

動脈内注入癌局所治療を目的とした
薬物担体の利用に関する研究

乙第10号

夏目秀視

動脈内注入癌局所治療を目的とした
薬物担体の利用に関する研究

夏目秀視

目 次

総論の部

緒 言

---- 1

第1編 動脈内注入療法と固形薬物担体を組み合わせたDDSの開発

---- 4

第1章 化学塞栓材料としてのマイトマイシンC (MMC) 含有アルブミンマイクロスフィアの調製

---- 5

第1節 MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製

---- 5

第2節 マイクロスフィアの形状, 粒度分布及び薬物含有率

---- 7

第3節 界面活性剤による目的粒子径の取得

---- 10

第2章 アルブミンマイクロスフィアの分解性及び生体内適合性

---- 11

第1節 アルブミンマイクロスフィアの分解性

---- 11

第2節 アルブミンマイクロスフィアの生体内適合性

---- 13

第3章 アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出性

---- 14

第1節 アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出

---- 15

第2節 アルブミンマイクロスフィアからの初期薬物放出の見積り法

---- 16

第4章 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能に関する組織学的評価

---- 28

第1節 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能の造影法による評価

---- 29

第2節 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能の染色法による評価

---- 31

第5章 MMC含有アルブミンマイクロスフィアのAH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットに対する抗腫瘍効果

---- 33

第6章 アルブミンマイクロスフィアからの薬物放出制御の試み

---- 34

第1節 薬物放出制御を目的としたMMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製

---- 35

第2節 交叉結合剤を用いて調製したアルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出性

---- 37

第7章 小括

---- 40

第2編 動脈内注入療法と油性薬物担体を組み合わせたDDSの開発

---- 42

第1章 抗癌剤を含有した粘性油性薬物担体の調製

---- 44

第1節	粘性油性薬物担体の調製	----	44
第2節	粘性油性薬物担体の粘性と指標粘度の決定	----	46
第3節	シスプラチン含有粘性EOの懸濁安定性	----	50
第2章	油性薬物担体の脈管内挙動と組織滞留性	----	50
第1節	油性薬物担体の脈管内挙動	----	50
第2節	油性薬物担体の組織滞留性	----	54
第3節	油性薬物担体の組織滞留機構の組織学的検討	----	57
第3章	油性薬物担体からの薬物放出性	----	60
第1節	油性薬物担体からのセムスチンの放出	----	60
第2節	油性薬物担体からのシスプラチンの放出	----	61
第4章	油性薬物担体及び制癌剤のモデル固形癌への集積性	----	63
第1節	油性薬物担体の癌部位集積性	----	64
第2節	シスプラチンの癌部位集積性	----	66
第5章	モデル固形癌に対する制癌剤含有油性薬物担体の抗腫瘍効果	----	69
第1節	AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットに対する制癌剤含有油性薬物担体の抗腫瘍効果	----	70
第2節	VX-2腫瘍細胞移植モデル肝癌家兎に対するシスプラチン含有油性薬物担体の抗腫瘍効果	----	72
第6章	薬物放出制御を目的とした粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性とモデル腹水癌に対する抗腫瘍効果	----	74
第1節	非イオン性界面活性剤を含有した粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性	----	75
第2節	モデル腹水癌を利用した薬物放出制御製剤としての油性薬物担体からのシスプラチン放出性の最適化	----	77
第7章	小括	----	81
総括		----	84
謝辞		----	85
実験の部			
第1編	実験の部	----	86
第2編	実験の部	----	90
参考文献		----	98

総論の部

緒言

現在、固形癌の治療は外科的切除（外科療法）を根幹として、その前後に化学療法、放射線療法、温熱療法及び免疫療法が併用されている（図1）。¹⁾このような併用治療がなされるのは、癌は完治しなければならない疾病の一つでありながら、癌細胞を選択的に根治するような治療法が開発されていないことによる。それゆえ図1は、現在利用されている一般的な癌の治療法を示しているが、癌細胞のみに作用するスーパードラッグ（新薬）が開発されていない現状においては、癌の治療率をさらに高めることのできる新たな情報を取り込んで、より体系的な治療法の開発が大きなテーマとなる。

化学療法は、制癌剤が癌細胞と正常細胞とのわずかな感受性の違いを利用しているため、全身的な副作用が不可避であり、補助療法としての位置を占めざるを得ない（図1）。²⁾したがって、化学療法による癌の治療率をさらに高めるためには、この副作用の問題の解決が必要となる。化学療法の副作用を改善し、かつ治療効率を高める方法として、制癌剤を正常組織には極力行かせずに、癌部位にのみ送達する、すなわち“標的化”がある。癌局所への薬物の効率的な標的化によって全身的な副作用が軽減でき、図1のA→B→Cの過程のうちBを省略できる可能性を有している。

薬剤学・製剤学の分野において最近定着した薬物送達システム (Drug Delivery System, DDS) の概念に基づき、既存の薬物のバイオアベイラビリティを高める試みがなされている。^{3~6)} DDSは、薬物の“targeting (標的化)”と

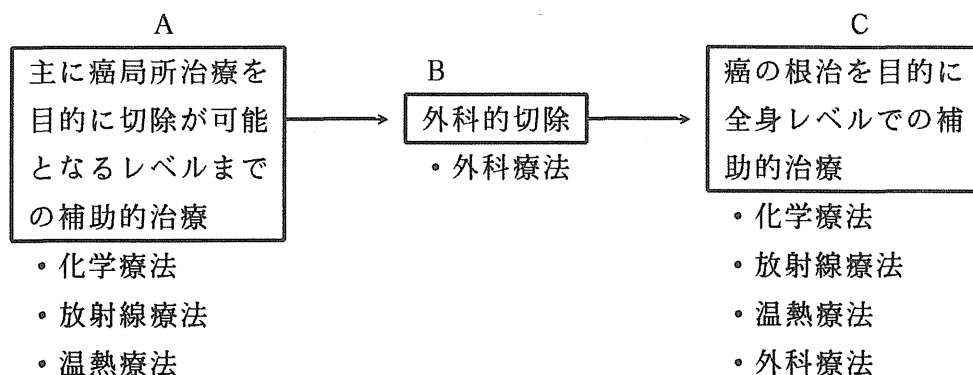


図1 一般的な癌治療設計

“controlled release (放出制御)”を基本として設計されるシステムであり、この制癌剤含有DDSを癌治療に応用したとき、治療効率の改善が期待される。薬物の標的化に利用可能と思われるDDSの中に薬物担体がある。^{7~11)} この薬物担体は、天然または合成の担体となりうる物質と薬物を結合させるかまたはそれらの物質中に薬物を封入して物理的あるいは化学的駆動力を与えることによって目的部位に薬物を運搬するものである。

一方、医学の分野において動脈内注入療法(動注療法)が開発された。¹²⁾ この治療法は薬物の標的化の手段として、薬物を癌支配動脈または近傍動脈から投与することにより一時的に薬物の癌局所内濃度を高め、癌細胞における薬物のバイオアベイラビリティを改善するものである。¹³⁾ したがって、極めて低い投与量で期待した治療効果が得られる。動注療法は、Seldinger¹⁴⁾が開発したtranscatheter法により飛躍的に進歩した。これは、カテーテルを大腿部動脈や鎖骨下動脈より挿入して目的動脈まで誘導し、そこから薬物を投与するものである。しかし、この方法は一時的に癌局所内濃度を高めることができるものの、それを持続させることが困難である。この欠点を補うため、持続動注ポンプと呼ばれる外部注入器が開発されているが¹⁵⁾、手術が必要であり、簡便さに欠ける。

そこで著者は図1のAからBへの治療設計において、固形癌組織周辺の正常組織を含む領域に薬物を送達することを目的に、DDSに動注療法を組み込んだ標的化治療システムの設計を行った。すなわち、薬物を含有する薬物担体を動脈より投与し、担体を癌組織の動脈、細動脈あるいは毛細血管内に停滞させ、そこから制癌剤を癌組織に送達する方法である。血管内に停滞させることができる薬物担体としては固形の薬物担体と液状の油性薬物担体が考えられる。Katoら^{16, 17)}は制癌剤マイトマイシンCを含有したエチルセルロースマイクロカプセルを調製して膀胱癌や腎臓癌の治療に応用し、高い臨床成績を得ている。この方法は薬物の標的化が達成できるばかりでなく、癌細胞の主たる栄養補給ルートが動脈であることから、担体が動脈を塞栓することでその補給ルートも遮断できるというメリットを合わせ持っており、この方法を特に加藤らは、“化学塞栓療法”と名づけた。化学塞栓療法は、動注療法と固形の薬物担体とを同時に利用したDDSである。当教室においても、以前よりアルブミンマイクロスフィアを制癌剤の薬物担体として利用し、モデル腹水癌に対する放出制御製剤や肺癌に対する磁性体を利用した標的化製剤としての有用性を報告してきた。^{18, 19)}そこで著者は化学塞栓を利用し、本システムに用いる固形の薬物担体としてアルブミンマイクロスフィアを選択した。

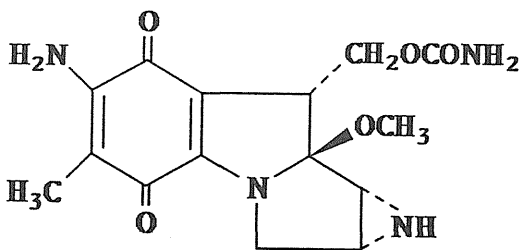
一方、動注療法に利用された油性薬物担体として、油性造影剤リピオドールウルトラフルイド(Lipiodol Ultrafluide, LP)などが知られている。今野ら²⁰⁾

やMakiら²¹⁾は、癌組織の造影にLPを用いた時、癌組織のみ長期に亘って濃染されたことに着目して、LPにスチレン-マレイン酸共重合体と制癌剤ネオカルチノスタチンの結合体(SMANCS)を含有させ、これを肝癌の治療に応用し、高い臨床成績を得た。この担体の癌部位標的化機構は、動脈内から投与することに加えて、癌新生血管の乱雑な形成、血管壁透過性の亢進、間質スペースの増加やリンパ系の欠如による除去能の低下といった癌組織に油性物質や高分子が貯留しやすいという特性^{22, 23)}によるところが大きい。しかしながら、LPによる癌組織への標的化は個々の癌組織の特性に左右されやすいという欠点を持ち、LP自身の標的化能が乏しい場合が認められる。そこで、本システムに用いる油性薬物担体としてLPの原料の中からオレイン酸とそのエチルエステル体を選び、薬物標的化を向上させる手段として癌組織の特性をいかしつつ、増粘剤を添加して担体の粘性を増加させた粘性オレイン酸と粘性オレイン酸エチルを用いた。

本論文では、動脈内投与と上に掲げた物性の異なる2種の薬物担体とを組み合わせたDDSについて、特に“薬物の標的化”の観点から、第一編としてアルブミンマイクロスフィア、第二編として粘性油性薬物担体について検討・考察し、さらに各編において動物のモデル固形癌に対する抗腫瘍効果の結果から、本標的化システムをより最適化するための具体的な製剤学的改善策やその可能性について述べる。

第 1 編 動脈内注入療法と固形薬物担体を組み合わせた DDS の開発

動脈内注入療法と固形薬物担体を組み合わせた DDS の開発を行う上で、まず重要となるポイントは①標的組織がどこであるか、②制癌剤として何を選択するか、③固形薬物担体を何にするか、である。これら 3 点を決定した後、④癌局所治療に対する最適なシステムを開発する、という方法をとった。もちろん、④は前 3 点へフィードバックする可能性がおおいに考えられる。そこで本研究においては、標的臓器として、脈管系の特異性から癌の外科的切除が難しいといわれている肝臓を選んだ。また、薬物としては制癌スペクトルが幅広く肝癌に対しても活性を有するマイトマイシン C (MMC) を選択した。MMC の構造と物理化学的性質を図 2 に示す。²⁴⁾ 緒言でも述べたように本システムによる薬物の癌組織への標的化は動脈内投与を利用しかつ固形の薬物担体の物理的修飾、すなわち担体の粒子径の調節による担体の動脈内塞栓を利用することである。それゆえ、薬物担体 (塞栓材料) の選択は担体の粒子径や形状などの物理的修飾のしやすさを考慮しなければならない。加えて、用いる材料は生体に対する適合性が高いことも考慮に入れなければならない。担体として候補に上げられるマイクロスフィアやマイクロカプセルなどの材料^{25~30)}の中で、既に主旨を同じくして取り組まれている材料にはエチルセルロースマイクロカプセル³¹⁾、デンプン小球体^{32, 33)}、ポリ乳酸小球体³⁴⁾、フィブリンクロット³⁵⁾、リポソーム³⁶⁾があげられる。著者は、アルブミン凝集体やゼラチン、アルブミン及び脂質マイクロスフィアを本システムに利用可能であるかどうかを予備的に試験し、その結果、アルブミンマイクロスフィアが本システムに最も適した材料になりうると判断した。また、用いる材料は生体適合性が高い方が望ましい。アルブミンマイクロスフィアはスキャンニング剤として既に臨床応用されてお



分子量 ; 334.13

溶解度 ; 25 °C

水 2.73 mM

ミリスチン酸イソプロピル 0.0193 mM

ヘキサン 0.0234×10^{-3} mM

37 °C

(1/15M) pH 7.4 リン酸緩衝液 3.5 mg/ml

図 2 マイトマイシン C の構造式とその物理化学的性質

り^{37, 38)}, その生体適合性は高いと思われる。^{39, 40)} 加えて, マイクロスフィアの調製法のほとんどが乳化重合法であり, 含有させる薬物の外相への逃散性を極力少なくするためには選択した担体に含有させる薬物の物性も考慮に入れる必要がある。MMCは水溶性であることから担体への包含性を考慮すると担体は水溶性の高分子のほうが適当であり, このこともアルブミンマイクロスフィアを選択した一因である。

本編では, 主にMMCを含有したアルブミンマイクロスフィアについてその調製, 物性, 抗腫瘍効果などについて以下7章に亘って報告する。

第1章 化学塞栓材料としてのマイトマイシンC (MMC) 含有アルブミンマイクロスフィアの調製

DDSとしてのアルブミンマイクロスフィアの当初の利用は, 体循環血中を循環させる間に含有させた薬物を標的部位に到達させることを大きな目標とし, 肝臓の細網内皮系を標的部位とする場合を除きマイクロスフィアの粒子径が毛細血管よりも小さい, すなわち粒子径 $1\ \mu\text{m}$ 以下の球体を利用してマイクロスフィアの化学的または物理的な修飾により薬物の標的化効率を高める試みがなされてきた。^{41~43)}

一方, 化学塞栓療法におけるDDSとしてのアルブミンマイクロスフィアの利用は, 生体への安全性から粒子径がより小さくなければいけないというそれまでの定説を覆し, 標的部位をよりマクロにとらえてほぼ完全に血管を塞栓することを目標とした。化学塞栓療法における塞栓材料の塞栓部位は栄養補給ルートを遮断できる部位, すなわち血流をストップさせ動脈血が癌組織内にほとんど流入できない場所に設定しなければならない。つまり, 癌組織内に至る血管径 $20\ \mu\text{m}$ の細動脈から癌組織周辺または中心に張り巡らされている $200\ \mu\text{m}$ の動脈ということになる。したがって, この血管径を目安としてマイクロスフィアを調製できるような調製法を確立しなければならない。

本章では, 予め設定した粒子径を持つアルブミンマイクロスフィアを収率良く得ることが可能な調製法の確立を行った。

第1節 MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製

アルブミンマイクロスフィアの調製には基本的に乳化重合法を用いた。したがって, マイクロスフィアの粒子径は, 連続相の溶媒や粘度, 攪拌強度, 乳化剤の種類や量の条件によって決定される。そこでまず目的とする粒子径を有するマイクロ

フィアを調製するために、それら可変条件を決定しなければならない。また、薬物の封入率も同時に考えていかなければならない。

アルブミンマイクロスフィアの調製法を図3に、その時の条件を表1に示す。図3に示した方法1は、従来から当教室で用いてきた調製法⁴⁴⁾で粒子径を大きくするために攪拌速度を落としている。しかしながら、この調製法はもともとより小さな粒子径を持つマイクロスフィア(粒子径 $\leq 10 \mu\text{m}$)の作成のために開発されたもので連続相に粘度70 centi poise (cp)の綿実油を用いている。方法2及び3はLongsら⁴⁵⁾の方法を修飾した調製法であり、特に方法3は調製操作がより簡便となっている。この時、マイクロスフィアの調製に際し添加した交叉結合剤、グルタルアルデヒドはマイクロスフィアの粒子径を決定する一つの要因となるが、マイクロスフィアの粒子径を決定する大きな要因は連続相の粘度である。すなわち、粒子径と粘度とは反比例の関係にある。Longsら⁴⁵⁾の用いた溶媒(イソオクタン、クロロホルム、トルエン)の粘度は綿実油の粘度よりも小さい(粘度 $< 1 \text{ cp}$)ので粒子径を大きくできるはずである。この場合、これらの溶媒を連続相に用いたときに調製される目的とした粒子径範囲内の径を有するマイクロスフィアの収率は攪拌強度と界面活性剤との組み合わせの選択により決定されるであろう。

次に問題となるのは薬物の含有率である。予備試験においてグルタルアルデヒド

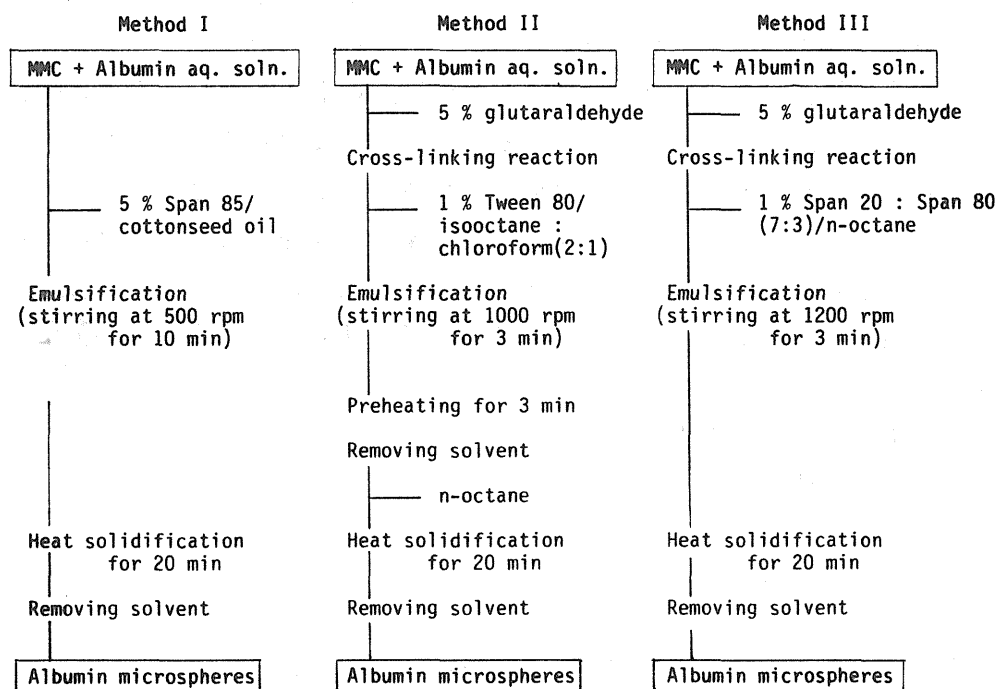


Fig. 3 Preparation Methods of MMC Loaded-Albumin Microspheres

Table 1 Condition for Preparation of MMC-Loaded Albumin Microspheres

Method	MMC (mg)	Albumin (mg)	Outer phase	Surfactant	5% Glutar- aldehyde (ml)
I	30	270	Cottonseed oil	Span 85	
II	30	270	chloroform/ isooctane and n-octane	Tween 80	0.6
III	30	270	n-octane	Span 80 and 20	0.6

に加えて, Levyら⁴⁶⁾ が利用した交叉結合剤の効果を比較したが, 彼らの用いた交叉結合剤の反応性は非常に弱く, マイクロスフィアの固化状態 (1時間以内に緩衝液中で溶解), 粒子の収率 (< 50%) 及び薬物含有率 (約3%) のどの点においてもグルタルアルデヒドの方が高かった. しかしながら, このグルタルアルデヒドによる交叉反応の場合, 乳化過程で固化が起こりマイクロスフィアとなるため, マイクロスフィア中への水の保持率が限定され, 水とマイクロスフィアとの間で相分離が起こった. したがって, MMCとアルブミン水溶液を混合する初期の段階においてMMCはなるべくアルブミン水溶液中で微細に懸濁した状態になっているほうが分離した水相へのMMCの流出を防ぐことができ, それゆえ, この混合過程は氷冷下で行った. また, さらに薬物の封入率を高めるためにはMMCの連続相への逃散を極力避け (より極性の低い溶媒を用いる), かつマイクロスフィアの壁構造を強固にするための熱固化過程 (100 °C以上) を容易にできる溶媒が必要である. これらの条件を満たすことが可能な溶媒として著者は連続相にn-オクタン (b. p. 125.6 °C, 粘度 < 1 cp) を選んだ. 方法1, 2及び3は, マイクロスフィアの平均粒子径を50 μmに設定し, 上述の個々の方法の条件の中で最も収率良くマイクロスフィアを回収できた調製法である.

第2節 マイクロスフィアの形状, 粒度分布及び薬物含有率

図4に方法2及び3で調製したアルブミンマイクロスフィアの走査型, 光学及び実体顕微鏡写真を示す. 写真からわかるように方法3のマイクロスフィアはほぼ完全な球形をしており表面も滑らかであった. ここでは示していないが, 方法1で調製したマイクロスフィアも同様であった. しかしながら, 方法2のマイクロスフィアは表面が凹凸であり, しかも細孔が無数に見られる. この凹凸は交叉結合過程で

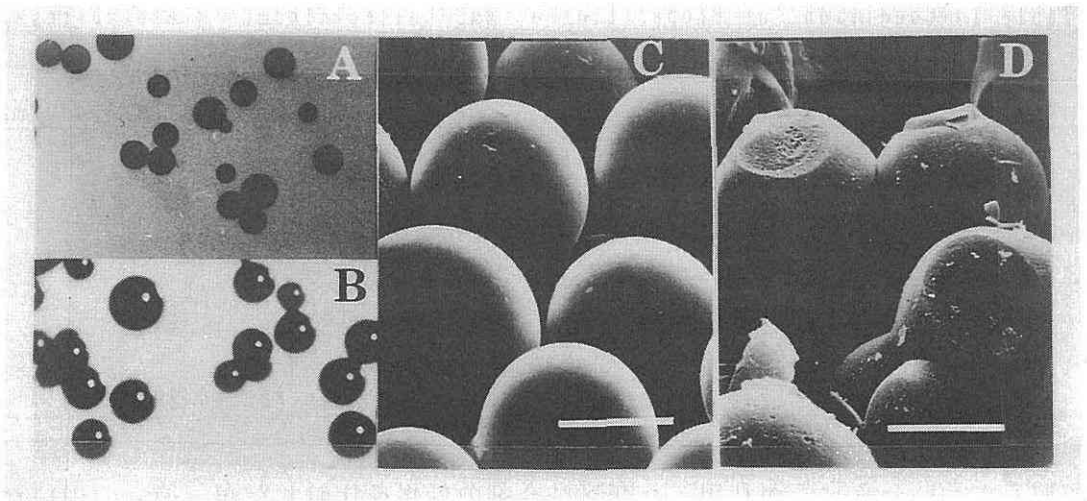


Fig. 4 Microphotographs of Albumin Microspheres

A; light micrograph (Method III), B; stereoscopic micrograph (Method III), C; scanning electron micrograph (Method III), D; scanning electron micrograph (Method II) bar=30 μ m

用いた溶媒（イソオクタン／クロロホルム）と界面活性剤（Tween 80）の組み合わせの時、マイクロスフィアどうしの凝集により形成されたとと思われる。また、細孔の発生要因はわからなかった。

図5に方法1及び3で調製したアルブミンマイクロスフィアの粒度分布を、また表2に方法1～3で調製したマイクロスフィアの平均粒子径と薬物含有率を示す。方法1により調製したマイクロスフィアの粒度分布はブロードで、目的とする粒子径範囲（40～50 \pm 10 μ m）の径を有するマイクロスフィアは全体の40%以下で、その平均粒子径は34.5 μ mであった。本編第1節で述べたように連続相に用いる溶媒の粘度が高いものほどマイクロスフィアの粒子径は小さくなる。連続相に綿実油、界面活性剤にSpan 85を用い攪拌強度を2500 rpmとし、さらに超音波破碎機で処理すると粒子径1 μ m前後のマイクロスフィアが収率良くできる。⁴⁷⁾したがって、マイクロスフィアの収率を考えると、方法1は塞栓材料用のマイクロスフィアの調製には適していないことになる。一方、方法3で調製したマイクロスフィアの粒度分布はシャープで、全体の90%以上のマイクロスフィアが目的範囲内の粒子径であった。その平均粒子径は42.4 μ mであった。また、方法2で調製したマイクロスフィアの粒度分布も比較的シャープで、70%以上の収率で平均粒子径は47.5 μ mであった。これらの結果は、これらの調製条件、特に連続相として用いた溶媒の粘度が10 μ mオーダーのマイクロスフィアを調製する条件に適していたものと思われる。

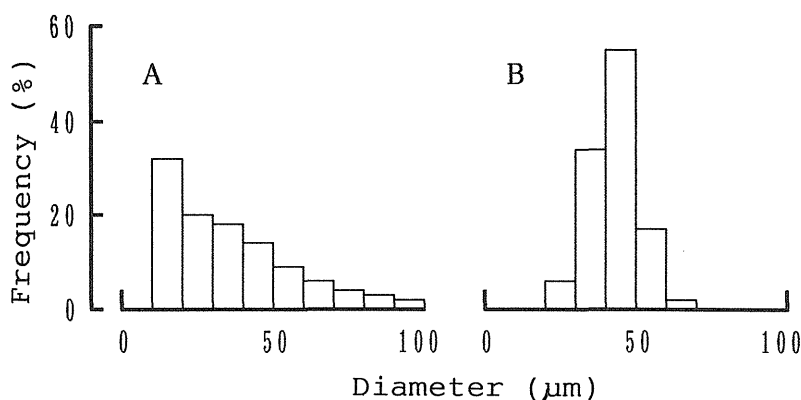


Fig. 5 Diameter Distribution of Albumin Microspheres
A: Method I, B: Method III

Table 2 Mean Diameter and Drug Content in MMC-Loaded Albumin Microspheres

Method	I	II	III
Mean diameter (μm)	34.5	47.5	42.3
Drug content (%)	1 ~ 2	2 ~ 3	4 ~ 5

MMC含有アルブミンマイクロスフィア中の薬物封入率で最も高かったのは方法3で調製したマイクロスフィアで約5%であった。調製時における薬物仕込み量は全体の10%でありかなりのMMCが損失したことになる。この原因の一つはマイクロスフィアのエーテル洗浄中の漏出である。この洗浄操作の間にどの方法で調製したマイクロスフィアも仕込み量の30%が漏出した。他の損失が生じる可能性をもつ過程については今回は確認していないが、共通の過程としては熱固化時における薬物の分解がある。また、共通しない損失過程は、方法1の場合、交叉結合過程がないことから攪拌溶媒への漏出が、また方法2と3で調製したマイクロスフィアのMMC封入率の違いは方法2で最初攪拌溶媒に用いたイソオクタン/クロロホルム系の極性がn-オクタンよりも高いことより、これらの溶媒系への薬物の漏出性の差によると思われる。また、この2つの方法には交叉結合剤が加えられており、薬物封入性の改善を果たしているものの、アミノ基を持つ薬物とも反応するためこの点もこの2つの方法で調製したマイクロスフィア中の薬物封入率を低下させる要因になっているかもしれない。以上の結果はアルブミンマイクロスフィア中への薬物の封入性の点で方法3が最も良いことを示している。

第3節 界面活性剤による目的粒子径の取得

化学塞栓療法における塞栓材料の塞栓部位は、固形癌の血管系に合わせて選択することが望ましい。現在利用されている化学塞栓材料の粒子径は20~200 μm であり^{48, 11)}、塞栓材料としては500 μm 前後のものが用いられている。⁴⁹⁾ それゆえ、種々平均粒子径を有するアルブミンマイクロスフィアを調製できるほうが都合がよい。今回用いたマイクロスフィアの調製条件の中で、攪拌溶媒を変えることはこれ以上低粘度の溶媒が見当たらないことから不可能である。そこで、平均粒子径を変えることが可能な手段として攪拌強度や界面活性剤を変えることが考えられるが、著者は連続相に添加する非イオン性界面活性剤のHydrophilic-Lipophilic Balance (HLB) 値を変化させることによってマイクロスフィアの平均粒子径を変えることを試みた。

図6に界面活性剤以外の調製条件を方法3と同様とし、界面活性剤の混合比を変えてHLB値を変化させたときの平均粒子径の変化を示す。マイクロスフィアの平均粒子径は加えた界面活性剤のHLB値が増加するほど小さくなった。平均粒子径が最も大きかったのは加えた界面活性剤がSpan 85 単独の時で、その平均粒子径は76.5 μm であった。また、Span 80 単独でその添加濃度を1%から0.1%まで落とすと平均粒子径150 μm までのマイクロスフィアを調製することが可能であった。

本章では、3つの方法を用いてアルブミンマイクロスフィアを調製した。このう

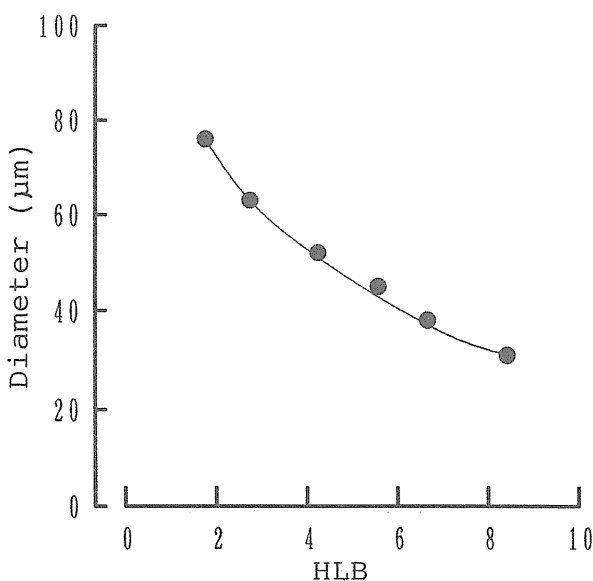


Fig. 6 Relationship between HLB of Non-ionic Surfactant and Mean Diameter of Albumin Microspheres

ちマイクロスフィアの構造，収率及び薬物の封入率を考えた場合，方法3が最も良いと思われた。この方法を他の薬物（5-フルオロウラシル，ニムスチン，cis-diamminedichloro platinum（Ⅱ），塩酸ドキシソルビシン）に応用したところ蛋白結合性の非常に強い塩酸ドキシソルビシン以外はほぼ同様な物性を持つマイクロスフィアを調製できた。加えて，界面活性剤の種類や量によってもマイクロスフィアの平均粒子径を調節できることから，方法3は非常に広範囲の薬物に利用できるものと思われた。

第2章 アルブミンマイクロスフィアの分解性及び生体適合性

固形癌は自己の持つ腫瘍壊死因子（Tumor Necrosis Factor, TNF）⁵⁰⁾ や化学療法剤の治療効果によりライソゾーム⁵¹⁾ を始めとする消化酵素により融解壊死の状態になった後，その部分が貧食され消失していくことが予想される。したがって，アルブミンマイクロスフィアも生体由来の酵素により消化・分解されたほうが都合がよい。加えて，もしマイクロスフィアの分解過程が Hixon-Crowell型⁵²⁾ に従うならば，マイクロスフィアの分解過程は抗腫瘍効果に，より重要となる。

一方，アルブミンマイクロスフィアは，スキャンニング剤として既に臨床応用されており^{37, 38)}，その生体適合性は高いものと思われる。^{39, 40)}しかし，本編で使用したマイクロスフィアの調製時に生体との反応性が比較的高い交叉結合剤，グルタルアルデヒドを使用していることもあり，安全性の確認がぜひ必要である。

そこで，本章ではスキャンニング剤として利用されているアルブミンマイクロスフィアとほぼ同様の調製方法1による薬物を含むマイクロスフィアをコントロールとして方法2及び3で調製したマイクロスフィアの分解性及びに生体適合性を比較・検討した。

第1節 アルブミンマイクロスフィアの分解性

表3に方法1，2及び3で調製したアルブミンマイクロスフィアを各種蛋白質分解酵素を用いて4日間処理したときの残存重量を示す。コラーゲンやゼラチンに特異的なコラゲナーゼ処理では，どの方法で調製したマイクロスフィアもほとんど消化分解されなかった。パパイン処理では交叉結合剤を使用していない方法1で調製したマイクロスフィアが約50%消化分解されたのに対し，方法2及び3で調製されたマイクロスフィアはほとんど消化分解されなかった。これはパパインによるロイシンやグリシンを含むペプチド結合の加水分解が交叉結合剤により阻害されたため

Table 2 Biodegradability of Albumin Microspheres with Several Proteolytic Enzymes

Method	Collagenase	Papain	Trypsin	Protease
I	75	42	13	8
II	90	76	21	15
III	96	92	60	26

Data are shown as percentages of remaining weight against that of microspheres treated with buffer solution alone.

と思われた。一方、トリプシンやプロテアーゼ処理ではどの場合もマイクロスフィアは消化分解されている。この2つの酵素はパpainと同様にペプチド結合を加水分解するが、トリプシンはアルギニン残基やリジン残基のカルボキシル基側のペプチド結合を、またプロテアーゼはトリプシンに加えカテプシンやキモトリプシン等の混合酵素でこれらはフェニルアラニンやチロシン等の芳香族アミノ酸のカルボキシル基側を加水分解することから、今回使用した交叉結合剤はこれらのペプチド結合の加水分解に対する阻害効果が小さかったものと思われる。

図7に方法3で調製したマイクロスフィアのプロテアーゼ存在下における消化分解過程の実体顕微鏡写真を示す。図から明らかなように、マイクロスフィアの消化分解過程は球形構造を保ちつつ表面から溶解していくのではなく、マイクロスフィア表面が凹凸状態になるように消化分解され(処理2日後)、消化分解が進行する

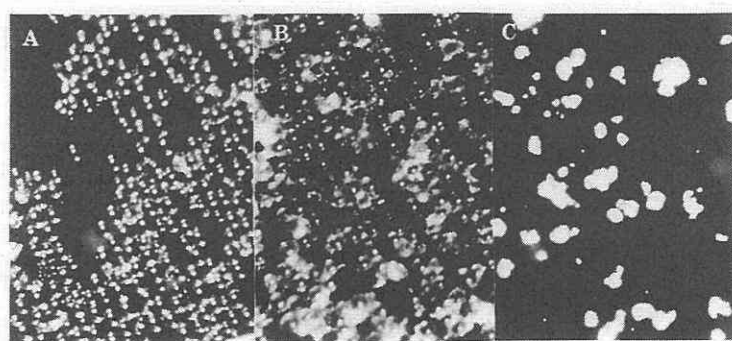


Fig. 7 Stereoscopic Micrographs of Albumin Microspheres after Treatment with Protease
 A: immediately after treatment
 B: 2 days after treatment, C: 4 days after treatment

に連れて球形構造が崩れて小さくなった（処理4日後）。

以上の結果から、生体内においてもマイクロスフィアは消化分解を受ける可能性が示唆された。Sugibayashi ら⁴⁴⁾ は、これら蛋白質分解酵素と生体のライソゾーム分画とのアルブミンマイクロスフィアの消化分解性を試験し、ライソゾーム分画中ではマイクロスフィアの消化分解速度が遅いことを報告している。上述の結果が生体内においてそのまま起こるとはいえないが、融解壊死状態に陥った癌組織においては、分解酵素活性が非常に高くなっていることが予想されるのでマイクロスフィアはかなり速い速度で分解されるかもしれない。

第2節 アルブミンマイクロスフィアの生体内適合性

図8に方法1及び2で調製したマイクロスフィアをラット大腿部の筋肉内に注射後7日目の組織像と方法3で調製したマイクロスフィアを同様に注射後3, 7及び30日目の組織像を示す。なお方法1のマイクロスフィアは粒子径が $1\mu\text{m}$ 前後のものを使用した。方法1及び2のマイクロスフィア注射7日後のどちらの組織像にもマイクロスフィア周辺に好中球などの組織球の浸潤が見られ弱い急性の炎症反応が認められたが、既に治癒過程に入っていた。方法3のマイクロスフィアにおいては、3日目、マイクロスフィア周辺に組織球の浸潤が見られ弱い急性の炎症反応が認められた。この観察は方法1及び2のマイクロスフィアの時も同様であった。7日目、同様に組織球が認められるものの治癒過程に入っていた。30日目、炎症反応の時に見られた組織球は認められずマイクロスフィア周辺の筋肉組織はほぼ正常状態になっていた。この観察は方法2のマイクロスフィアでも同様であった。急性の炎症反応は物理的な破砕によっても生じる。しかし、7日目の各組織像は治癒過程に入っているものの未だ組織球が認められ、また30日後の組織像から多核細胞がマイクロスフィアを取り巻いていることから異物反応も起こっている可能性も考えられた。

以上の結果から、方法1で調製したマイクロスフィアと方法2及び3で調製したマイクロスフィアの病理学的な評価に差異は無く、方法2及び3で使用した程度の交叉結合剤を用いてもマイクロスフィアの生体内適合性は高いものと思われる。

また、30日後の結果から、多核細胞中に取り込まれたマイクロスフィアの表面に凹凸が見られることから、マイクロスフィアの消化分解が*in vivo*（筋肉内）においてもゆっくり起こるだろうことが確認された。

本章で試験した結果は3つの方法で調製したアルブミンマイクロスフィアに著しい差が認められないことを示しており、著者はこれらのマイクロスフィアが塞栓物質として生体に適用可能であると判断した。

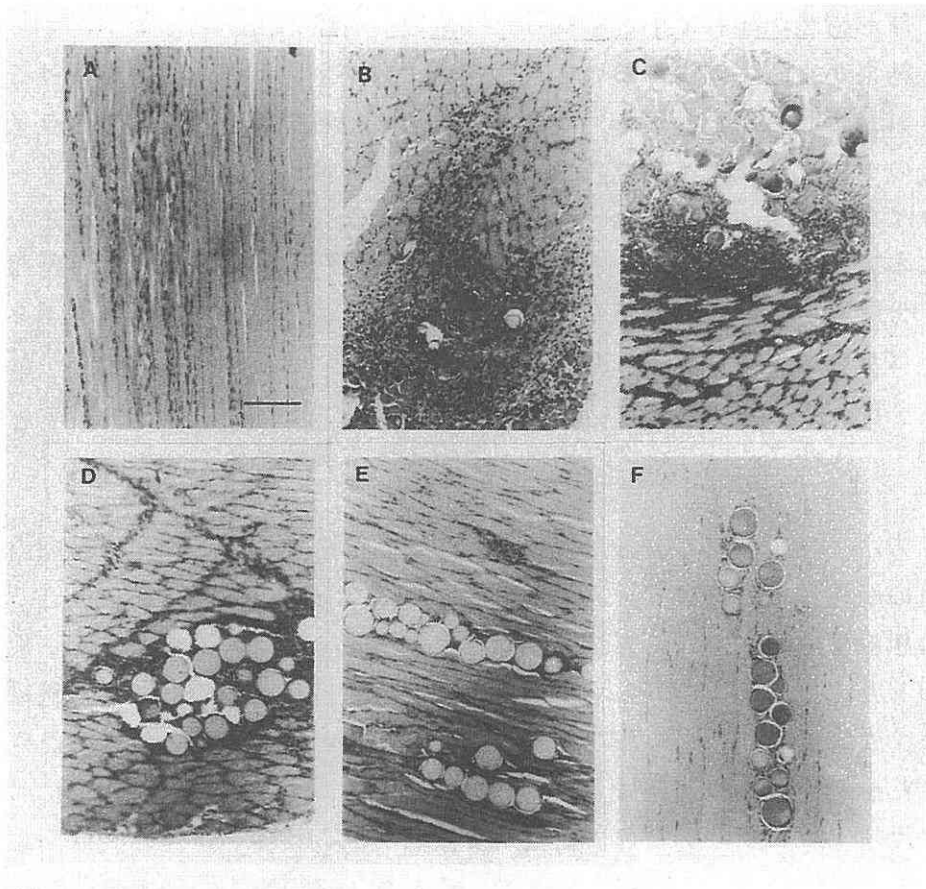


Fig. 8 Microphotographs of the Rat Muscle after Injection of
Albumin Microspheres bar=100 μ m

A ; non-treatment ,

B ; 7 days after injection of albumin microspheres (Method I) ,

C ; 7 days after injection of albumin microspheres (Method II) ,

D ; 3 days after injection of albumin microspheres (Method III) ,

E ; 7 days after injection of albumin microspheres (Method III) ,

F ; 30 days after injection of albumin microspheres (Method III)

第3章 アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出性

天然高分子であるアルブミンやゼラチン，合成高分子であるエチルセルロースやシリコーンは，標的化のための薬物担体としてばかりでなく最近は薬物徐放性材料として，経口用のカプセル剤あるいは植え込み剤として利用されつつある⁵³⁻⁵⁶⁾。これらの製剤は服用回数の減少や患者のコンプライアンスの点から，特に薬効の持

続化を目的としているものが多い。

一方、元来薬物担体の利用は薬物の“標的化”にあった。標的化によって薬物のバイオアベイラビリティはかなり改善されることが予想されるが、制癌剤の場合、その薬理作用に合わせて“放出制御”ができれば、さらに標的部位の薬物のバイオアベイラビリティは改善されるであろう。

そこで本章では、第1章で用いた3つの調製方法で作成したアルブミンマイクロスフィアが本編で選択した制癌剤、マイトマイシンC (MMC) の薬理作用に適した薬物放出を望めるかどうかについて検討した。また、その放出性を予測、見積ることのできる方法の確立を行なった。

第1節 アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出

MMCはDNA合成阻害作用を持つ濃度依存型の制癌剤である。それゆえ、MMCが投与されたとき癌組織内MMC濃度が高いほど薬効が高くなる。またその時点で生き残った癌細胞が存在することを考慮するとその後も癌組織内にMMCがある程度残存するか補給されるほうが望ましい。したがって、本システムにおいて、動脈内に投与されたMMC含有アルブミンマイクロスフィアが癌組織内または支配動脈内に標的化できたと仮定すると、マイクロスフィアからのMMCの放出は、初期に比較的多くのMMCがマイクロスフィアから放出され、その後持続的に放出される方がMMCの癌組織内の利用率が高まると予想される。

この薬物利用率を調製法の段階で考えてみると、マイクロスフィア調製時の薬物仕込み量に対する薬物含有率も問題となる。薬物含有率は第1章第1節に示した方法3が最も高く、癌組織に標的化されたマイクロスフィア単位重量あたりのMMC量は最も多くなる。したがって、他の方法で調製したMMC含有マイクロスフィアよりも高濃度で癌組織内に薬物を送り込みやすくなり治療効率の向上が期待される。

図9に方法1、2及び3で調製したアルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出曲線を示す。アルブミンマイクロスフィアからのMMCのpH 7.4リン酸緩衝液への放出は、方法1、2、3の順に速かったが、どの場合もほとんどが1時間以内に含有量の90、70、50%以上のMMCが放出された後、方法1ではほとんど放出されず、方法2及び3でも非常にゆっくりとしかMMCが放出されなかった。

前章でも述べたように生体内ではマイクロスフィアは酵素により分解を受ける可能性がある。そこでプロテアーゼ存在下における放出性を試験した。その結果、方法2及び3で調製したマイクロスフィアからは、速度に差はあるもののマイクロスフィアの消化分解に伴ってMMCが徐々に放出され、方法2で約4時間、方法3で

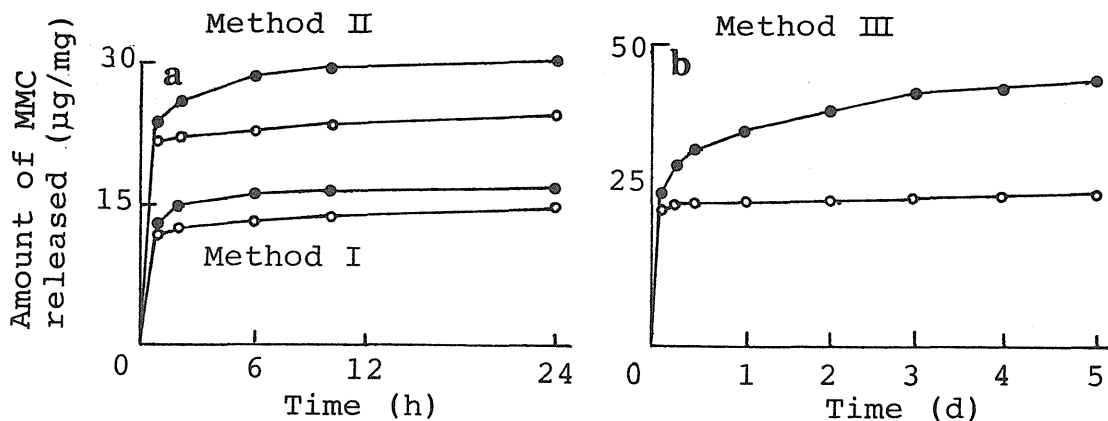


Fig. 11 In Vitro MMC Release from Albumin Microspheres
 (a); Method I and Method II, (b); Method III
 ○; without Protease, ●; with protease

約4日間放出が続いた。これは、マイクロスフィア中に含有されたMMCのうち、ある量の薬物はアルブミンの溶解により薬物が溶出することを示している。

これらの結果は、方法2及び3で調製したマイクロスフィアを動注した時、投与直後の癌組織内MMC濃度が一時的に高まった後、マイクロスフィアの分解に伴い徐々に放出された薬物により、癌組織内に、ある濃度のMMCが残存するだろうことを示している。加えて、方法3で調製したマイクロスフィアの効果は方法2で調製したものよりも長期に亘って得られる可能性が高い。また、Fujimotoら⁵⁷⁾は方法1とほぼ同様な調製方法を用いて調製したMMC含有マイクロスフィアを肝動脈内に投与したときの肝臓内MMC濃度及び肝静脈への流出動態を測定した結果、4時間前後、測定限界以上の高い肝組織内MMC濃度が得られることを報告しており、in vitroの放出結果はin vivoにおいてはより持続した結果となるものと思われた。

以上、第1、2章及び第3章第1節までの結果及び考察から、方法1～3で調製したアルブミンマイクロスフィアのうち方法3で調製したMMC含有マイクロスフィアが本編の治療システムに用いる化学塞栓物質として有用性が高いと考えられたので、第4章及び第5章においては方法3で調製したマイクロスフィアを使用することとした。

第2節 アルブミンマイクロスフィアからの初期薬物放出の見積り法

MMCの初期の速い放出 (burst effect) は、Widderら⁵⁸⁾が本格的にマイクロ

スフィアを薬物担体として利用しようと試みて以来、ほとんどの薬物、特に水溶性の薬物において見られる。Tomlinson ら⁵⁹⁾ は、水溶性の薬物については含有薬物量の90%前後が初期に放出され、残りの薬物が徐々に放出されると結論づけている。また、比較的初期放出の遅い薬物に関してはコンパートメントモデルや拡散モデルを用いて解析が行われている^{60~63)} が、一般にその初期の速い放出は放出試験開始後ほとんど1時間以内に起こるためその理論的な特徴づけは難しい。また、これらの薬物放出試験はマイクロスフィア群としてのものであり、個々の球体からの薬物放出性を試験したものではない。個々のマイクロスフィアからの薬物放出特性が同じであると仮定すると薬物放出は個々のマイクロスフィアの形態学的（ディメンション）な特性に依存することとなる。それは、前章で示したようなシャープな粒度分布のマイクロスフィア群よりもブロードな粒度分布のマイクロスフィア群でより顕著になると予想される。

アルブミンマイクロスフィアを用いて動物レベルでの効果を試験した結果に基づきMMCの放出性を改善するためには、まず、理論的な背景から今回使用したマイクロスフィアからの速い放出性の特徴づけを行い、薬物放出性を予測し見積もる必要がある。また、その上で薬物放出を制御する方法を組み立てていくほうがより簡単に最適と思われるMMCの放出性を得ることができる。薬物放出を見積もる上で薬物放出の特徴づけが不可欠であるが、個々のマイクロスフィアからのMMCの放出特性を明らかにすることはその定量感度から不可能と考えられる。

したがって、アルブミンマイクロスフィアからの薬物放出特性を明らかにするためには他の方法を用いて特徴づけることが必要となってくる。ここで、もしマイクロスフィアからの薬物放出特性が個々で変化せず、また個々の球体からの薬物放出を定量化できる大きさの球体まで放出特性が変わらないと仮定すると、大きなアルブミン球体からのMMCの放出特性からマイクロスフィアからのMMCの放出特性を判定でき、またその結果をもとにマイクロスフィア群の薬物放出を見積ることが可能となる。

そこで、本節では個々の大きなアルブミンの球体（mm order, macrospheres, マクロスフィア）からマイクロスフィアへの外挿により、MMCの初期放出特性を特徴づけ、マイクロスフィア群からのMMCの放出を見積る方法の確立を行った。

（1）理論

n 個のアルブミンマイクロスフィア群の中の i 番目のマイクロスフィアからの累積薬物放出量、 q_i 、は式（1）のように、ある関数、 f 、として表わされる。

$$q_i = f(\alpha, \beta, \gamma, \dots) \quad (1)$$

ここで i はあるマイクロスフィアの母集団を最も小さい球体から大きい球体に並べたときの順番である。 α 、 β 及び γ は従属パラメータである。もし、関数、 f 、が線形速度式、拡散式あるいは簡単な多項式で表わされるとすると、従属パラメータ、 α 、 β 及び γ 、は速度定数や拡散定数などになる。それゆえ、 n 個のマイクロスフィア群からの全累積薬物放出量、 Q 、は (2) 式のようなになる。

$$Q = \sum_{i=1}^n q_i \quad (2)$$

先述したように、一般にマイクロスフィア 1 個からの薬物放出を定量することは難しいので、マイクロスフィアの大きさにかかわらずその放出特性が変わらないと仮定するとマクロスフィアから得られた放出特性に係わるパラメータを用い、それを重量、体積、面積、粒子径のパラメータ (ディメンションパラメータ) や物性 (密度、薬物含有率) パラメータと関連づけることができればマクロスフィアからマイクロスフィアへの外挿が可能となる。また、このときマクロスフィアを用いてマイクロスフィアからの薬物放出特性も特徴づけることができるかもしれない。したがって、マイクロスフィア群の全累積薬物放出量はマイクロスフィアのディメンションパラメータや物性パラメータを支配する分布関数を用いることによって最終的に見積ることが可能となる。

(2) MMCを含有したアルブミンマクロスフィアとマイクロスフィアの調製

本節の目的は、マイクロスフィアからの初期薬物放出の特性を評価し、またその放出の見積り法を確立することである。そこで初期放出により MMC がほとんどすべて放出されるように、マクロスフィアとマイクロスフィアの調製にはグルタルアルデヒドによる化学的変性法を使用した。この方法により調製した球体からの MMC の放出は球体が溶解しなくてもほぼ完全にすべての MMC が放出される。その調製法の概略を図 10 に、マクロスフィアとマイクロスフィアを各々調製するための可変条件を表 4 に示す。この調製法を方法 4 とし、可変条件により Type A ~ Type D とした。この調製法ではマクロスフィアを調製するために、界面活性剤をごくわずか添加するか (Type A)、無添加 (Type B) で、攪拌スピードを極端に落として調製した。また、マイクロスフィアの調製は、その粒子径をランダムにするため攪拌速度を変え、Type A と同じ濃度の界面活性剤を添加 (Type C) するか、第 1 章の調製

Method IV

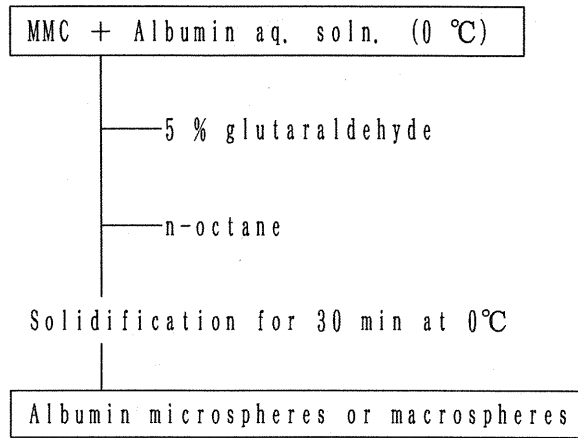


Fig. 10 Preparation Method of Albumin Macrospheres and Microspheres by Chemical Denaturation Method (Method IV)

Table 4 Condition for the Concentration of Span 80 and Stirring Speed at Preparation of Types A, B, C and D (Method IV)

	Concentration of Span 80	Stirring speed
Type	(v/v %)	(rpm)
A	0.2	150
B	---	150
C	0.2	400
D	1.0	700

法, 方法3と同様の濃度の界面活性剤を添加 (Type D) して調製した. この方法で調製したマクロスフィアとマイクロスフィアの顕微鏡写真を図11に示す.

(3) アルブミンマイクロスフィア群からのMMCの放出の見積り

図12に典型的な個々のマクロスフィアからのMMCの放出曲線を示す. また, 試験したマクロスフィアのディメンションパラメータと物性を表5に示す. マクロスフィアからのMMCの放出は粒子径の増加に伴ない遅くなった. したがって, 球体の大きさと薬物放出速度とに何等かの関係が得られる可能性がある.

そこでまず, これらの放出性に関して1次速度式及び球形マトリックスからの薬

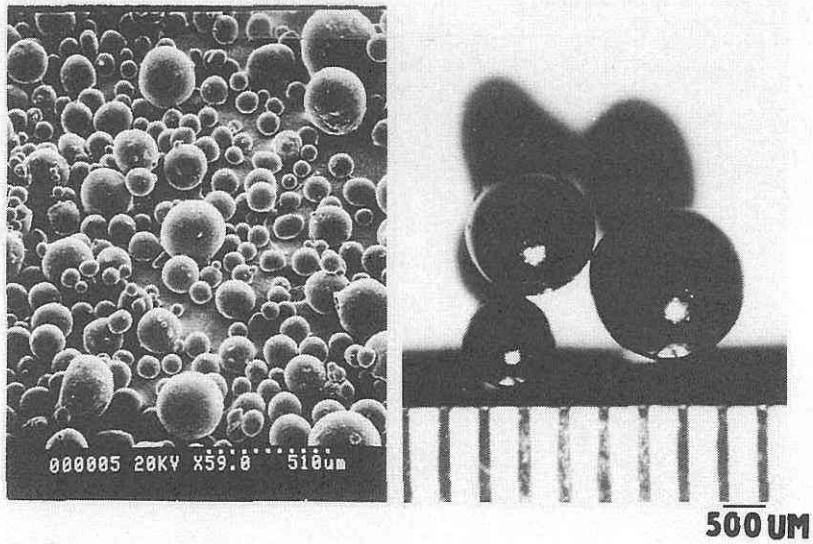


Fig. 11 Scanning Electron Micrograph of Albumin Microspheres (a) and Stereoscopic Micrograph of Macrospheres (b)

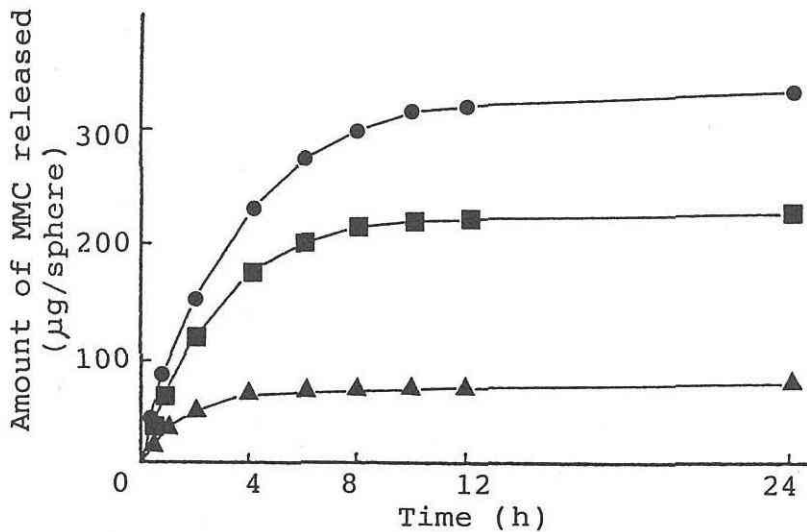


Fig. 12 In Vitro Typical MMC Release from Albumin Macrospheres
 ● ; No. 10, ▲ ; No. 16, ■ ; No. 20 (See Table 5)

物拡散式である Baker と Lonsdale の式⁶⁴⁾ * に当てはめ、それらの相関性を比較した。表 6 に MMC の放出に関するこれら 2 式の相関性を示した。どちらの場合もその相関性は高く、したがってマクロスフィアからの MMC の放出は、拡散理論に基づいて特徴づけることが可能である。その相関係数、 γ 、は 1 次速度式 ($0.930 \leq$

Table 5 Dimensional and Physical Parameters of Individual MMC-Loaded Albumin Macrospheres

No.	Weight	Diameter	Surface area	Volume	Density
Type A	(mg)	(mm)	(mm ²)	(mm ³)	(mg/mm ³)
1	0.57	0.916	2.635	0.402	1.42
2	0.89	1.042	3.409	0.592	1.50
3	0.96	1.083	3.683	0.665	1.44
4	1.24	1.186	4.417	0.873	1.42
5	1.50	1.226	4.720	0.964	1.56
6	1.58	1.303	5.331	1.158	1.36
7	2.81	1.623	8.266	2.235	1.26
8	3.54	1.713	9.214	2.631	1.35
9	5.80	1.905	11.40	3.622	1.60
10	6.33	2.216	14.19	5.030	1.26
Type B					
11	0.20	0.678	1.440	0.163	1.25
12	0.38	0.802	2.021	0.270	1.41
13	0.78	0.998	3.120	0.520	1.50
14	1.03	1.104	3.830	0.705	1.46
15	1.16	1.177	4.352	0.850	1.36
16	1.80	1.341	5.650	1.260	1.43
17	3.26	1.656	8.620	2.378	1.37
18	3.56	1.727	9.370	2.699	1.32
19	3.60	1.717	9.260	2.650	1.36
20	5.84	2.004	12.62	4.214	1.39
21	6.86	2.053	13.24	4.530	1.51
22	8.92	2.357	17.45	6.852	1.30

$\gamma \leq 0.9998$) のほうが拡散式 ($0.910 \leq \gamma \leq 0.998$) よりも良く、また1次速度式のほうがより簡便であることから、以後の薬物放出の見積りには1次速度式を用いることとした。

したがって、式(1)は次のように表わすことができる。

$$q_i = M_{0i} [1 - \exp(-k_i t)] \quad (3)$$

Table 6 Correlation Coefficients (γ) between Log Amount of MMC Released and Time (First Order Kinetics) or Y and Time (Diffusion Kinetics)

	First order kinetics	Diffusion Kinetics		First order kinetics	Diffusion Kinetics
Type A	(γ)	(γ)	Type B	(γ)	(γ)
No. 1	0.925	0.917	No. 11	0.965	0.944
2	0.993	0.983	12	0.977	0.983
3	0.9996	0.992	13	0.995	0.999
4	0.997	0.995	14	0.999	0.943
5	0.9998	0.995	15	0.996	0.995
6	0.997	0.997	16	0.996	0.991
7	0.991	0.984	17	0.999	0.993
8	0.991	0.990	18	0.996	0.995
9	0.995	0.988	19	0.999	0.996
10	0.998	0.997	20	0.998	0.996
			21	0.993	0.995
			22	0.998	0.997

* (see eq. (c))

Table 7 Independence Kinetic Parameters in Individual MMC-Loaded Albumin Macrospheres

Type A	M_{0i} ($\mu\text{g/sphere}$)	k_i (hr^{-1})	Type B	M_{0i} ($\mu\text{g/sphere}$)	k_i (hr^{-1})
No. 1	30.8	1.21	No. 11	10.6	3.05
2	42.8	0.92	12	14.2	2.10
3	47.0	0.89	13	32.2	1.29
4	60.7	0.73	14	36.5	1.16
5	82.0	0.63	15	44.9	0.92
6	90.7	0.57	16	69.4	0.75
7	157.0	0.38	17	124.1	0.55
8	170.7	0.35	18	131.4	0.54
9	296.1	0.27	19	148.9	0.43
10	316.0	0.26	20	228.1	0.39
			21	269.4	0.29
			22	340.4	0.26

* : 球形マトリックス中に薬物が飽和濃度以上に均一に分散し, その薬物がマトリックス中を拡散してシンク溶液中に放出すると仮定したとき, Baker と LonsdaleはT. Higuchi の式⁶⁵⁾ に基づき, 以下の式を導いた.

$$dQ_t / Q_0 / dt = 3 C_s D / r_0^2 C_0 \times [(1 - dQ_t / Q_0)^{1/3} / 1 - (1 - dQ_t / Q_0)^{1/3}] \quad \text{--- (a)}$$

この速度式を積分して濃度式にすると

$$3/2 [1 - (1 - Q_t / Q_0)^{2/3}] - Q_t / Q_0 = 3 D C_s / r_0^2 C_0 \times t \quad \text{--- (b)}$$

ここで, Q_t は時間 t においてスフィアから放出された薬物量, Q_0 はスフィア中の全薬物量, D はスフィア中の拡散係数, C_s はスフィア中の溶解度, r_0 はスフィアの初期の半径, C_0 はスフィア単位体積当りの薬物量である.

濃度式の左辺を Y , 右辺の第1項を a とおくと, 濃度式は

$$Y = a \cdot t \quad \text{--- (c)}$$

となる. 縦軸に Y , 横軸に時間 t をとった時に傾き a の直線になれば, マイクロスフィアからのMMCの放出性を拡散理論により特徴づけることが可能となる.

ここで, $M_{0,i}$ は i 番目のマクロスフィアの薬物含有量, k_i は i 番目のマクロスフィアの1次放出速度定数である. ゆえに, n 個のマクロスフィア群からの全累積薬物放出量, Q , は式(2)及び(3)から式(4)のようになる.

$$Q = \sum_{i=1}^n q_i = \sum_{i=1}^n M_{0,i} [1 - \exp(-k_i \cdot t)] \quad (4)$$

次に, 式(3)中の個々のマクロスフィアの従属パラメータ ($M_{0,i}$, k_i) は, 図12の結果から個々の球体の大きさに依存する可能性が予想されたので, それらの関係を比較した. 表7にType A及びType Bのマクロスフィアの従属パラメータを示した. 表5に示したマクロスフィアのディメンションパラメータと表7に示したパラメータの相関性を求めたところ, 図13に示したように個々のマクロスフィアの重量と $M_{0,i}$ 及び k_i と表面積の逆数の相関性が最も高かった (共に $r \geq 0.998$). し

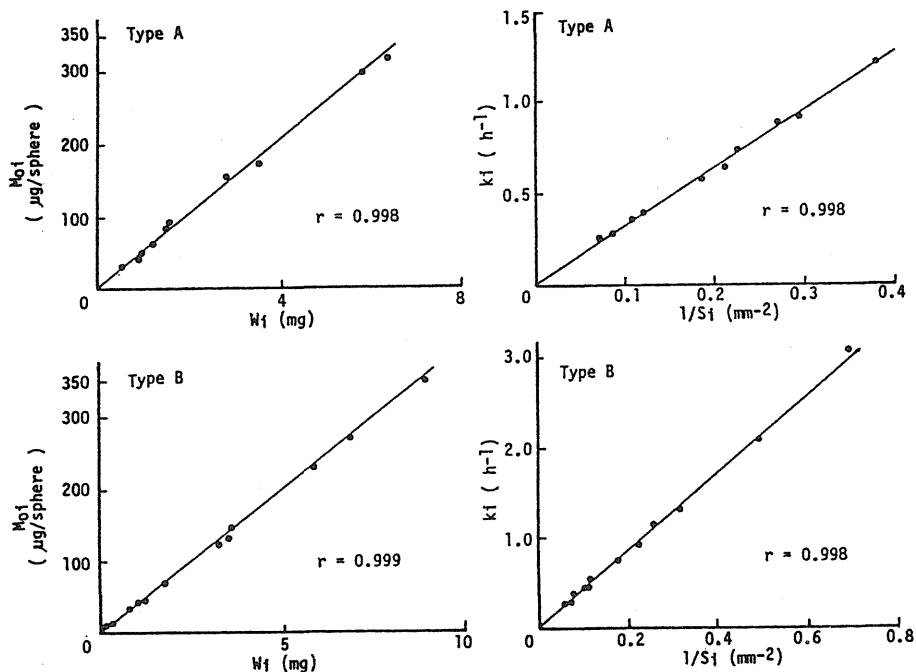


Fig. 13 Relation between $M_{o,i}$ and W_i or k_i and S_i for Albumin Macrospheres of Types A and B

たがって、これらの関係は次式のように表わすことができる。

界面活性剤が存在する場合 (Type A) ,

$$M_{o,i} = 5.06 \times 10^{-2} W_i \quad (5)$$

$$k_i = 3.15 / S_i \quad (6)$$

界面活性剤が存在しない場合 (Type B) ,

$$M_{o,i} = 3.86 \times 10^{-2} W_i \quad (5')$$

$$k_i = 4.30 / S_i \quad (6')$$

式 (5) 及び (5') はそれぞれ球体中の薬物含有量は球体重量に比例する、すなわち球体単位重量あたりに含まれる薬物量が一定であることを示す。また、式 (6) 及び (6') はそれぞれの速度定数が表面積に反比例する、すなわち単位表面積あたりの速度定数は一定であるものの個々の球体単位体積あたりの表面積が異なるためそれぞれの速度定数が異なることを示している。

したがって、これらマクロスフィアから求めた関係式からType A及びType Bの各場合において、個々の小さな球体の従属パラメータを算出することが可能なことを示している。しかし、Types A 及びB，すなわちマクロスフィア調製時に界面活性剤を添加するかしないかによって式(5)と(5')及び式(6)と(6')の傾きは異なった。この要因を考察することは非常に難しいが、加えた界面活性剤が攪拌溶媒への薬物の漏出を防ぎ、また球体中の薬物の拡散速度またはsink溶液への分配速度を変化させているのかもしれない。それゆえ、マイクロスフィアの調製、特に粒子径200 μm 以下のものを調製するときには、界面活性剤の添加が不可欠であると考えられる。このことからType Aのマクロスフィアから得られた関係式(5)及び(6)を用いて累積MMC放出量を見積ることとした。したがって、式(4)は、式(5)及び(6)を代入して次式のようなになる。

$$\sum_{i=1}^n a_i = \sum_{i=1}^n 5.06 \times 10^{-2} W_i [1 - \exp(-3.15/S_i \cdot t)] \quad (7)$$

この式から、あるマイクロスフィア群からのMMCの放出を見積ることができる。 W_i と S_i は球体のディメンションパラメータであるので、 n 個の球体の W_i と S_i の分布は球体の粒度分布として扱うことができる。そこで、Type CとType Dのマイクロスフィアを無作為に100個取り出し、その粒度分布から分布関数を求めた。一般的に粒子の粒度分布は、分布の上下を無視して正規分布またはlog正規分布として取り扱うことが多い。この時分布関数は単純な直線式とすることができる。しかし、本実験において、小さい粒子は全粒子からの薬物の放出速度定数に大きく影響を与える。また同時に、大きな粒子は薬物含有絶対量に影響する。このような場合、通常分布関数としてRosin-Rammlerの式⁶⁶⁾を適用できる場合が多いが、今回調製したマイクロスフィアはこの式に当てはまらなかった。それゆえ、分布関数を次式の多項式として表わすこととした。

$$W_i = a_w \cdot i^3 + b_w \cdot i^2 + c_w \cdot i + d_w \quad (8)$$

$$\log S_i = a_s \cdot i^3 + b_s \cdot i^2 + c_s \cdot i + d_s \quad (8')$$

ここで、 a_w 、 b_w 、 c_w 、 d_w 、 a_s 、 b_s 、 c_s 及び d_s は用いたマイクロスフィアに依存した係数である。図14に、分布関数を求めるためTypes C 及びDのマイクロスフィア100個の W_i と $\log S_i$ の分布を小さい順に並べて示した。この分布は3回の試験でほぼ同様であった。コンピュータプログラム、MULTIを用い

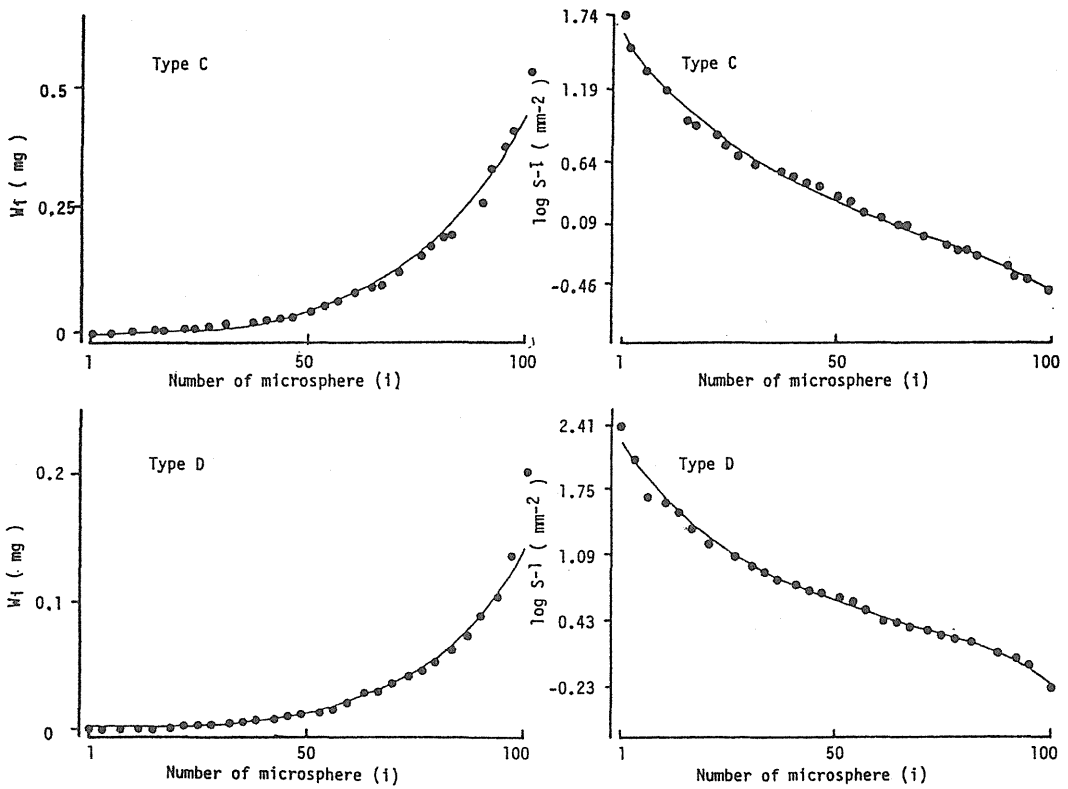


Fig. 14 Weight or Surface Area Distributions of Albumin Microspheres of Types C and D

て非線形最小二乗法による当てはめから、これらの曲線の式 (8) 及び (8') の係数を求めた。したがって、式 (8) 及び (8') は次式のようにになった。

Type Cのマイクロスフィアの場合、

$$W_i = 7.47 \cdot 10^{-7} \cdot i^3 - 3.85 \cdot 10^{-5} \cdot i^2 + 9.19 \cdot 10^{-4} \cdot i - 1.01 \cdot 10^{-2} \quad (9)$$

$$\log S_i = -2.28 \cdot 10^{-6} \cdot i^3 + 4.60 \cdot 10^{-4} \cdot i^2 - 4.28 \cdot 10^{-2} \cdot i + 1.546 \quad (10)$$

Type Dのマイクロスフィアの場合、

$$W_i = 2.34 \cdot 10^{-7} \cdot i^3 - 1.02 \cdot 10^{-5} \cdot i^2 + 1.76 \cdot 10^{-4} \cdot i - 3.38 \cdot 10^{-5} \quad (9')$$

$$\log S_i = -3.87 \cdot 10^{-6} \cdot i^3 + 7.51 \cdot 10^{-4} \cdot i^2 - 6.12 \cdot 10^{-2} \cdot i + 2.322 \quad (10')$$

これらの結果から、式(9)及び(10)または式(9')及び(10')を式(7)に代入することでType C及びType Dのマイクロスフィア群からの全累積MMC放出量を見積ることができる。

次に、これらの式により求まる薬物放出の計算曲線の妥当性を評価するため、計算値と実測値を比較した。図15に、Type C及びType Dのマイクロスフィア群からの累積MMC放出量の実測値と計算曲線を示す。図から明らかなように、実測値と計算値はどちらの場合も良く一致した。これらの結果から、今回用いた計算法によりアルブミンマイクロスフィアからの薬物放出を見積ることが可能であることが示唆された。

マイクロスフィアやマイクロカプセルなどの微粒子からの薬物放出の特徴づけは、放出量がマイクロオーダーであるため非常に難しい。今回確立した計算法は微粒子からの薬物放出性がマクロオーダーの粒子であっても変わらないという仮定のもとに成り立つ。逆にいえば、この方法により薬物放出を見積ることが出来ればマクロスフィアを用いて微粒子の薬物放出特性を決定できることになる。アルブミンマクロスフィアからのMMCの放出は、1次速度式及び球形マトリックスの拡散式のどちらにも比較的良く従った。それゆえ、今まで単に“burst effect”として取り扱われてきたアルブミンマイクロスフィアからの初期の速い放出は、マイクロスフィア群の、特にその中のより小さい個々のマイクロスフィアの放出速度定数あるいは拡散及び分配係数により支配された個々の放出の集合体として特徴づけることができる。この特徴づけはアルブミンマイクロスフィアばかりでなく、他の微粒子担体

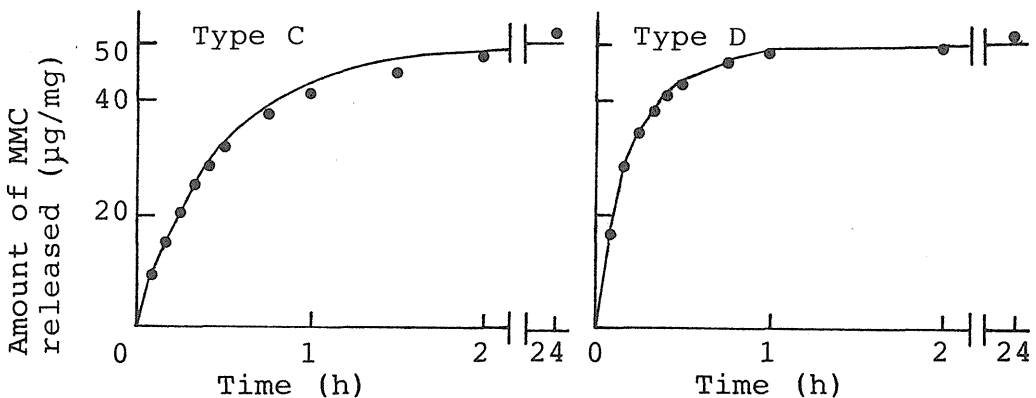


Fig. 15 Comparison between Calculated (—) and Observed (●) Values for In Vitro MMC Release from Albumin Microspheres of Types C and D

にも応用できるものと思われる。しかしながら、この方法は、マイクロカプセルからの薬物放出を見積るのには適していないと考えられる。それはマイクロカプセルの場合、薬物放出を支配する被膜の厚さは個々のカプセルで不均一の場合が多く、大きなカプセルから小さなカプセルへ外挿出来るような個々のカプセルのディメンションパラメータと放出速度パラメータとの関係を求めることができないからである。事実、Gross や Hoffman ら^{67, 68)}は、個々のマイクロカプセルからの薬物放出が封入した薬物の活量が一定である時間範囲内において、その放出が0次であるものの放出速度は粒子の大きさに依存せずカプセル膜の厚さに依存することを示し、マイクロカプセルからの“burst effect”はマイクロカプセル群のより被膜の薄いカプセルに依存して決定されると特徴づけている。

この薬物放出の見積り法は種々の微粒子マトリックスへの応用が期待されるばかりでなく、またアルブミンマイクロスフィアからの薬物放出の特徴づけを物理化学的に研究しているIshizakaら⁶⁹⁾やYaacobiら⁷⁰⁾の実験にも役立たせることができるであろう。

本節で得た結果から、第1節で示した3つの方法で調製したMMC含有アルブミンマイクロスフィアからの初期のMMC放出も同様な機構に基づいているだろうことが予想される。この方法に基づき計算される方法3のマイクロスフィアからの初期のMMC放出は分単位で起こる。含有させたMMCにとってこの速い放出が抗腫瘍効果にどのように影響するかは現段階では判定できないが、少なくとも対応できるような何らかの薬物放出の改善策が必要になるとと思われる。

第4章 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能に関する組織学的評価

動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化はまず動脈内投与の技術レベルにより左右される。今日のカテーテル技術の進歩は本実験の標的臓器である肝臓の固有動脈へ大腿部動脈からの挿入でも到達させることができ、さらに分枝した動脈へも選択して挿入することが可能になっている⁷¹⁾。したがって、その部位において注入されたマイクロスフィア、すなわち塞栓物質の塞栓部位はその粒子径により決定される。固形癌、特に肝癌の保存的治療、すなわち正常肝組織をできるかぎり残しつつ癌組織のみダメージを与える治療を容易にするためには、担体や薬物の標的化が重要となる。

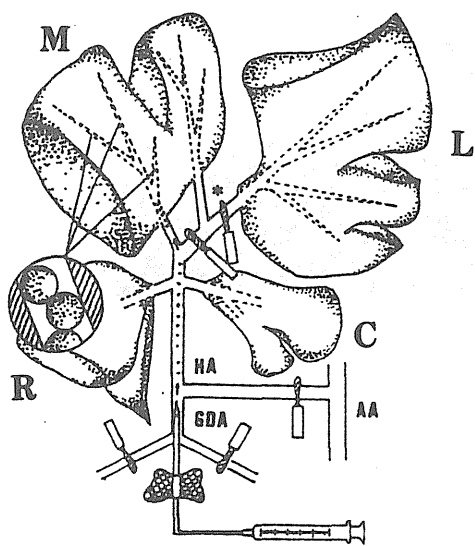
そこで本章においては、担体と薬物の標的化能を組織学的に評価した。

第1節 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能の造影法による評価

肝癌への標的化を証明する肝動脈内投与のモデル化は図16のように行なった。すなわち、ラット肝中間葉の左側、右葉及び尾状葉を標的的部位とし、中間葉の右側及び左葉を正常肝組織と仮定してアルブミンマイクロスフィアを注入し、その塞栓状況を比較した。

図17にマイクロスフィア注入直後、2及び7日後のアンジオグラムを示す。注入直後ではマイクロスフィアが注入されなかった肝中間葉の右側及び左葉、すなわち正常肝組織と仮定した組織の動脈はその末梢まで鮮明に描出されているのに対し他の葉、すなわち標的的部位と仮定した組織の動脈はマイクロスフィアにより血管塞栓が起こり途中から描出されなかった(図17a)。この結果は、動脈を確実に塞栓することによって標的化が成立していることを示している。2及び7日後のアンジオグラム(図17b及びc)においてもその塞栓状況は変わらず、アンジオグラムから少なくとも1週間動脈塞栓を伴う標的化が継続していることが明らかとなった。

次に、癌を移植した肝臓においても同様な標的化が可能かどうかを確認するため、ラット肝中間葉の左側にAH 272腹水肝癌細胞を移植して転移モデル肝癌を作成し同様にマイクロスフィアを投与した。図18にその結果を示す。図から明らかのように、癌新生血管を伴う癌組織(図において中間葉の左側、図18a)においても動脈塞栓



* ; 第2編, 第2章, 第1節の図34の実験においては, ここをクランメで止めた。

M; Middle lobe

L; Left lobe

R; Right lobe

C; Caudate lobe

AA; Abdominal Artery

GDA; Gastro-Duodenal Artery

HA; Hepatic Artery

Fig. 16 Schematic Diagram of Infusion Method of Albumin Microspheres to Hepatic Artery in Rats

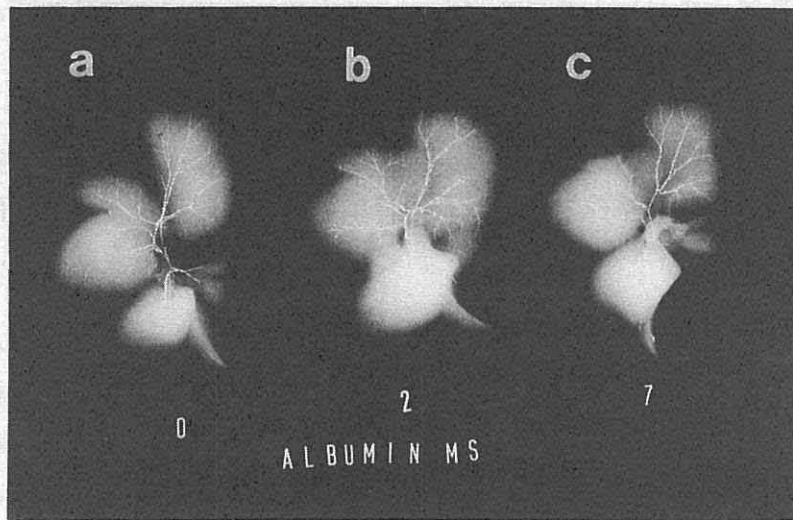


Fig. 17 Angiogram of the Liver after Intra-Arterial Infusion of
 Albumin Microspheres in Rats
 (a); immediately after infusion, (b); 2 days after infusion,
 (c); 7 days after infusion

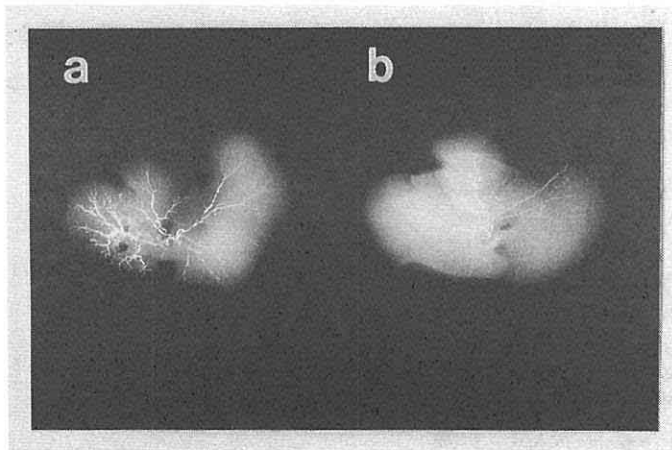


Fig. 18 Angiogram of the AH 272 Tumor-Implanted Liver after
 Intra-Arterial Infusion of Albumin Microspheres in Rats
 (a); no infusion, (b); infusion

を伴う標的化が確認された（図18b）。これらの結果は、より選択的にカテーテルを施すことが可能な現在の技術レベルにおいて、肝癌の保存的治療の可能性を示唆するものである。

第2節 動脈内投与によるアルブミンマイクロスフィアの標的化能の染色法による評価

図19に薬物を含まないアルブミンマイクロスフィアを動脈内に注入72時間後(図19a), MMCを含有したマイクロスフィア注入12及び24時間後(図19b及びc)のHE染色像を示す。これらの組織像からもアルブミンマイクロスフィアの標的化が確認された。図19aの組織像から薬物を含まないマイクロスフィアの投与では、アルブミンマイクロスフィアが認められる動脈周辺の肝実質細胞は正常状態を保っていた。一方、図19b及びcの組織像からMMCを含有したマイクロスフィア投与12時間後では、図19aと同様に肝実質細胞は正常状態を保っているのに対しMMCを含有したマイクロスフィア注入24時間後では、マイクロスフィアの認められる動脈周辺の肝実質細胞が壊死に陥っていた。また、遊離MMC投与24時間後の組織像においても肝実質細胞の変化は認められなかった(データは示していない)。

図20にMMCを含有したアルブミンマイクロスフィア注入2週間後の組織像を示す。2週間後において、図19cで観察された実質細胞の壊死部はさらに広範囲に拡がっていた。同時に壊死部周辺に繊維芽細胞や擬胆管細胞が認められ、肝組織の修復過程に入っていた。また、動脈内に認められるマイクロスフィアの表面には凹凸

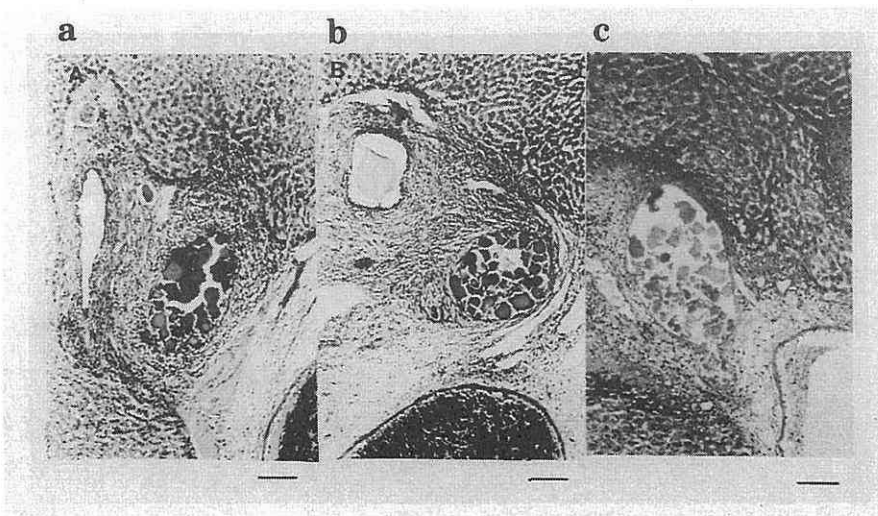


Fig. 19 Histological Appearance of the Liver after Infusion of MMC-Loaded and Non-Loaded Albumin Microspheres bar=100 μ m
(a); 24 h after infusion of non-loaded albumin microspheres
(b); 12 h after infusion of MMC-loaded albumin microspheres
(c); 24 h after infusion of MMC-loaded albumin microspheres

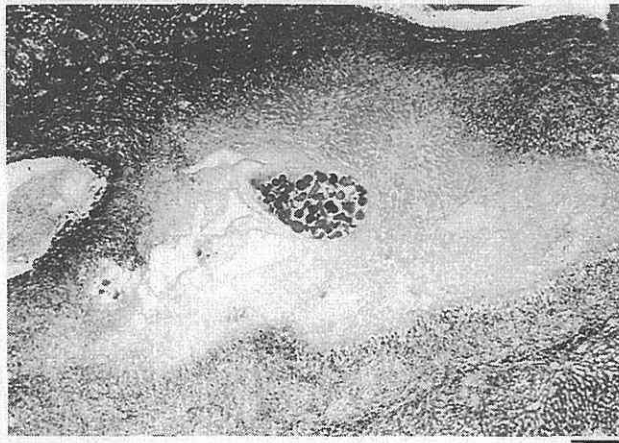


Fig. 20 Histological Appearance of the Livers 2 weeks after Infusion of MMC-Loaded and Non-Loaded Albumin Microspheres bar=200 μ m

が観察され、血管内においてマイクロスフィアの消化・分解が進行していることが推測された。

肝実質細胞の栄養補給ルートは肝動脈と門脈であり、どちらかの供給ルートが断たれたとしても比較的長期に亘って正常状態を保つことができる。今回得られた組織像の結果は、正常肝組織において薬物を含まないアルブミンマイクロスフィアを肝動脈内に投与しても比較的長い間正常状態を維持できることを示している。

癌組織においては、癌細胞の増殖活性が高いために栄養素が門脈血よりも高い動脈血にその供給の依存性が高く、また癌新生血管の呼び込みルートが動脈であることから動脈血の遮断により大きなダメージを与えることが予想されるとSegall⁷²⁾は指摘している。一方、中村ら⁷³⁾は動脈支配の臓器に発生した固形癌に対する塞栓効果は高いものの、2重支配を受ける肝臓癌の場合、門脈血からの栄養供給だけでも比較的十分であり塞栓効果は低いと述べている。この相反する意見から癌の種類やその存在状態により結論づけることが難しいと思われる。ここで得られた組織像の結果は、マイクロスフィア中に含まれたMMCが標的部位において放出され、動脈を含む結合組織周辺部位から徐々に実質組織を浸食し、その過程は長くても2週間以内に終了することを示している。しかしながら、その放出はマイクロスフィアの消化・分解が動脈内においてほとんど起こっていないことから、第3章で得たマイクロスフィアの消化・分解に伴って放出される薬物は、ほとんど組織像で得られた結果に寄与していないと思われた。

本章で得られた結果は、癌組織においてもMMCを含有したアルブミンマイクロスフィアの動脈内投与により薬物担体だけでなく含有させた薬物の標的化も達成できることを示唆している。

第5章 MMC含有アルブミンマイクロスフィアのAH 272腹水 肝癌細胞移植モデル肝癌ラットに対する抗腫瘍効果

前章までに、MMCを含有したアルブミンマイクロスフィアの“標的化”システムとしての有用性を試験・確認してきた。このシステムが実際の固形癌、特に肝癌に対してどの程度有力な武器になるかを確認することは重要である。固形癌は、その発生源により原発性及び転移性の2つに大別されるが、その型(nodular typeやmassive type等)によって細分類されるし、またその性質によっても癌の種類は多岐に渡る⁷⁴⁾。したがって、制癌剤の癌に対するスクリーニングは重要となる。市村⁷⁵⁾の制癌剤のスクリーニングは、主にラット及びマウスを用いたin vivo系(腹腔-腹腔系, i. p. -i. p. 系及び静注-静注系, i. v. -i. v. 系)であり、かつ一般的な注射剤として行っている。それゆえ、本論文のような特殊な系での動物を用いた抗腫瘍効果の評価は2通り考えられる。1つは、スクリーニング結果で、制癌剤の制癌スペクトル内に十分入る癌細胞を用いて特殊なシステムによる薬物のバイオアベイラビリティだけを評価する場合であり、もう一つは、このスクリーニングにおいては制癌剤の制癌スペクトル内に入るものの効果的に小さい癌細胞を用いて特殊なシステムによる制癌効果の拡大の可能性と薬物のバイオアベイラビリティとを評価する場合である。市村⁷⁵⁾のスクリーニング結果によれば、AH 272腹水肝癌細胞に対するMMCの効果は腹腔-腹腔(i. p. -i. p.)系である程度観察され、また静注-静注(i. v. -i. v.)系ではわずかに観察されている。

そこで、本章では本システムの可能性を追及するために、上述した2つ目の評価観点から、AH 272腹水肝癌細胞を用いて作成したラットのモデル肝癌に対するMMC含有アルブミンマイクロスフィアの抗腫瘍効果を試験した。

表8にAH 272細胞を肝臓の中間葉に移植後3日目に各製剤を動脈内に投与したときの肝癌ラットの延命曲線をもとに計算した平均生存日数とT/C%を示す。生理食塩水、遊離MMC、薬物を含有しないアルブミンマイクロスフィア及びMMC含有アルブミンマイクロスフィア投与群のラットの平均生存日数は8.8, 13.2, 9.6及び21.9日であった。また、MMC含有アルブミンマイクロスフィア投与群の場合、45日以上生存した、いわゆる寛解ラットが10匹中2匹存在した。これらの結果は、今回設計したシステムの肝癌に対する効果が高いことを示している。

ラットを用いた肝癌モデルにおいて、動注による遊離MMCのT/C%は、150であり判定基準から有効となる。このことは動脈内から薬物を注入するという投与方法に変更するだけで、MMCの癌細胞に対する制癌スペクトルを拡大できることを示している。さらに、薬物の投与剤形をアルブミンマイクロスフィアとし薬物の

標的化効率を高めるとT/C%は248.9 となり著しい延命効果を発揮している。これらのことは、標的化を主目的とした本治療システムが、癌の局所治療に対する武器として有用性が高いことを示している。

Table 8 Mean Survival and T/C % of MMC-Loaded Albumin Microspheres Treated Groups in AH 272 Tumor-Bearing Rats

	Number of rats	Mean survival (d ± S. E.)	T/C * (%)	Long term ** survivor
Control	10	8.8 ± 0.46	— —	0
Free MMC soln.	10	13.2 ± 0.75	150	0
MMC free microspheres	5	9.6 ± 0.67	109.1	0
MMC-loaded microspheres	10	21.9 ± 3.16	248.9	2

* : This means (mean survival of rats treated by each preparation / mean survival of rats non-treated) × 100.

** : This means number of rats survived over 45 days.

本章まで、アルブミンマイクロスフィアを利用して薬物の“標的化”を主目的としたシステム設計を行い、ラットを用いた肝癌モデルにおいて高い効果が得られたことから、目的はある程度達成されたものと考えられる。しかしながら、第3章までの結果から、種々調製法で調製したマイクロスフィアの中から本趣旨に最も適すると判断して以後の章で選択した方法3のマイクロスフィアは、第4章で得られた結果から、他の方法で調製したマイクロスフィアよりも薬物を高濃度で“標的化”できるもののその薬物を有効に利用できなかったと結論づけられる。したがって、標的化された薬物をさらに有効に利用するためには、マイクロスフィアに薬物の“放出制御”の観点から、さらに修飾を施すことが必要であると思われる。

第6章 アルブミンマイクロスフィアからの薬物放出制御の試み

前章まで薬物の“標的化”を主たる目的としてアルブミンマイクロスフィアを利用したシステム設計を行ってきた。しかし、DDSのもう一つの目的である薬物の

“放出制御”の観点からシステム設計を行っていない。マイクロスフィアからの薬物放出は初期に速い。MMCの薬理効果は濃度依存的であることから、そのことはむしろ長所として考えている。例えば、MMC溶液と塞栓物質としてデンプンマイクロスフィアとの併用動脈内投与によっても高い臨床成績を得ている。⁷⁶⁾ 加えて、マイクロスフィアの酵素による消化・分解に伴う薬物の“持続的放出”効果も期待できるものと予測していた。しかしながら、MMCのマイクロスフィアからの速い放出は第3章の結果から数分以内に起こり、また第4章の結果からマイクロスフィアの消化・分解に伴う薬物の持続的放出が期待できないことから、第5章の抗腫瘍効果に有効に利用されると思われる残存MMC量が少ないことが予想された。したがって、その放出速度が最適であるかどうかを判定することは難しい。

そこで、本章においては前章までの結果を参照して、必要な機能と思われる薬物の“放出制御”の観点から、アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出をより制御できるかどうかについて検討した。

まず、第5章で得られた抗腫瘍効果に結びつくMMC量が仮に今回方法3で調製した*in vitro*のマイクロスフィアからのMMCの速い放出、すなわち数分以内に放出されたMMC量で決定されるとすると、マイクロスフィアの動注により初期放出量の約70%以上のMMC量がこの時点で放出されマイクロスフィア中の薬物残存量が少ないことになり、その後の効果は余り期待できなくなる。組織像からの結果(第4章)は、*in vivo*においてその放出が*in vitro*よりも遅いことを支持していると思われるが、これはマイクロスフィア中に残存する約30%のMMCによる可能性が高いであろう。それゆえ、初期の段階での薬理効果を持続させるためにはより薬物放出速度を遅くし、少なくとも方法3で調製したマイクロスフィアの数分以内に放出されるMMCを1時間程度までに放出するようなマイクロスフィアとして調製できれば薬物の放出制御製剤としてもより有用となろう。

第3章の結果からマイクロスフィアからのMMCの速い放出は、個々の球体からの1次速度式あるいは拡散式に従った放出の集合体であることを明らかにした。従って、放出を制御するためには薬物の放出速度定数 k あるいは球体中の薬物拡散係数 D を変えることが必要となる。そこで、本章では固定化剤を利用してアルブミンマトリックス構造を強化し、薬物の放出制御を図った。

第1節 薬物放出制御を目的としたMMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製

図21に固定化剤を利用したアルブミンマイクロスフィアの調製法を、表9に調製

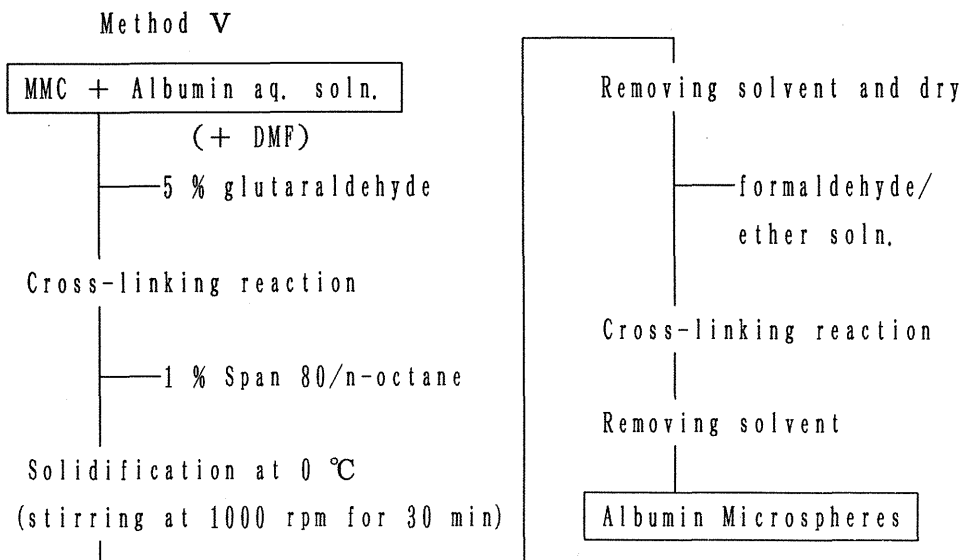


Fig. 21 Preparation Method of MMC-Loaded Albumin Microspheres

Table 9 Conditions for Preparing MMC-Loaded Albumin Microspheres
(Method V) (Diameter = 125~205 μ m)

Type	Albumin (mg)	MMC (mg)	(DMF) *	Fixing period** (h)	MMC content (% W/W)
A-1	270	30	—	0	5.2
-2	270	30	—	1	4.2
-3	270	30	—	4	4.0
-4	270	30	—	8	3.6
-5	270	30	—	16	3.1
B-1	270	30	+	0	4.0
-2	270	30	+	1	3.3
-3	270	30	+	4	2.8
-4	270	30	+	8	2.5
-5	270	30	+	16	2.2
C-1	285	15	—	0	1.9
-2	285	15	—	4	1.6
-3	285	15	—	16	1.1
D-1	295	5	—	0	0.8
-2	295	5	—	4	0.7
-3	295	5	—	16	0.6

* : solubilizer

** : Formaldehyde was used as a fixing agent.

条件を示す。本調製法を方法5とし、条件によりType A~Type Dとした。方法5ではマトリックス構造の強化を目的に交叉結合剤としてグルタルアルデヒド及びホルムアルデヒドを用いた。調製したマイクロスフィアはふるいを用いて各粒度に分取した。この場合、マイクロスフィアの粒子径はほぼ一定と仮定し放出試験に供した。

薬物含有量はホルムアルデヒドの固定化時間が長くなると減少した(表9)。図22にType A及びBのマイクロスフィアの固定化時間と薬物含有量の関係を示す。図から明らかなように、薬物含有量は固定化時間に依存して減少した。これは他のTypeにおいても同様であった。この原因は主にホルムアルデヒド/エーテル相中へのMMCの溶出によると思われる。MMCのマイクロスフィア中への分散性をより均一にするために利用したMMCの可溶化剤、ジメチルホルムアミド(DMF)の添加は薬物含有量の低下を招いてしまった。これはグルタルアルデヒドにより固化したマイクロスフィアとマイクロスフィア中に保持されなかったジメチルホルムアミド水溶液の相分離過程での遊離によると思われる。

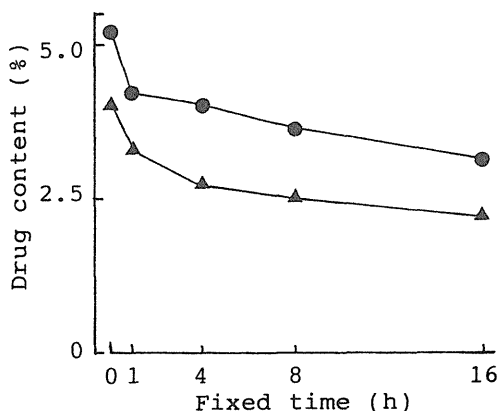


Fig. 22 Relationship between Drug Content and Fixed Time

● ; Type A, ▲ ; Type B

第2節 交叉結合剤を用いて調製したアルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出性

図23にType A~Type Dのアルブミンマイクロスフィアからの薬物放出曲線を示す。どの場合も、ホルムアルデヒドの固定化により薬物放出速度が減少する傾向が認められた。このことをより明確にするために、マイクロスフィアからの90%までのMMCの放出を拡散式及び1次速度式に当てはめ放出速度を評価できるパラメータを求めた。表10にその結果を示した。この2つのモデルの個々のパラメータの相関性は、どちらのモデルも同程度であったが、Type A~Type Dのアルブミンマイクロ

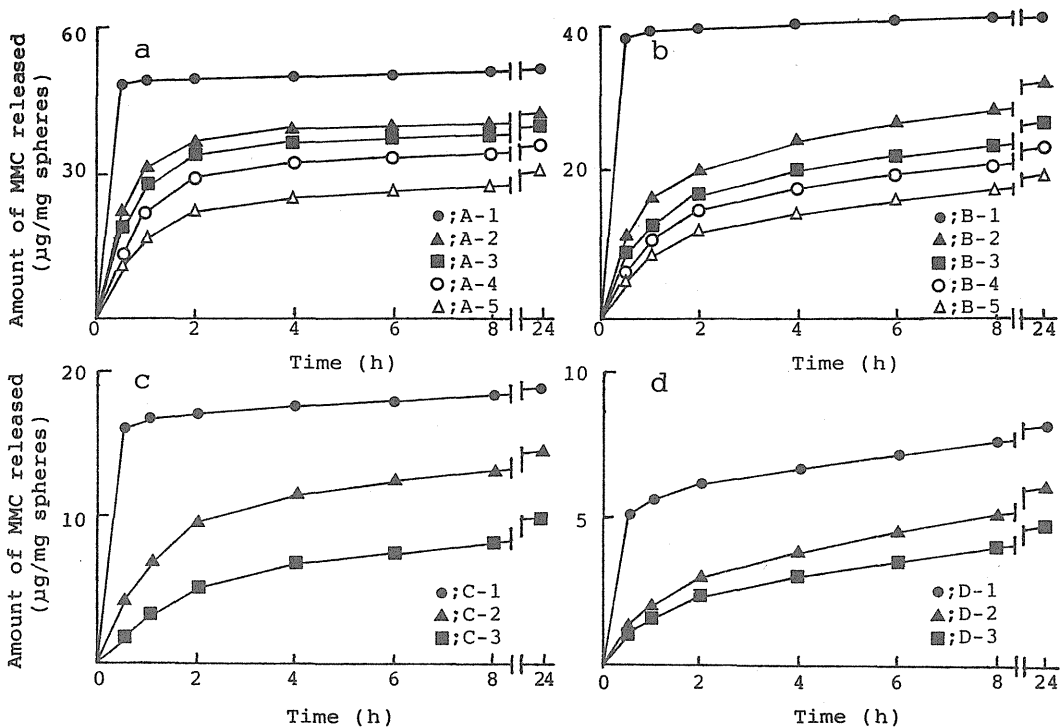


Fig. 23 In Vitro MMC Release from MMC-Loaded Albumin Microspheres
 (a); Type A, (b); Type B, (c); Type C, (d); Type D

Table 10 Kinetic Parameters in MMC-Loaded Albumin Microspheres

Type	3DCs/roCo (h ⁻¹)	γ^*	k (h ⁻¹)	γ^{**}	Type	3DCs/roCo (h ⁻¹)	γ^*	k (h ⁻¹)	γ^{**}
A-1	0.063	0.577	7.61	0.913	C-1	0.057	0.746	4.83	0.934
-2	0.055	0.893	1.66	0.955	-2	0.031	0.982	0.762	0.987
-3	0.047	0.904	1.41	0.947	-3	0.020	0.994	0.523	0.998
-4	0.041	0.926	1.14	0.978	D-1	0.038	0.959	2.08	0.907
-5	0.037	0.943	1.06	0.951	-2	0.019	0.999	0.543	0.990
B-1	0.065	0.656	6.12	0.923	-3	0.017	0.999	0.563	0.993
-2	0.033	0.985	0.984	0.977	-3	0.031	0.987	0.739	0.982
-4	0.028	0.985	0.724	0.990					
-5	0.023	0.987	0.694	0.984					

* : Correlation coefficient between Y and t (see eq. (C), p. 23)

** : Correlation coefficient between Qt and t (see eq. (4), p. 23)

フィアからの薬物放出の全体を通して、1次速度式のほうがMMCのマイクロスフィアからの90%までの放出をより正確に反映していることから、放出速度定数、 k 、を用いて放出速度を評価した。表から明らかのように、固定化時間の延長と共に速度定数、 k 、は減少した。Type A及びType Bのマイクロスフィアに関してこれらの関係を図24に示す。図から速度定数に対する固定化時間の効果は、Type Aで8～16時間、Type Bで4～16時間の間ではほぼ最大に達し、それ以上固定化してもその放出性に変化を及ぼさないことが明らかとなった。

ホルムアルデヒドを用いたアルブミンマイクロスフィアの固定化によりMMCの放出制御が可能となった。第3章で調製したマイクロスフィアの場合、薬物放出の90%以上が拡散モデルに従うことから、water-richなアルブミン実質部を薬物が拡散していると思われるのに対し、今回調製したマイクロスフィアの場合、ホルムアルデヒドの固定化時間に依存して薬物放出が2つ以上の関数により表わされる、少なくとも2つの放出性の異なるルートを薬物が拡散していることが考えられた。

今回調製したアルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出は方法3で調製したマイクロスフィアの速い放出が数分で起こるのに対しその部分のMMC放出量は低下し、その後の比較的早い時間内（約2～4時間以内）での放出量が増加した。今回の方法5で作成したマイクロスフィアの内、どの放出パターンが局所固形癌に対する効果が最も高いのかは判定できないが、第4章で認められたin vivoでの薬物放出がin vitroよりも遅くなるだろうという結果と癌組織における制癌剤の分布の拡がりマイクロスフィア中の薬物濃度に依存した濃度勾配にも大きく左右されることが推察されることから、本章で調製したマイクロスフィアは、薬物の“放出制御”の機能も有する“標的化”製剤としてより有用性が高まったものと思われる。

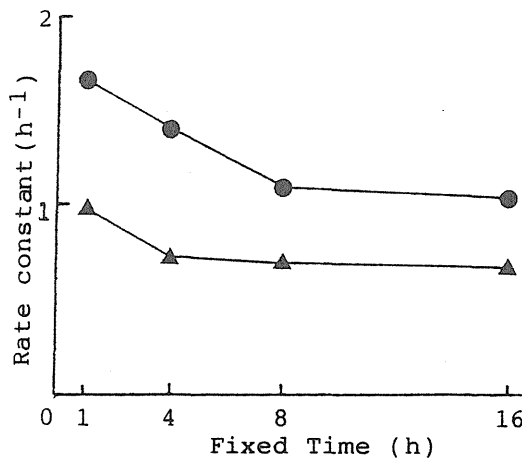


Fig. 24 Relationship between First-Order Release Rate Constant and Fixed Time ● ; Type A, ▲ ; Type B

第7章 小括

全6章に亘って固形薬物担体としてアルブミンマイクロスフィアを選択し、動脈内注入療法と組み合わせ設計した癌局所の“標的化”を主目的としたDDSについて述べてきた。本システムは経カテーテルによる動注によって標的化部位へ薬物担体を誘導し、薬物担体の粒子径による物理的な動脈塞栓により“標的化”を凶るものである。その第1ポイントは血管内の塞栓部位をどこに設定し、またそれに合わせて効率良く薬物担体を調製できるかである。今回用いたマイクロスフィアは攪拌溶媒や界面活性剤の選択に加え、交叉結合剤を利用したエマルジョン重合法を基本とした方法により設定した粒子径範囲のマイクロスフィアを収率良く調製でき、しかも比較的広範囲に亘って種々の平均粒子径を持つマイクロスフィアも調製することを可能にした。また、この方法は微粉化・懸濁した薬物を封入させることから、水溶性の薬物ばかりでなく脂溶性の薬物も比較的効率良く含有させることができる可能性を有しており、アルブミンが水溶性の高分子であることから脂溶性の薬物を含有させることができればそれらの物性の違いから長期に渡る徐放性製剤として利用できるかもしれない。

アルブミンマイクロスフィアはスキャンニング剤として利用されており生体適合性にほとんど問題はないと思われるが、我々の調製したマイクロスフィアには交叉結合剤としてグルタルアルデヒドを使用しており、生体への影響が心配された。しかしながら、筋肉内投与による病理学的な知見は急性炎症反応は見られるものの、その程度は従来からのマイクロスフィアのそれと変わらず適合性は高いものと思われた。また、ホルムアルデヒド固化によるマイクロスフィアも含め残留アルデヒドの可能性をシッフ塩基反応により確認したが⁷¹⁾ 検出されなかった。この結果は、第3章のマイクロスフィアの生体適合性が高いという結果を間接的に支持している。

アルブミンマイクロスフィアの生体内における酵素的消化・分解の可能性が*in vitro* 試験により推察された。ところが、動注投与による標的化の組織学的な確認試験において、*in vitro*よりもその分解性が非常にゆっくりであることが明らかとなった。この結果は脈管中のライソゾーム活性が非常に小さいことを意味している。したがって、この消化・分解性の速度はマイクロスフィアからのMMCの放出性にも影響を及ぼす可能性が推察された。

方法1～3で調製したMMC含有アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出は、初期の速い放出で特徴づけられる。この放出性はMMCの薬理効果の点から長所となりうると考えた。このうち方法3で調製したMMC含有マイクロスフィアからのMMCの放出はその速い放出の後、マイクロスフィアの消化・分解に伴った

比較的長期に亘る薬物放出の可能性を有していた。本編で設計したシステムの第1の目的は薬物の“標的化”であり、薬物担体及び薬物の標的化を組織学的に確認した。方法1～3で調製したMMC含有マイクロスフィアの中で、当初最も薬物放出性に優れていた方法3のMMC含有マイクロスフィアを用いたモデル肝癌ラットに対する抗腫瘍効果は動注による遊離MMC投与群に比べ高かった。この結果は、本システム設計が癌局所治療に対して有効な手段となりうることを示している。

しかし、方法3で調製したアルブミンマイクロスフィアによる本システムがこの系で最も優れているか否かは判断することは難しい。そこで、マイクロスフィアからのMMCの放出性の観点から第5章までの結果を総括して考えてみた。方法3で調製したマイクロスフィアからのMMCの*in vitro*での放出性は、初期の速い放出の後マイクロスフィアの消化・分解に伴ってMMCを放出することが予想されたが、組織学的な結果は、脈管内ではマイクロスフィアの消化・分解が遅く、消化・分解に伴う薬物放出の効果が余り期待できないかもしれないことを示唆していた。しかしながら、同様の組織学的結果から動脈を含む結合組織周辺の肝実質細胞はMMCによって徐々に壊死を起こし、そしてそれは、2週間に亘って拡がっており、*in vivo*では2週間以内の比較的長い間MMCが放出されている可能性が推察された。すなわち、マイクロスフィア中に含有されているMMCのうち、*in vitro*で速く放出されるMMCのみ薬理効果に有効であるものの、*in vivo*ではそのすべてが素早く放出されるのではなく、比較的ゆっくりとマイクロスフィアから放出されていると思われた。したがって、濃度依存的に効果を発揮する初期のMMCの速い放出に加え、その後さらに有効量のMMCの放出、すなわち*in vitro*での数分単位での速い放出を数時間単位までの放出に制御できれば、より効果が高まるものと思われた。

これらの一連の結果及び考察から、アルブミンマイクロスフィアを用いたシステム機能をさらに高めるには、マイクロスフィアからの薬物放出制御が必要と結論づけられる。マイクロスフィアからの薬物の速い放出は、大きなアルブミンの球体からの外挿法により個々の球体からの1次速度式または拡散式に従った放出性の集合体であり、その放出速度定数か拡散係数を変化させることによって改善できることを明らかにした。加えて、この方法は薬物放出の見積り法へと発展した。それらの結果をもとに、よりゆっくりとMMCを放出することが可能なマイクロスフィアの調製法も確立した。このマイクロスフィアの動物レベルでの効果については、判定しなかったが、薬物の“標的化”ばかりでなく“放出制御”の観点から、今回一連の方法で調製したアルブミンマイクロスフィアについてスクリーニングを行ないより精密なシステムとすることが今後の課題となろう。

第2編 動脈内注入療法と油性薬物 担体を組み合わせたDDS の開発

動脈内注入療法と油性薬物担体を組み合わせたDDSの開発の研究を組み立てる上で最も重要なポイントは、薬物担体として何を選択し、かつ癌組織への標的化のための手段としてどのような方法を用いるかである。エマルジョン製剤以外に液状の油性薬物担体として動注療法に利用されているのは、Lipiodol Ultra-Fluide (LP) だけであり、その臨床的評価は高い。^{21, 77)} しかも、LPはもともとリンパ管造影剤であるので、癌組織への“標的化”^{*}能力が高いばかりでなく同時に診断ができるという利点を有している。したがって、ここで選択されるべき油性薬物担体はLP以上の能力を必要とする。LPの標的化能力はその画像診断能力によって判断したものであり、薬剤学・製剤学的な研究・検討の結果から薬物担体への有用性を評価していない。加えて、LPの動脈内投与による癌組織中の高い滞留性、集積性のメカニズムも未だ明らかにされていない。そこでより有効な油性薬物担体を選択するために、その滞留メカニズムを推察すると、①癌支配動脈から網目状に延びる毛細血管の大半が血管構築の未熟な新生血管であるために高分子や油性物質を透過しやすい、②新生血管の形成に伴い癌組織中の血管容積が増加し、また新生血管が刺激に対する応答性に乏しいため、血管内の移動速度の遅いものほど残留しやすい、③リンパ管がほとんど欠如しているため、高分子や脂質類の除去能が低下し、その消失を遅らせる、④癌の形成に伴い細胞間質が拡大しその部位に貯留しやすい、^{22, 23, 78-80)} があげられる。これらは、全て癌新生血管を含む癌組織の特性に由来している。LPの特性で滞留効果に関連していると考えられるのは、それがヨウ素を含んでいることから比重が大きいことや構成脂肪酸の炭素数等である。それゆえ、まず油性薬物担体を選択するには、比重の影響や構成脂肪酸の炭素数の影響について実験することが考えられる。しかしながら、メカニズムを支配する要因は、ほとんど癌組織の特性にあると考えられるので、LPの構成成分を油性薬物担

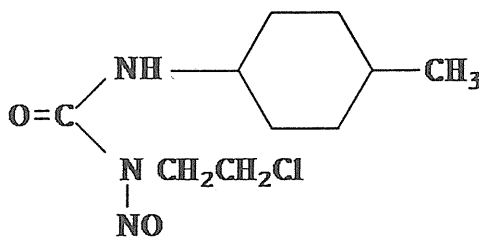
* : LP及び本論文で用いた油性薬物担体や薬物の本論文での研究結果で、癌組織において見かけ上、正常組織よりも担体や薬物量が多くなり、かつその値が投与した部位に均一に分布したと仮定したとき、平均値よりも高くなる場合がある。そこで、臓器や癌組織におけるある時間の担体や薬物の量を比較する場合、その量を滞留量、またその時間的推移(消失性)を滞留性または滞留能と言い、癌部位におけるある時間の担体及び薬物量を集積性または集積能と言うこととする。

体を選択するための基本に置き、癌組織の特性を活かしつつ、かつ液状の薬物担体の特性によって滞留効果が支配できるように製剤学的修飾を加えることとした。

まず、LPの原料であるケシ油の構成脂肪酸がオレイン酸及びリノール酸を主成分とする混合物であること、またLPがヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステルであることから、オレイン酸とそのエステル体であるオレイン酸エチルを油性薬物担体の候補として選択した。次に、LPよりも癌部位滞留性を高め、かつその効果をより担体支配性にするための方法を選択した。上述したLPの癌部位での滞留メカニズムと思われるものの中で、脈管中の滞留量と癌組織に移行した担体の移動速度を改善できる油性薬物担体を調製できれば、より滞留効果が高まるとと思われる。そこで、油性薬物担体に増粘剤を添加して粘性油性薬物担体を調製することとした。粘度の増加は脈管中の移動速度を遅らせ、しかも粘度によっては第1編で示したアルブミン小球体などの固型薬物担体と同様な塞栓効果も得られる可能性がある。

今野ら²⁰⁾はLPへの含有薬物として脂溶性の高分子化制癌剤SMANCSを、Fukushimaら⁸¹⁾はFdUrdのプロドラッグである3',5'-dioctanoyl-5'-fluoro-2'-deoxyuridineを用いた。一般的に薬物を溶解することは体内に吸収する上で最も重要なことであるが液状の油性薬物担体の出現は脂溶性制癌剤にとって薬物の利用率を考えると光明を与えるものである。一方、柴田ら⁸²⁾は、LP中にシスプラチンを懸濁含有させた製剤を調製して家兎肝癌モデルに適用して高い抗腫瘍効果を得ている。シスプラチンは一般的な投与方法では肝癌に対しほとんど効果がないと報告されており⁸³⁾、このようなシスプラチンの懸濁化剤を特殊なシステムに用いて薬物の利用範囲を拡大できる可能性を示した報告は興味深い。そこで、脂溶性制癌剤1-(2-chloroethyl)-3-(methylcyclohexyl)-1-nitrosourea (Semustine, セムスチン)及び難溶性制癌剤cis-diamminedichloro platinum (II) (Cisplatin, シスプラチン)を選択した。それら薬物の構造式と物性を図25及び26に示す。

本編では、主に粘性油性薬物担体の組織滞留性、癌部位集積性及び抗腫瘍効果について、以下7章に亘って報告する。

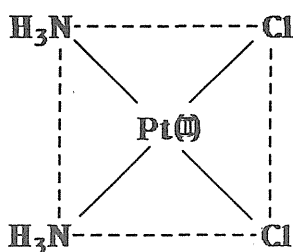


分子量 ; 247.7

溶解度 ; 25 °C

水	0.05 mg/ml
アセトン	50 mg/ml
ベンゼン	50 mg/ml
クロロホルム	667 mg/ml

図25 セムスチンの構造式とその物理化学的性質



分子量 ; 300.09

溶解度 ; 25 °C

水	0.77×10^{-2} M
0.9 % NaCl	0.50×10^{-2} M
DMF	6.67×10^{-2} M
DMSO	116.6×10^{-2} M

図26 シスプラチンの構造式とその物理化学的性質

第1章 制癌剤を含有した粘性油性薬物担体の調製

製剤学的な修飾によりLPのような組織滞留能やその滞留性のある程度担体支配性にするために、前編の固形薬物担体のような血管塞栓能を付与することは、上述したような担体設計の有効な手段になると思われる。油性薬物担体の特性を保持しながら固形薬物担体の特性を持たせるためには、粘度の高いゾル状の油性薬物担体の設計が必要である。また、今回使用する制癌剤のうちシスプラチンは、微粉化、懸濁して含有させるので油性薬物担体中に安定して分散しているほうが望ましい。

そこで、本章では高い塞栓性、滞留性が得られ、かつ、安定な薬物分散性を保持できる油性薬物担体の調製（増粘剤の添加による粘性の付与）とその物性について検討した。

第1節 粘性油性薬物担体の調製

予備試験で、オレイン酸(OA)やオレイン酸エチル(EO)の増粘剤の候補としてポリビニルピロリドン、プルロニック(ブロッグ重合型ポリエーテル系界面活性剤)⁸⁴⁾、ステアリン酸アルミニウム(AS)及びエチルセルロース(EC)を選択したが、ポリビニルピロリドンやプルロニックでは少量の添加で大幅な粘度の増加に至らなかった。そこで本編ではASとECを増粘剤として用いることとした。図27に粘性OA及び粘性EOの調製法を、また条件を表11に示す。まず、ASまたはECを任意の割合で取り、これにOAまたはEOを加えて攪拌しながら約120°Cで加熱溶解した。溶解後、室温で放冷して粘性OA及び粘性EOを製した。セムスチンは、その適量を粘性OAに添加し溶解した。またシスプラチンの場合は、微粉化(<5 μm)したシスプラチンの既知量に粘性EOを加え、超音波発生装置及びスターラーを用いて分散、懸濁させて調製した。なお、粘性EOは、常温でゲル化

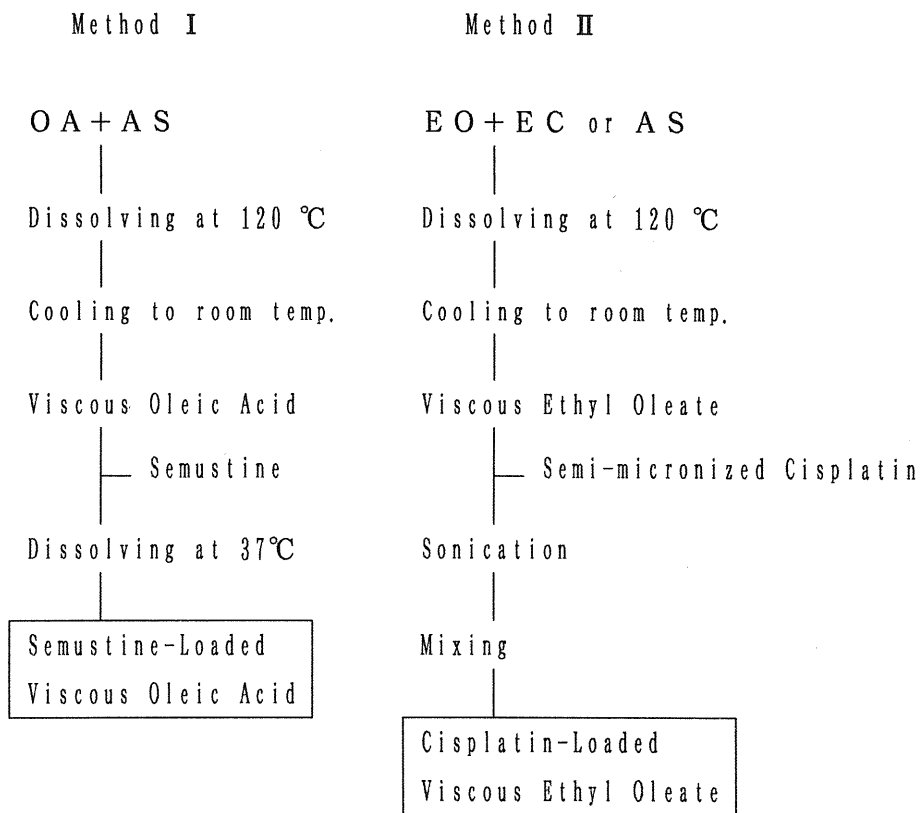


Fig. 27 Procedure for Preparing Semustine-Loaded Viscous Oleic Acid and Cisplatin-Loaded Viscous Ethyl Oleate

Table 11 Condition for Preparation of Semustine-Loaded Viscous Oleic Acid and Cisplatin-Loaded Viscous Ethyl Oleate

Method	Oil (g)	AS (g)	EC (g)	Semustine (%)	Cisplatin (%)
I - 1	9.61	0.39	—	6	—
2	9.56	0.44	—	6	—
3	9.53	0.47	—	6	—
II - 1	9.70	0.30	—	—	—
2	9.50	0.50	—	—	—
3	9.34	0.64	—	—	—
4	9.74	—	0.26	—	0.5
5	9.58	—	0.42	—	0.5
6	9.53	—	0.47	—	0.5

しているため、水浴中80℃でゾル化した後シスプラチンを添加した。

第2節 粘性油性薬物担体の粘性と指標粘度の決定

図28にOA, LP及びASを4.7%添加した粘性OAの、また図29にEO及びASまたはECを各々6.4%または4.7%添加した粘性EOのレオグラム(流動曲線)を示す。OA, EO及びLPのレオグラムは、ずり応力に対しずり速度が原点を通過して直線的に増加するニュートン流動を示した。OA, EO及びLPの粘度はそれ

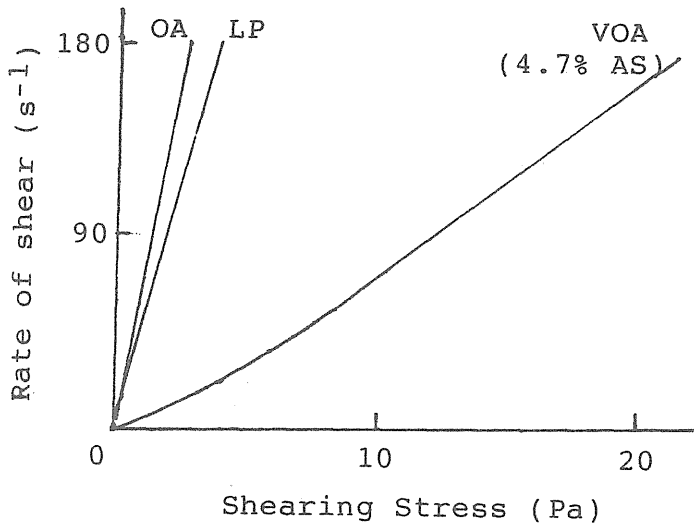


Fig. 28 Rheogram of Oily Drug Carriers

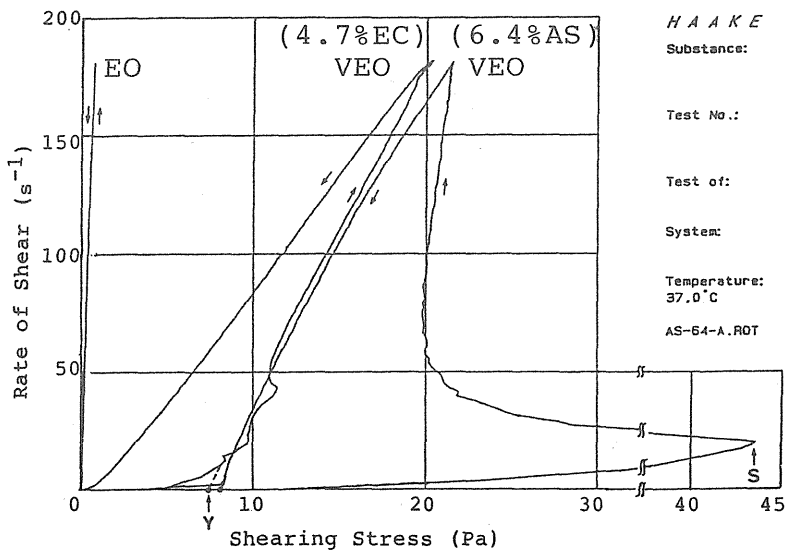


Fig. 29 Rheogram of Oily Drug Carriers

ぞれ15, 5及び21 cpであった。一方, ASを添加した粘性OA及び粘性EOまたはECを添加した粘性EOのレオグラムは非直線性の非ニュートン流動を示し, またこれらの粘度はずり速度の増加とともに減少した。粘性OAの場合, 原点を通る曲線であることから, それらは, 擬塑性流動体に属すると思われた。加えて粘性OAにおいて, 降伏値に見られる凝集破壊がないこと, このずり速度間で曲線幅が非常に小さいこと及び上昇曲線と下降曲線がほぼ一致していることから, 粘性OAの流動変化, すなわち粘度変化は比較的小さいものと思われた。粘性EOの場合, ASの添加で上昇曲線にスパー値が, ECの添加で降伏値が見られることから, 塑性流動体に属すると思われた。加えて, どちらの場合も上昇曲線と下降曲線とが一致せず, 下降曲線が左にシフトするチキソトロピーを示した。また, AS添加の粘性EOの場合, 塑性粘度はほぼ一定であると思われるものの, 下降曲線に未だ凝集破壊に伴う降伏値が観察され流動変化が非常に大きいと思われるのに対し, ECを添加したEOの場合, 下降曲線は擬塑性流動体様の曲線となり, またその間の曲線幅が小さいことから, ASを添加したEOに比べ流動変化は小さいと思われた。⁸⁵⁾

粘性油性薬物担体の血管塞栓能や臓器滞留性に対する粘度の影響を研究する場合, ずり速度に対する応力変化の大きな製剤はその評価が難しく, できれば応力が常に一定なニュートン流動体を使用する方が望ましい。しかし, 上述の結果からもわかるように, 増粘剤の添加はニュートン流動体を示す溶媒または分散媒を非ニュートン流動系の粘弾性を示す混合物に変える場合が多く, したがってこのような場合, 指標となる粘度を規定する必要がある。

そこで指標粘度の決定を行った。非ニュートン流動体の粘度変化は, ずり応力とずり速度の関数であると同時にずり速度の処理時間の関数でもある。したがって, ずり速度またはその処理時間のどちらかを一定の条件にするほうが指標粘度を決定しやすい。著者は実験方法の観点から(例えば, ある一定の攪拌速度で攪拌した粘性油性薬物担体を各実験に使用する), ずり速度を一定にしてずり応力を測定することにした。すなわち, 粘性OA及び粘性EOを, 37°C, 回転粘度計のトルク内静置2分, ずり速度 180 s^{-1} の一定条件に固定し, 時間に対する応力変化を測定した。

図30にASを3.6, 4.4及び4.7%添加した粘性OA, 図31aにECを2.6, 4.2及び4.7%添加した粘性EOを, また図31bにASを3.0, 5.0及び6.4%添加した粘性EOの結果を示す。粘性OAの場合, そのレオグラムから予想されたように, この時間範囲内でどのASの添加濃度においてもずり応力の変化は小さかった。粘性EOの場合, ECとASを添加したときを比較すると, ECを添加した粘性EOは経時的なずり応力変化が小さく, 測定後半の10分間でどのEC添加濃度の場合においてもずり応力はほぼ一定であったのに対し, ASを添加した粘性EOは経時的な

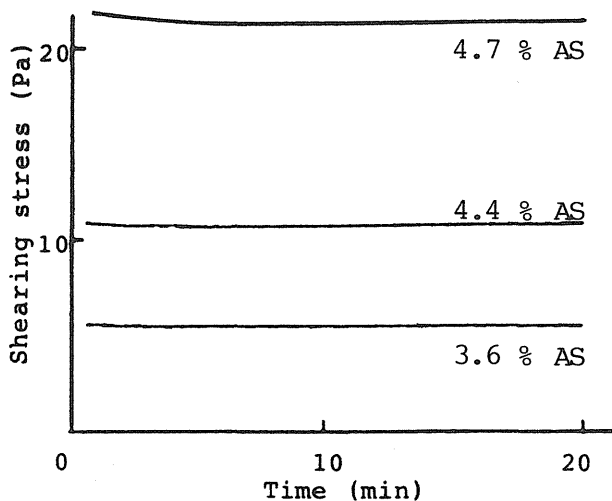


Fig. 30 Time Course of Shearing Stress of Viscous OA Containing AS at the Constant Rate of Shear (180 s^{-1})

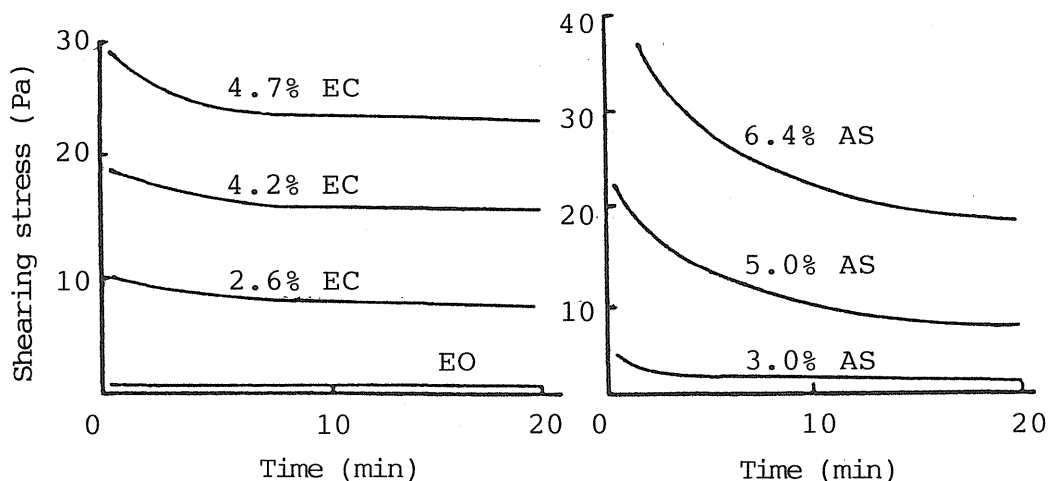


Fig. 31 Time Course of Shearing Stress of Viscous EO Containing EC (a) or AS (b) at the Constant Rate of Shear (180 s^{-1})

ずり応力変化が大きく、測定終点付近においても粘度がほぼ一定とはならず、さらに減少する傾向が見られた。これらの結果よりASを添加したEOは、ずりの履歴に依存性が高く、粘度の効果を測定する上で指標粘度の決定が困難であることから、粘性EOの増粘剤にはECを、粘性OAの増粘剤にはASを使用することとした。指標とする粘度は、粘性OAの粘度変化よりも粘性EOのそれを考慮して、上記測定条件で測定20分後のずり応力の値を用い、このときに見かけ上計算できる粘度

(centi poise , cp) を用いることとした。本論文においては、指標粘度がそれぞれ40, 80及び120 cpの粘性OA及びEOを使用した。但し、図31 a及び表11に示したようにECの添加濃度がそれぞれ2.6, 4.2 または4.7 %のときに指標粘度がそれぞれ40, 80, 120cp になっているが、用いたECの規格値に若干の幅(90~110 cps, 5% Ethanol+Toluene Soln. at 25 °C)があるので、ここで示した添加濃度は一つの目安として用いた(実験の部参照)。

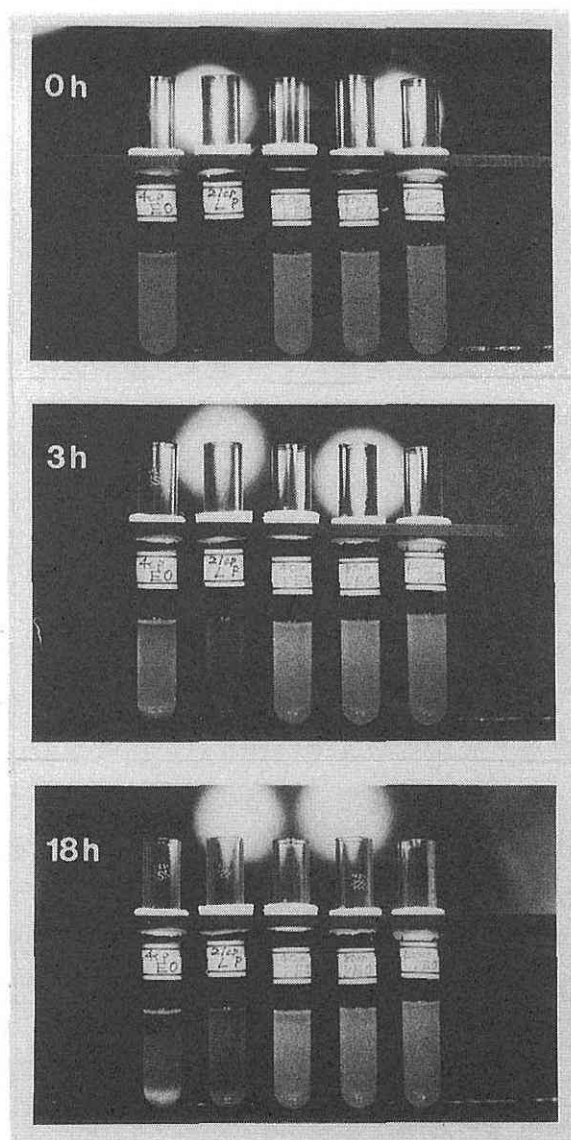


Fig. 32 Sedimentation of Cisplatin in Several Oily Preparations.

第3節 シスプラチン含有粘性EOの懸濁安定性

シスプラチンは油性薬物担体中に懸濁させて使用するので、次に油性薬物担体中の懸濁安定性を試験した。

図32にECを種々濃度で添加して調製した粘性EOに微粉化したシスプラチン($<10\mu\text{m}$)を懸濁し、調製した製剤の調製直後、2時間及び18時間後の懸濁安定性を示す。その結果、 120cp 粘性EO $=80\text{cp}$ 粘性EO $>40\text{cp}$ 粘性EO $>LP>EO$ の順に高い懸濁安定性を示し、粘度の増加によりシスプラチンの分散安定性が高まることが示唆された。また、ここでは示さなかったが、 120cp 粘性EOの場合、2週間以上シスプラチンが均一に分散していた。

第2章 油性薬物担体の脈管内挙動と組織滞留性

経カテーテル技術の進歩は、動注療法において標的化を臓器レベルから比較的癌部位周辺の局所組織レベルにまで可能にし、臨床成績を向上させている。しかし、制癌剤の局所内濃度は一時的に高くはなるものの速やかに全身循環系へと移行し、その効果は薬物投与初期に限定され、かつ投与量によっては副作用の問題も残されている。したがって、滞留効果の増強は正常組織に比べ癌局所に薬物を集中させやすいという点から、抗腫瘍効果を高める上で一番必要とされるfactorの一つである。

一方、生体の脈管系は、そのほとんどが動・静脈が連結した連続血管系であるが、腎臓では有窓タイプであるし、肝臓・脾臓では動・静脈が連結していない不連続タイプの血管系であり⁸⁶⁾、しかも各臓器における血流量や血流速度も異なる。したがって、今回我々が調製した粘性OAや粘性EOの血管塞栓能や臓器滞留性を種々の臓器で把握することは、臓器滞留性の最適な条件を選定して粘性油性薬物担体の能力を最大限に引き出すのに大切なことである。また、第1編の固形の薬物担体とは異なり、血管塞栓能に確実性が得られない。

そこで本章では、第1編と同様肝臓を主標的臓器とし、また種々臓器においても種々粘性OA及び粘性EOの脈管塞栓性や臓器滞留性を定性及び定量的に測定し、さらにその滞留機構についても若干検討した。

第1節 油性薬物担体の脈管内挙動

(1) 油性薬物担体の血管塞栓能の造影法による測定

図33に、ラットの肝左葉及び中間葉の右側(図に対して)以外の葉の動脈内に種

々粘度 (40, 80, 120 cp) の粘性OAを投与し, 10分後に造影剤を注入して撮影したアンジオグラムを, また図34に, 肝左葉以外の葉の動脈内にEO及び種々粘性EOを投与し, 24時間後のアンジオグラムを示す (第1編第4章第1節, 図18参照) .

40 cp 粘性OAを投与した葉の動脈は造影剤によって描出されており明確な血管塞栓の証拠は得られなかった. ここでは示さなかったがOAの場合も同様に明らかな血管塞栓は観察されなかった. 一方, 80及び120 cp粘性OAの場合, 左葉以外の



Fig. 33 Angiograms of the Liver 10 min after Intra-Arterial Infusion of Several Viscous OAs in Rats

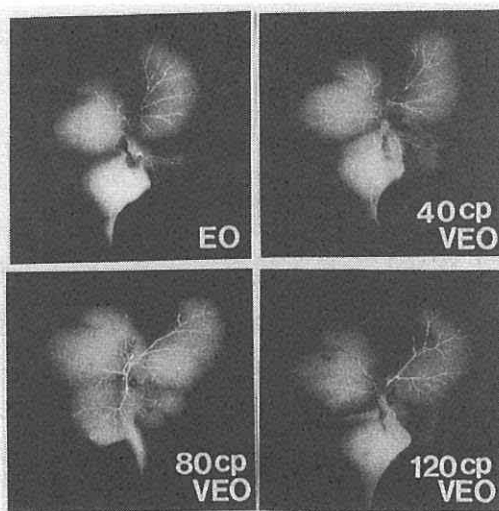


Fig. 34 Angiograms of the Liver 24 h after Intra-Arterial Infusion of Several Viscous EOs in Rats

葉の動脈は造影剤によって描出されておらず、それらの投与初期に動脈塞栓を起こすことが推察された。また、種々粘性EOの場合も投与10分後の結果は、粘性OAの場合と同様であった。図34から、EO及び40 cp粘性EO投与24時間後でも明確な血管塞栓は観察されなかった。一方80 cp粘性EOの場合、肝小葉辺縁部に若干の血管塞栓がみられるものの再現性の高い像は得られず、明らかな血管塞栓像は観察されなかった。この結果は80 cp粘性OAにおいても同様であった。また、120 cp粘性EOにおいては、投与された葉の動脈は描出されておらず24時間後においても動脈塞栓の可能性が推察された。この結果も120 cp粘性OAにおいて同様である。以上の結果は、ラット肝臓への投与において少なくとも24時間動脈塞栓能を油性薬物担体が有するためには、その指標粘度が120 cp程度必要であることを示している。

(2) 油性薬物担体の脈管内挙動の組織学的な測定

次に、これら油性薬物担体の血管塞栓性や脈管内挙動をより視覚的に観察し、また肝動脈との血管構築性の違いによるそれらの存在状態を肝臓のアンジオグラムと比較するためにハムスター頬袋を利用し、その動脈の支配動脈から種々粘性EOを投与してその後の頬袋内の挙動を顕微鏡的に観察した。図35及び表12にハムスター頬袋内動脈に種々粘度(40, 80, 120 cp)の粘性EOを投与した後の経時的な脈管内挙動の顕微鏡写真及び血管内の通過時間と塞栓状況を示す。

EOの場合、投与直後に頬袋内の径が $80\mu\text{m}$ の動脈を通過し、注入2~3分後に径が $20\sim 30\mu\text{m}$ の細動脈へ到達しそこからゆっくりと末梢へ移動した。注入20分後、径が $5\sim 10\mu\text{m}$ の細動脈や毛細血管に到達し、その部位で塞栓が観察され、2~3時間後に全微小動脈で血流が停止した。また、ここでは示さなかったが、EOの場合毛細血管中に到達した後、静脈側へ脱出するものもあった。40 cpの粘性EOの場合、約1分後に径が $70\sim 80\mu\text{m}$ 、2~3分後に径が $40\sim 50\mu\text{m}$ の動脈及び細動脈に到達し、20分後に径が $20\sim 30\mu\text{m}$ の細動脈で塞栓が観察されたが、枝分かれした径が $10\sim 15\mu\text{m}$ の血管にも移行した像が観察された。約1時間後にこれらすべての血管で血流が停止した。80 cpの粘性EOの場合、約1分後に径が $80\sim 100\mu\text{m}$ の動脈に到達し、約10分後に径が $70\sim 80\mu\text{m}$ の動脈で塞栓が観察され、約20分後で血流が停止した。120 cpの粘性EOの場合、約3分後に径が $110\sim 130\mu\text{m}$ の動脈に到達し、10分後に径が $100\sim 120\mu\text{m}$ の血管で塞栓が観察され、約15分後に血流が停止した。これらの結果は、種々粘性EO投与1日後においても顕微鏡的にほぼ同様であった。以上の結果から、油性薬物担体はその粘度の違いにより微小血管到達時間、塞栓部位及び塞栓時間の異なることが明らかとなった。

ハムスターの結果において、第1編で示したアルブミン小球体と血管塞栓状況が

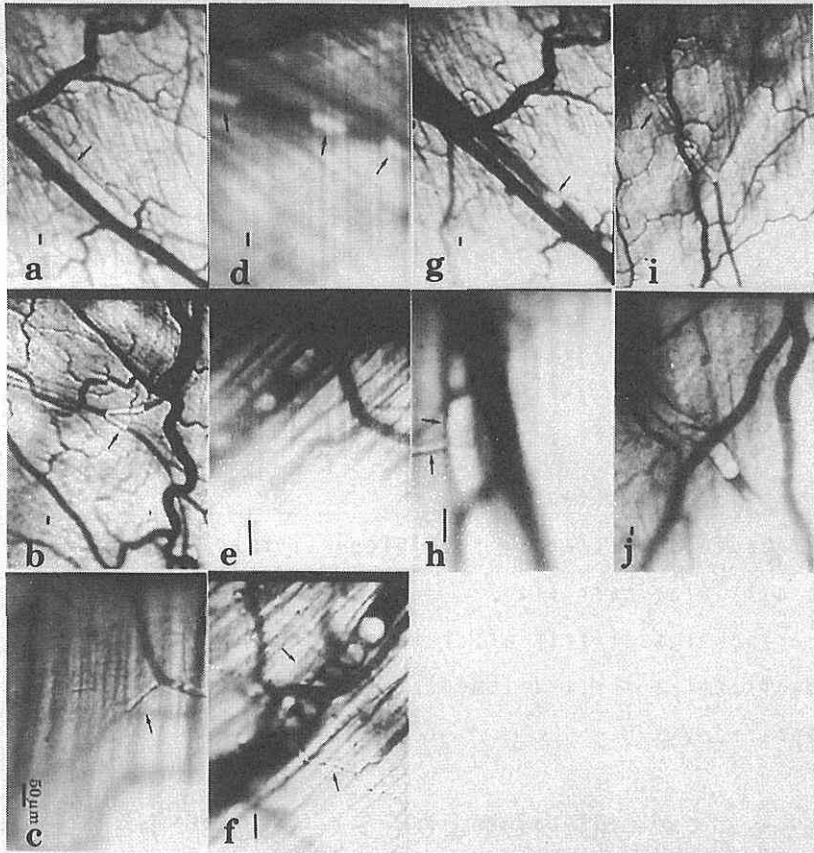


Fig. 35 Behavior of Viscous EO in the Artery and Arteriole of the Hamster Cheek Pouch bar=50 μ m
 a, b and c:EO, d, e and f:40cp VEO, g and h:80cp VEO
 i and j:120cp VEO

同様、すなわち血管径約50 μ m以上で塞栓が生じていると思われるのは、粘度が80及び120cpの粘性EOの時であったが、粘度が40cpの粘性EOでもより径の細い血管で塞栓が生じていた。

本節においてラット肝臓及びハムスター頬袋を用いた結果は異なった。この違いの最も大きな要因は、それらの血管構築性の違いによると思われる。つまり、ラット肝動脈は不連続な血管であるため、組織液あるいは肝実質組織側への漏出が連続

Table 12 Relationship between Diameter in Cheek Pouch Artery and Appearance Time of Several Oily Drug Carriers After Infusion to External Carotid Artery in Hamsters

Oily drug carriers	Diameter in artery					Embolized Time *
	120 μ m	80 μ m	40 μ m	20 μ m	$\leq 10 \mu$ m	
E O	~ 0 **	~ 0 **	1 min	3 min	20 min ***	2 ~ 3 h (Embolized)
40 cp- E O	~ 0 **	1 ~ 2 min	3 min	20 min *** (Embolized)	—	1 h
80 cp- E O	0.5 min	0.5 ~ 1 min	10 min *** (Embolized)	—	—	20 min
120 cp- E O	3 min *** (Embolized)	—	—	—	—	15 min

* : Time needed to perfectly stop blood flow by microvascular embolization with oily drug carriers .

** : Appearance immediately after infusion of oily drug carrier.

*** : Embolization started immediately when the oily drug carriers were appeared.

血管であるハムスター頬袋内動脈よりも多く、流動性の小さいより粘度の高い粘性EOで確実な血管塞栓の証拠が得られたものと推察される。

また、本節で試験した粘性OA及び粘性EO以上の粘度、すなわち120 cp以上の粘度を有する粘性油性薬物担体を用いたとき、その塞栓性や脈管内挙動、あるいは次節で示す組織滞留性がどのようになるかは大変興味の持たれるところである。しかしながら、これ以上の粘度の増加は塞栓効果を高めるものの、その塞栓部位はより血管径の太いほうへ移動し、LPが持つような癌部位集積性の効果を減弱する危険性を持つ。したがって、本論文では以後の実験においても指標粘度が120 cp以下の粘性油性薬物担体を使用するものとした。

第2節 油性薬物担体の組織滞留性

次に、固有動脈内に種々粘性油性薬物担体を投与したときの標的臓器内の滞留性を定量的に評価するため、標識体を利用して経時的な放射活性量を測定した。また、今回調製した粘性油性薬物担体がどのような臓器癌に利用可能か確認するために、

粘性EO投与の場合において、ラット肝臓に加えてハムスター頬袋及びラット胃並びに腎臓についても粘性油性薬物担体の滞留性を試験した。

図36に ^3H -オレイン酸を含有した種々粘性OAを肝動注後の、また図37に ^3H -オレイン酸を含有した種々粘性EOをハムスター頬袋、ラット肝臓、胃及び腎臓の支配動脈より投与した後の放射活性量の経時的变化を示す。

OAの投与において、肝臓からの放射活性の減少は速く、48時間後で全量の30%しか残存していなかった。一方、粘性OAの投与において粘度の増加に伴い放射活

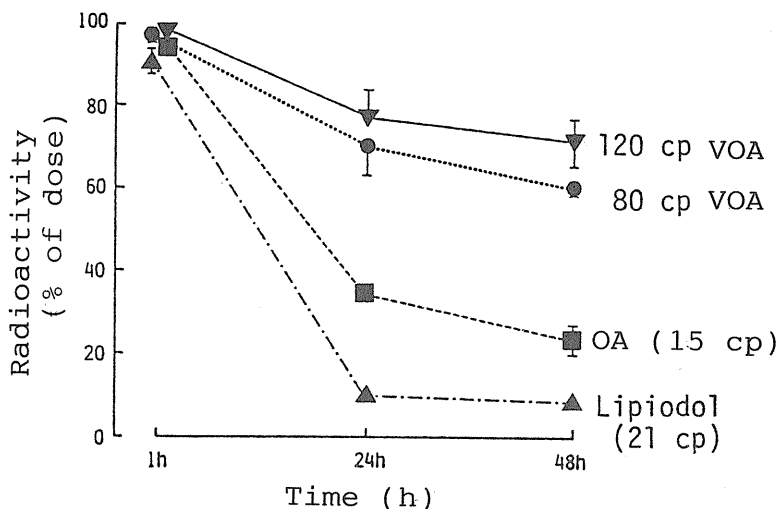


Fig. 36 Time Course of Radioactivity in the Liver after Intra-Arterial Infusion of Oily Drug Carriers Containing ^3H -Oleic Acid in Rats

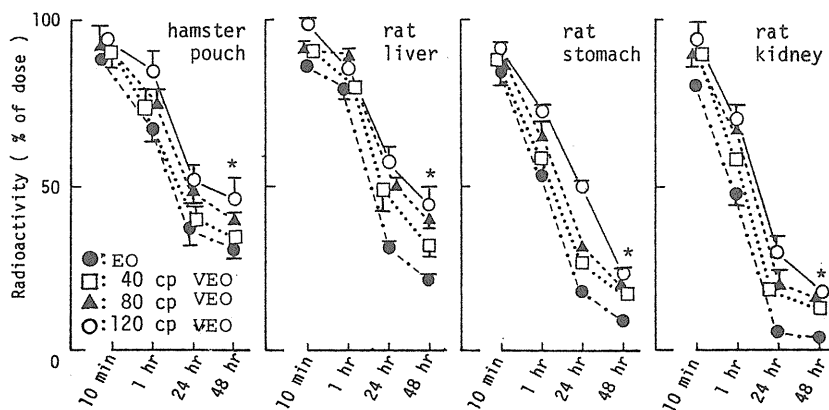


Fig. 37 Time Course of Radioactivity in Several Tissues after Intra-Arterial Infusion of Oily Drug Carriers Containing ^3H -Oleic Acid in Hamsters and Rats

性の減少は遅くなり、120 cp粘性OAの投与48時間後で約80%の放射活性が残存していた。この結果は粘性油性薬物担体の粘度の増加により肝組織滞留性が増加することを示している。

粘性EOの滞留性は、どの臓器においても担体の粘度の増加に伴って高まり、特に120 cp粘性EOでは、48時間後の残存放射活性量がEOに比べ有意に高かった。各臓器間で滞留性を比較すると頬袋 \geq 肝臓 $>$ 胃=腎臓の順になった。今回試験した頬袋を除く主要臓器中で、最も高い滞留効果を示したのは肝臓における120 cp粘性EO投与時であり、担体の48時間後の滞留量は約45%であった。しかしながら、80及び120 cp粘性OA投与に比べその値は小さかった。また、胃及び腎臓での滞留量は、最も滞留効果の高かった120 cp粘性EO投与時でさえ、EOを肝臓に投与し48時間後の滞留量(約25%)とほぼ同程度であり、非常に消失が速かった。

LPを肝臓に投与した場合、EOを投与した場合よりも速く消失し、48時間後の残存放射活性量は約10%であった。

これらの結果について考察すると、ハムスター頬袋での油性薬物担体の高い滞留性は、粘性EOを投与したとき、塞栓部位は異なるものの担体の粘度にかかわらず動脈を塞栓することから、血管塞栓による血管内滞留に大きく支配されていると思われる。一方、同様な血管系を有するラットの胃及びさらに有窓血管系を有する腎臓では、ハムスター頬袋の結果とは異なり滞留効果ははるかに小さく、また頬袋の顕微鏡的結果と同様な血管塞栓が起こっているかは確認できなかった。この滞留性が小さい理由は、動脈の血流量や血流速度の違いによると思われる。一般に絶対的な血流量や血流速度は大動脈から末梢に至るにつれ減少し、血管抵抗は小さくなるように調節されている。すなわち、滞留効果の差は、胃や腎臓ではそれらの存在位置や機能面から考えても腹部大動脈の血流量や血流速度の影響を受け易く、また毛細血管を経て動脈と静脈が連結しているので静脈へwash-outされやすいが、頬袋では血管が同様に連結しているものの、腹部大動脈に比べ血流量の少ない総頸動脈の支配を受け、大動脈レベルでの血流量や血流速度の影響を受けにくいので静脈側へのwash-outが小さいと考えられる。したがって、ハムスター頬袋においては、粘性EOの消失過程が主にリンパ系への移行に支配されているのに対し胃や腎臓においてはそれが臓器内の血管からの除去に支配されていると思われる。

以上の結果及び考察から、今回調製した種々粘性EOの場合、肝臓以外の臓器に対して現段階では滞留効果を得るのは非常に難しいと思われ、今後さらに油性薬物担体の塞栓性や滞留性を高めるために、より高い粘度の付与や他の何等かの修飾を施す必要があるものと思われた。

そこで本節以降の実験においては、肝臓を標的臓器とし、用いた粘性OA及び粘

性EOのうち肝臓において塞栓効果並びに滞留効果の最も高かった120 cp粘性OA及び粘性EOを以後の実験において主に用いることとし、VOA及びVEOと略記する。また、肝臓における滞留効果は用いた担体の違いも含めより複雑であるので、次節の結果も含めて考察することとする。

第3節 油性薬物担体の組織滞留機構の組織学的検討

肝臓における粘性油性薬物担体の滞留性をより詳細に考察するため、脂肪染色法(Sudan II染色)を用いて組織学的に検討した。図38j, a及びbに未処理及びEOを肝動脈内に投与10分及び1時間後の脂肪染色による肝組織標本を示す。未処理の肝組織標本写真では、脂肪染色像(赤色～赤褐色)は観察されず、Sudan II陰性を示した。一方、EO投与の場合、投与10分後ですでに動脈内にEOをほとんど観察することはできず、肝小葉辺縁部からグリソン鞘と中心静脈の間帯に多く存在していた。1時間後では、間帯から中心静脈周辺部の中心帯に多く存在していた。ここでは示さなかったが投与1日後においては中心帯に多く存在し、7日後ではほとんど実質組織側に観察されなかった。これらの観察期間中、肝実質組織側で観察されたEOは非常に微細な油滴として存在していた。さらに、組織側に移行したEOの中でクッパー細胞や実質細胞に取り込まれているものも観察された。

図38c及びdにLPを肝動注後1時間及び1日目の肝組織切片写真を示す。LPの場合、投与1時間後において結合組織内の動脈、門脈及びその周辺の実質組織に染色像が観察され、それは6時間後においても同様であった。投与1日後、肝実質組織側には鮮明な染色像は観察されなかったが、結合組織内に未だLPが残存していた。ここには示さなかったが、結合組織周辺に若干の巣状壊死が観察された。7日後、肝辺縁に極わずかに微小の油滴を認めるもののほとんどLPによる染色像は観察されなかった。また、LPもEOと同様に実質側で微細な油滴として観察され、クッパー細胞や実質細胞に取り込まれているものも認められた。これらの観察において、LPの肝実質側への移行はEOよりも遅く、その量は少ないようであった。

図38e及びfにVOAを肝動注後1及び7日目の肝組織切片写真を示した。VOAの場合、投与1日後において結合組織内に染色像が認められるものの、その周辺の実質組織側にVOAによる濃染色像が観察された。このときもまた、実質側に移行したVOAは微細な油滴であり、クッパー細胞や肝実質細胞中に取り込まれているものも観察された。しかしながら、写真下側に若干認められるような巣状壊死はVOAが投与された肝全体にかなり多く点在して認められた。これは、OA投与のときにおいても同様に観察された。7日後、これらの壊死層は修復過程に入ってい

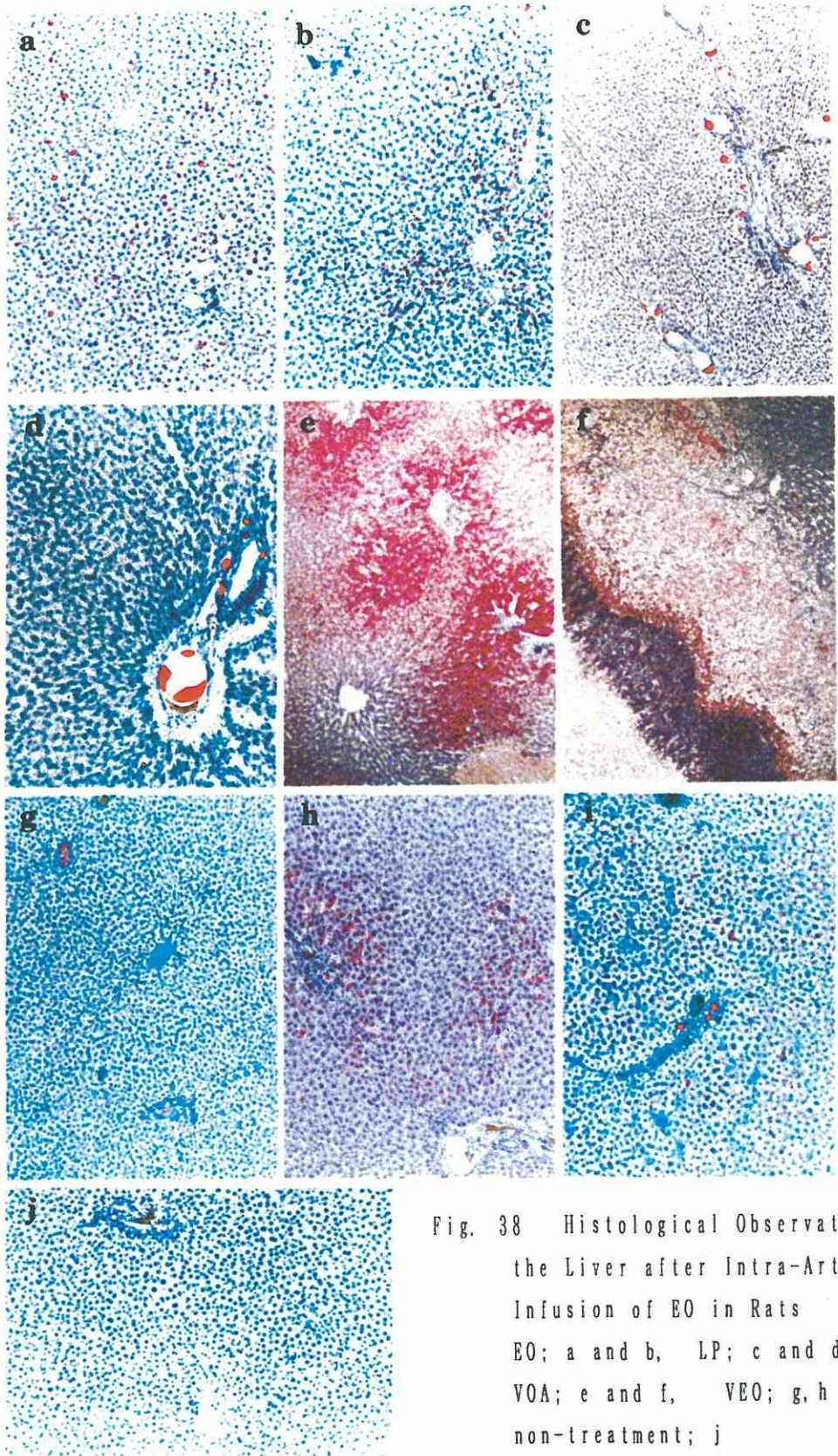


Fig. 38 Histological Observation of the Liver after Intra-Arterial Infusion of EO in Rats
 EO; a and b, LP; c and d, VOA; e and f, VEO; g, h and i, non-treatment; j

るようであったが1日後に比べ拡がっていた。また、壊死層辺縁にはV O Aと思われる微小の油滴が認められた。

図38g, h及びi にV E Oを肝動注後、1時間、1及び7日目の肝組織切片写真を示す。V E Oの場合、投与1時間後、油滴は動脈及び門脈内に多く観察され、類洞内への移行はほとんど観察されなかった。24時間後、依然として動脈及び門脈内に多く観察されたものの、肝小葉辺縁を中心としてかなり微細な油滴の染色像が観察され、またV E Oにおいても類洞内のクッパー細胞内及び実質細胞内にも油滴が認められた。7日後、依然として動脈及び門脈内に多く残存しており、また組織内での微細な油滴は肝小葉全域に渡り多く観察された。これらの観察は、V E Oが非常にゆっくりとした速度で肝組織側へ移行していることを示唆している。

肝動脈内に投与された油性薬物担体の消失経路は、まず第1にリンパ管が考えられる。しかしながら、本節の結果からその明確な証拠は得られず、またどの油性薬物担体を投与しても実質側への移行が認められた。さらに実質側へ移行した油性薬物担体が胆管へ回収されるような証拠も得られなかった。これらの知見は動脈内へ直接ある量の油性物質を投与すると、それらのかなりの量が実質組織側に移行することを示唆している。したがって、第2節で得た肝組織滞留性の定量的な結果は以下のように推察される。まず、O AやE O投与でさえ他の臓器に比べて遥かに滞留性が高かったのは粘度が低い時においても肝実質側へかなり移行するためと思われた。2番目として粘度の増加に伴って滞留性が増加したのは、本節の結果及び第1節の肝アンジオグラムの結果から、80 cp 粘性O A及び粘性E O投与で24時間以内に血管塞栓の可能性が、またV O A及びV E O投与で少なくとも24時間の血管塞栓の明らかな証拠が得られていることから、血管塞栓による血管内滞留と肝組織内滞留との両方の効果によると思われた。3番目としてL Pの肝滞留性が本編で用いた油性薬物担体より低かったのはリンパへの回収の程度が大きかったためと推察された。4番目として、V O Aの方がV E Oよりも滞留性が高かったのは肝組織の広範に亘る壊死のため肝臓の脂肪酸代謝系の低下によると思われた。Nishikawa ら⁸⁷⁾はオレイン酸を含む不飽和脂肪酸がある種の癌に対して抗腫瘍効果を有すると報告している。今回オレイン酸を担体として多量に使用したため、肝組織に対して殺細胞効果を示したものと思われる。また、Hayashi ら^{88, 89)}はこれらの脂肪酸を制癌剤としてL Pに溶解して動物レベルで高い抗腫瘍効果を得ている。したがって、オレイン酸を担体として利用する場合、慎重な取り扱いが必要となろう。

今回の組織標本の結果からL PやV E Oでは、動注後の組織側への移行過程で門脈への逆流の証拠を得た。動脈-門脈(A-P) shunt が存在するという明らかな証拠を呈示した成書はなく、この現象がどのようにして起こるかを本実験結果から

考察することは難しい。しかしながら、同様の現象はLPを用いた川上ら⁹⁰⁾や日原ら⁹¹⁾によって報告されている。また、中村ら⁹²⁾や大井ら⁹³⁾は、この現象を利用して肝癌（微小病変が存在する場合のみ）に対しゼラチンスポンジとLPとを併用したセメント療法と称された治療法を施行している。いずれにしてもLPの門脈への逆流現象の解明は、今後肝癌に対する治療効率の向上のために急務となろう。

以上より、これまで述べてきた動注後の粘性油性薬物担体（EO及び粘性EOの場合のみ）の挙動についてまとめてみると、まず、動注した粘性EOは棒状あるいは球状の形で、その粘度により血管塞栓または血管内滞留が起こる。次に、結合組織から組織液中に移行する際にリンパ管や胆管への移行があると思われる⁹⁴⁾が、ある量の担体はその粘度に併せた速度で血管側から組織側（類洞内）へ移行する。この時そのほとんどが微細粒子状に類洞側に移行し、粘度の低いものほど素早く中心静脈側へ、粘度の高いものほど長期間に亘って組織側に徐々に移行する。また、組織側へ移行した微細油滴粒子は、その移動過程で肝実質細胞やクッパー細胞等の網内系細胞により捕食されるものもある。また、可能性として胆管中に回収されるものもあるかもしれない。

本章の結果から、今回調製した油性薬物担体の標的可能な臓器は肝臓であり、VOA及びVEOが塞栓性、滞留性の点で効果が最も期待できるものと思われた。

第3章 油性薬物担体からの薬物の放出性

薬物を含有した油性薬物担体からの標的臓器中での薬物放出性は、抗腫瘍効果を期待する上で重要な因子となる。本論文の油性薬物担体は、前章の結果からその粘度が増加すると血管塞栓を伴った脈管内滞留が増加する可能性が高いので、その投与初期においては担体から腫瘍組織側への薬物の移行が必要である。また、半永久的に脈管中に残存する固型薬物担体に対し、油性薬物担体は腫瘍組織への移行が予測されるので薬物放出性をより厳密に制御する必要はないかもしれない。

そこで、本章では後章で試験するモデル担癌動物に対する抗腫瘍効果と薬物放出性とを比較・考察するため、油性薬物担体からのセムスチン並びにシスプラチンの放出性について検討した。

第1節 油性薬物担体からのセムスチンの放出

図39aにOA及びVOAからの、また図39bにEO及びVEOからのセムスチンの放出曲線を示す。これら油性薬物担体からのセムスチンの放出は遅く、試験中ほ

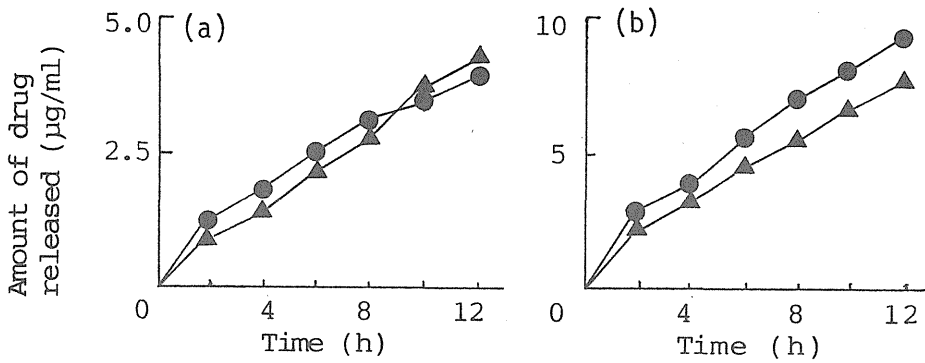


Fig. 39 In Vitro Semustine Release from Semustine-Loaded Oily Drug Carriers

a; OA (●) and VOA (▲) b; EO (●) and VEO (▲)

ば0次速度で薬物担体から放出された。また、粘度の違いによるセムスチンの放出性に有意な差はなく、実験開始12時間後の放出量は、OAとVOA及びEOとVEOでそれぞれ含有量の0.1及び0.2%であった。これらの結果は、セムスチン含有油性薬物担体を癌支配動脈内に投与したとしてもセムスチンがその部位において担体からほとんど放出されないことを示している。

脂溶性の制癌剤を油性薬物担体中に封入すると、それらの親和性に多少の差はあるとしても担体からの逃散傾向は小さいと考えられるので、一般に放出速度は遅くなる。したがって、特に濃度依存型の制癌剤は効果が余り期待できないことになる。しかし、投与された油性薬物担体は組織側へ移行し、それ自身癌細胞との接触、滞留時間が長く、また癌細胞に取り込まれるかもしれないので、担体中に溶解する脂溶性薬物は、担体から放出されなくても組織からのwash-outが速くなければ薬効は期待できると思われる。事実、前田⁹⁵⁾、Yamashitaら⁹⁶⁾やKawaguchiら⁹⁷⁾が報告しているように臨床や動物実験においては高い効果が得られており、薬物放出の制御が必要であるかどうかは、判断することが難しい。

第2節 油性薬物担体からのシスプラチンの放出性

図40に微粉化したシスプラチン(粒子径 $< 5 \mu\text{m}$)を含有する油性薬物担体(EO, LP, 40及び80 cp粘性EO及びVEO)からのシスプラチンの放出曲線を示す。EO及びLPからのシスプラチンの放出は速く、24時間までに含有量のほぼ100%が油相中から生理食塩水中へ放出された。また、その放出パターンは互いに良く類似していた。一方、40 cp粘性EOからのシスプラチンの放出量は初期に80

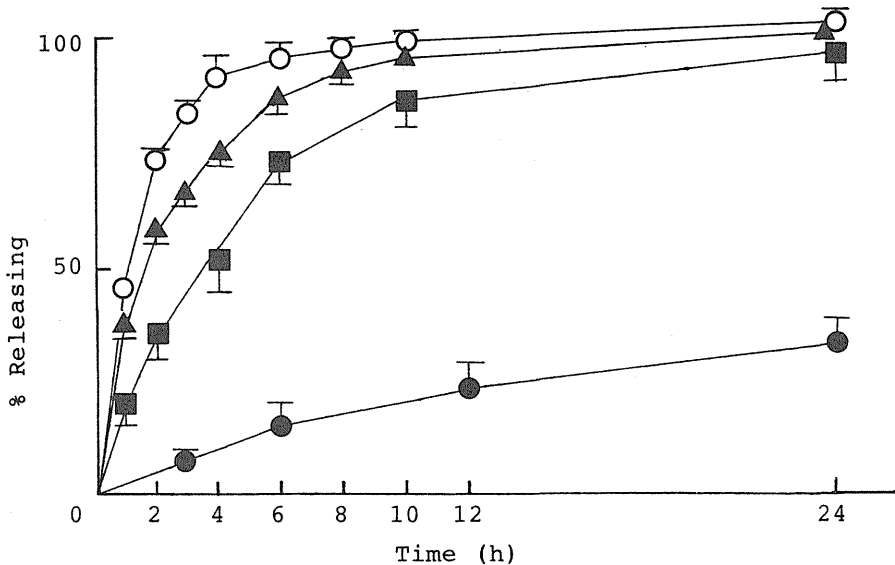


Fig. 40 In Vitro Cisplatin Release from Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers
 Carriers ▲; 0.9 % NaCl, ○; EO, ■; LP, □; 40 cp viscous EO, △; 80 cp viscous EO, ●; VEO

cp粘性EOやVEOに比べて多かったものの、同様な放出パターンを描き、24時間以降非常にゆっくりとシスプラチンが放出された。48時間後のシスプラチンの放出量は40及び80 cp粘性EO及びVEOでそれぞれ45、35及び35%であった。

このように油性薬物担体の粘度の増加で、初期放出に若干の違いがみられたがシスプラチンの放出パターンはほとんど変化せず、また放出は非常にゆっくりであった。これは、油相中でのシスプラチンの懸濁安定性が増加したことと、増粘剤として加えたECも影響を及ぼしていると思われた。ECはマイクロカプセルの壁材料として薬物放出の制御に用いられており、油相中のシスプラチンの拡散性を制御している可能性は高く^{98, 99)}、一連の粘性油性薬物担体に添加したECの濃度(2.6~4.7%)がほぼ等しいことから、粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性に差が見られなかったものと思われた。

標的癌組織における担体からの薬物放出性は、担体や薬物の種類さらには投与部位により異なる。動注癌化学療法において担体が固形の塞栓材料である場合、担体は血管内に存在するので、癌の種類にかかわらず適当な速度で癌組織へ薬物が放出されなければならない¹⁰⁰⁾。一方、油性薬物担体中に薬物を含有させる場合には、物性に関連して上述した場合よりも薬物放出性についてより複雑となろう。脂溶性の薬物の場合、先にも述べたように、薬物の標的化と薬物放出の重要性には格段の差があり、薬物放出性に関してあまりシステム設計をする必要が無いと考えられる。

これに対し、水溶性または難溶性の薬物を含有させる場合、薬物は油性薬物担体との親和性があまり良くないと考えられ、また油相中にそのほとんどが懸濁しているわけであるから、分散性は一般的に悪くなり薬物の油相からの分離、漏出が速くなるので、薬物放出性に関して何らかの製剤学的な修飾を必要とする。この製剤学的な修飾の手段としてはエマルジョン(W/O)にしたり^{101, 102)}、薬物の微粉化や油相の粘度を高めて懸濁剤を安定化することがある。このうち、粘度の増加による微粒子懸濁型の製剤については、薬物放出性が薬効に大きく影響する。特に、我々の目的とする血管塞栓能や滞留能を付与した薬物担体を用いた製剤では、まず、固形の塞栓材料と同様に血管内に存在することが予測され、しかも薬物は微粒子であるので、薬物が溶解し担体から適当な速度で放出されなければならない。さらに、微粒子状態であることは、担体といっしょに血管側から組織側に移行したとしても溶解する必要があると思われる。

今回得られた薬物放出性の結果が高い抗腫瘍効果に結びつくかどうかは、本章までの結果からでは判断できない。しかし、LPとVEOからのシスプラチンの放出は極端に異なり、また、粘度の増加は癌組織においてもその滞留性を変化させる可能性を有しており、これらの点についてその効果を比較検討することが重要であろう。これらのことに、さらに薬物放出制御というファクターを加えるとどの効果が薬効に影響を与えるかが把握し難くなる。したがって、それらの効果のある程度分離して評価する必要がある。本章においては、今回用いた油性薬物担体からの薬物放出性だけを評価した。

第4章 油性薬物担体及び制癌剤のモデル固型癌への集積性

今野ら¹⁰³⁾や福島ら¹⁰⁴⁾は、LPの肝癌組織での滞留性や集積性の高いことをその造影能から立証し、また癌と正常組織とのLPの消失速度が有意に異なることも明らかにしている。これは、生体側の因子に大きく影響されると思われ、製剤側にも高い滞留能を付与することが生体側に左右されずに効果を得る上で重要となろう。第2章で得た結果は、製剤側の修飾により癌組織においても塞栓能、滞留能が増加することを示している。しかしながら、癌組織との親和性効果が製剤学的修飾により損失したり、またシスプラチンを微粉化懸濁して含有させた製剤においては、薬物が油性薬物担体と同様な行動性を保持していなければ、製剤学的修飾によって高い抗腫瘍効果を得ることが難しい。

そこで本章では、ラットのAH 272腹水肝癌細胞移植肝癌モデル及び家兎のVX-2腫瘍細胞移植肝癌モデルを用いて油性薬物担体及びシスプラチンの癌組織及び正常組

織での滞留性を比較検討した。また、本実験以降セムスチン含有油性薬物担体としてはOA系を、シスプラチン含有油性薬物担体としてはEO系を用いた。

第1節 油性薬物担体の癌部位集積性

図41にAH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットに³H-オレイン酸を含有したVOA及びLPを、また図42に³H-オレイン酸を含有したEO及びVEOをそれぞれ肝動注した後の癌部位及び非癌部位（腫瘍を移植した肝臓，中間葉の肝正常部位）における放射活性量の経時的变化を示す。油性薬物担体はその粘度及び物性の違いにかかわらず，正常部位と腫瘍部位とで有意な滞留性の差が観察された。投与した油性薬物担体が癌組織を含む肝組織に均一に分布したと仮定すると，担体投与初期の組織1g当りの放射活性量は約7.5%であり，癌部位における放射活性量はその値に比べどの担体投与時でも高くなった。投与後48時間まで癌部位の滞留量は依然高く，特にVEOでは正常部位に比べ約4倍放射活性量が大きかった。また，正常部位からの放射活性の消失はLPで最も速く，VOAで測定期間中ほとんど放射活性の減少は見られなかった。EO及びVEOとの癌部位における滞留性を比較すると，VEOはEOよりも消失速度が遅く長時間癌部位に滞留しており，48時間後の癌部位滞留性はEOのそれよりも約3倍高かった。

次に，これら油性薬物担体の癌組織内動態をVX-2腫瘍移植肝癌家兎を用いて組織学的に検討した。図43にVX-2肝癌家兎にLP及びVEOを肝動注した時の脂肪染色

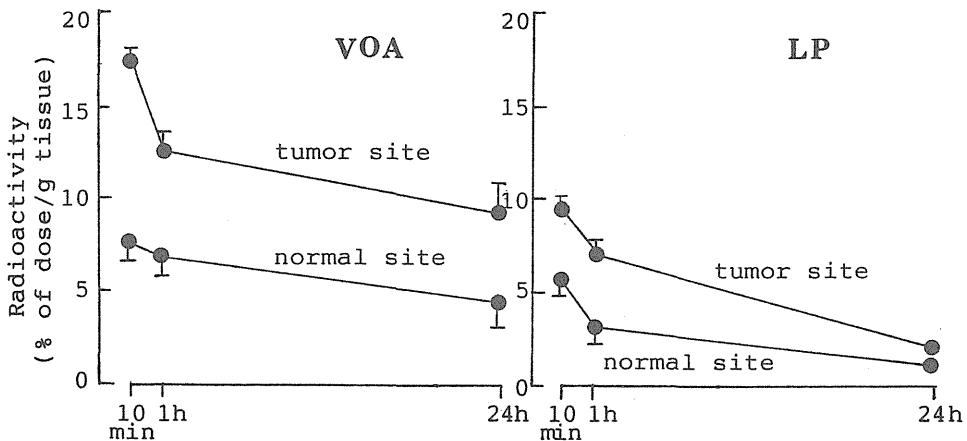


Fig. 41 Disappearance of Radioactivity in the Tumor or Normal Site of the Liver after Intra-Arterial Infusion of LP or VOA Containing ³H-Oleic Acid in Rats

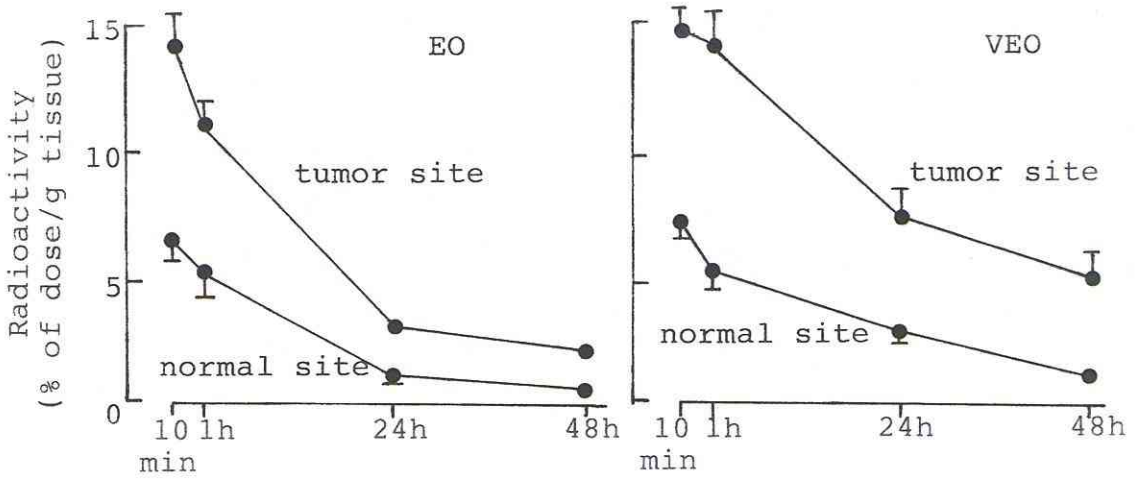


Fig. 42 Disappearance of Radioactivity in the Tumor or Normal Site of the Liver after Intra-Arterial Infusion of EO or VEO Containing ^3H -Oleic Acid in Rats

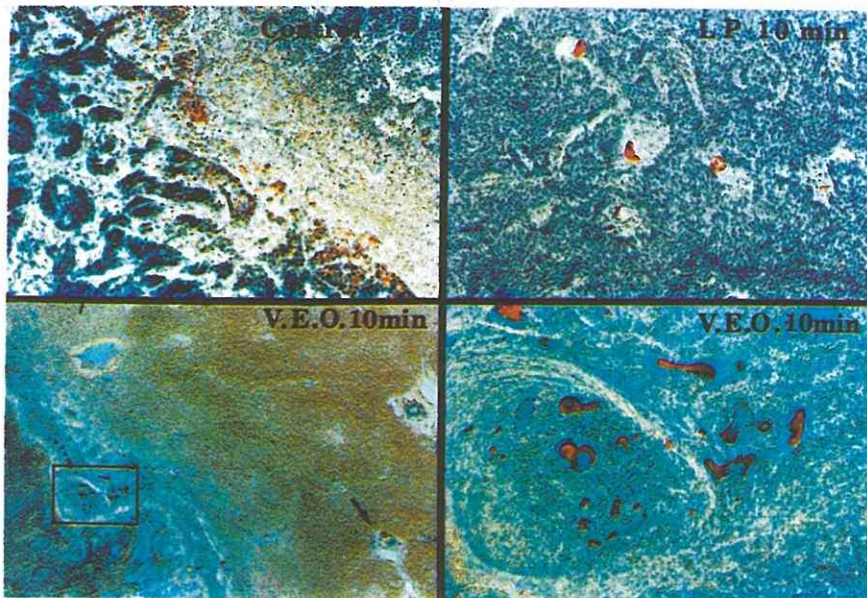


Fig. 43 Histological Observation of the Liver 10 min after Intra-Arterial Infusion of LP or VEO in VX-2 Tumor-Bearing Rabbits

像を示した。未処置の移植21日目のVX-2腫瘍は、広範な固形癌特有の中心性壊死がみられ、さらにその壊死部と生腫瘍細胞との境界部付近に内因性と思われる脂肪変

性による広範かつ多量のSudan II陽性像が観察された。したがって、油性薬物担体の肝組織移行性の評価は困難であるので主に脈管内挙動についてのみ検討した。

L P動注後の組織像は、10分後で既に腫瘍内部の毛細血管内に広く分布しており、また、同様にV E O動注後の組織像も10分後で腫瘍内部の毛細血管内に多く分布していたが、この時腫瘍周辺のグリソン鞘内の動脈にも油滴が観察された。

以上の結果から、種々油性薬物担体を動注すると担体の癌部位集積性は高く、癌部位と正常部位との滞留性が有意に異なり、また担体の粘度の増加と共に癌部位における担体の消失速度が減少することが明らかとなった。

これらの結果は、緒言でも述べたような癌組織の特徴に加え担体の粘度の増加による滞留性の増加の相加または相乗効果によると思われる。Rubinら¹⁰⁵⁾の提示した癌新生血管の構築モデルによれば、単位体積あたりの血管容積は正常のそれに比較して有意に高くなるし、また、田中ら¹⁰⁶⁾も腫瘍の壊死部の存在で見かけ上腫瘍部の血流量は減るものの生腫瘍部のみでは血流量が正常のそれに比較して大きくなることを報告している。さらに福島ら¹⁰⁷⁾や鈴木ら¹⁰⁸⁾は圧力に対する癌新生血管の反応性は鈍く、昇圧によって腫瘍血管内の血流量が増加することを報告しており、これらの報告は上述した結果、特に薬物担体投与初期の滞留及び集積効果を支持するものである。加えて、Jain¹⁰⁹⁾やGullinoら¹¹⁰⁾が報告したように腫瘍組織内の間質スペースの増加やリンパ管の欠如、さらに高分子や油性物質の新生血管膜透過性の亢進は、組織側に移行した担体の組織からの消失速度を遅くすることを示しており、第3章及び本章第1節で得た結果はこれらのことを反映していた。

第2節 シスプラチンの癌部位集積性

セムスチンは油性薬物担体中で溶解し、また第3章の放出実験からもわかるように長期に亘って担体中に保持されており、その癌部位での挙動はほぼ薬物担体と同様であろう。しかしながら、シスプラチンの場合、油性薬物担体中に懸濁した状態で含有されており、その動態が担体と同様であるかは明らかではない。そこでシスプラチン含有油性薬物担体動注後のシスプラチンの滞留性・集積性を検討した。

図44に、AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットにシスプラチン含有油性薬物担体を肝動注したときの腫瘍及び正常部位のシスプラチンの組織内濃度の経時的变化を示す。先の油性担体自身の結果と同様に、どの担体の場合も正常部位と癌部位とでシスプラチンの滞留量に差がみられ、またそれらの部位からの消失速度は異なり、担体の粘度の増加に伴ってシスプラチンの癌組織からの消失速度は遅くなった。また、癌部位集積性も高まり、特にV E O投与で腫瘍部位48時間後の組織内濃度が

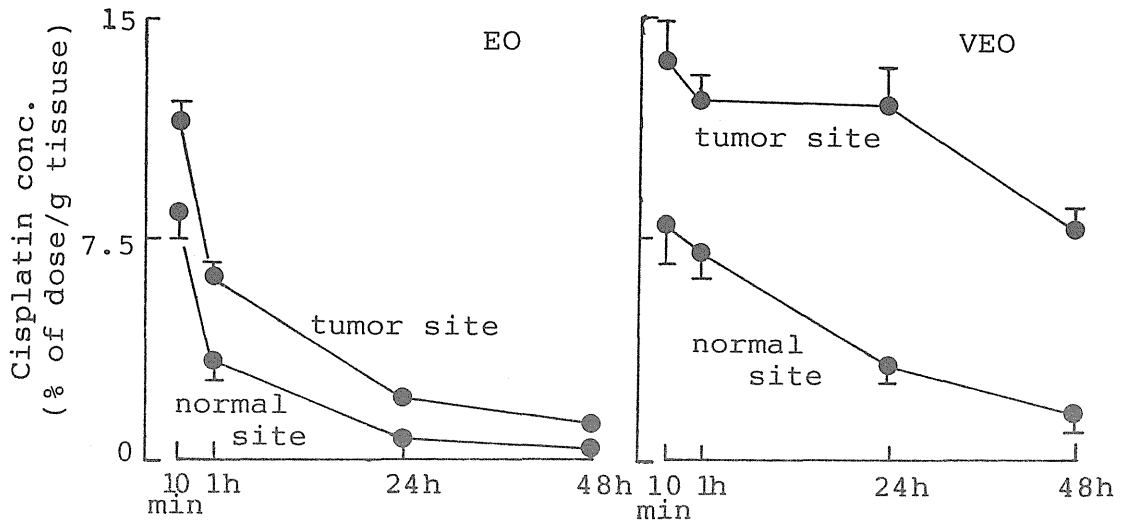


Fig. 44 Disappearance of Cisplatin Concentration in the Tumor or Normal Site of the Liver after Intra-Arterial Infusion of Cisplatin-Loaded EO or VEO in Rats

正常部位に比べ約5倍，EO投与の腫瘍部位に比べ約6倍高かった。

次にVX-2腫瘍細胞移植肝癌家兎にシスプラチン含有油性製剤を同様に投与し，図45のように，肝組織の摘出部位を腫瘍部，その近傍，遠隔及び未処置の4つの部位に分け，それらの各時間における各部位のシスプラチン濃度を表13に示す。シスプラチンの生理食塩水溶液投与群において，投与10分後よりシスプラチンの組織内濃

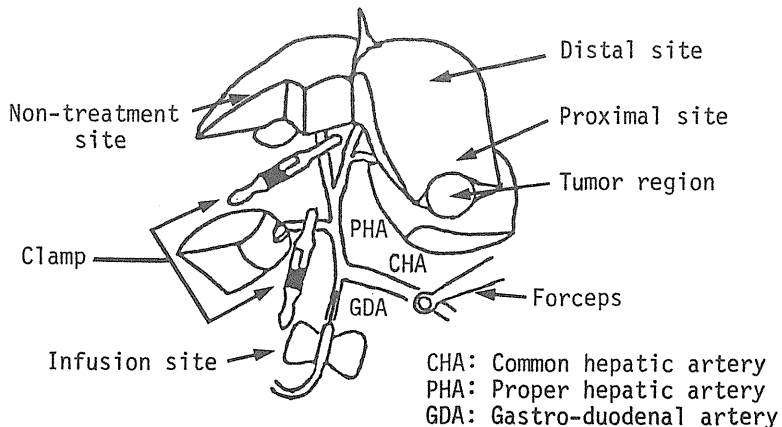


Fig. 45 Schematic Diagram of Resection Sites of the Liver in VX-2 Tumor-Bearing Rabbits

Table 13 Cisplatin Concentration in the several Sites of the Liver after Intra-Arterial Infusion of Cisplatin-Loaded Several Oily Drug Carriers in VX-2 Tumor-Bearing Rabbits

		Cisplatin Concentration ($\mu\text{g}/\text{g}$ tissue, mean \pm S. E.)				
Site		10 min	3 day	7 day	14 day	
Cisplatin	TS	2.27 \pm 0.25	0.63 \pm 0.34	ND	ND	
0.9% NaCl soln.	PS	1.43 \pm 0.62	0.78 \pm 0.31	ND	ND	
	DS	1.30 \pm 0.36	ND	ND	ND	
	NS	0.61 \pm 0.36	ND	ND	ND	
.....		TS	24.69 \pm 3.81	8.09 \pm 2.25	5.68 \pm 2.65	0.80 \pm 0.34
Cisplatin-loaded LP	PS	8.54 \pm 2.35	2.69 \pm 0.46	0.31 \pm 0.16	ND	
	DS	2.52 \pm 0.38	1.46 \pm 0.07	ND	ND	
	NS	2.22 \pm 0.36	0.81 \pm 0.20	ND	ND	
.....		TS	14.44 \pm 2.24	4.97 \pm 0.87	1.88 \pm 1.21	1.82 \pm 1.57
Cisplatin-loaded EO	PS	5.00 \pm 0.58	1.74 \pm 0.40	0.75 \pm 0.55	ND	
	DS	2.06 \pm 0.66	0.52 \pm 0.27	ND	ND	
	NS	0.14 \pm 0.03	0.09 \pm 0.07	ND	ND	
.....		TS	43.13 \pm 16.2	45.52 \pm 13.6	9.61 \pm 2.35	4.84 \pm 2.86
Cisplatin-loaded VEO	PS	11.93 \pm 2.24	11.24 \pm 6.61	5.81 \pm 2.23	0.24 \pm 0.21	
	DS	4.63 \pm 1.12	1.51 \pm 0.90	0.08 \pm 0.06	ND	
	NS	2.79 \pm 2.24	1.73 \pm 1.41	ND	ND	

TS: Tumor Site, PS: Proximal Site, DS: Distal Site,

NS: Non-treatment Site

度は他の油性薬物担体投与群に比べ有意に小さく、また摘出部位間では若干腫瘍部位で高くなる傾向が見られたものの、他の部位との有意差は見られなかった。

一方、3種油性薬物担体を投与した各群において、どの担体を投与しても腫瘍部位のシスプラチン濃度は他の部位に比べ高かった。投与されたシスプラチンが癌組織を含む肝組織に均一に分布したとすると、その濃度は約 $5 \mu\text{g}/\text{g} \cdot \text{tissue}$ となる。投与後 10 min における癌組織内濃度は、平均濃度に比較して EO, LP 及び VEO で、それぞれ約 2.9, 4.9 及び 8.6 倍高かった。

これら 3 種油性製剤間の癌部位でのシスプラチンの滞留性及び集積性を比較すると、投与 14 日目までシスプラチン濃度は、 $\text{VEO} > \text{EO} \geq \text{LP}$ の順に高い傾向が見られ、14 日目の腫瘍内シスプラチン濃度は、VEO が EO の 2.7 倍、LP の 6.0 倍

高かった。また、これら製剤間の腫瘍内のシスプラチンの消失速度は異なり、LP及びEO投与群でその初期にシスプラチンの速い消失がみられ、比較的低濃度で14日目まで推移していた。これに対して、VEO投与群では3日目までシスプラチンの組織内濃度は変わらず、その後7日目まで比較的速い速度で消失した後、14日目までゆっくりとした速度でシスプラチンが消失した。また、VEO投与群ではLPやEO投与群よりも高い濃度で長期（少なくとも14日目まで）にわたり推移していた。さらに、VEO投与群では、実験範囲内で腫瘍周辺部も他の投与群に比べシスプラチンの濃度は高く、腫瘍部位と同様な消失過程を示した。

ラットのAH 272肝癌モデル及び家兎のVX-2肝癌モデルの結果から、薬物担体を動脈より投与すると薬物も癌部位集積性が高くなり、また癌部位と正常部位とで滞留性は有意に異なった。加えて、担体の粘度の増加と共に癌部位における滞留性が増加し、その消失パターンは異なることが明らかとなった。これらの結果は、微粉化した薬物を懸濁化剤として投与しても癌部位滞留性が増加することを示している。

ラット及び家兎の担癌モデルにおいて癌部位への薬物の集積性は高かったものの種差によりその集積性に差が見られた。Okagakiら¹¹¹⁾は、油性薬物担体としてLPを用いWalker 256肉腫をラットの肝癌モデルに利用し塩酸アクリルピシンの、またFukushimaら⁸¹⁾は我々と同様に家兎VX-2担癌モデルを用いてシスプラチンの集積性を、さらにIwair¹¹²⁾は家兎VX-2担癌モデルを用いてLPの集積性を検討しているが、著者と同様な結果となっており、担癌動物モデルの違いによって薬物担体及び薬物の集積性に差があるものと思われた。この違いは、AH 272細胞が増殖活性が強く肝組織内に浸潤、遊離するため、癌新生血管を含む癌組織が1個の個体として成長する以前に試験しなければならないのに対し、VX-2細胞では増殖活性がより弱いために癌新生血管に富んだ癌組織が1個の個体として成長した段階で集積性の試験を行うことができたためと考えられる。したがって、AH 272細胞のような癌種の場合、固形の薬物担体のような標的化能、すなわち脈管滞留能の大きな担体ほど有用性が高いかもしれない。

本章の結果はVOAやVEOを薬物担体として用いることで癌組織における薬物の滞留性や集積性を増加させ、かつその消失速度がLPよりも遅いことから、より有用な薬物担体として利用可能であることを示している。

第5章 モデル固形癌に対する制癌剤含有油性薬物担体の抗腫瘍効果

前章までに制癌剤を含有したVOA及びVEOの“標的化”システムとしての有

用性を評価してきた。これらのシステムは、臨床的に評価の高いLPよりも癌部位滞留性や集積性に優れ、より高い抗腫瘍効果が得られる可能性は高い。しかしながら、第1編でも示したように“標的化”の成立と薬効とが必ずしも一致するとは限らないと思われ、DDSと薬効との関係を明らかにすることは、その結果に基づき、さらにより良いDDSとして改良していくためにも最も重要であろう。

そこで本章では、ラット及び家兎の肝癌モデルに対するセムスチン含有VOAまたはシスプラチン含有VEOの効果を延命または腫瘍増殖率から検討した。

第1節 AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットに対する制癌剤含有油性薬物担体の抗腫瘍効果

表14に、AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットにセムスチンを含有した各製剤を肝動注したときの平均生存日数とT/C%を示す。未処理群に比較してOA投与群で若干、VOA投与群で比較的延命効果が観察され、VOAのT/C%は138であった。この結果は、用いた担体自身にも抗腫瘍活性があることを示している。一方、セムスチンを含有したOA投与群ではVOAとほぼ同様の延命効果が見られた。これに対してセムスチンを含有したVOAの延命効果は大きく、T/C%は304.2であり、45日以上生存したいわゆる寛解ラットも10匹中4匹存在した。この

Table 14 Effect of Semustine-Loaded VOA on Survival of AH 272 Tumor-Bearing Rats

	Number of rat	Survival (d) (mean ± S. E.)	T/C* (%)	Long term** survivor
0.9% NaCl Soln.	10	9.6 ± 0.56	—	0
OA	10	11.4 ± 0.90	111.8	0
VOA	10	13.3 ± 1.35	138.5	0
Semustine-loaded OA	10	12.2 ± 0.89	127.2	0
Semustine-loaded VOA	10	29.2 ± 4.33	304.2	4

* : $T/C (\%) = \frac{\text{survival time of oily drug carrier-treated group}}{\text{survival time of 0.9\% NaCl solution-treated group}} \times 100$

** : This means number of rat survived over 45 days.

ことは油性薬物担体の粘度の増加により、薬物の“標的化”が増加して抗腫瘍効果が増強されたことを示している。

第3章において、セムスチンの油性薬物担体からの薬物放出がほとんどないことを明らかにした。したがって、in vivo においても同様である可能性は大きく、本節で得られた高い抗腫瘍効果には薬物放出の有無が関係していないことになる。すなわち、癌組織内に標的化された薬物が担体と一緒に細胞内に取り込まれ、それが抗腫瘍効果に結びついたと思われる。

これらの結果及び考察は、脂溶性の制癌剤（セムスチンだけかもしれない）と油性薬物担体との組み合わせで、かつAH 272細胞系のような癌種において、持続した標的化の成立だけで高い抗腫瘍効果が得られることを示している。

表15にAH 272移植モデル肝癌ラットにシスプラチン含有油性製剤を肝動注したときの平均生存日数とT/C%を示す。生理食塩水投与群に比較して薬物を含有していないVEO投与群では延命効果が得られなかったのに対し、シスプラチンを溶解した生理食塩水、シスプラチン含有EO、LP及びVEO投与群のT/C%は、それぞれ128.8、123.1、145.5及び212.2となり、どの投与群においても延命効果

Table 15 Effect of Cisplatin-Loaded Several Oily Drug Carriers on the Survival in AH 272 Tumor-Bearing Rats

	Number of rat	Survival (d) (mean ± S. D.)	T/C * (%)	Long term ** survivor
0.9% NaCl Soln.	17	15.6 ± 1.5	—	0
VEO	10	13.6 ± 1.3	87.2	0
Cisplatin solution	11	20.1 ± 4.4	128.8	0
Cisplatin- loaded EO	6	19.2 ± 4.0	123.1	0
Cisplatin- loaded LP	7	22.7 ± 3.7	145.5	0
Cisplatin- loaded VEO	10	33.1 ± 4.8	212.2	2

* : $T/C (\%) = \frac{\text{survival time of oily drug carrier-treated group}}{\text{survival time of 0.9\% NaCl solution-treated group}} \times 100$

** : This means number of rat survived over 60 days.

が認められた。特に、シスプラチン含有VEOは他の油性製剤投与群に比して延命日数が延長し、60日以上延命した寛解ラットも10匹中2匹存在した。この寛解ラットの解剖所見から、腫瘍を移植した肝中間葉は癒痕治癒し、他の肝小葉への転移または製剤投与による損傷は認められず、ほぼ完治していた。

これらの結果は、担体の機能を高めるために評価した前4章までの結果とよく対応しており、粘度を増加した油性薬物担体の有用性が示唆された。すなわち、先のセムスチンの結果と同様にAH 272細胞系においては薬物の持続した標的化の成立が抗腫瘍効果に大きく影響しているだろうことを示している。また、第3章のシスプラチンの放出結果は、EO及びLPからのシスプラチンの放出は速く、VEOからは持続的な放出の後ほとんど放出されないことを示しており、本担体系においては、このような油性薬物担体からの薬物放出性も抗腫瘍効果に関与していると思われる。

第2節 VX-2腫瘍細胞移植モデル肝癌家兎に対するシスプラチン含有油性薬物担体の抗腫瘍効果

VX-2腫瘍細胞移植肝癌家兎においては、AH 272細胞系よりどの油性薬物担体の投与でもシスプラチンの癌部位集積量は多く、また滞留性も高い。そこで、VX-2腫瘍細胞移植肝癌家兎に対するシスプラチン含有油性薬物担体の抗腫瘍効果も検討した。

図46に、VX-2肝癌家兎にシスプラチンを溶解した生理食塩水または各種シスプラチン含有油性薬物担体を肝動脈より投与したときの各投与群の個々の投与前の腫瘍

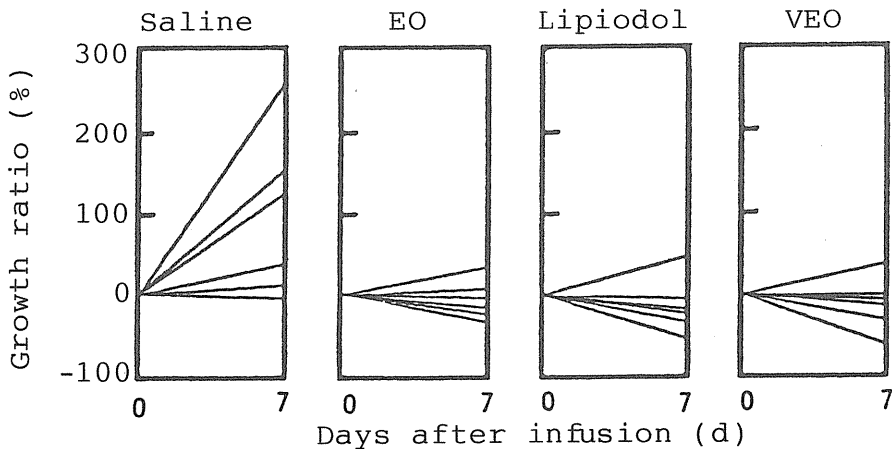


Fig. 46 Change of Volume of the Tumor before and 7 days after Intra-Arterial Infusion of Cisplatin-Loaded Several Oily Drug Carriers in Individual VX-2 Tumor-Bearing Rabbits

体積に対する投与7日目の腫瘍体積の増殖率を示す。シスプラチンを溶解した生理食塩水投与群では、半数以上の個体で腫瘍の増殖が認められたのに対しシスプラチン含有EO、LP及びVEO投与群ではほとんどの個体で増殖は認められず、担体間で有意差はなかった。これらの結果は、標的化能を高めるために修飾した薬物担体の粘度及びその結果得られた薬物放出性の違いによる効果が、VX-2腫瘍系ではあまり発揮されなかったことを示している。

この要因について再考すると、AH 272腫瘍移植モデルで観察された油性薬物担体の粘度の違いによる抗腫瘍効果の差は、EOやLPの投与での薬物のより早い消失、すなわち持続的な標的化の不成立のみによると考えられるが、癌組織への薬物の集積性がEO投与でさえもAH 272腫瘍移植モデルよりも高かったVX-2腫瘍移植モデルにおいては、そのことが油性薬物担体間で抗腫瘍効果に差が見られなかった要因の一つになっていると思われた。次にVX-2腫瘍移植モデルに対する抗腫瘍効果だけに注目した場合、初期の薬物の標的絶対量はVEOで最も多く、また持続的な標的化もVEOで最も高い。そこで、腫瘍増殖に対するこれらの効果をよりはっきりさせるために、製剤投与3日後及び14日後の腫瘍体積の変化を測定した。

図47に各種シスプラチン含有油性薬物担体投与3日、7日及び14日後の各群の腫瘍体積の変化を示す。シスプラチンを溶解した生理食塩水溶液投与群では3日目まで腫瘍体積の増殖は認められなかったが、3日目以降に腫瘍体積の指数関数的な増殖が認められた。この結果は、一時的にシスプラチンの癌局内濃度が高まることで投与後3日目までの増殖を抑制することを示している。一方、他の油性薬物担体投与群では14日目において腫瘍体積が若干増加したものの、やはり3種油性薬物担体

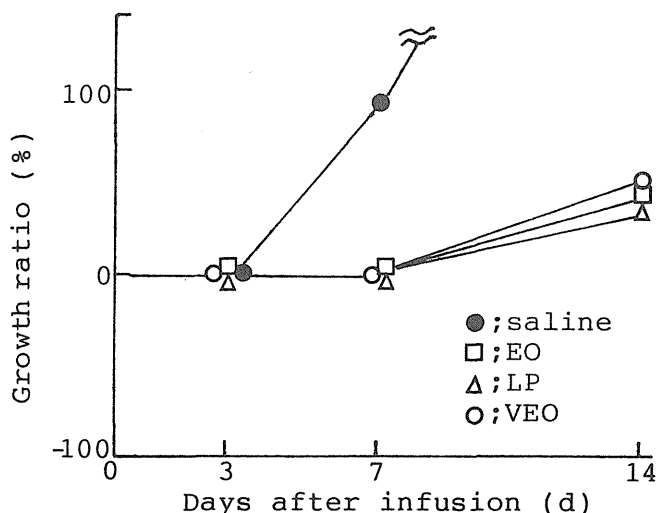


Fig. 47 Effect of Several Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers on the Tumor Growth in VX-2 Tumor-Bearing Rabbits

間でその有意差は認められなかった。また、このとき3種油性製剤投与群の肝組織標本の解剖所見から未だ生癌細胞の存在が認められた。このように長期にわたる実験系においても効果に差がみられず、解剖所見も同等の評価であった。したがって、本結果からVX-2腫瘍のような臓器中に独立した個体として存在する固形癌では抗腫瘍効果に対して見かけ上、粘度の効果があまり影響しないことになる。

しかし、VEOの投与で薬物の標的絶対量が最も多く、持続的な標的化も最も高いことと抗腫瘍効果がEOやLPの投与と同等であるという相矛盾する結果は、標的化を高めることが薬効に結びつかないというよりはむしろ標的化された薬物が有効に利用されていないのではないかと推察することができる。すなわち、第3章で得たin vitroの放出結果がin vivoの抗腫瘍効果に反映するとすれば、家兎のVX-2腫瘍モデルに対するシスプラチンの増殖抑制効果に寄与した遊離のシスプラチン量はどの油性薬物担体も同じであると考えられ、EO及びLPの投与では投与初期に放出されたシスプラチンが薬効に主に関係しており、VEOの投与では腫瘍組織中に滞留した薬物のうち徐々に放出されたシスプラチンのみが薬効を発揮していると考えることができる。したがって、この考え方から言えば、VEOにより標的化されたシスプラチンは有効に利用されていないことになる。

本章まで、薬物の“標的化”を主目的にシステム設計を考えてきた。その結果、粘度を高めた油性薬物担体とすることで、薬物の標的化、すなわち癌部位集積能や滞留能が増加し、臨床的に高い評価を得ているLPと同等かあるいはそれ以上の優れた薬物担体とすることができた。しかしながら、特に、懸濁化剤のような剤形として油性薬物担体を用いる場合には、標的化能ばかりでなく薬物放出性も抗腫瘍効果に対する重要なファクターになると思われ、薬物放出制御能も有するシステムの設計が必要になってくるものと思われる。

第6章 薬物放出制御を目的とした粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性とモデル腹水癌に対する抗腫瘍効果

シスプラチンを微粉化・懸濁した油性薬物担体には薬物放出制御能が必要である。第3章で得た油性薬物担体からのシスプラチンの放出性は、EOやLPではほぼ全量が24時間以内に、VEOで約25%が24時間以内に放出され、その後ほとんど放出がみられない。さらに、VX-2腫瘍モデルを用いた前章の結果から、シスプラチンの油性薬物担体からの放出性について放出制御の観点からシステム設計を考えると、シスプラチンを含有した担体を動注により標的部位の脈管中に滞留させた後、初期にある一定量（副作用の発現量以下まで）の薬物が担体から放出され、その後適度な

速度で徐々にシスプラチンが放出するような製剤設計が望ましいと考えられる。

そこで、VEOに非イオン性界面活性剤を添加してVEOからのシスプラチンの放出性の制御を試みた。本章で用いた油性薬物担体を添加剤の種類や量により区別するため、表16に用いた油性薬物担体を示した。

Table 16 Oily Drug Carriers Used in This Section

Sample	Cisplatin Content (mg/ml)	Surfactant (1%)
EO-1	1.0	---
LP-1	1.0	---
VEO-1	1.0	---
T ₈₀ VEO-1/4	0.25	Tween 80
T ₈₀ VEO-1/2	0.5	Tween 80
T ₈₀ VEO-1	1.0	Tween 80
S ₂₀ VEO-1	1.0	Span 20
S ₂₀ VEO-2	2.0	Span 20
S ₈₀ VEO-1	1.0	Span 80
S ₈₀ VEO-4	4.0	Span 80

第1節 非イオン性界面活性剤を含有した粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性

図48に種々の非イオン性界面活性剤を1%含有するT₈₀VEO-1, S₂₀VEO-1及びS₈₀VEO-1からのシスプラチンの放出曲線を示した。含有させた界面活性剤のHLB値が大きくなると、すなわちその親水性が増加するとシスプラチンの放出は速くなった。Tween 80を添加したT₈₀VEO-1からのシスプラチンの放出は24時間までにほぼ全量が放出されたが、S₂₀VEO-1及びS₈₀VEO-1からは24時間までに、それぞれ全量の1/2及び1/4が放出された後、徐々にシスプラチンが放出された。これらの結果に基づき、図49に第3章、図40のシスプラチン含有生理食塩水、EO及びVEO（本章におけるEO-1及びVEO-1に相当する、以後EO-1及びVEO-1と略記）からの放出結果も含め、担体中の残存量の対数値として示す。EO-1及びT₈₀VEO-1中の残存量の10%までの対数値は、時間に対してほぼ直線であったのに対し、VEO-1, S₂₀VEO-1及びS₈₀VEO-1中の残存量の対数値は24時間前後で傾きの異なる2本の直線となった。そこで、図49の最初の直線の傾

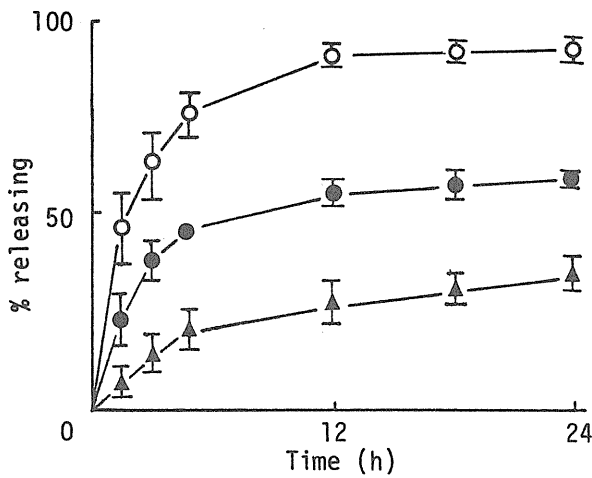


Fig. 48 In Vitro Cisplatin Release from Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers ○ ; T₈₀VEO-1 , ● ; S₂₀VEO-1 , ▲ ; S₈₀VEO-1

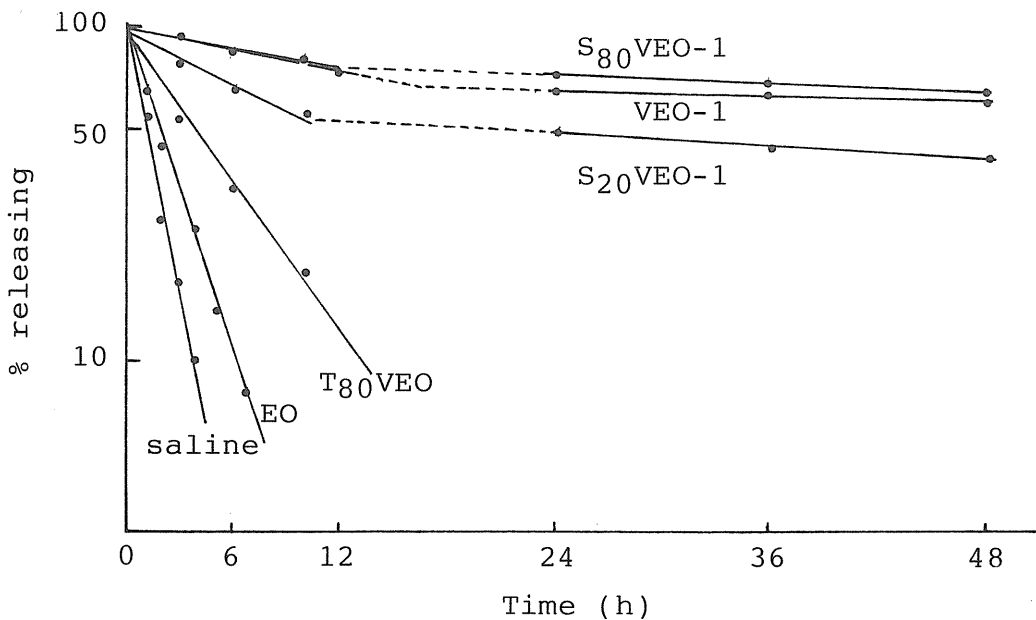


Fig. 49 Profiles of % Remaining in Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers

きから放出速度定数, k_1 を, VEO-1, S₂₀VEO-1及びS₈₀VEO-1の2本目の直線の傾きから k_2 を仮定して算出し, これら油性薬物担体からのシスプラチンの放出速度を比較した(表17). k_1 は界面活性剤の親水性が増すと大きくなった. 一方, S₂₀VEO-1とS₈₀VEO-1の k_2 はほぼ等しかったが, VEOの k_2 よりも大きくなり, この相の薬物放出速度がVEOよりも速くなることを示していた.

Table 17 Kinetic Parameters for Cisplatin Release from Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers

Sample	k_1 (h^{-1})	γ	k_2 (h^{-1})	γ
0.9 % NaCl soln.	0.576	0.997	—	—
EO-1	0.359	0.995	—	—
VEO-1	0.0245	0.994	1.693×10^{-3}	0.9998
T_{80} VEO-1	0.168	0.997	—	—
S_{20} VEO-1	0.0597	0.994	5.48×10^{-3}	0.997
S_{80} VEO-1	0.0222	0.9998	5.21×10^{-3}	0.998

これらの結果は、非イオン性界面活性剤の添加によりVEOからのシスプラチンの放出をある程度制御できることを示している。

第2節 モデル腹水癌を利用した薬物放出制御製剤としての粘性油性薬物担体からのシスプラチンの放出性の最適化

VX-2腫瘍に対するシスプラチン含有EO及びLPの抗腫瘍効果は、投与初期に放出された遊離のシスプラチンによると予測した。EO及びLPからのシスプラチンの放出は12時間以内に、また T_{80} VEO-1からは24時間以内にほぼ終了することから、初期の有効速度を推察するため、ラット腹腔を局所と仮定して、ラット腹水肝癌に対するシスプラチン含有EO、LP及び T_{80} VEO-1の延命効果から判定した。

表18aにAH 272腫瘍細胞をラット腹腔に移植後3日目にEO-1、LP-1及び T_{80} VEO-1を投与したときの平均生存日数及び製剤投与前と投与3日後の体重の増加率(%)を示す。薬物を含有しないVEOを投与した群の平均生存日数が6.9日であるのに対しEO-1、LP-1及び T_{80} VEO-1投与群の平均生存日数はそれぞれ11.35、12.38及び11.56であり比較的高い抗腫瘍効果を示した。また、この薬物投与量で体重の減少は観察されなかった。これらの結果は、EOやLPからのシスプラチンの放出速度と T_{80} VEO-1からの放出速度の間で初期の抗腫瘍効果に対する有効速度にほとんど差がないことを示している。

そこで、 T_{80} VEO-1の効果を基本とし、24時間までに放出された薬物量と抗腫瘍効果との関連性を調べた。図50に T_{80} VEO-1とシスプラチン含有量がその1/2及び1/4である T_{80} VEO-1/2及び T_{80} VEO-1/4からの累積放出曲線を示す。シスプラチンは含有薬物量に依存して放出され、その放出パターンはほぼ同

Table 18 Antitumor Effect of Cisplatin-Loaded oily Drug Carriers on Survival in AH 272 Ascites of Rats

Sample	Dose of Cisplatin (μ g/rat)	Number of rat	Weight change (%)	Mean survival (d \pm S. E.)	T/C (%)
a					
VEO	0	19	8.7	6.90 \pm 0.25	—
EO-1	100	6	12.5	11.35 \pm 1.25	164.5
LP-1	100	8	12.3	12.38 \pm 1.44	179.4
T ₈₀ VEO-1	100	7	12.8	11.56 \pm 1.38	166.7
b					
T ₈₀ VEO-1/4	25	5	11.8	7.40 \pm 0.25	107.2
T ₈₀ VEO-1/2	50	6	14.1	8.33 \pm 0.42	120.7
c					
Cisplatin soln.	100	8	0.7	15.57 \pm 1.56	225.7
S ₂₀ VEO-2	200	10	12.8	20.60 \pm 3.74	298.6
S ₈₀ VEO-4	400	10	11.2	32.80 \pm 6.92	475.4
d*					
Cisplatin soln.	100 \times 10**	10	—		545.8***

* : This column shows result of Sato et al.,¹¹³⁾

** : 100 μ g/day was administrated in AH 272 ascites of rat for 10 days.

*** : This value is (mean survival of rats treated cisplatin soln. / mean survival of rats non-treated) \times 100

様であった。次に、T₈₀VEO-1/2とT₈₀VEO-1/4の抗腫瘍効果を測定した。その結果を表18bに示す。表18aに示したT₈₀VEO-1投与群の結果とこれらの結果より、薬物含有量の増加で抗腫瘍効果が高まることが明らかとなった。このことをより明確にするため、T₈₀VEO中のシスプラチン含有量に対するT/C%を図51に示す。その結果、シスプラチンの含有量に依存してT/C%は増加した。したがって、初期の薬物放出による抗腫瘍効果を高めるため、T₈₀VEO中のシスプラチン含有量をさらに増加させることが可能と思われる。しかしながら、表17cに示し

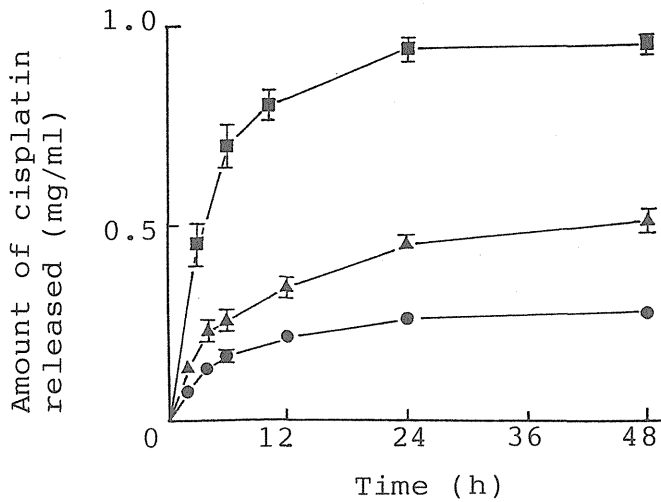


Fig. 50 In Vitro Cisplatin Release from Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers ■; T₈₀VEO-1, ▲; T₈₀VEO-1/2, ●; T₈₀VEO-1/4

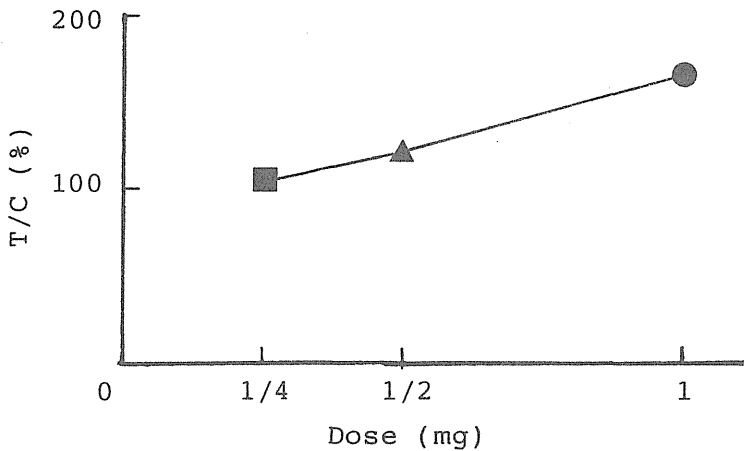


Fig. 51 Relationship between administration doses of Cisplatin and Survival Times

■; T₈₀VEO-1, ▲; T₈₀VEO-1/2, ●; T₈₀VEO-1/4

たようにT₈₀VEO-1の4倍量のシスプラチン生理食塩水を投与した群の延命効果は、T/C%が225.7とT₈₀VEO-1投与群よりも高いもののラット体重の増加は見られず強い副作用が発現している可能性があり、T₈₀VEO中の薬物量の増加は副作用を招く危険性を持つ。そこで本実験では、シスプラチンが初期に放出されて有効に利用される量をT₈₀VEO-1に含有された量、すなわち1mg/mlに設定した。

次に、24時間目以降の薬物放出性について検討した。図49の結果より、S₂₀VEO-1及びS₈₀VEO-1からのシスプラチンの放出性は、放出実験開始24時間前後で

傾きの異なるゆっくりとした放出パターンを示し、かつ24時間までのシスプラチンの放出量は $T_{80}VEO-1$ の $1/2$ 及び $1/4$ であった。表18aに示したように、放出実験24時間までの放出速度は、その時点までに放出される薬物量が同じであれば、抗腫瘍効果にほとんど影響がなかった。そこで、 $S_{20}VEO$ 及び $S_{80}VEO$ からのシスプラチンの24時間までの放出量を $T_{80}VEO-1$ からのそれと同様にし、24時間目以降のシスプラチンの放出性が異なるように $S_{20}VEO-1$ 及び $S_{80}VEO-1$ のそれぞれ2及び4倍量の薬物を含有する $S_{20}VEO-2$ 及び $S_{80}VEO-4$ を調製した。

図52に、 $T_{80}VEO-1$ 、 $S_{20}VEO-2$ 及び $S_{80}VEO-4$ からのシスプラチンの累積放出曲線を示す。これら油性薬物担体からのシスプラチンの放出は実験開始24時間目の累積量がほぼ等しくなった後、薬物含有量に依存して $S_{20}VEO-2$ 及び $S_{80}VEO-4$ からシスプラチンが徐々に放出された。

次に $S_{20}VEO-2$ 及び $S_{80}VEO-4$ の抗腫瘍効果を試験した(表17c)。これらの製剤投与で延命効果は増大し、特に $S_{80}VEO-4$ 投与群で $T/C\%$ が475.4であった。また、ラットの体重の減少は観察されず副作用は小さいと思われた。 $S_{80}VEO-4$ と同量のシスプラチンを含有した生理食塩水投与群の $T/C\%$ が225.7であり、体重の増加が見られず副作用の可能性があること、また表17dに効果の指標として示した佐藤ら¹¹³⁾のシスプラチンの連続投与($0.1\text{ mg/rat/day} \times 10$)によるスクリーニング結果を我々の結果と比較すると、その $T/C\%$ が545.8であることから考えてもこれらの製剤、特に $S_{80}VEO-4$ は薬物放出制御製剤として有用性は非常に高いものと推察される。

本章において、前章までの結果から考えて粘性油性薬物担体の薬物放出制御製剤

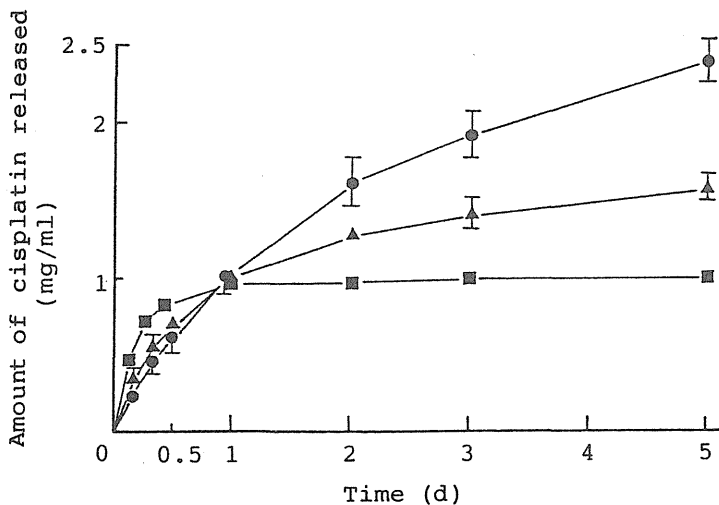


Fig. 52 In Vitro Cisplatin Release from Cisplatin-Loaded Oily Drug Carriers ($T_{80}VEO-1$, $S_{20}VEO-2$, $S_{80}VEO-4$)

としての可能性を検討した。ラット腹腔を局所と仮定したとき、今回調製したV E O中、S₈₀V E O-4は早い時期に一定量のシスプラチンを放出し、その後徐々に薬物を放出する放出制御製剤として担癌ラットに対して有効に作用した。このことは、著者が本章において当初考えたシステム設計の妥当性を示すものである。これらの結果が局所固形癌にそのまま当てはまるとはいえないが、界面活性剤の添加によりV E Oは副作用を発現させることなく比較的多量のシスプラチン（少なくともシスプラチンの溶液投与で副作用が発現するレベルまで）投与することが可能であり、含有させる界面活性剤の種類を変えることによって固形癌の特性に合わせて薬物放出制御製剤としての機能設計も十分組み立てることができるものと思われる。

第7章 小括

6章に亘って油性薬物担体として粘性オレイン酸及び粘性オレイン酸エチルを選択し、動脈内注入療法と組み合わせ設計した癌局所の“標的化”を主目的としたシステムについて述べてきた。本システムは癌組織の特性に基づいた油性物質の癌組織集積性や滞留性の高さを、それに製剤学的修飾（粘度の増加）を施すことで血管塞栓を伴った集積性及び滞留性をさらに増強して“標的化”を計るものである。今回、オレイン酸及びオレイン酸エチルの増粘剤としてステアリン酸アルミニウム（A S）またはエチルセルロース（E C）を添加して粘性油性薬物担体とすることで標的化能の増強を計った。したがって、粘性油性薬物担体の標的化効果は、まずそれらの粘度の関数として試験することが望ましく、それゆえ調製された粘性油性薬物担体は粘度を規定できるニュートン流動体であることが望ましい。しかし、これらの粘性油性薬物担体の流動曲線は、それらが非ニュートン流動体であることを示し粘度を規定することができなかつた。そこで指標粘度を決定した。オレイン酸とA S及びオレイン酸エチルとE Cの組み合わせで、一定ずり速度で測定したずり応力の変化は小さく、またある時間範囲内でほぼ一定の値に収束する傾向を示したのでこの条件で粘度の影響を試験することが可能であると判断し、その値を粘性油性薬物担体のみかけの粘度（CP）と定義して以後の実験に使用した。

セムスチンのような脂溶性の薬物の場合、ほとんど油性薬物担体中に溶解しているので投与後のセムスチンの挙動はほぼ油性薬物担体と同様であろう。一方、シスプラチンのような難溶性やあるいは水溶性薬物で今回のような懸濁状態で油性薬物担体中に封入した場合、その動態は油性薬物担体のそれと異なる可能性が考えられた。しかしながら、担癌動物に対してシスプラチンを懸濁含有した油性薬物担体を投与したときのシスプラチンの動態はほぼ担体と同様であり、加えて薬物担体の粘

度の増加により懸濁安定性も増加することから、微粉化・懸濁剤という剤形が難溶性や水溶性薬物の動脈内投与に有効な手段になると思われた。

油性薬物担体自身の臓器レベルでの標的化能は臓器滞留性の定量的評価から、選択した臓器中、肝臓において粘度の増加に伴ない比較的高くなる傾向が見られた。この薬物担体の粘度の増加による臓器滞留性の増加は、肝臓のアンジオグラムの結果から血管塞栓能が増加すること及び脂肪染色標本の結果から血管中に滞留した薬物担体が徐々に組織側へ移行することによると推察された。また、VX-2腫瘍を肝臓に移植した家兎における脂肪染色標本を用いた組織学的な結果は、癌新生血管において粘度の低いオレイン酸エチル（5 cp）でさえも血管壁に付着するように新生血管中に存在するものの粘度の増加で新生血管を塞栓するように存在し、また癌部位周辺の動脈内にも油の存在が認めらることを示していた。このことはシスプラチンのVX-2腫瘍移植肝癌家兎における油性薬物担体の粘度の違いによる初期の癌部位集積性の差として定量的に確認された。加えて標識体を用いた肝臓における正常部位と癌部位の滞留性の比較で、正常部位よりも癌部位のほうが放射活性が高く、また粘度の増加で癌部位における滞留性が増加した。さらに薬物の癌部位集積性、滞留性も増加した。これらの結果は当初著者がシステム設計した癌組織の特性に加え、油性薬物担体の粘度の増加という製剤学的修飾による担体の標的化の増強に伴った薬物の“標的化”が設計通りに成されていることを示唆するものである。

しかしながら、VX-2腫瘍移植肝癌家兎に対するシスプラチンを含有した油性薬物担体の抗腫瘍効果の結果は薬物担体の標的化能に薬物放出制御能を加えることを必要としている。AH 272腫瘍細胞移植肝癌ラットに対するシスプラチン含有油性薬物担体の効果の違いは、この腫瘍系で癌部位への薬物の集積性が家兎を用いた腫瘍系に比べるとあまり高くなく、また薬物担体投与初期のシスプラチンの癌部位集積性がどの油性薬物担体でもほぼ同程度あることから、油性薬物担体の粘度の増加によるシスプラチンの癌部位滞留性の増加に伴なって高くなったと推論される。一方、VX-2腫瘍細胞移植肝癌家兎に対するシスプラチン含有油性薬物担体の効果がほとんど等しかったのは、この腫瘍系で油性薬物担体の粘度の違いによるシスプラチンの癌部位滞留性が異なるもののどの薬物担体の投与でさえも初期の癌部位の薬物集積性が高く、また薬物放出性に違いが見られたことによると思われた。VX-2腫瘍系においてこの結果は、薬物放出制御製剤としての機能を付与する必要性を結論として導いたが、これら2つの異なった腫瘍系の効果の違いも結果として薬物放出制御製剤としての機能を付与する必要性があると結論づけられるであろう。つまり、これら2つの腫瘍系に対するシスプラチンを含有した油性薬物担体の効果の違いは、①薬物に対する感受性の違い、②実験モデルとしての独立性の違い、すなわちVX-2

腫瘍の方が肝臓中でAH 272腫瘍よりもゆっくりと独立した個体を形成する，③それに伴った癌新生血管の発達性の違いによると思われ，AH 272腫瘍のような系の癌でも薬物放出制御製剤としての機能を付与すればより効果は高まるものと推察される．5章までの結果から，粘性油性薬物担体に薬物放出制御製剤としての機能を持たせるために界面活性剤を含有した担体を調製した．この油性薬物担体からのシスプラチンの放出は加えた界面活性剤の種類によって変えることができ，含有させたシスプラチンを有効に標的部位で利用できる可能性を示した．今回，腹水癌を用いて確認した一連の界面活性剤を含有した粘性油性薬物担体の結果は，薬物放出制御製剤としても十分機能を果たすことを示していたが，薬物によってはさらに精密な制御システムとして設計する必要があるであろう．

今回，著者は粘度を高めた粘性油性薬物担体を調製してLPが有する癌部位選択的集積性の能力に加え固形薬物担体の有する臓器滞留性や塞栓能を付与し，抗腫瘍効果をさらに増強できる薬物の標的化製剤のシステム設計を行なった．また，薬物放出制御製剤としての機能も界面活性剤の添加で成し得ることができた．油性担体も固形担体も長所，欠点があるわけであるが，それらの良いところを取ることは得てしてより良い結果を得られない場合もある．本論文で得た結果は，臨床的に高い評価を得ているLP以上の効果を粘性油性薬物担体が有し，また著者が当初設計したシステム以上の能力を発揮する製剤とすることができた．しかしながら，さらにより良いシステムとして設計するためには上述したような薬物担体の長所や欠点の接点を見出し，標的とする腫瘍の発生部位や薬物の種類に合わせた油性薬物担体とすることが必要となろう．

総 括

第1編と第2編にわたって固形癌に対する薬物の“標的化”を主目的に、固形の薬物担体（アルブミンマイクロスフィア）と液状の油性薬物担体（粘性オレイン酸、粘性オレイン酸エチル）を動脈内注入療法に導入したシステムについて述べてきた。著者が目指した薬物の“標的化”とは、癌周辺の正常組織をある程度含む領域であり、その目的に合わせて製剤学的な修飾により薬物担体を調製した。薬物担体の標的化は組織学的及び定量的に確認され、どちらの薬物担体もその能力が非常に高いものであると思われた。標的化の観点からこれら2種の薬物担体を比較すると、アルブミンマイクロスフィアは癌組織及びその周辺組織の細動脈から動脈への標的化であるのに対し、粘性油性薬物担体は癌組織及びその周辺組織の癌新生血管から動脈及び癌組織内（このことは正常組織での間接的な結果から）への標的化である。肝癌に限っていえば、著者が調製した粘性油性薬物担体が固形の薬物担体の機能も保持していることから原発性及び転移性の肝癌の両方に効果を発揮する可能性を示しており、この点から固形薬物担体よりも有用性が高いかもしれない。しかし、肝癌以外の臓器癌への応用性の観点を付け加えると、本論文の結果から、粘性油性薬物担体にはその可能性は非常に小さく、担体及び薬物のバイオアベイラビリティも含め絶対的な標的化レベルは現在のところアルブミンマイクロスフィアの方が高いものと思われる。いずれにしても“標的化”を目的に設計したこれらのシステムは、ラット及び家兎のモデル肝癌に対して高い抗腫瘍効果を発揮しており、局所治療に対する有用性は高いと思われるが、システムの設計には、同時に薬物の“放出制御”に関してもその機能を組入れ平行して考えなければならない。この考え方を本システムに導入することは、抗腫瘍効果をさらに高めることはまちがいないと思われるが、そのためには現在のところ用いる制癌剤と標的とする臓器癌に合わせてある程度の試行錯誤を繰り返しながらこれらの薬物担体のシステム設計を行っていく必要があると思われる。また、本論文の標的化レベルにおいて、特に油性薬物担体の機能をより高めるためには、さらに詳細な癌組織の特性に由来する集積メカニズムの解明が重要であり、今後の課題となろう。

謝 辞

本研究に際し、城西大学薬学部教授 森本雍憲先生には、研究テーマの決定から結論に至るまで、終始示唆に富んだ適確なるご指導、ご助言を賜り厚く感謝の意を表します。

杉林堅次先生には、終始研究を見守って頂きました。行き詰まった時など、方向性をご指摘下さり、研究の進展を見ることができました。

また、従二和彦先生、千葉大学医学部助教授 藤本茂先生、埼玉医科大学講師 芝田俊勝先生には常に研究の裏付けとなるデータの提供、解析など、実験研究へのお力添えを頂きました。

更にディスカッション等により、分析の不十分なる点を述べて頂き研究を一層深めて下さった川口健夫先生、関俊暢助手、畑中朋美助手、実験協力者の塚田裕一郎君、今水賢君のご尽力により結論までの道程を歩めましたことに深く感謝いたします。

その他、教室関係者諸氏を含め、森本雍憲先生を中心とする城西大学薬学部製剤学教室の研究態勢、チームワークの良さに勇気づけられ、本研究を滞りなく成し遂げることができました。

ここに厚くお礼を申しあげます。

実験の部

第1編 実験の部

(1) 実験材料及び試薬

小球体調製に用いた人血清アルブミン (HSA) (Fraction V, 粉末) はシグマ社から、牛血清アルブミン (BSA) は (Fraction V, 粉末) は生化学工業から得た。マイトマイシン C (MMC) は協和醗酵工業から供与されたものを用いた。染色剤として用いたヘマトキシリンはメルク社のものを用いた。綿実油, イソオクタン, クロロホルム, *n*-オクタンは和光純薬から購入した。交叉結合剤としてグルタルアルデヒド (25%, 和光純薬) 及びホルムアルデヒド (38%, 和光純薬を用いた)。非イオン性界面活性剤である Span 85 (HLB 1.8), Span 80 (HLB 4.3), Span 20 (HLB 8.6), Tween 80 (HLB 14.5) は東京化成から購入した。その他の試薬は特級または1級を用いた。

(2) アルブミンマイクロスフィアの調製法

MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製 (Method I) --- 氷冷したHSA水溶液 (270 mg/ml, pH 7.4リン酸緩衝液を使用) 中にMMC (30mg) を入れ混合した。次に, 5% Span 85含有綿実油 100ml中にこの混合液を滴下し, 30分間, 500 rpm で攪拌しエマルジョンとした。さらに, 120°C, 500 rpm で攪拌した綿実油 100ml中に上記のエマルジョンを滴下し, 30分間熱固化した。冷後, 溶媒を除去するためにエーテル約40mlで4~5回洗浄し, デシケーター中で乾燥, 保存した。また, 第3章で用いた薬物を含有しないマイクロスフィアを調製する場合には, HSA水溶液を上記攪拌溶媒に滴下した後, 30分間, 2000 rpmで攪拌しエマルジョンとしさらに超音波破碎装置で30分間処理後, 熱固化した。

MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製 (Method II) --- 上記と同様に氷冷したMMC-HSA混合液を調製した後, 5%グルタルアルデヒド 0.6mlを素早く添加し30秒攪拌した。次に1%Tween 80含有イソオクタン:クロロホルム (2:1) 混合溶媒 100ml中に上記の混合液を滴加し, 5分間, 1000rpm で攪拌した後, 80-85°Cで5分間攪拌, 熱固化した。混合溶媒除去後, さらに*n*-オクタン 100mlを添加しグリセリン油浴中で120°C, 20分間熱固化した。冷後, 溶媒を除去するために, 石油エーテル及びエーテル約40mlを用いて, 3~4回洗浄し, デシケーター中で乾燥, 保存した。^{114, 44)}

MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製 (Method III) --- Method IIと同様に氷冷したMMC-HSA混合液に5%グルタルアルデヒド 0.6mlを素早く添加し30秒攪拌した後, こんどは1% Span 80:Span 20 (7:5)含有*n*-オクタン 100ml中で5分間, 1200rpm で攪拌し, さらにグリセリン油浴中で120°C, 20分間熱固化して溶媒除去後, 乾燥, 保存した。また, 種々のSpan 80及びSpan 20の混合比 (HLB値, 1.8, 3.0, 4.3, 5.5, 6.7, 8.6) の界面活性剤を1%含有する*n*-オクタン中で, 同様にマイクロスフィアを調製した。

MMC含有アルブミンマイクロスフィア及びマクロスフィアの調製 (Method IV) --- BSAを用い, Method IIIと同様の操作で, 攪拌速度及び攪拌溶媒中の非イオン性界面活性剤の量を変えてマイクロスフィア及びマクロスフィアを調製した (第3章, 第2節参照)。

MMC含有アルブミンマイクロスフィアの調製 (Method V) — — — Method III とほぼ同様の操作で、マイクロスフィアを調製した (可変条件は第6章, 第1節参照)。調製したマイクロスフィアを 100mg 分取し, ホルムアルデヒド-エーテル溶液中 (50ml) で 1, 4, 8 または 16 時間攪拌した。溶媒除去後, エーテル約 40ml で 4 回洗浄し, デシケーター中で乾燥, 保存した。¹¹⁵⁾ アルブミンは BSA を用いた。

(3) アルブミンマイクロスフィアの形状及び粒度分布の測定法

アルブミンマイクロスフィアの実体顕微鏡観察 — — — Method II, Method III 及び Method IV で調製したマイクロスフィアまたはマクロスフィアをプレパラートに均一に分散させた後, 実体顕微鏡 (Olympus, model SZ-Tr) 下で観察した。

アルブミンマイクロスフィアの光学顕微鏡観察 — — — Method III で調製したマイクロスフィアを上と同様に処理した後光学顕微鏡 (Olympus, model BH) 下で観察した。

アルブミンマイクロスフィアの走査型電子顕微鏡観察 — — — Method III 及び Method IV で調製したマイクロスフィアをイオンコーター (Eiko, model 1B-3) で白金-パラジウム蒸着した後 (蒸着条件: 真空度 0.01 Torr. 以下, 照射電流 0.65 mA, 照射時間 3.5 min), 走査型電子顕微鏡 (日立, X-650) 下で観察した。

アルブミンマイクロスフィアの粒度分布の測定 — — — Method III で調製したマイクロスフィアを上記の方法と同様に蒸着した後, 走査型電子顕微鏡下で観察し適当と思われる箇所の写真を取り, Video Plan (Kontron) を用いて粒度分布を測定した。

(4) MMC含有アルブミンマイクロスフィアからのMMCの放出測定法

マイクロスフィアからのMMCの放出測定 (第2章, 第1節の場合) — — — MMC含有アルブミンマイクロスフィア 10mg をそれぞれ pH 7.4 リン酸緩衝液及びタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ 100unit/10ml) (シグマ社) 含有 pH 7.4 リン酸緩衝液 10ml 中に入れ, マグネチックスターラーで攪拌した。懸濁液は実験中 37°C に保った。次に各時間毎にアルブミンマイクロスフィア懸濁液 10ml を 3000g で遠心し, 上清を 7.0ml 採取した。残りの懸濁液には各緩衝液 7.0ml を添加し, 同様な操作で実験を続けた。MMC の定量は分光光度法で行ない, 365 nm の吸光度を分光光度計 (日立, model 100-60) を用いて測定した。

マイクロスフィアからのMMCの放出測定 (他の場合) — — — MMC含有アルブミンマイクロスフィア 10mg を pH 7.4 リン酸緩衝液 10ml に入れ, 同様の操作で放出実験を行った。定量は, 表 19 に示した条件で HPLC で行った。

Table 19 Condition for HPLC Analysis

Column	Nucleosil 5C ₁₈
Mobile phase	0.01M phosphate buffer (pH 6) : MeOH = 6 : 4
Flow rate	0.8ml/min
Wavelength	360 nm
Injection volume	20 μl

(5) MMC含有アルブミンマクロスフィアからのMMCの放出測定法

マクロスフィアの重量及び粒子径の測定——個々のマクロスフィアについて重量及び粒子径をセミマイクロ化学天秤及びマイクロメータ (M110-25, 三豊 MFG) を用いて測定した。また、この結果から、個々のマクロスフィアの体積、面積及び密度を計算した。

MMC含有アルブミンマクロスフィアからのMMCの放出測定——個々のマクロスフィアをバイアル (容量4 ml) に入れた後、pH 7.4 リン酸緩衝液 3.5 mlを入れ、37 °C, 150 rpm で攪拌した。経時的に上清 3.0 mlを採取した後、同量の緩衝液を戻し実験を続行した。MMCの定量は、HPLCで行い表19の条件で測定した。

MMC含有アルブミンマイクロスフィア及びマクロスフィアからのMMCの放出性の解析——スフィアからのMMCの放出性は、1次速度式または拡散式にあてはめ、コンピュータプログラムMULTIを用いて非線形最小2乗法により解析した。

MMC含有アルブミンマイクロスフィア及びマクロスフィア中の薬物量の測定 (Method IV及びV)——マイクロスフィア10 mgまたはマクロスフィア1個をpH 7.4リン酸緩衝液10 mlまたは2 ml中に入れ、37 °Cで攪拌した。Sink状態が保たれるように経時的に上清を全量採りし、上清中のMMC量を48時間まで測定した。なお、マイクロスフィアの場合は、3000 gで遠心した後、上清を採取した。

(6) 蛋白質分解酵素によるアルブミンマイクロスフィアの消化・分解性の測定法

蛋白質分解酵素によるアルブミンマイクロスフィアの消化・分解性の測定——Method I, Method II及びMethod IIIで調製した薬物を含有しないアルブミンマイクロスフィア各10 mgを種々の分解酵素 (コラゲナーゼ 10 unit/ml, パパイン 10 unit/ml, プロテアーゼ 10 unit/ml, トリプシン 10^3 BAEE unit/ml) (シグマ社) を含有したpH 7.4 リン酸緩衝液8 ml中に入れ、96時間マグネットスターラーで攪拌しながら37 °Cでインキュベートした。但し、懸濁液は24時間毎に高速冷却遠心機 (KUBOTA KR-20000T) を用いて10733 gで遠心した後、上清 6.0 mlを除去し新たに各緩衝液 6.0 mlを加えた。96時間インキュベート後、懸濁液を10733 gで遠心し上清を除去した。残った沈澱物に蒸留水を加え攪拌した後、また10733 gで遠心し上清を除去した。同様にこの操作を蒸留水で1回、メタノールで2回繰返した後、沈澱物を40 °Cに加温した水浴上で窒素ガスを用いて沈澱物中のメタノールを蒸発させ、デシケーター中で減圧乾燥した。十分乾燥させた沈澱物を採取し、セミマイクロ化学秤かりを用いてその残存重量を測定した。¹¹⁶⁾

蛋白質分解酵素処理したアルブミンマイクロスフィアの実体顕微鏡観察——Method IIIのマイクロスフィアをプロテアーゼ含有リン酸緩衝液で上と同様に処理し、0, 2, 4日後に実体顕微鏡で観察した。

(7) アルブミンマイクロスフィアの生体内適合性の測定法

アルブミンマイクロスフィア懸濁液の調製——Method I~IIIの方法で調製した薬物を含有しないアルブミンマイクロスフィア各50 mgを滅菌生理食塩水 5.0 ml中に懸濁させた。

ラット大腿部筋肉内への懸濁液の注入操作——体重150 gの雄性ウイスターラットをペントバルビタールNa (大日本製薬) で麻酔 (1.0 ml/kg *i.p.*) 後、大腿部筋肉内に上で調

製した各懸濁液 0.25 mlを注入した。コントロールとして生理食塩水 0.25 mlを注入した。また、一群3匹とした。^{117, 118)}

組織標本の作成——各アルブミン懸濁液注入後3日, 7日, 30日後に大腿部筋肉を切除し, 10%中性緩衝ホルマリン溶液(処方1参照)で固定後, 常法により切片を作成しヘマトキシリン, エオジン染色(処方2参照)した。^{119, 120)}

処方1) 10%ホルマリン中性緩衝溶液		処方2) Mayer's Hematoxylin 液	
ホルマリン原液	100.0 ml	ヘマトキシリン	1.0 g
蒸留水	900.0 ml	ヨウ素酸ナトリウム	0.2 g
第一リン酸ナトリウム・一水和物	4.0 g	カリウム明バン	50.0 g
(" ・二水和物	4.4 g)	抱水クロラル	50.0 g
第二リン酸ナトリウム・無水物	6.5 g	結晶性クエン酸	1.0 g
(" ・十二水和物	25.9 g)	蒸留水	100.0 ml

(8) 軟X線発生装置を用いた塞栓効果の測定法

造影剤(硫酸バリウム懸濁液)の調製——硝酸バリウム26.0gを沸騰蒸留水400ml中に入れ加熱溶解した。溶解液が50℃前後まで冷えてから10%硫酸100mlを加えてよく攪拌する。約10分間放置後, 上清を除去し, 残った沈澱物に蒸留水を適量加えて攪拌, 再び10分間放置後上清を除去する。この操作を蒸留水ですらに2回, メタノールで3回行った後, 40℃水浴上でロータリーエバポレーター(東京理化学器械 TYPE N-1)を用いて硫酸バリウムを減圧乾燥した。¹²¹⁾次に, 合成した硫酸バリウム20gを蒸留水50ml中に懸濁させ, これに0.1%寒天溶液40mlと10%ホルマリン溶液1.0mlを加えて造影剤とした。¹²²⁾

アルブミンマイクロソフィア懸濁液の調製——Method IIIで調製した薬物を含有しないマイクロソフィア20mgをカルボキメチルセルロースナトリウム(CMC-Na)を少量添加した滅菌生理食塩水3.0ml中に入れ攪拌して懸濁液とした。

ラット肝動脈内へのマイクロソフィア懸濁液及び造影剤の注入方法(第1編, 第4章, 第1節, 図20参照)——体重200~250gの雄性ウイスターラットをペントバルビタールNaで麻酔した後, 開腹し肝尾状葉の下に隠れている肝動脈を露出させた。次に, 肝左葉及び, 肝中間葉の右側に通じる動脈の血流をクランプで遮断し消化管に通じる動脈の枝分かれの部分からカテーテルを用いてマイクロソフィア懸濁液0.4mlを注入した。肝左葉及び肝中間葉の右側に通じる動脈の血流を遮断しているクランプを外し, その直後, 2及び7日後, 造影剤約0.03mlを注入した。なお, この操作の間, マイクロソフィア懸濁液と造影剤の逆流を防ぐため腹部大動脈から肝動脈に至る部分の血流をクランプで遮断した。^{123, 124)}また, AH 272転移肝癌を有するラットの肝動脈から上記と同様な方法でマイクロソフィア懸濁液及び造影剤を注入した。コントロールとして造影剤だけを注入した。

アンジオグラムの作成——マイクロソフィア懸濁液及び造影剤注入後, 肝臓を摘出し, 生理食塩水で軽く濯いだ後, 軟X線発生装置(綜研, Sofron model TRS-630)を用いてアンジオグラムを撮影した。撮影条件は, 管電圧28~30kV, 管電流5mA, 撮影距離50cm, 露出時間30秒である。フィルムはGraphic Arts Film(小西六, Sakura CS-100E)を用い, 現像は自動現像装置(Phoenix)で行った。

(9) MMC及びマイクロスフィアの標的化の組織標本による測定法

マイクロスフィア懸濁液の調製――薬物を含有しないマイクロスフィア及びMMC含有マイクロスフィア各20mgを滅菌生理食塩水 3.0ml中に入れ懸濁した。

組織切片の作成――上で調製した懸濁液をそれぞれ(7)と同様な方法で注入し、薬物を含有しないマイクロスフィア懸濁液注入の場合には3日目、MMC含有マイクロスフィア懸濁液の場合には12, 24時間及び2週間目に肝臓を摘出して10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法により切片を作成しヘマトキシリン、エオジン染色した。

(10) AH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌ラットに対するMMC含有アルブミンマイクロスフィアの抗腫瘍効果

AH 272腹水肝癌細胞の植えつき――150 g前後の雄性ドンリュウラット系を用い、希釈しない $10^7 \sim 10^8$ 個の腫瘍細胞を含む約 0.05 mlの腹水を5~6日目毎に腹腔内に移植して継代培養を行った

AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットの作成――体重 170~200 gの雄性ドンリュウラットをペントバルビタールNaで麻酔した後、右肋骨下約 1cmの所を縦に約 1cm開腹し肝中間葉を腹腔外に露出した後、上記の腫瘍細胞 1×10^7 個(0.05 ml)を中間葉の右側(ラットから見て)に注入しAH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌を作成した。

AH 272腹水肝癌細胞移植モデル肝癌ラットにおける延命効果の測定――AH 272腹水肝癌細胞移植後3日目の担癌ラットをペントバルビタールNaで麻酔した後、正中線に沿って約3.0cm開腹し、(7)と同様な操作でそれぞれ生理食塩水(コントロール)(10匹)、薬物を含有しないマイクロスフィア(25mg/ml)(5匹)、遊離MMC(1.25 mg/ml)、MMC含有マイクロスフィア(25mg/ml, MMC量で 1.25 mg/ml)を 0.4ml肝動脈から注入し、生存日数を記録した。¹²⁵⁾

評価法――効果の判定はコントロール群の平均生存日数に対する治療群の平均生存日数の百分率(T/C%)として判定した。¹²⁶⁾

$$T/C (\%) = \frac{\text{治療群の平均生存日数}}{\text{未処理群の平均生存日数}} \times 100 \quad \dots \quad (1)$$

第2編 実験の部

(1) 実験材料及び試薬

オレイン酸、オレイン酸エチル及びステアリン酸アルミニウムは和光純薬より購入した。エチルセルロース(90~120cp, 5% Ethanol+Toluene soln. at 25°C)は、東京化成工業のものを用いた。油性造影剤リピオドールウルトラフルイドは小玉株式会社より供与されたものを使用した。染色剤として用いたオイルレッドOならびにヘマトキシリンはメルク社のものを用いた。制癌剤セムスチンは協和醗酵工業株式会社より、シスプラチンは日本化薬株式会社より供与された原末を用いた。[9, 10-³H(N)]-オレイン酸(³H-オレイン酸、比活性35μCi/mM)は日本ラジオアイソトープ協会から購入した。非イオン性界面活性剤であるSpan 80(HLB 4.3), Span 20(HLB 8.6)及びTween 80(HLB 14.5)は東京化成から購入し

た。その他の試薬は特級または1級を用いた。

(2) 粘性油性薬物担体の調製法 (第2編, 第1章, 第1節参照)

粘性オレイン酸の調製——オレイン酸 (OA) とステアリン酸アルミニウムを任意の割合で耐熱バイアル中 (50ml) に取り, ホットプレート上で 120℃ に加熱し透明になるまで攪拌溶解した後, 室温で空冷し, 粘性オレイン酸とした。セムスチンは粘性オレイン酸調製後, 添加し溶解した (60mg/ml)。

粘性オレイン酸エチルの調製——オレイン酸エチル (EO) とステアリン酸アルミニウムまたはエチルセルロースを任意の割合で耐熱バイアル中に取り, 上と同様に処理し, オレイン酸エチルとした。但し, エチルセルロースの粘度は, そのロット間でバラツキがあるため, 目的とする指標粘度をもつ粘性油性薬物担体を調製する時は, 一旦, 目的粘度よりも高い粘度の粘性油性薬物担体とした後, オレイン酸エチルを目的粘度になるまで添加して製した。また, 製剤は加熱溶解した後, バイアル内を窒素置換し冷蔵庫内 (4℃) にて保存した。シスプラチンは薬物担体中にほとんど溶けないため, メノウ乳鉢上で微粉化した後, 超音波処理及びマグネチックスターラーで均一に分散させた。

(3) 油性薬物担体の粘度測定法

油性薬物担体の粘性の測定——精密回転粘度計 (HAAKE, Rotovisco RV100/CV100 or または RV20/CV20) の CV 100 または RV20/CV20 のビーカー内に, inner cylinder の表面積を覆う量の油性薬物担体を入れ, ずり速度; $0 \sim 180 \text{ s}^{-1}$, ビーカー内静置; 2min, オペレーション時間; 20min, オペレーション温度; 37℃ の条件でリバーサル法により粘性を測定した。

粘性油性薬物担体の指標粘度の決定——粘性油性薬物担体を同様にトルク内に入れ, 一定ずり速度; 180 s^{-1} , ビーカー内静置; 2min, オペレーション時間; 20min, オペレーション温度; 37℃ の条件で one way 法により測定した。

(4) シスプラチンの油性薬物担体中の懸濁安定性の測定

シスプラチンを試験管中のリピオドール, EO または 40, 80 及び 120 cp 粘性 EO 中に入れ (1mg/ml), 均一に分散させた後, シスプラチン粒子の沈降性を経時的にカメラに収めた。

(5) 軟X線発生装置を用いた油性薬物担体動注後の塞栓効果の測定法

造影剤 (硫酸バリウム懸濁液) の調製——第1編, 実験の部, (7) と同様。

ラット肝動脈内への油性薬物担体及び造影剤の注入方法——第1編, 実験の部, (7) と同様に, OA, 粘性 OA (40, 80 及び 120 cp), EO または粘性 EO (40, 80 及び 120 cp) を $20 \mu\text{l}$ 投与し, 10分及び24時間後のアンジオグラムを撮影した。ただし, EO または粘性 EO (40, 80 及び 120 cp) の投与の場合, 左葉に通じる動脈のみクランプで止めた。

アンジオグラムの作成法——第1編, 実験の部, (7) と同様。

(6) 動脈内投与した油性薬物担体の脈管内挙動の測定法

ハムスター頬袋の調製法——ゴールデンハムスター (σ , 100 ~ 120 g) をペントバ

ルビタールNa (50mg/ml, 1ml/kg, *i.p.*) で麻酔した後, リングピンセットで頬袋を口腔より注意深く外側に引き出し生理食塩水で洗浄した. 動物固定台にハムスターを固定し, Plexiglas 製の観察用チャンバーを隣接させた (図57). 頬袋をチャンバー辺縁のシリコンラバーを敷いた浅い溝に2~3本のピンで留めた. このときピンによる主要血管の閉塞や損傷に注意し, また, 血管に富む部分がチャンバー中央に来るようにした. 次に, 取り出した頬袋は2層に重なっているのので, 上層の膜を周辺より口に近い部分まで注意深く1.5 ~ 2.0 cm切開し, その切り口を反転し図57に示すようにシリコンラバーにピンで留め一層の膜とした. 光学顕微鏡下での観察を最適にするために, 膜上の網目状の結合組織をピンセットで注意深く取り除いた. 実験中のチャンバー内は, マイクロチューブポンプを用い1.0 ml/min の流速で37℃の生理食塩水を環流させ, 頬袋が生理食塩水で充分満たされるようにした. チャンバー内の温度は, 図57に示したように温度計により確認した. ¹²⁷⁾

外頸動脈への油性薬物担体の注入法とハムスター頬袋の微細循環系の観察法——油性薬物担体の注入は, Tumaらの方法¹²⁸⁾を修飾して行った. 上で頬袋を調製したハムスターをさらに必要に応じてウレタン (50 w/v% soln., *i.p.*) を用い維持麻酔し, 頬袋を支配している頸静脈を露出した. 図57に示した様に頸動・静脈を内・外頸動脈の分枝まで注意深く分けた. 次に, ハムスターを固定した動物固定台をカメラ (ITC-350M, Olympus-Ikegami, Tokyo) 及びカメラビデオモニター (CDA-201N, Olympus-Ikegami, Tokyo) を接続した顕微鏡 (new VANOX, model AHBS, Olympus, Tokyo) のステージの上に乗せ頬袋を固定した. 観察用チャンバーを接眼レンズ下に設置した. 内・外頸動脈分枝下の頸動脈をクランプで閉塞した後, 外頸動脈より翼付静脈針付きのシリコンチューブを挿入しクランプで固定した. 分枝下の頸動脈に固定したクランプを除去し, 予め37℃に温めておいた種々油性薬物担体 5.0 μ l を図57に示すようにマイクロシリンジを用いて内頸動脈に挿入したシリコンチューブより注入した. 血管は, 200 μ mの動脈血管から5 μ mの毛細血管までのものを観察し, その重要と思

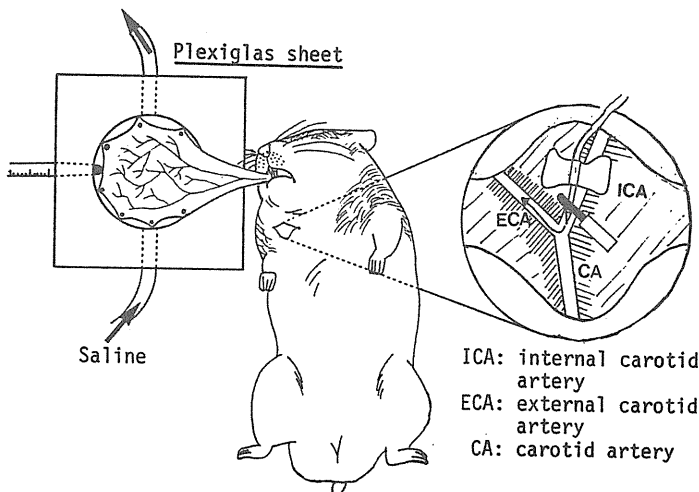


Fig. 53 Single Layered Pouch Preparation and Position of Catheter for Injection of Oily Drug Carriers into the External Carotid Artery of Hamsters

われる場面をビデオテープに納め、注入直後から種々の径の血管に到達する時間及び血管塞栓時間をタイマーで計測した。

(7) 油性薬物担体動注後の各臓器滞留性の測定法

^3H -オレイン酸含有種々油性薬物担体の調製——肝臓及び他の臓器（ハムスター頬袋、ラット胃及び腎臓）へ種々油性薬物担体を投与した時に、 ^3H -オレイン酸の比活性が各々25及び $10\mu\text{Ci}/\text{ml}$ になるように、 ^3H -オレイン酸をマイクロシリンジを用いて10mlのフラスコに滴下し、これに種々油性薬物担体を加え10mlとした後、振とうして調製した。

各臓器への油性薬物担体の投与方法——ラット肝臓及びハムスター頬袋への ^3H -オレイン酸含有油性薬物担体（リピオドール、OA、粘性OA（40、80及び120 cp）、EOまたは粘性EO（40、80及び120 cp））の投与法は、第1編、実験の部、（7）及び第2編、実験の部、（6）と同様に行った。ただし、この場合、肝臓の全ての葉に投与した。このときのラット肝臓及びハムスター頬袋への ^3H -オレイン酸含有油性薬物担体の投与量は、25及び $10\mu\text{l}$ とした。なお、油性薬物担体肝動注時の注入速度は $10\mu\text{l}/\text{min}$ とした。

ラット胃への ^3H -オレイン酸含有油性薬物担体の投与は、ラットを開腹後、肝臓の下に隠れている胃動脈を露出し、図58に示したように胃・十二指腸動脈をクランプで結紮し、肝動脈から行なった。腎動脈への投与は直接腎動脈にカテーテルを挿入し行なった。投与量は $10\mu\text{l}$ とした。

各臓器のホモジネートの調製法と放射活性量の測定法——注入10分、1、2、4、24及び48時間後、ハムスター及びラットを屠殺し、各臓器を摘出した。これを生理食塩水で洗浄した後、個々の臓器の重量を測定した。次に、それらを20（ハムスター頬袋、ラット胃及び腎臓）または100 ml（ラット肝臓）のメスシリンダーに入れ、生理食塩水を加え20または100 mlに調製した。次に、ULTRA TURRAX（JANKKE&KUNKEL社）を用いて20000 rpm、1～2分間ホモジネートした。この試料1 mlをコンバストコーン（PACKARD社）に分取し、24時間空乾した。乾燥後、自動燃焼装置（Aloka, ASC-113）を用いて45秒間燃焼した。scintillatorとして乳化型（composition; 4 g POP, 0.4 g POPOP, 1 L Toluene, 0.5 L

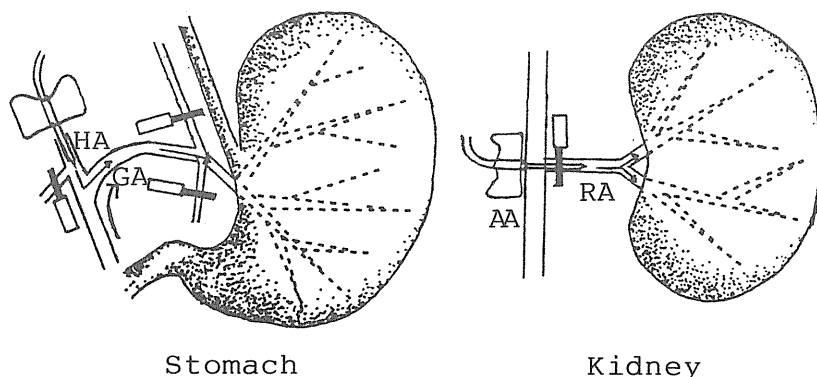


Fig. 54 Position of Catheter for Injection of Oily Drug Carriers into the Several Artery in Rats HA;hepatic artery, GA;gastric artery, AA;abdominal artery, RA;renal artery

Triton X-100) を用い、試料液と scintillator (1 : 19) の 20ml の混液とした。この操作を一試料につき三回ずつ行った。放射活性は chemical quenting を防止するために一夜冷暗所にて放置した後、liquid scintillation counter (Aloka, LSC-700) によって測定した。

また、本実験において用いた ^3H -オレイン酸のオレイン酸エチル中の保持率は、生理食塩水への溶出試験から確認したところ、48時間後で97.5%以上であったので、マーカーとして使用可能と判断した。

(8) 油性薬物担体の肝動脈内投与後の組織内挙動の組織標本による測定法

ラット肝動脈内への油性薬物担体の投与方法——第1編、実験の部、(7)と同様に、肝全葉に各種油性薬物担体(リピオドール、120 cp 粘性OA, EO及び120 cp 粘性EO)を注入(注入量、25 μl)し、10分、1、24時間及び7日後に屠殺、肝全葉を摘出した。リピオドールは更に注入30分、2、4及び6時間後についても同様に行なった。

組織標本の作成——摘出した各組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液に入れ、2週間以上固定した。固定した組織片を適当な大きさに整え台木にアロンアルファ(コニシボンD)で接着し、液体窒素上(約-150 $^{\circ}\text{C}$)に浮かべた発砲スチロールに乗せ凍結した。これをマイクロトームに固定し適度に解凍したところで素早く適当な厚さ(16~18 μm 、(12)においては27~30 μm)に薄切し水中で伸展し、スダンII(オイルレッドO)染色法にて脂肪染色を行なった。染色液の処方は、処方3に示した。¹²⁹⁾

処方3) Sudan II 染色液

0.5W/V% オイルレッドO /

イソプロパノール溶液 12ml

蒸留水 12ml

(注意: 液はコロイド様の懸濁液となる。

染色には30分間放置後、そのろ液を用いる。)

(9) 制癌剤を含有した油性薬物担体からの制癌剤の放出実験法

セムスチン含有油性薬物担体からのセムスチンの放出実験——pH 4.0クエン酸-リン酸緩衝液を図59に示したように底を塞いだ100mlの注射筒に20mlを入れた後、セムスチンを含有した油性薬物担体(OA, 120 cp粘性OA, EO, 120 cp粘性EO, 5mg/ml) 20mlを重ね層した。ただし、リピオドールは比重が大きいため、先にリピオドールを入れその上に緩衝液を重ね層した。次に、各層を37 $^{\circ}\text{C}$ で攪拌し、水層を経時的に1ml採取し、液量を一定に保つために同量の緩衝液を戻した。

セムスチンの定量——セムスチンの定量は、L o o r a¹³⁰⁾の比色定量法により図60の手順で行った。

シスプラチン含有油性薬物担体からのシスプラチンの放出実験——縦型2-チャンバセルの下側を donor 側にし、スターラーを入れた後、1mg/mlシスプラチン含有油性薬物担体(リピオドール, EO, 120 cp VEO または 1%の界面活性剤(Tween 80, Span 20 及び 80) 含有120 cp VEO)を各々2mlずつ入れ、シリコンパッキングを donor 側セルの擦り合わせ部分に蒸留水で湿らせ密着させた。その上から生理食塩水をパッキング表面に液面が到達するまで正確に取りながら滴下した。その上に透析膜を空気がセル内に残らぬように乗せ、さらにパッキングと上方セルを乗せ固定した。次に、receiver (上方セル) 側に生理食

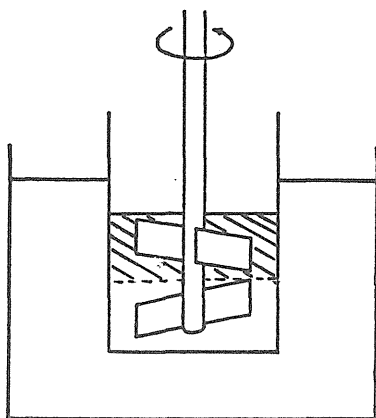


Fig. 55 Apparatus for In Vitro Semustine Dissolution Test

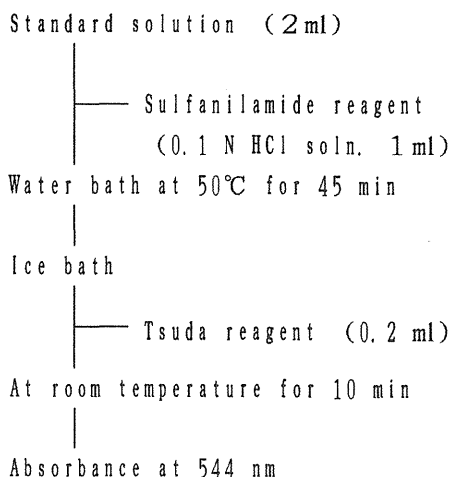


Fig. 56 Determination of Semustine

塩水10mlを入れ、恒温槽中37°Cで一定速度(1200~1300 rpm)で donor側のみ攪拌した。経時的に receiver側から全量採取した。¹³¹⁾また、実験直前にシスプラチン含有油性薬物担体 0.5~1.0 mlをフラスコに採取した。アセトン及びN,N-ジメチルホルムアミドで溶解後、蒸留水で一定容量にし振とう後、試料を1~2ml遠心用チューブ(Eppendorf社)に分取し、遠心(16000 rpm, model M-150, 佐久間製作所, 東京)した後、上澄み(リピオドールのみ)または下澄みを取り、各製剤中の絶対量を測定した。

シスプラチンの定量——シスプラチンの定量は原子吸光度法を用い、表20の条件でPt量として測定することにより行った。

Table 20 Condition of Atomic Absorption Analysis

Lamp: Pt ホローカソードランプ, D ₂ ランプ		任意	
波長: 259.95 nm		任意	
Damping: 2	Display: BKG	注入量: 10~20 μl	
	current (A)	time (sec)	mode
Dry	28	15	STEP
	(50) *	(20) *	(RAMP) *
Ash	65	15	STEP
	(100) *	(15) *	
Atomize	330	15	RAMP

* ; 生体試料の場合は、この条件で行なった。

(10) モデル肝癌ラットへ油性薬物担体動注後の油性薬物担体の滞留性の測定法

³H-オレイン酸含有種々油性薬物担体の調製——ラット肝臓への投与を目的に、第2

編, 実験の部, (7)と同様に ^3H -オレイン酸を含有した油性薬物担体(リピオドール, OA, 120 cp粘性OA, EOまたは120 cp粘性EO)を調製した。

AH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌ラットの作成——第1編, 実験の部, (9)と同様。ただし, EOまたは120 cp粘性EOの投与においては, 上記の腫瘍細胞 1×10^6 個(0.05 ml)を移植した。

ラット肝臓への油性薬物担体の投与方法——ラット肝臓への ^3H -オレイン酸含有油性薬物担体(リピオドール, OA, 120 cp粘性OA, EOまたは120 cp粘性EO)の投与法は, 第1編, 実験の部, (7)と同様に行った。このときのラット肝臓への ^3H -オレイン酸含有油性薬物担体の投与量は, $20 \mu\text{l}$ とした。ただし, EOまたは120 cp粘性EOの投与においては, 移植後5日目とした。

各臓器のホモジネートの調製法と放射活性量の測定法——注入10分, 1, 2, 4, 24及び48時間後, ラットを屠殺し, 肝臓を摘出した。これを生理食塩水で洗浄した後, 図55(総論の部, 第2編, 第4章, 第1節参照)のように癌部位と正常肝組織を切り取り各々の重量を測定した。これを20mlのメスシリンダーに入れ, 生理食塩水を加え20mlに調製した後, 第1編, 実験の部, (9)と同様にホモジネートを作成し, 同様に放射活性量を測定した。

(11)モデル肝癌動物へのシスプラチン含有油性薬物担体動注後のシスプラチンの滞留性の測定法

AH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌ラットの作成——第2編, 実験の部, (10)と同様。ただし, 上記の腫瘍細胞 1×10^6 個(0.05 ml)を移植した。

ラット肝臓へのシスプラチン含有油性薬物担体の投与方法——シスプラチンを含有した油性薬物担体(EOまたは120 cp粘性EO, 5mg/ml/kg)を, 第1編, 実験の部, (7)と同様に投与した。また, 投与は移植後5日目とした。

VX-2腫瘍移植モデル肝癌家兎の作成——日本白色種家兎(♀, 2.5~3.0 kg)に耳静脈よりペントバルビタールNa (0.5mg/kg)を投与し麻酔した。腹部を除毛して背位固定した後, 消毒し(体毛; 0.5%ヒビテン 溶液, 皮膚; イソジンヨード), メッキンオイフ で覆い, 切開部のみ露出させた。メスで正中線に沿って腹部を約8cm切開後, VX-2腫瘍塊(約 27mm^3)を先曲りピンセットで肝臓の内側右葉に埋め込むように移植し, 移植部位の血餅をガーゼで拭き縫合した。移植14日後の家兎をモデル肝癌家兎として実験に供した。

家兎肝動脈内への油性薬物担体の投与方法——上で作成したVX-2腫瘍移植肝癌家兎に同様に麻酔, 固定した後, メスで剣状突起より腹部にかけて約12cm切開した。胆嚢下部の内側右葉に通じる右肝固有動脈及び外側右葉に通じる右肝固有動脈を肝固有動脈に近い部位でクランプにより結紮した(総論の部, 第2編, 第4章, 第2節, 図48参照)。次に, 胃及び十二指腸を指で押さえ総肝動脈, 肝固有動脈及び十二指腸動脈の分枝を露出させた。十二指腸動脈左脇の間膜を先曲りピンセットで慎重に縦に裂き小さな穴を開け, リングピンセットの先を十二指腸の外壁に水平に胃側に向けて挿入し, 間膜と動脈とを剥離した。十二指腸動脈右脇の間膜も同様に行い, 十二指腸動脈に沿って一部間膜を残した状態でその間膜と十二指腸動脈を同時に先曲りクランプを用いて結紮した。総肝動脈をピンセットで挟み血流を調節しながら, 翼付静注針($27\text{G} \times 1/2'$)付きのマイクロシリンジで油性薬物担体 0.2mlを注入

した（注入所要時間：1分以内）。注入部位は、肝動脈側の十二指腸動脈をクランプで結紮し仮止血した。この間に、先に結紮に用いたクランプ2本を逆の順番に取り除き右葉側の血流を回復させた。更に、注入部位のクランプを取り指で止血した。術後の腹腔内は生理食塩水及び滅菌ガーゼを用いて洗浄し、縫合した。注入10分、1及び24時間、3、7及び14日後に屠殺し、癌部位並びにその周辺部位を摘出した。

組織中のシスプラチンの測定――第2編、実験の部、(10)と同様に、癌部位と正常肝組織を切り取り、約0.5gを正確に秤量した。これに濃硝酸：過塩素酸(1:1)を少量加え全量約1.5mlとした後、沸騰水浴中にて加熱溶解し、希塩酸により正確に2.0mlに調製し測定試料とした。定量は、原子吸光光度法にて表20の条件で行った。

(12) VX-2腫瘍移植肝癌家兎への油性薬物担体の肝動脈内投与後の組織内挙動の組織標本による測定法

VX-2移植モデル肝癌家兎の作成――第2編、実験の部、(11)と同様。

家兎肝動脈内への油性薬物担体の投与方法――第2編、実験の部、(11)と同様。

組織標本の作成――投与10分後に肝臓を摘出し、第2編、実験の部、(8)と同様。

(13) 制癌剤含有油性薬物担体のモデル肝癌動物に対する抗腫瘍効果の測定法

AH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌ラットの作成――第2編、実験の部、(10)と同様。ただし、オレイン酸エチル系場合、腫瘍細胞 1×10^6 個(0.05 ml)を移植した。

AH 272腹水癌細胞移植モデル肝癌ラットにおける延命効果の測定――0.9%NaCl soln. (1 ml/rat), OAまたはVOA (20 μ l/rat)及びセムスチンを含有するOAまたはVOA (0.9mg/20 μ l/rat)を、第1編実験の部、(7)と同様に投与した。また、同様に0.9%NaCl soln. (1 ml/rat), VEO (20 μ l/rat), シスプラチン含有生理食塩水 (0.1 mg/0.5ml/rat)またはシスプラチンを含有した油性薬物担体(LP, EOまたは120 cp粘性EO, 0.1 mg/20 μ l/rat)を、投与した。投与は移植後5日目とした。腫瘍移植後の生存日数より化学療法係数(T/C%)を算出し、抗腫瘍効果を判定した(第1編、実験の部、(9)参照)。

VX-2移植モデル肝癌家兎の作成――第2編、実験の部、(11)と同様。

VX-2移植モデル肝癌家兎における延命効果の測定――作成したモデル肝癌家兎に各油性薬物担体0.1ml及びシスプラチン-0.9%NaCl soln. 1.0ml(全てシスプラチン0.5mg相当)を投与した。投与直前と屠殺直前にマイクロメーターを用いて長径、短径及び厚さを測定し体積を算出した。抗腫瘍効果は、この体積を用い(2)式より算出した増殖率にて判定した。

$$\text{増殖率 (\%)} = \frac{\text{投与後の腫瘍体積}}{\text{投与前の腫瘍体積}} \times 100 \quad \dots \quad (2)$$

AH 272腹水癌ラットの作成――AH 272腹水肝癌細胞 1×10^6 個(0.05 ml)を移植した。

AH 272腹水癌ラットにおける延命効果の測定――AH 272腹水肝癌細胞移植後3日目に、油性薬物担体(総論の部、第6章、表16参照)0.2 mlを投与し上と同様に延命効果を判定した。ただし、このときのコントロールは薬物を含有しない120 cp粘性EOとした(第1編、実験の部、(9)参照)。

文 献

- 1) “動注がん化学療法—基礎と臨床—” 田口鐵男, 中村仁信監修, 癌と化学療法社, 東京, (1986).
- 2) 豊島磁編, “抗癌剤の領域”, 医薬ジャーナル, pp. 235-268 (1979).
- 3) Y. Matsumura and H. Maeda, *Cancer Res.*, 46, 6387-6392 (1986).
- 4) T. Iwao, H. Yoshikawa, K. Takada and S. Muranishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 2270-2273 (1988).
- 5) D. A. Scheinberg and M. Strand, *Cancer Res.*, 43, 265-272 (1983).
- 6) 畑中朋美, 森本雍憲, 治療, 73, 73-78 (1991).
- 7) K. Sato, K. Itakura, K. Nishida, Y. Takakura, M. Hashida and H. Sezaki, *J. Pharm. Sci.*, 78, 11-16 (1989).
- 8) 高橋孝行, 熊井浩一郎, 石引久弥, 阿部倉彦, 多田隈卓史, 保田立二, *Drug Delivery System* 3, 415-419 (1988).
- 9) T. Suzuki, E. Sato, Y. Matsuda, H. Tada, K. Unno and T. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 1051-1054 (1989).
- 10) B. Lindberg, K. Lote and H. Teder, “Microspheres and drug therapy. Pharmaceutical, Immunological and medical aspects, eds. by S. S. Davis, L. Illum, J. G. Mcvie and E. Tomlinson, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, New York, Oxford, pp. 153-188 (1984).
- 11) S. Fujimoto, M. Miyazaki, F. Endoh, O. Takahashi, K. Okui and Y. Morimoto, *Cancer*, 56, 2404-2410 (1985).
- 12) C. T. Klopp, T. C. Alford, and J. Bateman, *Ann. Surg.*, 132, 811-831 (1950).
- 13) H. R. Bierman, R. L. Byron, E. R. Miller and M. B. Shimkin, *Amer. J. Med.* 8, 535 (1950).
- 14) S. I. Seldinger, *Acta. Radiol.*, 39, 368-378 (1953).
- 15) A. M. Cohen, A. Greenfield, W. C. Wood, A. Waltman, R. Novelline, C. Athanasoulis and N. J. Schaefer, *Cancer*, 51, 2013-2019 (1983).
- 16) T. Kato, R. Nemoto, H. Mori and I. Kumai, *Cancer*, 46, 14-21 (1980).
- 17) 加藤哲郎, 新藤雅章, 癌と化学療法, 9, 357-364 (1982).
- 18) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai and Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 3433-3434, (1977).
- 19) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, and Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 29, 1433-1438 (1981).
- 20) 今野俊光, 前田浩, 横山育三, 岩井顕, 緒方賢治, 田代征記, 上村邦紀, 持永瑞恵, 渡辺栄二, 中熊健一朗, 森永哲夫, 宮内好正, 癌と化学療法, 9, 2005-2015 (1982).
- 21) S. Maki, T. Konno and H. Maeda, *Cancer*, 56, 751-757 (1985).
- 22) R. K. Jain, *Cancer Metastasis Rev.*, 6, 59-593 (1987).

- 23) K. Hori, M. Suzuki, S. Tanda and S. Saito, *Jpn. J. Cancer Res.*, 82, 109-117 (1991).
- 24) マイトマイシンC文献集, 協和醗酵工業株式会社編
- 25) T. Yoshioka, M. Hashida, S. Muranishi and H. Sezaki, *Int. J. Pharmaceut.*, 8, 131-141 (1981).
- 26) L. Illum and S. S. Davis, *J. Parent. Sci. Technol.*, 36, 242-248 (1982).
- 27) F. Leonard, R. K. Kulkarni, G. Brandes, J. Nelson and J. Cameron, *J. Appl. Polym. Sci.*, 10, 259-272 (1966).
- 28) S. Miyazaki, H. Hashiguchi, M. Sugiyama, M. Takada and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 1370-1375 (1985).
- 29) J. H. Eldridge, C. J. Hammond, J. A. Meulbroek, J. K. Staas, R. M. Gilley and T. R. Tice, *J. Controlled Rel.*, 11, 205-214 (1990).
- 30) 久保田美穂, 福島昭二, 中野眞汎, 従二和彦, *Drug Delivery System* 2, 128-133 (1987).
- 31) T. Kato, R. Nemoto, H. Mori and I. Kumai, *J. Urol.*, 125, 19-24 (1981).
- 32) S. Dakhill, W. D. Ensminger, K. Cho, J. Niederhuber, K. Doan and R. Wheeler, *Cancer*, 50, 631-635 (1982).
- 33) J. W. Gyves, W. D. Ensminger, D. Vanharken, J. Niederhuber, P. Stetson and S. Walker, et al., *Clin. Pharmacol. Ther.*, 34, 259-265 (1983).
- 34) K. Juni, J. Ogata, N. Matsui, M. Nakano, T. Ichihara, K. Mori and M. Akagi, *Chem. Pharm. Bull.*, 33, 313-318 (1985).
- 35) Y. Takatsuka and A. Sugitachi, *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 15, 107-114 (1985).
- 36) 高橋孝行, 熊井浩一郎, 石引久弥, *Drug Delivery System* 3, 415-419 (1988).
- 37) U. Scheffel, B. A. Rhodes, T. K. Natarajan and H. N. Wagner, Jr., *J. Nucl. Med.*, 13, 498-503 (1972).
- 38) I. Zolle, H. N. Wagner, Jr., and B. A. Rhodes, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.*, 21, 155-167 (1970).
- 39) B. A. Rhodes and T. F. Bolles, "Radiopharmaceutics," The Society of Nuclear Medicine, Inc., New York, pp. 282-291 (1975).
- 40) J. Szymendera, O. Mioduszezewska, I. Licinska, A. Czarnomska and B. Luska, *J. Nucl. Med.*, 18, 478-482 (1977).
- 41) K. J. Widder and A. E. Senyei, *Pharm. Ther.*, 20, 377-395 (1983).
- 42) B. A. Rhodes, I. Zolle, J. W. Buchanan and H. N. Wagner, Jr., *Radiology*, 92, 1453-1460 (1969).
- 43) Y. Morimoto, M. Akimoto, K. Sugibayashi, T. Nadai and Y. Kato, *Chem. Pharm. Bull.*, 28, 3087-3092 (1980).
- 44) K. Sugibayashi, Y. Morimoto, T. Nadai, A. Hasegawa and T. Arita, *Chem. Pharm. Bull.*, 27, 204-209 (1979).

- 45) W. E. Longs, H. Iwata, T. A. Lindheimer and E. P. Goldberg, *J. Pharm. Sci.*, 71, 1323-1328 (1982).
- 46) M. C. Levy, P. Rambourg, J. Levy and G. Potron, *J. Pharm. Sci.*, 71, 759-762 (1982).
- 47) Y. Morimoto, K. Sugibayashi, M. Okumura and Y. Kato, *J. Pharmacobio Dyn.*, 3, 264-267 (1980).
- 48) R. Nemoto and T. Kato, *Br. J. Urol.*, 53, 225-227 (1981).
- 49) 山田龍作, 徳山博, 佐藤守男, 日本臨床, 46, 増刊号, pp. 342-346 (1988).
- 50) H. N. Langstein, G. M. Doherty, D. L. Fraker, C. M. Buresh and J. A. Norton, *Cancer Res.*, 51, 2302-2306 (1991).
- 51) 高野達哉訳, “リソゾームと細胞機能”, D. ピット著, 講談社サイエンティフィック, pp. 56-104 (1978).
- 52) A. Hixson and J. Crowel, *Ind. Eng. Chem.*, 23, 923 (1931).
- 53) D. J. Burgess and S. S. Davis, *Int. J. Pharmaceut.*, 46, 69-76 (1988).
- 54) Y. Tabata, K. Unno, S. Muramatsu and Y. Ikada, *Jpn. J. Cancer Res.*, 80, 387-393 (1989).
- 55) M. Komatsu, K. Tagawa, M. Kawata and S. Goto, *Chem. Pharm. Bull.*, 31, 262-268 (1983).
- 56) 渡辺寛, 飯塚紀文, 末栴恵一, 行徳素道, *Oncologia*, 20, 105-114 (1987).
- 57) S. Fujimoto, M. Miyazaki, F. Endoh, O. Takahashi, K. Okui, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Cancer Drug Delivery*, 2, 173-181 (1985).
- 58) K. J. Widder, A. E. Senyei and D. F. Ranny, *Adv. Pharmacol. Chemother.*, 16, 213-271 (1979).
- 59) E. Tomlinson, J. J. Burger, E. M. A. Schoonderwoerd and J. G. McVie, Elsevier, Amsterdam, (1984).
- 60) D. J. Burgess, S. S. Davis and E. Tomlinson, *Int. J. Pharmaceut.*, 39, 129-136 (1987).
- 61) P. K. Gupta, C. T. Hung and D. G. Perrier, *Int. J. Pharmaceut.*, 33, 137-146 (1986).
- 62) H. W. Jun and J. W. Lai, *Int. J. Pharmaceut.*, 16, 65-77 (1983).
- 63) N. Willmott, J. Cummings, J. F. B. Stuart and A. T. Florence, *Biopharm. Drug Disp.*, 6, 91-104 (1985).
- 64) R. W. Baker and H. K. Lonsdale, Plenum Press, New York, (1984).
- 65) T. Higuchi, *J. Pharm. Sci.*, 52, 1145-1149 (1963).
- 66) P. Rosin and E. Rammler, *J. Inst. Fuel.*, 7, 29-36 (1933).
- 67) S. T. Gross, A. Hoffman, M. Donbrow and S. Benita, *Int. J. Pharmaceut.*, 29, 213-222 (1986).
- 68) A. Hoffman, M. Donbrow, S. T. Gross, S. Benita and R. Bahat, *Int. J. Pharmaceut.*, 29, 195-211 (1986).

- 69) T. Ishizaka, M. Motojima, S. Kounosu and M. Koishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 34, 3341-3347 (1986).
- 70) Y. Yaacobi, A. A. Israel, R. A. McCluskey and E. P. Goldberg, Proc., 16th Int. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., Chicago, Aug., p.154 (1989).
- 71) “動注がん化学療法－基礎と臨床－” 田口鐵男, 中村仁信監修, 癌と化学療法社, 東京, pp.44-64 (1986).
- 72) H. N. Segall, *Surg. Gynecol. Obstet.*, 37, 152-178 (1923).
- 73) “動注がん化学療法－基礎と臨床－” 田口鐵男, 中村仁信監修, 癌と化学療法社, 東京, pp.91-104 (1986).
- 74) T. Konno, H. Maeda, K. Iwai, S. Tashiro, S. Maki, T. Morinaga, M. Mochinaga, T. Hiraoka and I. Yokoyama, *Eur. J. Cancer. Clin. Oncol.*, 19, 1053-1065 (1983).
- 75) 市村宏子, 癌と化学療法, 2, 605-610, (1975).
- 76) 伊谷賢治, 吉川敏一, 田井中憲三, 内藤裕二, 瀬戸治, 堀田忠弘, 杉野成, 近藤元治, 癌と化学療法, 14, 388-395 (1987).
- 77) 前田浩, 今野俊光, 岩井顕, 牧祥二郎, 田代征記, 癌と化学療法, 11, 814-826 (1984).
- 78) M. A. Gimbrone, Jr. R. S. Cotran, S. B. Leapman and J. Folkman, *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 413-427 (1974).
- 79) R. K. Jain, *Biotechnol. Progr.*, 1, 81-94 (1985).
- 80) L. J. Nugent and R. K. Jain, *Cancer Res.*, 44, 238-244 (1984).
- 81) S. Fukushima, T. Kawaguchi, M. Nishida, K. Juni, Y. Yamashita, M. Takahashi and M. Nakano, *Cancer Res.*, 47, 1930-1934 (1987).
- 82) 柴田淳治, 中園光一, 藤山重俊, 佐藤辰男, 福島昭二, 林良樹, 岸本修一, 中野眞汎, *Drug Delivery System* 3, 431-435 (1987).
- 83) “シスプラチン－その臨床応用－”, 加藤俊, 太田和雄, 新島端夫編, 協和企画通信, (1983).
- 84) 林壮一, 永井真一, フレグランスジャーナル, 12, 82-87 (1974).
- 85) A. Martin, J. Swarbrick, A. Cammarata, eds., “Physical Pharmacy – Physical chemical principles in the pharmaceutical Sciences – Third edition”, Lea & Febiger, Philadelphia, pp.522-543 (1983).
- 86) 高田寛治, *Pharm Tech Japan*, 6, 21-27 (1990).
- 87) Y. Nishikawa, K. Yoshimoto, M. Okabe and F. Fukuoka, *Chem. Pharm. Bull.*, 24, 756-762 (1976).
- 88) Y. Hayashi, S. Fukushima, S. Kishimoto, T. Hirata, Y. Isoda, J. Hirano and M. Nakano, *Yakuzaigaku*, 51, 109-114 (1991).
- 89) 林良樹, 博士論文, (1991).
- 90) 川上朗, 石田修, 鈴木康之, 癌と化学療法, 15, 2787-2792 (1988).
- 91) 日原敏彦, 荒木力, 可知謙治 臨床放射線, 32, 1529-1532 (1987).

- 92) 中村仁信, 橋本勉, 藤田昌英, 大井博道, 井上賢二, 水本正剛, 沢田敏, 高安幸生, 堀信一, 古井滋, 癌と化学療法, 16 Part-II, 2849-2852 (1989).
- 93) 大井博道, 山本忠司, 沢井ユカ, 藤野正興, 岡村純, 中村仁信, 癌と化学療法, 16 Part-II, 2853-2857 (1989).
- 94) 藤田恒夫, 藤田尚男, “標準組織学 各論”, 医学書院, (1981).
- 95) 前田浩, 癌と化学療法, 16, 3323-3331 (1989).
- 96) Y. Yamashita, M. Takahashi, H. Bussaka, S. Fukushima, T. Kawaguchi and M. Nakano, *Cancer*, 64, 2437-2444 (1989).
- 97) T. Kawaguchi, S. Fukushima, Y. Hayashi and M. Nakano, *Cancer Res.*, 48, 4179-4183 (1988).
- 98) H. Suryakusuma and H. W. Jun, *J. Pharm. Pharmacol.*, 36, 493-496 (1984).
- 99) S. Benita and M. Donbrow, *Int. J. Pharmaceut.*, 12, 251-264 (1982).
- 100) “動注がん化学療法—基礎と臨床—” 田口鐵男, 中村仁信監修, 癌と化学療法社, 東京, pp. 257-264 (1986).
- 101) 福島昭二, 西田美香, 渋谷達幸, 財津直寿, 從二和彦, 中野真汎, 山下康行, 仏坂博正, 中川伸正, 宮脇正行, 高橋睦正, 第1回クリニカルファーマシーシンポジウム・講演要旨集, pp. 97-98 (1985).
- 102) 谷口弘毅, 高橋俊雄, 山口俊晴, *Drug Delivery System* 1, 20-25 (1986).
- 103) 今野俊光, 前田浩, 横山育三, 岩井顕, 緒方賢治, 田代征記, 上村邦紀, 持永瑞恵, 渡辺英二, 中熊健一郎, 森永哲夫, 宮内好正, 癌と化学療法, 9, 2005-2015 (1982).
- 104) 福島昭二, 学位論文, (1989).
- 105) P. Rubin, and G. Casarett, *Clin. Radiol.* 17, 220-229 (1966).
- 106) 田中健藏, 福本純, 癌と化学療法, 10, 1564-1568 (1983).
- 107) 福島雅典, 癌と化学療法, 10, 1591-1597 (1983).
- 108) 鈴木磨郎, 堀勝義, 阿部郁夫, 斎藤祥子, 佐藤晴郎: シンポジウムⅢ, 脈管学, 19, 233-236 (1976).
- 109) R. K. Jain, *Cancer Res.*, 47, 3039-3051 (1987).
- 110) P. M. Gullino, F. H. Grantham and S. H. Smith, *Cancer Res.*, 25, 727-731 (1965).
- 111) T. Okagaki, H. Yoshikawa, K. Takada and S. Muranishi, *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 3092-3097 (1988).
- 112) K. Iwai, H. Maeda and T. Konno, *Cancer Res.*, 44, 2115-2121 (1984).
- 113) H. Sato, private data.
- 114) M. C. Levy, P. Rambourg, J. Levy and G. potron, *J. Pharm. Sci.*, 71, 759-762 (1982).
- 115) K. Widder, G. Flouret and A. Senyei, *J. Pharm. Sci.*, 68, 79-82 (1979).
- 116) H. R. Dickinson, A. Hiltner, D. F. Gibbons and J. M. Anderson, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 577-589 (1981).

- 117) J. Wilson, G. H. Pigott, F. J. Schoen and L. L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15, 805-817 (1981).
- 118) W. H. Lawrauel, J. L. Mitchell, W. L. Guess and J. Autian, *J. Pharm. Sci.*, 52, 958-963 (1963).
- 119) “病理組織標本の作り方, 第5版”, 影山圭三, 渡辺陽之輔監修, 医学書院, 東京, pp169-170 (1978).
- 120) “顕微鏡観察の基本”, 井上勤, 横山譲二, 林武彦著, 地人書院, (1982).
- 121) 久野栄進: 金属の化合物Ⅱ; バリウムの塩, 社団法人日本化学会編, 丸善, 8, 630-631 (1977).
- 122) 佐々木憲一, 北爪伸二, 奥平正彦, 臨床検査, 24, 271-279 (1980).
- 123) B. Lindell, K. F. Aronsen, B. Nosslin and U. Rothman, *Annals of Surgery*, 187, 95-99 (1978).
- 124) 藤原弘, 医実報告, 17, 129-139 (1976).
- 125) 市村宏子, 癌と化学療法, 2, 605-610 (1975).
- 126) 古江尚, 太田和雄, 田口鉄男, 藤田浩, 塚越茂, “癌化学療法の基礎と臨床”, 癌と化学療法社, (1977).
- 127) B. R. Duling, *Microvasc. Res.*, 5, 423-429 (1973).
- 128) R. F. Tuma, “Microspheres and drug therapy. Pharmaceutical, Immunological and medical aspectes, eds. by S. S. Davis, L. Illum, J. G. Mcvie and E. Tomlinson, Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, New York, Oxford, pp. 189-203 (1984).
- 129) “染色法のすべて”, 月刊Medical Technology 編, 医歯薬出版, (1980).
- 130) T. L. Loo, and R. L. Dion, *J. Pharm. Sci.*, 54, 809-810 (1965)
Ann. Surg., 148, 616 (1958).
- 131) K. Hosoya, N. Shudo, K. Sugibayashi and Y. Morimoto, *Chem. Pharm. Bull.*, 35, 726-733 (1987).