

## Liposome 封入 Adriamycin の経気管支鏡的 縦隔リンパ節内局所注入法による Drug Delivery System の実験的研究

東京医科大学外科学第一講座 (指導: 加藤治文主任教授)

魏 柏 榮 高 橋 秀 暢

**【要旨】** 本研究では liposome 封入 Adriamycin (Lip-ADM) を作製し、肺癌の縦隔リンパ節転移に対する治療を目的として、その投与方法及び臨床応用の可能性を実験的に検討した。

成犬の気管分岐部リンパ節に Lip-ADM 0.5 mg/kg を経気管支鏡的局所注入し、同時に静脈内投与 (Lip-ADM 2.0 mg/kg) 及び胸腔内投与 (Lip-ADM 1.0 mg/kg) を比較対照群として、次の項目にて実験検討した。(1) ADM の血中動態 (2) 胸腔、腹腔内臓器別及び縦隔リンパ節内の ADM の放出減衰曲線 (3) 病理組織の検索 (4) 縦隔リンパ節での Lip-ADM の減衰曲線から *in vitro* で抗腫瘍効果の予測。

その結果、注入リンパ節のみならず他の縦隔リンパ節へも高濃度に Lip-ADM の集積が認められた。また周囲正常組織にほとんど影響を与えることなくその徐放性が認められ、しかも強い抗腫瘍効果が得られる可能性が示された。

### 緒 言

肺癌のリンパ行性転移に対する治療法としては、外科的郭清、化学療法、放射線療法などがある。局所療法として最も確実と考えられる方法である外科的郭清にしても、手術側とは反対側の縦隔リンパ節の郭清は困難である。縦隔の解剖学的構造から、完全郭清の可能な範囲は制限され、両側郭清を行ったとしても十分とは言い難い。我々の教室でも肺癌手術後の再発様式として、約半数はリンパ節転移と局所再発であることから、より効果的な術後補助療法が望まれている。従来 of 合併療法では転移リンパ節への効果に限界が生じてきており、より以上の効果を期待する為には広範囲に高濃度の有効な抗腫瘍剤がリンパ節内、リンパ管内に到達し作用することが必要と考えられる。

1964 年 Bangham が生体膜脂質によって形成される膜様構造体が閉鎖小胞であることを発見し<sup>1)</sup>、以来人工的に脂質から構成される閉鎖小胞が liposome と称されている。liposome は無毒性かつ

徐放性の性質があり、薬剤の無修飾的封入が可能であり、医学領域では薬剤の carrier として使用されてきている<sup>2),3)</sup>。

本研究では liposome 封入 Adriamycin (Lip-ADM) を用い、動物実験にて経気管支鏡的縦隔リンパ節内局所注入法における体内薬理動態を、他の投与経路 (静脈内投与と胸腔内投与) と比較検討するとともに、その抗腫瘍効果の予測及び臨床応用の可能性について検討した。

### 方 法

実験動物には体重 10~15 kg の成犬を用い、経気管支鏡的に気管分岐部リンパ節に Lip-ADM を局所注入し、Lip-ADM の胸腔内投与及び静脈内投与を対照群として比較検討した。各処置時の麻酔はケタラール 10 mg/kg の筋肉注射を行った。それにて自発呼吸下、約 20~30 分間の麻酔状態が得られた。抗腫瘍効果の検討のために、*in vitro* で、我々の教室で樹立したヒト肺腺癌培養株である PC-9 を用い、clonogenic assay 法にて、7 日間培養における腫瘍

1995 年 6 月 9 日受付, 1995 年 6 月 28 日受理

キーワード: リポソーム, アドリアマイシン, 肺癌, 気管支鏡的治療, 局所注入。

(別刷請求先: 〒300-03 茨城県稲敷郡阿見町中央 3-20-1 東京医科大学霞ヶ浦病院呼吸器科 魏柏榮)

細胞の抗癌剤感受性試験を行ない、腫瘍細胞の survival rate (%) と ADM の Area Under the Curve (以下 AUC と略す) との相関を求めた。

1. liposome 封入 ADM の作製

近年, Mayer らは<sup>4)</sup>, liposome 内外相の水素イオン濃度差を利用して, ADM を liposome 内に高率に封入する方法 (pH 勾配法) を開発した。本研究では局所投与量を減少し, 局所正常組織障害を可能な限り回避するために, 高封入率の Lip-ADM を得るべく pH 勾配法により作製した<sup>5)</sup>(表 1)。作製した Lip-ADM は封入率約 98% であり, 薬液濃度は ADM 量として 3.0 mg/ml に調整した。また, liposome の粒子径は 150 nm に調整し使用した。血中及び組織内の ADM 濃度は, 高速液体クロマトグラフィー法<sup>6)</sup> (HPLC 法) にて測定した。(ADM は協和発酵株式会社より供与された)

2. 投与方法の比較検討

投与方法は経気管支鏡的気管分岐部リンパ節局所注入(リンパ節注入群), 左胸腔内投与と静脈内投与の三つの経路を比較した。

A 群 (n=9) : リンパ節注入群

- A-1 群 (n=3) : 注入後 7 日目に剖検した。
- A-2 群 (n=3) : 注入後 14 日目に剖検した。
- A-3 群 (n=3) : 注入後 21 日目に剖検した。

成犬をケタラルール筋肉注射で麻酔し, 自発呼吸下で気管支鏡を施行し, 経気管支鏡的に TBAC 針 (Trans-Bronchial Aspiration Cytology needle) を挿入, 気管分岐部リンパ節に刺入し, Lip-ADM 0.5 mg/kg を注入した (図 1)。

B 群 (n=3) : 胸腔内投与

成犬 3 頭をケタラルール筋肉注射で麻酔し, 16 Fr. Trocha を左胸腔内に挿入し, Lip-ADM 1.0 mg/kg を胸腔内注入後, ドレーンを直ちに抜去した。投与後 7 日目に剖検した。

C 群 (n=3) : 静脈内投与

Lip-ADM 2.0 mg/kg を成犬 3 頭に静脈内投与し, 投与後 3 日目に剖検した。

3. 血行動態の検討

Lip-ADM 投与前および投与後 5, 10, 15, 30 分, 1, 2, 4, 24, 48 時間に採血し, 直ちに 1500 rpm, 15 分で遠沈後その上清 (血清) を取り, HPLC にて血中 ADM 濃度を測定するまで -90°C に保存した。

4. 組織内 ADM 濃度の検討

実験犬剖検し, 縦隔リンパ節, 気管, 肺, 胸膜,

表 1 Liposome 封入 ADM の作製 (pH 勾配法)

DPPC=100mg cholesterol=30mg	DPPC/cholesterol=2/1(molar ratio) mixture in chloroform
lipid film	
lipid dispersion (60°C)	add 2ml of 300mM citric acid (pH4.0)
sonication (5min)	
dialysis in saline (24hrs)	filtration by 0.2 m polycarbonate membrane (5min) add 7ml of 300mM citric acid (pH7.8) add 0.4ml of 1N NaOH add 10ml of DXR solution at 60°C (2.5mg/ml in 300mM citric acid (pH7.8))
Lip-ADM	

Diphosphatidylcholine (DPPC) 100 mg と cholesterol 30 mg (脂質組成比 DPPC : cholesterol = 2 : 1 (モル比)) をフラスコ内で 4 ml のクロロフォルムに溶解し, ロータリー式エバポレーターで溶媒を減圧除去し, フラスコ内壁面に均一な脂質の薄膜を作製した。このフラスコ中に 2 ml の 300 mM クエン酸 (pH 4.0) を加え, 60°C にて Vortex ミキサーで振盪脂質懸濁液を作製した。この脂質懸濁液を 10 分間超音波処理し, 空の多重層 liposome を作製した。0.2 μm サイズの polycarbonate membrane を用いて濾過し, 粒子径を 200 nm に揃えた。作製された liposome 溶液に IN の NaOH を加え, liposome 外相液を pH 7.8 に調整し, 蒸留水に溶解した ADM 25 mg を加えて, 60°C の恒温槽内で 10 分間軽く振盪しながら加温し, liposome 内に ADM を封入した。Sephadex G-50 カラムにて liposome に封入されていない ADM を lip-ADM より分離した。

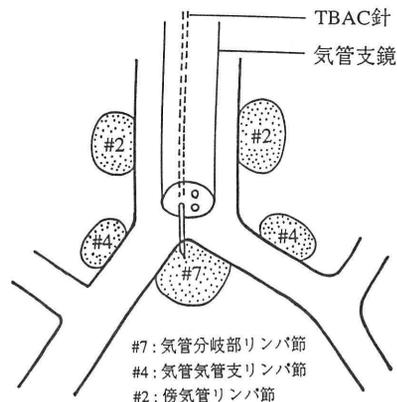


図 1 気管分岐部リンパ節への薬剤注入法  
気管支鏡を施行し, 経気管支鏡的に TBAC 針 (Trans-Bronchial Aspiration Cytology needle) を挿入, 気管分岐部リンパ節に刺入し, 薬剤を注入する。

胸腺, 胸水, 食道, 心臓, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 小腸の各臓器を採集, 組織内 ADM 濃度を測定のために, 直ちに  $-90^{\circ}\text{C}$  に測定まで保存するとともに一部はホルマリン固定し, 組織学的検討もあわせて行なった。

#### 4-1. 投与経路別の組織内 ADM 濃度の検討

A-1 群, B 群, C 群実験犬の胸腔, 腹腔臓器組織内 ADM の集積を比較検討した。

#### 4-2. リンパ節注入群の経時的縦隔リンパ節内 ADM 集積変化の検討

犬で常時採取できる縦隔リンパ節は 3 群あり, 便宜上ヒトでの肺摘取扱い規約に対応させ, 気管分岐部リンパ節 (#7 lymph node: L.N.), 気管気管支リンパ節 (#4 L.N.), 傍気管リンパ節 (#2 L.N.) と呼称した。リンパ節注入群の各縦隔リンパ節, 胸腔, 腹腔臓器組織内 ADM の集積及び減衰を週間単位で比較検討した。

#### 5. 抗腫瘍効果の検討

Lip-ADM の抗腫瘍作用はそれ自体には抗腫瘍活性がなく, liposome が崩壊することによって遊離した ADM が抗腫瘍活性を有している。従って, 縦隔リンパ節における抗腫瘍効果はリンパ節に集積した Lip-ADM から遊離した ADM の総量によるものと考え, 次の検討を行なった。

#### 5-1. PC-9 肺腺癌細胞増殖に対する *in vitro* で ADM の抗腫瘍効果の検討

Clonogenic assay<sup>7)</sup> によって, 二重軟寒天培養法により行なった。直径 35-mm petri dish に RPMI 1640+10%FCS+0.5%agar 1 ml を下層とし, 上層は PC-9 肺腺癌細胞  $1 \times 10^3$  個を RPMI 1640+10%FCS+0.3% agar+ADM が 1 ml となるように調整して plating した。実験はすべて triplicate で行ない, インキュベーター内で  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ /95%room air, 水蒸気飽和の条件下で 7 日間培養した後に, 単一細胞の繰り返される倍化によって形成される細胞集落 (コロニー: 細胞数 50 個以上である集落はコロニーとした) の数を, 自動コロニーカウンターで計測した。ADM の各濃度が 0.001 mg/ml, 0.003 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.03 mg/ml, 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 1.0 mg/ml となるように調整し, control として生理食塩水を用いた。実験は全て 3 回行ない, 各 ADM 濃度での PC-9 肺腺癌細胞のコロニー数から ADM の AUC との dose-response curve を求めた。

#### 5-2. 縦隔リンパ節で遊離した ADM の抗腫瘍効果の検討

気管分岐部リンパ節, 気管気管支リンパ節と傍気管リンパ節内 ADM の週間減衰曲線を求め, ADM の週間遊離量は Area Above the Curve (以下 AAC と略す) として算定した。縦隔リンパ節における AAC と対応した *in vitro* での PC-9 に対する殺細胞効果を検討した。

#### 6. 局所投与による組織障害性の検討

気管分岐部リンパ節 Lip-ADM 局所注入後, 各臓器における ADM 濃度を測定するとともに, 組織障害の有無について, 週間毎に気管注入部, 縦隔リンパ節, 胸腔, 腹腔内各臓器の組織学検索を行なった。

### 結 果

#### 1. 血行動態の検討

Lip-ADM 投与経路別の ADM 血行動態を (図 2) に示した。Lip-ADM (2.0 mg/kg) 静脈内投与群では投与後 5 分で最高血中濃度  $12.48 \pm 1.01$  mg/ml (mean  $\pm$  SD) を示し, その後, 急速に減少していた。

Lip-ADM (1.0 mg/kg) 胸腔内投与群では, 投与後 15 分で最高血中濃度  $0.085 \pm 0.013$  mg/ml に達した後, 4 時間目の  $0.007 \pm 0.005$  mg/ml まで急速に減少し, その後徐々に低下した。Lip-ADM (0.5 mg/kg) リンパ節注入群では, 投与後の ADM 濃度は徐々に上昇し, 投与後 2 時間で最高値  $0.046 \pm 0.007$  mg/ml を示し, 次第に減少した。

#### 2. 組織内 ADM 濃度の検討

投与経路別の組織内 ADM 濃度は (図 3) に示した如くであった。リンパ節注入群では投与後 1 週目

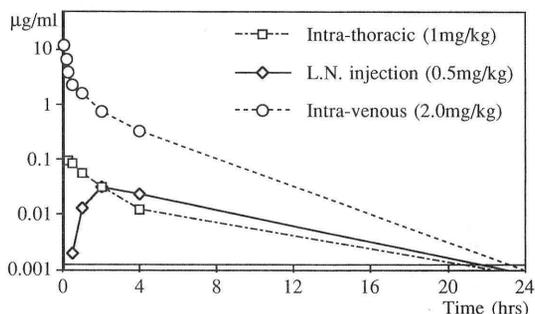


図 2 Lip-ADM 投与方法別の血行動態  
経気管支鏡的気管分岐部リンパ節注入, 左胸腔内投与と静脈内投与の三つの投与経路における Lip-ADM 投与後血中 ADM の濃度変化。

で縦隔リンパ節(#7 L.N.  $22.04 \pm 3.66$  mg/g, #4 L.N.  $13.99 \pm 2.80$  mg/g, #2 L.N.  $4.63 \pm 2.36$  mg/g) 及び縦隔臓器(気管注入部  $8.56 \pm 1.65$  mg/g, 胸腺  $6.62 \pm 2.25$  mg/g, 食道  $2.93 \pm 2.06$  mg/g) の高濃度集積を認め、肝臓 ( $0.277 \pm 0.10$  mg/g) と脾臓 ( $0.123 \pm 0.036$  mg/g) は低集積であった。胸腔内投与群の投与後1週目での最大集積臓器は胸膜 ( $2.75 \pm 1.28$  mg/g) で、縦隔リンパ節では#7 L.N. で  $2.32 \pm 1.45$  mg/g, #4 L.N. で  $2.4 \pm 1.73$  mg/g, #2 L.N. で  $1.71 \pm 1.52$  mg/g であった。静脈内投与群では投与後3日目で、脾臓 ( $8.59 \pm 4.86$  mg/g) の最大集積が観察され、肝臓で  $2.36 \pm 2.18$  mg/g, 縦隔リンパ節では#7 L.N. で  $2.95 \pm 1.83$  mg/g, #4 L.N. で  $3.95 \pm 2.05$  mg/g, #2 L.N. で  $1.15 \pm 1.23$  mg/g であった。

3. リンパ節注入群の経時的縦隔リンパ節内 ADM 集積変化の検討

リンパ節注入群の胸腔、腹腔各臓器組織内 ADM 濃度の経時変化は(図4)に示した如くであった。縦隔リンパ節における ADM の組織内濃度変化は、#7 L.N. で1週目の  $22.04 \pm 3.66$  mg/g から3週目の  $1.08 \pm 1.36$  mg/g まで、#4 L.N. では1週目の  $13.99 \pm 2.80$  mg/g から3週目の  $1.48 \pm 1.80$  mg/g

まで、#2 L.N. では1週目の  $4.63 \pm 2.36$  mg/g から3週目の  $1.15 \pm 1.38$  mg/g まで経時的に減少していたが、3週間経過しても充分測定が可能な濃度が維持されていた。また、正中の#7 L.N. より局所注入した後、左右縦隔リンパ節(rt.#4, lt.#4, rt.#2, lt.#2)への ADM 集積が同時に認められた(図5)。

4. 抗腫瘍効果の検討

4-1. PC-9 肺腺癌細胞増殖に対する *in vitro* での ADM の抗腫瘍効果の検討

*In vitro* で、PC-9 肺腺癌株を用い、clonogenic assay 法にて、7日間での癌細胞の survival rate (%) と ADM の AUC との dose response curve ( $y = 7.031 x^{-0.859}$ ) を求めた(図6)。この結果を縦隔リンパ節内の週間 ADM 遊離量の殺細胞効果検討の標準曲線とした。

4-2. 縦隔リンパ節内に遊離した ADM の抗腫瘍効果の検討

気管分岐部リンパ節、気管気管支リンパ節、傍気管リンパ節における ADM 減衰曲線を作成し、週間毎の ADM 遊離量は AAC と考え、算出した(図7)。各リンパ節における AAC を AUC と比較し、 $y = 7.031 x^{-0.859}$  の方程式にて予測 cell kill rate (%) を求めた(表2)。各リンパ節における抗腫瘍効果は

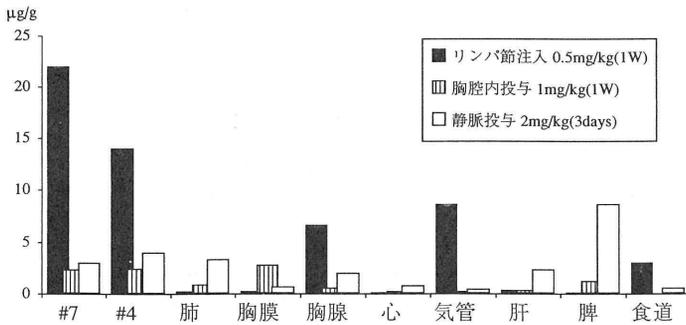


図3 投与方法による臓器内 ADM 濃度の比較  
気管分岐部リンパ節注入群(Lip-ADM 0.5 mg/kg, 7日目に剖検)、左胸腔内投与群(Lip-ADM 1.0 mg/kg, 7日目に剖検)と静脈内投与群(Lip-ADM 2.0 mg/kg, 3日目に剖検)の各胸腔、腹腔臓器内 ADM 濃度の比較。

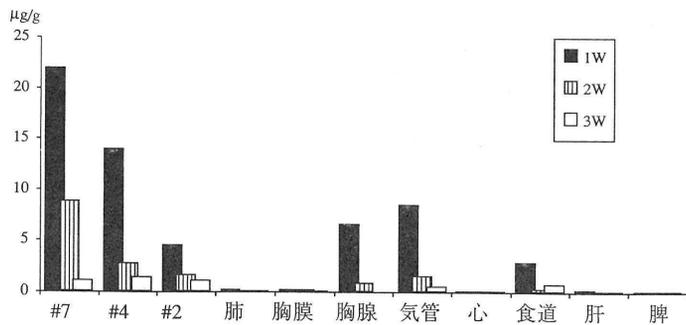


図4 リンパ節注入群の経時的臓器内 ADM 濃度の変化  
気管分岐部リンパ節注入群 Lip-ADM 0.5 mg/kg を注入後、週間毎の各胸腔、腹腔臓器内 ADM 濃度の変化。

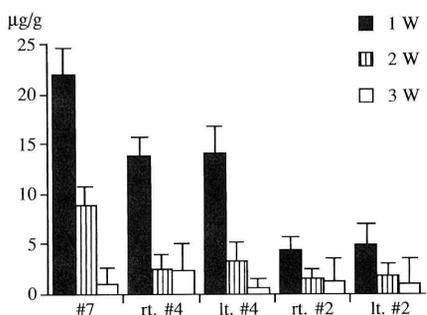


図 5 左右縦隔リンパ節の ADM 集積の比較  
気管分岐部リンパ節に Lip-ADM 0.5 mg/kg を注入後, 左右気管支リンパ節 (rt. & lt. #4 L.N.), 左右傍気管リンパ節 (rt. & lt. #2 L.N.) ADM 集積の比較.

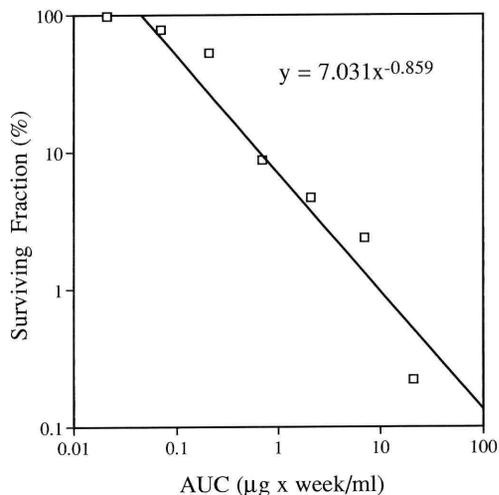


図 6 PC-9 腺癌細胞の生存率と ADM の AUC との関連曲線

*In vitro* で, PC-9 肺腺癌株を用い, clonogenic assay 法にて, 7 日間での癌細胞の survival rate (%) と ADM の AUC (Area Under the Curve) との dose response curve ( $y=7.031x^{-0.859}$ ) を求めた).

#7 L.N. では 1~2 週目 98.6%, 2~3 週目 97.8%; #4 L.N. では 1~2 週目 98.4%, 2~3 週目 90.3%; #2 L.N. では 1~2 週目 94.9%, 2~3 週目 79.0% の cell kill rate (%) と予測された。縦隔リンパ節内で遊離したと考えられる ADM の抗腫瘍効果は 3 週目まで観察された。

### 5. 局所投与による組織障害性の検討

Lip-ADM 局所注入後 1 週目の気管刺入部及び気管分岐部リンパ節の組織所見を (写真 1, 写真 2) に示

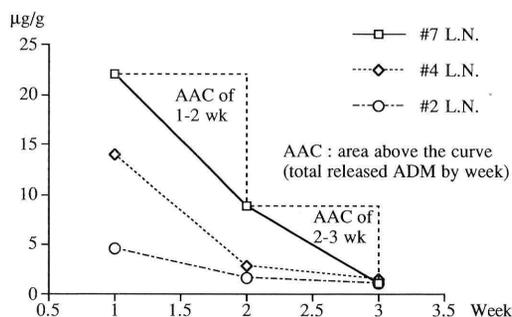


図 7 縦隔リンパ節内 ADM 濃度の変化と AAC の推算

気管分岐部リンパ節 (#7 L.N.), 気管支リンパ節 (#4 L.N.), 傍気管リンパ節 (#2 L.N.) における ADM 減衰曲線を作成し, 週間毎の ADM 遊離量は AAC (Area Above the Curve) と考え, 算出した。

表 2 縦隔リンパ節における AAC (area above the curve) と対応させた *in vitro* での PC-9 に対する殺細胞効果

	#7 L.N.		#4 L.N.		#2 L.N.	
period	1-2wk	2-3wk	1-2wk	2-3wk	1-2wk	2-3wk
AAC(µg x wk/mg)	6.578	3.902	5.572	0.685	1.457	0.279
Cell Kill Rate (%)	98.6	97.8	98.4	90.3	94.9	79.0

気管支分岐部リンパ節 (#7 L.N.), 気管支リンパ節 (#4 L.N.), 傍気管リンパ節 (#2 L.N.) における週間毎の ADM 遊離量は AAC と考え, 算出した。各リンパ節における AAC を AUC と比較し,  $y=7.031x^{-0.859}$  の方程式にて予測週間毎の cell kill rate (%) を求めた。 $y=7.031x^{-0.859}$  方程式の算出が図 6 にて説明した。

した。リンパ濾胞などの正常構造が保たれ, 組織の破壊所見は認められず, 非特異性炎症所見が僅かに認められたのみであった。その他の臓器の病理組織学的検索を行なったが異常所見を認めず, Lip-ADM 局所注入による正常組織への障害は認めなかった。

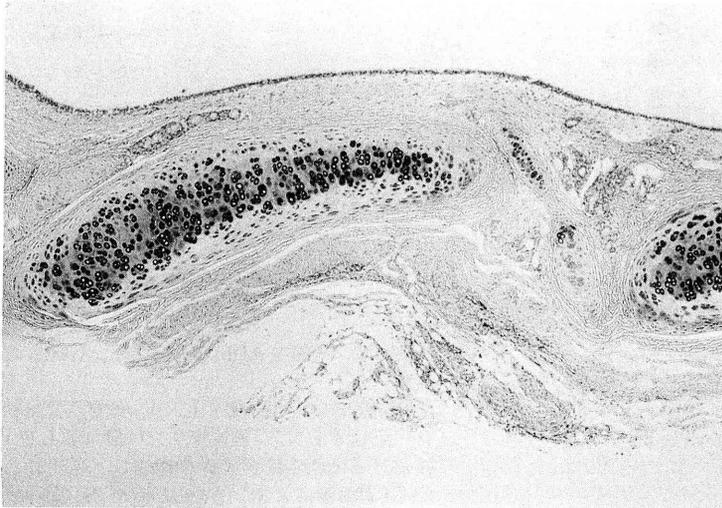
### 6. Lip-ADM 投与における全身状態への影響

投与経路別の全身状態を観察した所, 静脈内投与および胸腔内投与された犬では食餌摂取不良が現われ, さらに胸腔内投与群では全例剖検時両側に約 30 ml の胸水貯留を認めたが縦隔リンパ節内投与群では全く変化がなかった。

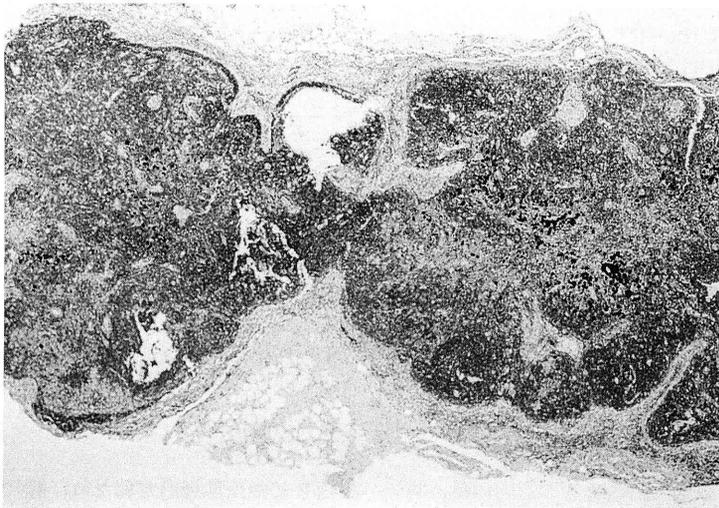
## 考 察

### 1. 肺癌手術後の再発

肺癌の治療成績は芳しいものではなく, 日本にお



**写真1** リンパ節刺入群の7日目の気管注入部の組織所見  
弱拡大(40X)の気管注入部の組織所見。気管軟骨及び周囲組織の正常構造が保たれ、組織の破壊所見は認められなかった。



**写真2** リンパ節刺入群の7日目の気管分岐部リンパ節の組織所見  
弱拡大(40X)の気管分岐部リンパ節の組織所見。リンパ節の正常構造が保たれ、非特異性炎症所見が僅かに認められたのみであった。

ける非切除を含む全肺癌症例の5年生存率は10%台である。全国がんセンター協議会の17施設の5年生存率でも24.1%に過ぎず、我々の施設でも1981年から1990年まで取り扱った全肺癌1299例の5年生存率は25.8%であった。完全寛解(complete remission)を得る手段として最も確実と考えられるものが治癒的肺切除術であろう。しかしそれでも再発が生じ、治癒切除後の5年生存率は約60~70%と低下してくる。これは微小転移巣などからの遠隔転移再発による死亡のためである<sup>25)</sup>。この再発予防のため世界中で肺癌切除後の補助化学療法、放射線療法あるいは免疫療法の有用性が研究されてきたが、いまだ再現性をもって明らかに有用な術後補助

療法は皆無であり、肺癌専門医は苦勞しているのが現状である。

肺由来の縦隔リンパ流について長石と岡田<sup>8)</sup>は正常時でも同側以外に反対側への流注経路の存在を指摘している。しかもリンパ節転移や石灰化などによるリンパ節構造の破壊を伴う状況では縦隔リンパ流の複雑な変化も予想され、反対側縦隔や頸部領域のリンパ節に潜在性転移が存在しても不思議ではない。また、石川<sup>9)</sup>らは、完全切除されたと考えられる99例の縦隔リンパ節転移を伴う(N2)肺癌例の skipping metastasisの有無について検索した結果、原発腫瘍から肺門部リンパ節を通らず、縦隔リンパ節に転移が存在した例が24例(24.2%)あったと報告し

た。

我々の施設でも、肺癌手術後の再発様式として、約半数は遠隔転移であり、約1/3がリンパ節転移、残りは局所再発である。従って、肺癌の手術における一つの問題点は、対側リンパ節郭清及び潜在的なリンパ節転移に対する治療が困難なことであり、これらに対する効果的な治療が開発されれば、肺癌の術後成績が飛躍的に向上するものと考えられる。

## 2. Liposome 封入制癌剤による DDS

近年、人工脂質膜である liposome を用いた DDS の癌治療研究が盛んに行われるようになってきている。薬剤キャリアとして用いた場合、liposome には無毒性、徐放性、リンパ指向性の特質を持ち、薬剤の無修飾的封入、生体内において分解処理が可能で、biodegradable な担体であるとの利点が挙げられている<sup>3)4)</sup>。

化学療法の最も大きな問題点は、抗癌剤自体に腫瘍選択性が乏しいことに起因する骨髄、肝臓、消化管粘膜などの障害などの副作用が dose limiting factor となり、充分有効な量の抗癌剤を腫瘍に作用させることが困難なことである。この問題解決法の一つとして、薬剤送達技術の工夫を行う Drug Delivery System (DDS) の研究が発展してきている。DDS には、病変部の有効薬剤濃度を維持しようとする controlled release と、薬剤を病変局所にできるだけ到達させようとする targeting に2大別され、いずれも目的とするところは、有効な薬剤を必要な量かつ必要な時間、病変部に作用させることである。

ADM の心毒性は臨床上の制限因子であることが良く知られており、Legha らは ADM の心毒性は心筋 ADM 最大濃度と関連し、最大濃度を下げると心障害の発生率が減少すると報告している<sup>10)</sup>。ADM の liposome 封入化は、特に局所投与によって、心筋 ADM 濃度の最大濃度と累積分布を減少させ、心筋障害の軽減効果を認めたと報告している<sup>11)12)</sup>。本研究では静脈内投与と群、胸腔内投与と群とリンパ節注入群の全てで、低い心筋 ADM 集積が認められた。特に、リンパ節注入群の心筋 ADM 集積は測定限界以下であり、ADM の liposome 封入化及び局所投与により、心障害を最低限にする事が可能と考えられた。

Liposome の剤型には肝臓、脾臓などの網内系組織に捕捉されやすいという性質があり、癌化学療法での DDS として標的腫瘍への到達性の障害となり短所ともなってくる。静脈内投与と群では、脾臓での高

い ADM 集積 ( $8.59 \pm 4.86$  mg/g) を認め、肝臓 ( $2.36 \pm 2.18$  mg/g) と縦隔リンパ節 (#7 L.N.:  $2.95 \pm 1.83$  mg/g) の ADM 集積はほぼ同程度であった。肝臓、脾臓の非標的臓器の ADM 集積は胸腔内投与法とリンパ節局所注入によって低下させることが可能であった。特にリンパ節注入群では縦隔リンパ節の高 ADM 集積及び肝臓、脾臓の低 ADM 集積を認め、癌の縦隔リンパ節転移に対する targeting 療法を目的とした投与法としては最も有用と考えられた。

## 3. リンパ行性制癌剤投与

悪性腫瘍のリンパ節転移に対する診断法として、1952年 Kinmonth<sup>13)</sup> は足背のリンパ管を介して造影剤を経リンパ行性に注入し、骨盤腔や後腹膜のリンパ節を造影する方法を考案した。Wallace ら<sup>14)</sup> は、この方法を応用してリンパ管内に制癌剤を直接注入する、いわゆる intralymphatic chemotherapy を始めて試みた。Jackson<sup>15)</sup> は同様の方法を用いて、臨床的に各種制癌剤の投与を試みた。しかし、リンパ管造影の手法を応用して直接リンパ管内に注入することは可能ではあるが、手技的に困難であり確実性が低く、薬剤がリンパ管注入部から漏出した場合は重篤な皮膚障害を生じる危険性を有している。リンパ節への直接注入は Votava (1966)<sup>16)</sup>、山口 (1972)<sup>17)</sup> の気管分岐部リンパ節経由による縦隔リンパ系造影の実験から、左右縦隔への造影剤 (lipiodol) の移行が可能であると報告した。三谷<sup>18)</sup> らは術中に Lipiodol-Bleomycin を気管分岐部リンパ節に注入の臨床研究を行い、リンパ節移行率は郭清領域で70%に移行を認め、反対側縦隔でも同程度の移行が期待できると報告している。我々の実験でも、リンパ節注入群では、左右縦隔リンパ節への高濃度 ADM 集積が同時に認められ (図5)、本投与法は注入部位のみならず左右縦隔リンパ節への移行による治療が期待できることが示唆された。

リンパ節注入群では縦隔リンパ節、気管、胸腺、食道への高濃度 ADM 集積を認め、経リンパ流拡散と組織間の直接浸透によるものと考えられるが、注入しても穿刺部からの逆流や不確実穿刺のためにリンパ節外に流出することも予想される。今回の実験では抗癌剤として ADM を用いたため、その liposome 封入体である Lip-ADM はオレンジ色を呈し、気管支鏡下に TBAC 針で穿刺注入時、薬剤漏出の有無が容易に観察可能であった。しかし今回の

実験では、気管分岐部リンパ節に Lip-ADM 注入時、薬剤漏出や逆流などの所見は全くなく、全例目的量を注入できた。

リンパ節周囲組織に注入した際のリンパ節や注入周囲臓器への吸収、移行について、猪口<sup>19)</sup>は肺癌患者に emulsion type 5-FU の術前、前縦隔持続投与を行い、縦隔リンパ節への到達性と転移リンパ節での組織学的効果を認めた。熊井<sup>12)</sup>も胃癌患者に Lip-ADM の制癌剤を局所注入して、原発巣及び転移リンパ節での組織学的効果を認めたと報告している。完全にリンパ節内に薬剤が注入されたか否かの確認は困難であるが、今回の我々の研究結果及び以上の報告から、リンパ節そのものに注入されていなくても、リンパ節の周囲組織に注入されていれば、リンパ節や注入周囲臓器への吸収、移行が可能であることが示されている。

直接リンパ管内に抗癌剤を注入する場合には、種々の副作用の発生を考慮する必要がある。とりわけ最も重大なものとして、従来から肺塞栓症の招来や機械的圧入による腫瘍細胞遊出の危険性が指摘されている<sup>20)</sup>。リンパ管造影法の操作による腫瘍細胞遊出促進の事実について、庵原<sup>20)</sup>らは進行癌にリンパ系造影法を行ったところ胸管リンパ液中に癌細胞の著しい増加を認めたと報告したが、Schaffer ら<sup>21)</sup>はリンパ管造影後の血中の腫瘍細胞数を測定し、造影前後で著明な差はみられなかったと報告した。一般に、リンパ管に造影剤を緩徐に適量を注入する限り、腫瘍細胞播種の危険性は少ないと考えている者が多い。また、気管分岐部リンパ節の注入量は 3.0 ml 以上の注入は困難で、注入量には限界があると報告されている<sup>18)</sup>。本実験での注入量は約 1.7~2.5 ml であり、注入時の抵抗、注入後の副作用などは全く認められなかった。また、Lip-ADM は今回使用した 3.0 mg/ml より高濃度に調整可能であるため、ヒトに応用する際にも薬液量を減少させることができ、注入量の問題は解決可能と考える。

すでに転移で侵されているリンパ節内に薬剤が流入することについては従来から疑問視されている。夏田<sup>22)</sup>は実験的リンパ節転移巣について検討し、リンパ管の開存さえあれば、かなり高度の転移を生じたリンパ節内へも薬剤の移行は可能であると報告している。また上野<sup>23)</sup>らは、リンパ路さえ遺残していれば、転移の寡多にかかわらずリンパ節内に薬剤が流入し、抗腫瘍効果が発揮されることを確認し、転

移リンパ節への薬剤移行が期待できると報告した。肺癌開胸手術時に胸膜リンパ管、気管分岐部リンパ節より DDS が報告され<sup>18)26)</sup>、いずれも縦隔リンパ節に高い制癌剤の移行及び抗腫瘍効果を認めている。

リンパ行性に投与された制癌剤が、リンパ節内で癌細胞に作用する機序は、他の投与方法の場合と大きな違いは無いと考えられるが、組織学的にみると局所効果は顕著である。即ち、制癌剤の局在する部位に接する癌組織は高度の変性に陥り、さらに制癌剤で囲まれた領域の癌組織は特に強い中心壊死を呈する事実が示されている<sup>23)</sup>。

実験的に肺癌を犬で作製することは可能であるが、縦隔リンパ節に定着させることは困難である。我々は、*in vitro* で、PC-9 肺腺癌株を用い、clonogenic assay 法により、7日間培養での survival rate (%) と ADM の AUC との dose response curve から両者の相関 ( $y=7.031x^{-0.859}$ ) を求め、リンパ節注入群における各縦隔リンパ節での抗腫瘍効果の比較対象とした。また、各縦隔リンパ節内 ADM 濃度の減衰曲線を作製し、1週間毎に遊離した ADM 濃度の変化である AAC を算出した。リンパ節注入群での各縦隔リンパ節における AAC に対する *in vitro* での PC-9 肺腺癌細胞に対する cell kill rate (%) を、 $y=7.031x^{-0.859}$  の方程式にて求めた。これにより縦隔リンパ節内の ADM は投与後 2 週から 3 週目までの期間で、79.0% (cell kill rate%) 以上の高い抗腫瘍活性を認め、リンパ節注入群では縦隔リンパ節での強い抗腫瘍効果が少なくとも 3 週間以上維持されているという事実が明らかとなった。

ADM の局所障害性は強く、家兎の実験では 0.1 vol% 以上の ADM 溶液を皮下、皮内に局所投与すると浮腫、壊死を起こすことが報告されている<sup>24)</sup>。気管分岐部に 0.5 mg/kg Lip-ADM 注入後、7 日目の気管刺入部と気管分岐部リンパ節の組織を検討したが、正常構造が保たれ、正常組織の破壊所見はなく、非特異性炎症がやや認められたのみであった。また、その他の臓器の組織障害も認めなかった。従って、0.5 mg/kg Lip-ADM の縦隔リンパ節注入は局所障害所見が軽微であり、心筋障害の軽減効果とあわせて、臨床において本法が安全に施行可能であると考えられた。

本研究では 0.5 mg/kg Lip-ADM の経気管支鏡的気管分岐部リンパ節局所注入法について検討した

結果、縦隔リンパ節の targeting 療法として (1) 内視鏡下に簡便に施行が可能である, (2) 局所障害が少なく安全かつ侵襲が少ない, (3) 注入リンパ節のみならずその他の縦隔リンパ節での集積性が高い, (4) 高い抗腫瘍効果が期待ができる, (5) 非標的臓器の影響を軽減させ得るなどの極めて良好な結果を得た。肺癌のリンパ節転移に対する Lip-ADM の経気管支鏡的投与は外科的郭清困難な微小リンパ転移巣に対する補助療法及び転移縦隔リンパ節への targeting 療法として、有用な治療法となりうる可能性が示された。しかし、長期に亘って高濃度の制癌剤が停滞する場合には、正常リンパ組織に対する障害も避けられない可能性がある。高濃度の制癌剤を健常組織内に予防的に長期に亘って停滞させる場合には、この点に関する考慮も必要である。従って、Lip-ADM の最低抗腫瘍濃度徐放の工夫、封入薬剤の選択、至適投与量、投与間隔、投与時期などの検討が今後の課題として残されている。

### 結 語

1. 経気管支鏡的縦隔リンパ節内抗癌剤の投与は Lip-ADM の使用によって可能となった。
2. Lip-ADM の縦隔リンパ節への高濃度集積および ADM 徐放性を認めた。
3. 縦隔リンパ節内の ADM は投与後3週目まで、強い抗腫瘍濃度を維持していた。
4. 局所組織障害は軽微であった。
5. 経気管支鏡的縦隔リンパ節内への Lip-ADM 投与は肺癌の縦隔リンパ節転移に対する治療法として有用と考えられた。

稿を終わるに臨み、本研究の御指導、御校閲を賜りました恩師加藤治文教授に深甚なる謝意を表しますとともに、御協力頂きました外科第一講座教室員各位、本学薬剤部細田順一郎長ならびに Lip-ADM の作製と多大なる助言をいただいた畝崎栄博士に深謝いたします。

本論文の要旨は、第31回日本癌治療学会総会、第7回国際肺癌学会総会において発表した。

(本研究の一部は財団法人がん研究振興財団の第26回がん研究助成金の援助を受けた。)

### 文 献

- 1) Bangham AD, Hore RW: Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electronmicroscope. *J. Mol. Biol.* **8**: 660~998, 1964.
- 2) Gregoriadis G: The liposome drug-carrier concept: its development and future. In Gregoriadis G and Allison AG (eds): *Liposomes in biological system*, New York: John Wiley and Sons, Ltd.: 25~86, 1980.
- 3) Weinstein JN: Liposomes as drug carriers in cancer therapy. *Cancer Treat Rep.* **68**: 127~135, 1984.
- 4) Mayer LD, Bally MB, Cullis PR: Uptake of adriamycin into large unilamellar vesicles in response to a pH gradient. *Biochem. Biophys. Acta* **857**: 123~126, 1986.
- 5) 畝崎 栄, 松村正史他: pH 勾配法によるドキシソルビン封入温度感受性リポソームの調整と評価. *日本 DDS 学会誌* **7**(1): 37~41, 1992.
- 6) 増池健年, 大嶽純一他: 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): 620~623, 1984.
- 7) Wei Dong G, Preisler HD, Priore R: Potential limitation of *in vitro* clonogenic drug sensitivity assays. *Cancer Chemother Pharmacol* **13**: 206~210, 1984.
- 8) 長石忠三, 岡田慶夫: 肺癌のリンパ行性転移に関する2, 3の問題. *日本胸部臨床* **24**: 397, 1965.
- 9) 石川七郎: リンパ節転移の実態, 肺のリンパ流路, 臨床肺癌, 初版, Vol. III, 講談社, 東京, p17~18, 1983.
- 10) Legha SS, Benjamin RS: Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *ANN Intern Med.* **96**: 133~139, 1982.
- 11) Gabizon A et al.: Liposomes as *in vivo* carriers of adriamycin: reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. *Cancer Res.* **42**: 4734~4739, 1982.
- 12) 熊井浩一郎, 高橋孝行: 抗癌剤封入リポソームの内視鏡下局注による胃領域リンパ節指向性化学療法. *Gastroenterol. Endosc.* **29**: 1308~1310, 1987.
- 13) Kinmonth J: Lymphangiography in man. Mehtod of outlining lymphatic trunks at operation. *Clin. Scill.* **11**: 13~20, 1952.
- 14) Wallace S et al.: Lymphangiograms: Their diagnostic and therapeutic potential. *Radiology* **76**: 179~199, 1961.
- 15) Jackson L et al.: Chemotherapy by intralymphatic infusion. *Cancer* **15**: 955~957, 1962.
- 16) Votava V: Die direkte Lymphadenographie der intrathorakalen Lymphknoten. *Radiologia Diagnostika* **6**: 447~456, 1965.

- 17) 山口貞夫: 肺門, 縦隔リンパ系造影に関する実験的研究. 胸部外科 **25**: 727~733, 1972.
- 18) 三谷惟章他: 肺癌の術中補助療法としての経リンパ行性抗癌剤投与に関する実験的・臨床的検討. 胸部外科 **39**(1): 29~33, 1986.
- 19) 猪口嘉三他: 肺癌の縦隔リンパ節転移巣に対する抗癌剤の持続的局所投与. 日胸外会誌 **20**: 44~55, 1972.
- 20) 庵原昭一他: リンパ液の細胞診. 癌の臨床 **13**: 757~764, 1967.
- 21) Schaffer B et al.: A critical evaluation of lymphangiography. Radiology **80**: 917~930, 1963.
- 22) 夏田康則: 胸部食道癌における術中経リンパ節的抗癌剤投与方法の実験的研究. 日外会誌 **83**: 264~276, 1982.
- 23) 上野陽一郎: 選択的経リンパ行性抗癌剤投与方法に関する研究. 京大胸部研紀要 **17**: 50~63, 1984.
- 24) 清原晃, 久保和博他: Adriamycin の一般薬理作用. 応用薬理 **6**(5): 1075~1088, 1972.
- 25) 大田満夫: 癌化学療法による長期生存は可能か・肺癌. JAMA (日本語版付録) **9**: 12~13, 1993.
- 26) 岡田慶夫: 肺癌のリンパ行性転移に関する臨床的諸問題. リンパ学 **10**: 39~44, 1987.

Drug Delivery System for Metastatic Mediastinal Lymph Nodes Using  
ADM-Encapsulated Liposomes Through a Bronchofiberscope  
—An Experimental Study—

Bor-Rong WEI, Hidenobu TAKAHASHI

Department of Surgery, Tokyo Medical College  
(Director: Prof. Harubumi KATO)

Drug delivery systems (DDS) using liposomes as drug carriers in cancer chemotherapy are recently being developed because of the low toxicity and no antigenicity. In this study, DDS was evaluated for the treatment of lung cancer involving mediastinal lymph nodes. Adriamycin-encapsulated liposomes (Lip-ADM) was produced with the pH gradient method. The effects of transbronchial injection of Lip-ADM (0.5 mg/kg) into the subcarinal lymph node of dog were compared with those obtained by two other administration routes, intravenous (2.0 mg/kg) and intrathoracic (1.0 mg/kg). The dogs were sacrificed at the 1st, 2nd and 3rd week.

The following were investigated: 1. the pharmacokinetics of ADM, 2. the release curves of ADM in mediastinal lymph nodes, 3. histological examinations, and 4. the predictive anti-cancer effect of released ADM corresponding to the experimental anti-cancer effect of ADM in PC-9 (an serially cultured adenocarcinoma cell line established from human lung cancer) by colony forming assay, *in vitro*.

The results of this study showed: 1. trans-endoscopic administration of Lip-ADM was possible, 2. high level accumulation of Lip-ADM and continuous release of ADM in mediastinal lymph nodes were recognized, 3. high level anti-cancer concentration was recognized until the 3rd week. Also, the study suggested that the local injection of Lip-ADM, through the bronchofiberscope, can be recommended as a clinical mode of application.

---

<Key words> Liposome, Adriamycin, Lung cancer, Bronchofiberscopic therapy, Local injection, PC-9.

---