



Title	抗悪性腫瘍剤カルボコンを封入したリポゾームに関する研究
Author(s)	久岡, 正史
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33161
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	ひさ 久	おか 岡	まさ 正	みみ 史
学位の種類	薬	学	博	士
学位記番号	第	5521	号	
学位授与の日付	昭和57年2月12日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	抗悪性腫瘍剤カルボコンを封入したリポゾームに関する研究			
論文審査委員	(主査) 教授	青沼	繁	
	(副査) 教授	鎌田	皎	教授 近藤 雅臣 教授 岩田平太郎

論 文 内 容 の 要 旨

緒 言

癌の化学療法において優れた効果を期待するためには、薬剤が選択的に腫瘍周辺に到達し癌細胞に作用することが望まれる。しかし、今までに開発された数多くの制癌剤の中に、こういった条件を満足し得る薬剤は未だ認められない。そこで、化学療法をより効果的にするためには、現存の制癌剤に腫瘍到達性、作用性などの選択特性を持たせる必要がある。この目的から、近年、drug delivery system¹⁾の開発が数多く試みられ、エマルジョン^{2,3)}、マイクロスフェア^{4,5)}、DNAとの結合体⁶⁾、Dextranとの結合体⁷⁾および癌細胞抗体との結合体⁸⁾などが報告されてきた。リポゾームは、1964年 Bangham⁹⁾によって見出されたリン脂質から成る小胞体であり、主に生体膜モデルとして用いられてきた。しかし、targetting¹⁰⁾を目的としたsystemの研究が盛んになると共に、リポゾームをdrug carrierとして応用しようとする試みが行なわれるようになってきた。すでに、数種の制癌剤について良好な基礎的検討結果^{11,12,13)}が認められているが、詳細な研究は数少ない。そこで、著者は、制癌剤であるカルボコン (CQ) を用い、drug carrierとしてのリポゾームの有用性について詳細な検討を加えた。CQは、1970年に開発されたアルキル化剤に属する抗悪性腫瘍剤であり、基礎および臨床試験から、抗腫瘍効果について高い評価を得ているが^{14,15,16)}他の制癌剤と同様副作用を有している。このCQの効果を最大に発揮させ、副作用を軽減させるようなsystemの開発を目的として検討を行なった。すなわち、CQをリポゾームに封入するための方法の検索、静注時の体内動態の検討、腹腔内投与時のリンパ移行性の検討および担癌マウスに対する制癌効果等について検討した。この結果、リポゾームがCQのcarrierとして適しており、有用なdelivery systemであることを認めた。

第I章 CQを封入したリポソーム (CQ-Liposome) の調製とCQ-LiposomeからのCQの放出¹⁷⁾

リポソームの調製については、従来からの製法を用いて種々の検討を行なったが、CQの良好な取り込み率を示すリポソームを得ることはできなかった。最近、Szokaら¹⁸⁾は、reverse-phase evaporation vesicle(REV)を作る方法を開発し、水溶性薬物の良好な取り込み率が得られることを報告した。そこで、著者は、彼等の方法に改良を加えることにより、脂溶性化合物のCQについても良好な取り込み率を示すCQ-Liposomeの調製法を確立した。方法をFig.1に示した。CQ-Liposomeに適したリン脂質の選択を検討した結果、distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) が最も適しており、このリン脂質を用いたときのCRの取り込み率は約22%であった。電顕写真から求めたCQ-Liposomeの粒径分布は、Fig.2に示した通りであり、平均粒子径は $0.2\mu\text{m}$ (直径)であった。

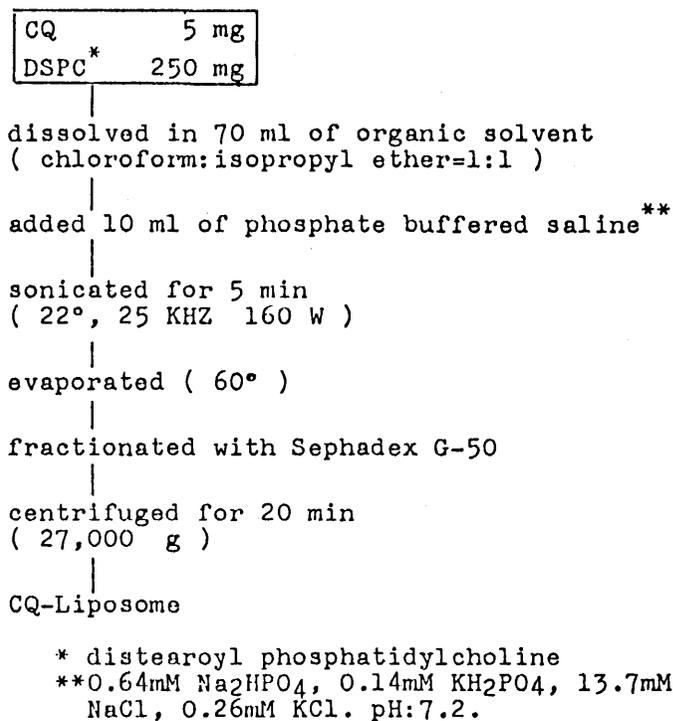


Fig.1. Method of Preparation of CQ-Liposome

この粒子を、pore sizeの異なるNuclepore filterで大きいサイズのものから順次用いてろ過し、ろ過後の粒径分布を測定した。Fig.3に示すようにいずれの場合にも、平均粒子径が $1.5\mu\text{m}$ の粒子として存在することが明らかとなった。この結果は、CQ-Liposomeは調製後直ちに $1.5\mu\text{m}$ の大きさの凝集体となるが、凝集は強固なものでなくろ過操作中には元の一次粒子に解離し、ろ過後直ちに再凝集することを示すものである。CQは、水に対する溶解度の3~4倍取り込まれていること、また、調製時にリポソーム膜に取り込まれるcholesterolを使用するとCQの取り込みが阻害されてしまうことなどから、CQはその大部分がCQ-Liposomeの膜側に取り込まれていることが示唆された。次いで、CQ-LiposomeからのCQの放出を検討した。Fig.4に時間 (\sqrt{t}) に対するCQの放出を示した。放

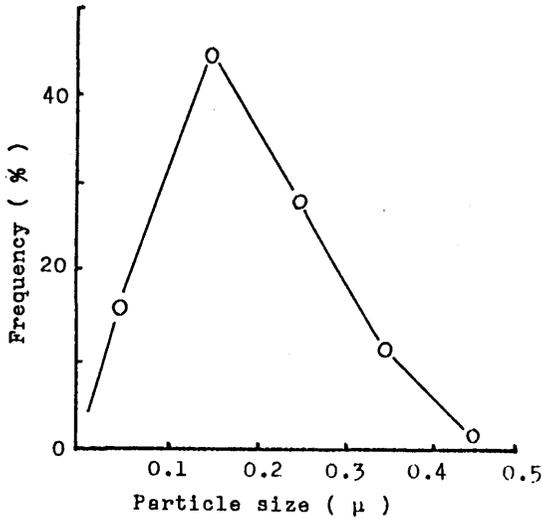


Fig. 2. Size Distribution of Primary Particles from Negative-Stain Electron Micrograph

出は温度の影響を受けやすく、高い温度では速い放出が認められた。制癌剤を封入した今までのリポゾームが放出遅延を目的としたものが多いのに対して、CQ-LiposomeではCQの放出は比較的速い。

第II章 CQ-Liposome静注時の体内分布¹⁹⁾

CQの体内分布を検討するために高感度の定量法が必要となり、著者は、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による新定量法を確立し²⁰⁾、CQ動態を検討した。CQ-Liposomeをラットに静注した時のCQの血漿中濃度推移 (Fig. 5) は、CQ溶液 (Free CQ) 投与時に比較して高い濃度推移を示した。

両薬剤間のCQ濃度の差は、投与量の増加に従って大きくなることが認められた。この結果は、特定のリポゾームの量によって分布部位で

の飽和が起きることを示唆するものである。ウサギでも、ほぼ同様の血中濃度推移の結果が得られた。そこで、ラットおよびウサギの血中濃度をTwo-compartment open modelを用いて解析し、Table Iの如きパラメーターを得た。消失速度定数kel値は、両薬剤でほとんど差が認められないが、分布容積 V_1 および V_2 はFree CQの方がCQ-Liposomeよりも約3倍大きい値を示した。このことから、CQをリポゾームに封入して静注すると、体内分布が変化することが示唆された。そこで、薬剤静注

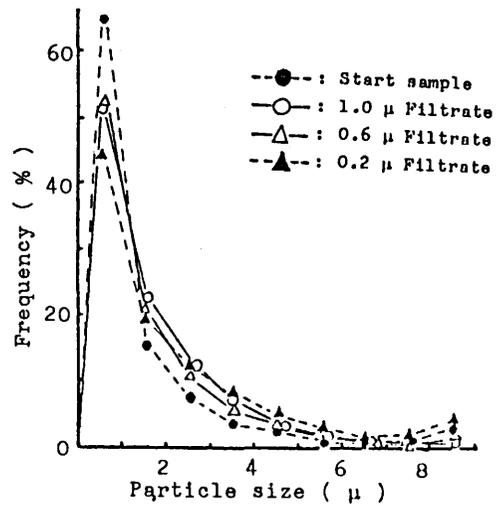


Fig. 3. Size Distribution of Aggregated Particles from Hiac Particle Size Analyzer after Filtration with Various Pore Size Filter

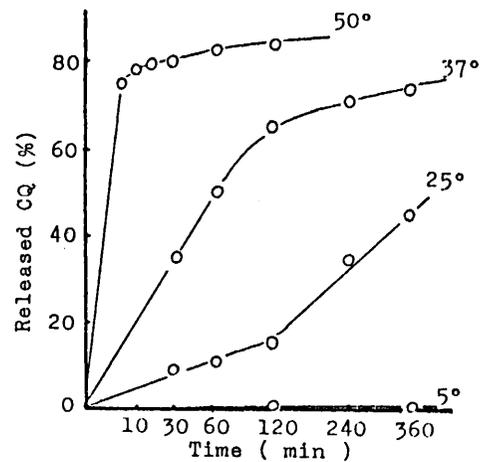


Fig. 4. In Vitro Release Patterns of CQ from CQ-Liposome

Results are expressed as the mean of three experiments.

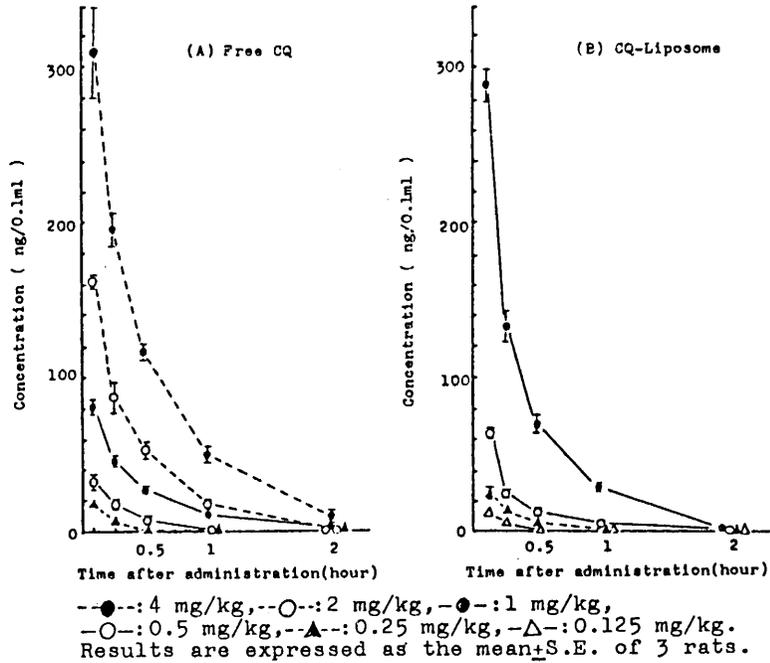


Fig.5. Plasma Concentrations of CQ after Intravenous Administration of Free CQ and CQ-Liposome at Various Doses in Rat

Table I. Pharmacokinetic Parameters of Free CQ and CQ:Liposome after Intravenous Administration in Rat and Rabbit

Parameter	Rat *1)		Rabbit *2)	
	Free CQ	CQ-Liposome	Free CQ	CQ-Liposome
n	3	4	3	4
A ng/0.1ml	131±35	439±62	19±6	43±4
B ng/0.1ml	70±7	199±12	6±1	14±3
α hr ⁻¹	18.0±3.4	15.3±2.2	19.5±0.8	15.4±2.1
β hr ⁻¹	1.9±0.2	2.0±0.1	3.1±0.1	3.2±0.3
k _{e1} hr ⁻¹	4.6±0.9	5.1±0.7	8.5±1.0	8.0±0.7
k ₁₂ hr ⁻¹	7.8±1.9	6.2±1.3	6.8±0.6	4.5±1.4
k ₂₁ hr ⁻¹	7.5±0.7	6.0±0.2	7.3±0.9	6.1±0.8
V ₁ liter/kg	0.53±0.09	0.16±0.01	0.46±0.10	0.19±0.00
V ₂ liter/kg	0.51±0.04	0.15±0.02	0.42±0.06	0.15±0.05
[AUC] ₀₋₂ ng.hr/0.1ml	44±3	129±8	3±1	8±1

*1) Dose : 1 mg/kg.

*2) Dose : 0.33 mg/body.

Results are expressed as the mean ± S.E.

後のCQの臓器内濃度推移を検討した (Fig. 6)。この結果, CQ-Liposomeは肝臓, 脾臓などの細網内皮系組織に取り込まれ易く, 肺への分布も良好であった。しかし, 末梢組織では, その大部分をしめる皮膚, 筋肉への取り込みがCQ-Liposomeで減少した。この結果から, CQ-LiposomeがCQを特異臓器へと選択的に運び得ることが認められた。

第三章 CQ-Liposome腹腔内投与時のリンパ組織への移行性²¹⁾

胸管カニューレションしたラット腹腔内に薬剤を投与したときの胸管リンパ液中への移行性を検討

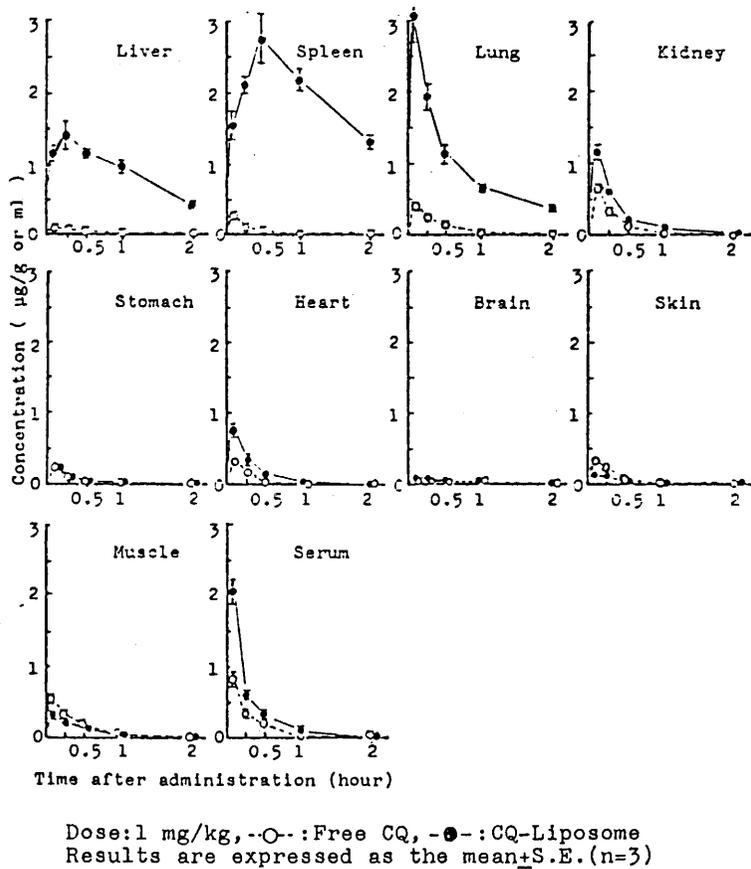


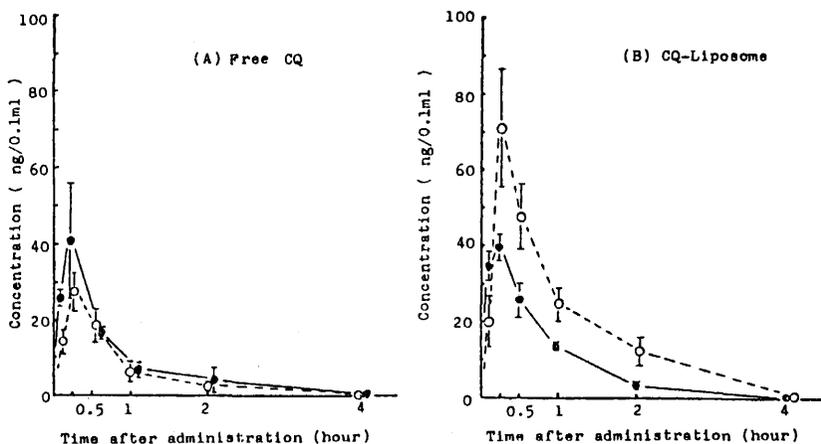
Fig. 6. Distribution of Free CQ and CQ-Liposome after Intravenous Administration in Rat

し、結果を Fig. 7 に示した。CO-Liposome 投与時の CQ のリンパ移行性は、Free CQ に比較して優れていた。また正常ラットの腹腔内に CQ-Liposome を投与した時、消化管リンパ節への CQ の良好な移行が認められた。CQ-Liposome のリンパ指向性について、さらに投与部位および剤型について検討を加えた。CQ-Liposome を静注または筋注してもリンパ系への良好な移行性は認められず、腹腔内投与時に特異的な結果である。CQ をヒマシ油に溶解した油性製剤、および LQ-Liposome とほぼ同一の組成のエマルジョン製剤を腹腔内投与してもリンパ移行特性は認められず、従ってこの性質が CQ-Liposome 製剤の特性であると考えられる。

以上の結果から、腹腔内に転移が進行した癌の摘出手術時または術後のリンパ転移を防止する薬剤として、CQ-Liposome を使用できる可能性が示唆された。

第四章 担癌マウスでの CQ-Liposome の制癌効果²²⁾

CQ-Liposome の肺への分布が優れていることは第 II 章に示した通りであり、まず、肺癌に対する効果を検討した。dewis 肺癌を静注すると、肺に特異的に転移する。本癌細胞を移植したマウスに CQ-Liposome を静注したところ、Table II に示すように、Free CQ に比べて強い延命効果が認め



Dose: 1 mg/kg, -○-: thoracic duct lymph, -●-: plasma.
Results are expressed as the mean ± S.E. of 4 rats.

Fig. 7. Concentration of CQ in Thoracic Duct Lymph and Plasma after Intraperitoneal Administration of Free CQ and CQ-Liposome

Table II. Effect of Free CQ and CQ-Liposome on Increase in Life Span of BDF₁ Mice Bearing Lewis Lung Carcinoma

Drug	Dose (mg/kg)	Mean survival time(days)	ILS (%)	Survivors on 60 days
Control	0	18.4	0	0/5
Free CQ	1.4	18.8	2	0/5
	2.0	23.2	26	0/5
	2.8	22.8	24	0/5
CQ-Liposome	1.4	30.6	66	0/5
	2.0	>36.2	>97	1/5
	2.8	>36.4	>98	1/5

Lewis lung carcinoma cells (5×10^4) were implanted intravenously into mice and drugs were injected intravenously 1 hour after implantation.

Table III. Effect of Free CQ and CQ-Liposome on Increase in Life Span of BDF₁ Mice Bearing Lymphoid Leukemia L-1210

Drug	Dose (mg/kg)	Mean survival time(days)	ILS (%)	Survivors on 60 days
Control	0	6.5	0	0/6
Free CQ	1.4	9.0	38	0/5
	2.0	10.2	57	0/5
CQ-Liposome	1.4	9.4	45	0/5
	2.0	11.4	75	0/5

Drugs were intravenously injected into BDF₁ mice 24 hours after intravenous inoculation of 5×10^4 of L-1210 cells.

られた。

すなわち、CQ-Liposomeの体内分布と有効性が相関する結果が得られた。つぎに、リンパ性白血病癌のL-1210を静注移植したマウスに対する延命効果を検討した (Table III)。CQ-Liposome静注時、高い血中濃度が得られることを第II章で示したが、L-1210担癌マウスに対する延命効果もCQ-Liposomeの方がFree CQより強く発現した。

さらに、Ehrlich腹水癌に対するCQ-Liposomeの制癌効果をマウスで検討した。腹腔内に癌細胞移植1日後に薬剤を腹腔内投与し、以後の細胞数を経時的に測定し、同時に有効性の一指標として腹水量も測定した (Fig. 8)。

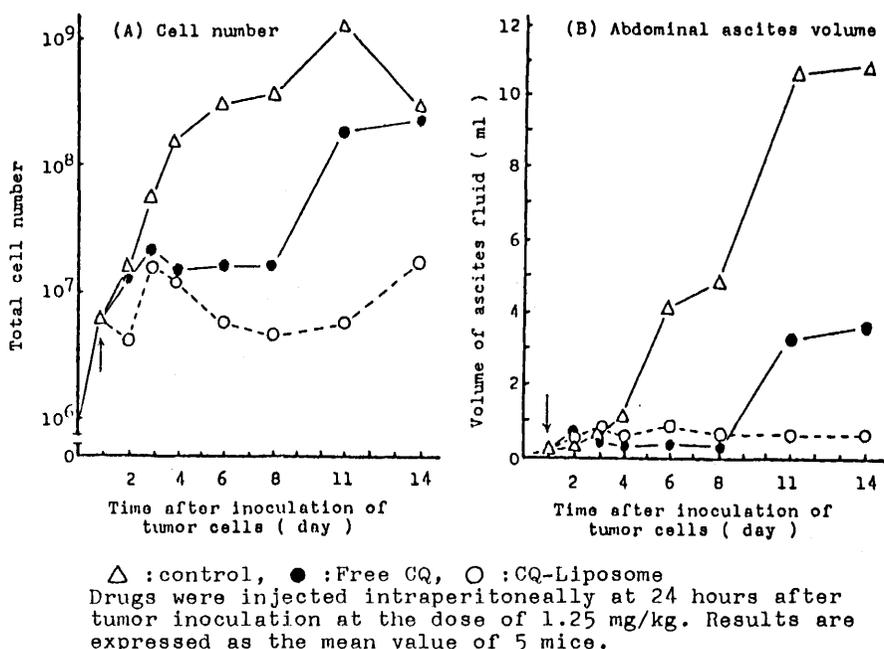


Fig. 8. Time-Courses of Ehrlich Ascites Carcinoma Cells (A) and Abdominal Ascites Volume (B) after Treatment with Free CQ and CQ-Liposome

control群に対して、Free CQ投与時には癌細胞数の減少が認められたが、この癌細胞増殖抑制効果は、CQ-Liposome投与時にはさらに強く認められた。また腹水量もCQ-Liposome投与群では最も少なかった。そこで、延命効果を検討したところ、Table IVに示すように、Free CQに比較してCQ-Liposomeの優れた効果が認められた。しかも、完全治癒したマウス例もCQ-Liposome投与時には6匹中1匹ずつ得られた。

この様に、CQをリポソームに封入することにより制癌効果を増強することができたが、この効果増強は、次の様なCQ-Liposomeの特性に起因しているものと考えられた。(a) CQ-Liposomeは第II章に述べた様な分布特性を有しており、分布し易い肺などに転移する癌の治療に有利な薬剤である。(b) CQの副作用である白血球減少を、CQ-Liposomeでは軽減できる (Fig. 9)。(c) 電気泳動結果 (Fig. 10) から、CQ-Liposomeが正の表面電荷を有し、Ehrlich腹水癌細胞が負の表面電荷を有

Table IV. Effect of Free CQ and CQ-Liposome on Increase in Life Span of ICR/CD-1 Mice Bearing Ehrlich Ascites Carcinoma Cells

Drug	Dose (mg/kg)	Mean survival time(days)	ILS (%)	Survivors at 60 days
Control	0	16.5	0	0/6
Free CQ	0.31	23.5	42	0/6
	0.63	24.8	50	0/6
	1.25	25.0	52	0/6
	2.5	>22.3	>35	1/6
CQ-Liposome	0.31	>27.0	>64	1/6
	0.63	>34.7	>110	1/6
	1.25	>38.7	>135	1/6
	2.5	>37.5	>127	1/6

Ehrlich Ascites Carcinoma Cells (1×10^6) were implanted intraperitoneally into mice and drugs were injected intraperitoneally 24 hours after implantation.

している²⁴⁾ことが認められ、両者間の親和性が高くなっていることが考えられる。

さらに、皮下移植したLewis肺癌、dymphosarcomaなどの固型癌に対する効果も検討したが、CQ-Liposomeの有効性はFree CQと同程度であった。この結果は、CQ-Liposomeが皮下などの末梢組織へは分布し難いとの結果と良く相関するものであった。

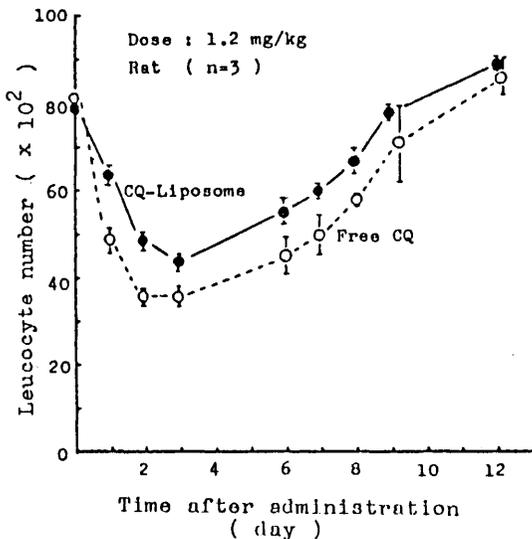


Fig. 9. Changes of Leucocyte Number after Intravenous Administration of Free CQ and CQ-Liposome

総括

CQは、水に溶解難く、しかも油にも溶解難い化合物であるため、従来のリポソーム調製法を用いても良好なentrap率は得られなかった。しかし、Szoka等のREV調製法¹⁸⁾に準じた著者の改良法により、約22%のentrap率を示すCQ-Liposomeの調製に成功した。このCQ-Liposomeは、平均粒子径2.5 μ mの粒子であるが、調製後直ちに凝集する性質を有し、平均粒子径1.5 μ mの凝集体として存在する。また、CQ-LiposomeからのCQの放出は、他の制癌剤を封入した既報のリポソームの場合に比

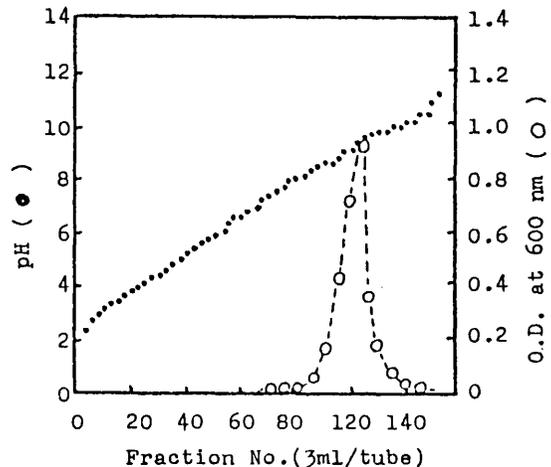


Fig. 10. Isoelectric Focusing of CQ-Liposome. Isoelectric focusing was carried out in 1% (W/V) Ampholine at pH3.5 10 for 24 hours at 1100 V. Approximately 3mg of liposomes by dry weight was used.

較して速やかであった。

CQ-Liposomeをラットに静注すると、肝臓、脾臓などの細網内皮系組織に取り込まれ易く、さらに肺への分布も良好であった。また、Free CQよりも末梢組織への分布が少ないことが認められ、全身性の副作用を軽減し得る可能性を示唆している。

CQ-Liposomeをラット腹腔内に投与すると、リンパ系組織への良行な移行が認められた。この特性は、静注および筋注では認められず、腹腔内投与経路に特異的であった。しかし、腹腔内投与でも油性製剤、エマルジョン製剤では認められず、CQ-Liposomeの剤型に特異的な性質である。

Lewis肺癌、L-1210およびEhrlich腹水癌を移植したマウスに対するCQ-Liposomeの延命効果は、Free CQよりも優れていた。リポソームによるCQの制癌効果の増強は、CQ-Liposomeの体内分布特性、副作用の軽減およびCQ-Liposomeと癌細胞との高い親和性などに起因するものと考えられた。

以上の結果から、CQ-LiposomeがCQのcarrierとして適したものであり、有用性の高いdrug delivery systemであることが確認された。

参考文献

- 1) R. L. Juliano, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 56, 683 (1978).
- 2) M. Hashida, Y. Takahashi, S. Muranishi and H. Sezaki, *J. Pharm. Dyn.*, 2, 45 (1979).
- 3) T. Takahashi, S. Ueda, K. Kono and S. Majima, *Cancer*, 38, 1507 (1976).
- 4) P. A. Kramer, *J. Pharm. Sci.*, 63, 1646 (1974).
- 5) K. J. Widder, A. E. Senyei and D. G. Scarpelli, *Proc. Socie. Experiment. Biol. Med.*, 58, 141 (1978).
- 6) A. Trouet, D. D. Campeneere and C. De. Duve, *Nature*, 239, 110 (1972).
- 7) M. Hashida, A. Kato, T. Tojima, S. Muranishi, H. Sezaki, N. Tanigawa, K. Satomura and Y. Hikasa, *Gann*, 72, 226, (1981).
- 8) R. Levy, E. Hurwitz, R. Maron, R. Arnon and M. Sela, *Cancer Res.*, 35, 1182 (1975).
- 9) A. D. Bangham, M. M. Standish and J. C. Watkins, *J. Mol. Biol.*, 13, 238 (1965).
- 10) G. Gregoriadis, *Nature* 265, 407 (1977).
- 11) D. Papahadjopoulos, G. Poste, W. J. Vail and J. L. Biedler, *Cancer Res.*, 36, 1390 (1979).
- 12) Y. M. Rustum, C. Dave, E. Mayhew and D. Papahadjopoulos, *Cancer Res.*, 39, 1390 (1979).
- 13) J. N. Weinstein, R. L. Magin, R. L. Cysyk and D. S. Zpharko, *Cancer Res.*, 40, 1388 (1980).
- 14) M. Arakawa and N. Okada, *Gann*, 65, 21 (1974).
- 15) 石川 裕, 井上広治, 堀場道明, 今井昌利, 小笠原文雄, 甲斐一誠, *診断と治療*, 64, 738 (1976).
- 16) 白川 茂, 堂前尚親, 巽 英二, 福原資郎, 錦織 優, *癌と化学療法*, 3, 533 (1976).

- 17) K. Tsukada, R. Okada, M. Hisaoka and T. Morioka, Chem. Pharm. Bull., Submitted (1981).
- 18) F. Szoka and Papahadjopoulos, Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A., 75, 4194 (1978).
- 19) M. Hisaoka, K. Tsukada and T. Morioka, J. Pharm. Dyn., accepted (1981).
- 20) M. Hisaoka, T. Morioka and A. Yagita, Gann, Submitted (1981).
- 21) M. Hisaoka, K. Tsukada and T. Morioka, J. Pharm. Dyn., accepted (1981).
- 22) M. Hisaoka, K. Tsukada, T. Morioka, T. Inomata and M. Arakawa, J. Pharm. Dyn., accepted (1981).

論文の審査結果の要旨

制癌剤であるカルボコン (CQ) を用い drug carrier としてのリポソームの有用性について詳細な検討を加えた。まず22%の entrap 率を示す CQ-Liposome の調製に成功し、その物は組織に取り込まれ易く特にリンパ系組織への良行な移行が認められた。Lewis 肺癌, L-1210 および Ehrlich 腹水癌を移植したマウスに対する CQ-Liposome の延命効果は Free CQ より優れており、有用性の高い drug delivery system であることを確認した。

よって薬学博士として価値ある論文と認める。