アドリアマイシン包埋リポソームの
リンパ節への移行性矢口豊久・山内晶司・高木 弘^{*1)}、林 豊・八木國夫^{*2)}*Delivery of adriamycin entrapped in sulfatide-inserted liposomes to lymph nodes*

We attempted to deliver adriamycin (ADM) to lymph nodes by using sulfatide-inserted liposomes, which consist of phosphatidylcholine, cholesterol, and sulfatide (molar ratio, 5:4:1) (Lip-ADM). We measured the concentrations of ADM in regional lymph nodes of the stomach after the injection of Lip-ADM or free ADM into the gastric mucosa of dogs, and found that in the case of Lip-ADM, ADM levels in all regional nodes were significantly higher than those in the case of free ADM and these high levels were maintained for 48h. Then, we transplanted a mammary tumor into foot pads of mice to make inguinal lymph node metastases. Upon subcutaneous injection into the femur, Lip-ADM brought about a higher concentration of the drug in the metastasized cells at 24 hours than did the free ADM.

These data suggest that liposomes entrapping ADM are effective for the treatment of lymph node metastases of gastric cancers.

Toyohisa Yaguchi・Masaji Yamauchi・
Hiroshi Takagi^{*1)}Yutaka Hayashi・Kunio Yagi^{*2)}

key words : DDS, adriamycin, liposomes

消化器外科領域において、胃癌の治療成績は確実に向上しているが、進行胃癌は高率にリンパ節転移をきたし、手術療法にて広範なリンパ節郭清を施行しても、なおリンパ節再発の可能性を除去することができない。そこでリポソームに包埋したアドリアマイシン(Lip-ADM)の網内系への高い移行性に着目し、本剤をイヌの胃粘膜下に局所投与した場合のリンパ組織への移行性について検

討した。また、マウスの鼠径リンパ節転移モデルを作成し、転移リンパ節への本剤の移行性についても検討した。

方 法

(1) Lip-ADM の調製

クロロホルムに溶解した卵黄ホスファチジルコリン、コレステロールおよびウシ脳由来のサルファイド(モル比5:4:1)^{1,2)}を構成脂質として、押し出し法^{3,4)}にてアドリアマイシンを包埋した多重膜リポソーム(multilamellar vesicles, MLV)を調製した。

調製した Lip-ADM の直径は、100 nm 程度であった。

(2) 胃粘膜下への Lip-ADM の局所投与

体重 8~12 kg の雑種成犬をチオペンタール(5 mg/kg)による全身麻酔下に開腹し、胃角部前壁に 2 cm 程度の小切開を加え、胃角部小彎の粘膜下に ADM 量として 1 mg (1.72 μ mol) の Lip-ADM を投与したあと、切開部を縫合し閉腹した。一定時間後に再開腹し犠死させ、胃小彎リンパ節、左胃動脈幹リンパ節、および脾動脈幹リンパ節を摘出し、各リンパ節内の ADM 濃度を定量した。また、注射した部位を粘膜から漿膜まで採取し、粘膜上で 1 cm² 分を 1 頭のイヌについて 3 カ所ずつ採取、磨砕し、組織内の ADM 濃度を測定した。雑種成犬は各時間ごと 3 頭ずつ用いた。同量の遊離 ADM (free ADM) を同様に投与処理した場合、および ADM 無投与群についても検討した。

(3) 担癌マウスにおける組織内 ADM の定量

C3H/HeN の足底に可移植性マウス乳癌株(MM48)を 5 $\times$ 10⁶ 個移植し、13 日間経過したと

^{*1)} Department of Surgery II, Nagoya University School of Medicine 名古屋大学医学部第二外科学教室

^{*2)} Institute of Applied Biochemistry 応用生化学研究所

図1 脾動脈幹リンパ節内 ADM 濃度

図2 左胃動脈幹リンパ節内 ADM 濃度

ここで, free ADM あるいは Lip-ADM を, 移植側鼠径部の皮下に投与した. 投与量は ADM として 8 mg/kg ($13.8 \mu\text{mol/kg}$)とした.

投与 24 時間後に犠死させ, 足底に移植した腫瘍から転移した鼠径リンパ節を採取し, その組織内の ADM 濃度を測定した. ADM 無投与群マウスの腫瘍を同様に処理し, ブランクとした.

(4) ADM の定量

ADM の定量は Rosso ら⁵⁾の方法に従い, ブタノール抽出液中の量を分光光度計を用いて励起波長 470 nm , 蛍光波長 590 nm で蛍光強度を測定して算出した.

結果

胃小彎リンパ節内の ADM 濃度の経時的変化を図 1 に示す. Lip-ADM 投与群は投与後 1 時間で $53.3 \text{ nmol/g tissue}$ を示し, 8 時間後で $57.4 \text{ nmol/g tissue}$ となり, 以後高値を示した. 一方, free ADM 投与群は, 投与後 4 時間で $46.1 \text{ nmol/g tissue}$ を示したあと, 低下した. 投与後 48 時間まで, Lip-ADM 投与群のほうが free ADM に比して高値を維持する傾向にあった.

図 2 に左胃動脈幹リンパ節内の ADM 濃度の

経時的変化を示す. 組織内濃度は投与後 1 時間で高値を示し, Lip-ADM 投与群では $19.5 \text{ nmol/g tissue}$, free ADM 投与群では $6.4 \text{ nmol/g tissue}$ であった. 以後, free ADM 投与群では減少したが, Lip-ADM 投与群は 10 nmol/g tissue 程度の値を示し, free ADM 投与群にくらべ, 高値を維持する傾向にあった.

図 3 に二次リンパ節である脾動脈幹リンパ節内の ADM 濃度の経時的変化を示す. 脾動脈リンパ節は ADM 投与部位よりも離れているため, いずれの投与群でも投与初期には ADM がほとんど検出されない. free ADM 投与群はその後低値であるが, Lip-ADM 投与群では時間とともに上昇し, 投与 48 時間後で $30.0 \text{ nmol/g tissue}$ に達した.

注射部位の組織内 ADM 濃度を測定した結果を図 4 に示す. free ADM を投与した群では投与後 8 時間以降の ADM 濃度は急速に減少するが, Lip-ADM 投与群では長時間残存する傾向にあった.

つぎにマウスの転移リンパ節内 ADM 濃度を free ADM 投与と Lip-ADM 投与の場合につい

図3 胃小腸リンパ節内 ADM 濃度

て、比較した結果を図5に示す。Lip-ADM 投与群のほうが、23.0 nmol/g tissue と free ADM 投与群にくらべほぼ2位の濃度を示した。

考 察

ADM はアントラサイクリン系抗生物質の一つで、その副作用に心筋毒性や骨髄抑制があることはよく知られている。特に必毒性の回避について、薬物をリポソームに封入する方法が多く報告されている^{1,2,6-9)}。

筆者らがこれまで、ヌードマウスを用いた薬物動態について検討した結果^{10,11)}、ホスファチジルコリン、コレステロール、サルファタイドからなる ADM 包埋リポソームは、肝、脾、リンパ節などの網内系によく捕捉されることが明らかとなった。このような網内系へ集積する性質は、リンパ節転移に対する治療法として応用するのに有利であると考えられる。その基礎的実験として、イヌの胃粘膜下に Lip-ADM を注射し、リンパ節への移行性を遊離のそれと比較検討した。その結果、Lip-ADM は free ADM にくらべ高い組織内濃度を示し、かつそれが長時間持続する可能性が示された。

図4 注射部位胃壁内 ADM 濃度

図5 乳癌株移植 C3H/HeN マウス
鼠径リンパ節内 ADM 濃度

Lip-ADM は、局所投与により所属リンパ節に移行し滞留すると同時に、注射部位においても徐放性が示され、リンパ節内の ADM 濃度が高く維持されるものと考えられる。これらのことより、リポソームに包埋した抗癌剤は、原発巣はもとより転移リンパ節に対しても抗腫瘍効果を示すことが期待できる。

この方法は、すぐれた抗癌剤の有する副作用を軽減するばかりでなく、リンパ組織へ薬剤を長時間貯留させる可能性を持ち、今後十分期待できる方法であると思われる。

文 献

- 1) Kojima, N., Ueno, N., Takano, M., Yabushita, H., Noguchi, M., Ishihara, M., Yagi, K.: Effect of adriamycin entrapped by sulfatide-containing liposomes on ovarian tumor-bearing nude mice. *Biotech. Appl. Biochem.* 8: 471-478, 1986.
- 2) Takano, M., Kojima, N., Ueno, N., Yabushita, H., Noguchi, M., Ishihara, M., Yagi, K.: Improved sulfatidecontaining liposomes as carriers of

- adriamycin. J. Clin. Biochem. Nutr. 4 : 223-233, 1988.
- 3) Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., Cullis, P. R. : Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. Chem. Phys. Lipids 40 : 89-107, 1986.
 - 4) Mayer, L. D., Hope, M. J., Cullis, P. R. : Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochim. Biophys. Acta 858 : 161-168, 1986.
 - 5) Rosso, R., Ravazzoni, C., Esposito, M., Sala, R., Santi, L. : Plasma and urinary levels of adriamycin in man. Eur. J. Cancer 8 : 455-459, 1972.
 - 6) Nicolay, K., Timmers, R. J. M., Spoelstra, E., Van der Neut, R., Fok, J. J., Huigen, Y. M., Verkleij, A. J., De Kruijff, B. : The interaction of adriamycin with cardiolipin in model and rat liver mitochondrial membranes. Biochim. Biophys. Acta 778 : 259-371, 1984.
 - 7) Forssen, E. A., Tökes, Z. A. : Use of anionic liposomes for the reduction of chronic doxorubicin-induced cardiotoxicity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 1873-1877, 1981.
 - 8) Gabizon, A., Dagan, A., Goren, D., Balenhoz, Y., Fuks, Z. : Liposomes as *in vivo* carrier of adriamycin : Reduced cardiac uptake and preserved antitumor activity in mice. Cancer Res. 42 : 4734-4739, 1982.
 - 9) Gabizon, A., Goren, D., Fuks, Z., Barenholz, Y., Dagan, A., Meshorer, A. : Enhancement of adriamycin delivery to liver metastatic cells with increased tumoricidal effect using liposomes as drug carriers. Cancer Res. 43 : 4730-4735, 1983.
 - 10) 高木 弘, 山内晶司, 永田二郎, 八木國夫, 小嶋仲夫 : アドリアマイシン包埋リポソームの胃癌株に対する抗腫瘍効果. 厚生省新薬開発研究, 医薬品担体応用リポソームの開発研究班, 昭和 60 年度研究報告集, 1986, p 36-40.
 - 11) 高木 弘, 山内晶司, 永田二郎, 八木國夫, 小嶋仲夫 : アドリアマイシン包埋リポソームの胃癌株に対する抗腫瘍効果. 厚生省新薬開発研究医薬品担体応用リポソームの開発研究班, 昭和 61 年度研究報告集 1987, p 35-40.