脳腫瘍の治療を目的とした制癌剤の新規脳内送達法

新垣友隆・坂根稔康・山下伸二・瀬崎 仁^{*1)}、徳永能治・柴田尚武^{*2)}*Transnasal delivery of anticancer drugs to the brain tumor : A new strategy for brain tumor chemotherapy*

The feasibility of a new chemotherapy of the brain tumor which utilizes the direct transport pathway from the nasal cavity to the cerebrospinal fluid(CSF) was evaluated using three anticancer drugs with small MW, cisplatin analogue pyridoxatodiammineplatinum(II) (P-PtB), mitomycin C(MMC) and methotrexate(MTX). *In vitro* anticancer activity of MTX against 9L glioma cells was particularly potent compared with P-PtB and MMC. The pharmacokinetic studies following nasal and intravenous applications revealed that P-PtB and MTX, which are relatively hydrophilic, archived significantly high concentration in the CSF following nasal application, while lipophilic MMC was not detected following both nasal and intravenous applications. Therefore, the low lipophilic anticancer drugs are suitable for the strategy. The investigations on the enhancement and duration of the drug concentration in the CSF indicated that the most favorable dosage forms of P-PtB and MTX are nebulization of the powder and instillation of a viscous CMC(carboxymethyl cellulose) solution, respectively. It was also shown that acetazolesamide, which is used clinically to reduce the renal side effect by MTX, enhanced the MTX level in the CSF and reduced the plasma MTX level. The *in vivo* therapeutic potencies of P-PtB and MTX applied as favorable dosage forms as shown above were evaluated using 9L-bearing animals. Compared with the non-treated animals, P-PtB neither increased the survival nor reduced the tumor weight at the death. On the contrary, the tumor weight of the rats receiving four nasal applications of MTX was significantly reduced as compared to the non-treated group and the intraperitoneal group. It was clarified that efficient chemotherapy of the brain tumor and the reduction of systemic side effects are enabled by nasal application of anticancer agents. Our strategy is thought to be clinically significant.

Tomotaka Shingaki・Toshiyasu Sakane・Shinji Yamashita・Hitoshi Sezaki^{*1)},
Yoshiharu Tokunaga・Shobu Shibata^{*2)}**key words** : nasal cavity, cerebrospinal fluid, brain tumor,
methotrexate, mitomycin C

近年のめざましい医療技術の進歩に伴い、腫瘍一般にその治癒率には格段の向上が認められる。しかしながら、脳腫瘍に関してはいまだ予後が悪く、他臓器の腫瘍と比較して、生存率は低いまま

である。脳腫瘍の治療法としては、現在、外科的手術とその後の化学療法が行われているが、血液脳関門により、化学療法に用いられる制癌剤の脳への透過性が制限されているため、点滴静注などの通常の投与方法では脳腫瘍への移行量が十分ではないこと、また、血中濃度の上昇により重篤な副作用が発現するため、化学治療の継続が困難となる場合が多いことが主な理由と考えられる。したがって、化学療法の有効性を高め、脳腫瘍の予後

^{*1)} Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University 摂南大学薬学部

^{*2)} Department of Neurosurgery, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部脳神経外科学教室
Offprint requests to : Toshiyasu Sakane, Ph. D., Faculty of Pharmaceutical Sciences, Setsunan University, 45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata-shi, Osaka 573-0101

および治癒率を改善するためには、制癌剤の脳腫瘍への送達効率を高めると同時に、全身循環血への移行量を抑制して、副作用を軽減することが可能な新しい投与システムの開発が必要と考えられる。

鼻腔は、その粘膜下に吸収に適した発達した血管系を有し、さらに高分子物質に対するバリア機能が他の粘膜にくらべて弱いため、ペプチド性医薬品を中心とした薬物の投与部位として、さまざまな研究が行われている¹⁾。一方、解剖学的に鼻粘膜直下に脳脊髄液(CSF)が分布していることが知られており^{2,3)}、筆者らはすでに、鼻腔内に投与された薬物が全身循環血を経ることなく、直接CSFに移行することを報告している⁴⁻⁷⁾。さらに、CSFから脳への薬物移行は比較的容易であることから、鼻腔は脳への薬物送達が可能で投与部位と考えられる⁸⁾。

そこで筆者らは、鼻腔に薬物を投与し、その後CSFを介して脳腫瘍内に制癌剤を送達するという新しい概念に基づいた、新規脳腫瘍治療システムの開発を目的として、異なる物理化学的性質を有する3種の制癌剤、cisplatinのピリドキシン酸誘導体(pyridoxatodiammine-platinum(II)、P-PtB)、mitomycin C(MMC)、methotrexate(MTX)を用い、鼻腔からCSFへの移行性について種々の検討を行うとともに、*in vivo*における抗腫瘍効果を測定し、新規脳腫瘍治療システムとしての可能性を評価した。

材料と方法

(1) 試薬

MTXはSigma社より購入した。P-PtBは(株)エーザイから、MMCは京都大学から供与されたものを用いた。cell counting kit[®]は同仁化学研究所より購入した。その他の試薬はすべて和光純薬工業(株)あるいはナカライテスク(株)の特級試薬を用いた。

(2) 50%細胞増殖阻害濃度の測定⁹⁾

9L glioma細胞を96穴プレートの各wellに 10^3 cellずつ播種し、48時間培養した。その後、培養液を各種制癌剤を含むものに置換し、96時間培

表1 Physicochemical characteristics and *in vitro* cytotoxic activity of the anticancer drugs

	MW	Pc ^{a)}	IC ₅₀ (μ M) ^{b)}
MMC	334	0.414	1.5
P-PtB	428	0.207	4.0
MTX	455	0.014	0.02

^{a)} partition coefficient between n-octanol and saline

^{b)} concentration exhibiting 50% growth inhibition against 9L glioma cell

養を行った。培養終了後、cell counting kit[®]を用いて生細胞数を測定し、dose-response curveから50%細胞増殖阻害濃度(IC₅₀)を求めた。

(3) 動物および投与方法

Wistar系雄性ラット(体重200~300 g)をpentobarbitalで麻酔し、右大腿動脈に血液採取用のカニュレーションを施した。その後、静脈内投与群については、左大腿静脈より生理食塩水に溶解した制癌剤を投与した。鼻腔内投与群については、Hiraiらの方法¹⁰⁾に準じて気管・食道に手術を行い、右外鼻孔より各制癌剤50 μ lをマイクロピペットで投与した。粉末製剤の投与は(株)帝人より供与されたパプライザー[®]を用いた。薬物投与後、経時的に採血し、HPLC¹¹⁻¹³⁾を用いて血漿中薬物濃度を測定した。また、投与15分後あるいは60分後にChou & Levyの方法¹⁴⁾に準じてCSFを採取し、その薬物濃度をHPLCにより測定した。

(4) *In vivo* 抗腫瘍活性の測定

9L glioma細胞 5×10^6 個をFisher系雄性ラットの右前頭葉(bregmaの後方3 mm, 側方2 mm, 硬膜面からの深さ3 mm)に移植することにより、大脳表面に露出し、CSFと直接接触するような腫瘍塊を形成させた。腫瘍移植4日目から制癌剤の投与を開始し、P-PtBについては3日おきの連続投与を、またMTXについては2日おきに4回の投与を行った。なお、MTXの場合は、投与30分前にacetazolamideを経口投与した。対照治療群には各制癌剤を腹腔内投与し、P-PtBについては生存日数と死亡時の腫瘍重量を、またMTXについては腫瘍移植後11日目の腫瘍重量を測定し、抗腫瘍活性の指標とした。

図1 Comparison of the concentrations of P-PtB in plasma and CSF following intravenous and nasal applications

Data represent mean $\pm$ SE.

i.v. : intravenous application, i.n. : intranasal application

結果と考察

(1) 制癌剤の物理化学的性質および *in vitro* 細胞増殖抑制効果

表1に、各制癌剤の分子量、油水分配係数および IC_{50} を示す。いずれの制癌剤も分子量は400前後、また分配係数はMMCで大きく、以下P-PtB、MTXの順であった。 IC_{50} はP-PtB > MMC > MTXの順であったが、MTXについては他の制癌剤の1/100程度と顕著に小さく、9Lに対する強力な細胞増殖抑制効果を有していることが明らかとなった。

(2) 制癌剤の鼻腔内投与後の脳脊髄液移行性

① P-PtBの鼻腔から脳脊髄液への移行性および吸収動態

最初に、P-PtB点鼻投与後の血中およびCSFへの移行性について検討を行った。図1に結果を示す。投与5分以降、両者の血漿中濃度はほぼ同程度であったが、点鼻投与後のCSF中薬物濃度は有意に高く、P-PtBが鼻腔から直接CSFへ移行することが示された。

② MMCの鼻腔から脳脊髄液への移行性および吸収動態

つぎに、MMCについて検討を行った。結果を図2に示す。水溶液投与、懸濁液投与、sodium glycocholate (GCNa, 吸収促進剤)併用の三種類の条件で実験を行ったが、いずれの条件においてもCSF

中薬物濃度はほぼ検出限界付近にとどまり、非常に低いものであった。

③ MTXの鼻腔から脳脊髄液への移行性および吸収動態

つぎに、MTXについて検討を行った。図3に示すように、静脈内投与後にはCSF中にまったく検出されなかったが、点鼻投与後には顕著に高いCSF中濃度が観察された。しかもその値はCSF採取時の血漿中濃度の約3倍という高い値であり、MTXが本研究の目的に適した制癌剤であることが示唆された。

以上の結果より、本研究に用いる制癌剤としては、脂溶性の低い制癌剤が適していることが示唆された。

(3) CSF中の制癌剤濃度の改善および持続化

制癌剤が抗腫瘍効果を発揮するためには、長時間にわたりCSF中濃度が高く維持されるように剤形を工夫する必要がある。鼻腔内に投与された溶液は纖毛運動により咽頭部に移動し、鼻腔内の残存薬物量が経時的に減少することが知られており、投与液の鼻腔内滞留性を改善することにより、CSF中濃度の改善および持続化が可能と考えられる。そこで、CSFへの移行性の高いことが明らかとなったP-PtBおよびMTXに関して、P-PtBについては粉末製剤の投与を、またMTXに

図 2 Comparison of the concentrations of MMC in plasma and CSF after nasal application of solution, suspensions and solution with GCNa

Data represent mean $\pm$ SE.

ND : not detected, GCNa : sodium glycocholate, PEG : polyethylene glycol

図 3 Comparison of the concentrations of MTX in plasma and CSF following intravenous and nasal applications

Data represent mean $\pm$ SE.

i.v. : intravenous application, i.n. : intranasal application, ND : not detected

については投与液の粘稠化および acetazolamide (AZA) の併用を試みた。

① P-PtB の粉末製剤投与

図 4 に、P-PtB 粉末製剤投与後の血中濃度の時間変化および投与 60 分後の CSF 中濃度を示す。薬物の粉末のみを投与した場合、水溶液投与の場合(図 1)とくらべて、血漿中および CSF 中濃度に大きな変化は観察されなかったが、投与 1 時間後においても CSF 中濃度が維持されており、粉末製剤の投与が有効であることが示唆された。さらに、薬物の鼻腔内滞留性を改善するために、高分

子物質を基剤として投与したが、血液中、CSF 中に P-PtB はまったく検出されなかった。また、吸収促進剤として citrate の併用を試みたが、血液への吸収のみが顕著に促進され、CSF 中濃度は逆に低下することが明らかとなった。したがって、P-PtB を用いた *in vivo* 抗腫瘍効果の測定では、制癌剤単独の粉末を投与することとした。

② MTX 投与液の粘稠化および acetazolamide の併用

まず、投与液の粘稠化について検討を行った。気管・食道に手術を施していないラットを用い、

図 4 Comparison of the concentrations of P-PtB in plasma and CSF after nasal application of powder formulations

Excipient(hydroxypropyl cellulose : microcrystalline cellulose=1 : 4) or sodium citrate was mixed with P-PtB powder at the weight ratio of 1 : 1, 1 : 10, respectively. Data represent mean $\pm$ SE. ND : not detected, SC : sodium citrate

図 5 Effect of acetazolamide and the viscosity of the dosing solution on the concentrations of MTX in plasma and CSF after nasal application

Data represent mean $\pm$ SE.

CMC : carboxymethyl cellulose, AZA : acetazolamide

2%の carboxymethyl cellulose(CMC)を加えて粘稠度を上昇させた溶液を点鼻投与した。図 5 に示すように、投与 60 分後においても CSF 中に高濃度の MTX が検出され、CSF 中濃度を持続化させることが可能であった。つぎに、副作用の軽減と CSF 中濃度の改善を目的として、AZA の併用を行った。利尿薬である AZA は、炭酸脱水酵素の阻害により利尿作用を示す薬物であるが、脈絡叢に存在する $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ の輸送系に作用して、CSF の分泌を阻害することが報告されている¹⁵⁾。CSF 中の薬物のクリアランスは、主として CSF の流れ

(bulk flow)によると考えられるため、CSF の分泌速度が低下すると、相対的に CSF 中濃度が増大することが期待される¹⁶⁾。また、AZA は尿の pH を上昇させる作用を持っているために、MTX による化学療法を行う際、腎尿細管部位における MTX の結晶化を防ぐと同時に、MTX を速やかに体外に排出する薬物として、臨床でも用いられている。図 5 に示すように、AZA の併用により血漿中濃度の低下が観察され、さらに CSF 中濃度には顕著な増大が観察された。このように、AZA は血漿中濃度の低下による副作用の軽減と、CSF

図 6 Changes of survival and tumor weight during chemotherapy with P-PtB
i.p. : intraperitoneal application, i.n. : intranasal application

中濃度の増大に基づく抗腫瘍効果の促進という主作用・副作用の両面で有効と考えられた。そこで、MTX を用いた *in vivo* 抗腫瘍効果の測定では、MTX の投与前に AZA を経口投与し、MTX の CMC 溶液を投与することとした。

(4) 担癌モデル動物を用いた *in vivo* 抗腫瘍効果の測定

① P-PtB の *in vivo* 抗腫瘍効果

図 6 に、投与スケジュールおよび検討結果を示す。対照治療群については、鼻腔内投与群とほぼ同程度の血中濃度推移を示す 1.5 mg の腹腔内投与とした。生存率については、腹腔内投与群に若干の改善が認められたものの、経鼻投与群と非治療群との差は観察されなかった。死亡時の腫瘍重量と生存日数との間には直線関係が認められたが、直線の傾きには各群間で有意な違いは観察されず、P-PtB については有意な抗腫瘍効果を観察することはできなかった。これは、 IC_{50} に匹敵する CSF 中 P-PtB 濃度が得られなかったためと考えられる。

② MTX の *in vivo* 抗腫瘍効果

つぎに、MTX について評価を行った。図 7 に、投与スケジュールおよび各群の腫瘍重量を示す。なお、腹腔内投与群の投与量は 0.63 mg/rat とした。非治療群および腹腔内投与群にくらべて、鼻

図 7 Comparison of the tumor weight after chemotherapy with MTX

Bars represent SE.

i.p. : intraperitoneal application, i.n. : intranasal application, ● : average

腔内投与群の腫瘍重量は有意に小さく、MTX を鼻腔内に投与することにより血漿中濃度は同程度でありながら、有意な抗腫瘍効果が得られることが明らかとなった。これらの結果は、鼻腔内投与後、直接 CSF に移行した MTX が脳腫瘍の成長阻害を引き起こしたことを示しており、本システムが脳腫瘍に対する画期的な治療法になりうることが明らかとなった。

以上、鼻腔に制癌剤を投与することにより、CSFを介して脳腫瘍に送達できることを明らかにすることができた。これらの知見は、新しい脳腫瘍治療システムの開発に対する有用な基礎的情報として重要と考えられる。

文 献

- 1) Chien YW, Su KSE, Chang S-F : Nasal Systemic Drug Delivery. Marcel Dekker, New York, 1989.
- 2) Jackson RT, Tigges J, Arnold W : Subarachnoid space of the CNS, nasal mucosa, and lymphatic system. Arch. Otolaryngol. 105 : 180-184, 1979.
- 3) Bradbury MWB, Cserr HF, Westrop RJ : Drainage of cerebral interstitial fluid into deep cervical lymph of the rabbit. Am. J. Physiol. 240 : F329-F336, 1981.
- 4) Sakane T, Akizuki M, Yoshida M, Yamashita S, Nadai T et al. : Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. J. Pharm. Pharmacol. 43 : 449-451, 1991.
- 5) Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Nadai T, Hashida M et al. : The transport of a drug to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity : The relation to the lipophilicity of the drug. Chem. Pharm. Bull. 39 : 2456-2458, 1991.
- 6) Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T : The direct drug transport from the nasal cavity to the cerebrospinal fluid : The relation to the dissociation of the drug. J. Pharm. Pharmacol. 46 : 378-379, 1994.
- 7) Sakane T, Akizuki M, Taki Y, Yamashita S, Sezaki H et al. : Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid : The relation to the molecular weight of the drug. J. Pharm. Pharmacol. 47 : 379-381, 1995.
- 8) Sakane T, Yamashita S, Nadai T, Sezaki H : Direct drug transport from the nasal cavity to the cerebrospinal fluid : A new strategy for drug delivery to the brain. s.t.p. Pharm. Sci. 7 : 98-106, 1997.
- 9) Nakashima M, Shibata S, Tokunaga Y, Fujita H, Ando T et al. : *In vivo* microdialysis study of the distribution of cisplatin into brain tumour tissue after intracarotid infusion in rats with 9L malignant glioma. J. Pharm. Pharmacol. 49 : 777-780, 1997.
- 10) Hirai S, Yashiki T, Matsuzawa T, Mima H : Absorption of drugs from the nasal mucosa of the rat. Int. J. Pharm. 7 : 317-325, 1981.
- 11) Bannister S, Sternson LA, Repta AJ : Urine analysis of platinum species derived from cis-dichlorodiammineplatinum(II) by high performance liquid chromatography following derivatization with sodium diethyldithiocarbamate. J. Chromatogr. 173 : 333-342, 1979.
- 12) Fujita T, Tamura T, Yamada H, Yamamoto A, Muranishi S : Pharmacokinetics of mitomycin C (MMC) after intraperitoneal administration of MMC-gelatin gel and its anti-tumor effect against sarcoma-180 bearing mice. J. Drug Target. 4 : 289-296, 1997.
- 13) Hirai T, Matsumoto S, Kishi I : Determination of methotrexate and its main metabolite 7-hydroxymethotrexate in human urine by high-performance liquid chromatography with normal solid phase extraction. J. Chromatogr. 690 : 267-273, 1997.
- 14) Chou RC, Levy G : Effect of heparin or salicylate infusion on serum protein binding and on concentrations of phenytoin in serum, brain and cerebrospinal fluid of rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 219 : 42-48, 1981.
- 15) Davson H, Segal MB : The effects of some inhibitors and accelerators of sodium transport on the turnover of ^{22}Na in the cerebrospinal fluid and the brain. J. Physiol. 209 : 131-153, 1970.
- 16) Bergman I, Burckart GJ, Pohl CR, Venkataramanan R, Barmada MA et al. : Pharmacokinetics of IgG and IgM anti-ganglioside antibodies in rats and monkeys after intrathecal administration. J. Pharmacol. Exp. Ther. 284 : 111-115, 1998.