

担癌動物を用いたシスプラチン含有粘性
オレイン酸エチルの有用性

夏目秀視・今水 賢・杉林堅次・森本雍憲*

Investigation on utility of viscous ethyl oleate containing cis-diamminedichloro platinum(II) in tumor-bearing animals

Antitumor effects of ethyl oleate (EO), Lipiodol Ultra-Fluide® (LP) and viscous ethyl oleate (VEO) containing cis-diamminedichloro platinum(II) (CDDP) on the tumor-bearing animals were investigated. The *in vitro* CDDP release from EO and LP was fast and the total CDDP was released within 24 h.

In contrast, CDDP release from VEO was very slow. When these oily drug carriers were infused into the proper artery of the liver implanted with VX-2 tumor in rabbits, the rank order of the accumulation of CDDP in the tumor site was VEO > LP > EO. However, the inhibition effect of these oily drug carriers on the tumor growth was almost the same. Next, controlled drug release property of the VEO was evaluated by addition of non-ionic surfactants (Tween 80, Span 20 and 80) using the AH 272 ascites in rats.

The *in vitro* CDDP release from the VEO containing the surfactants was faster than that without the surfactants (the extent of suppress was Span 80 > Span 20 > Tween 80). The mean survival (T/C%) of EO-, LP-, VEO containing Tween 80, Span 20 or Span 80-treated groups was 164.5, 179.4, 166.7, 298.6 or 475.4, respectively.

These results suggested that VEO containing non-ionic surfactants was very useful as a bifunctional drug carrier with abilities of "targeting" and "controlled release" for intra-arterial infusion therapy.

Hideshi Natsume・Masaru Imamizu・
Kenji Sugibayashi・Yasunori Morimoto

key words : targeting, controlled release,
viscous ethyl oleate, oily drug carrier,
cis-diamminedichloro platinum(II)

Lipiodol Ultra Fluide® (リピオドール, LP) は、癌部位への選択的滞留性にすぐれた油性の薬物担体として、動脈内注入療法(動注療法)による癌の局所治療に対する有力な武器となっている^{1,2)}。しかしながら、癌組織の特性から考えて、この癌部位への選択的滞留性が、リピオドールに固有の能力であるとはいえ³⁻⁶⁾、他の類縁物質を用いても、同様な効果が期待できる可能性は高い。

LPの造影による視覚的・顕微鏡的研究から、動注初期にLPが選択的に滞留することは、癌新生血管を含む血管内滞留によるだろうと考えられている⁷⁾。したがって、油性物質を薬物担体として動注療法に用いたとき、初期にいかに薬物担体を血管内に滞留させるかが、担体の利用効率を考えるうえでもっとも重要な因子の一つとなる。

そこで筆者らは、LPの元原料に多く含まれているオレイン酸エチル(ethyl oleate, EO)を薬物担体の候補に選び、血管内滞留性を増強する手段として、EO(粘度4 centi poise, cp)に増粘剤としてエチルセルロースを添加した粘性オレイン酸エチル(120 cp viscous ethyl oleate, VEO)を調製し、その有用性を検討してきた^{8,9)}。このVEOは、ラット肝臓を標的組織として、その固有動脈より投与すると、固形薬物担体と同様な血管塞栓能を持ち、しかも、脈管内滞留部位から徐々に組織側に移行する脈管内滞留能の高い¹⁰⁻¹⁴⁾担体であった。また、AH272細胞移植モデル肝癌ラットに対して、VEOを動脈内投与すると、癌局所への集積性が増加し、担体の利用効率および懸濁含有させた制癌剤シスプラチンによる治療効果が大幅に改善された。

本報では、さらにVEOの機能をLP(粘度, 21 cp)と比較し、その結果から、より有効な油性薬物担体の設計を試みた。

* Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University,
1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-02, Japan 城西大
学薬学部製剤学教室

材料と方法

(1) VEO の調製

オレイン酸エチル(東京化成)に適量(5.0 w/w% 前後)のエチルセルロース(東京化成)を加え、油浴中で120°Cに加温、攪拌溶解後、室温まで冷却して製した⁸⁾。ただし、エチルセルロースは、そのロット間で指標粘度にばらつきがあるため(90~120 cp, 5% ethanol toluene solution at 25°C)、いったん上記処方にて120 cp以上の粘性オレイン酸エチルを調製したあと、EOを添加しながら回転粘度計を利用して、120 cpの粘性オレイン酸エチルとした。シスプラチン(日本化薬)は、メノウ乳鉢で微粉化後、攪拌しながら超音波処理し懸濁・分散させた。

(2) 油性製剤からのシスプラチンの放出実験

シスプラチンを含有した各油性製剤 2 ml(0.5~8 mg/ml)および生理食塩水約 15 ml(1 mg/ml)を縦型拡散セル¹⁰⁾の下部に入れたあと、透析膜を挟み攪拌した。このセルの有効表面積は5.72 cm²である。つぎに、上部セルに生理食塩水 10 mlを加えたあと、適当な時間間隔ごとに上側セルより生理食塩水を全量採取し、Pt量を定量した。採取後同量の生理食塩水を入れ実験を続行した。セルは、遮光した恒温槽中で37°Cに保った。Ptの定量は、原子吸光光度法によった。試験した油性製剤のリストを表1に示した。

(3) VX-2 移植肝癌家兎に対する各油性製剤の抗腫瘍効果

約1 mm³のVX-2腫瘍塊を家兎の肝臓に移植2週間目に腫瘍の長径、短径、および厚さを測定し、体積を算出した。つぎに、シスプラチン含有油性製剤(EO, LP, VEO, 5 mg/ml)を家兎1匹当たり0.1 ml、十二指腸動脈から投与した。投与3, 7, 14日後に家兎を屠殺し同様に腫瘍体積を算出した。また、油性製剤投与10 min, 3, 7, 14日後のシスプラチン組織内濃度を測定した。

腫瘍の体積変化は次式に従い算出した。

体積変化

$$= \frac{\text{油性製剤処理後の体積} - \text{処理前の体積}}{\text{処理前の体積}} \times 100$$

(4) AH272 腹水肝癌ラットに対する各油性製剤の抗腫瘍効果

AH272 肝癌細胞1×10⁶個をラットの腹腔に移

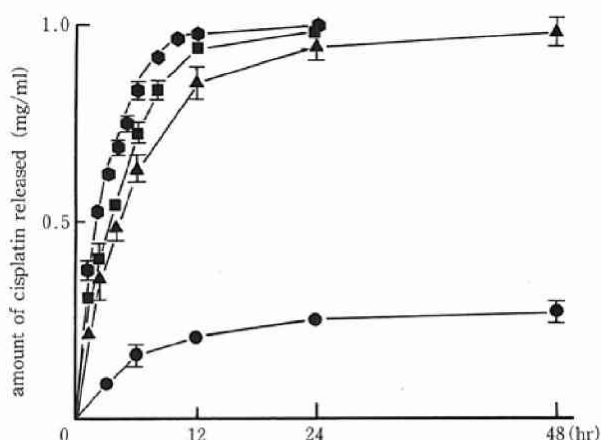


図1 *In vitro* におけるシスプラチン含有油性製剤 (1 mg/ml)からのシスプラチンの放出

○: 0.9% NaCl soln. ■: EO.

▲: LP. ●: VEO (3例ずつ)

植3日目に各シスプラチン含有油性製剤を投与し、生存日数とT/C(%)を求めた。また、油性製剤投与後3日目までの体重変化も同時に測定し、副作用の指標とした。

なお、T/C(%)は次式に従い算出したが、コントロール群(C)は、薬物を含有しないVEO投与群とした。

$$T/C(\%) = \frac{\text{製剤処理群の平均生存日数}}{\text{薬物未処理群の平均生存日数}} \times 100$$

また、体重変化は次式に従い算出した。

体重変化

$$= \frac{\text{製剤処理3日目の体重} - \text{処理前の体重}}{\text{処理前の体重}} \times 100$$

結果と考察

(1) シスプラチンを含有した油性製剤からのシスプラチンの放出

図1にシスプラチンを含有した生理食塩水、EO, LPおよびVEOからのシスプラチンの累積放出曲線を示した。EOおよびLPからのシスプラチンの放出は速く、実験開始24時間までにほぼ全量が放出された。一方、VEOからのシスプラチンの放出はそれらにくらべて遅く、24時間までに全量の約25%が放出されたあと、さらに非常にゆっくりとした速度でシスプラチンが放出された。

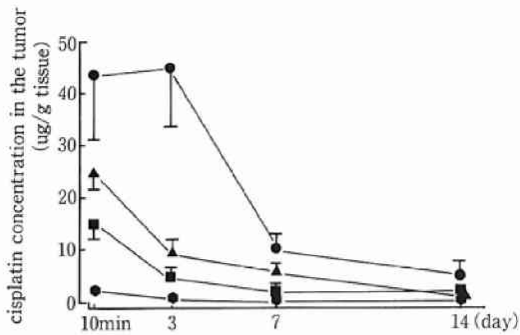


図2 VX-2 細胞移植肝癌家兎にシスプラチン含有油性製剤を動注したときの腫瘍部位のシスプラチン濃度の経時的変化
●: 0.9% NaCl soln. ■: EO
▲: LP. ○: VEO(3~7例)

水溶性や難溶性の制癌剤を、このような油性製剤中に封入し、動注療法に用いる場合の一つの剤形に微粉化懸濁剤が考えられる。この場合、薬物は目的部位で製剤から放出されなければ薬理効果を示さない。試験した EO および LP と VEO からのシスプラチンの放出性は、その懸濁安定性(沈降性)が低いことに依存して極端に異なるため(たとえば、放出試験 24 時間目において、EO や LP のほうが VEO よりシスプラチン放出量が 4 倍多い)、これらの結果より製剤の有用性を評価することはむずかしく、局所でこれら製剤から放出されたシスプラチンの制癌活性を比較することが重要になる。

そこで、シスプラチンの制癌効果を、これらの製剤間で比較するため、VX-2 移植肝癌家兎に投与してその効果を測定した。

(2) VX-2 移植肝癌家兎に対する効果

図2に VX-2 移植肝癌家兎にシスプラチン含有生理食塩水、EO、LP、VEO を動注後の腫瘍内 Pt 量の経時変化を示した。シスプラチンの腫瘍内濃度は、生理食塩水投与群にくらべてどの油性製剤も高かったが、油性製剤間では、VEO>LP>EO の順に高く、特に VEO 投与群では投与 14 日後においても、腫瘍部位にシスプラチンが多量に残存していた。この結果から、油性薬物担体の粘度を高めることで、薬物の腫瘍組織集積性が高まることが示唆された。

図3に、このときの腫瘍体積の経時変化を示し

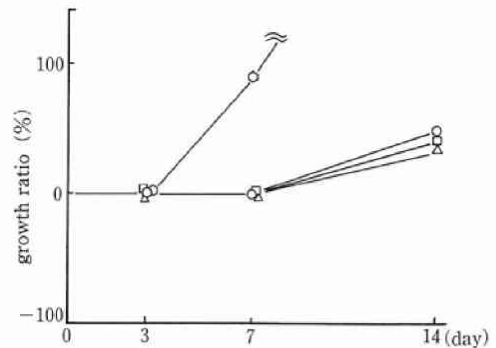


図3 VX-2 細胞移植肝癌家兎にシスプラチン含有性製剤を動注した時の腫瘍の増殖率
○: 0.9% NaCl soln. □: EO.
△: LP. ○: VEO(3~7例)

た。どの油性製剤もシスプラチン含有生理食塩水投与群に比して高い腫瘍増殖抑制効果を示したが、薬物の標的率に差が存在したのにもかかわらず、油性製剤間で有意な差はみられなかった。

また、ここでは示さなかったが、粘性油性製剤投与 14 日後の VX-2 腫瘍部位の断面所見からは生癌細胞組織層の存在がどの製剤投与群においても確認された。シスプラチンの薬理作用は、腫瘍部位における濃度および残存時間の両方に依存するといわれており¹¹⁾、その癌組織残存量は VEO を用いたときももっとも高いので、VEO を投与した場合の見掛けの腫瘍組織内濃度一時間曲線下面積(AUC)は、EO や LP にくらべて大きくなり、VEO は、本来制癌効果がもっとも高くなることが予想される。

EO を用いたとき、シスプラチンの腫瘍部位集積性(標的化)は VEO より小さく(図2)、また、EO や LP からのシスプラチンの *in vitro* 放出は非常に速いにもかかわらず(図1)、これらは、VEO と同等の腫瘍増殖抑制効果を発揮している。

この原因をつぎのように考察した。シスプラチンの *in vitro* 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、どの油性製剤も同じであると考えられる。すなわち、LP および EO では、投与

表 1 今回の実験に使用したシスプラチン含有油性製剤

| 油性製剤 | シスプラチン含量 (mg/ml) | 加えた界面活性剤 (1 w/w%) |
|--------------------------|---------------------|----------------------|
| EO | 1.0 | — |
| LP | 1.0 | — |
| VEO | 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 |

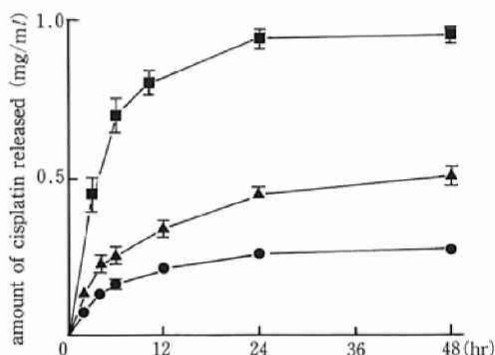


図 5 *In vitro* におけるシスプラチン濃度の異なる T₈₀ VEO からシスプラチンの放出
 ■: T₈₀ VEO-1. ▲: T₈₀ VEO-1/2.
 ●: T₈₀ VEO-1/4 (3例ずつ)

初期に油性製剤から溶出したシスプラチンが薬効に主に関係しており、VEO では、腫瘍組織中に徐々に溶出したシスプラチンが効果を発揮していると考えられる。したがって、薬物担体を VEO とすることでシスプラチンの標的化能が高まったものの、標的化された薬物が安定に VEO 中に懸濁・含有されているため、血管中に残存しているシスプラチンが有効に利用されていないことが考えられた。

それゆえ、VEO により標的化された薬物を有効に利用するためには、EO や LP のように、標的化初期に有効量のシスプラチンが溶出し、その後徐々に薬物が放出されるほうが望ましいと思われる。そこでつぎに、油性製剤の薬物放出制御製剤としての機能設計を検討した。

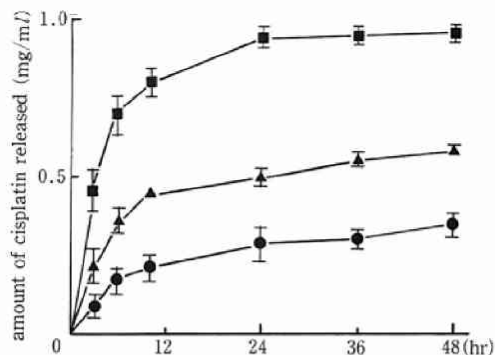


図 4 *In vitro* における非イオン性界面活性剤を含有した VEO (1 w/w%) からシスプラチンの放出に対する非イオン性界面活性剤の添加効果
 ■: T₈₀ VEO-1. ▲: S₂₀ VEO-1.
 ●: S₈₀ VEO-1 (3例ずつ)

(3) 非イオン性界面活性剤を含有した VEO からシスプラチン放出性の改善とその AH 272 細胞移植腹水癌ラットに対する抗腫瘍効果

VEO に薬物放出制御能をもたせる手段として、1%の非イオン性界面活性剤を VEO 中に添加した(表 1 参照)。図 4 に種々非イオン性界面活性剤を含有する VEO からシスプラチンの累積放出曲線を示した。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、薬物放出速度は速くなった。Tween 80 を添加した T₈₀VEO-1 から放出速度は図 1 に示した EO および LP から放出速度よりは若干遅いものの、24 時間までに全量が放出された。Span 20 を含有した S₂₀VEO-1 および Span 80 を含有した S₈₀VEO-1 から 24 時間までの放出量は、T₈₀VEO-1 のそれぞれ 1/2 および 1/4 であり、24 時間後も徐々にシスプラチンが放出された。

この結果は、非イオン性界面活性剤の添加により、VEO から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。

T₈₀VEO-1 からシスプラチンの放出速度が、EO や LP のそれとほぼ同様であることから、T₈₀VEO を用い *in vitro* で 24 時間までに放出された薬物量と AH272 腹水癌ラットに対する抗腫瘍効果との関連性を調べた。図 5 に T₈₀VEO-1 からシスプラチンの累積放出曲線とシスプラチン含有

表 2 AH272 腹水癌ラットの延命に対するシスプラチンを含有した油性製剤の効果

| 油性製剤 | 薬物量 ($\mu\text{g}/\text{ラット}$) | ラット数 | 体重変化 (%) | 平均生存日数 (日 \pm SE) | T/C (%) |
|-------------------------|-------------------------------------|------|-------------|------------------------|------------|
| a | | | | | |
| VEO 単独 | 0 | 19 | 8.7 | 6.90 \pm 0.25 | |
| 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 |
| T ₈₀ VEO-1 | 100 | 7 | 12.8 | 11.56 \pm 1.38 | 166.7 |
| EO | 100 | 6 | 12.5 | 11.35 \pm 1.25 | 164.5 |
| LP | 100 | 8 | 12.3 | 12.38 \pm 1.44 | 179.4 |
| b | | | | | |
| 生理食塩水 | 400 | 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 |

量が、その 1/2 および 1/4 である T₈₀ VEO-1/2 と T₈₀ VEO-1/4 からのシスプラチン累積放出曲線を示した(表 1 参照). 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様であった.

表 2 a に、これらの油性製剤を AH272 腹水癌ラットに腹腔内投与したときの延命効果を示した. これら油性製剤のうち、含有シスプラチン量が 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ である T₈₀ VEO-1 投与群の延命効果が比較的高かった(T/C%=166.7). また、T₈₀ VEO-1 と同量のシスプラチンを含有する EO (T/C%=164.5) および LP 投与群(T/C%=179.4)でもほぼ同様の延命効果を示した.

これらの結果より、T₈₀ VEO 投与群中、T₈₀ VEO-1 投与群がもっとも高い延命効果を示したので、初期有効量をラット 1 匹当たりシスプラチン 100 μg とし、S₂₀ VEO-2、および S₈₀ VEO-4 を用いて(表 1 参照)、シスプラチンの 24 時間目までの薬物放出量を T₈₀ VEO-1、EO および LP とほぼ等しくして、24 時間目以降に放出される薬物と抗腫瘍効果の関連性について検討した.

図 6 に T₈₀ VEO-1、S₂₀ VEO-2、および S₈₀ VEO-4 からのシスプラチンの累積放出曲線を示した. これらの油性製剤からの 24 時間目までのシスプラチン放出量はほぼ等しく、その後、薬物含有量の多い S₈₀ VEO-4、S₂₀ VEO-2 の順にシスプラチンが放出された.

表 2 b に、これら油性製剤投与後の延命効果を示した. S₂₀ VEO-2、および S₈₀ VEO-4 投与群に

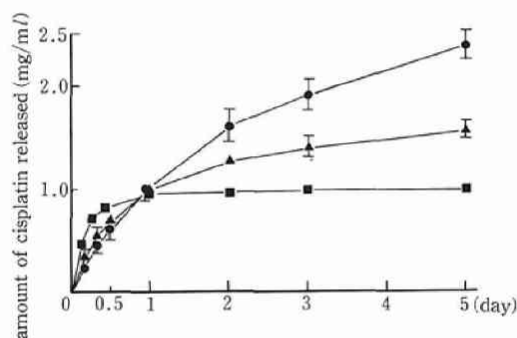


図 6 *In vitro* におけるシスプラチン濃度の異なる T₈₀ VEO からのシスプラチンの放出
 ■ : T₈₀ VEO-1. ▲ : S₂₀ VEO-2
 ● : S₈₀ VEO-4 (3 例ずつ)

おける T/C% はそれぞれ 298.6 および 475.4 であり、高い抗腫瘍効果を示した. 一方、S₈₀ 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では、T/C% が 225.7 とかなり高い値を得たが、その値は S₈₀ VEO-4 投与群に比較して小さく、また、副作用の指標としたラットの体重は溶液投与 3 日目まで増加せず副作用の可能性が考えられた. したがって、S₂₀ VEO-2 と S₈₀ VEO-4 は、ラット腹腔を局所と仮定したとき、その部位におけるシスプラチンの利用効率が高い薬物放出制御製剤であると思われた.

まとめ

スチレン-マイレン酸共重合体と制癌剤ネオカルチノスタチンとの結合したプロドラッグであ

る, SMANCS をはじめとする脂溶性制癌剤を含有した LP の臨床成績はきわめて高く^{2,12)}, LP は癌組織滞留性のすぐれた油性薬物担体として考えられている。しかしながら, LP の癌部位標的性は, 特に, 担体投与初期においては, 癌組織の血管特性に負うところが大きいと考えられており, 血管特性に支配されずに標的化できる薬物担体が必要である。今回, VEO を用いて研究した結果, 担体の粘度を増加させることにより, 血管塞栓を伴う脈管滞留性が増加し, 制癌剤の腫瘍部位への標的化を成し遂げることができた。

ここで, 標的化された制癌剤の利用効率を考えてみると, LP の臨床結果^{2,12)}より, 投与された脂溶性の制癌剤が定性的には有効に利用されていることが推測される。それは, ① 脂溶性制癌剤の油性薬物担体/組織液間の分配性が低いため, 脈管中で油性薬物担体からの制癌剤の放出量が少ないこと, および② 油性薬物担体が脂溶性の制癌剤を含有した状態で脈管外に移動すること, に起因すると考えられる。

②の可能性は, ラット正常肝組織を標的部位として行った筆者らの実験結果⁹⁾から, 油性薬物担体は血管側から組織側に移行する際, 実質細胞に多く取り込まれることが示されていることより支持されるものと考えられる。

このことから, 脂溶性制癌剤の場合は, 癌細胞中に担体と一緒に取り込まれる可能性が大きく, たとえ制癌剤が放出されなくても制癌剤の利用効率は高いと思われる。しかし, シスプラチンのような難溶性の制癌剤や水溶性制癌剤で, しかも油性薬物担体中に微粉化懸濁させる場合には, その状態で癌細胞に取り込まれるとは考えにくく, 癌周辺の血管を含む組織に標的化された薬物は担体から放出されなければならない。すなわち, 担体からの薬物放出性が抗腫瘍効果を左右すると考えられる。

今回調製した VEO 中, S₉₀VEO-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有効に作用したことは, ラット腹腔を局所と仮定したときももっとも有効であったことより明らかである。

これらの結果が, 局所固型癌にそのまま当てはまるとはいえないが, VEO 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を(少なくともシスプラチン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によって, 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。

以上の結果より, VEO は, 脂溶性制癌剤だけでなく, 比較的多量の水溶性制癌剤をも含有することが出来る標的性を有した担体として作用することが明らかとなった。

文 献

- 1) Fukushima, S., Kawaguchi, T., Nishida, M., Juni, K., Yamashita, Y., Takahashi, Y., Nakano, M.: Selective anticancer effect of 3,5-dioctanoyl-5-fluoro-2-deoxyuridine (FdUrd-C8), a lipophilic prodrug of 5-fluoro-2-deoxyuridine (FdUrd), dissolved in an oily lymphographic agent on hepatic cancer of rabbit bearing VX-2 tumor. *Cancer Res.* 47: 1930-1934, 1987.
- 2) 今野俊光: Lipiodol をキャリアーとする選択的癌局所療法—その応用と原理—. 図説臨床[癌]シリーズ, No. 31, 癌の新しい局所治療. (山村雄一, 杉村 隆・監修), メジカルビュー社, 1990, p 98-107.
- 3) Gimbrone, Jr. M. A., Cotran, R. S., Leapman, S. B., Folkman, J.: Tumor growth and neovascularization: An experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* 52: 413-427, 1974.
- 4) Jain, R. K.: Transport of macromolecules in tumor microcirculation. *Biotechnol. Progr.* 1: 81-94, 1985.
- 5) Gullino, P. M., Grantham, F. H., Smith, S. H.: The interstitial water space of tumors. *Cancer Res.* 25: 727-731, 1965.
- 6) Rubin, P., Casarett, G.: Microcirculation of tumors part I: Anatomy, function and necrosis. *Clin. Radiol.* 17: 220-229, 1966.
- 7) 前田 浩: 油性抗癌剤(スマンクス/リピオドール)の選択的抗癌効果について. 癌と化学療法 16: 3323-3332, 1989.
- 8) 夏目秀視, 杉林堅次, 森本雅憲: シスプラチン含有オレイン酸エチル懸濁液の調製と癌化学療法への応用. 日本薬学会第 108 年会, 講演要旨集(広島), 1988, p 551.
- 9) 今水 賢, 夏目秀視, 杉林堅次, 森本雅憲: 化学塞栓剤としての CDDP 含有エチルオレエートの評価. 第 33 回日本薬学会関東支部大会(東京), 講演要旨集, 1989, p. 46.
- 10) Hosoya, K., Shudo, N., Sugibayashi, K., Morimoto, Y.: Effect of Azone on the percutaneous absorption of 5-fluorouracil from gels in hairless rats. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 726-733, 1987.
- 11) 加藤 俊, 太田和雄, 新島端夫・編: シスプラチン—そ

- の臨床応用— 協和企画通信, 1983.
- 12) Yamashita, Y., Takahashi, M., Bussaka, H., Fukushima, S., Kawaguchi, T., Nakano, M. : Intraarterial infusion of 5-fluoro-2-deoxyuridine-C8 dissolved in a lymphographic agent in malignant liver tumors. A preliminary report. *Cancer* 64 : 2437-2444, 1989.