悪性脳腫瘍に対する熱感受性リポソームと 脳組織内加温による化学温熱療法

柿沼健一・田中隆一・高橋英明・須田 剛^{*1)}、加藤 仁^{*2)}

Chemo-thermotherapy for malignant brain tumor with the combination of thermosensitive liposome and interstitial hyperthermia

Malignant glioma responds poorly to chemotherapy presumably mainly because the antitumor drugs can not be delivered in effective concentrations to the tumor site without causing complications, and because the existence of the blood-brain barrier (BBB) restricts the distribution of many antitumor drugs to malignant gliomas. We used thermosensitive liposomes containing CDDP (cis-diamminedichloroplatinum) with localized heating, and the possibilities of this drug delivery system to the brain tumor were discussed. First, this unique and attractive strategy showed remarkable effects against the RSV-induced subcutaneous tumor which was relatively insensitive to various antitumor agents.

The authors then investigated the antitumor effect on rat malignant brain tumor. Ten days after tumor inoculation, six groups were formed: control, free CDDP, hyperthermia, free CDDP+hyperthermia, CDDP-liposome, and CDDP-liposome+hyperthermia. Liposomes containing CDDP (CDDP-liposome) or free CDDP were injected via the tail vein. The brain tumor heating was given using a radiofrequency antenna which was designed at our institute. As a result, the rats treated by CDDP-liposome+hyperthermia had the longest survival time, and the tumor CDDP level of this group was the highest when compared to other groups.

These findings suggest that the combination of thermosensitive liposome and localized hyperthermia could ① bring a direct thermal killing of the tumor cells, plus ② increase a permeability of the

BBB to transport of CDDP, plus ③ target CDDP-liposomes to the tumor site and produce an effective release of liposomal CDDP with greater activity than when free CDDP was injected.

Kenichi Kakinuma・Ryuichi Tanaka・
Hideaki Takahashi・Tsuyoshi Suda^{*1)},
Masashi Kato^{*2)}

key words : hyperthermia, thermosensitive liposome, targeting chemotherapy, malignant brain tumor, CDDP

抗癌剤の多くは悪性腫瘍に対して強い殺細胞効果を有する反面、副作用も多く、治療係数は概して小さい。さらに脳腫瘍においては、血液脳関門の存在が腫瘍内への抗癌剤の到達を妨げ、一層治療係数が小さくなることが知られている。なかでも悪性グリオーマはきわめて予後のわるいものとして知られ、さまざまな化学療法が試みられてきたが、今日までその予後はほとんど改善されていないといっても過言ではない。

筆者らは、これまで悪性脳腫瘍の組織内温熱療法に用いる radiofrequency (RF) 加温装置の試作開発とともに温熱療法の基礎的研究を行ってきており、すでに RF 加温装置を用いて臨床応用を行い、すぐれた成績を報告している¹⁻⁶⁾。さらに筆者らは、この局所温熱療法に、抗癌剤を封入した熱感受性リポソームを組み合わせることによって、悪性脳腫瘍に対する新しい化学温熱療法の可能性について検討した。

材料と方法

(1) 熱感受性リポソームの調整

熱感受性リポソームは reverse-phase evaporation 法によって作製した, dipalmitoylphosphatidylcholine と distearoylphosphatidylcholine を

^{*1)} Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University 新潟大学脳研究所脳神経外科

^{*2)} Division of Pharmacy, Niigata University Medical Hospital 新潟大学医学部附属病院薬剤部

Offprint requests to : Kenichi Kakinuma, M.D., Department of Neurosurgery, Brain Research Institute, Niigata University, 1-757 Asahimachi-dori, Niigata 951

図 1 Temperature-response curves

The combination of CDDP-liposome and hyperthermia at 42°C and 43°C showed a significant tumor growth delay compared with free CDDP and hyperthermia alone.

9 : 1 のモル比で isopropylether と chloroform の混合溶媒 (1 : 1) に溶解したあと, CDDP (cis-diamminedichloroplatinum) を加えて攪拌し, 10 分間の sonication を行った. その後, vacuum evaporator にて溶媒を除去し, 透析で free の CDDP を除き, 約 80% の CDDP が 41°C 以上で放出されよう設定された CDDP 封入熱感受性リポソーム (CDDP-liposome) を作製した⁷⁾.

(2) 皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討

筆者らは, まずはじめにこの CDDP-liposome を用い, マウスの皮下腫瘍グリオーマモデルで局所温熱療法との併用効果について検討した. 10⁶個の Rous sarcoma virus (RSV) 誘発グリオーマ細胞を C3H/He マウスの大腿皮下に移植し, 12 日から 14 日後, 腫瘍の大きさが一定になった時点で Group A (free CDDP 単独投与), Group B (hyperthermia), Group C (free CDDP と hyperthermia の併用), Group D (CDDP-liposome 単独投与), Group E (CDDP-liposome と hyperthermia の併用) の 5 治療群 (各群 n = 20~30 匹) にわけ実験を行った. 抗腫瘍効果の判定は腫瘍体積が 4 倍になるまでの日数の比較とし, 加温は恒温

図 2 Dose-response curves

The combination of CDDP-liposome and hyperthermia was most effective per amount of CDDP in delaying tumor growth.

槽を用いた.

まず 41, 42, 43°C の各温度で 60 分間腫瘍を温浴させ, 温度の違いによる抗腫瘍効果を検討した. 薬剤はすべて加温直前に尾静脈から注入したが, それぞれは CDDP に換算して 4 μg/g で行われた.

次いで, 加温を 43°C で 60 分間行い, 2, 4, 6 μg/g の 3 通りの投与量の違いによる抗腫瘍効果も同時に検討した.

(3) CDDP-liposome の体内薬理動態

腫瘍組織内および血液中の, CDDP 濃度の推移について検討した. 薬剤の投与量はいずれも CDDP に換算して 4 μg/g, 加温はいずれも 43°C で 60 分間行われた. 薬剤注入の 20 分後に加温を開始し, 加温開始時, 30, 60, 120 分後に心臓穿刺で採血し, 腫瘍を摘出したのち, CDDP 濃度を Pt 濃度として atomic absorption spectrophotometer で測定した.

図3 Time course of CDDP levels in blood
When CDDP was encapsulated in liposomes, the slower blood clearance of CDDP was seen. Then blood CDDP levels decreased rapidly corresponding to the start of heating.

図4 Time course of CDDP levels in tumor
The tumor uptake of liposomal CDDP was markedly increased by heating.

(4) 脳腫瘍に対する抗腫瘍効果の検討

次いで、ラットの脳腫瘍グリオーマモデルで本法の抗腫瘍効果について検討を行った。Fisher ラット脳内に RSV 誘発グリオーマ細胞 10^5 個を移植し、10 日目に Group 1 (control), Group 2 (free CDDP 単独投与), Group 3 (hyperthermia), Group 4 (free CDDP と hyperthermia の併用), Group 5 (CDDP-liposome 単独投与), Group 6 (CDDP-liposome と hyperthermia の併用) の 6 治療群 (各群 $n=10$ 匹) にわけ、生存期間をみた。加温方法は、筆者らの施設で試作開発してきた組織内温熱療法を用いた。すなわち、径 1.0 mm の RF アンテナを腫瘍中央に刺入し、腫瘍内温度は腫瘍内にアンテナと平行に刺入した径 0.8 mm 多点式温度計で、複数の個所で同時に、かつ real time にモニターしながら RF generator を操作し、腫瘍内温度が 41°C 以上になるようにコントロールした。まず 15 分間加温したのち、CDDP に換算して $6\mu\text{g/g}$ の free CDDP、あるいは CDDP-liposome を尾静脈から注入し、さらに

15 分間の加温を行った。

また移植 15 日目に、Group 2, Group 4, Group 5, Group 6 で同様の治療を行った直後に、脳腫瘍を摘出し、腫瘍内 CDDP 濃度を測定した (各群 $n=10$ 匹)。

結 果

(1) 皮下腫瘍に対する抗腫瘍効果

① 加温温度別の抗腫瘍効果 (図 1)

Group B, Group C, Group D とも加温温度の上昇につれて抗腫瘍効果が増強された。 41°C では Group C, Group D の 2 群は、Group B に対しごく軽度の温熱増強効果がみられたのみで、両者に差はなかったが、 42°C , 43°C の加温を併用すると、Group D では Group B, Group C に対して有意な抗腫瘍効果がみられた ($P<0.05$: Student's t-test)。

② 薬剤投与量別の抗腫瘍効果 (図 2)

加温を併用しなかった群と比較すると、Group D は Group A と同等の効果がみられたに過ぎなかった。一方、加温を併用した Group C, Group

表 1 The median survival time among the groups

Group	Cases	Mean survival(days)	P value
Group 1(control)	10	19.5±2.5	
Group 2(free CDDP)	10	20.1±3.0	N.S vs Gr. 1
Group 3(Hyperthermia)	10	28.0±3.7	<0.01 vs Gr. 1-2
Group 4(free CDDP+Hyperthermia)	10	29.1±6.2	<0.01 vs Gr. 1-2, N.S vs Gr. 3
Group 5(CDDP-liposome)	10	32.1±3.5	<0.01 vs Gr. 1-2, <0.05 vs Gr. 3-4
Group 6(CIIP-liposome+Hyperthermia)	10	41.6±9.5	<0.01 vs Gr. 1-4, <0.05 vs Gr. 5

Survival of animals treated with either hyperthermia or CDDP-liposome was significantly prolonged. Group 6, treated with both of them, had the best outcome.

図 5 CDDP concentration in the brain tumor
Brain tumor CDDP levels were significantly higher when the CDDP-liposome was used with hyperthermia, and CDDP levels were also detectable when CDDP-liposome was used without hyperthermia. Broken line shows the detectable limit of CDDP. ND is below the minimum level of detectability.

E では顕著に抗腫瘍効果が増強された。特に Group E では、Group C にくらべてさらに効果が増強され、4 μg/g 以上では有意な差がみられた ($P < 0.05$: Student's *t*-test)。

(2) CDDP-liposome の体内薬理動態

血液中の CDDP 濃度は、CDDP-liposome を投与した Group D, Group E の 2 群において、20 分後でまだきわめて高濃度に維持されており、その後徐々に減少していった(図 3)。また、加温と併用した Group E では、Group D に比してその減少速度が速まっていたが、腫瘍組織内の CDDP 濃

度は、Group E で他の治療群と比較して約 2 倍の CDDP の集積がみられたことから、CDDP が加温部位に集積して消費されたためと考えられた(図 4)。

(3) 脳腫瘍に対する抗腫瘍効果

平均生存期間(日)は、Group 1 が 19.5 ± 2.5 , Group 2 が 20.1 ± 3.0 , Group 3 が 28.0 ± 3.7 , Group 4 が 29.1 ± 6.2 , Group 5 が 32.1 ± 3.5 , Group 6 が 41.6 ± 9.5 であった。Group 1 と 2 との間および Group 3 と 4 との間には差がなく、free CDDP の投与は無効と考えられた。一方、Group 1, 2 に比較して、加温もしくは CDDP-liposome のいずれかを用了 Group 3, 4, 5, 6 では、有意に生存期間が延長した ($P < 0.01$: Wilcoxon-test)。さらに加温と CDDP-liposome の両者を用了 Group 6 では最大の抗腫瘍効果が得られた(vs Group 1-4: $P < 0.01$, vs Group 5: $P < 0.05$)(表 1)。

腫瘍内 CDDP 濃度も同様の結果で、加温と CDDP-liposome の両者を用了 Group 6 では最大の CDDP 濃度が得られた(vs Groups 2, 4: $P < 0.0001$, vs Group 5: $P < 0.001$: Student's *t*-test)。また、加温を併用せず、CDDP-liposome のみを用いた Group 5 でも CDDP 濃度が上昇した。一方、Groups 2, 4 では、CDDP 濃度は測定感度 ($> 0.6 \mu\text{g/g}$) 以下だった(図 5)。

考 察

周知のように、熱感受性リポソームは、腫瘍局所に効果的にかつ選択的に抗癌剤を到達させ、さらに温熱療法との相乗効果をも得られる DDS と

図 6 Photograph showing how hyperthermic therapy is performed clinically

して期待され、筆者らもはじめに行った実験(2)における皮下腫瘍のモデルに対する顕著な抗腫瘍効果と、実験(3)の結果にみる理論的な体内薬理動態から、この方法の有用性に確信を持った。筆者らのほかにもこれまで多くの報告がなされてきたが^{3,4-10)}、それら報告の多くは加温の容易な皮下腫瘍に対して行われたものであり、この魅力ある DDS も、現在の加温技術の限界から、深部に発育する腫瘍には適応できないなど、その後さまざまな問題点が明らかになってきた。さらに、脳という臓器の解剖学的特徴から、これまで脳腫瘍に本法を応用しようとする試みは報告されていない。

筆者らの施設では、すでに 10 年以上にわたり、悪性脳腫瘍に対する温熱療法について、基礎的、臨床的検討を行ってきた¹⁾。そして近年、教室の高橋らにより、定位的脳手術装置を用いて直径 1.0 mm の加温用アンテナを脳内の任意の部位に正確に刺入して行う、RF 組織内加温法が考案された^{2,4-6)}。この方法は、局所麻酔下に少ない侵襲でアンテナを脳内の任意の部位に刺入し、症例を車椅子に座らせたままで、なんら苦痛を感じさせることなく加温操作を行うことが可能である(図 6)。さらにこの方法は、加温用アンテナの材質の熱インピーダンスを改良することにより、RF を低 power でかつ任意に調節できるうえ、加温部位に直径 0.8 mm の多点式温度計を刺入し、温度を real time に monitoring することにより、事前

に計画した範囲を、計画した温度で加温できる画期的なシステムである。加えてこの方法は、定位脳手術装置によって脳内のいかなる部位にも RF antenna を正確に挿入することができ、これまでの方法ではさらに治療が困難であった脳の深部に存在する腫瘍もよい治療の適応となる。このシステムによって、悪性脳腫瘍に対する熱感受性リポソームを用いた DDS が、実用化へ向けて具体化してきたものと思われる。

一方、これまで脳腫瘍、特に悪性グリオーマに対する化学療法¹¹⁾においては、腫瘍内への抗癌剤の到達を妨げる血液脳関門が存在することが大きな問題点とされ、薬剤の選択に当たってもっとも重要と考えられた点は、その薬剤の血液脳関門に対する透過性であった。そのため、悪性グリオーマに対してはニトロソウレア系の抗癌剤が主に用いられてきたが、それらの有効性は *in vitro* での強い殺細胞効果に反して、満足すべきものではないのが現状である。

今回の筆者らの脳腫瘍モデルを用いた実験(4)で、通常では血液脳関門を透過しないとされる free CDDP が熱感受性リポソームに封入されたことにより、CDDP が腫瘍内に高濃度に移行し、より強力な抗腫瘍効果を発揮したことは、リポソームと血液脳関門の関係を考えるうえで、きわめて興味深い結果と思われた。現在、細胞内に生理活性物質を導入するなど、細胞膜相互作用のモデルとしても重要視されている、リポソームの持つ cell affinity に注目して、熱感受性リポソームとはまた別の視点から、リポソームと血液脳関門の主役である内皮細胞の細胞膜との親和性を高め、血液脳関門の障壁を乗り越えようとする試みが報告されており^{12,13)}、今後の進展が期待されている。筆者らの結果も、このような内皮細胞とのリポソーム独自の cell affinity の一端を示唆するものと考えられ、現在さらに検討中である。

また筆者らは、薬剤固有の血液脳関門透過性は、温熱療法と併用することで一層亢進することをすでに報告している^{14,15)}。この利点と、前記のリポソームと血液脳関門の親和性とが、Group 6 において治療群中最大の腫瘍内 CDDP 濃度をもたら

し、さらに温熱による直接の殺細胞効果が加わり、これら三者の総合的な相乗効果が、この Group に最大の抗腫瘍効果をもたらしたのと考えられる。

したがって本法は、① 抗癌剤を脳腫瘍内に高濃度に target できる新しい化学療法であること、② 温熱による直接の殺細胞効果も有するため、化学療法のみならず温熱療法との相乗効果が期待できること、③ 加温によって血液脳関門の透過性が亢進すること、およびリポソーム自身に血液脳関門の内皮細胞との膜親和性が期待されることによって、熱感受性リポソームの腫瘍への移行が高められ、化学療法における血液脳関門の問題を克服できる可能性があること、④ また、これらの目的の達成には十分な加温技術が必須のものとなるが、筆者らの RF 組織内加温法はすでに臨床治療に應用され、安全で安定した脳腫瘍の加温を達成していることなど、数多くの特長を備え、悪性脳腫瘍に対する新しい化学温熱療法として十分期待できうと思われる。

さて、従来から問題視されている、リポソームの網内系による捕捉については、今回用いた熱感受性リポソームも肝臓、脾臓には高濃度の集積を示した。しかし、実験(4)の脳腫瘍モデルで、治療後網内系臓器についても病理学的検索を行ったが、光顕レベルにおいて組織学的には異常を認めなかった。これは、脳腫瘍局所の加温が十分に達成されたため、再循環する熱感受性リポソーム量が減少し、たんに静注した場合よりも網内系臓器への集中が抑制されたとも考えられる。しかしながら、実際の悪性グリオーマは周囲の正常脳組織に広く浸潤しているため、筆者らの組織内加温法をもってしても、腫瘍全体を完全に加温するにはなお限界がある。今後臨床へ応用するためには、リポソームの網内系による捕捉量の軽減を図り、悪性グリオーマ全体に治療範囲を拡大するためにも、脳内加温技術のさらなる改良、あるいは現在ある加温技術の特性と限界に即した熱感受性リポソーム療法の新たな strategy の考案、また脂溶性、水溶性、いずれの抗癌剤も封入することが可能であるといわれるリポソームの特性を生かし

て、強力な抗腫瘍効果がありながら、脳血液関門を通過しないとされ、使用されてこなかった抗癌剤の新たな選択などを考慮していく必要があろう。

文 献

- 1) Tanaka, R., Kim, C.H., Yamada, N. et al.: Radio-frequency hyperthermia for malignant brain tumors. *Neurosurgery* 21: 478-483, 1987.
- 2) Takahashi, H., Tanaka, R., Hondo, H. et al.: Pre-clinical experiments of RF interstitial hyperthermia with phantom and animals. *Hyperthermic Oncology in Japan '90*: 87-88, 1990.
- 3) Watanabe, M., Tanaka, R., Hondo, H., Kuroki, M.: Effect of antineoplastic agents and hyperthermia on cytotoxicity toward chronically hypoxic glioma cells. *Int. J. Hyperthermia* 8: 131-138, 1992.
- 4) Takahashi, H., Tanaka, R., Hondo, H. et al.: RF hyperthermia for malignant glioma—development of a needle-shaped applicator and small-sized RF generator—. *Hyperthermic Oncology in Japan '91*: 133-134, 1993.
- 5) 高橋英明, 田中隆一, 本道洋昭, 中島 拓, 渡辺正人・他: 悪性脳腫瘍に対する RF 温熱療法の臨床治験. *Neurosurgeons* 12: 245-255, 1993.
- 6) 高橋英明, 田中隆一, 渡辺正人, 柿沼健一, 須田 剛・他: 悪性脳腫瘍の組織内温熱療法—RF 加温による臨床成績—. *Jpn. J. Hyperthermic Oncol.* 11(1): 61-67, 1995.
- 7) Iga, K., Hamaguchi, N., Igari, Y. et al.: Enhanced antitumor activity in mice after administration of thermosensitive liposome encapsulating cisplatin with hyperthermia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 257: 1203-1207, 1991.
- 8) Nishimura, Y., Ono, K., Hiraoka, M. et al.: Treatment of murine SCC tumors with localized hyperthermia and temperature-sensitive liposomes containing cisplatin. *Radiat. Res.* 122: 161-167, 1990.
- 9) Weinstein, J.N., Magin, R.L., Cysyk, R.L. et al.: Treatment of solid L1210 Murine tumors with local hyperthermia and temperature-sensitive liposomes containing methotrexate. *Cancer Res.* 40: 1388-1395, 1980.
- 10) Yatvin, M.B., Mühlensiepen, H., Porchen, W. et al.: Selective delivery of liposome-associated cis-Dichlorodiamineplatinum (II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Cancer Res.* 41: 1602-1607, 1981.
- 11) Takakura, K., Abe, H., Tanaka, R. et al.: Effects of ACNU and radiochemotherapy on malignant gliomas. *J. Neurosurg.* 64: 53-57, 1986.
- 12) Umezawa, F., Eto, Y.: Liposome targeting to mouse brain: Mannose as a recognition marker. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038-1044, 1988.
- 13) Yagi, K., Naoi, M., Sakai, H. et al.: Incorporation of enzyme into the brain by means of liposomes of

- novel composition. *J. Appl. Biochem.* 4 : 121-125, 1982.
- 14) Kakinuma, K., Tanaka, R., Takahashi, H. et al. : Targeting therapy for malignant brain tumor using thermosensitive liposome. *Hyperthermic Oncology in Japan '91* : 393-394, 1993.
- 15) Kakinuma, K., Tanaka, R., Takahashi, H., Sekihara, Y., Watanabe, M. et al. : Drug delivery to the brain using thermosensitive liposome and local hyperthermia. *Int. J. Hyperthermia* 12(1) : 157-165, 1996.