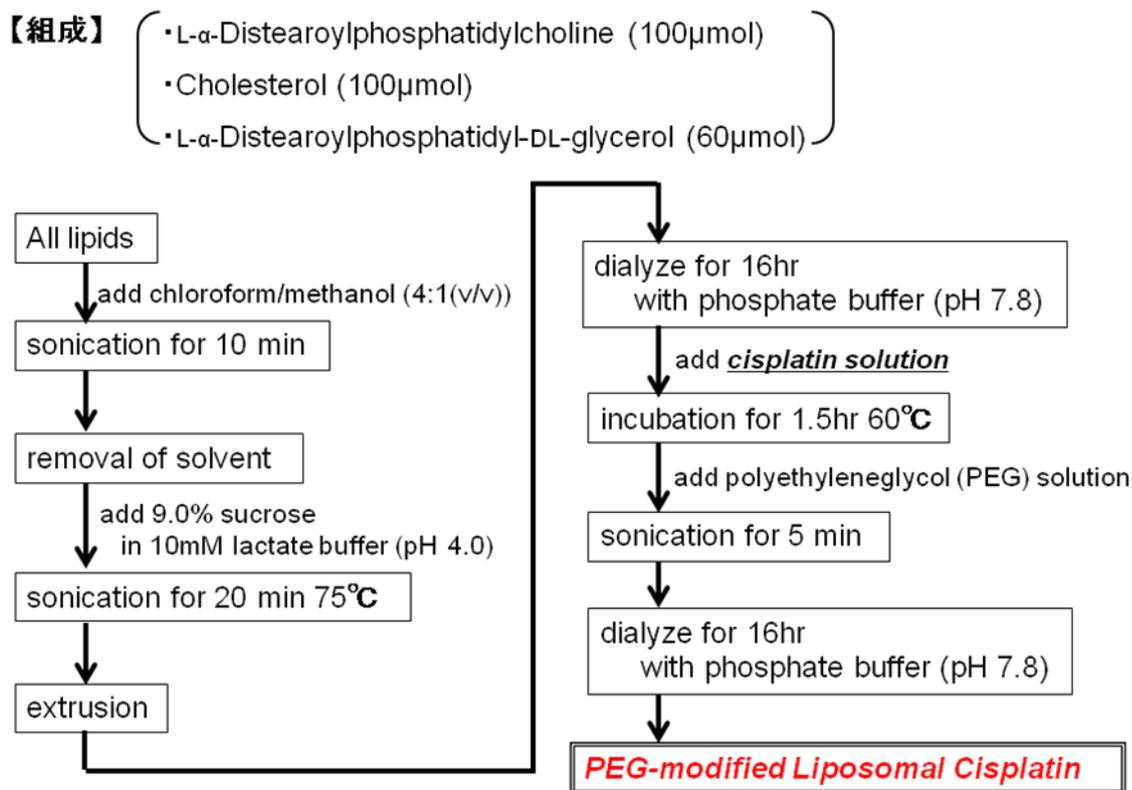


Fig.1 Liposomal Cisplatin の調製法

リポソーム化を完了したシスプラチン水溶液を直接 PIXE にて白金量計測を行い、1 匹のマウス舌に注入する白金量をシスプラチンに換算して 1 $\mu$ g/10 $\mu$ l に調整した。

## 実験 1

平均リポソームサイズ約 100 $\mu\text{m}\phi$ 、400 $\mu\text{m}\phi$ 、800 $\mu\text{m}\phi$  を作成し、白金の所属リンパ節への移行量の計測を行った。

## 実験 2

平均リポソームサイズは A 群 131.7nm $\phi$ (75.1%)と 748.0nm $\phi$ (24.9%)の混合、B 群 118.4nm $\phi$ (100%)の 2 種類を作製した。各群のリポソームの Volume データは A 群 116.0nm(59.9%)、793.1nm(40.1%)、B 群 106.5nm(100%)であった。

## 2.2 実験方法

動物はペントバルビタール腹腔内麻酔下に、実験 1 では 3 種類のサイズのリポソーム化シスプラチンを各 2 匹に、実験 2 では 2 種類のリポソーム化シスプラチンを各 5 匹の左側舌辺縁部に 10 $\mu\text{l}$  (白金量換算で 0.65 $\mu\text{g}$ ) を、24G 針を使用してマイクロシリンジにて注入した。注入 24 時間後にペントバルビタール過麻酔下に舌および左右の顎下リンパ節を摘出した。各試料は乾熱乾燥 (200 $^{\circ}\text{C}$ ) を 2 日間行った。舌については内部標準をインジウムとして加え、硝酸灰化法にて調整を行い、Particle Induced X-ray Emission (PIXE) により白金検出を行った。顎下リンパ節は乾燥重量が 1mg 未満であったため、世良の無調整・無標準法にて PIXE による白金検出を行った<sup>13-14)</sup>。

## 3 結果

### 3.1 実験 1

3 種類の平均リポソームサイズ(約 100 $\mu\text{m}\phi$ 、400 $\mu\text{m}\phi$ 、800 $\mu\text{m}\phi$ ) をマウスの左側舌辺縁部に注射し、24 時間後の舌内および所属リンパ節への白金の移行量の計測を行った。各試料の白金検出結果を Fig.2,3 に示す。

舌内においては、サイズの大きいリポソーム化シスプラチンは 24 時間後でも注入部位に小さいサイズのもの 2~3 倍量残存していたが、100 $\mu\text{m}\phi$  と 400 $\mu\text{m}\phi$  の間に大きな差は認められず、800 $\mu\text{m}\phi$  のみが多く残留していた。すべての試料において 2.6 $\mu\text{g/g}$  以上の白金が検出された(Fig.2)。

一方、舌の所属リンパ節である顎下リンパ節には、3 種類すべてのリポソーム化シスプラチンで、注射した左側において右側の 2~3 倍の白金量が検出された。検出された白金量は個体によるばらつきはあるが、概して大きいサイズのリポソーム化シスプラチンが多くなっていた。検出量が注入量より多く出ているのは顎下リンパ節の乾燥重量が 1mg より小さいためであり、縦軸の単位が  $\mu\text{g/g}$  であることから、実際に顎下リンパ節に移行した白金量はグラフの縦軸の 1/5~1/10 量と考えている。その結果、ほとんどのマウスの左右顎下リンパ節には 2.6 $\mu\text{g/g}$  以上の白金が検出されていた(Fig.2)。

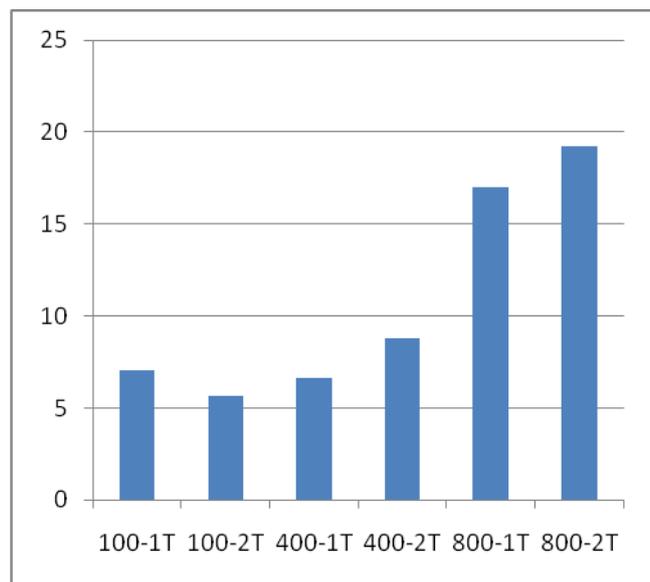


Fig.2 舌内における 24 時間後の白金残留量  
縦軸の単位 :  $\mu\text{g/g}$   
横軸の記号 : サイズー動物番号 T (舌)

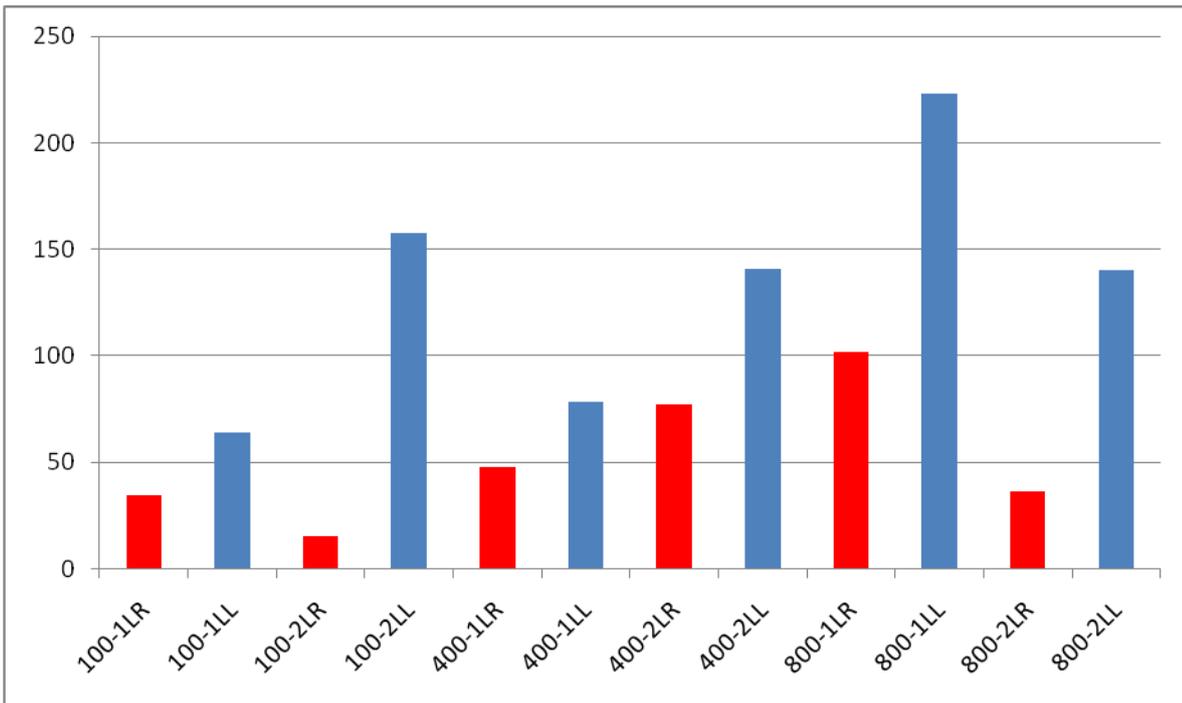


Fig.3 顎下リンパ節内における 24 時間後の白金検出量 縦軸の単位 : µg/g  
横軸の記号 : サイズー動物番号 L(顎下リンパ節)左右

### 3.2 実験 2

2種類のリポソーム化シスプラチン(平均リポソームサイズはA群 131.7nmφ(75.1%)と 748.0nmφ(24.9%)の混合、B群 118.4nmφ(100%))をマウスの左側舌辺縁部に注射し、24時間後の舌内および所属リンパ節への白金の移行量の計測を行った。各試料の白金検出結果を Fig.4 に示す。

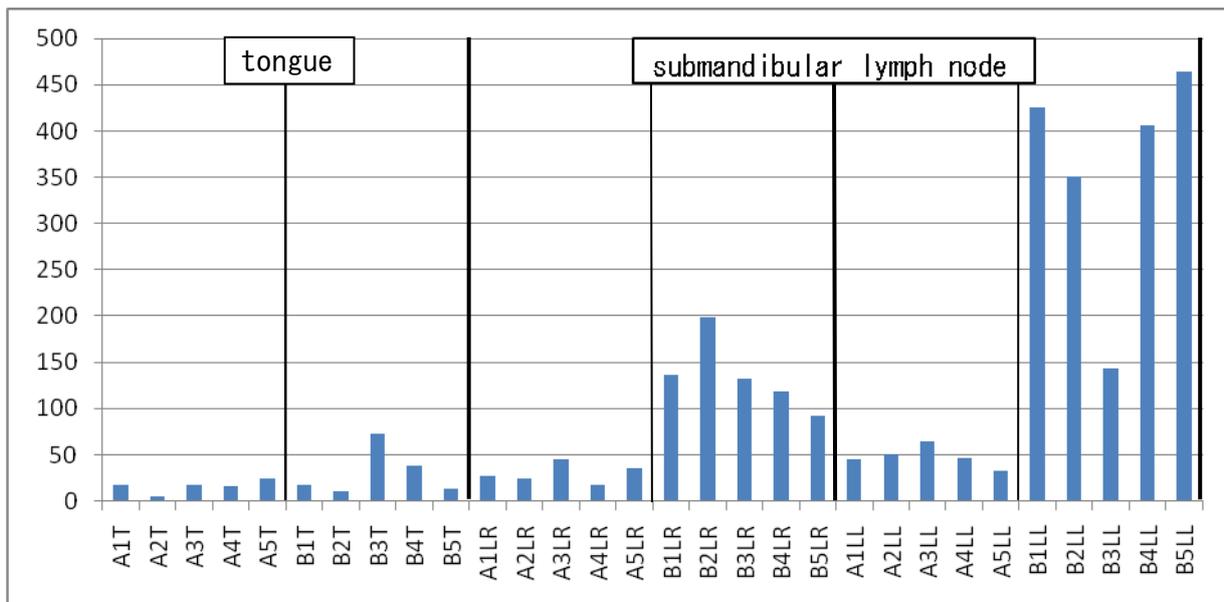


Fig.4 2種類のリポソーム化シスプラチンの舌内および顎下リンパ節内における 24 時間後の白金検出量 (A 群 131.7nmφ(75.1%)と 748.0nmφ(24.9%)の混合、B 群 118.4nmφ(100%))  
縦軸の単位 : µg/g 横軸の記号 : 群ー動物番号 T(舌)または L(顎下リンパ節)左右

舌内における 24 時間後の白金残留量は A 群、B 群ともに平均は差が認められなかった。B 群で、データにばらつきがみられた。しかしながら、すべての動物において 2.6 $\mu\text{g/g}$  以上の白金が検出された。結果として、サイズによる違いを認めなかった。

顎下リンパ節への白金の移行量には大きな差が認められた。すなわち、B 群（リポソームサイズが 100 $\mu\text{m}\phi$ ）が A 群（リポソームサイズが 100 $\mu\text{m}\phi$  と 800 $\mu\text{m}\phi$  の混合）より 2~3 倍量検出された。両群とも、舌における注射側である左側に多く検出されていたが、右側にもすべての動物において 2.6 $\mu\text{g/g}$  以上の白金が検出された。

#### 4 考 察

本研究の目的は徐放化した抗癌剤を腫瘍原発部に注入し、薬剤がリンパ管を介して所属リンパ節に十分量の濃度で到達するか否かを検討することである。我々は、抗癌剤の徐放化をリポソームの形で検証している。一方、リンパ管は血管より大きなサイズの粒子を吸収することが可能である。逆説的に言うと、血管に吸収されずにリンパ管にのみ吸収されることを期待しているわけである。今回我々が作成したリポソーム化シスプラチンは注入直後に体液に触れることで徐放が開始するため、本来の目的に合致した薬剤形態にまでは至っていないが、大きなサイズは注射局所に残留し、徐放する、小さいサイズはリポソームの形でもリンパ管に吸収されること、さらに、注射局所において徐放した薬剤は血管およびリンパ管の双方に吸収され、血管内に吸収されたものは大量の血液内で希釈されるが、リンパ管に吸収されたものは所属リンパ節に到達することを期待している。今回用いたシスプラチンは体液の蛋白と吸着することで、抗癌作用を喪失するため、フリーの状態の白金がいかに多く癌細胞に到達するかが、抗癌作用の効果としてあらわれるものである。過去の報告では、局所にシスプラチン水溶液を血管内に注射することで抗癌作用をあらわすこと（実際の臨床ではこの形態で投与）、局所に注射しても抗癌作用をあらわすことは確認しているが<sup>15-20</sup>、今回の研究では、さらに、リポソーム化された形の抗癌剤がリポソームの形でリンパ管に吸収され、リンパ節に到達し、そこで徐放することで、フリーの白金が転移リンパ節の癌細胞に直接働く可能性を検索したことになる。

実験 1 では、大きいサイズのリポソームは注射局所に残留していることを、実験 2 では注射 24 時間後に所属リンパ節に十分量の白金が検出された。形態的な検索を行っていないので、リポソームがリポソームの形でリンパ管に吸収されたのか、徐放後にリンパ節に到達したのかは不明であるが、大きいサイズのリポソームが注射局所に大量に残留していたこと、所属リンパ節には以前ウサギの移植実験<sup>10-12</sup>で報告したシスプラチンが抗癌作用を示す局所濃度が 4mg/kg(=4 $\mu\text{g}$ [シスプラチン]/g=2.6[白金] $\mu\text{g/g}$ )をはるかに超える濃度であったことは水溶液の状態では注射した実験より有効な方法であることが推測できた。また、抗癌剤の投与量では、今回の実験ではマウス 1 個体に対して 1 $\mu\text{g}$  を投与した。通常の場合、4mg/kg で投与するため、全身に対する投与量は 100 $\mu\text{g}/25\text{g}$  (個体) となる。この点からみても、投与量は血管内投与の 1/100 量である。また、過去の報告で、血管内注入による投与方法の場合、血管内に注入し、組織に到達した薬剤は体液に暴露しているため、抗癌作用をすでに失っており、局所に到達した薬剤の 8~10% が有効な薬剤であるとされている。この観点から、本研究で用いている投与方法はほぼ、局所に存在する薬剤は 100% の作用を保持していると考え、1/1000 の量でよいことになり、しかも、PIXE による定量結果から、必要濃度の 2~10 倍くらいの濃度で白金が検出されている。これらの結果は、現在臨床で使われている抗癌剤の投与方法の量を限りなく少なくすることが可能になることを示唆している。すなわち、投与した薬剤が最終的に血中に入り、全身をまわったとしても、副作用を引き起こす濃度ではないことになる。抗癌剤に限らず、化学療法の最大の問題点は副作用であり、その最大の原因は投与量である。我々が考案した抗癌剤の投与方法は量的に引き起こされる副作用を限りなく抑制し、その結果、患者の QOL を確保できるものと考えている。今後、実験的腫瘍実験において本法を用いて、抗癌作用を確認すること、さらに、徐放剤の改良（徐放開始の遅延、リポソームサイズ

の検討、リンパ管指向性の添加、粘膜経由の創剤化) を検討する予定である。

## 参考文献

- 1) 陳寛宏、藤村 朗：ゴールデンハムスターの舌におけるリンパ管の走行、岩手医科大学歯学雑誌、19：91-102、1994
- 2) 謝 雪峻、藤村 朗：舌のリンパ管による巨大分子クリアランスに関する研究、岩手医科大学歯学雑誌、25：273-282、2000
- 3) 梁 榮洲、藤村 朗：舌粘膜上皮下毛細リンパ管構築 -酵素組織化学的検索-、岩手医科大学歯学雑誌、25：283-291、2000
- 4) Akira Fujimura and Yohichiro Nozaka：Analysis of the three-dimensional lymphatic architecture of the periodontal tissue using a new 3D reconstruction method.、Microscopy Research and Technique、56：60-65、2002
- 5) A. Fujimura, S. Seki, M-Y. Liao, X. Hu, M. Onodera, Y. Nozaka：Three dimensional architecture of lymphatic vessels in the tongue.、Lymphology、36：120-127、2003
- 6) Min-Ying Liao and Akira Fujimura：The distribution of lymphatic vessels in gingiva.、Microvascular Reviews and Communications、2：2-7、2008
- 7) 佐藤 大、藤村 朗：頬粘膜下リンパ管の構築と分布量、岩手医科大学歯学雑誌、34：7-17、2009
- 8) Mikiko Masuyama, Akira Fujimura：Lymphatic distribution in the mouse periodontal ligament.、Microvascular Research and Communications、3：2-10、2010
- 9) Yoshinori Ando and Akira Fujimura：Lymphatic architecture of human periodontal tissue beneath the oral epithelium of the free gingiva.、Microvascular Research and Communications、3：17-24、2010
- 10) Shotaro Seki and Akira Fujimura：Three-dimensional changes in Lymphatic architecture around VX2 tongue cancer. -Dynamics in growth of cancer -、Lymphology、36：128-139、2003
- 11) Shotaro Seki and Akira Fujimura：Three-dimensional changes in Lymphatic architecture around VX2 tongue cancer. -Dynamics by administering of antiangiogenic agent -、Lymphology、36：199-208、2003
- 12) Toshihiro Ohta and Akira Fujimura：The anti-angiogenic agent, E7820, induces changes in the architecture of lymphatic vessels around tumors.、Dent. J. Iwate Med. Univ.、29：79-92、2004
- 13) Sera, K., Terasaki, K., Itoh, J., Futatsugawa, S, Saitoh, Y. and Fujimura, A.：Simultaneous Multi-element (Including Fluorine) Analysis of Various Bio-medical Samples.、Int'l Journal of PIXE、15：3,4 169-180、2005
- 14) Sera, K., Itoh, J., Goto, S., Saitoh, Y., Fujimura, A., Nosaka, Y., Noda, Y., Nishizuka, S. and Wakabayashi, G.：Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients and Experimental Animals; Standard-free Method for Organ、Int'l Journal of PIXE、18：3,4 111-122、2008
- 15) 藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、太田敏博、齊藤恒夫、二ツ川章二、世良耕一郎：薬剤輸送経路としてのリンパ管の検証、第12回NMCC共同利用研究成果発表会、2005
- 16) 藤村 朗、佐藤 大、庄司 美樹子、小野寺 政雄、西村 智尚、野坂 洋一郎、伊藤 じゅん、世良 耕一郎：頬粘膜下リンパ管の薬剤吸収能 -バツカル錠を想定して-、第13回NMCC共同利用研究成果発表会、2006
- 17) 藤村 朗、野坂 洋一郎、世良耕一郎：頬粘膜および口蓋粘膜経由の抗癌剤投与、第14回NMCC共同利用研究成果発表会、2008
- 18) 藤村 朗、古城慎太郎、香木千尋、安藤禎紀、小野寺政雄、野坂洋一郎、世良耕一郎：生体からのPIXE試料採取法の改善、第15回NMCC共同利用研究成果発表会、2009
- 19) Akira Fujimura, Ikumi Sugiyama, Yasuyuki Sadzuka, Yohichiro Nozaka：The development of sustained release preparation. -Local administration using the lymphatic system-、第35回日本微小循環学会、2010
- 20) 藤村 朗、安藤禎紀、鍵谷 忠慶、杉山育美、佐塚泰之、高橋千衣子、後藤祥子、世良耕一郎：リポソーム化抗癌剤の動態第、15回NMCC共同利用研究成果発表会、2010

## The dynamics of liposomal anti-tumor agent

A. Fujimura, Y. Ando, T. Kagiya,  
I. Sugiyama<sup>1</sup>, Y. Sadzuka<sup>1</sup>, C. Takahashi<sup>2</sup>, S. Goto<sup>2</sup> and K. Sera<sup>3</sup>

Department of Oral Biology, Division of Oral Anatomy,  
School of Dentistry, Iwate Medical University  
1-3-27 Chuo-dori, Morioka 020-8505, Japan

<sup>1</sup>Department of Advanced Pharmaceutics, School of Pharmacy, Iwate Medical University  
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, Japan

<sup>2</sup>Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association  
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

<sup>3</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### Abstract

The aim of this experiment was to confirm that the platinum reaches to the regional lymph node ( submandibular lymph node ) or not when the liposomal cisplatin was injected to the mouse tongue.

The liposomal cisplatin was injected in the mouse tongue under anesthesia. After 24 hours, the tongue and the both side of submandibular lymph nodes were extracted, and then they were desiccated in the dryer at the 200 degree centigrade overnight. The tongues were treated by the chemical ashing method using nitric acid adding with Indium as the internal standard. The submandibular lymph nodes were treated by the standard-free method using the PIXE.

The large size of liposome remained in the tongue more than the small size of liposome. The enough quantity of platinum was accumulated in the regional lymph nodes ( over 2.6 $\mu$ g/g ). The large size (about 800 nm $\phi$ ) of liposome was very useful for the sustained release agent.

We believe that this method is useful for control to the side effects caused by the administration of anti-tumor agent.