リポソーム封入シスプラチンによる脳腫瘍ターゲティング療法

—— 1. 構造変換リポソームと脳腫瘍指向性 ——

柴田尚武・陣内敬文・越智 章・森 和夫^{*1)}、佐藤智典^{*2)}、砂本順三^{*3)}

Targeting chemotherapy of brain tumor using liposome-encapsulated cisplatin—Part I. Substances associated with liposomes to target brain tumor

The chemotherapeutic anticancer agent cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum, CDDP) has several disadvantages, such as its extreme nephrotoxicity and rapid binding to plasma proteins, and also poor penetration in the central nervous system. Liposomes therefore seemed to be suitable carriers to overcome these problems. Liposomes were investigated as a carrier for the delivery of therapeutic agents to target brain tumors. Four kinds of liposomes were prepared: neutral liposome (phosphatidylcholine and cholesterol), positively charged liposome (added stearyl amine), negatively charged liposome (added phosphatidic acid) and neutral liposome with low membrane fluidity (dipalmitoylphosphatidylcholine and cholesterol). As for the uptake of radioactivity in the brain tumor, spleen, liver, kidney and brain 30 minutes after the injection of liposomes labeled with ¹⁴C into the 9L cells implanted brain tumor rats, the spleen had the highest uptake of radioactivity.

The uptake was also greater in the brain tumor and lower in the kidney as compared to using cisplatin alone. The brain tumor uptake were in order of neutral liposome with low membrane fluidity, neutral liposome, negatively charged liposome and positively charged liposome.

The cytotoxicity of cisplatin against 9L-glioma cells was not decrease by encapsulation of liposomes. These results indicate that liposomes-encapsulated cisplatin could be utilized for target-

ing the chemotherapy of brain tumors, however in order to increase the targetability of liposome to brain tumors, we have developed the coating of liposomes with a cell specific polysaccharide.

Shobu Shibata・Takafumi Jinnouchi・
Akira Ochi・Kazuo Mori^{*1)},
Toshinori Sato^{*2)}, Junzo Sunamoto^{*3)}

key words: liposome, cisplatin,
9L rat brain tumor, drug delivery

シスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum, CDDP)は、抗腫瘍剤中、重金属(白金)を含んだ唯一の薬剤であり、グリオーマに対して*in vitro*において殺細胞効果はすぐれているが、*in vivo*においては水溶性であるため血液脳関門を通過しにくく、抗腫瘍効果は十分でない。また、腎毒性が強く、各種の誘導体の開発が行われているが、実用化にはほど遠い。

そこで筆者らは、シスプラチンをリポソーム(liposome)に封入して水溶性薬物を脂溶性薬物にカプセル化することにより、血液脳関門を通過させて脳腫瘍指向性を高め、腎臓への分布を抑制して毒性を軽減することを目的として、すなわち、リポソーム封入シスプラチンによる脳腫瘍ターゲティング療法の研究を行っている。

今回は、脳腫瘍に対するリポソームの passive targeting の効果をみる目的で、中性リポソーム、陽性荷電リポソーム、陰性荷電リポソームおよび低い膜流動性を持つ中性リポソームの4種を用いた。臓器分布は4種のリポソームを¹⁴Cで標識し、9Lグリオーマ移植ラットに静注、あるいは動注して各臓器の放射線活性を測定した。抗腫瘍効果は脳腫瘍にもっとも移行が良好であった低い膜流動性を持つ中性リポソームにシスプラチンを封入し、*in vitro*では9Lグリオーマ細胞培養液に添

^{*1)} Department of Neurosurgery, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部脳神経外科教室

^{*2)} Department of Industrial Chemistry, Faculty of Engineering, Nagasaki University 長崎大学工学部工業化学教室

^{*3)} Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University 京都大学工学部高分子化学教室

図 1

upper: tissue distribution of ^{14}C -labeled liposomes 3 hours after intravenous injection into five 9L cells implanted brain tumor rats
lower: brain tumor distribution of ^{14}C -labeled liposomes
PC: phosphatidylcholine. SA: stearyl amine. PA: phosphatidic acid. DPPC: dipalmitoylphosphatidylcholine

加して細胞障害活性を, *in vivo* では 9L グリオーマ移植ラットの尾静脈より投与して生存率を調べた.

実験方法

(1) リポソームの調製

卵黄 phosphatidylcholine (PC) 50 μml と cholesterol 15 μml をクロロホルム液 2ml に溶解し, 陰圧下で乾燥させて脂質の薄膜を作成した. これに生食水 1 ml を加えてミキサーにて振盪を繰り返し, 氷浴上で超音波照射 (25W, 15 分間) して, 多重層リポソーム (multilamellar vesicle, MLV) を調製した (中性リポソーム, PC). さらに, 陽性電荷を与えるために stearyl amine (SA) を付加して陽性荷電リポソーム (PC+SA) を, 陰性電荷を与えるために phosphatidic acid (PA) を付加して陰性荷電リポソーム (PC+PA) を調製し

表 1 tissue distribution of ^{14}C -labeled egg phosphatidylcholine liposome 30 minutes after intracarotid injection into 9L cell implanted brain tumor rats (Values represent the mean $\pm$ SE of 5 animals)

tissue	% of injected dose/100 mg tissue
tumor	0.28 $\pm$ 0.06
ipsilat. brain	0.20 $\pm$ 0.05
contralat. brain	0.02 $\pm$ 0.01
kidney	0.04 $\pm$ 0.01
spleen	0.78 $\pm$ 0.25
liver	0.25 $\pm$ 0.06
blood	0.08 $\pm$ 0.03

た. また, 膜流動性を低くするために dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) を用い, 低い膜流動性を持つ中性リポソーム (DPPC) 調製した.

(2) ^{14}C 標識リポソームおよびリポソーム封入シスプラチン

脂肪薄膜作成時に, ^{14}C -DPPC 1 μCi を加え, ^{14}C 標識リポソームを調製した (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$).

また, 先に作成した脂質の薄膜にシスプラチン 0.5 mg/ml を混入して, シスプラチン封入リポソーム (Lip-CDDP) を調製した.

(3) 9L グリオーマ移植ラット

9L グリオザルコーマ細胞の浮遊液 (5×10^5 個/10 μl) を, 雄 Fisher 344 ラット (250~300 g) の Bregma の左方 3 mm, 前方 1.5 mm で穿頭し, 硬膜面から深さ 5 mm の左尾状核にハルミトンシリンジを用いて定位的に注入移植し, 15 日目を用いた.

(4) 一般操作

① 臓器分布

^{14}C 標識リポソーム 1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を 9L グリオーマ移植ラットの 15 日目に静注, あるいは動注した. 静注は尾静脈より, 動注はフローセン麻酔下に左側の総・内・外頸動脈を露出し, 後頭, 上甲状腺, 翼突口蓋動脈を凝固切断し, 左外頸動脈よりカテーテルを頸動脈分岐部まで逆行性に挿入して注入した.

静注法では 3 時間後に, 動注法では 30 分後に屠殺し, 上行大動脈よりヘパリン加生食水で灌流後, 脳腫瘍, 大脳, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 血液を摘出し, 100 mg を 0.5 mg のソルエン 350 と 50°C でインキュベーションして溶解した. ついで, 10 ml のイ

ンスタゲルと 0.5 NHCl(9:1 v/v)と混合し、液体シンチレーションカウンター(Aloka LSC-900)で放射線活性を測定した。

② 細胞障害活性

Flask 内に継代培養している 9L グリオーマ細胞株を 0.25% EDTA ではがしたあと、complete MEM にて細胞濃度を 1×10^4 /ml に調製した。multiwell plate に 1 ml/well の割合で散布し、ただちに 5% CO₂ 雰囲気下 37°C の恒温器内にて静置培養した。24 時間後 trypan blue で染色して生細胞数を計測し、細胞が対数増殖期にあることを確かめ、それぞれ 10, 30, 50 μ l の遊離 CDDP と Lip-CDDP を含む complete MEM (1 ml) と変換した。その後、再び静置培養し、薬剤添加後 2, 4, 6 日目に trypan blue で染色し、1 well 当りの生細胞数を計測した。

薬剤の細胞障害活性は、培養液のみを加えた無処置群に対する薬剤添加群の生細胞数の比率より求めた。

③ 生存率

9L グリオーマ移植ラットの 15 日目に、i. 無処置群、ii. 遊離 CDDP 1 ml (CDDP 0.15 mg) 静注群、iii. Lip-CDDP 5 ml (CDDP 0.15 mg) 静注群、の各群にわけ、生存率を Kaplan-Meier 法で算出した。

結 果

(1) 臓器分布

¹⁴C で標識した中性リポソーム(PC)、陽性荷電リポソーム(PC+SA)、陰性荷電リポソーム(PC+PA)、および低い膜流動性を持つ中性リポソーム(DPPC)の各 1 μ Ci/ml をそれぞれ 5 匹の 9L グリオーマ移植ラットの 15 日目に尾静脈より投与して 3 時間後に脳腫瘍、対側大脳、肝臓、脾臓、腎臓、血液を摘出し、各 100 mg wet tissue 当りのカウント数を計測した。4 種とも脾臓、肝臓の網内系に高値で、腎臓で低値を示し、脳腫瘍への取り込みもみられた(図 1, 上段)。脳腫瘍へのリポソームの取り込みは、DPPC リポソームがもっとも高値で、ついで PC リポソームであった(図 1, 下段)。

静注法で脳腫瘍へもっとも取り込まれた DPPC リポソームと、PC リポソームを、それぞ

図 2 tissue distribution of ¹⁴C-labeled liposomes 30 minutes after intracarotid injection into five 9L cells implanted brain tumor rats

れ 5 匹の 9L グリオーマ移植ラットの 15 日目の内頸動脈より投与して 30 分後に臓器分布を同様に計測した。静注法にくらべ脳腫瘍および同側大脳への取り込みが増加し、脾臓、肝臓への取り込みが減少した(図 2)。PC リポソームで、臓器 100 mg 当りの総投与量に対する取り込み率は、脾臓 0.78%、脳腫瘍 0.28%、肝臓 0.25%、同側大脳 0.20%、血液 0.08%、腎臓 0.04%、対側大脳 0.02% の順であった。

脾臓にもっとも高率で、脳腫瘍の取り込みは脾臓と同程度であった(表 1)。

(2) 細胞障害活性

リポソームは脳腫瘍への取り込みがもっとも高率であった DPPC リポソームを用いた。DPPC-Lip-CDDP の力価判定は、本リポソーム 1 ml を凍結融解にて破壊し、遊出した CDDP のプラチナ濃度を原子吸光法で測定した。3 検体の平均プラチナ濃度は 28.3 μ g/ml であった。したがって、

図3 cytotoxicity of free cis-diaminedichloroplatinum (CDDP) and liposome-encapsulated CDDP (Lip-CDDP) toward 9L glioma cells

Each point represents the mean of 4 experiments.

CDDP の保持効率は 5.7%であった。

それぞれ 10, 30, 50 μ l の遊離 CDDP (5, 15, 25 μ g) と DPPC-Lip-CDDP (0.3, 0.9, 1.5 μ g) を、対数増殖期にある 9L グリオーマ細胞に添加し、2, 4, 6 日目の生細胞数を計測し、コントロール群に対する生細胞数の比率 (4 回の平均値) でみると、生存細胞率は両者とも濃度依存性に抑制されていた。また、両者における細胞障害活性は同等であった (図 3)。

(3) 生存率

無処置群 (10 匹)、遊離 CDDP 0.5 mg/1 ml 静注群 (7 匹)、DPPC-Lip-CDDP 0.15 mg/ml 静注群 (6 匹) の平均生存日数は、それぞれ 21.6, 22.1, 23.6 日であった。DPPC-Lip-CDDP は無処置群と比較して 9% の延命を認めた (図 4)。

考 察

薬物運搬体はその標的指向性の発現機序により、passive targeting と active targeting の二つに分類することができる。passive targeting ではキャリアの脂溶性、流動性、表面電荷、サイズなどの物理化学的性質により標的性が左右される。これに対して、active targeting は、標的細胞に特異な抗原抗体、あるいは糖鎖決定因子をキャリ

図4 survival curves of 9L cells implanted brain tumor rats following each dose of free cis-diaminedichloroplatinum (CDDP) and liposome-encapsulated CDDP (Lip-CDDP) injected intravenously at 15 days

アに修飾することではじめて達成される。前者は遠距離認識であり、後者は近距離認識である。

筆者らは、悪性グリオーマに対してすぐれた抗腫瘍効果を持つシスプラチンをリポソームに封入することによって、脳腫瘍指向性を高め、腎毒性を抑えて治療効果を高めること、すなわち薬物送達システム (drug delivery system, DDS) としての脳腫瘍指向性リポソームの開発研究を行っている^{1,2)}。

そこで、まず予備実験として、リポソームの passive targeting の効果をみる目的で種々の構造特性の異なるリポソーム封入シスプラチンを実験脳腫瘍ラットに投与し、脳腫瘍および臓器分布と抗腫瘍効果を検討した³⁾。中性リポソーム (PC)、陽性荷電リポソーム (PC+SA)、陰性荷電リポソーム (PC+PA)、および低い膜流動性を持つ中性リポソーム (DPPC) の 4 種を調製し、¹⁴C でラベルして、9L グリオーマ内への取り込みを測定したところ、DPPC リポソームがもっとも高率で、ついで PC リポソームで、他の 2 種は低率であった。しかし、静注法では腎臓への取り込みは減少したが、脾臓、肝臓の網内系に高値であり、脳腫瘍では低値であった。動注法でも脾臓にもっとも高値で、脳腫瘍の取り込みは肝臓と同程度であった。

脳腫瘍への取り込みは、基本的なリポソームである PC リポソームと比較して、DPPC リポソ

ムではやや高値を示したが、41°Cに相転移温度を持つために血管内で凝集する欠点を持ち、他の2種のリポソームではむしろ低値であった。したがって、これらの結果からは、リポソームの構造特性の変換では、脳腫瘍指向性は期待できないことがわかった。

一方、抗腫瘍効果については、*in vitro*において DPPC リポソーム封入シスプラチンの細胞障害活性は、シスプラチン単独とほぼ同程度であり、リポソームに封入することにより、シスプラチンの抗腫瘍効果が落ちないことがわかった。また、*in vivo*において DPPC リポソーム封入シスプラチン静注群の平均生存日数は23.6日で、無処置群21.6日とくらべると9%の延命を認めるにすぎなかった⁴⁻⁶⁾。

そこでこの予備実験を踏まえて、リポソームの構造強化と標的指向性、すなわち active targeting を達成するために、つぎの実験では共同研究者砂本の考案により、疎水性アンカーとして、コレステリル基で一部修飾した天然由来多糖で、PC リポソーム表面を被覆した多糖被覆リポソームを調製し、このリポソームを用いて同様の実験を行ったので次報で発表する予定である^{7,8)}。

結 論

リポソームの構造特性の変換と脳腫瘍指向性との程度を検討する目的で、中性リポソーム、陽性荷電リポソーム、陰性荷電リポソーム、および低

い膜流動性を持つ中性リポソームの4種類を調製し検討したが、リポソームの構造特性の変換では脳腫瘍指向性は期待できないことがわかった。

一方、リポソーム封入シスプラチンの抗腫瘍効果は、*in vitro* ではシスプラチン単独と同程度であった。さらなるリポソームの構造強化と脳腫瘍指向性が今後の課題である。

文 献

- 1) 柴田尚武：血液脳関門に対するリポソーム封入抗癌剤の研究開発. *Mebio* 15:118-119, 1988.
- 2) 柴田尚武, 陣内敬文, 森 和夫：リポソーム封入シスプラチンの脳腫瘍血管透過性に関する超微形態学的研究. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* 20:696-700, 1989.
- 3) 砂本順三, 岩本 清：リポソームの調製. リポソーム. (野島庄七, 砂本順三, 井上圭三・編), 南江堂, 1988, p21-40.
- 4) 小山内たか, 永井克孝：血液-脳関門とリポソーム. *神経進歩* 28:580-588, 1984.
- 5) 鬼頭 晃, 吉田 純, 景山直樹, 井上 達, 阿部博子・他：リポソームを用いる脳腫瘍の化学療法に関する基礎的研究—ヒト glioma 細胞に対するサルファタイド挿入リポソームの親和性. *脳神経* 39:783-788, 1987.
- 6) Kito, A., Yoshida, J., Kageyama, N., Kojima, N., Yagi, K: Liposomes coupled with monoclonal antibodies against glioma-associated antigen for targeting chemotherapy. *J. Neurosurg.* 71:382-387, 1989.
- 7) 砂本順三, 佐藤智典：細胞特異性リポソームの開発とその応用. *日本化学会誌* 2:161-173, 1989.
- 8) 佐藤智典, 砂本順三：ミサイル療法での人工細胞. *高分子と医療*. (竹本喜一, 砂本順三, 明石 満・編), 三田出版会, 1989, p544-577.