

抗がん剤を含まないハイブリッド型リポソームのみによる *in Vivo* でのがん化学療法

市原英明, 永見英明, 山本圭一, 松本陽子, 上岡龍一*

Chemotherapy with Hybrid Liposomes without Any Drug *in Vivo*

Hideaki ICHIHARA, Hideaki NAGAMI, Keiichi YAMAMOTO,
Yoko MATSUMOTO, and Ryuichi UEOKA*

Graduate Course of Applied Chemistry, Sojo University,
4-22-1, Ikeda, Kumamoto 860-0082, Japan

(Received August 14, 2002; Accepted October 23, 2002)

Prolonged survival was seen in a carcinoma model in mice intraperitoneally inoculated with B-16 melanoma cells after the intraperitoneal treatment with hybrid liposomes composed of L- α -dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC) and polyoxyethylenedodecyl ether ($C_{12}(EO)_n$, $n=10$ and 23 respectively) which had a uniform and stable structure. No drug was administered. The therapeutic effects of the single-component liposomes composed of lipids with a variety of hydrophilic head groups and different hydrophobic alkyl chains were investigated. Markedly prolonged survival (248%) of mice was achieved after treatment with DMPC liposomes. However, DMPC liposomes have the disadvantage of an unstable structure, requiring daily sonication. On the other hand, no life-prolonging effects or toxicity occurred with the administration of the other single-component liposomes employed in this study. Next, we successfully prepared stable, uniform liposomes composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% $C_{12}(EO)_n$ ($n=10$ and 23, respectively), which have diameters of 70 nm and 100 nm, respectively. Interestingly, prolonged survival (173—186%) of mice was achieved after treatment with hybrid liposomes of 90 mol% DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_n$ ($n=10$ and 23). Finally, we conducted toxicity tests using normal rats to determine hybrid liposome stability. There were no abnormal findings in blood chemistry or relative organ weights at autopsy of normal rats after hybrid liposome administration. In addition, hybrid liposomes were metabolized in the liver after intravenous administration to normal mice. These results suggest that hybrid liposomes could be used as a new single chemotherapeutic agent in the treatment of carcinoma with no side effects.

Key words—hybrid liposome; phosphatidylcholine; chemotherapy; melanoma; toxicity test

緒 言

がん治療の抱える大きな問題の1つに抗がん剤による重篤な副作用がある。抗がん剤はがん細胞に毒性を示し死滅させる薬剤であるが、同時に正常細胞をも破壊してしまうからである。腫瘍の縮小効果は認められても副作用などにより延命効果が得られないという深刻な問題まで出てきている。そのため、効果的で安全な抗がん剤が切望されている。

リポソームは、生体膜の構成成分であるリン脂質を水中に比較的低濃度で分散させた時に形成される閉鎖小胞体である。1965年にBanghamらがリポソームを発見して以来,¹⁾ リポソームは、その生体

膜類似性あるいは閉鎖性ゆえに、細胞機能の解析及び drug delivery system としての利用をはじめとする基礎及び実用の両面において、研究が盛んに行われている。^{2,3)} しかしながら、リン脂質のみからなる形成されるリポソームは、不均一で経時的に不安定であり、その均一性、安定性の克服は様々な研究目的のための1つの課題とされてきた。

筆者らが開発したハイブリッド型リポソーム (Fig. 1) は、⁴⁾ リン脂質とミセル分子を水溶液中で超音波処理するだけで得られ、従来のリポソームに比べて有機溶媒の混入がなく、素材及び組成比の選択により、形態やサイズ、相転移温度、疎水性及び流動性のコントロールが可能な生体適合性指向の新しい医用素材である。特に、ベシクル分子としてリン脂質を、ミセル分子としてPEG (ポリオキシエ

び正常マウスを用いた体内動態試験を行った。

実験の部

1. 試料 L- α -ジラウロイルホスファチジルコリン (DLPC), L- α -ジミリスチルホスファチジルコリン (DMPC), L- α -ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC), L- α -ジミリスチルホスファチジルグリセロール (DMPG) は市販品 (日本油脂), 1,2-ジミリスチル-3-トリメチルアンモニウムプロパン (DMTAP) は市販品 (フナコシ) をそのまま使用した。ポリオキシエチレン (10) ドデシルエーテル C₁₂(EO)₁₀ は市販品 (Sigma) をそのまま使用した。C₁₂(EO)₂₃ は市販品 (Sigma) を Elworthy らの方法に従い精製したものを使用した。¹²⁾ 1-パルミトイル-2-[12-(7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキシアジアゾール-4-イル)アミノ]ドデカノイル-*sn*-グリセロ-3-フォスフォコリン (NBDPC) は、市販品 (Avanti) をそのまま使用した。

2. ハイブリッド型リポソームの調製 ハイブリッド型リポソームは、水溶液中でリン脂質及びミセル界面活性剤を 45°C, 窒素雰囲気下で 5 分間、超音波照射 (VELVO-CLEAR VS-N 300 s: 300 W) することによって調製し、孔径 0.20 μ m フィルターでろ過滅菌し試験溶液とした。

3. 膜サイズの測定 ハイブリッド型リポソームの膜サイズは、サブミクロン・サイザー (Brookhaven BI-90) を用い、動的光散乱法により測定した。光源として He-Ne レーザーの 632.8 nm の発振線を出力 35 mW で用い、散乱角 90°で測定し、得られた拡散係数 (D) から、(1)式 (Stokes-Einstein の式) に従い、膜の直径 (d_{hy}) を求めた。

$$d_{hy} = kT / 3\pi\eta D \quad (1)$$

ここで、 k は Boltzmann 定数、 T は絶対温度、 η は溶媒の粘度である。

4. 電子顕微鏡観察 電子顕微鏡観察は、ネガティブ染色法で行った。カーボン補強済みフォルムパール膜 Cu300 メッシュ (日本電子) に試料をマウントして乾燥後、ネガティブ染色剤としてモリブデン酸アンモニウムで染色し、透過型電子顕微鏡 (日本電子 JEM100S) を使用し倍率 100,000 倍で観察した。

5. 治療効果の評価 動物は 5 週齢の C57BL/

6 雌性マウス (日本チャールズリバー) を、がん移植当日の体重をもとに層別連続無作為化法により 6 匹ずつコントロール群及びハイブリッド型リポソームを投与する治療群に群分けを行った。マウス由来悪性黒色腫 (B16-F0 melanoma) 細胞 (5×10^5 cells) をマウスの腹腔内に移植し、担癌マウスを作成した。投与スケジュールは、がん細胞移植後 1 時間より移植後 12 日までの計 13 回、ハイブリッド型リポソームの腹腔内投与を行った。マウスの生存日数から、式(2)より延命率 (%) を算出し、ハイブリッド型リポソームの抗腫瘍効果について検討した。

$$\text{延命率}(\%) = (\text{治療群の平均生存日数} / \text{未治療群の平均生存日数}) \times 100 \quad (2)$$

6. 反復投与毒性試験 DMPC/10 mol % C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームの反復投与毒性試験は、5 週齢の CD (SD) 雄性ラット (日本チャールズリバー) を使用した。ラットは恒温恒湿環境下 (温度: 24 \pm 2°C, 湿度 55 \pm 10%) で飼育し、層別連続無作為化法にて 5 匹ずつに群分けした。期間中水及び餌は自由に摂取させた。試験試料を 20 ml/kg 尾静脈から 2 ml/min にて 1 日 1 回の割合で 7 日間反復投与した。投与期間中、一般状態の観察及び生死の確認を行うとともに、体重を測定した。また、投与終了後に採血し、血液学的検査、血液生化学検査を行った。さらに解剖後、臓器を肉眼観察し、胸腺、肺、肝臓、脾臓及び腎臓の重量を測定した。

7. 静脈内投与による体内分布 NBDPC を含有した複合脂質膜を正常マウス (BALB/c, 雌, 6 週齢) の眼窩静脈から 10 ml/kg 投与 (Dose for DMPC 67.8 mg/kg) し、所定時間後に肝臓、腎臓、脾臓、肺の摘出及び採血を行った。摘出した各器官は OCT コンパウンド包埋して凍結固定し、組織切片を作成して共焦点レーザー顕微鏡 (Leica, TCS NT) で観察及び蛍光強度の測定を行った。

結果と考察

1. リポソームの安定性 (経時変化) Fig. 2 に動的光散乱法による単一成分リポソームの膜サイズ経時変化を示す。3 週間で沈殿が生じるまで非常に安定な膜であった DMPG リポソームを除いたすべての単一成分リポソームにおいて調製直後から不安定で早期に沈殿が生じた。

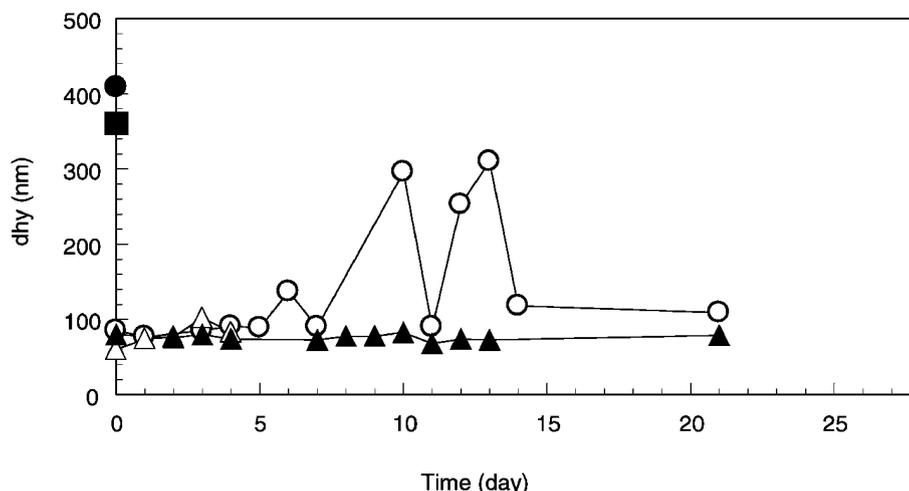


Fig. 2. Time Courses of d_{hy} Change for Single-Component Liposomes

○: DLPC, ●: DMPC, △: DPPC, ▲: DMPG, ■: DMTAP. [lipid] = 5.0×10^{-2} M, in 5% glucose solution for 3 min at 45°C in a nitrogen atmosphere and, subsequently, filter sterilized through a 0.22 μ m pore filter.

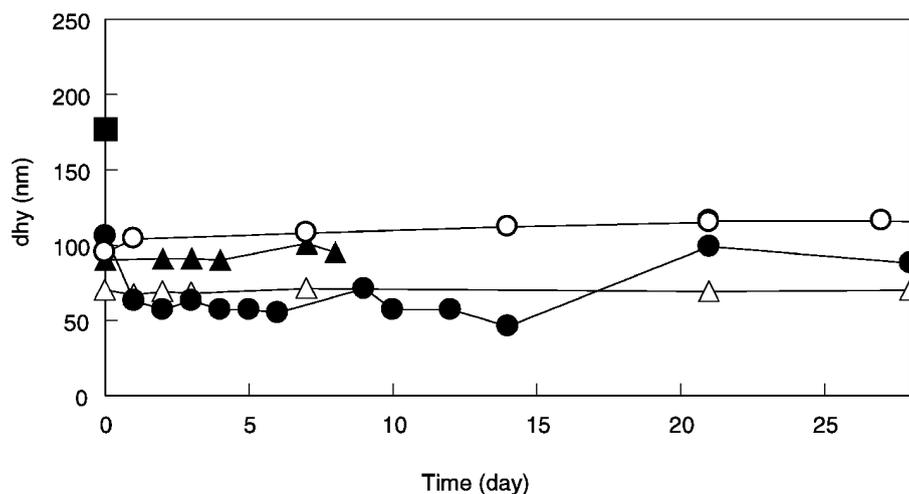


Fig. 3. Time Courses of d_{hy} Change for Hybrid Liposome

△: DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$, ○: DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$, ●: DPPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$, ▲: DMPG/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$, ■: DMTAP/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$. [lipid] = 5.0×10^{-2} M, in 5% glucose.

Fig. 3 にハイブリッド型リポソームの膜サイズの経時変化を示した。DPPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、調製直後に最大の膜サイズを示すものの 4 週間以上安定な膜であった。DMPG/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、直径 100 nm で安定な膜であったが、調製 9 日後に沈殿した。DMTAP/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ ハイブリッド型リポソームは、調製直後に沈殿が生じた。DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ 及び DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソームは、それぞれ直径 70 nm, 100 nm 前後で 4 週間以上非常に

均一で安定な膜であった。また、DMPC/ $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソームは、Fig. 4 に示した電子顕微鏡写真からも非常に均一なベシクルの形態であることが明らかとなった。単一成分リポソームでは、非常に不安定な膜で沈殿が生じるが、PEG 系界面活性剤 $C_{12}(EO)_{10}$ 及び $C_{12}(EO)_{23}$ によりハイブリッド型リポソームとすることにより安定な膜を形成し、特に DMPC と $C_{12}(EO)_{10}$ 及び $C_{12}(EO)_{23}$ で構成されるハイブリッド型リポソームは非常に均一で安定な膜であることを明確にした。

2. アシル鎖長の異なる脂質分子で構成される単

一成分リポソームの担がんマウスに対する延命効果哺乳類動物における全リン脂質の約 50% を占め、細胞膜の構成リン脂質として最も多く存在すると考えられるホスファチジルコリン系についてアシル鎖長の異なる DLPC (C12), DMPC (C14) 及び DPPC (C16) 単一成分リポソームについて検討し、Fig. 5 に結果を示した。

図から明らかなように DMPC (678 mg/kg) 単一成分リポソーム投与群において生存率 248% と極めて顕著な延命効果が得られ、また低用量群 (67.8 mg/kg) においても 130% の延命効果を示した。DMPC 単一成分リポソームの相転移温度 (23°C) は体温より低く、体温付近では液晶状態と考えられ

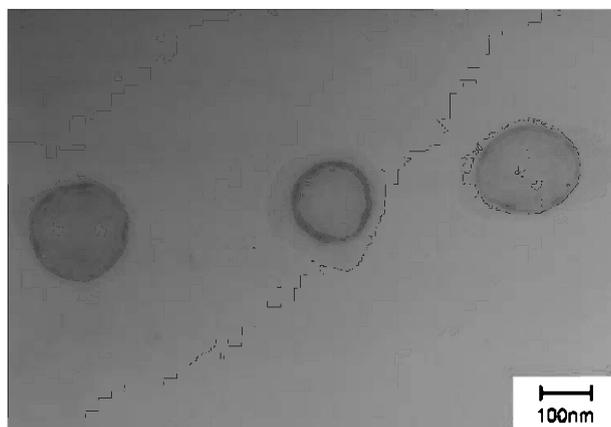


Fig. 4. An Electron Micrograph of Hybrid Liposomes Composed of DMPC and $C_{12}(EO)_{23}$
[DMPC] = 3.0×10^{-2} M. An electron micrograph was obtained by means of negative-staining techniques using Ammonium molybdate.

る。流動性の比較的高い状態でのリポソームは、正常細胞に比べて細胞膜の流動性が大きいと言われているがん細胞に対しての融合性⁸⁾が高まったと考えることができる。しかしながら、膜が経時的に不安定であるために、投与毎に超音波処理をして均一なリポソームを調製し、投与しなければならないという欠点が明確になった。一方、DPPC (734 mg/kg) 単一成分リポソームではコントロールと同様の 106% であった。DPPC 単一成分リポソームは相転移温度 (40°C) が体温よりも高いために体内付近ではゲル状の固い膜であり、がん細胞膜と融合しにくくなったことが考えられる。さらに、DLPC (620 mg/kg) 単一成分リポソームにおいては生存率 22% と毒性を示した。DLPC は相転移温度が低温 (0°C) であることに加えて、生体にほとんど存在しない脂質であるため、抗原性を示した可能性が高い。また毒性の強い反応中間体が生成し、結果としてその中間体、代謝物が正常に排泄されることなく体内に蓄積し毒性を示した可能性も考えられる。

3. 頭部極性基の異なる脂質分子で構成される単一成分リポソームの担がんマウスに対する延命効果最も顕著な延命効果が得られた DMPC とアシル鎖長が同じ 14 で、頭部極性基が異なるアニオン性の DMPG 単一成分リポソーム及びカチオン性の DMTAP 単一成分リポソームについて延命効果を検討し、結果を Fig. 6 に示した。

DMPG 単一成分リポソームの生存率はコントロールと同様の 106% であり、延命効果を示さなか

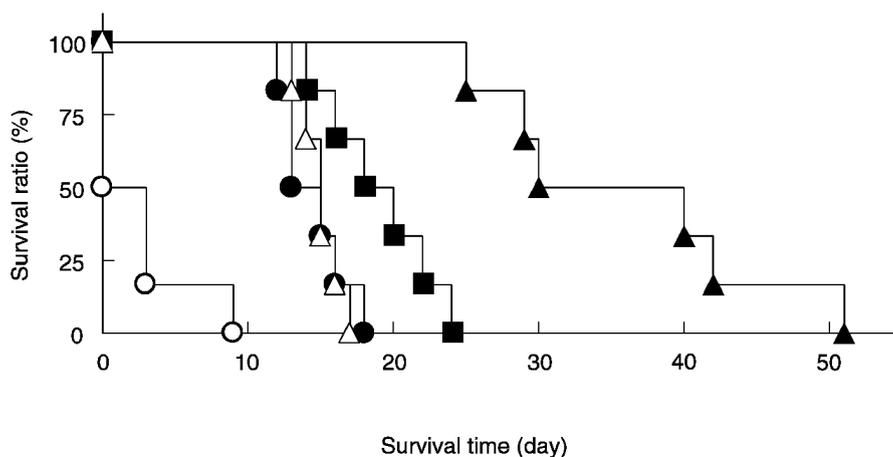


Fig. 5. Survival Curves of Mice Treated with Single-Component Liposomes after the Intraperitoneal Inoculation of B16-Melanoma Cells
●: Control, ○: DLPC (620 mg/kg) ($p < 0.01$), ▲: DMPC (678 mg/kg) ($p < 0.01$), ■: DMPC (67.8 mg/kg), △: DPPC (734 mg/kg). Six mice were employed in each experiment.

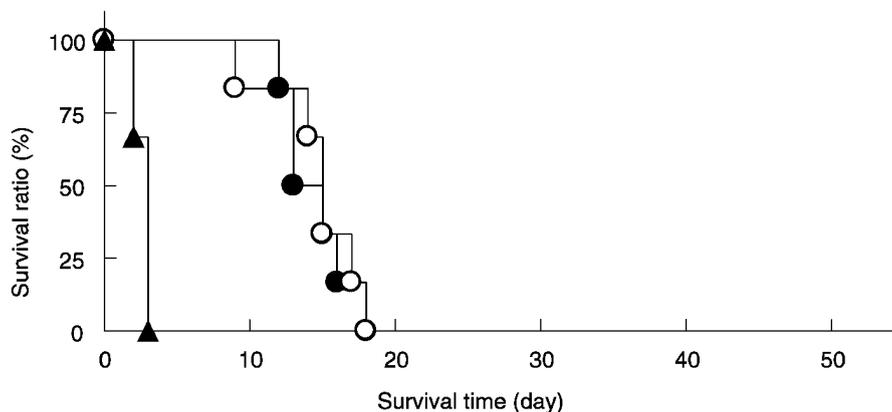


Fig. 6. Survival Curves of Mice Treated with Single-Component Liposomes after the Intraperitoneal Inoculation of B16-Melanoma Cells

●: Control, ○: DMPG (689 mg/kg), ▲: DMTAP (590 mg/kg) ($p < 0.01$). Six mice were employed in each experiment.

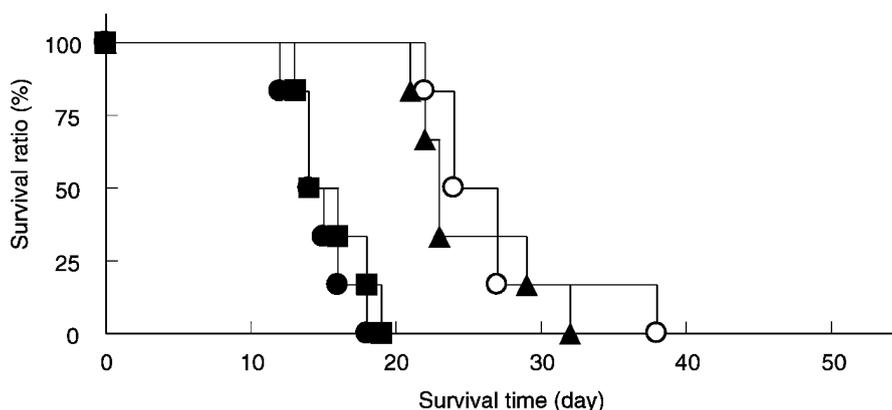


Fig. 7. Survival Curves of Mice Treated with Hybrid Liposomes after the Intraperitoneal Inoculation of B16-Melanoma Cells

●: Control, ○: DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ (DMPC 678 mg/kg, C₁₂(EO)₂₃ 135 mg/kg) ($p < 0.01$), ▲: DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ (DMPC 678 mg/kg, C₁₂(EO)₁₀ 69.7 mg/kg) ($p < 0.01$), ■: DPPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ (DPPC 734 mg/kg, C₁₂(EO)₂₃ 135 mg/kg). Six mice were employed in each experiment.

った。DMPG 単一成分リポソームはアニオン性であるため、マイナスに帯電しているがん細胞の細胞膜との反発作用が生じ、膜融合⁸⁾が容易でなかったため効果を示さなかったと考えられる。一方、DMTAP 単一成分リポソームは、生存率 19%と毒性が認められた。カチオン性である DMTAP 単一成分リポソームは、マイナスに帯電しているがん細胞の細胞膜との静電的相互作用のため、細胞膜のイオンバランスを崩し、結果として毒性を示す可能性も考えられる。

4. アシル鎖長の異なる脂質分子を構成成分とするハイブリッド型リポソームの担がんマウスに対する延命効果 B-16 F0 メラノーマ移植マウスに対するアシル鎖長の異なる DMPC 及び DPPC とミセルで構成されるハイブリッド型リポソームについて

延命効果を検討した結果を Fig. 7 に示す。なお、ミセル単一成分の投与による生存率は、C₁₂(EO)₁₀ (69.7 mg/kg) 及び C₁₂(EO)₂₃ (135 mg/kg) において、それぞれ 103% 及び 102% でコントロールと同様に担がんマウスに対して延命効果を示さず、また毒性も全く見られなかった。

DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームは、コントロールと比較して 173% の顕著な延命効果が認められた。DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームにおいても同様に 186% と良好な延命効果が得られた。ミセル分子の親水部の違いによる延命効果の大きな差異は認められないものの、DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームの方がより高い延命効果を示し、臨床応用へステップアップする場合により効果的である

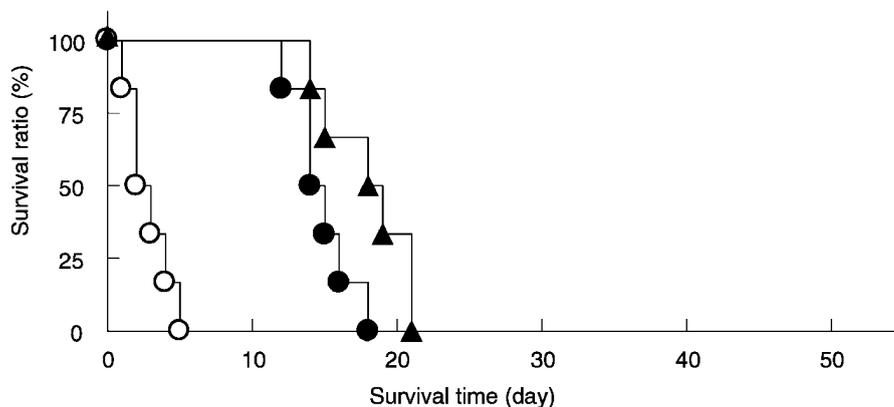


Fig. 8. Survival Curves of Mice Treated with Hybrid Liposomes after the Intraperitoneal Inoculation of B16-Melanoma Cells

●: Control, ○: DMTAP/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ (DMTAP 590 mg/kg, C₁₂(EO)₁₀ 69.7 mg/kg) ($p < 0.01$), ▲: DMPG/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ (DMPG 689 mg/kg, C₁₂(EO)₁₀ 69.7 mg/kg) ($p < 0.05$). Six mice were employed in each experiment.

ことが期待できる。DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ 及び DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームの膜サイズは、それぞれ 70 nm 及び 100 nm 前後であり、単一成分リポソームと異なり調製直後から 4 週間以上極めて均一で安定な膜であるため投与後も体内で長時間安定なリポソームを形成して全身転移を抑制したものと考えられる。DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ 及び DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームは、化学療法剤としての有効性が非常に高い。一方、DPPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームの延命率は 111% で顕著な治療効果は得られなかった。

5. 頭部極性基の異なる脂質分子を構成成分とするハイブリッド型リポソームの担がんマウスに対する延命効果 アシル鎖長は 14 で頭部極性基が異なる DMPC, DMPG 及び DMTAP とミセルからなるハイブリッド型リポソームの B-16 F0 メラノマ移植マウスに対する延命効果について検討した結果を Fig. 8 に示す。

均一で長期間安定な膜を形成する双性の DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームは、173% の生存率を示し高い延命効果が得られた。また、カチオン性の DMTAP/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームは、生存率 25% で毒性を示したが、DMTAP 単一成分リポソームに比べてやや毒性が緩和された。アニオン性の DMPG/10 mol% C₁₂(EO)₁₀ ハイブリッド型リポソームの生存率は 124% であり、DMPG 単一成分リポソームに比べて約 20% 延命効果が増加した。アニオン性及

びカチオン性ハイブリッド型リポソームの生存率増加は、ミセルを加えることによりリポソーム外殻の固定水層が厚くなり単一成分リポソームに比べてイオンバランスが修正されたことが示唆される。¹³⁾

6. ハイブリッド型リポソームの正常動物に対する安全性試験 4 週間以上均一で安定な膜であり、*in vivo* において顕著な延命効果の得られた DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームの安全性を検討するため、急性毒性試験の結果をもとに正常ラットを用いた反復投与毒性試験 (7 日間) を実施した。すべてのサンプルでラット体重は順調に増加し、体重の経時変化はいずれのハイブリッド型リポソームにおいてもコントロールと同様であった。

Table 1 に DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームを静脈内反復投与したラットの血液検査結果を示した。高用量群 (678 mg/kg) において赤血球が減少し軽度の貧血がみられた。また、白血球数が増加したが、顕微鏡観察から炎症により増大する好中球でなくリンパ球の増加が確認された。すなわち、各組織において炎症が起こっていないことを確認した。また、リンパ球の増加は DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームによる免疫賦活作用が示唆される。一方、低用量群ではコントロールと同様の値であり、安全性が確認できた。

DMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ ハイブリッド型リポソームを静脈内反復投与したラットの血液生化学検査において、リン脂質代謝に関係する指標を Table

Table 1. Hematological Findings in Male Rats Treated Intravenously with Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% C₁₂(EO)₂₃ for 7 Days

Sample	Dose (mg/kg)	RBC ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	WBC ($\times 10^2/\mu\text{l}$)
Control	—	671.6 \pm 47.6	70.4 \pm 20.4
DMPC	67.8	656.4 \pm 19.1	92.4 \pm 26.3
DMPC	678	370.8 \pm 39.5	1149.6 \pm 224.2
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 67.8 C ₁₂ (EO) ₂₃ 3.30	710.2 \pm 23.7	87.6 \pm 11.1
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 678 C ₁₂ (EO) ₂₃ 33.0	242.2 \pm 3.0	1548.2 \pm 257.6

Values represent mean \pm S.D.

Table 2. Biochemical Findings in Male Rats Treated Intravenously with Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% C₁₂(EO)₂₃ for 7 Days

Sample	Dose (mg/kg)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	ALP (IU/l)	BUN (mg/dl)	Phospholipids (mg/dl)
Control	—	72 \pm 4	15 \pm 1	456 \pm 150	13.7 \pm 1.2	124 \pm 12
DMPC	67.8	81 \pm 6	15 \pm 2	543 \pm 87	12.9 \pm 2.0	126 \pm 12
DMPC	678	85 \pm 6	18 \pm 3	493 \pm 76	15.1 \pm 1.6	144 \pm 20
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 67.8 C ₁₂ (EO) ₂₃ 3.30	75 \pm 13	16 \pm 3	406 \pm 88	15.4 \pm 1.7	137 \pm 20
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 678 C ₁₂ (EO) ₂₃ 33.0	78 \pm 8	17 \pm 1	453 \pm 54	16.4 \pm 1.5	151 \pm 6.0

Values represent mean \pm S.D.

Table 3. Relative Organ Weight in Male Rats Treated Intravenously with Hybrid Liposomes Composed of 90 mol% DMPC and 10 mol% C₁₂(EO)₂₃ for 7 Days

Sample	Dose (mg/kg)	Relative organ weight (g/100 g B.W.)					
		Heart	Thymus	Lung	Liver	Spleen	Kidney
Control	—	0.46 \pm 0.04	0.35 \pm 0.01	0.46 \pm 0.02	3.45 \pm 0.14	0.27 \pm 0.02	0.84 \pm 0.05
DMPC	67.8	0.46 \pm 0.03	0.35 \pm 0.04	0.49 \pm 0.05	3.30 \pm 0.13	0.34 \pm 0.05	0.84 \pm 0.04
DMPC	678	0.49 \pm 0.02	0.27 \pm 0.05	0.58 \pm 0.02	3.74 \pm 0.07	1.29 \pm 0.08	0.93 \pm 0.04
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 67.8 C ₁₂ (EO) ₂₃ 3.30	0.43 \pm 0.01	0.29 \pm 0.04	0.47 \pm 0.02	3.46 \pm 0.13	0.33 \pm 0.03	0.85 \pm 0.06
DMPC/10 mol% C ₁₂ (EO) ₂₃	DMPC 678 C ₁₂ (EO) ₂₃ 33.0	0.54 \pm 0.02	0.27 \pm 0.06	0.59 \pm 0.01	3.62 \pm 0.11	1.37 \pm 0.07	0.93 \pm 0.06

Values represent mean \pm S.D.

2にまとめた。コントロール群とハイブリッド型リポソーム投与群に差異は見られず、リン脂質分子DMPCで構成されるハイブリッド型リポソームが副作用なく正常に代謝されていることが明らかとな

った。

Table 3にDMPC/10 mol% C₁₂(EO)₂₃ハイブリッド型リポソームを静脈内反復投与したラットの相対臓器重量測定結果をまとめた。高用量群において

脾臓の肥大が見られたが、高用量の脂肪乳剤を投与した際と同様の症状であり、脂肪乳剤同様に短期間で回復すると思われる。高用量群のその他の臓器、また低用量群のすべての臓器においてコントロールと比較して重量変化がみられず、剖検所見も良好でありハイブリッド型リポソームの高い安全性が確認された。

7. ハイブリッド型リポソームの体内分布 リポソーム内に封入された薬剤の体内分布に関しては、一般的な静脈内注入法では、肝臓、脾臓、肺の細網内皮系細胞に圧倒的に取り込まれる。¹⁴⁾ 本論文においては、蛍光脂質 (NBCPC) をハイブリッド型リポソームに含有させ、正常マウスに眼窩静注し、所定時間後に解剖し、肝臓・肺・腎臓・脾臓の各臓器における蛍光量を測定した。結果を Fig. 9 に示す。図から明らかなように肝臓における蛍光強度は 1 時間後に最大値を示し、その後時間とともに減少した。蛍光顕微鏡観察からは、NBDPC 含有ハイブリッド型リポソームは投与後 1 時間で肝臓組織内の肝実質細胞内に取り込まれ蓄積し、その後数時間で肝実質細胞内部において分解・代謝されていると考えられる。また、組織切片内部の胆管などの脈管系への蓄積は観察されなかった。一方、腎臓、脾臓、肺においては蛍光強度に変化はなく各臓器に蓄積されないことが明らかになった。以上のことから、複合脂質膜は静脈投与後肝臓において代謝され安全であることが明確になった。

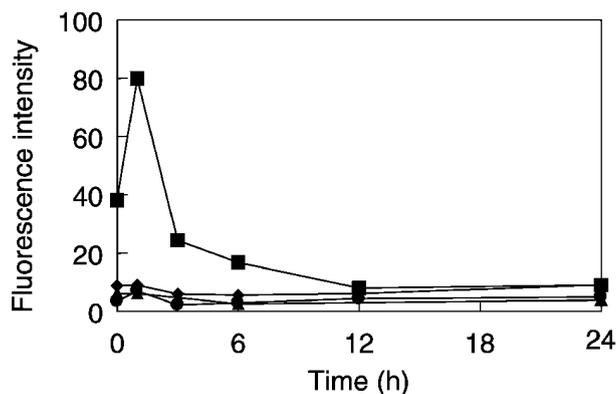


Fig. 9. Fluorescence Intensity of NBDPC Incorporated into Hybrid Liposomes in Various Organ of Normal Mice after the Intravenous Administration

●: Lung, ◆: Spleen, ▲: Kidney, ■: Liver. [DMPC] = 1.00×10^{-2} M, [NBDPC] = 4.40×10^{-4} M, [$C_{12}(EO)_{23}$] = 5.49×10^{-4} M, Excitation wavelength: 460 nm, Emission wavelength: 534 nm.

結 論

リン脂質と PEG 系界面活性剤から構成されるハイブリッド型リポソームのマウス由来悪性黒色腫 (B16-F0 melanoma) 細胞腹腔内移植マウスに対する延命効果について検討したところ、次のような興味ある知見が得られた。

- (1) アシル鎖長が 14 で双性の DMPC (678 mg/kg) 単一成分リポソーム投与群において生存率 248% と極めて顕著な治療効果が明らかとなった。しかしながら、膜が経時的に不安定なために投与毎に超音波処理する必要性が明らかとなった。アシル鎖長が 12 の DLPC は毒性を示し、鎖長 16 の DPPC はコントロールと同様であった。
- (2) アシル鎖長が 14 で頭部極性基がカチオン性の DMTAP 単一成分リポソームは毒性を示し、アニオン性の DMPG はコントロールと同様であった。
- (3) DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ 及び DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソーム腹腔内投与群において顕著な延命効果が得られ、特に DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソームでは 186% の延命効果が明らかとなり、投与後も体内で長時間安定なリポソームを形成して全身転移の抑制が示唆された。
- (4) DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{10}$ 及び DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソームは、それぞれ直径 70 nm, 100 nm 前後で 4 週間以上非常に均一で安定であることが明らかとなった。
- (5) DMPC/10 mol% $C_{12}(EO)_{23}$ ハイブリッド型リポソームの正常ラットを用いた反復投与毒性試験から、体重、血液検査、相対臓器重量、剖検所見において異常が認められず高い安全性が明確となった。さらに、ハイブリッド型リポソームは、体内動態試験から、肝臓において代謝され安全であることが明確になった。

以上のように、アシル鎖長が 14 で双性の DMPC と PEG 系界面活性剤 $C_{12}(EO)_{10}$ 及び $C_{12}(EO)_{23}$ からなるハイブリッド型リポソームは、メラノーマ細胞移植マウスに対して顕著な延命効果を示すことが明確となった。ハイブリッド型リポソームは *in*

vitro においてがん細胞に対して特異的に融合・蓄積し、アポトーシスを誘導することをマイクロフィジオメーターなどで確認している。^{15,16} *In vivo* においてもハイブリッド型リポソームのみの治療により腫瘍に対してアポトーシスを誘導すると共にリンパ球を増加させる免疫賦活作用により顕著な延命効果を示す可能性も示唆された。今後、薬物動態及びモデル動物を用いて種々の腫瘍に対する延命効果とメカニズムを明確とする。

抗がん剤を含まないハイブリッド型リポソームのみを用いて、メラノーマ移植マウスに対して顕著な制がん効果を示し、かつ、正常ラットに対して無毒性で副作用がないという動物実験の結果は今回が初めてである。これまでにない全く新しいタイプの制癌剤として期待できると考える。

謝辞 本研究にあたり、実験面で協力いただいた東京都臨床医学総合研究所の小原道法博士及び薬物安全性試験センターの金納明宏博士に感謝申し上げます。本研究の一部は文部科学省科学研究費 (No. 14350439) の補助によるものであることを付記します。

REFERENCES

- 1) Bangham A. D., Sandish M. M., Watkins J. C., *J. Mol. Biol.*, **13**, 238–252 (1965).
- 2) Graybill J. R., Craven P. C., Tayler R. L., Williams D. M., Magee W. E., *J. Infect. Dis.*, **145**, 748–752 (1982).
- 3) Gabizon A., Catane R., Uziely B., Kaufman B., Safra T., Cohen R., Martin F., Huang, A., Barcnholz Y., *Cancer Res.*, **54**, 987–992 (1994).
- 4) Ueoka R., Matsumoto Y., Moss R. A., Swarup S., Sugii A., Harada K., Kikuchi J., Murakami Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **110**, 1588–1595 (1988).
- 5) Allen T. M., Everest J. M., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **226**, 539–544 (1983).
- 6) Oku N., Doi K., Namba Y., Okada S., *Int. J. Cancer*, **58**, 415–419 (1994).
- 7) Imamura C., Kemura Y., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 1119–1121 (1997).
- 8) Imamura C., Kanno A., Mitsuoka C., Kitajima S., Inoue H., Iwahara M., Matsumoto Y., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **116**, 942–950 (1996).
- 9) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Iwahara M., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **9**, 1937–1940 (1999).
- 10) Matsumoto Y., Kato T., Iseki S., Suzuki H., Nakano K., Ueoka R., *Yakugaku Zasshi*, **119**, 280–287, (1999).
- 11) Kanno A., Tsuzaki K., Miyagi M., Matsumoto Y., Ueoka R., *Biol. Pharm. Bull.*, **22**, 1013–1014 (1999).
- 12) Elworthy P. H., Macfarlane C. B., *J. Chem. Soc.*, **1962**, 537–541.
- 13) Shimada K., Miyagishima A., Sadzuka Y., Nozawa Y., Mochizuki Y., Ohshima H., Hirota S., *J. Drug Target*, **3**, 283–289 (1995).
- 14) Nojima S., Sunamoto J., Inoue K., “Liposome,” Nankodo Co., Ltd., Tokyo, 1988.
- 15) Nakano K., Iwamoto Y., Takata W., Matsumoto Y., Ueoka R., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **12**, 3251–3254 (2002).
- 16) Matsumoto Y., Kato T., Kemura Y., Tsuchiya M., Yamamoto M., Ueoka R., *Chem. Lett.*, **1999**, 53–54.