

塞栓能を有する油性薬物担体に
関する基礎的研究



研究課題番号62570971

昭和63年度科学研究費補助金 一般研究(C)

研究成果報告書

平成元年3月

研究代表者 杉林 堅次

(城西大学薬学部講師)



研究組織

研究代表者：杉林 堅次（城西大学薬学部講師）

研究分担者：従二 和彦（城西大学薬学部助教授）

研究分担者：夏目 秀視（城西大学薬学部助手）

研究分担者：畑中 朋美（城西大学薬学部助手）

研究経費

昭和62年度	1200千円
昭和63年度	600千円
計	1800千円

研究発表

（1）学会誌

夏目秀視ら，植物油の化学的塞栓材料としての評価に関する基礎的研究，Drug Delivery System, 1 (1986) .

夏目秀視ら，癌化学療法における油性薬物担体の有用性に関する研究，Drug Delivery System, 2 (1987) .

（2）口頭発表

夏目秀視ら，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（1988）.

はしがき

Transcatheter techniquesの進歩に伴い動脈内注入療法に薬物担体を利用した多くの試みが行われている^{1~5)}。特に、加藤ら⁶⁾が行なった“Chemoembolization”は、固型薬物担体を塞栓材料として利用し動脈塞栓による癌細胞への栄養補給ルートの遮断と含有させた薬物の癌局所への集中化、徐放化によりTherapeutic Indexを高めようとするもので、腎癌や肝癌において高い臨床効果を得ている。我々も塞栓材料としてマイトマイシンC含有アルブミン小球体を用い、動脈内投与して高い抗腫瘍効果が得られたことを報告している⁷⁾。

一方、今野ら⁸⁾は、油性リンパ管造影剤(Lipiodol Ultrafluid^R、以下Lipiodolと略称、略記)が、正常肝組織からの消失が速いのに比して癌組織からの消失が非常に遅いという利点に着目し、これを薬物担体として高分子化制癌剤SMANCS(スチレン・マレイン酸無水物の共重合体にネオカルチノスタチンを結合させた)を含有させ肝動注し高い臨床効果を得ている。このLipiodolの滞留性の増加の要因は、癌組織の特徴、すなわち癌新生血管の脂溶性物質の透過亢進、リンパ管の欠除による脂溶性物質除去能の低下や細胞間質中への脂溶性物質の取り込みの増大、さらに肝動脈が不連続性の血管系であることによる癌組織への脂溶性物質の流入の増加等によると考えられる^{9~14)}。

目次

第1章 粘性油性薬物担体の調製とそのレオロジー	・・・ 1
第1節 粘性油性薬物担体の調製	・・・ 1
第2節 粘性油性薬物担体のレオロジー	・・・ 2
第2章 粘性油性薬物担体の組織滞留性及び脈管内挙動	・・・ 4
第1節 粘性油性薬物担体の組織滞留性	・・・ 4
第2節 アンギオグラムによる塞栓の観察とハムスター 頬袋を用いた脈管内挙動の視覚的観察	・・・ 7
第3節 油性薬物担体の肝動脈内投与後の安全性	・・・ 11
第3章 油性薬物担体からの薬物の放出性	・・・ 15
第1節 semustine 含有油性薬物担体からのsemustine 放出	・・・ 15
第2節 cisplatin 含有油性薬物担体からのcisplatin 放出	・・・ 17

第 1 章 粘性油性薬物担体の調製と そのレオロジー

第 1 節 粘性油性薬物担体の調製

Chart 1 に粘性油性薬物担体の調製法を示した。増粘剤としては、ステアリン酸アルミニウム（モノ）及びエチルセルロース（90~110cp，5% Ethanol + Toluene Soln. at 25°C）を用いた。ステアリン酸アルミニウムは、化粧品原料基準に記載され、経口的に無害とされている。また、エチルセルロースも化学塞栓療法のカプセル基剤として使用されており、比較的安全であると考えられる。Chart 1 に示した方法は、比較的簡便であり、調製2~3日後に増粘剤とオレイン酸またはオレイン酸エチルの分離が見られるが、攪拌や適度の加温で容易に元に戻る。

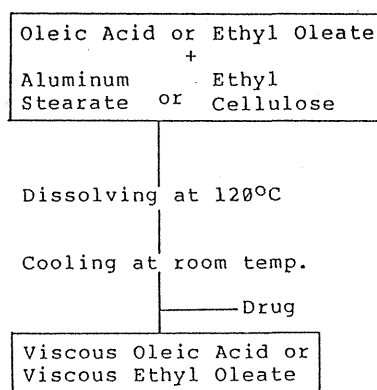


Chart 1 Procedure for Preparing Viscous Oleic Acid or Viscous Ethyl Oleate containing Antitumor Drug

第2節 油性薬物担体のレオロジー

増粘剤のような溶質を溶媒に添加するとそのレオロジーは様々に変化する場合が多い。従って、レオロジー変化の著しい製剤は、粘度の影響を試験する上でその基準を決めにくい。そこで粘性油性薬物担体の粘度の経時的変化について検討した。Fig. 2 にずり速度に対する粘度変化の典型的な例を示した。粘度の測定は、回転粘度計 (Rotovisco RV100/CV100 HAKKE West Germany) を用いて行った。オレイン酸もオレイン酸エチルもそれ自体はニュートン流動を示すが (それぞれ15cp及び4cp)、増粘剤の添加で非ニュートン流動を示した。ステアリン酸アルミニウムを添加した粘性オレイン酸の場合レオペクシーを示し、ステアリン酸アルミニウム又はエチルセルロースを添加した粘性オレイン酸エチルの場合チキソトロピーを示した。これらのうち、ステアリン酸アルミニウムを添加したオレイン酸エチルのずり速度の変化に対する粘度変化は著しく (Fig. 2)、ずり速度を一定とし粘度の経時的変化を観察しても経時的変化は大きかった。一方、ステアリン酸アルミニウムを添加したオレイン酸及びエチルセルロースを添加したオレイン酸エチルではその変化の差は小さかった。また、これらの粘度は増粘剤の添加濃度により様々に変えることができた。

このように増粘剤添加時の油性薬物担体のレオロジーは非ニュートン

流動を示すが、ステアリン酸アルミニウム添加時のオレイン酸及びエチルセルロース添加時のオレイン酸エチルでは、粘度変化が余り大きくないので以後の実験に利用した。但し、ずり速度を一定として粘度を測定し、それがほとんど変化しなくなる20分後の粘度をその油性薬物担体の指標粘度とし、以後40, 80, 120 cpのこれら粘性油性薬物担体を使用した。また、エチルセルロースはそのロット間で添加濃度に対する溶媒の粘度が異なるので、一旦120cp よりも高い粘性オレイン酸エチルを調製し、それにさらにオレイン酸エチルを加えて40, 80, 120cp 粘性油性薬物担体とした。

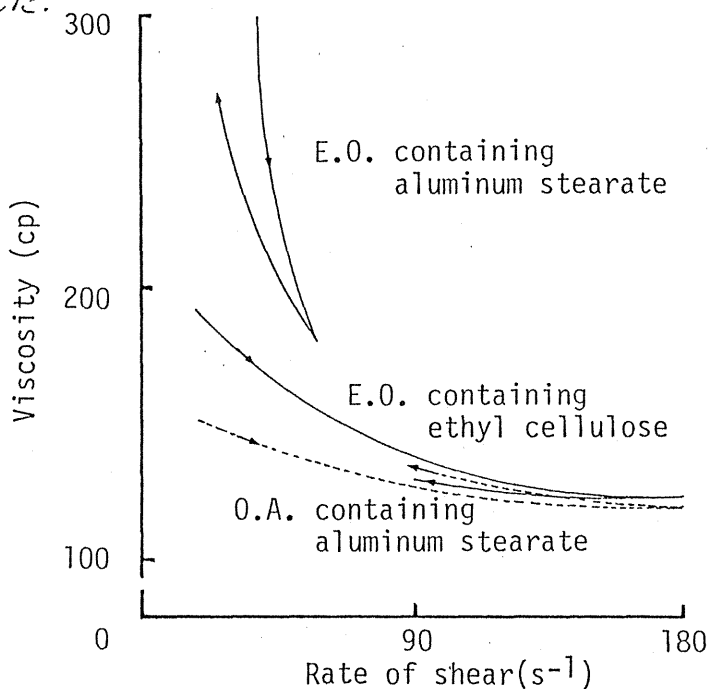


Fig.1 Effect of Aluminum Stearate or Ethyl Cellulose on the Rheograms of Viscous-Oleic Acid(O.A.) and -Ethyl Oleate(E.O.) at 37 °C

第2章 粘性油性薬物担体の組織滞留性及び脈管内挙動

第1節 粘性油性薬物担体の組織滞留性

はしがきでも述べたように、組織滞留性の強化は、局所選択性の外科的テクニックの進歩の著しい¹⁷⁾ 今日において、比較的局所に集中させやすいという理由から、抗腫瘍効果増強のために最も重要な課題の一つである。

Fig. 2に標識体を含むさせた種々粘性のオレイン酸をB. Lindell ら¹⁸⁾の方法によりラットの肝固有動脈より投与したときの滞留性の経時的变化を示した。指標としてLipiodol (Lipiodolの粘度は約20cpであった)の経時的变化も示した。図から明らかなように、Lipiodolやオレイン酸原液では組織からの消失が速く48時間後の組織内残存放射活性量は、それぞれ約7及び22%であったのに比して、粘度を80や120cpに増加すると組織からの消失は遅くなり残存量は60及び75%であった。

同様に、オレイン酸エチルについても検討した。この場合、標的組織としてラットの肝臓に加えて、ハムスターの頬袋、ラットの胃及び腎臓を加えた。Fig. 3にそれらの結果を示した。ハムスター頬袋における滞留性は、オレイン酸エチル原液を投与してもかなり高く、48時間後でも

投与量の約30%が頬袋組織内に滞留していた。オレイン酸エチルの粘度を増加していくと徐々に滞留性が増加し、48時間で120cp 粘性オレイン酸エチルは投与量の50%が頬袋組織内に残存しており原液に比べて有意に高かった。ラットの肝臓の場合、その滞留性はハムスター頬袋の場合とほぼ同様であり、粘度の増加と共にその滞留性は増加し、各粘性製剤でオレイン酸エチル原液の滞留性に比して48時間後で有意に高かった。一方、ラットの胃及び腎臓においてはその滞留性は減少し、48時間後の原液の滞留性は胃で9%、腎臓で4%であった。粘度を増加してもその増加量は小さく、120cp 粘性オレイン酸エチルの48時間後の滞留性は胃で20%、腎臓で12%であったが、原液に比べ有意に高かった。

これらの結果を総合すると、オレイン酸及びオレイン酸エチルとも肝臓での滞留性が胃や腎臓に比べ高かった。この最も大きな要因は、血管構築の違いと思われる。すなわち、肝臓の血管系は動脈と静脈が不連続で、網目状に走るシヌソイドを介しているため、組織移行性が粘度の増加と共に減少すると思われるのに対し、胃や腎臓では連続的な血管系で血流が速いため、油性薬物担体のwash outも速くなったためと思われる。また、連続血管系を有するハムスター頬袋において滞留性が高かったのは、微小毛細血管が他の臓器に比べ発達しており、血流強度が弱まるために担体のwash outが遅くなり、肝臓と同様な結果が得られたと思われる。粘性オレイン酸と粘性オレイン酸エチルとで滞留性に若干の相違が

見られたが、この理由については後述する。

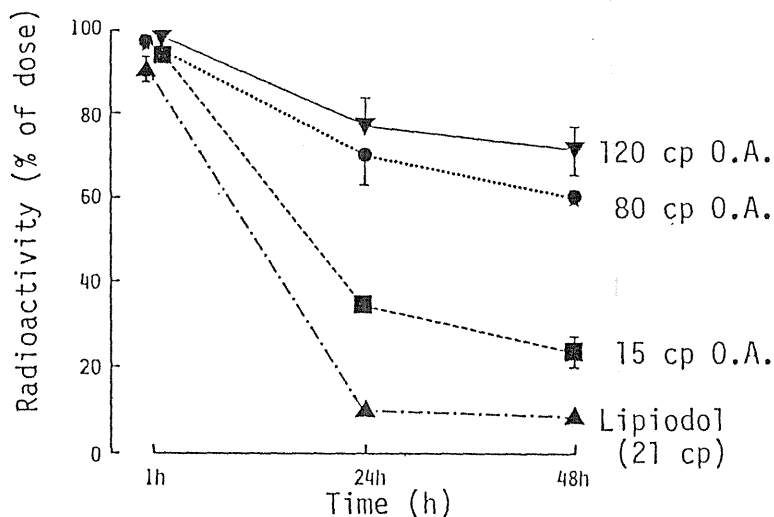


Fig.2 Time Course of Radioactivity in the Liver after Intraarterial Injection (i.a.) of Viscous Oleic Acid(O.A.) and Lipiodol Containing ^3H -Oleic Acid in Rats

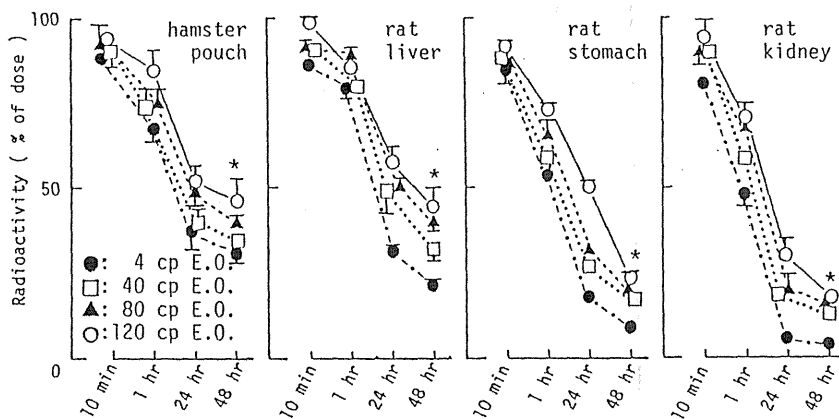


Fig.3 Time Course of Radioactivity in the Several Tissues after i.a. Injection of Viscous Ethyl Oleate Preparations Containing ^3H -Oleic Acid in Hamsters and Rats (*: $P < 0.05$)

第2節 アンギオグラムによる塞栓の観察とハムスター頬袋を用いた脈管内挙動の視覚的観察

Fig. 4に40, 80及び120 cpの粘性オレイン酸を写真中の肝臓の右上部以外の動脈内に投与し、10分後に硫酸バリウム造影剤を投与したときのアンギオグラムを示した¹⁹⁾。40cpの粘性オレイン酸を投与した場合、塞栓の視覚的証拠は得られなかったのに対し、80及び120 cpの粘性オレイン酸を投与したときには、投与部の動脈は描出されず血管塞栓が生じていることが確認された。

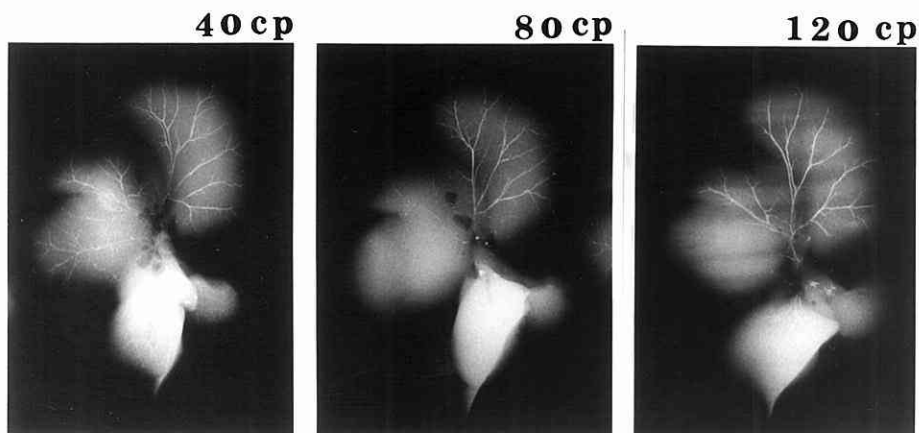


Fig. 4 Angiograms of the Liver after i.a. Injection of Viscous Oleic Acid in Rats

ハムスター頬袋内動脈に種々粘度のオレイン酸エチル投与後の経時的変化をFig. 5 に、血管内の通過時間と塞栓状況をTable 2 に示した。ハムスター頬袋は、B. R. Duling²⁰⁾の方法を修飾して調製し、R. F. Tuma²¹⁾の方法を用いて頸静脈より油性薬物担体を投与した。頬袋内動脈に流入してきた油性薬物担体を画像（カメラヘッド ITC-350M, モニター, CDA-201N, OLYMPUS-IKEGAMI, 東京 Japan）付きの光学顕微鏡（new VANOX, model AHBS, OLYMPUS, Japan）下で経時的に観察し、その挙動をビデオテープレコーダー（マスタックス, VT-2450, HITACHI, 東京, Japan）に収め重要と思われるポイントを静止画像にし記録（顕微鏡写真）した。

オレイン酸エチルの場合、投与直後に頬袋内に出現し径80 μ mの血管を通過する（Fig. 5a）。注入2~3分後に径20~30 μ mに到達しゆっくりと下方へ移動し、注入20分後、径5~10 μ mの最も細い血管に到達する。その部位で塞栓が観察され（Fig. 5b）、2~3時間後に全ての微小動脈で血流が遮断された。40cpの粘性オレイン酸エチルの場合、約1分後に径70~80 μ mの血管に到達し（Fig. 5c）、2~3分後に径40~50 μ mの血管に到達する。20分後に径20~30 μ mの血管で塞栓が観察されるが、枝分かれした径10~15 μ mの血管にもかなりおくの方まで進入していた。約1時間後にこれら全ての血管で血流が遮断された（Fig. 5d）。80cp及び120cpの粘性オレイン酸エチルでは、頬袋内動脈への出現が遅く、80cpで約1分後に径80~100 μ mに、120cpで約3分後に径110~130 μ mの血管に到

達する。その後、約10分後に80cpで径70~80um、120cpで径が約100~120umの血管に到達し塞栓が観察され、約15~20分後に全ての血管で血流が遮断された (Fig. 5e)。このように、油性薬物担体はその粘度の違いにより、血管到達時間、塞栓部位、塞栓時間が異なることが明らかとなった (Table 1)。

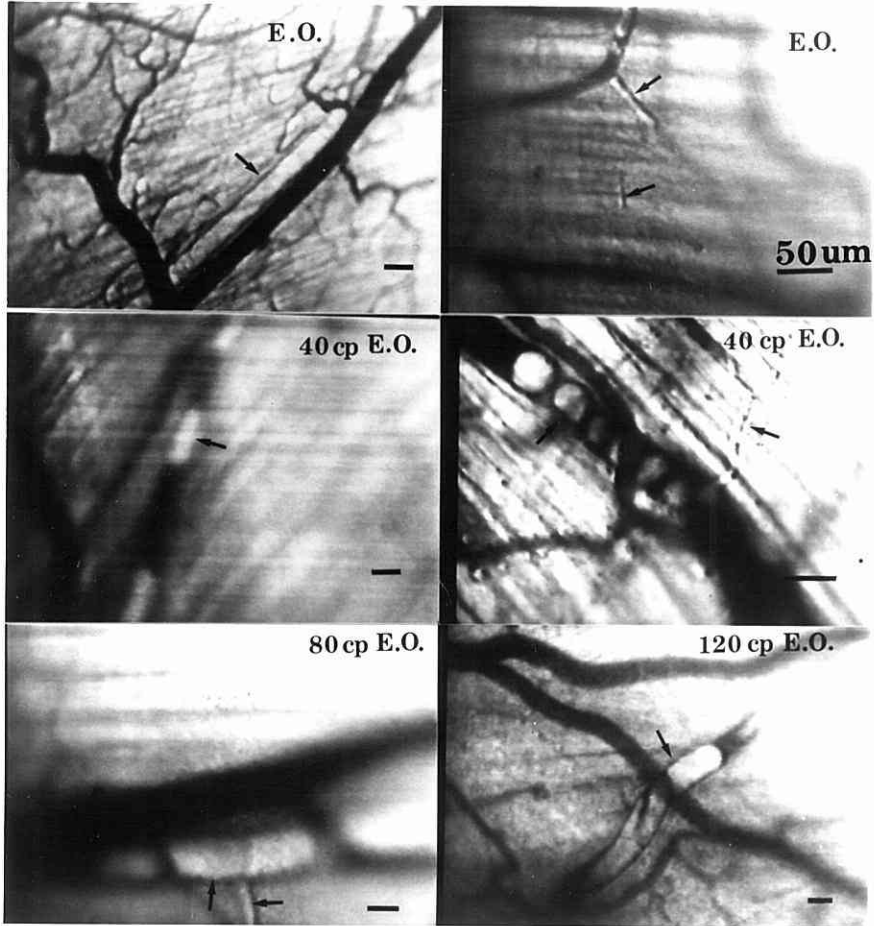


Fig. 5 Behavior of Viscous Ethyl Oleate in the Artery and Arteriole of the Hamster Cheek Pouch

Table 1 Relationship Between Diameter in Cheek Pouch Artery and Appearance Time of Oily Substances after Injection to External Carotid Artery in Hamster

oily substance	diameter in artery					embolized ^{a)} time
	120 μ m	80 μ m	40 μ m	20 μ m	\leq 10 μ m	
Ethyl Oleate	\approx 0b)	\approx 0b)	1 min	3 min	20 min (embolized) ^{c)}	2-3 h
40cp Ethyl Oleate	\approx 0b)	1-2 min	3 min	20 min (embolized) ^{c)}		1 h
80cp Ethyl Oleate	0.5 min	0.5-1 min	10 min (embolized) ^{c)}			20 min
120cp Ethyl Oleate	3 min (embolized) ^{c)}					15 min

- a) Time needed to perfectly stop blood flow by microvascular embolization with oily substances.
 b) Appearance immediately after injection of oily substance
 c) Embolization started immediately after the oily substances were appeared.

固形の塞栓材料の場合、目的とする癌組織の動脈を確実に塞栓する。事実、我々もアルブミン小球体の塞栓能をアンギオグラムを用いて証明している⁷⁾。観察した実験方法に違いがあるが、粘性オレイン酸や粘性オレイン酸エチル等の油液状の薬物担体でも今回得られたアンギオグラムやハムスターの実験から塞栓材料の機能を果たす可能性が示唆された。すなわち、第1節で示した実験初期の高い滞留性は、血管塞栓による脈管内滞留であり、その後の滞留効果は、特に肝臓においては、組織内滞留の可能性が高い。但し、これらの評価は、さらに肝臓における組織学的な検討を必要とするであろう。

癌新生血管においては血管膜の強度が弱いことや新生血管群の容量が大きく血流強度が弱いことが考えられる。従って、必ずしも正常な胃や腎臓での第1節に示した定量的な滞留性の結果と癌に犯された臓器の滞留性が一致するわけではなく、連続的な血管系を有する癌組織においても、血管に富むハムスター頬袋の視覚的な結果に近いかもしれない。

しかしながら、上述したことを総合すると、連続的な血管系を有する臓器に対しては、現段階でははっきりとした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付与するために、より高い粘性の付与や他の何等かの修飾を施すことが必要であろう。

第3節 油性薬物担体の肝動脈内投与後の安全性

油性薬物担体動注後の肝臓に対する安全性を確認するため組織学的な検討を行った。Fig. 6に120 cpの粘性油性薬物担体を肝固有動脈内に投与1及び7日後のH・E染色像を示した。120cp 粘性オレイン酸の投与では、1日後に肝実質細胞部の広範かつ多発的な巣状壊死が観察され、末梢に拡がっていた。7日後には、これらの壊死部はさらに広がり壊死の融解もみられたが、線維芽細胞や擬胆管細胞がみられ修復過程に入っていた。また、ステアリン酸アルミニウムの毒性についてチェックしたところこの系では観察されなかった。一方、120cp 粘性オレイン酸エチ

ル投与では、投与1日後において若干の巣状凝固壊死が点在していたが、7日後には擬胆管細胞がみられ、壊死部は消失し、ほぼ完全に修復していた。

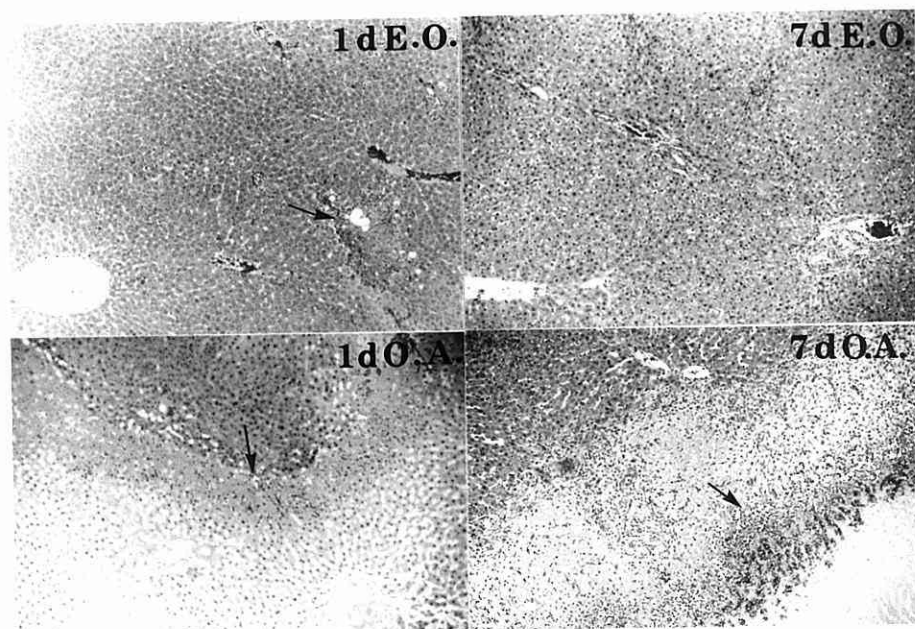


Fig. 6 Cytochemical Examination of the Liver 1 and 7 Days after i.a. Injection of Oleic Acid and Ethyl Oleate in Rats

これらの結果は、生体、特に油性薬物担体を局所投与された組織の安全性の点でオレイン酸は非常に危険性を有することを示している。ここでは示さなかったがオレイン酸原液投与の場合においても、部分的な肝実質部の壊死が見られた。また、西川ら²²⁾は、オレイン酸のような不飽和高級脂肪酸が抗腫瘍効果を発揮することを述べている。これらのことを総合すると、オレイン酸を担体として投与した場合、そのもの自体の細胞毒性により実質細胞の壊死を起し、さらに粘度が高くなるとオレイン酸の滞留性が増加することで細胞毒性効果が強まって重篤な壊死を引き起こしたと推察される。従って、オレイン酸をそのまま薬物担体として利用するのは非常に困難であろう。Lipiodolのような油性薬物担体が癌部位集積性を示す一つの大きな理由として、リンパ管等の油状物質の除去器官の欠除が上げられ²³⁾、特に壊死部で多く見られる。従って、第1節でみられた粘性オレイン酸とオレイン酸エチルの滞留性の差は、オレイン酸の壊死効果による滞留性の増強によることが大きな理由と思われる。

一方、粘性オレイン酸エチルでは、投与1日後に若干壊死部が観察されたが7日後ではほぼ正常肝組織と変わらず、肝組織に対して安全性が高いものと思われた。不連続血管系の臓器である肝臓においては、投与した油性薬物担体と肝実質細胞との接触が他の連続血管系の臓器に比べ高いと思われ、肝臓で安全性が高いのであれば他の臓器に対しても安全

であると思われる。従って、安全性の点を考慮すると担体としてはオレイン酸エチルの方が妥当であると考えられる。

第3章 油性薬物担体からの薬物の放出性

第1節 semustine 含有油性薬物担体からのsemustine の放出

オレイン酸及び粘性オレイン酸 (120 cp) からのsemustine の放出を Fig. 7aに、オレイン酸エチル及び粘性オレイン酸エチル (120 cp) からのsemustine の放出をFig. 7bに示した。定量法は、L o oらの比色定量法²⁴⁾を用いた。

図から明らかなように両製剤ともその粘度に関わらず薬物放出は同様な放出パターンを示した。また、両製剤とも0次に近い放出性を示したが、その放出量は少なく、12時間後でオレイン酸の場合含有量の0.1%、オレイン酸エチルの場合0.2%であった。これらの結果は、semustine が油性薬物担体中に安定に包含されているため、in vivo においても油性薬物担体と同様な挙動をとるだろうことを示している。

標的癌組織における担体からの薬物放出性は、担体が固型の塞栓材料である場合、血管内に担体が存在するわけであるから薬物の種類や癌の種類に関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。Lipiodolのような癌組織選択性の高い油性薬物担体の場合、特に肝臓においてはそれ自身癌細胞との接触が高く、また癌細胞に取り込まれるか

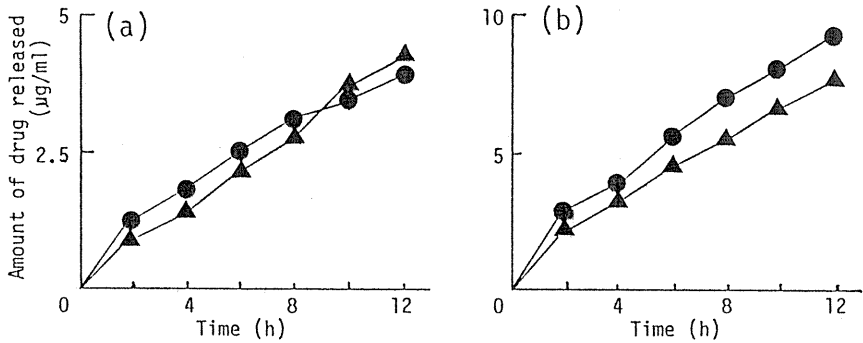


Fig.7 In Vitro Semustine Release from Viscous-Oleic Acid (a) and -Ethyl Oleate (b) (120 cp)

● : Oleic Acid or Ethyl Oleate
 ▲ : Viscous-Oleic Acid or -Ethyl Oleate

もしれないので、脂溶性の薬物を含有させた場合薬物の放出の有無が適当であるか否かは判断しかねる。事実、in vitroにおける脂溶性薬物の放出は、上述の結果もそうであったように、それぞれの脂溶性薬物の油性担体との親和性に差があったとしても非常に遅いと思われるが、前田ら²⁵⁾や福島ら²⁶⁾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いる。

我々が前節で得た粘性油性薬物担体の結果は、油性薬物担体の動脈内投与初期において血管塞栓が予想されるので、我々が利用する剤形では、特に濃度依存型の薬理作用を発揮する薬物を包含する場合には、ある程度高い薬物放出性が望まれるかもしれない。

第2節 cisplatin 含有油性薬物担体からのcisplatin の放出

オレイン酸エチル及び粘性オレイン酸エチルからのcisplatin の放出をFig. 8に示した。実験系は、縦型拡散セルの下層に薬物含有油性薬物担体と生理食塩水を、上層に生理食塩水を入れその間に透析膜を挟み、上層をサンプリングした。定量はフレイムレス原子吸光光度法で行った。

オレイン酸エチルからのcisplatin の放出は速く、free cisplatin/saline系とほぼ同様な放出パターンを示した。一方、粘性オレイン酸エチルからのcisplatin の放出は24時間までに含有量の30%を徐々に放出した後、さらにゆっくりとした速度で薬物を放出する二相性のパターンを示した。

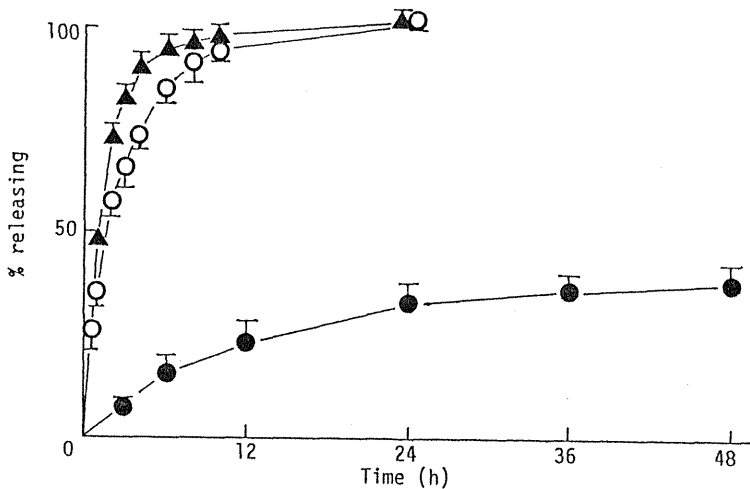


Fig.8 In Vitro Cisplatin Release from Ethyl Oleate and Viscous Ethyl Oleate (120 cp)

▲: free cisplatin NaCl Soln., ○: Ethyl Oleate,
●: Viscous Ethyl Oleate

オレイン酸エチルからのcisplatinの放出に及ぼす界面活性剤の影響をFig. 9に示した。この場合、界面活性剤の影響を調べるため、拡散セルの下層には前実験とは異なり、油性薬物担体のみを加えた。

オレイン酸エチル原液の場合、前述の実験系での薬物放出性とは異なり、実験開始10時間までにcisplatinを全量の15%放出した後ほとんど放出しなかった。非イオン性界面活性剤を含有させると種々異なった放出パターンを描いた。Span 80では10時間までに全量の5%を放出した後、オレイン酸エチル原液の場合と同様にほとんど薬物放出が見られなかった。HCO-60又はTween 80を含有させると薬物放出はオレイン酸エチ

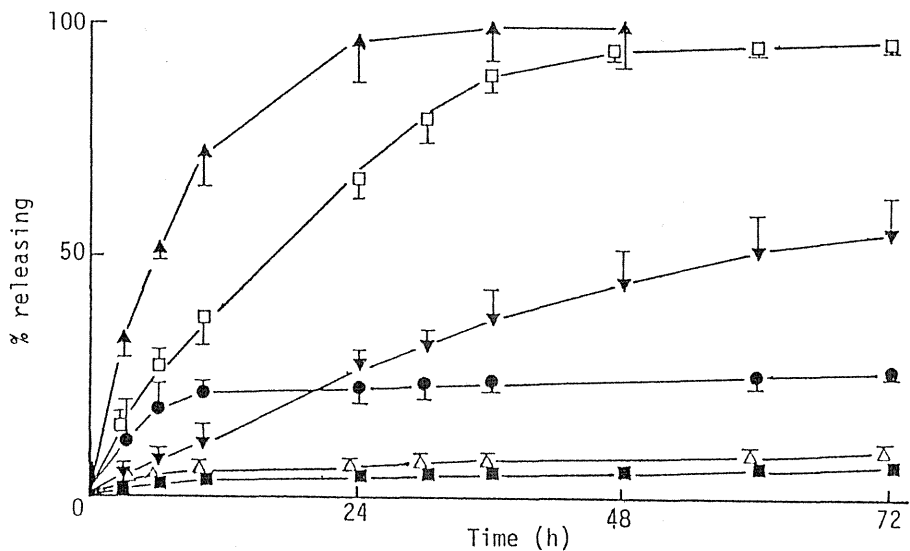


Fig.9 Effect of Several Surfactants on the Cisplatin Release from Ethyl Oleate (E.O.)

●: E.O., ▲: E.O. containing 1% Tween 80,
 □: E.O. containing 1% HCO-60, ▼: E.O. containing 1% Span 20,
 △: E.O. containing 1% Span 80,
 ■: Lipiodol

ル原液に比べて速くなり，HCO-60で72時間，Tween 80で36時間までにはほぼ完全に薬物を放出した．一方，Span 20 ではほぼ0次に近い速度で薬物を放出し，72時間までに全量の約60%を放出した．48時間までの薬物放出量は，界面活性剤のHLB値，すなわち極性に依存していた．

種々界面活性剤を含有する粘性オレイン酸エチルからのcisplatinの放出をFig.10に示した．この場合，粘度の影響及び界面活性剤の影響を試験するため，拡散セルの下層には，油性薬物担体と生理食塩水を加えた．

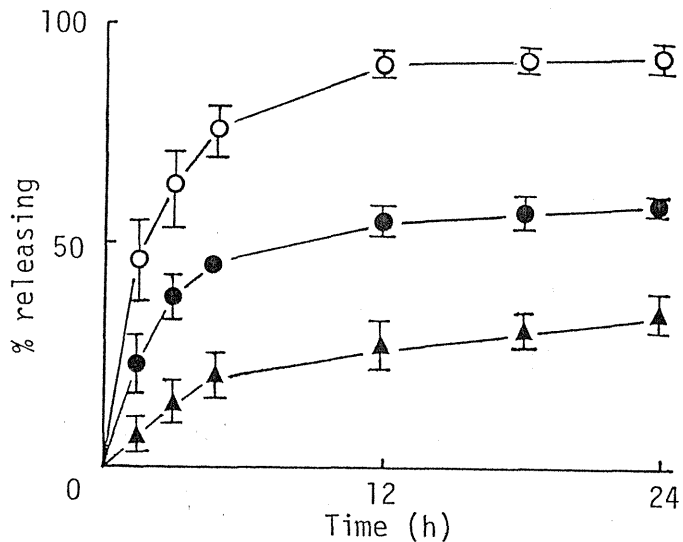


Fig.10 Effect of Several Surfactants on the Cisplatin Release from Viscous Ethyl Oleate(V.E.O., 120 cp)

- : V.E.O. containing 1% Tween 80,
- : V.E.O. containing 1% Span 20,
- ▲: V.E.O. containing 1% Span 80

得られた結果は、前結果と同様に、界面活性剤の極性に依存した放出パターンを示したが、Span 80 を含有する系では、0次放出ではなく初期の速い放出相をもつ2相性のパターンを示した。

水溶性または難溶性薬物の場合、油性薬物担体との親和性が悪くなり、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、薬物放出は速くなりまた分散状態も悪くなる。これを防ぐ手段としてはエマルションにしたり^{27,28)}、油相の粘度を高めて懸濁剤を安定化することなどがある。エマルションタイプの製剤については、薬物の放出性とエマルションの安定性とが密接に関係しており、また薬物自身の安定性も十分考慮しなければならず、これらの点において、優れたエマルション製剤の開発が望まれる。

一方、難溶性の制癌剤であるcisplatin をLipiodolに懸濁させた油性薬物担体の利用が報告されている²⁹⁾。Lipiodol等の油性薬物担体は、癌局所動注療法に用いられるのでcisplatin や水溶性制癌剤でも油性薬物担体中に安定に懸濁できれば十分利用性が高いと思われる。我々は、癌組織の滞留性の増加を目的に粘性油性薬物担体を調製したが、これは水溶性や難溶性薬物の分散性を安定化するのにも十分役割を果たす結果になった。我々が調製したcisplatin 含有油性薬物担体はオレイン酸エチル単独でその分散性は悪く、調製 2~3 時間後には約 7~8 割沈降してしまったのに対し、120cp 粘性油性薬物担体では少なくとも24時間安

定であった。また、油性薬物担体からのcisplatinの放出は、粘性油性薬物担体とするだけである程度持続的なパターンが得られた。これは、cisplatinが安定に油性薬物担体中に懸濁したためcisplatinの油相への溶解律速が大きな理由になっていると考えることもできる。我々は、cisplatinの効果はある程度濃度依存型と考えており、この油性薬物担体は血管塞栓能を有している可能性があるので、投与初期に癌細胞が高濃度の薬物と接触した方がよりよく、今回得られた放出結果はある程度満足できるものである。

油性薬物担体に懸濁させたcisplatinの粒子径は、顕微鏡的な観察から最も大きなもので3 μm でそのほとんどが1 μm 以下であった。このことは、もしオレイン酸エチルが癌細胞内に取り込まれるとするとcisplatin粒子も同様に取り込まれる可能性も高く、cisplatinの安定性を考えると微粒子分散型の剤形の方がw/oエマルションの様な薬物溶解型の剤形よりも都合がよいかもしれない。

第4章 AH272 移植モデル肝癌ラット に対する効果

第1節 AH272 移植モデル肝癌ラットにおける油性薬物担体の癌部位集積性

オレイン酸エチル及び120cp 粘性オレイン酸エチルのAH272 移植肝癌ラットにおける癌部位集積性をFig. 11に示した。図から明らかな様に癌部位とその近傍正常部位とで集積性に差が観察された。オレイン酸エチル原液においては、集積性に差がみられるものの24時間以降の集積量が小さかったのに比べ、120cp 粘性オレイン酸エチルでは集積性が大きかった。また、48時間後においても投与10分における集積量の約40%以上が残存しており、さらに、近傍正常部位に比べて約4倍集積性が高かった。ここでは示さなかったが、Lipiodolの癌部位集積性もオレイン酸エチル原液に近かった。

VX-2 tumor移植家兎肝癌モデルにおけるLipiodolの癌部位集積性は、アンギオグラムや標識体を用いて定量的にも証明されている³⁰⁾。その集積性は、正常肝組織の数十倍といわれており、我々の得た結果よりもかなり高い。この差は、動物種や癌種の違いが大きいと思われる。特に、VX-2 tumorは、かなりはっきりとした固型癌を形づくるのに対し、

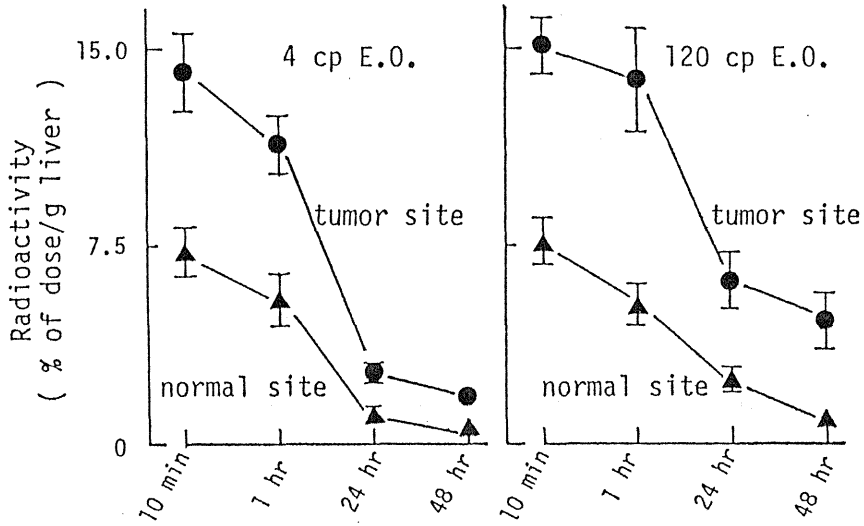


Fig.11 Disappearance of Radioactivity in the Tumor or Normal Site of the Liver after i.a. Infusion of 4 cp or 120 cp Ethyl Oleate Containing ^3H -Oleic Acid in Rats

AH272 tumor は、細胞自体がかなり強力に壊死部を含む固型癌を形成するまでには、腹腔に癌細胞が浸潤し宿主が死亡するため、完全な固形癌として実験を組み立てえず、この差が集積性に反映したと思われる。

今回の実験で得られたオレイン酸エチルと粘性オレイン酸エチルの24時間以降の集積率の差は、粘度の増加に伴った移行速度の差であり、癌部位と正常部位との集積性の差は、癌新生血管の血管容積、高分子の透過性の亢進あるいは腫瘍間質スペースの脂質の取り込みの増大さらにはリンパ管の欠除による油性物質のクリアランス能の低下によると考えられる。

第2節 AH272 移植モデル肝癌ラットにおけるcisplatin の癌部位集積性

cisplatin を含有した種々油性薬物担体の肝動注後のAH272 移植肝癌ラットにおけるcisplatin の癌部位集積性をFig. 12に示した。どの場合においても癌部位の方が近傍正常部位に比べて集積性が高かった。オレイン酸エチル原液では、先の油性薬物担体の集積性の結果と同様に集積性に差があるもののその量は少なかった。粘性オレイン酸エチルでは、粘度の増加と共に集積性が増加し、120cp 粘性オレイン酸エチルで48時間後で癌部位の方が近傍正常部位よりも約5倍高かった。また、Span 20 を含有させた粘性オレイン酸エチルにおいてもほぼ同様な結果であった。cisplatin の経時的な集積性の変化は、油性薬物担体の経時的な変化とは若干異なり、Fig. 11と比較するとオレイン酸エチル原液でcisplatin の1時間後の消失が速く、また120cp 粘性オレイン酸エチルで24時間後の消失が遅くなっていた。

cisplatin の癌部位集積性も、油性薬物担体のそれと同様に優位に高かった。福島ら²⁹⁾は、VX-2移植肝癌家兎にcisplatin 懸濁Lipiodolを肝動注し、同様な結果を得ている。従って、微粒子懸濁型の剤形を用いても十分組織選択性を確保できるように思われる。先に得られた結果で、投与1日後のcisplatin と粘性オレイン酸エチルの集積性に差が

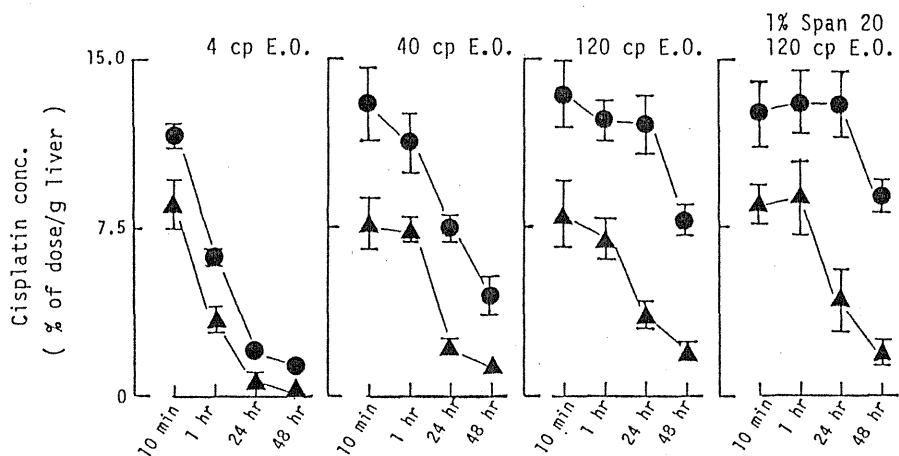


Fig.12 Disappearance of Cisplatin Conc. in the Tumor or Normal Site of the Liver after i.a. Infusion of Several Viscous Ethyl Oleates Containing Cisplatin in Rats ●: tumor site, ▲: normal site

みられた。この理由についてははっきりとしたことはいえないが、cisplatin 粒子が溶解しないまま、癌組織周辺に残存しているためかもしれない。

cisplatin の集積性も先の油性薬物担体の集積性と同様に VX-2 tumor の方が高い結果となっている。しかし、岡垣ら³¹⁾も Walker 256 carcinosarcoma をラット肝癌モデルに利用し、薬物にアクリルビシンを用いて Lipiodol に溶解させアクリルビシンの集積性を測定しているが、我々と同様な結果となっており、ラットを用いたモデルでは、癌部位と正常部位とでその差は、家兎モデルよりもでにくいと思われる。

第3節 cisplatin 含有油性薬物担体のAH272 移植ラットに対する抗腫瘍効果

AH272 移植ラットに対するcisplatin 含有油性薬物担体の延命効果を Fig. 13に、またそのときの平均生存日数とT/C%をTable 2 に示した。control の場合の平均生存日数は15.3日であった。これに対し120cp 粘性オレイン酸エチルだけを投与した群の平均生存日数は13.6日でほとんど変わらなかった。free Cisplatin投与群ではかなり延命効果が見られ、平均生存日数は20.1日、T/C%は132.2 であった。Span 20 を含有した120cp 粘性オレイン酸エチル投与群では、優れた延命効果が観察され平均生存日数は33.1日、T/C%は217.8 であり、60日以上生存した寛解ラットが10匹中2匹存在した。

以上の結果から、cisplatin を含有した粘性オレイン酸エチルは、モデル肝癌に対し高い効果を示すことが明らかとなった。このことは、脂溶性制癌剤に加えて水溶性や難溶性の制癌剤も安定に癌局所にターゲットできることを意味する。この抗腫瘍効果の実験では担体の粘度の比較を行わなかったが、前節まで結果から、今回用いた系が最もその効果を発揮すると思われる。

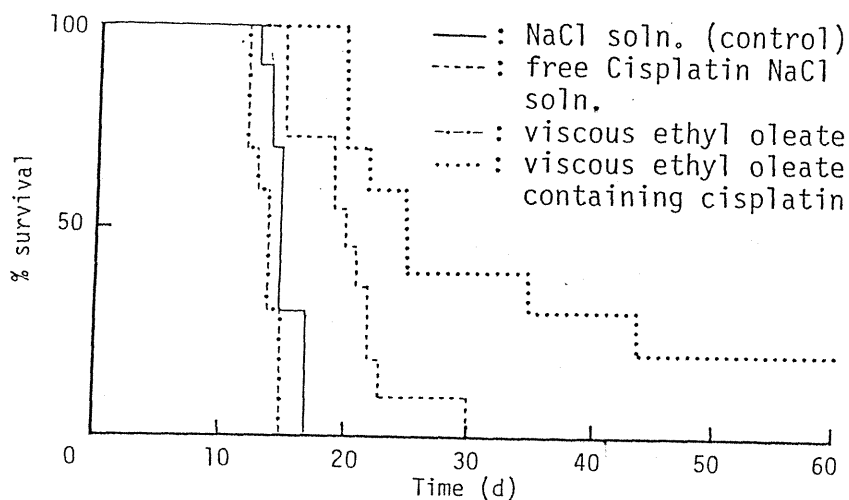


Fig.13 Effect of Viscous Ethyl Oleate*(120 cp) Containing Cisplatin on the Survival in AH 272 Tumor Bearing Rats

* containing 1% Span 20

Table 2 Effect of Viscous Ethyl Oleate(120 cp) Containing Cisplatin on the Survival in AH 272 Tumor Bearing Rats

	number of rats	mean survival	T/C(%)	long term* survivor
NaCl soln. (control)	10	15.2±1.4	100	0
free CDDP** NaCl soln.	11	20.1±4.4	132.2	0
V.E.O.***	10	13.6±1.3	89.5	0
CDDP V.E.O.	10	33.1±16.1	217.8	2

* This means number of rats survived over 60 days.

** Cisplatin

***Viscous Ethyl Oleate

終わりに

今回、我々は、粘度を高めた粘性油性薬物担体を調製し、Lipiodolが有する癌部位選択的集積性の能力に加え、臓器滞留性や固形薬物担体の有する塞栓能を付与することにより、抗腫瘍効果の増強を狙った。はしがきでも述べたように、油性担体も固形担体も長所、短所があるわけであるが、それらの良いところを取ることは、えてして共倒れになる場合もある。ここで得た結果は、幸いにも良好な結果となったが、集積性と塞栓能の関係を明らかにしていけば、さらにより良い製剤の開発が望められると思われる。

また、Lipiodolの臨床効果は、原発性の肝癌に良好な成績があるものの転移性の肝癌では余り効果がなく³²⁾、アルブミン小球体を用いた臨床効果は、転移性の肝癌に良好な成績を上げている³³⁾。これらのことは、我々が調製した粘性油性薬物担体が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唆している。

今後は、さらに他臓器癌への応用の拡大と効果発現のメカニズムの解明が粘性油性薬物担体の設計戦略の重要な課題となろう。

最後に、昭和62年度の研究代表者で、63年度は米国留学のため代表者を途中で辞退された城西大学薬学部製剤学教室森本雅憲教授に数々の御懇篤なる御指導、御助言をいただきました。この場をお借りして、深謝致します。

文 献

- 1) Y. Takatsuka, et al., Jpn. J. Clin. Oncol. 15, 107-114 (1985).
- 2) K. Juni, et al., Chem. Pharm. Bull. 33, 1734-1738 (1985).
- 3) K. Kumai, et al., Jpn. J. Cancer Chemother. 12, 1946-1948 (1985).
- 4) S. Fujimoto, et al., Cancer 55, 522-527 (1985).
- 5) R. Nemoto, et al., Invest. Urol. 18, 69-73 (1980).
- 6) T. Kato, et al., J. Urol. 125, 19-24 (1981).
- 7) Y. Morimoto, et al., Int. J. Pharm. accepted.
- 8) T. Konno, et al., Cancer 54, 2367-2374 (1984).
- 9) M. A. Gimbrone, Jr., et al., J. Natl. Cancer Inst. 52, 413-427 (1974).
- 10) R. K. Jain, Cancer and Metastasis Rev. 6, 59-593 (1987).
- 12) R. K. Jain, et al., Biotechnol. Progr. 1, 81-94 (1985).
- 13) P. M. Gullino, et al., Cancer Res. 25, 727-731 (1965).
- 14) P. Rubin, et al., Clin. Radiol. 17, 220-229 (1966).
- 15) T. Kato, et al., Jpn. J. Cancer Chemother. 11, 798-805 (1984).
- 16) 高塚雄一ら, “動注がん化学療法—基礎と臨床—”, 田口鐵男ら編, 癌と化学療法社, 東京, pp. 178-183 (1986).

- 17) M. Kawabata, et al., Jpn. J. Cancer Chemother. **11**, 806-813 (1984).
- 18) B. Lindell, et al., Annals of Surgery **187**, 95-99 (1987).
- 19) 藤原弘, 医実報告, **17**, 129-139 (1976).
- 20) B. R. Duling, et al., Microvasc. Res. **5**, 423-429 (1973).
- 21) R. F. Tuma, "Microspheres and Drug Therapy" S. S. Davis, Eds., Elsevier, Amsterdam, pp. 189-203 (1984).
- 22) Y. Nishikawa, et al., Chem. Pharm. Bull. **24**, 756-762 (1976).
- 23) R. K. Jain, Cancer Res. **47**, 3039-3051 (1987).
- 24) T. L. Loo, et al., J. Pharm. Sci. **54**, 809-810 (1965).
- 25) H. Maeda, et al., Jpn. J. Cancer Chemother. **11**, 814-826 (1984).
- 26) S. Fukushima, et al., Cancer Res. **47**, 1930-1934 (1987).
- 27) I. Tada, et al., Jpn. J. Cancer Chemother. **12**, 1938-1939 (1985).
- 28) 今野俊光, "動注がん化学療法—基礎と臨床—", 田口鐵男ら編, 癌と化学療法社, 東京, pp 239-250(1986).
- 29) S. Fukushima, et al., Drug Delivery System **3**, 431-435 (1988).
- 30) K. Iwai, et al., Cancer Res. **44**, 2115-2122 (1984).
- 31) T. Okagaki, et al., Chem. Pharm. Bull. **36**, 3092-3097 (1988).

32) S.Maki, et al., Cancer 56, 751-757 (1985).

33) 藤本茂ら, “動注がん化学療法—基礎と臨床—”, 田口鐵男ら編,
癌と化学療法社, 東京, pp. 257-264 (1986).