

シスプラチン含有多相エマルションの腎毒性に関する研究

金 一^{*1,2)}, 川口健夫・従二和彦^{*2)}, 李 凤龍^{*1)}

Reduced nephrotoxicity of cisplatin in multiple-phase emulsion

Cisplatin is an anticancer drug with broad-spectrum, that is especially effective against genito-urinary tumors. But it shows serious toxicity in kidney and gastrointestinal tract in clinical use. In order to decrease nephrotoxicity of cisplatin, several approaches have been done, such as : (1) Change of administration route and combination therapy with other drugs ; (2) Development of new derivatives ; (3) Novel dosage form (design of DDS forms) ; etc.

In this paper, preparation of multiple-phase emulsion containing cisplatin and its combination therapy in mouse will be presented. The physico-chemical properties and nephrotoxicity of the emulsion were also investigated.

Yi Jin^{*1,2)}, Takeo Kawaguchi · Kazuhiko Junii^{*2)}, Fenglong Li^{*1)}

key words : cisplatin, multiple-phase emulsion, nephrotoxicity, sodium selenite

シスプラチンは生殖器、泌尿器系の睾丸腫瘍、卵巣癌、膀胱癌などにすぐれた効果があり、臨床で高い有用性が示されている。しかし、腎毒性、恶心、嘔吐、神経毒性などの副作用もあり、特に腎毒性は投与量に対する大きな制限因子となっている¹⁾。これらの問題を解決するために、(1)投与方法の変更、併用薬の使用、(2)新規誘導体の開発、(3)剤形修飾(DDS 製剤の開発)などがおもに行われている。

本研究では、シスプラチンの毒性を軽減しうる併用薬を含有する DDS としての多相エマルションの有用性を明らかにすることを目的として検討を行った。

材料と方法

(1) 材 料

シスプラチンは Jin Zhou Pharmaceutical, Ind.(China)のものを使用した。亜セレン酸ナトリウムと硫酸銅は Bei Jing Chemical Ind.(China)のものを、チオ硫酸ナトリウムは Chang Chun Chemical Ind.(China)のものを、有機ゲルマニウム(carboxyethyl germanium sesquioxide)は Yan Bian Medical College of Pharmaceutical Ind.(China)のものを使用し、卵黄レシチンは Shen Yang College of Pharmacy Pharm. Ind. (China)のものを、Span-80 は Tyan Jing Chemical Ind.(China)のものを、SO-15 および HCO-60 は Nikko Chemical Ind.(Japan)のものを使用した。

(2) シスプラチンの致死量測定による併用薬のスクリーニング²⁾

亜セレン酸ナトリウム、硫酸銅、チオ硫酸ナトリウム、有機ゲルマニウムの一定量と、シスプラチンとの併用によるシスプラチン致死量の比較を行った。マウス(体重 18~24 g, 1 群 4 匹)の腹腔内に各併用量を投与後、3 日間までの死亡数の観察から、シスプラチン最大耐量および最小致死量を決定し、併用薬によるシスプラチンの毒性軽減効果を比較した。

(3) 併用薬投与時のシスプラチン LD₅₀ 値の測定²⁾

有機ゲルマニウムあるいは亜セレン酸ナトリウムの一定量と、シスプラチンとの併用時におけるシスプラチンの LD₅₀ 値を、マウス(18~24 g, 1 群 10 匹)に腹腔内投与後 3 日間までの死亡数の観察から求めた。後述の多相エマルションについても同様に行った。

(4) W/O/W 型多相エマルションの調製³⁾

乳化剤として卵黄レシチン、Span-80 および SO-15 を含むゴマ油中に、シスプラチン粒子とそ

*¹⁾ Faculty of Pharmaceutical Science, Yanbian Medical College, China 中國吉林省延辺医学院藥学部

*²⁾ Faculty of Pharmaceutical Science Josai University, Japan 城西大学藥学部藥剤学教室

表 1 Comparision of maximal tolerated and minimal lethal doses of cisplatin under administration of concomitant drug in mice

| No | concomitant drug (dose, mg/kg) | cisplatin(mg/kg) | |
|----|-----------------------------------|------------------------|---------------------|
| | | maximal tolerated dose | minimal lethal dose |
| 1 | sodium selenite (3) | 100 | 30 |
| 2 | copper sulfate (10) | 15 | 10 |
| 3 | sodium thiosulfate (400) | 80 | 40 |
| 4 | organic germanium (100) | 75 | 35 |

表 2 LD₅₀ of cisplatin combined with or without organic germanium or sodium selenite

| No | concomitant drug (dose, mg/kg) | formulation | LD ₅₀ of cisplatin(mg/kg) (95% confidence limit) |
|----|-----------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------------|
| 1 | none | aqueous soln. | 12.45 |
| 2 | sodium selenite (3) | aqueous soln. | 37.26(32.79~41.73) |
| 3 | organic germanium (100) | aqueous soln. | 35.40(30.65~40.15) |
| 4 | none | W/O/W emulsion | 36.35 |
| 5 | sodium selenite (3) | W/O/W emulsion | 61.41(53.73~69.09) |

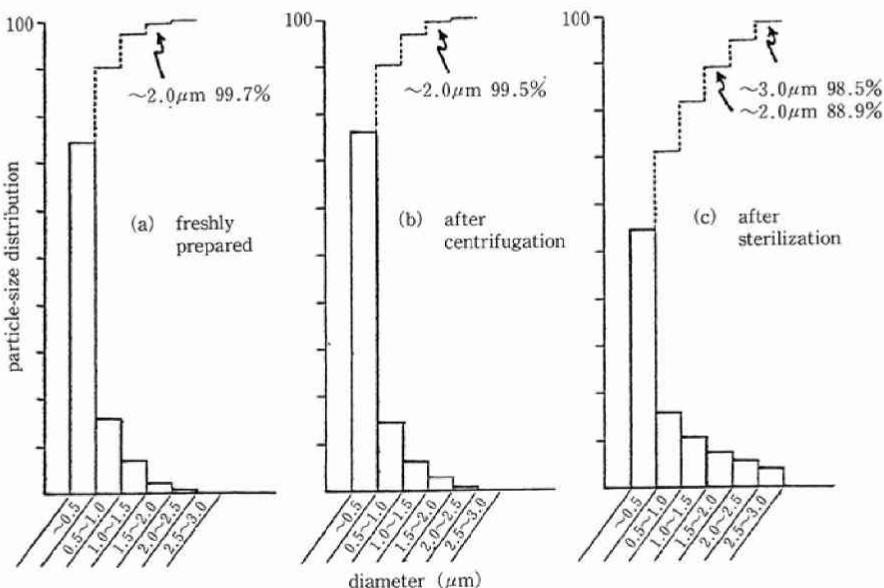


図 1 Particle-size distribution patterns of multiple emulsion containing cisplatin and sodium selenite

の分散安定化剤としてのポビドン、および併用薬の亜セレン酸ナトリウムまたは有機ゲルマニウムを含む水溶液を加え、超音波照射により 1 次乳化を行い、さらにこの W/O 型エマルションを、HCO-60 を含む水中に加え、超音波照射により 2

次乳化を行い、W/O/W 型多相エマルションを調製した。

(5) 多相エマルションの物理化学的性質の測定

物理的安定性：つぎの条件下でのエマルション

表 3 Inhibition for tumor growth by cisplatin(i.p.) in aqueous solution and W/O/W type multiple emulsion containing sodium selenite in mice bearing S180 sarcoma (i.p.)

| drugs ^{*1)} | animal start | animal end | body weight change ^{*2)} | mean tumor weight±SE(g) ^{*2)} | inhibition rate(%) ^{*3)} | P |
|----------------------|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|--------------|
| r n 1 | normal saline(control) | 10 | 8 | +2.23 | 1.915±0.106 | |
| | cisplatin+sodium selenite aq. soln. | 10 | 3 | -3.47 | 0.567±0.379 | 70.45 <0.001 |
| | cisplatin+sodium selenite(W/O/W) | 10 | 10 | +0.83 | 0.243±0.379 | 87.34 <0.001 |
| r n 2 | normal saline(control) | 10 | 7 | +2.61 | 1.914±0.901 | |
| | cisplatin+sodium selenite aq. soln. | 10 | 3 | -3.37 | 0.633±0.513 | 66.93 <0.01 |
| | cisplatin+sodium selenite(W/O/W) | 10 | 10 | +1.38 | 0.264±0.429 | 86.21 <0.001 |

*1) : dose : cisplatin(2 mg/kg)+sodium selenite(3 mg/kg)/day×6 days

*2) : on the 5th day after the final administration

*3) : inhibition rate on the basis of mean tumor weight : $\frac{(\text{control}-\text{treated})}{\text{control}} \times 100$

表 4 BUN and blood creatinine levels in rabbits following i.p. administration of cisplatin with or without sodium selenite

| drug | formulation | BUN (mg/dl) mean±SE(n=4) | creatinine(mg/dl) mean±SE(n=4) |
|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-----------------------------------|
| cisplatin | aq. soln. | 33.78±1.26** | 3.97±0.90** |
| cisplatin+sodium selenite | aq. soln. | 23.79±1.95** | 2.25±1.51* |
| cisplatin | W/O/W | 18.82±3.18* | 3.40±1.27* |
| cisplatin+sodium selenite | W/O/W | 19.03±1.47* | 2.85±0.05* |
| normal saline soln(control) | | 17.98±0.98 | 2.58±1.05 |

dose : cisplatin(4 mg/kg), sodium selenite(3 mg/kg)

* : P<0.05. ** : P<0.05

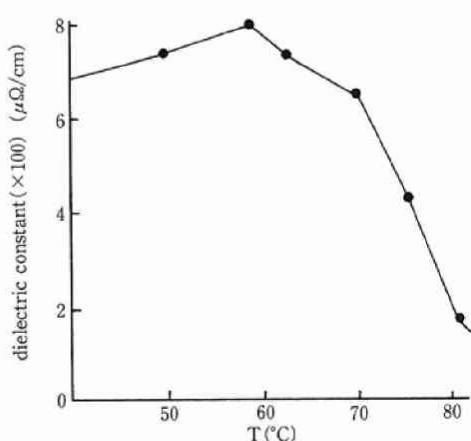


図 2 Dielectric constant vs temperature of multiple emulsion containing cisplatin and sodium selenite

の安定性を、肉眼による相分離の観察および一部コールターカウンターによる粒度分布測定を行い評価した。① 4,000 rpm, 15 分間遠心, ② 冷凍, 1 カ月保存後に解凍, ③ 45°C, 2 カ月保存, ④ 0 °C以下で 12 時間保存し、さらに 35°Cで 12 時間保持を 10 回繰り返し, ⑤ 室温, 8 カ月放置, ⑥ 115°Cで 30 分間滅菌操作。

相転移温度の測定：エマルションを水浴中に保持し、徐々に温度を上昇させながら、エマルションの誘電率の測定を行い、相転移温度(PIT)を求めた。

(6) 抗腫瘍効果の測定²⁾

マウス肉腫 S180 を前肢腹部皮下に移植したマウス(18~24 g, 1 群 10 匹)に、24 時間後より 1 日 1 回、6 日間にわたり、① (シスプラチナ+亜セレン酸ナトリウム)含有液、② (シスプラチナ+亜セレン酸ナトリウム)含有多相エマルション、

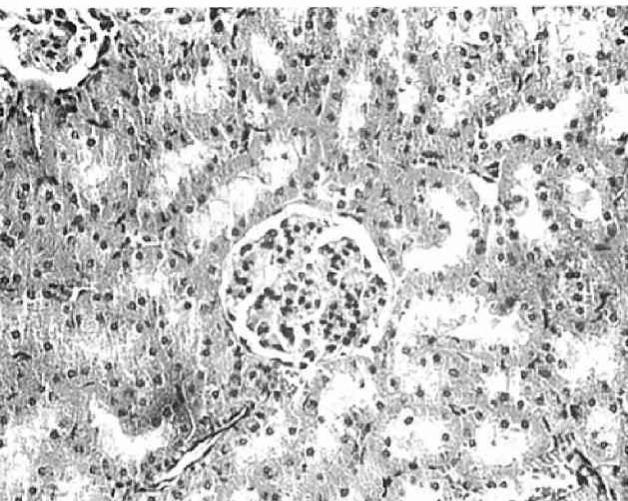


図 3 control group : cortex normal tissue

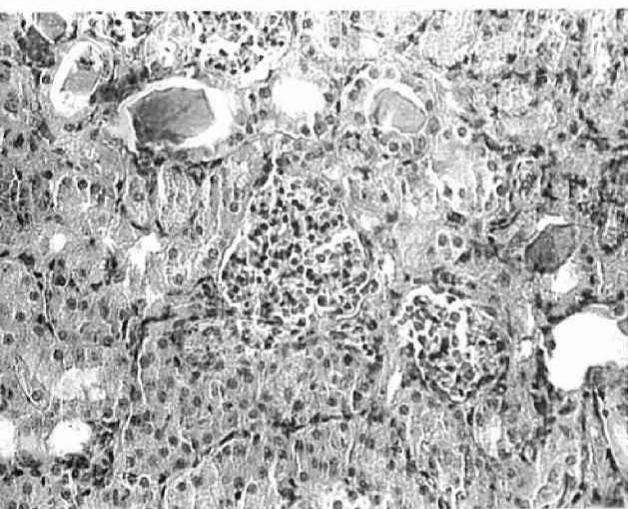


図 4 Cisplatin aq. soln. group : glomerular dilatation hyperemia, and proximal convoluted tubule granule degeneration are evident

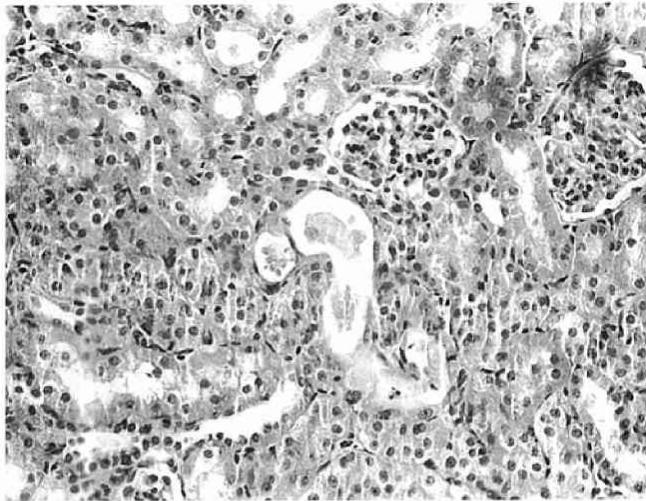


図 5 (cisplatin+sodium selenite aq. soln.) group : formation of small hyaline cast is evident

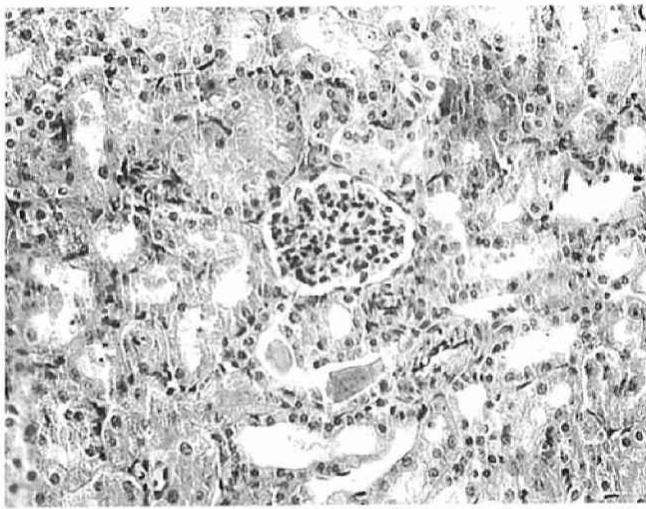


図 6 (cisplatin + sodium selenite) multiple emulsion group : hyaline cast formation is negligible

③ 対照として生理食塩液を皮下投与した。最終投与の5日後にマウス体重、腫瘍重量を測定し、対照群との比較から腫瘍増殖抑制率を算出した。

(7) シスプラチンの腎毒性の評価^{4,5)}

ウサギ(体重2.0~2.5kg, 1群2匹)を用いて、シスプラチニンの腎毒性に対する亜セレン酸ナトリウム併用および多相エマルション適用の効果を、腹腔内投与後5日目における血中尿素窒素(BUN)および血中クレアチニン濃度の測定値を

指標として評価した。さらに腎臓を摘出後、10%ホルマリン溶液中にて固定し、調製した切片の顕微鏡観察より組織学的に毒性を観察した。

結果と考察

(1) 併用薬投与時のシスプラチニンの致死量とLD₅₀値の測定

併用薬使用時のシスプラチニンの最大耐量、最小致死量を表1に示した。これらの結果から、No1.

3 および 4 の併用が候補として考えられたが、チオ硫酸ナトリウムはシスプラチンとの同時併用においてキレート剤として作用するから、シスプラチンと結合するとただちにその作用は失活する、すなわち、毒性も抗癌作用もなくなると考えられるため⁶⁾、以後の検討には亜セレン酸ナトリウムと有機ゲルマニウムを用いることとした。また、選択された 2 種の薬物の併用時の、シスプラチンの LD₅₀ 値を表 2 に示した。シスプラチンは亜セレン酸ナトリウムあるいは有機ゲルマニウムと同時に併用投与することにより毒性が減少することが明らかとなった。この効果はシスプラチンを単独で多相エマルション中に封入させた場合と同程度であったが、併用薬、シスプラチンをともに多相エマルション中に含有させることで、さらに強い毒性軽減効果が得られることが明らかになった。

(2) 多相エマルションの安定性と物性

種々の保存条件下において、シスプラチンと亜セレン酸ナトリウムを含有した多相エマルションは、肉眼観察では明らかな相分離は観察されず、比較的安定であると思われた。

図 1 に遠心あるいは滅菌操作の影響を粒度分布の比較で示した。4,000 rpm, 15 分の遠心操作ではほとんど影響がなく、99.5%以上が 2 μm 以下であった。滅菌操作により軽度の粒子径増大が観察された。なお、有機ゲルマニウムを共存させて調製した多相エマルションは肉眼観察の結果、亜セレン酸ナトリウムを含有させたものと比較して不安定であった。

図 2 に亜セレン酸ナトリウムを共存させて調製した多相エマルションの温度に対する誘電率の変化を示す。この結果より、相転移温度は約 60°C であることが認められた。

(3) 抗腫瘍効果と腎毒性の製剤間での比較

S180 肉腫を皮下に移植したマウスにおける抗腫瘍効果の実験結果を表 3 に示した。亜セレン酸ナトリウムを併用した液剤の投与群では、生存したマウスにおいては高い抗腫瘍効果がみられたものの、予想に反してかなりの毒性が認められた。

一方、併用薬とともに多相エマルション中にシ

スプラチンを含有させた製剤では、死亡例はなく、さらに高い抗腫瘍効果が得られた。多相エマルション化により癌部位への薬物の集積性が高まるとともに、正常細胞への薬物分布が減少した結果と考えられ、その有用性が示された。表 4 にはウサギにシスプラチンを腹腔内投与後の血中尿素窒素(BUN)とクレアチニン濃度を示した。この結果より、亜セレン酸ナトリウムの併用あるいは多相エマルションを用いることが、シスプラチンの腎毒性軽減に対して有効であることが明らかとなった。さらに摘出した腎臓組織切片の顕微鏡観察では、図 3～6 に示したようにシスプラチン単独の液剤投与時には腎臓組織の変形、変性がいちじるしいのに対し、シスプラチンと併用薬を含む多相エマルションではこれらの現象はほとんど観察されなかった。

今回、筆者らは、シスプラチンの毒性低減効果から併用薬として選択した亜セレン酸ナトリウムをシスプラチンとともに含有する、物理的に安定な W/O/W 型多相エマルション製剤を調製した。この製剤はマウスにおける毒性、抗腫瘍効果、またウサギにおける腎毒性の実験結果から、シスプラチンの高い抗腫瘍効果と同時に腎毒性の抑制を得るうえすぐれた製剤であると考えられる。

本研究の要旨は第 9 回日本 DDS 学会(京都)で発表した。

文 献

- 1) 杉田教文：白金制癌剤の最近の動向、化学の領域 35(9) : 654-657, 1987.
- 2) 徐淑云：LD₅₀ の測定方法、薬理学実験方法学、人民衛生出版社、北京、1986, p 1115.
- 3) 李水林, 金 一, 李鳳龍: Study on Cisplatin Multiple-Phase Emulsion as an Anticarcinogen. 延辺医学院学報 13(9) : 182-186, 1990.
- 4) 王利文: Nephrotoxicity of Cisplatin. 中国薬理学報 8 (2) : 166-167, 1987.
- 5) 南京中医学院主編: 生物化学実験、広西科学技術出版社、1988, p 66-69.
- 6) 佐々木常雄: シスプラチンの有害作用軽減、医学のあゆみ 164(5) : 367-370, 1993.