肝細胞癌の塞栓療法のための塩酸エピルビシン封入 w/o/w 型 エマルションのラットに対する急性毒性の評価

日野知証・磯崎正季子・山本浩充・竹内洋文・川島嘉明^{*1)},
中野 哲・山崎 太・熊田 卓^{*2)}, 佐々 敏^{*2,*3)}

Evaluation of acute toxicity of epirubicin hydrochloride-encapsulating w/o/w emulsion administered to rat for the transcatheter embolization therapy for hepatocellular carcinoma

The toxicity of lipiodol (LPD) w/o/w emulsions encapsulating epirubicin hydrochloride (FARM) after iv administration to rat was investigated compared to the conventional o/w emulsions used for transcatheter arterial embolization (TAE) therapy for hepatocellular carcinoma. Survival time of the rat administered w/o/w emulsion was longer than that of the o/w emulsion. The rats administered o/w emulsion (≥ 1.5 ml/kg) were deceased within 2 days by pulmonary edema caused by embolism with fine oil droplets. The edema was not found in the lungs of the rats administered w/o/w emulsion. The toxicity of the FARM, ie, size reduction of thymus gland and ulceration in the stomach, was reduced by encapsulating the drug in the w/o/w emulsion. The present w/o/w emulsion prepared by us proved a desirable formulation for the TAE therapy because of reducing toxicities of oil droplets and drug.

Tomoaki Hino・Makiko Isozaki・
Hiromitsu Yamamoto・Hirofumi Takeuchi・
Yoshiaki Kawashima^{*1)}, Satoshi Nakano・
Futoshi Yamazaki・Takashi Kumada^{*2)},
Toshi Sassa^{*2,*3)}

key words : w/o/w emulsion, acute toxicity,
epirubicin hydrochloride,
transcatheter arterial embolization,
hepatocellular carcinoma

ル注入療法³⁾や肝移植⁴⁾, さらには, これらと放射線療法, 化学療法などを組み合わせた集学的治療⁵⁾が行われている.

TAE の一種として, 選択的腫瘍集積性を有する油性造影剤であるリピオドール (LPD) をキャリアーとして用いた化学塞栓療法⁶⁾が広く行われている. しかし, 抗癌剤の多くは水溶性であるため LPD に溶解させるのは困難であり, o/w 型または w/o 型のエマルションとして治療に用いられている. しかしながら, これらのエマルションにはつぎのような欠点がある. 前者においてはエマルション注入直後から抗癌剤は血流により希釈されて全身循環系に漏れ, 癌に集積しなくなる虞がある. 後者においては, 通常水相 (すなわち薬物水溶液相) の油相に対する体積比が小さく, 抗腫瘍効果が濃度依存的である薬物では効果が減少する.

そこで筆者らは, 簡便かつ無菌的に操作できる 2 段階パンピング法を使用して, 多量の薬物を封入・保持できる w/o/w 型エマルションを開発した⁷⁾. このエマルションは, 現在 TAE に使用されている o/w 型エマルションとくらべて, *in vitro* でヒト赤血球に対する溶血性が少ないことが判明した. そこで本研究では, さらに w/o/w 型エマルションをラット尾静脈から投与した場合の急性毒性について, 詳細に検討したのでここに報告する.

試料と方法

(1) 試料

油性造影剤のリピオドール・ウルトラフルイド® (LPD, ラボワトワール・ゲルベ社), 水溶性造影剤のオムニパーク 240® (OMN, 第一製薬) および抗癌性腫瘍剤のファルモルビシン® 注 (FARM, ファ

現在肝細胞癌の治療法として, 肝切除¹⁾, 経カテーテル動脈塞栓療法 (TAE)²⁾, 経皮的エタノー

^{*1)} Gifu Pharmaceutical University 岐阜薬科大学

^{*2)} Ogaki Municipal Hospital 大垣市民病院

^{*3)} Gifu University 岐阜大学医学部

Offprint requests to : Yoshiaki Kawashima, Ph. D.,
Gifu Pharmaceutical University, 5-6-1 Mitahora-
Higashi, Gifu 502

図1 Survival time of rat after the administration of emulsion

- : w/o/w emulsion with FARM.
- : w/o/w emulsion without FARM.
- △ : o/w emulsion with FARM.
- ▲ : o/w emulsion without FARM.

ルマシア)は購入したものをそのまま使用した。

LPDは、ヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステルで、1 ml中にヨード 480 mg (38 w/w%)を含有する。OMNは、1 ml中にイオヘキソールを 527.7 mg 含有する非イオン性造影剤の水溶液で、添加物としてエデト酸二ナトリウムカルシウム 0.1 mg, トロメタミン 1.21 mg をそれぞれ含有する。FARMは1バイアル中に、塩酸エピルピシン (EPI)を 10 mg 含有し、添加物として乳糖 50 mg を含有する。

ゼラチンおよびポリオキシエチレン硬化ヒマシ油 60 (HCO-60, HLB 14.0)は、試薬特級をそのまま用いた。

(2) パンピング法によるエマルジョンの調製
エマルジョンの調製は、水相と油相をそれぞれ2本のシリンジ(テルモシリンジ®, テルモ)に充填し、三方活栓(トップ化成)で接続してシリンジ内容物を往復させる方法(パンピング法)を用いた。このパンピング法により、簡便にかつ無菌的にエマルジョンを調製できる。

w/o/w型エマルジョンの調製は、先に開発した2段階パンピング法により行った⁷⁾。すなわち、FARM (EPI 150 mg), HCO-60 0.48 mg を含有した OMN からなる内水相 4 ml と油相 (LPD) 6 ml を 40 回パンピングすることにより w/o 型エマル

表1 Macroscopic pathological finding of lung

Dose (ml/kg)	0.7	1	1.5	2	3
Present w/o/w emulsion (with FARM)	—	—	—	—	a
Present w/o/w emulsion (without FARM)	—	—	—	—	—
Conventional o/w emulsion (with FARM)	—	—	b	b	b
Conventional o/w emulsion (without FARM)	—	—	b	b	b

a : Bleeding in the lung was observed.

b : Pulmonary edema.

— : No significant change was observed.

ジョンを調製し(一次乳化),これと外水相(ゼラチン 300 ml 含有した OMN) 10 ml とを 10 回パンピングすることで w/o/w 型エマルジョンを得た(二次乳化)。顕微鏡法による油滴の平均 Heywood 径は 69.6 μ m であった⁷⁾。

O/W 型エマルジョンは、FARM (EPI 150 mg) を含有した OMN からなる水相) 10 ml と油相 (LPD) 10 ml を 40 回パンピングすることにより調製した。油滴の平均径は 8.5 μ m であった⁷⁾。

また、FARM 非含有 w/o/w 型エマルジョンおよび o/w 型エマルジョンも同様に調製した。

(3) エマルジョンのラットに対する毒性の評価

FARM 含有あるいは非含有 o/w 型および w/o/w 型エマルジョン、0.7~4 ml/kg を単回 wistar 系雄性ラット (10 週齢, 体重 282~301 g) に、尾静脈より投与した。死亡後、あるいは投与 15 日後に屠殺、解剖して、組織の傷害を肉眼で観察した。また、摘出した肺および肝臓を 10% 緩衝ホルマリン水で固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン-エオシン染色して組織標本を調製し、光学顕微鏡で観察した。

結 果

(1) エマルジョン投与後のラットの生存日数
エマルジョン投与後のラットの生存日数を図1に示す。o/w 型エマルジョンを投与したラットでは、FARM の有無に関わらず 1.5 ml/kg 以上の投与で 2 日以内に死亡した。これらのラットでは、投与直後に腹臥位、不整呼吸を示した。また、1.0 ml/kg 以下の FARM 含有 o/w 型エマルジョン

表 2 Size reduction of thymus gland after administration of emulsion

Dose(ml/kg)	0.7	1	1.5	2	3
Present w/o/w emulsion (with FARM)	—	—	+	+	+
Present w/o/w emulsion (without FARM)	—	—	—	—	—
Conventional o/w emulsion (with FARM)	+	+	— ^{a)}	— ^{a)}	— ^{a)}
Conventional o/w emulsion (without FARM)	—	—	—	—	—

+ : Size reduction of thymus gland was observed.

— : No significant change was observed.

^{a)} Size reduction of thymus gland was observed, because rat died in 2 days after administration.

を投与したラットでも腹臥位、不整呼吸を示したが、約2時間後には回復した。

FARM含有w/o/w型エマルジョンを2 ml/kg以上投与したラットでは、7～9日後に死亡した。これらのラットでは、投与4～5日後より血便、下痢、貧血、流涎などの症状を示していた。1.5 ml/kg以下の投与あるいはFARM非含有w/o/w型エマルジョンを投与したラットでは、外観上異常を示さず15日以上生存した。

(2) 剖検結果

剖検時の肺の状態を表1に示す。o/w型エマルジョンを投与したラットでは、FARMの有無に関わらず1.5 ml/kg以上の投与で肺水腫を示した。一方、w/o/w型エマルジョンを投与したラットでは、FARM含有w/o/w型エマルジョン3.0 ml/kgを投与したラットで点状出血斑が散在していた以外には、肺に異常が認められなかった。

剖検時の胸腺の状態を表2に示す。FARM含有w/o/w型エマルジョンを1.5 ml/kg以上投与したラットおよびFARM含有o/w型エマルジョンを0.7～1.0 ml/kg投与したラットでは胸腺が萎縮しているのが観察された。その他のラットの胸腺には異常が認められなかった。

剖検時の胃の状態を表3に示す。表2の胸腺萎縮の認められたラットでは、胃にも傷害が認められた。すなわち、FARM含有w/o/w型エマルジョンを1.5 ml/kg以上投与したラットでは、胃

表 3 Macroscopic pathological finding of stomach

Dose(ml/kg)	0.7	1	1.5	2	3
Present w/o/w emulsion (with EPI)	—	—	a	b	b
Present w/o/w emulsion (without EPI)	—	—	—	—	—
Conventional o/w emulsion (with EPI)	c	d	— ^{e)}	— ^{e)}	— ^{e)}
Conventional o/w emulsion (without EPI)	—	—	—	—	—

a : Gastric paries became thin.

b : Bleeding in the stomach was observed.

c : Brown spots were scattered in the inner mucosa.

d : Ulcer was observed.

^{e)} Rats died in 2 days after administration.

— : No significant change was observed.

壁が薄くなったり、胃内出血が認められた。また、FARM含有o/w型エマルジョンを0.7～1.0 ml/kg投与したラットでは、胃内に褐色斑が散在していたり、潰瘍が観察された。その他のラットの胃には異常が認められなかった。

(3) 組織標本の観察

肺組織標本の光学顕微鏡写真を図2に示す。FARM含有o/w型エマルジョンを3 ml/kg投与したラットでは、血管の周囲に水腫および出血が観察される(図2A)。また、FARM含有w/o/w型エマルジョンを2～4 ml/kg投与したラットでは、末梢血管に紫色の壊死様物質の散在が観察される(図2B, C)。一方、w/o/w型エマルジョン1 ml/kg投与したラットの肺では光学顕微鏡レベルでは異常が認められなかった(図2D)。

肝組織標本の光学顕微鏡写真を図3に示す。FARM含有o/w型エマルジョンを3 ml/kg投与したラットでは、充血のため類洞に赤血球が充満しているのが観察される(図3A)。一方、FARM含有w/o/w型エマルジョンを投与したラットの肝標本では、光学顕微鏡レベルでは異常が認められなかった(図3B)。

考 察

o/w型エマルジョンによるラットの死亡は、表1や図2の結果からFARMの有無に関係なく肺水腫によるものと考えられる。これは、o/w型エ

図 2 Pathological findings of lungs of rats after administration of o/w and w/o/w emulsions
 A : o/w emulsion (3 ml/kg) with FARM, died at about 20 min. a : Edema, b : Bleeding.
 B : w/o/w emulsion (4 ml/kg) with FARM, died at 7 day. Arrow : Necrosis
 C : w/o/w emulsion (2 ml/kg) with FARM, died at 9 day. Arrow : Necrosis
 D : w/o/w emulsion (1 ml/kg) with FARM, dissected at 15 day

図 3 Pathological findings of livers of rats after administration of o/w and w/o/w emulsions
 A : o/w emulsion (3 ml/kg) with FARM, died at about 20 min.
 B : w/o/w emulsion (4 ml/kg) with FARM, died at 7 day.

マルションでは油滴が小さく、肺の毛細血管まで油滴が緻密に詰まり、血流が閉ざされ呼吸困難になったためと考えられる。一方、w/o/w 型エマルションでは、油滴が大きく毛細血管にまで到達せ

ず塞栓が緩やかなため、細部の血管への血流が確保されて肺水腫を生じなかったと考えられる。塞栓部位から漏出したエマルション滴は、心臓へ流入後肺に到達する。実際に、肝動注した LPD が肺

末梢血管を塞栓したため、肺脂肪塞栓症や成人性呼吸促迫症候群を発症した例も報告されている⁸⁾。投与時に、肝動脈から漏出したエマルションが肺に及ぼす影響を考慮すれば、w/o/w 型エマルションのほうが o/w 型エマルションより安全であると考えられる。なお、w/o/w 型エマルションが o/w 型エマルションより塞栓する能力が弱いという欠点は、エマルションを動注後ゼラチンスポンジなどで塞栓する⁹⁾ことにより解決できる。

FARM 含有 w/o/w 型エマルションを投与して 7~9 日後に死亡したラットでは胸腺萎縮や胃内出血、血便、下痢などが認められた。FARM による急性毒性には胸腺萎縮¹⁰⁾や下痢、消化管内出血¹¹⁾などが報告されており、これらのラットの死因は FARM による衰弱死と考えられる。この FARM による胸腺や胃に及ぼす影響は、表 2 および 3 の結果に示されたように、o/w 型エマルションでは、0.7 ml/kg 以上の投与で観察されたのに対して、w/o/w 型エマルションでは、1.5 ml/kg 以上で観察された。これは、FARM を w/o/w 型エマルションの油滴中に封入(封入率 62.6%)⁷⁾することにより FARM の毒性が軽減されたためと考えられる。なお、FARM 含有 o/w 型エマルションを 1.5 ml/kg 以上投与したラットでは、胸腺や胃に病変が観察されなかったのは、これらのラットでは、2 日以内に死亡したため、薬物による全身の衰弱が生じなかったためと考えられる(表 2, 3)。

肝組織標本の光学顕微鏡写真(図 3)では、FARM 含有 o/w 型エマルションを 3 ml/kg 投与したラットでは、充血が認められた。一方、FARM 含有 w/o/w 型エマルションを投与したラットの肝臓では異常が認められなかった。このことから、正常肝細胞に対する油滴による毒性は、w/o/w 型エマルションのほうが o/w 型エマルションより低いと考えられる。

以上より、筆者らの開発した w/o/w 型エマルションは、現在 TAE で使用されている o/w 型エマルションとくらべて、正常肝細胞に対する毒性が低いと考えられる。また、塞栓部位から漏出した場合の油滴による肺や FARM による全身臓器

に及ぼす毒性も低く、w/o/w 型エマルションは安全性の高い剤形であると考えられる。さらに、w/o/w 型エマルションでは、FARM が腫瘍集積性を有する LPD の油滴中に封入されているため、癌細胞に対する治療効果が大きく、正常細胞に対する毒性は低いと考えられ、TAE に適する。

今後は、ラットについて肝動注後の毒性や有効性を検討するとともに、臨床応用を検討したい。

エマルションの静脈内投与および組織標本の作成について御指導していただいたカワシマ商事株式会社 野崎良美氏に謝意を表します。

本研究費の一部は、文部省科学研究費、基盤研究(C)(2)(課題番号 07672320)によった。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 津下 宏, 三村 久, 高倉範尚, 浜崎啓介, 岡林孝弘・他: 肝細胞癌の腫瘍径と腫瘍数よりみた肝切除の適応. 日本消化器病学会雑誌 84: 2092, 1987.
- 2) Goldstein HM, Wallace S, Anderson JH, Bree RL, Gianturco C: Transcatheter occlusion of abdominal tumors. Radiology 120: 539-545, 1976.
- 3) Kumada T, Nakano S, Takeda I, Sugiyama K, Osada T et al.: Treatment of small hepatocellular carcinoma. Cancer Chemother. Pharmacol. 31: S25-S29, 1992.
- 4) 永末直文, 河野仁志, 竹本好成: 肝細胞癌に対する外科治療—肝切除と肝移植. Current Therapy 10: 1941-1946, 1992.
- 5) 市田隆文: 肝細胞癌に対する集学的治療. Current Therapy 10: 2197-2201, 1992.
- 6) Raoul JL, Heresbach D, Bretagne JF, Ferrer DJ, Duvauferrier R et al.: Chemoembolization of hepatocellular carcinomas. Cancer 70: 585-590, 1992.
- 7) 日野知証, 竹内洋文, 丹羽敏幸, 長屋和正, 川島嘉明・他: 肝細胞癌の塞栓療法のための塩酸エビルビジン封入 w/o/w 型リピドドールエマルションの設計. DDS 10: 115-119, 1995.
- 8) 加藤俊哉, 笠松紀雄, 橋爪一光, 川名秀忠, 半澤 偶・他: 肺脂肪塞栓症近縁疾患における診断上の特徴. 特に肺梗塞との画像上・臨床経過上の鑑別について. 臨床放射線 39: 115-123, 1994.
- 9) 山田龍作, 溝端敏晴: 化学療法とその工夫. (4) 化学閉塞療法. 臨床消化器内科 7: 1060-1065, 1992.
- 10) 中村 厚, 西村信雄, 上野英明, 小田重人, 田村一利・他: 塩酸エビルビジンのマウスおよびラットを用いた急性毒性試験. 新薬と臨床 35: 864-880, 1986.
- 11) 永田良一, 永田貴久, 佐藤 堅, 小林啓三, 大西瑞男・他: 塩酸エビルビジンのピーグルにおける静脈内投与急性毒性試験. 新薬と臨床 35: 882-888, 1986.