

外郭改良型徐放製剤（リポソーム化抗癌剤）の動態

安藤禎紀、藤村 朗、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

化学療法欠点の欠点は用量依存性に発症する副作用の存在である。投与量を減量することで副作用の発症は確実に抑えられるが、抗癌作用が低下することは明らかである。我々は口腔領域の抗癌剤投与に有効に使えるリンパ管構築部位を検索しつつ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、さらに徐放時間を延長させる強化型リポソームを開発し、同様の検索を行った。その結果、白金の注入量を過去の注射法と同じに調整することで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。

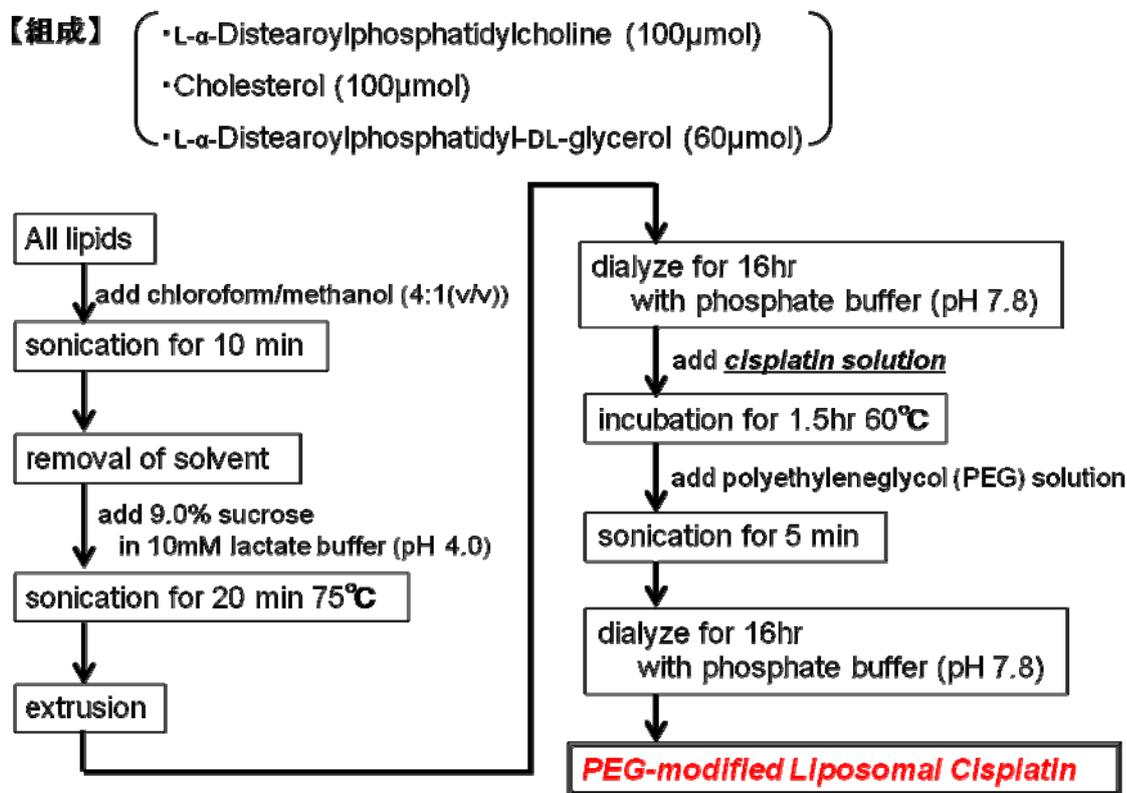


Fig.1 Liposomal Cisplatin の調製法

リポソームのサイズは extrusion に用いるフィルターの目の粗さで決定した。改良型リポソーム化シスプラチンは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をコーティングすることで作成した。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。さらに、リポソームの硬さを調整することで、徐放時間の延長を試みた。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 100nm 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。

Table 1 今回用いた各種シスプラチンの1ml中に含まれている白金量 (PIXEによる計測値)

剤型	白金量(PIXE 値: $\mu\text{g/ml}$)
CDDP Solution(0.1mg/ml)	55.33063 \pm 2.7924
Standard Liposome(100nm ϕ)	17.48511 \pm 0.6705
Hard Liposome	14.90847 \pm 0.6869
Wrapped Liposome	27.59524 \pm 1.0704

2.1.3 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種類のリポソーム化シスプラチンと、コントロールとしてシスプラチン水溶液 (0.1mg/ml) を各5匹のマウスの左側舌辺縁部に10 μl (シスプラチン量換算で1 μg =白金量換算で0.65 μg) を、24G針を使用してマイクロシリンジにて注入した。5分後群については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、30秒に1回の割合で舌のマッサージを5分間行った。4時間群は麻酔から覚醒するまで放置しておき、覚醒から4時間後に過麻酔による屠殺後、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^{13,14)}。

3 結果

注入したシスプラチン4種類の白金含有量をPIXEにて計測した。その結果は、シスプラチン0.1mg/ml中に55.3 $\mu\text{g/ml}$ 、Standard Liposomeに17.5 $\mu\text{g/ml}$ 、Hard Liposomeに14.9 $\mu\text{g/ml}$ 、Wrapped Liposomeに27.6 $\mu\text{g/ml}$ の白金が含まれていた。

3種類のリポソーム化シスプラチン (Standard Type (100), Hard(H), Wrapped Type(W)) をマウスの左側舌辺縁部に注入し、5分間のマッサージ後(5min)、および麻酔からの覚醒4時間後(4h)の所属リンパ節 (顎下リンパ節:SM) への白金の移行量計測を行った。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、試料調整中にミスがあり各群の例数にばらつきが出たため平均値のみを示す。シスプラチン水溶液を注入し、5分間のマッサージ群では注入側である左側に16.2 $\mu\text{g/g}$ が舌から顎下リンパ節に移行していた。一方、反対側の顎下リンパ節にも約半分の8.4 $\mu\text{g/g}$ が舌内での拡散およびリンパ管交差により到達していた。Standard Type 100nm ϕ の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7.4 $\mu\text{g/g}$ が、反対側には3.3 $\mu\text{g/g}$ の白金が、Hard Typeでは同側に13.6 $\mu\text{g/g}$ 、反対側に15.1 $\mu\text{g/g}$ が、Wrapped Typeでは同側に8.1 $\mu\text{g/g}$ 、反対側に9.7 $\mu\text{g/g}$ が到達していた。注入4時間後では、シスプラチン水溶液での検索を行わなかったが、Standard Typeで同側に12.8 $\mu\text{g/g}$ 、反対側で4.3 $\mu\text{g/g}$ 、Hard Typeで同側に11 $\mu\text{g/g}$ 、反対側に10 $\mu\text{g/g}$ が、Wrapped Typeで同側に10.4 $\mu\text{g/g}$ 、反対側に13.8 $\mu\text{g/g}$ が到達していた。

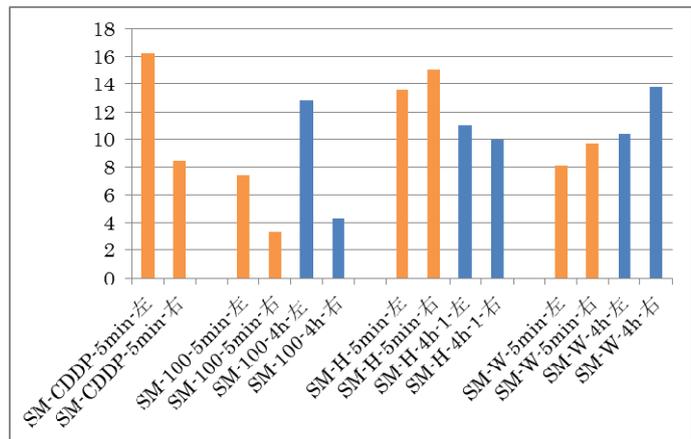


Fig.1 顎下リンパ節内の白金量
100: Standard Type, H: Hard Type, W: Wrapped Type

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、分子標的薬の開発等の臨床応用が進められてきている。が、いずれの薬剤でも、さらにどのような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癌細胞増殖抑制が期待でき、しかも全身への投与量が 1/100~1/1000 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の徐放（=リポソームの崩壊）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）かかるリポソーム化シスプラチン（**Wrapped Type**）、注入後の徐放時間が 48 時間のリポソーム化シスプラチン（**Hard Type**）の剤型を設計した。これらに加えて、本来の薬剤であるシスプラチン水溶液、リポソーム化シスプラチンの基本である 100nmφ を比較として検索した。マウスの左側舌辺縁部に注射し、5 分間のマッサージ後と、麻酔からの覚醒を確認して 4 時間後のマウス舌の所属リンパ節（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整中にミスはないものと考えているが、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周囲部に注入し、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。ウサギによる抗癌作用を示す経験上の白金量は 2.6μg/g（換算シスプラチンで 4μg/g）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 2.6μg/g 以上の白金が顎下リンパ節で検出された。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 以下となり、理論上の抗癌作用を示す濃度の約 1/100 量以下となる。

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、リポソームのサイズとリンパ管の吸収との関係を徐放時間のさらなる延長、徐放までの時間延長、初期破裂の防止の観点から、刺入点における創傷治癒の時間との関係、そして実験的腫瘍における癌細胞増殖抑制の観点から検証を行う予定である。

参考文献

- 1) 陳寛宏、藤村 朗：ゴールド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
- 21) 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

Dynamics of the outer shell improvement type sustained-release agent —Liposomal anti-tumor agent—

Y. Ando, A. Fujimura, 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

A negative aspect of cancer chemotherapy is dosage dependence. We have determined that cancer cell growth is inhibited even if we reduced the amount of medicine by 100-1000X through injection of the anti-tumor agent around the tumor. In animal experiments, problems with this method include a delay in injection wound healing and the requirement of anesthesia for each injection. Therefore, in this study, we examined the methods of administration of an anti-tumor agent to reduce the number of injections, and studied a sustained release agent to control medication release.

In this study, we constructed a Hard Type Liposome controlled release medication that was designed to control release for 48 hours after infusion. We also constructed a Wrapped Type Liposome controlled release medication that controlled the release start after infusion for two hours. After administration of these two liposomes, normal liposomes and an anti-tumor agent water solution, we examined the pharmacokinetics (the transition from the tongue to a submandibular lymph node) of the platinum using PIXE.

The Hard Type and Wrapped Type Liposomes showed a quantity of transition similar to the cisplatin solution and Standard Type Liposomes. Over 2X the concentration of platinum (2.6µg/g) in the local tissue was detected that shifted to the submandibular lymph node, a lingual regional lymph node.

Continuing experiments will examine the prolongation of the controlled release time, the prevention of the initial explosion, the vulnerary relation with the time from implantation, and the cancer cell growth suppression in the experimental tumor.