

## アドリアマイシン封入熱感受性リポソームと 温熱療法の併用に関する実験的研究

東京医科大学第4内科

堀部俊哉	真田 淳	水口泰宏	水村泰夫
二木修司	井手真理	小野田一敏	三輪一彦
大野博之	篠原 靖	河合 隆	角谷 宏
関 知之	新戸禎哲	山田孝史	池田 肇
斉藤利彦			

### Experimental Study on Treatment with Local Hyperthermia and Temperature-Sensitive Liposomes Containing Adriamycin

Toshiya HORIBE, Jyun SANADA, Yasuhiro MIZUGUCHI, Yasuo MIZUMURA,  
Syuuji NIKI, Mari IDE, Kazutoshi ONODA, Kazuhiko MIWA, Hiroyuki OHNO,  
Yasushi SHINOHARA, Takashi KAWAI, Hiroshi KAKUTANI, Tomoyuki SEKI,  
Teitetsu NIIDO, Takashi YAMADA, Hajimu IKEDA and Toshihiko SAITOU

(The Fourth Department of Internal Medicine, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan)

The antitumor effects of temperature-sensitive liposomes containing adriamycin (ADR-Lip) combined with local hyperthermia were studied using tumor-bearing mice. ADR-Lip which release the drug at 42°C, were prepared from dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) and distearoylphosphatidylcholine (DSPC) (DPPC: DSPC=9:1 in molar ratio) by the reverse-phase evaporation method. Colon Carcinoma 26 cells ( $1 \times 10^5$  cells) were inoculated subcutaneously in the hind feet of BALB/c mice. When the size of tumor was approximately 8 mm in diameter, free ADR or ADR-Lip was administered intravenously. At 5 minutes after administration, local hyperthermia was applied to the tumor by a radiofrequency hyperthermia apparatus at 42°C for 20 minutes. The ADR distribution in the tissues and tumors was measured at 0.5, 1, 2, and 6 hours after the treatment by use of HPLC. The antitumor effect was evaluated by the tumor growth rate and the survival rate. The uptake of ADR-Lip in liver and spleen were greater than those of free ADR but the uptake was decreased in combination with hyperthermia. The higher accumulation of ADR in tumor with the combination of ADR-Lip and local hyperthermia was maintained higher than with free ADR. There was no significant difference in survival rate but a significant difference in suppression of tumor growth in mice receiving the combination of ADR-Lip and local hyperthermia, compared with groups receiving the other treatment. The drug delivery system in the combination of ADR-Lip and local hyperthermia is expected to be very useful for antitumor therapy when applied clinically.

(1994年2月19日受付, 1994年4月1日受理)

**Key words:** リポソーム (Liposome), 温熱療法 (Hyperthermia), ドラッグデリバリーシステム (Drug delivery system), 化学療法 (Chemotherapy), アドリアマイシン (Adriamycin)

## I. 緒 言

近年、悪性腫瘍に対する集学的治療のひとつとして温熱化学療法が注目されている。一方、化学療法において腫瘍選択性の向上を図るためターゲティング療法が試みられているが、人工脂質膜小胞であるリポソームはその中でも有用な薬剤キャリアーとして応用されている。リポソームは本来その成分である脂質の組成により、ある一定温度でゲル状態から液相状態に相転移して封入薬剤を放出する性質がある。この薬剤放出性を利用すれば、リポソームの中に抗癌剤を封入し、局所温熱療法と組み合わせることで腫瘍局所に選択的に抗癌剤を集積させ得ることが考えられる。本研究では、アドリアマイシン封入熱感受性リポソームを用い、動物の皮下移植腫瘍モデルで局所温熱療法との併用効果について基礎的検討を行った。

## II. 材 料

### 1. 動物

実験動物は7週齢の Donryu 雄性ラットと7週齢の BALB/c 雄性マウスを使用した。

### 2. 腫瘍

移植腫瘍は N-methyl-N-nitroso-urethane 誘発により確立されたマウス可移植性大腸癌である Colon Carcinoma 26 細胞を使用した。

### 3. 移植腫瘍モデルの作製

マウス大腿皮下にて継代移植した腫瘍を、その体積が Giavazzi ら<sup>2)</sup>の方法(腫瘍体積=長径×短径<sup>2</sup>×1/2)による測定値が200~300 mm<sup>3</sup>に達した時点で摘出し、腫瘍内の壊死組織を除去、細片化後、酵素液(リン酸緩衝液(PBS)20 mlにCollagenase 23 mg, Deoxyribonuclease 3 mg 溶解液)に腫瘍片2 gを入れ、スターラーにて37°C、30分間攪拌し細胞浮遊液を作製した。それを1000 rpm、5分遠心分離し、生理食塩水で洗浄後、0.9% NH<sub>4</sub>Cl液にて溶血処理を行った。同様の操作を繰り返し、最終的に細胞浮遊液の生細胞数を0.25 mlあたり1.0×10<sup>5</sup>個に希釈調製した上で、マウスの大腿皮下に接種して腫瘍移植モデルを作製した。

### 4. 薬剤

熱感受性リポソームの脂質として Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC, 日本油脂)と Distearoylphosphatidylcholine (DSPC, Sigma社)を用い

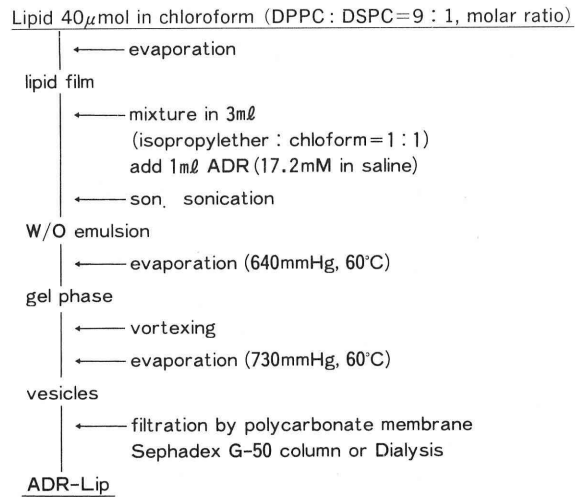


Fig. 1. Preparation of temperature-sensitive liposomes containing adriamycin (ADR-Lip). DPPC : Dipalmitoylphosphatidylcholine DSPC : Distearoylphosphatidylcholine

た、抗癌剤としてアドリアマイシン (ADR, 協和発酵工業) を使用した。

### 5. ADR 封入熱感受性リポソームの調製

リポソームの調製は、相転移温度 (Liquid-crystalline phase transition temperature: T<sub>c</sub>) 41°Cの DPPC を基本に T<sub>c</sub> 54°Cの DSPC を用いて逆相蒸発法<sup>3)</sup>により行った。脂質 40 μmol (DPPC : DSPC=9 : 1, molar ratio<sup>4)5)</sup> を 50 ml のナス型プラスチック中で chloroform に溶解後、溶媒を減圧除去し脂質の薄膜を形成させた。これに有機溶媒 (isopropylether : chloroform=1 : 1) 3 ml を加え脂質を溶解し、ついで生理食塩液に溶解した ADR (17.2 mM) 1 ml を加え、バス型ソニケーターで10分間超音波処理して W/O エマルジョンを得た。次に減圧下 (640 mmHg, 60°C) でロータリーエバポレーターを用いて溶媒は除去しゲル化した。これを Vortex ミキサーで軽く振盪後、再び減圧下 (730 mmHg, 60°C) で残りの溶媒を除去し、窒素パブリングを行った。これを孔径 0.2 μm の polycarbonate membrane (Nuclepore 社) で粒径を調製し、生理食塩液で平衡下した Sephadex-G-50 (ファルマシア社) カラムにてゲル濾過し、リポソーム内に封入した ADR と遊離の ADR を分離した (Fig. 1)。この様にして調整されたアドリアマイシン封入熱感受性リポソーム (ADR-Lip) の ADR 封入率は約 20~25%

で、脂質当り (全量 40  $\mu$ mol) 86~108 mmol ADR/mol Lipid となり、平均粒子径は  $133.6 \pm 22$  nm であった。

### III. 実験方法

#### 1. *in vitro* における ADR-Lip の温度放出性の検討

調製した ADR-Lip 溶液 0.5 ml に生理食塩液 0.5 ml を加え 36~42°C まで各温度 (1 度間隔) で 5 分間、水浴 (BT-25, ヤマト科学) で加温した。これをただちに冷却後、室温で限外濾過 (ULTRACENT-30, 東ソー) およびゲル濾過 (Sephadex G-50, 1 $\times$ 20 cm) し、加温前の ADR 量を 100% として放出率を求めた。ADR の定量は試料に 0.3 N 塩酸含有 50% EtOH を加えて励起波長 470 nm, 蛍光波長 590 nm で日立 F-3000 蛍光分光光度計を用いて蛍光強度を測定し、塩酸ドキソルピシンを標準として ADR 量を求めた。

#### 2. 血液中 ADR 濃度の経時的变化の検討

非担癌 Donryu ラットに ADR 単独 (以下 free ADR) または ADR-Lip を ADR 量として 5 mg/kg をネブタール麻酔下に尾静脈より投与し、5, 15, 30, 60, 120, 180 分後に下大静脈より採血, 3000 rpm, 30 分間の遠心分離にて血清とし、高速液体クロマトグラフィー法<sup>9)</sup> (HPLC 法) により ADR 濃度を測定した。尚, free ADR 投与群および ADR-Lip 投与群はそれぞれ n=30 とした。

#### 3. 腫瘍移植マウスにおける組織内および腫瘍内 ADR 濃度の検討

1) マウスの大腿皮下に腫瘍移植後、腫瘍径が約 8 mm になった時期に (移植後 8 日目から 10 日目), free ADR (n=24), ADR-Lip (n=24), free ADR+加温 (n=24), ADR-Lip+加温 (n=24) の 4 群に分けてネブタール麻酔下に ADR 相当量 5 mg/kg で薬剤を尾静脈より投与した。尚, 加温条件は薬剤投与 5 分後から radio frequency (RF) 加温装置 (OMRON 社製 HEH-100) を用いて 42°C で 20 分腫瘍を局所加温した。腫瘍の温度測定は, INTERNOVA 社製 MODEL TM-54 を用いて行った。薬剤を投与してから 30 分, 1 時間, 2 時間, 6 時間後にマウスを脱血屠殺し、腫瘍および各組織 (心, 肺, 腎, 肝, 脾) を摘出し HPLC 法<sup>7)</sup> により ADR 濃度を測定した。

2) 同様な方法で ADR-Lip+加温群の加温時間を

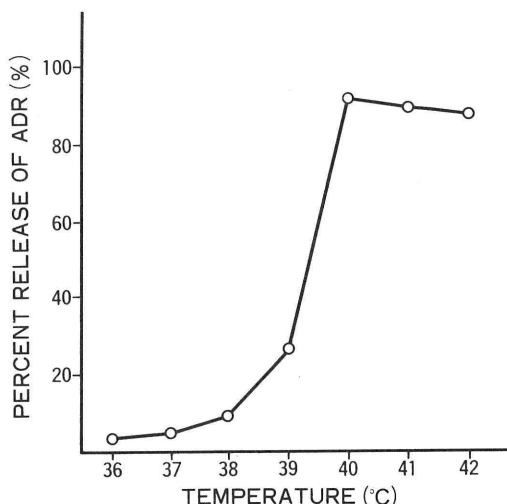


Fig. 2. Temperature dependence of adriamycin (ADR) from a suspension of liposomes in saline.

30 分として 1 時間後の腫瘍内 ADR 濃度を測定し、加温時間 20 分の群と比較した。

#### 4. 移植腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討

1) 腫瘍径が約 8 mm になった時期に, コントロール (無治療) 群, 温熱単独群, free ADR の加温群および非加温群, ADR-Lip の加温群および非加温群の 6 群に分けて (各群 n=10), 実験 3 と同様の方法で治療を行った。抗腫瘍効果の検討は治療 2 週間目の相対的腫瘍増殖率 (治療前の腫瘍体積に対する治療後の腫瘍体積の比率, 腫瘍体積 = 長径  $\times$  短径<sup>2</sup>  $\times$  1/2) および生存率 (10 週間の観察期間) によりおこなった。

2) 上記 6 群の内, 温熱単独群と ADR-Lip 加温群の加温時間を 30 分にした加温条件の違いによる抗腫瘍効果の検討と ADR-Lip 群の ADR 量を 2 倍の 10 mg/kg にした場合の抗腫瘍効果の検討を追加した。

#### 5. 統計処理

ADR 濃度および相対的腫瘍増殖率の有意差検定は t 検定をもって行い, p<0.05 を有意差ありとし, 生存率は Kaplan-Meier 法および一般化 Wilcoxon 検定にて統計学的に処理した。

### IV. 結 果

1. *in vitro* における ADR-Lip の温度放出性  
リポソームからの ADR 放出率を Fig. 2 に示す。

加温温度 36~38°C での放出率は 5.0±0.2~10.0±0.3% と低かったが, 39°C では放出率 28.0±0.6%, 40~41°C での放出率は 86.0±1.0~90.0±0.2% と急激な放出性を示した。

2. 血液中 ADR 濃度の経時的变化

free ADR においては投与後5分から30分まで ADR 濃度は 2.14±0.15 µg/ml から 0.07±0.01 µg/ml と急速に減少し, それ以降180分まで ADR 濃度は 0.04±0.01 µg/ml と緩徐に減少し2相性の経時的变化を示した。これに対して ADR-Lip では ADR 濃度の減少は投与後5分から60分まで 32.15±0.82 µg/ml から 23.23±1.10 µg/ml へと非常に緩徐で, 投与後180分においても 17.0±1.38 µg/ml

であり, free ADR と比べてはるかに高い濃度を維持していた (Fig. 3)。

3. 組織内および腫瘍内 ADR 濃度の検討

心臓の ADR 濃度は6時間後において, free ADR の加温群が 3.2±0.4 µg/g, 非加温群が 3.3±0.6 µg/g, ADR-Lip の加温群が 2.3±0.4 µg/g, 非加温群が 2.6±0.6 µg/g であり, また肺の ADR 濃度も6時間後において, free ADR の加温群が 4.6±1.7 µg/g, 非加温群が 5.3±1.8 µg/g, ADR-Lip の加温群が 2.8±1.1 µg/g, 非加温群が 2.9±1.1 µg/g であり, 心臓や肺の各4群間に経時的にみても有意差はなかった。一方, 腎臓における ADR 濃度は投与後30分において ADR-Lip の加温群が 21.6±5.2 µg/g で, free ADR の加温群が 17.9±2.3 µg/g, 非加温群が 19.5±2.0 µg/g であり3群間には差は認められなかったが, ADR-Lip の非加温群の ADR 濃度は 13.05±5.37 µg/g とこの3群に比較して有意 (p<0.05) に低かった。しかしそれ以降は経時的に4群間に差は認められなかった (Fig. 4)。網内皮系のひとつである肝臓において, ADR-Lip の非加温群の ADR 濃度は free ADR の加温, 非加温群に比較して, 投与後1時間で 25.2±4.8 µg/g, 2時間で 25.8±4.7 µg/g, 6時間で 19.1±2.5 µg/g と経時的に有意 (p<0.05) に高かった。ADR-Lip の加温群の ADR 濃度はその非加温群に比して, 投与後2時間で 18.3±3.7 µg/g, 6時間で 10.9±2.4 µg/g と経時的に有意 (p<0.05) に低かったが, free ADR の加温, 非加温群とは投与後1時間で 23.8±4.8 µg/g, 2時間で 18.3±3.7 µg/g と有

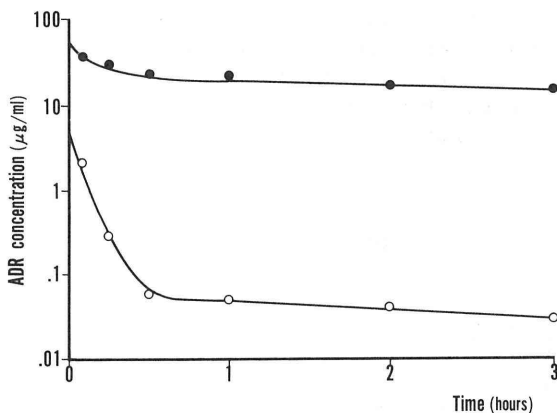


Fig. 3. Time dependent distribution of ADR in blood after the administration of ADR-Lip and free ADR to rats.  
○: free ADR, ●: ADR-Lip

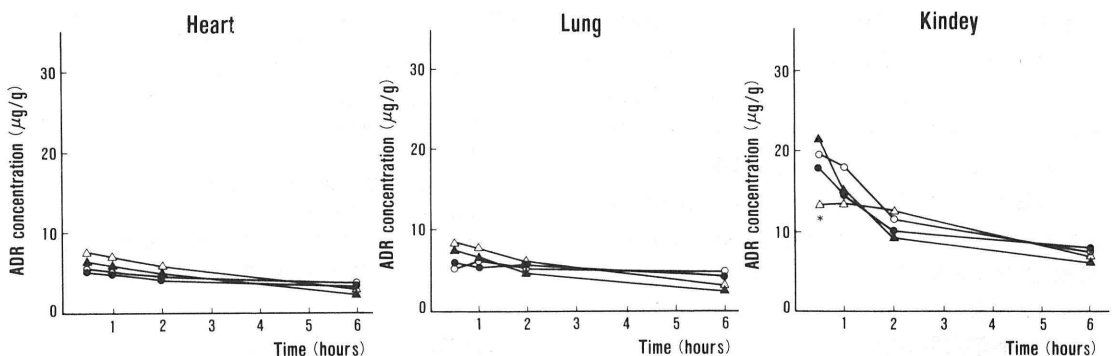
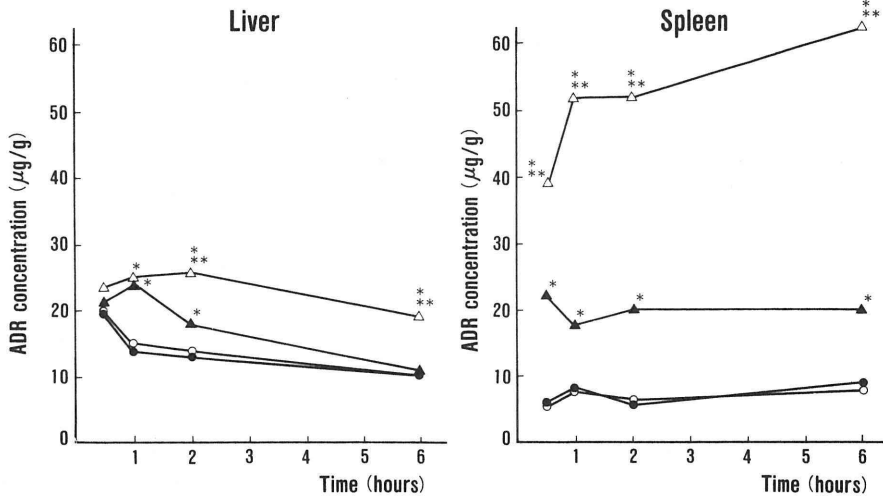


Fig. 4. Time dependent distribution of ADR in tissues (heart, lung and kidney). ADR-Lip and free ADR were i.v. injected into mice with or without hyperthermia. ADR concentration in each tissue at 0.5, 1, 2 and 6 hours after injection was measured by HPLC.  
○: free ADR, ●: free ADR+heat, △: ADR-Lip, ▲: ADR-Lip+heat \*p<0.05, as compared to free ADR, free ADR+heat, ADR-Lip+heat



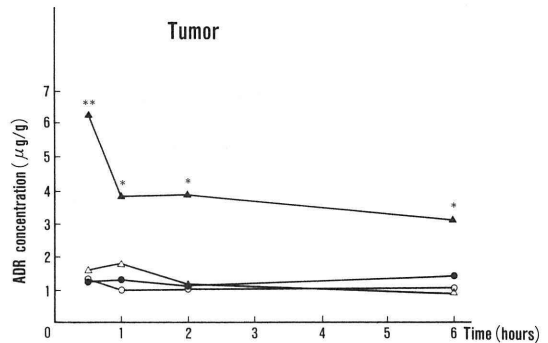
**Fig. 5.** Time dependent distribution of ADR in RES (liver and spleen). ADR-Lip and free ADR were i.v. injected into mice with or without hyperthermia. ADR concentration in RES at 0.5, 1, 2 and 6 hours after injection was measured by HPLC.  
 ○ : free ADR, ● : free ADR+heat, △ : ADR-Lip, ▲ : ADR-Lip+heat  
 \*p<0.05, as compared to free ADR, free ADR+heat  
 \*\*p<0.05, as compared to ADR-Lip+heat

意 (p<0.05) に高かった。網内皮系のもうひとつの主要な臓器である脾臓では、ADR-Lip の非加温群の ADR 濃度は free ADR の加温、非加温群と比較して投与後 30 分で  $38.9 \pm 23.9 \mu\text{g/g}$ 、6 時間で  $62.5 \pm 7.7 \mu\text{g/g}$  と経時的に有意 (p<0.05) に高かった。ADR-Lip の加温群の ADR 濃度はその非加温群に比して、投与後 30 分で  $22.0 \pm 6.1 \mu\text{g/g}$ 、6 時間で  $20.1 \pm 3.8 \mu\text{g/g}$  と経時的に有意 (p<0.05) に低かったが、free ADR の加温、非加温群と比較すると経時的に有意 (p<0.05) に高かった (Fig. 5)。

腫瘍においては、ADR-Lip の加温群の ADR 濃度が free ADR の加温、非加温群および ADR-Lip の非加温群の 3 群と比較して投与後 30 分で  $6.3 \pm 3.0 \mu\text{g/g}$ 、6 時間で  $3.1 \pm 2.2 \mu\text{g/g}$  と経時的に有意 (p<0.05) に高かった (Fig. 6)。ADR-Lip 加温群の加温条件 (加温時間) を変えた場合の腫瘍内濃度を比較すると、加温時間 30 分の ADR-Lip 群の ADR 濃度は  $5.3 \pm 1.6 \mu\text{g/g}$  と加温時間 20 分の群に比して有意 (p<0.01) に高かった (Fig. 7)。

**4. 抗腫瘍効果の検討**

治療開始後 2 週間目の相対的腫瘍増殖率はコントロール群 (無治療群) が  $23.33 \pm 9.70$  であるのに対して、温熱単独群は  $15.98 \pm 4.31$ 、free ADR の加温群および非加温群はそれぞれ  $11.99 \pm 4.21$ 、 $15.31 \pm$



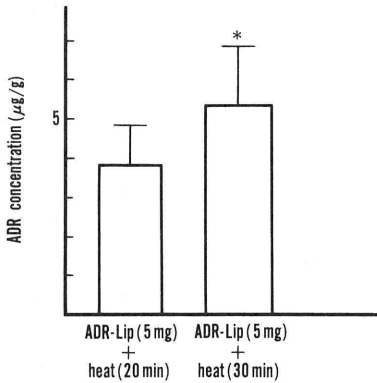
**Fig. 6.** Time dependent distribution of ADR in tumor. ADR-Lip and free ADR were i.v. injected into mice with or without hyperthermia. ADR concentration in tumor at 0.5, 1, 2 and 6 hours after injection was measured by HPLC.  
 ○ : free ADR, ● : free ADR+heat, △ : ADR-Lip, ▲ : ADR-Lip+heat  
 \*p<0.05, \*\*p<0.01, as compared to free ADR, free ADR+heat, ADR-Lip

$1.64$ 、ADR-Lip の加温群および非加温群はそれぞれ  $2.83 \pm 0.66$ 、 $13.52 \pm 3.57$  と治療群が有意 (p<0.01) に低かった。さらに治療群の内、ADR-Lip の加温群が他の 4 群と比較して有意 (p<0.01) に低かった (Fig. 8)。又、加温時間や ADR 量の違いによ

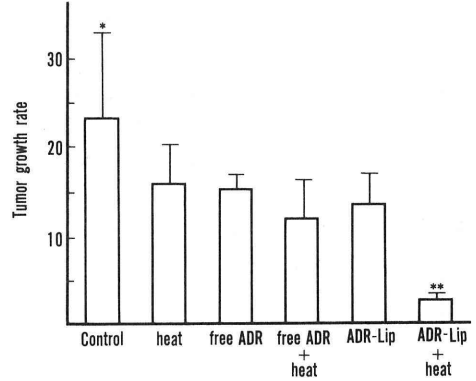
る腫瘍増殖率の差は認められなかった (Fig. 9).

生存率においてはコントロール (無治療群) と治療群に有意な差は認められなかったが, ADR-Lip の加温群に長期生存例が認められた (Fig. 10). 温熱単独群の生存率において, 20分加温群, 30分加温群

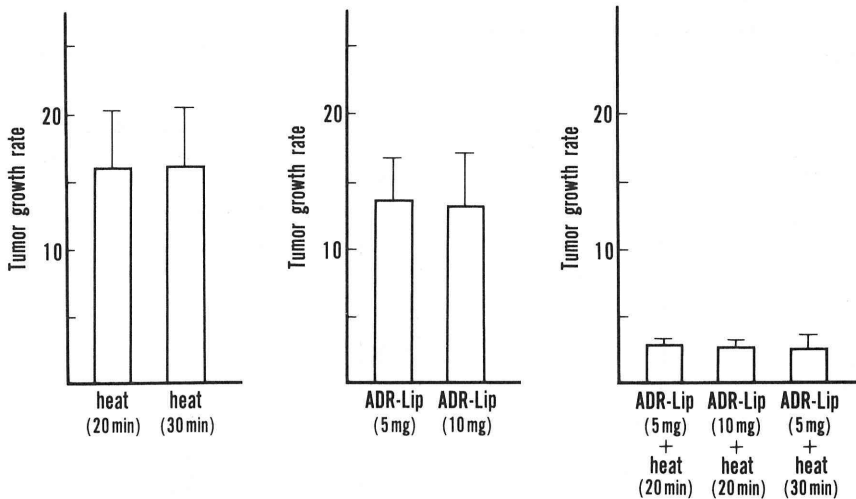
の2群間に有意な差は認められず, また, ADR-Lip の非加温群の生存率において, ADR量 5 mg/kg 群, ADR量 10 mg/kg 群の2群間に有意な差は認められなかった (Fig. 11). ADR-Lip (10 mg/kg) 20分



**Fig. 7.** Effect of heating time on the distribution of ADR to tumor after the administration of ADR-Lip. ADR-Lip were i.v. injected into mice with hyperthermia for 20 minutes or 30 minutes. ADR concentration in tumor at 1 hour after injection was measured by HPLC. A column with a vertical bar represent mean value and SD of the mean, respectively. \* $p < 0.01$



**Fig. 8.** Tumor growth rate 2 weeks after administration of ADR-Lip with hyperthermia as compared with the treated or the untreated control. Tumor growth rates were expressed as the ratio of tumor volume after treatments to volume before treatment. A column with a vertical bar represent mean value and SD of the mean, respectively. \* $p < 0.01$ , as compared to heat, free ADR, free ADR+heat, ADR-Lip, ADR-Lip+heat. \*\* $p < 0.01$ , as compared to heat, free ADR, free ADR+heat, ADR-Lip



**Fig. 9.** Effect of heating time and ADR dose on tumor growth rate 2 weeks after the treatment. Tumor growth rates were expressed as the ratio of tumor volume after treatments to volume before treatment. A column with a vertical bar represent mean value and SD of the mean, respectively.

加温群と ADR-Lip (5 mg/kg) 30 分加温群の生存率は ADR-Lip (5 mg/kg) 20 分加温群に比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に高かった (Fig. 12).

### V. 考 察

リポソームは脂質二重膜の小胞体で閉鎖された人

工膜であり、生体膜モデルあるいは薬物投与剤形として多角的に使用され、特に薬物を標的細胞に運ぶキャリアーとして医学的に応用する試みが盛んに行われてきた。キャリアーとしてのリポソームは種々の薬物をその物理学的性質に応じて内水層または膜内に封入することが可能であり、封入された薬物の失活を防ぎ、さらに薬物自体の毒性の軽減が期待できる。またリポソーム自体は生体膜由来の脂質を用いているので毒性も低く抗原性も否定されている<sup>8)</sup>。このような利点をもつリポソームの構成成分となるリン脂質は、それぞれ固有の相転移温度を有しており、例えば dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) は 41°C, distearoyl phosphatidylcholine (DSPC) は 54°C, dipalmitoyl phosphatidylglycerol (DPPG) は 41°C, dipalmitoyl phosphatidylserine (DPPS) は 51°C であり、混合脂質の相転移温度はそれぞれ脂質の重量比例配分によって得られた温度に近似した値となる。つまり種々の脂質の組合せにより、理想とする温度で封入した薬剤を放出させるリポソームを調製することは可能である。このような熱感受性リポソームに抗癌剤を封入したのち全身投与すれば、腫瘍部位を局所温熱により相転移温度以上に加温することによりリポソームは加温部位である腫瘍を通過する間にゲル相から液晶相へ相転移し、封入した抗癌剤は放出され、腫瘍局所への抗癌剤の選択的集積が可能となる。リポソームはその形態で multilamellar vesicle (MLV), small unilamellar vesicle (SUV), large unilamellar vesicle

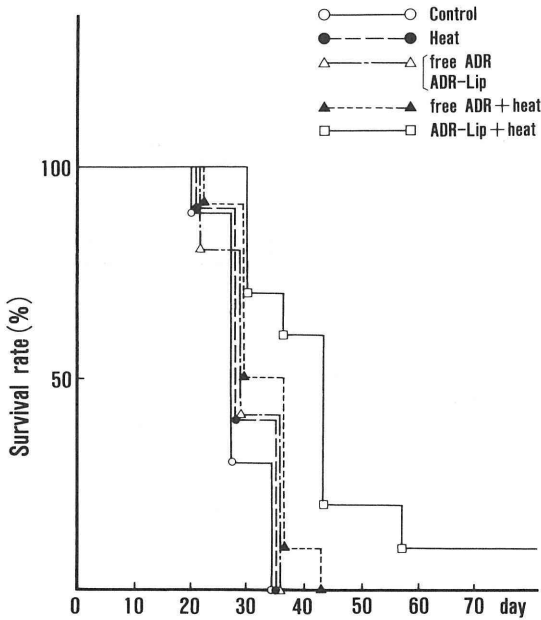


Fig. 10. Survival rates of tumor-bearing mice treated with no therapy as control, hyperthermia alone, free ADR with or without hyperthermia, and ADR-Lip with or without hyperthermia.

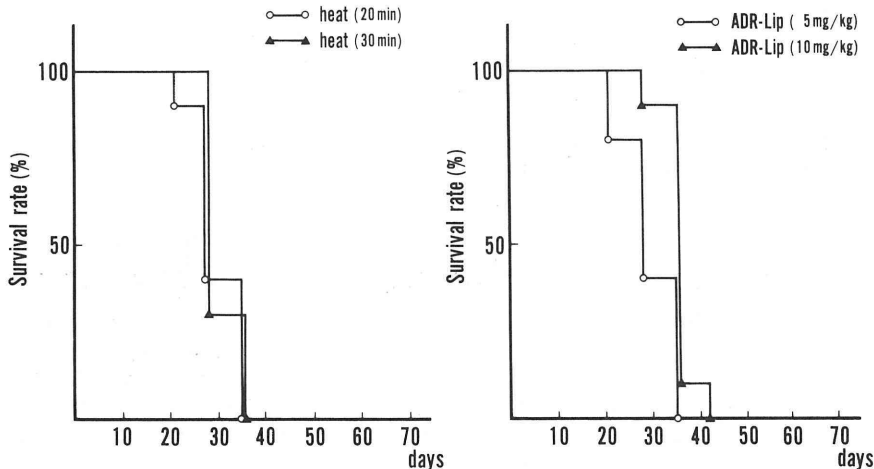


Fig. 11. Survival rates of tumor-bearing mice treated with hyperthermia alone for 20 minutes or 30 minutes, and ADR-Lip at a dose of 5 mgADR/kg or 10 mgADR/kg.

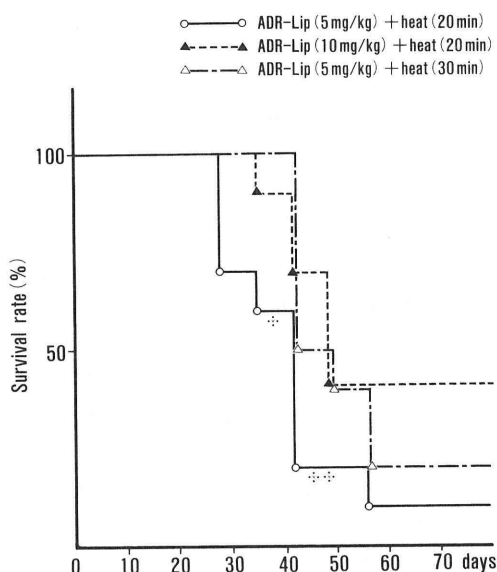


Fig. 12. Survival rates of tumor-bearing mice treated with ADR-Lip (5 mg/kg) plus hyperthermia (20 min), ADR-Lip (5 mg/kg) plus hyperthermia (30 min), and ADR-Lip (10 mg/kg) plus hyperthermia (20 min).

※ $p < 0.01$ , as compared to ADR-Lip (5 mg/kg) + heat (30 min)

※※ $p < 0.01$ , as compared to ADR-Lip (10 mg/kg) + heat (20 min)

(LUV)の3種類に分類される。これらのうちLUVは加温時における薬物放出の効率が高く、熱感受性リポソームとして最適である。これに対してSUVは薬物保持効率が低く、安定性が不十分なため温度放出率が低く、MLVも同様に不安定で、かつ広い温度範囲で薬物を放出するため熱感受性リポソームとしては不適である<sup>4)9)10)</sup>。

本研究では、広い抗癌スペクトラムを有するADRを用い、DPPCとDSPCを9:1の割合で逆相蒸発法により調製したLUVのひとつであるREV (reversephase evaporation vesicle)で検討した。

*in vitro*でのADR-Lipの温度放出については39~41°Cの間で急激な放出性を示し、41°CにおけるADRの放出率は86%であり、通常温熱療法に用いられる温度が42.0~43.5°Cであるので、理想的な相転移温度を有している。また、*in vivo*におけるADR-Lipの血液中の経時的なADR濃度はfree ADRと比べてはるかに高く、腫瘍を局所加温してADRを腫瘍に集積させるうえで十分な安定性を有

している。

マウスの大腿皮下に移植した腫瘍の加温方法としてこれまでは恒温水槽が用いられてきたが、この場合はマウスの後肢全体が加温されるため腫瘍以外の部位も加温され、局所加温としてはやや不十分なものであった。これに対して、腫瘍をアプリケーションで挟み込むRF加温装置では腫瘍のみを局所的に加温することが可能であり、今回の実験では最も適した加温方法と考えられる。

今回の検討ではADR-Lip加温群での腫瘍内ADR濃度が他群より経時的に有意に高い濃度を示し、また加温時間を20分から30分にするにより腫瘍内ADR濃度がさらに高まった。これらの結果は投与されたりポソームが循環して加温された腫瘍血管内で温度依存的に薬物を放出し、濃度勾配にしたがって腫瘍組織に移行したためと考えられる。又、加温時間を長くすることにより腫瘍内濃度が高まることは、残存して循環しているリポソームが腫瘍血管内で加温され薬物が放出されるためと考えられる。

主要臓器のうち、心臓および肺のADR濃度は4群間に経時的に有意差はみられなかった。腎臓のADR濃度は投与後30分においてADR-Lipの非加温群が他の3群より有意に低く、それ以降は経時的に4群間に差はみられなかった。これら3臓器の中では、free ADRは投与されると腎臓へ速やかに分布し、加温によりリポソームから放出されたADRもまた腎臓へ速やかに集積されるために腎臓においては差がみられ、心臓および肺においては差がみられなかったと考えられる。今回の検討では、心臓へのADRの移行性はfree ADR群とADR-Lip加温群では差が認められなかったが、free ADR群と同等の腫瘍内ADR濃度を得る場合、ADR-Lip加温群では投与量を下げることができ、心毒性対策も期待できる。肝臓および脾臓においてADR濃度はADR-Lip群がfree ADR群に比較して経時的に有意に高く、そしてADR-Lip群の内では加温群が非加温群に比べて有意に低いことが示された。肝臓や脾臓は細網内皮系のひとつであるが、リポソームは静脈内投与をすると細網内皮系に取り込まれやすい性質をもっており、今回の結果もこのような特性によるものと考えられる。ADR-Lip加温群で肝臓や脾臓へのADRの集積が抑制されたが、これは局所加温することによりリポソームからADRが放出され



たためと考えられる。リポソームに封入された薬剤は細網内皮系に取り込まれやすく、これまで副作用が懸念されてきたが、加温を用いることにより細網内皮系への取り込みは幾分抑制され、副作用の可能性を軽減させるものと考えられる。

抗腫瘍効果では、腫瘍増殖率および生存率の面からみて ADR-Lip 群は free ADR 群と比べリポソーム封入自体による効果は認められなかった。リポソームに温熱を併用した ADR-Lip 加温群では free ADR 群などの他群に比較して腫瘍の増殖が有意に抑制されたが、生存率において有意差は認められず、投与量を倍にした場合および加温時間を 30 分に延長した場合に始めて生存率の有意な改善が認められた。これらの結果はリポソームに温熱を併用することにより始めて腫瘍内の ADR 濃度が高められ、そして投与量の増加および加温時間の延長により、さらに腫瘍内の ADR 濃度が高められたという結果によるものと考えられる。尚、加温時間延長による加温そのものの影響は一温熱単独群での加温時間の違いによる差がないという結果から一考えられず、また温熱と ADR との相乗効果に関しては、報告者により一定の見解がないが<sup>11)12)13)</sup>、今回の free ADR の非加温および加温群の比較結果からは相乗効果は明らかではなかった。

本研究では熱感受性リポソームと温熱療法の併用の有用性について実験的に示してきたが、実際に臨床で用いる場合はいくつかの問題を解決していかねばならない。第一に ADR の封入率の問題である。今回用いたものは約 20~25% と低く、封入率を上げる工夫が必要である。第二にリポソームは細網内皮系に取り込まれやすく、細網内皮系における薬物濃度の上昇が新たな副作用を生む可能性があるということである。最近、細網内皮系を回避する手段としてガングリオシド GM 1<sup>14)</sup> やポリエチレングリコール<sup>15)</sup> をリポソーム膜に付与することが報告されており、これらの報告を手掛かりに細網内皮系を回避することが可能となれば、腫瘍への薬物の集積もさらに高められることが期待される。第三に温熱療法における加温技術の問題があげられる。最近、腔内加温などの開発により深在性腫瘍に対する加温技術も進歩してきたが、温度モニターの問題を含めて局所温熱療法のさらなる進歩が望まれる。

抗癌剤封入熱感受性リポソームと温熱療法を併用した癌治療法は、今後これらの問題点を中心に改善

されていくことで広く臨床応用のできるものとして期待される。

## VI. 結 語

アドリアマイシン封入熱感受性リポソーム (ADR-Lip) を作製し、動物の腫瘍モデルを用いて温熱療法との併用効果について検討した。

1. ADR-Lip に温熱を併用することにより ADR と比較して腫瘍内への集積が経時的に高く維持された。

2. 心、肺、腎においては ADR-Lip に温熱を併用することにより経時的に free ADR と同様な濃度推移を取った。

3. 細網内皮系(肝、脾)において ADR-Lip は free ADR に比べて経時的に高濃度が維持されるが、温熱により抑制された。

4. ADR-Lip に温熱を併用することにより ADR と比較して腫瘍の増殖は有意に抑制されるが、生存率においては有意差は認められなかった。

5. ADR-Lip 加温群において、加温時間を延長することにより腫瘍内濃度は増加し、生存率も有意に改善された。

以上より、ADR-Lip に局所温熱療法を併用するターゲティング療法は癌治療として有用であり、臨床的意義を十分期待し得るものと考えられた。

稿を終えるにあたり、本実験に御協力いただいた本学薬剤部員各位に謝辞を申し上げます。

本論文の要旨は、第 78 回消化器病学会総会、第 34 回消化器病学会大会において発表した。

## 文 献

- 1) Yatvin, M.B. et al: Design of liposomes for enhanced local release of drugs hyperthermia. *Science* **202**: 1290~1293, 1978
- 2) Giavazzi, R. et al: Metastatic behavior of tumor cells isolated from primary and metastatic human colorectal carcinomas implanted into different sites mice. *Cancer Res.* **46**: 1928~1933, 1986
- 3) Szoka, F., Papahadjopoulos, D.: Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 4149~4198, 1978

- 4) 伊賀勝美, 小川泰亮: 熱感受性リポソームによる腫瘍へのターゲティング. 生物薬剤学の最近の進歩, 伊賀立二, 奥村勝彦編, 薬業時報社, 東京, 1988 p. 416~425
- 5) 小川泰亮, 戸口 始: 熱感受性リポソームを用いた標的治療. 癌と化学療法 **17**(6): 1127~1133, 1990
- 6) 増池建年, 大獄純一, 武本宣教: 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のアドリアマイシンとその代謝物の定量 (第1報) 直接注入法による血清, 血漿の分析. 薬学雑誌 **104**(6): 614~619, 1984
- 7) 増池建年, 大獄純一, 武本宣教: 高速液体クロマトグラフィーによる生体試料中のアドリアマイシンとその代謝物の定量 (第2報) 抽出法による組織の分析. 薬学雑誌 **104**(6) 高速620~623, 1984
- 8) 多田隈卓史: 薬剤担体としてのリポソーム人工脂質膜小胞とその生体への応用. 慶應医学 **50**(2): 145~153, 1981
- 9) Magin, R.L., Weinstein, J.N.: Delivery of drugs in temperature-sensitive liposomes. Targeting of drugs, Ed. by G. Gregoriadis, J. Senior, A. Trouet, Plenum Press, New York, 1982 p. 203~221
- 10) Iga, K. et al: Heat-specific drug release of large unilamellar vesicle as hyperthermiamediated targeting delivery. Int. J. Pharmaceutics **57**: 241~251, 1989
- 11) Hahn, G.M. et al: Thermochemotherapy: Synergism between hyperthermia (42-43°C) and adriamycin (or bleomycin) in mammalian cell inactivation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA **72**: 937~940, 1975
- 12) Magin, R.L. et al: Distribution of adriamycin in mice under conditions of local hyperthermia which improve systemic drug therapy. Cancer Treat. Rep. **64**: 203~210, 1980
- 13) Marmor, J.B., Kozak, D. and Hahn, G.M.: Effects of systemically administered bleomycin or adriamycin with local hyperthermia on primary tumor and lung metastases. Cancer Treat. Rep. **63**: 1279~1290, 1979
- 14) Allen, T.M. et al: Liposomes with prolonged circulation times: factors affecting uptake by reticuloendothelial and other tissues. Biochim. Biophys. Acta **981**: 27~35, 1989
- 15) Alexander, L.K. et al: Amphipathic polyethylene glycols effectively prolong the circulation time of liposomes. FEBS Lett. **268**: 235~237, 1990

(別刷請求先: 〒160 新宿区西新宿 6-7-1

東京医科大学内科学教室第4講座 堀部俊哉)