MDP-Lys によるハムスター骨肉腫に対する肺転移抑制効果と
その至適投与量(第2報)新田泰章・杉田 孝・下瀬省二・生田義和^{*1)}, 村上照夫^{*2)}

Lung metastasis inhibitory effect and optimal dosage of muramyl dipeptide(MDP) analogue on hamster's osteosarcoma—Second report—

In the present study, we evaluated the lung metastasis inhibitory effect and optimal dosage of N²- [(N-acetylmuramoyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyl]-N⁶-stearoyl-L-lysine(MDP-Lys), a lipophilic derivative of muramyl dipeptide(MDP) acting as a macrophage activator, in hamsters bearing osteosarcoma. MDP-Lys was administered either as a solution or liposomal preparation (multilamellar, about 2 μ m of diameter).

The time course of lung metastatic rates after transplantation of osteosarcoma to the lower extremity was estimated macroscopically and pathologically for 7 weeks. In this study, the extremity was amputated 3 weeks after transplantation.

The lung metastatic rates observed were 0%, 10%, 50%, 70%, and 100%, 1, 2, 3, 5, and 7 weeks after transplantation, respectively. Based on these results, the inhibitory effect of MDP-Lys given as a solution or multilamellar liposome on lung metastasis was evaluated 7 weeks after transplantation. Hamsters, which were transplanted osteosarcoma and their extremity were amputated 3 weeks after transplantation, were divided into 3 groups. Treatments with MDP-Lys were carried out for 4 weeks after the amputation. The first group received free MDP-Lys subcutaneously as a solution(0.5, 5, 50 μ g/day), the second group received liposomal MDP-Lys(2 or 20 μ g, twice/week), and the third group received only empty liposome(twice/week) intravenously as a control.

The inhibitory effects of MDP-Lys on lung metastasis were observed in the following two

treatment groups: MDP-Lys given as a solution(50 μ g/day)reduced the lung metastatic rate to 54.5%, and liposomal MDP-Lys(20 μ g, twice/week) reduced to 60%. Thus, liposomal MDP-Lys showed a similar inhibitory rate to that given as a solution at a far lower dose(40 μ g vs 350 μ g/week). Considering that hamsters had lung metastasis at a rate of 50% before the treatment, above treatments with MDP-Lys inhibited the metastasis almost completely. The optimal dosage of MDP-Lys given as a solution would be more than 50 μ g/day, and that of MDP-Lys given as a liposome would be more than 20 μ g(twice per week). The greater efficacy of liposomal delivery would be due to the longer drug retention in the body. To confirm it, fluorescein was given intravenously either as a solution or multilamellar liposome(same size and composition to that of MDP-Lys), and the time course of fluorescein amount retained in the lung, liver and serum were determined. Fluorescein given as a solution was almost disappeared from the lung, liver and serum within 12 hrs. In contrast, fluorescein given as a liposome was retained in the body for about 72 hrs.

Thus, it would be concluded that the greater lung metastasis inhibitory effect of liposomal MDP-Lys than that of solution would be due to the long drug retention in the body, especially in the lung.

Yasuaki Nitta・Takashi Sugita・
Shoji Shimose・Yosikazu Ikuta^{*1)},
Teruo Murakami^{*2)}

key words : muramyl dipeptide analogue, dosage form,
liposome, osteosarcoma, lung metastasis, hamsters

目 的

Muramyl dipeptide(以下 MDP)およびその脂溶性誘導体である N²- [(N-acetylmuramoyl)-L-alanyl-D-isoglutaminyl]-N⁶-stearoyl-L-lysine(MDP-Lys)はマクロファージ活性化能を有する。活性化マクロファージが非特異的殺腫瘍

^{*1)} Department of Orthopaedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine 広島大学医学部整形外科教室

^{*2)} Department of Biopharmaceutics, Institute of Pharmaceutical Sciences, Hiroshima University School of Medicine 広島大学総合薬学科医療薬剤学講座
Offprint request to : Yasuaki Nitta, M.D., Department of Orthopaedic Surgery, Hiroshima University School of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minami-ku, Hiroshima 734

図 1 Treatment with MDP-Lys at early stage for 3 weeks after tumor transplantation

図 2 Treatment with MDP-Lys for 4 weeks after amputation

図 3 X-Ray and Histological observation of osteosarcoma 3 weeks after transplantation

図 4 Lung metastatic rate in untreated control group

能をもつことから MDP-Lys の癌治療への応用が模索されている. MDP-Lys は単独,あるいはリポソーム膜内封入のいずれにおいても,ハムスター骨肉腫に対する肺転移抑制効果を示すことを筆者らは以前に報告している¹⁾.今回,ハムスター骨肉腫に対する肺転移抑制のための MDP-Lys の至適投与量を算出する目的で,MDP-Lys を単独,あるいはリポソーム膜内に封入し,種々の投与量における肺転移率を測定した.

方 法

山梨医科大学の赤松らにより供与され,当教室で継代移植しているハムスター骨肉腫^{2,3)}を用い

図 5 Lung metastasis 7 weeks after tumor transplantation

図 6 Lung metastatic rate 3 weeks after tumor transplantation

図 7 Lung metastatic rate 7 weeks after tumor transplantation

た。MDP-Lys(ロムルチド末)は第一製薬より供与された。

注射用液は以下の手順によって作成した。① F-MDP は蒸留水に D-マンニトールを加えた溶媒に MDP-Lys を溶解して作成した。② L-MDP は phosphatidyl choline と phosphatidyl serine をモル比 7 : 3 とし、MDP-Lys を加えて溶解したあと、窒素充滿下にロータリーエバポレーターで脂質溶媒を蒸発乾燥させ、脂質薄膜を作成した。燐酸バッファーを加えボルテックスで機械的に振盪して多重膜リポソームを生成後、KUBOTA 20000-KR を用い 15000 G $\times$ 10 min で遠沈した。③ Emp-L は MDP-Lys を含まず他はすべて L-MDP と同様に作成した。

図 8 Inhibitory effect of MDP-Lys on lung metastasis

図 9-a Disappearance profile of fluorescein from the lung after intravenous administration

図 9-b Disappearance profile of fluorescein from the liver after intravenous administration

図 9-c Disappearance profile of fluorescein from plasma after intravenous administration

遠沈により粒子径の大きなリポソームが得られたことを確認するために、作成したリポソームの粒子径を Coulter counter N4S を用いて測定すると、リポソームの平均粒子径は遠沈前は平均 557 nm で、遠沈後は平均 1922 nm であった。

投与方法は以下の 3 群に分けた。すなわち① MDP-Lys 単独を毎日皮下投与 (F-MDP)、② MDP-Lys をリポソーム膜内に封入して週 2 回静脈内投与 (L-MDP)、③ MDP-Lys を含まないリポソームのみを週 2 回静脈内投与 (Emp-L)。

実験 (1) コントロール群として、ハムスター背部に継代移植している骨肉腫約 10 mm³を下腿三頭筋の筋間に移植し、3 週後に股関節離断を行った。移植後 1, 2, 3, 5, 7 週で肺転移の有無を肉眼的および病理学的に観察した。

実験 (2) 腫瘍移植直後より 3 週間、MDP-Lys 単独 50 μ g を毎日皮下投与する F-MDP 群、MDP-Lys をリポソーム膜内に封入し 1 回 20 μ g を週 2 回静脈内投与する L-MDP 群、およびリポ

ソーム担体のみを週 2 回静脈内投与する Emp-L 群を作成し、移植後 3 週での肺転移の有無を観察し、コントロール群と比較した (図 1)。

実験 (3) 腫瘍移植後 3 週間無治療のあと、患肢を股関節離断し、以後 F-MDP の投与量を 1 回 0.5 μ g, 5 μ g, 50 μ g の 3 群、L-MDP の投与量を 1 回 2 μ g, 20 μ g の 2 群、および Emp-L 群の合計 6 群を作成し、以後 4 週間投与を続けた。移植後 7 週 (離断後 4 週) での肺転移の有無を観察し、コントロール群と比較した (図 2)。

実験 (4) 今回使用したリポソームの体内における滞留性をみるため、fluorescein を静脈内に溶液として投与するコントロール群と、リポソーム膜内に封入して静脈内投与するリポソーム群を作成した。両群で経時的にそれぞれ肺、肝、血清を採取して、fluorescein の投与量に対する比率を算出した。

結 果

移植腫瘍の生着率は100%であった。骨形成性の腫瘍の増大を認め、移植腫瘍の病理所見では豊富な類骨、およびクロマチンに富む大小不整の核を持つ骨形成性の骨肉腫像を呈した(図3)。

実験(1) コントロール群の肺転移率は移植後1, 2, 3, 5, 7週の群でそれぞれ0%, 10%, 50%, 70%, 100%であった(図4)。肺転移腫瘍の病理所見は下肢とほぼ同等であった(図5)。

実験(2) 移植後3週における肺転移率はコントロール群の50%に比較し、F-MDP群では11.1%, L-MDP群では16.7%, Emp-L群では41.7%であった。F-MDP群、L-MDP群のいずれも有意に肺転移が抑制された(図6)。

実験(3) 移植後7週での肺転移率はF-MDP(0.5)群では100%, F-MDP(5)群では83.3%, F-MDP(50)群では54.5%であった。L-MDP(2)群では84.6%, L-MDP(20)群では60%, Emp-L群では100%であった。コントロール群と比較して、F-MDP(50)群、L-MDP(20)群では肺転移が有意に抑制されたが、F-MDP(5)群、F-MDP(0.5)群、L-MDP(2)群、Emp-L群では抑制されなかった(図7)。

実験3の結果よりF-MDP(50)群およびL-MDP(20)群で肺転移が有意に抑制されることが示された。さらに腫瘍移植後3週で肺転移率はすでに50%であり、移植後7週での肺転移率がF-MDP(50)群、L-MDP(20)群でそれぞれ54.5%, 60%であることは、MDP-Lysの投与により新たな肺転移がほぼ完全に抑制されたことを意味している(図8)。

実験(4) fluoresceinは肺において、コントロール群では投与4時間以内にはほとんど消失したが、リポソーム群では投与48時間後まで残存し、72時間後にほとんど消失していた(図9-a)。肝、血清においても同様の結果が得られた(図9-b, c)。したがってリポソーム化により肺、肝、血清における薬剤の滞留時間が有意に延長し、その結果低投与量でも有効な肺転移抑制効果が得られたものと考えられる。

考 察

MDPがアジュバント活性を有することをLedererら⁴⁾、Kotaniら⁵⁾は報告した。また、活性化マクロファージは非特異的殺腫瘍能をもつことから⁶⁾、マクロファージ活性化能を有し、低分子量で抗原性や毒性が無いMDPの癌治療への応用が模索されてきた⁷⁾。FidlerらはMDPあるいはその誘導体であるMTP-PE(muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine)をリポソーム化することで単独投与より効果的に肺胞マクロファージを活性化し、その結果腫瘍の肺転移が抑制されたことをC57BL/6 mouse, B-16 Melanomaを用いた動物実験で報告した^{8,9)}。MacEwenらは自然発生の犬骨肉腫に対し化学療法と患肢切断に加え、リポソーム化したMTP-PEを投与することで予後が有意に改善したと報告した¹⁰⁾。ヒト骨肉腫に対しても1986年Linkらが骨肉腫術後の肺転移抑制におけるMTP-PEの効果を報告し¹¹⁾、以後臨床応用が試みられるようになってきた¹²⁻¹⁴⁾。ハムスター骨肉腫を用いた今回の実験でも、MDP-Lysの投与により明らかな肺転移抑制効果が認められた。

MDP-Lysがマクロファージを活性化させるためには両者が2~4時間にわたり接触する必要があるとされる⁶⁾。しかしながら単独投与のMDPは速やかに尿中に排泄される¹⁵⁾。一方、MDP-Lysをリポソーム膜内に封入することにより体内の滞留時間は有意に延長し、マクロファージの活性化がより効果的となる。その結果、投与間隔をあけても持続的効果が期待でき、単独投与よりも少ない量で効果が得られる。このようにMDP-Lysのリポソーム化製剤は有用なDrug Delivery Systemの一方法であると考えられる。

問題点としては今回使用したリポソームが肝臓などの細網内皮系組織への取り込みが大きく、標的部位である肺胞への到達量を低下させていることである。リポソームの細網内皮系組織への取り込みを抑制することにより肺胞への滞留性をさらに向上できるのではないかと考えられる。

まとめ

今回 MDP-Lys のハムスターに対する至適投与量を単独、およびリポソーム膜内封入投与において検討した。その至適投与量は単独投与では 50 μg 以上毎日皮下投与、およびリポソーム膜内封入投与では 20 μg 以上週 2 回静脈内投与であった。

文 献

- 1) 新田泰章, 杉田 孝, 土肥浩平, 生田義和, 村上照夫: MDP-Lys による実験骨肉腫に対する肺転移抑制効果と抗腫瘍能について(第 1 報). 中部整災学会雑誌 39(4): 857-862, 1996.
- 2) Sekiguchi M, Satomura T, Shimoda T et al.: An experimental transplantable osteosarcoma with spontaneous pulmonary metastasis in hamsters. *Int. J. Exp. Pathol.* 75: 51-60, 1994.
- 3) 福島博, 赤松功也: ヒト骨肉腫の実験モデルとしてのペリリウム骨肉腫とハムスター骨肉腫について. 山梨医大誌 3: 39-46, 1988.
- 4) Lederer E, Adem S, Ciorbar R et al.: Cell walls of mycobacterium and related organisms. *Chemistry and immunostimulant properties.* *Mol. Cell. Biochem.* 7: 87-104, 1975.
- 5) Kotani S, Narita T, Stewart-Tull DES et al.: Immunoadjuvant activities of cell prepared walls and their water-soluble fractions from grampositive bacteria. *Biken J.* 18: 135-138, 1975.
- 6) Hibbs JB et al.: Discrimination between neoplastic and non-neoplastic cells in vitro by activated macrophages. *J. Natl. Canc. Inst.* 53: 1487-1492, 1974.
- 7) 曾根三郎, 堀良英郎, Fidler IJ: 癌転移治療—人工脂質膜(リポソーム)を用いた新しい試み—. *Oncologia* 1: 18-36, 1982.
- 8) Fidler IJ, Sone S, Fogler WE et al.: Eradication of spontaneous metastasis and activation of alveolar macrophages by intravenous injections of liposomes containing muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 1680-1684, 1981.
- 9) Schroit AJ, Fidler IJ: Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Res.* 42: 161-167, 1982.
- 10) MacEwen EG, Kurzman ID, Rosenthal RC et al.: Therapy for osteosarcoma in dogs with intravenous injection of liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *J. Natl. Cancer Int.* 81: 935-938, 1989.
- 11) Link MP, Goorin AM, Miser AW et al.: The effect of adjuvant chemotherapy on relapse-free survival in patients with osteosarcoma of extremity. *N. Eng. J. Med.* 314: 1600-1606, 1986.
- 12) Kleiner ES, Meyers PA, Jaffe N et al.: Combination therapy with ifosfamide and liposome-encapsulated muramyl tripeptide: Tolerability, toxicity, and immune stimulation. *J. Immunother* 17: 181-193, 1995.
- 13) Kleiner ES: Biologic therapy for osteosarcoma using liposome-encapsulated muramyl tripeptide. *Sarcomas part 2(9): 927-938, 1995.*
- 14) Kleiner ES, Gano JB, Jaffe N et al.: Efficacy of liposomal muramyl tripeptide in the treatment of relapsed osteosarcoma. *Am. J. Clin. Oncol.* 18(2): 93-99, 1995.
- 15) Parant M, Chedid L, Lederer E et al.: Fate of the synthetic immuno-adjuvant, muramyl dipeptide(C-labelled) in the mouse. *Int. J. Immunopharmacol.* 1: 35-41, 1979.