

徐放性抗癌剤（リポソーム化シスプラチン）の領域リンパ節への移動量

安藤禎紀¹、森 弓里子¹、杉山育美²、佐塚泰之²、後藤祥子³、細川貴子³、世良耕一郎⁴、
藤村 朗¹

¹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
028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1

²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

³日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

⁴岩手医科大学サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 緒言

本発表は NMCC 共同利用研究課題『食虫目スunksの歯科領域における実験動物としての有用性』の一環として行っている。歯科領域においては一般的に用いられている小型実験動物のほとんどはマウスであるが、口腔領域の形態学研究に用いるには顎骨の形態、歯の数などほとんどすべての領域においてヒトを想定した研究には不適であることは明白である。一方、食虫目スunksは有胎盤哺乳類の原型を保っていると言われている小型実験動物である^{1,2}。マウスの歯は $I1/1C0/0P0/0M3/3=16$ であるのに対してスunksの歯は $I3/1C1/1P2/1M3/3=30$ である。ヒトは $I2/2C1/1P2/2M3/3=32$ であることを考えると、明らかに人に近いことが想定できる。この動物を使って、癌の化学療法の薬剤剤形を徐放化すること、投与部位を経口や血管内ではなく、腫瘍周囲に直接、低濃度を少量投与することで、副作用の発症を抑制し、さらに、過去の抗癌剤で、腫瘍には著効を示すが、副作用のために排除された薬剤の発掘を目的として本プロジェクトを行っている。

2 実験材料および方法

実験に用いた抗癌剤は白金製剤シスプラチン（日本化薬より供与）を用いた。シスプラチン【 $cis-[PtCl_2(NH_3)_2]$ 】はその構造の中に白金を約 65%含んでいる。

実験に用いたスunksは平成 24 年より当時名古屋大学の織田銃一先生より分けていただいていたが、岩手

医科大学実験動物センター飼育室の環境が整わず、繁殖に至らなかったが、平成 26 年よりセンターの環境が整い、繁殖に成功した動物を用いた（岩手医科大学動物実験実施許可 承認番号 22-027）。

実験はシスプラチンを 10mg/20ml に調整した液剤 10 μ l (Pt3.25 μ g) と 100 μ l (Pt32.5 μ g) を腹腔内投与（全身投与群）、10 μ l (Pt3.25 μ g) を右側舌辺縁部に注射にて注入（局所投与群）するグループと、徐放製剤化抗癌剤としてリポソーム化シスプラチン 10 μ l (Pt7.5 μ g) を舌辺縁部に注射にて注入（徐放局所投与群）するグループに分け、さらにそれらの薬剤投与から試料採取までの時間を 1 時間、24 時間、48 時間とし、各群 3 匹、合計 30 匹を供した（表 1）。

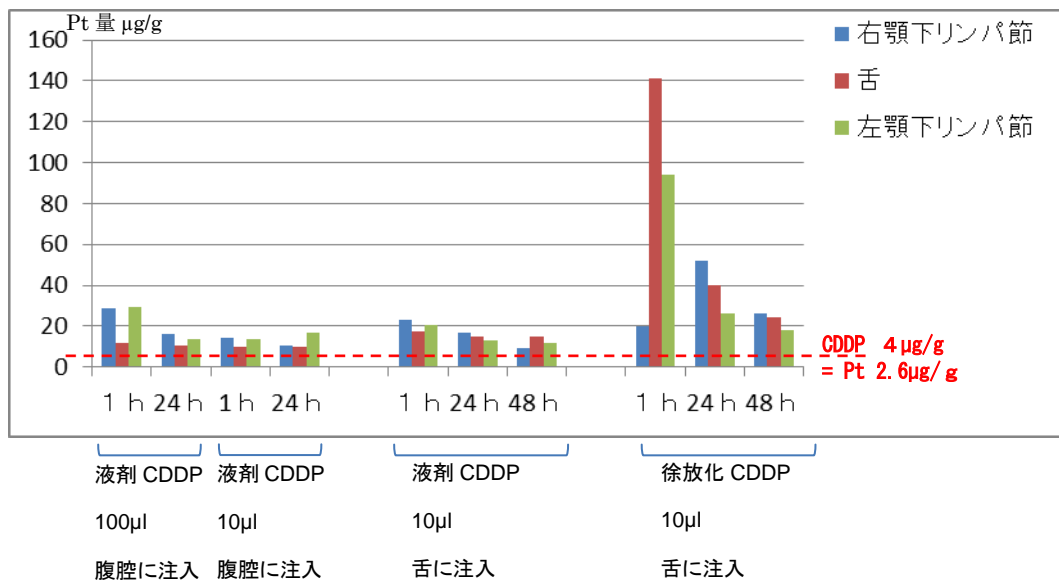
表 1

		徐放製剤		液剤	
		10 μ l	10 μ l	10 μ l	100 μ l
腹腔内 投与	1H			3	3
	24H			3	3
舌内投与	1H	3	3		
	24H	3	3		
	48H	3	3		

すべての動物は実験前に全身状態および口腔内に異常のないことを確認した。イソフルランによる吸入麻酔後、グループごとに腹腔内または舌内にそれぞれ調整した薬剤を注入した。覚醒を確認してから 1 時間、24 時間、48 時間で CO₂ による安楽死後に舌および左右側顎下リンパ節（舌の領域リンパ節）を採取した。試料はただちに 100 $^{\circ}$ C の乾熱乾燥機にて 2 日間乾燥し、舌は硝酸灰化法（In 内部標準）、顎下リンパ節は世良が開発した無標準法³を用いて、岩手県滝沢市にある日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター内の Particle Induced X-ray Emission（PIXE）による元素分析を行い、白金量を計測した。

3 結果

PIXE による白金の計測結果をグラフに示す。



液剤 CDDP を腹腔内に注入すると、顎下リンパ節の白金量は注入量 10 μ l、100 μ l 共に 1 時間後から 24 時間後で半分に減少していたが、舌ではほとんど変化がなかった。さらに初期投与量の多寡にかかわらず、24 時間後ではほぼ同様の検出量になっていた。

液剤 CDDP を舌内に 10 μ l 注入すると、1 時間後から 48 時間後にかけて舌の領域リンパ節である顎下リンパ節内に検出した白金量は半減していたが、舌内での白金量はほとんど変化しなかった。

リポソーム化により徐放化した CDDP は 1 時間後の右顎下リンパ節のデータを除くと液剤に比較してかなり大量の白金が舌内に残留しており、1 時間後から 48 時間後への減少は対数グラフ的に減少しているが、液剤の倍量が検出された。リポソーム化 CDDP の単位あたりの白金含有量は液剤の約 2 倍であったことから考えると妥当な量が検出されたと考える。

4 考察

本研究での第一目標は抗癌剤を投与した結果、副作用が発症しないこと、投与量を少なくした結果として腫瘍増殖抑制効果が減少しないことであったが、げっ歯類のマウスでは副作用としては腎臓機能の減少からマウスが死亡するまで確認できなかった。一方、スunks は投与量が多い場合には副作用としてまず嘔吐反応を示すことが知られており⁴、予備実験で腹腔内投与の場合に 1mgCDDP/個体で嘔吐反応を示すことを確認している。さらに過去の研究でウサギの VX2 移植舌癌への耳静脈内投与が 4mg/kg で著効を示すことを我々は確認しており⁵、動物種は異なるが、マウスにおいてもスunks においても組織局所濃度が 4mgCDDP/kg(2.6 μ gPt/g)を目標とした⁶⁻¹⁵。ちなみにこの量はヒトにおいては副作用が確認される量である。

今回注入したリポソーム化 CDDP の白金含有量は 751 μ g/ml なので注入量 10 μ l 中の白金量は 7.15 μ g であり、液剤中の白金量は 3 μ g/10 μ l であった。今回用いたスunks は雄雌混合であったため、体重 30-50g、年齢は 1.5-2 年のばらつきがあったため、あくまで局所の検出量での考察を行う事にした。

腹腔内投与 (=全身投与) の場合、最初の投与量が 10 倍であっても 24 時間後にはほぼ同量の検出量であり、1 時間後の半分以下になっていた。しかも、CDDP の効能書きには 24 時間で 98%が血漿タンパクと結合することが記載されており、経口および血管内投与は初期投与量の多寡を問わず、24 時間後には同程度の量 (=効能) しか残っていないことが判明した。一方、局所に直接投与すると、徐々に減少し、48 時間後の白金量が全身投与の 24 時間後の量に匹敵していた。しかも、24 時間後では全身投与の倍量が検出された。局所投与の有効性を推測させたが、CDDP の効能書きの 24 時間で 98%が血漿タンパクと結合するという意味において、48 時間後までの白金残留は意味のないものとなっている。一方、リポソーム化により、徐放化した薬剤の局所残留が多いこと、48 時間経過後も薬剤の移行が液剤の倍くらいを維持していること、加えてこの残留している白金はリポソームが崩壊し続けている限り新鮮な白金であり、血漿タンパクとの結合はほとんどがしていない白金であると考えることができる。これは徐放化製剤の局所直接投与が癌化学療法にとって非常に有効であることを推測させるものであると考える。

一方、今回の PIXE による計測結果は過去の報告よりも比較的大量に検出されていた。過去の実験では製剤を作成してから、含まれている白金量を計測し、投与量を計算してから動物実験を行ったため、製剤作成から 2 か月くらい経過したものを使用していた。今回は時間の関係から製剤作成直後のものを使用し、その後に投与薬剤の白金含有量を計測したため、非常に新鮮な薬剤を使用したことになる。徐放製剤は作成後の時間によりリポソームの自然崩壊が起り、液中に白金が露出している可能性があるため、今後は製剤作成

後の時間にも注意して実験計画を立てる必要があると考えた。

今回の結果も過去の報告と同様、舌局所に直接低濃度・低用量の CDDP を投与することで組織には壊死を確認することはなく、48 時間後までの間、舌局所および領域リンパ節である顎下リンパ節に 2.6 μ g/g 以上の白金が蓄積していることが確認できた。この量でスunks自体の抗腫瘍効果は確認していないが、ヒトの体表面積に換算するとヒトはスunksの約 100 倍であり、ヒトの舌を想定すると約 0.2mg を舌に注入することで効果がある可能性が示唆された。ヒトの全身投与が約 100mg を基準に考えた場合に血管内投与量の 1/500 量となる。経口投与量に比較すると 1/1000 以下になる。今回用いたリポソーム化 CDDP は血漿に触れると徐放が開始し、24 時間継続するものを使用したが、24 時間で CDDP の 98% が血漿蛋白と結合することと、徐放時間を延長できれば投与量をさらに減少させることが可能であると考えている。すなわち、癌化学療法の際の副作用の発症抑制には抗癌剤の徐放製剤化は絶対に必要であると考えている。

参考文献

- 1) 近藤恭司監修、織田銃一他編、スunks -実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学- (学会出版センター)、189-192, 210-212 (1985)
- 2) 磯村源蔵監修、織田銃一他編 スunksの生物学 (学会出版センター) 95-106, 107-112 (2011)
- 3) K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", Int'l Journal of PIXE, Vol.6, No.3, 4 467-481 (1996)
- 4) Matsuki N, Torii Y, Saito H. Effects of iron and deferoxamine on cisplatin-induced emesis: further evidence for the role of free radicals. Eur J Pharmacol., 248:131-5 1993
- 5) 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
- 6) 安藤禎紀、杉山育美、佐塚泰之、森 弓里子、細川貴子、後藤祥子、世良耕一郎、藤村 朗 徐放性抗癌剤 (リポソーム化シスプラチン) の食虫目スunksにおける体内動態、第 22 回 NMCC 共同利用研究成果報文集 163-167 (2015)
- 7) 安藤禎紀、藤村 朗、杉山育美、佐塚泰之、高橋千衣子、後藤祥子、世良耕一郎 外郭改良型徐放製剤 (リポソーム化抗癌剤) の動態、第 18 回 NMCC 共同利用研究成果報文集 205-210 (2011 年)
- 8) 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 改良型徐放製剤 (リポソーム化抗癌剤) の体内動態、第 17 回 NMCC 共同利用研究成果報文集 126-131 (2010)
- 9) 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 16 回 NMCC 共同利用研究成果報文集 218-224 (2009)
- 10) 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、高橋千衣子、後藤祥子、世良耕一郎 生体からの PIXE 試料採取法の改善、第 15 回 NMCC 共同利用研究成果報文集 172-177 (2008)
- 11) 世良耕一郎、寺崎一典、佐々木敏秋、後藤祥子、齋藤義弘、伊藤じゅん、二ツ川章二、藤村 朗、野坂洋一郎、野田芳範、西塚 哲、若林 剛 微小臓器試料に対する無標準定量分析法の開発、第 15 回

NMCC 共同利用研究成果報文集 178-190 (2008)

- 12) 藤村 朗、野坂洋一郎、世良耕一郎 頰粘膜下および口蓋粘膜経由の抗癌剤投与リンパ管の薬剤吸収能、第14回 NMCC 共同利用研究成果報文集 150-154 (2006-2007)
- 13) 藤村 朗、佐藤 大、庄司美樹子、西村智尚、小野寺政雄、伊藤じゅん、世良耕一郎、野坂洋一郎 頰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 共同利用研究成果報文集 71-76 (2005)
- 14) 藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、太田敏博、齋藤恒夫、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 共同利用研究成果報文集 51-56 (2004)
- 15) 藤村 朗、小野寺政雄、野坂洋一郎、齋藤恒夫、太田敏博、世良耕一郎、二ツ川章二 薬剤輸送経路としてのリンパ管の利用、第11回 NMCC 共同利用研究成果報文集 231-233 (2003)

The amount of liposomal cisplatin movement to the regional lymph node

Y. Ando¹, Y. Mori¹, I. Sugiyama², Y. Sadzuka², S. Goto³, T. Hosokawa³, K. Sera⁴ and
A. Fujimura¹

¹Division of Functional Morphology, Department of Anatomy, Iwate Medical University
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Iwate 028-3694, Japan

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

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

Previously, we measured the amount of the platinum transfer to the regional lymph node after controlled-release anticancer drug (liposomal cisplatin) local application in a mouse tongue using PIXE. As a result, it was confirmed that the necessary concentration of the anticancer agent reached the local and regional lymph nodes at 1/100 to 1/1000 of the usual intravascular dose. Also, we speculated that we can suppress the onset of side effects. But we could not prove it. In this study, cisplatin intraperitoneally administered as a solution and liposomalized cisplatin directly to the tongue were administered to Suncus causing vomiting reflex by administration of anticancer drug. The amount of anticancer agent transferred to the submandibular lymph node, which is the regional lymph node of the tongue and the tongue after 1 hour and 24 hours, was measured using platinum in cisplatin using PIXE. As a result, target amount of platinum was detected in the submandibular lymph nodes, which are local lymph nodes of the tongue and the tongue, which were localized at 1/1000 of the amount that induced the vomiting reaction by intraperitoneal administration. Moreover, the amount showed no vomiting reaction. It was confirmed that controlled-release cisplatin maintained the target concentration even after 24 hours.