

改良型徐放製剤（リポソーム化抗癌剤）の体内動態

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

岩手医科大学解剖学講座機能形態学分野
028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1

¹岩手医科大学薬学部創剤学講座
028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1

²（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

³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

癌に対する化学療法の欠点は副作用の発症である。その最大要因は投与量であるが、減量することで抗癌作用が低下することは明らかである。我々は口腔領域のリンパ管構築を検索しつつ¹⁻⁹、PIXEを用いて、腫瘍原発部に薬剤を直接投与し、腫瘍局所の抗癌剤の濃度を確保できること、所属リンパ節への抗癌剤の移行を確認した¹⁰⁻¹⁸。さらに、抗癌剤を徐放製剤化しても同様に濃度を確保できることをPIXEによる測定で明らかにした^{19,20}。この徐放製剤は注入直後から徐放が始まるため、注射針の刺入点の創傷治癒が遅れることが懸念された。今回、我々はリポソーム化徐放製剤をさらに抗癌剤を含まないリポソームにてコーティングすることで抗癌剤の徐放を遅延させることを想定し、製剤が原発巣および所属リンパ節にどの程度移行するかを検討し、同様の結果を得ることができたのでその詳細を報告する。

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/6J) を 15 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。

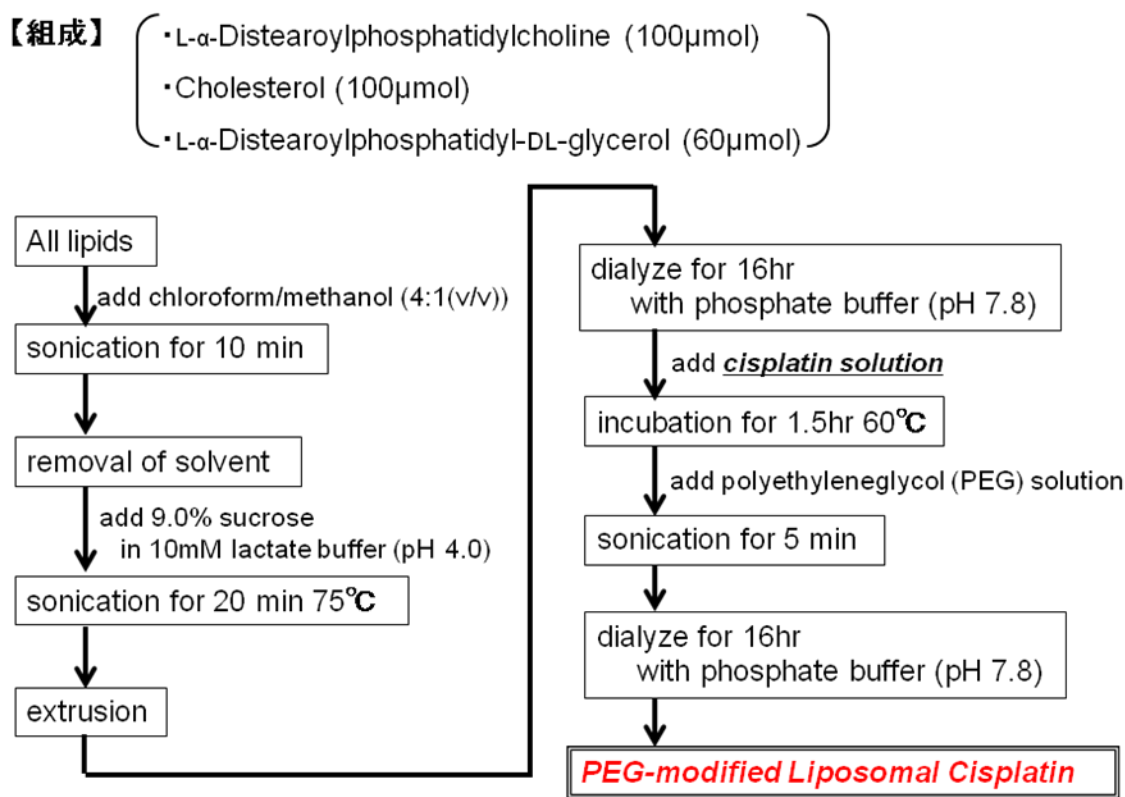


Fig.1 Liposomal Cisplatin の調製法

改良型リポソーム化シスプラチンは Fig.1 により作製したリポソーム化シスプラチンの表層にシスプラチンを含まないリポソームでコーティングした。このことにより、改良型リポソーム化シスプラチンは白金を徐放するまでにしばらくの時間が必要となる。実際、ウシ胎仔血清による暴露実験では 2-4 時間後から白金の徐放が始まっていることを確認した。今回作成したリポソームサイズは従来型のリポソームが約 100nm ϕ 、800nm ϕ で、改良型が約 800nm ϕ であった。これらのリポソーム化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 μ g/10 μ l に調整した。

2.2 実験方法

動物はペントバルビタールナトリウム塩 (ソムノペンチル) 腹腔内麻酔下に、3 種類のサイズ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 μ l (シスプラチン量換算で 1 μ g = 白金量換算で 0.65 μ g) を、24G

針を使用してマイクロシリンジにて注入した。注入直後からピンセットによりマウスの舌全体を上下的に挟み、毎秒1回の割合で舌のマッサージを5分間行った。その後、舌および左右の顎下リンパ節を摘出した。顎下リンパ節の摘出に際しては輸入および輸出リンパ管を顕微鏡下で確認し、結紮することで試料摘出時の圧迫によるリンパの絞り出しを極力抑えた。各試料は乾熱乾燥(200℃)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、硝酸灰化法にて調製を行い、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、世良の無調製・無標準法にてPIXEによる白金検出を行った¹³⁻¹⁴⁾。

3 結果

注入用に使用した3種類のリポソーム化シスプラチンの白金含有量をPIXEにて計測した。その結果は、従来型100nmφには8.5μg/ml、従来型800nmφには18.3μg/ml、改良型800nmφには61.2μg/gの白金が含有されていた。従来型100nmφと比較すると従来型800nmφには約2倍の、改良型800nmφには約8倍の白金が含有されていたことになる。

3種類のリポソーム化シスプラチン(従来型100nmφ、従来型800nmφ、改良型800nmφ)をマウスの左側舌辺縁部に注射し、5分間のマッサージ後の舌内および所属リンパ節(顎下リンパ節)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.1に示す。各5匹に注入したが、測定結果で白金が検出できなかった試料があったため、各群の例数にばらつきが出た。

リポソーム化シスプラチンを左側舌辺縁部に注入し、5分間のマッサージ後の同側(左側)顎下リンパ節には従来型100nmφで平均28μg/g、従来型800nmφで平均31μg/g、改良型800nmφで平均22μg/g、反対側(右側)顎下リンパ節では従来型100nmφで平均17μg/g、従来型800nmφで平均38μg/g、改良型800nmφで平均21μg/gの白金がPIXEにより検出された。

これらの結果に対して注入液の含有白金量を併せて計算して従来型100nmφと比較すると従来型800nmφは約半分量、改良型800nmφは約1割がリンパ節に流入したことになる。

4 考察

癌に対する化学療法における薬剤投与方法には経口投与、血管内投与が考えられ、後者については動脈内注入法(選択的動脈内注入法、超選択的動脈内注入法)が開発されてきている。また、薬剤としては通常の抗癌剤に加えて、血管新生阻害薬、分子標的薬の開発、臨床応用が進められてきている。が、いずれの薬剤でも、さらに投与方法を用いても副作用は避けて通れないものとなっている。我々が推奨している原発巣周囲への直接注入は原発巣そのものの細胞増殖抑制に加えて、所属リンパ節への転移および転移巣における細胞増殖抑制が期待でき、しかも全身への投与量が1/100量であることから副作用の発症はほとんどないものと推測できる。この方法における欠点として、薬剤注入時の刺入点に接触する薬剤が創傷治癒を遅延させること、毎回注入時に疼痛(動物の場合には麻酔が必要)となることである。今回、我々はこれら2点の問題点を解決させる方法として、注入直後には薬液が組織に暴露しないこと、組織内に入ってから徐放(=リポ

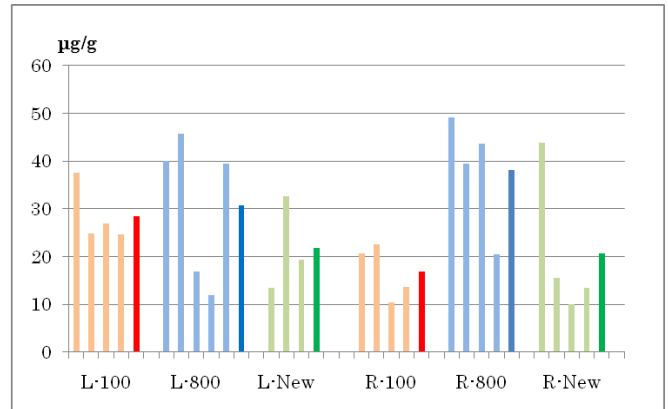


Fig.1 顎下リンパ節内の白金量
(各群の右端の濃い色のカラムは平均値を示す。)
L: left submandibular lymph node, R: right submandibular lymph node
100: 従来型100nmφ, 800: 従来型800nmφ, New:改良型800nmφ

ソームの崩壊)に一定時間(今回のものは約2時間後から崩壊が開始、約24時間で徐放終了)かかることを確認して本研究に着手し、3種類のリポソーム化シスプラチン(従来型100nmφ、従来型800nmφ、改良型800nmφ)をマウスの左側舌辺縁部に注射し、5分間のマッサージ後の舌内および所属リンパ節(顎下リンパ節)への白金の移行量の計測をPIXEによって行った。

計測結果のデータ数のばらつきについては、試料採取の際のタイミングによるものと考えている。輸入リンパ管、輸出リンパ管は結紮しているので試料採取中および試料調製中にミスはないものと考え、リンパ節ではある一定量まで輸入リンパ管からのリンパが蓄積され、それを越えると一挙に輸出リンパ管から流出することを我々の過去のデータで証明している²⁾。そのため、流出直後からリンパの蓄積が完了するまでの間にはリンパそのものの量にばらつきが出るためと推測している。

本研究の目的は徐放化した改良型リポソーム化シスプラチン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到達するか否かを検討することである。少なくとも、注入したリポソーム化シスプラチンでは従来型、改良型ともに20-30μg/gの白金が顎下リンパ節で検出された。ウサギによる抗癌作用を示す理論上の白金量は2.6μg/g(シスプラチン換算で4μg/g)であるので、顎下リンパ節内では約10倍量の白金が検出されたことになる。舌内にシスプラチンを1μg(0.1mg/ml濃度のシスプラチンを10μl)注入したので、白金量としては0.65μgを注入した。この値を全身に対しての投与量として計算すると0.03μg/gの投与量となる。白金量に換算すると約0.02μg/gとなり、理論上の抗癌作用を示す濃度の約1/100量となる。

抗癌剤をリポソーム化した本剤形の欠点は初期バーストである。改良型リポソーム化シスプラチンでも注入直後のバーストは発生したようで、従来型のリポソームに比べて改良型リポソームからの白金徐放が少ない傾向は認められたが、統計を取っていないので有意に低いかどうかは不明である。しかしながら、従来型より徐放開始が遅かったことで、少ない傾向が認められたことは今後の本製剤剤形開発に大きな可能性を見出すことができたものと確信している。薬剤を含まないリポソームのコーティングの厚さを増すことは初期バーストの予防になると思われること、製剤のサイズが大きくなることで、血管内への直接的な輸送を確実に抑制できることが考えられる。今後、リポソームのコーティング厚さと徐放の時間関係、リポソームサイズとリンパ管吸収の関係を詳細に検討していきたいと考えている。

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、2009

Dynamics of improved sustained release agent
- Liposomal anti-tumor agent - -

A. Fujimura, Y. Ando, T. Kagiya,
I. Sugiyama¹, Y. Sadzuka¹, C. Takahashi², S. Goto² and K. Sera³

Division of Functional Morphology, Department of Anatomy
Iwate Medical University
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, JAPAN

¹Department of Advanced Pharmaceutics, School of Pharmacy
Iwate Medical University
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba-cho, Shiwa-gun, Iwate 028-3694, JAPAN

²Takizawa Institute, Japan Radioisotope Association
348-1 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

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

Abstract

The negative aspect of chemotherapy for cancer is the appearance of side effects which are mostly linked to the dosage of anti-tumor agents. It is clear that a decrease of dosage results in the decrease of anti-tumor activity. Besides searching for lymphatic architecture in the oral region, we have confirmed by using PIXE that it was possible to secure the concentration of anti-tumor agent in the tumor periphery, and also a transition of the agent to the regional lymph nodes when administered directly around tumor.

We also examined by a PIXE analysis that the concentration of anti-tumor agent were equally maintainable when administrated as a slow-release drug. This liposomal sustained release agent starts releasing immediately after injection. Therefore it was concerned to cause a delay in healing of wounds due to injection needle. We assumed a slowdown in releasing speed, when the liposomal sustained-release agent was enclosed by an additional non-cisplatin liposome coating.

In this experiment, we examined the extend of platinum accumulation in the regional lymph node of the tongue(submandibular lymph node) when the improved sustained release liposomal cisplatin was injected in the mouse tongue.

As a result, we were able to obtain the similar result to past our results. We think this sustained release agent is useful for cancer chemotherapy because we can select many kinds of anti-tumor agent.