脳腫瘍指向性リポソームの開発

柴田尚武・笠 伸年・越智 章・陣内敬文*¹⁾,
佐藤智典・砂本順三*²⁾, 平井正己・松山賢治*³⁾Development of liposome for targeting therapy
against brain tumor

Liposomes were investigated as a carrier for the delivery of therapeutic agents to target brain tumors. We have developed the coating of liposomes with pullulan and 1-aminolactose pullulan, and compared with conventional neutral liposome.

When pullulan-coated liposome labeled with ¹⁴C was intracarotidly administrated into the 9L cells implanted brain tumor rats, brain tumor uptake of radioactivity increased 4.5 times and spleen uptake decrease compared with the neutral liposome. The cytotoxicity of cisplatin against 9L-glioma cells was not inhibited by encapsulation of pullulan-coated liposomes. The quantity of platinum of 1-aminolactose pullulan-coated liposome-encapsulated cisplatin into the brain tumor was about 4 times as great as that of pullulan-coated liposome-encapsulated cisplatin.

Considering that polysaccharide-coated liposomes become more stable, both physiochemically and biochemically, than conventional liposomes, 1-aminolactose pullulan-coated liposomes may be useful in targeting brain tumors.

Shobu Shibata・Nobutoshi Ryu・Akira Ochi・
Takafumi Jinnouchi*¹⁾, Toshinori Sato・
Junzo Sunamoto*²⁾, Masami Hirai・
Kenji Matsuyama*³⁾

key words : liposome, pullulan,

1-aminolactose, cisplatin, 9L rat brain tumor

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* においては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、まだ十分ではない。そこで筆者らはシスプラチンをリポソームに封入して、水溶性薬剤を脂溶性薬剤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¹⁻³⁾、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、すなわち薬物送達システム(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。

実験1では、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種を調製して臓器分布および抗腫瘍効果を調べ比較検討した。

実験2では、中性リポソームの表面を天然由来の多糖であるプルランのコレステロール誘導体で被覆したリポソームを調製し、臓器分布および抗腫瘍効果を調べ、中性リポソームと比較検討した。またプルランの有するカリボキシ・メチル基が網内系への取り込み抑制に関与しているのではないかと考え、カルボキシ・メチル基を持つプルランと、持たないプルランの両者について比較した。

実験3では active targeting の効果をみる目的で、多糖プルランに認識糖鎖である2糖1-アミノラクトースを導入したリポソームを調製し、腫瘍細胞への取り込みおよび臓器分布を調べ、プルラン被覆リポソームと比較検討した。

方 法

(1) リポソームの調製

中性リポソーム(PC)は卵黄 phosphatidylcholine(PC)40 mg とコレステロール 5.6 mg をクロロフォルム 2 ml に溶解し、減圧下で薄膜を作

*¹⁾ Department of Neurosurgery, Nagasaki University School of Medicine. 長崎大学医学部脳神経外科学教室

*²⁾ Department of Polymer Chemistry, Faculty of Engineering, Kyoto University 京都大学工学部高分子化学教室

*³⁾ Hospital Pharmacy, Nagasaki University School of Medicine 長崎大学医学部附属病院薬剤部

成した。これに生食水 1 ml を加えて vortex mixer を用いて攪拌振盪し、氷溶上でプローブ型ソニケーターで超音波照射(25 W, 15 分内)を行い、多重層リポソーム(multilamellar vesicle, MLV)を調製した。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、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)を調製した。

プルラン被覆リポソーム(pullulan-coated Lip)は、卵黄レシチン単独で前者に準じて調製した MLV に糖鎖の一部にスペンサーを介在したコレステリル基を置換したプルラン誘導体(脂質の 1/5~当重量)の水溶液を加え、20°Cで30分間のインキュベーションすることにより調製した。また 1-アミノラクトースを EDC 縮合剤を用いたカルボキシメチル化多糖に導入して 1-アミノラクトース修飾プルラン被覆リポソーム(1-aminolactose-pullulan-coated Lip)を調製した。

つぎに必要なに応じて、リポソームに ^{14}C -DPPC 1 μCi を加えて ^{14}C 標識リポソームを調製した(1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)。またシスプラチン 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(封入率 4%)。

(2) 9L グリオーマ移植ラット

雄 Fisher-344 ラット(250~350 g)をフローセン吸入麻酔下に定位脳手術装置へ固定し、9L グリオーザルコーマ細胞懸濁液 5×10^5 個/ μl を、bregma の左方 3 mm, 前方 1.5 mm, 硬膜面から深さ 5 mm の左尾状核に、ハミルトンマイクロシリンジを用いて注入移植した。

(3) 臓器内分布

移植 15 日目のラットに、フローセン吸入麻酔下に左側の総、内、外頰動脈を露出し、後頭、上甲状腺、翼空口蓋動脈を凝固切断し、ヘパリン加生食水を満たしたシリコンチューブを、左外頰動脈より頰動脈分岐部まで逆行性に挿入した。また大腿静脈にも挿入した。

麻酔より覚醒後に留置したシリコンチューブより ^{14}C 標識リポソーム 1 ml (1 μCi) を 2 分間かけ

て注入した。動注では 30 分後に、静注では 3 時間後に屠殺し、上行大動脈より生食水で灌流後に各臓器(脳腫瘍、大脳、肝臓、脾臓、腎臓、血液)を採取し、組織切片 100 mg を 0.5 mg のソルエン 350(Packard)とともに 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(Packard)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。

麻酔より覚醒後に留置したシリコンチューブよりシスプラチン単独、およびリポソーム封入シスプラチンを 2 分間かけて注入した。30 分後に屠殺し、各臓器を摘出し、検体 0.5~2.0 g をケルダールフラスコに入れ、硝酸と過酸化水素を加えて蛋白分解した。これを加熱することによって濃縮したあと、水を加えて 1~2 ml とし、原子吸光計(Hitachi 2-8000)で吸光度を測定した。

(4) 細胞障害活性

実験 1 では、flash 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 $1 \times 10^4/\text{ml}$ に調製した。multiwell plate に 1 ml/well の割合で散布し、ただちに 5% CO_2 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 μl の遊離シスプラチンとリポソーム封入シスプラチンを含む 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 回目に 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。

実験 2 では、9L グリオーザルコーマ細胞 2×10^3 を含む 10% FBS 加イーグル MEM 培地 100 μl を 96-well microplate に分注し、37°C 5% CO_2 で 24 時間培養したあと、各濃度の遊離シスプラチン、リポソーム封入シスプラチンおよびプルラン被覆リポソーム封入シスプラチンを含む 10% EBS 加イーグル MEM 培地 100 μl を加え、さらに 4 日間培養した。その後、リン酸緩衝生食水中に 5 mg/ml に調製しておいた MTT の stock solution に各 well に 15 μl 加え、4 時間培養後、

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

1000 rpm, 5 分間遠沈し, 上清を吸引除去し, DMSO 200 μl を加え, 形成されている formazan を溶解し, microphotometer を用いて 540 nm における吸光度 (OD 540) を測定した. シスプラチン感受性を 10% PBS 加 MEM をコントロールとした吸光度の比率 (ID 50) で示した.

結果

(1) 構造変換リポソーム (図1, 2, 3)

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, 臓器分布および抗腫瘍効果を調べた.

^{14}C 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 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 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, 同側大脳, 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, 肝臓への網内系に高値で, 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). 下段

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

は脳腫瘍へのリポソームの取り込みを拡大したもので, DPPCリポソームがもっとも高値で, ついで PC リポソームの順であった (図1下段).

静注法で脳腫瘍へもっとも高率に取り込まれた DPPC と PC リポソームを, それぞれ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. 静注法に比べ, 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. 脾臓にもっとも高率で, 脳腫瘍への取り込みは肝臓と同程度であった (図2).

細胞障害活性の測定には, 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. それぞれ 10, 30, 50 μl の遊離シスプラチン (CDDP で 5, 15, 25 μg) と DPPC リポソーム封入シスプラチン (封入率 5.7% であったので, CDDP で 0.3, 0.9, 1.5 μg) 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

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

Each point represents the mean of 4 experiments.

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ほぼ同等であった(図3)。

(2) プルラン被覆リポソーム(図4, 5, 6)

プルラン被覆リポソームを用い、臓器分布および抗腫瘍効果を調べ、中性リポソームと比較検討した。また網内系への取り込み抑制にプルランの有するカルボキシ・メチル基が関与しているのではないかと考え、カルボキシ・メチル基を持つプルランと持たないプルランの両者について臓器分布について比較検討した。

^{14}C で標識した中性リポソームとプルラン被覆リポソームの各 $1\mu\text{Ci}/\text{ml}$ を、それぞれ5匹と8匹の9Lグリオーマ移植ラットの15日目に内頸動脈より投与して30分後に屠殺し、脳腫瘍、同側大脳、対側大脳、肝臓、脾臓、腎臓、血液の各100mg wet tissue 当りのカウント数を計測し、投与量に対する取り込み率であらわした。プルラン被覆リポソームは、中性リポソームとくらべ、脳腫瘍では0.28から1.26%と4.5倍に、また腫瘍側大脳でも0.2から0.41%と2倍に増加した。一方脾臓では0.78から0.2%と1/4に減少した(図4)。

各濃度の遊離シスプラチン、リポソーム封入シスプラチン(封入率5.7%)、プルラン被覆リポソーム封入シスプラチン(封入率2.7~8.4%)を9L細胞培養液に添加し、4日間培養後、シスプラチン感受性を10% PBS加MEMをコントロールとして吸光度の比率(ID50)で示した。シスプラ

図4 tissue distribution of ^{14}C -labeled egg phosphatidylcholine liposomes without and with pullulan derivative 30 minutes after intracarotid injection into 9L cells implanted brain tumor rats

図5 cytotoxicity of free cis-diamminedichloroplatinum(CDDP), liposome-encapsulated CDDP(Lip-CDDP) and pullulan-coated liposome-encapsulated CDDP(pullulan-coated Lip-CDDP)toward 9L glioma cells. Value calculated by the following equation:

$$\frac{\text{mean absorbance of test wells}}{\text{mean absorbance of control wells}} \times 100$$

チンのID50は、遊離シスプラチン $4.7\mu\text{g}/\text{ml}$ 、リポソーム封入シスプラチン $7.3\mu\text{g}/\text{ml}$ 、プルラン被覆リポソーム封入シスプラチン $10.0\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、リポソームに封入し若干の細胞障害活性の低下がみられたが、有意差はなかった(図5)。

カルボキシ・メチル基が100単糖当たり5個以下

図6 Percent injected dose of tissue platinum concentration 30 minutes after intracarotid injection of 1 ml of free CDDP, and pullulan-coated liposomes without and with carboxymethyl-encapsulated CDDP into 9L cells implanted brain tumor rats. Values represent the mean of 3 animals.

のプルランと、25個のプルランを合成し、両者のプルラン被覆リポソーム封入シスプラチン(66.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$)およびシスプラチン単独(579 $\mu\text{g}/2\text{ ml}$)を、9L グリオーマ移植ラットの15日目の内頸動脈に投与し、30分後に肝臓、脾臓、腎臓を摘出して、プラチナ(Pt)濃度を原子吸光法で測定した。投与量に対するプラチナ臓器分布率(3群とも3匹の平均)で示した。カルボキシ・メチル基を持つプルラン被覆リポソーム封入シスプラチンの分布率は、カルボキシ・メチル基を持たないプルラン被覆リポソーム封入シスプラチンとくらべ、肝臓では約98%にしか減少しなかったが、脾臓では約31%に減少した(図6)。

(3) 1-アミノラクトース修飾プルラン被覆リポソーム(図7)

1-アミノラクトース修飾プルラン被覆リポソームを用い、9L グリオーマ細胞に対する取り込みと臓器分布を調べ、プルラン被覆リポソームと比較検討した。

単層培養 9L グリオーマに ^{14}C および ^3H イヌリンで標識したプルラン被覆リポソームと、1-アミノラクトース修飾プルラン被覆リポソームを接触させて、2種のリポソームの取り込み率を液体シンチレーションカウンターで測定した。3時間接触させたあと、1-アミノラクトース・プルランは従来のプルランにくらべ、 ^{14}C で約5倍、 ^3H イヌリンで約4倍の取り込み率がみられた。

図7 Percent injected dose of tissue platinum concentration 30 minutes after intracarotid injection of 1 ml of pullulan-coated liposome-encapsulated CDDP [P-MLV-CDDP(CM+)] and 1-aminolactose-pullulan-coated liposome-encapsulated CDDP [1-AL-REV-CDDP(CM-)] into 9L cells implanted brain tumor rats. Values represent the mean of 3 animals.

調製法の簡便さから多重層リポソーム(MLV)を用いてきたが、水溶性薬剤であるシスプラチンの封入率の低さ(約4%)が問題であった。そこで構造安定性にすぐれたプルランを用いて、逆相蒸発法による大きな一枚膜リポソーム(REV)を調製し、両者のシスプラチン封入率を原子吸光法により測定し、比較検討した。

プルラン被覆 REV シスプラチンのシスプラチン封入率(3例の平均)は13.0%で、プルラン被覆 MLV シスプラチン(9例の平均)の3.6%にくらべ約3.6倍に増加していた。そこでプルラン被覆 MLV 封入シスプラチンと1-アミノラクトース修飾プルラン被覆 REV 封入シスプラチン各1 mlを、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、30分後に脳腫瘍および各臓器を摘出して、プラチナ濃度を原子吸光法で測定した。投与量に対するプラチナ臓器分布率(それぞれ3匹の平均)で示した。1-アミノラクトース修飾プルラン被覆 REV 封入シスプラチンの脳腫瘍分布は、プルラン被覆 MLV シスプラチンの約4倍に増加していた。同時に同側正常脳への取り込みも増加していた(図7)。

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。

まずリポソームの passive targeting の効果を見る目的で、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⁴⁾。

つぎに、中性リポソーム表面を天然由来の多糖であるプルランのコレステロール誘導体で被覆したリポソームを調製した。プルラン被覆リポソームは構造安定性に非常にすぐれ、かつ生体投与後、他の多糖類とくらべて特異な標的指向性を示さず、認識素子としての糖分子や抗体を導入するには適材と考え使用した。プルラン被覆リポソームの取り込み率は、中性リポソームとくらべて脳腫瘍では4.5倍に増加、逆に脾臓では1/4に減少した。

一方、プルラン被覆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、中性リポソーム封入シスプラチンとほぼ同等であった。また、プルランの持つカルボキシ・メチル基によって、プルラン被覆リポソームシスプラチンの網内系への取り込みは肝臓では約98%に、脾臓では約33%に減少した。プルランにおけるカルボキシ・メチル基の数はその合成過程で調節可能であり、網内系への取り込みをもっとも抑制するプルラン被覆リポソームを調製することは可能である^{5,6)}。

第三に細胞認識性を有する糖鎖をリポソームに付与する方策の一つとして、多糖プルランへの2糖1-アミノラクトースの導入を行った。1-アミノラクトースは癌細胞表面の受容体の認識に深く関わっている糖鎖と考えられている。またその調製法の簡便さから多重層リポソーム(MLV)を実験に用いてきたが、MLVは水溶性薬剤であるシスプラチンの封入率の低さ(約4%)が問題であっ

た。そこで構造安定性にすぐれたプルランを用いて、逆相蒸発法による大きな一枚膜リポソーム(REV)を調製し、シスプラチン封入率の向上を計った。1-アミノラクトース、プルラン被覆リポソームの単層培養9Lグリオーマへの取り込み率は、プルラン被覆リポソームの約5倍であった。プルラン被覆リポソームのシスプラチン封入率はMLVで約3.6%であったのに対し、REVでは約13.0%で約3.6倍であった。

1-アミノラクトース、プルラン被覆 REV 封入シスプラチンの脳腫瘍プラチン分布率は、プルラン被覆 MLV 封入シスプラチンの約4倍であった。したがって、1-アミノラクトース・プルランで被覆した大きな一枚膜リポソームは、脳腫瘍指向性リポソームとして有用と考えられる⁷⁻¹⁰⁾。

本論文の要旨は第7回日本 DDS 学会シンポジウム“脳神経外科領域と DDS”にて発表した。

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) Shibata, S., Ochi, A., Mori, K.: Liposomes as carriers of cisplatin into the central nervous system-Experiments with 9L gliomas in rats. Neurol. Med. chir. (Tokyo) 30: 242-245, 1990.
- 4) 柴田尚武, 陣内敬文, 越智 章, 森 和夫, 佐藤智典, 砂本順三：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。DDS 5: 83-87, 1990.
- 5) 越智 章, 柴田尚武, 森 和夫, 佐藤智典, 砂本順三：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。2. プルラン被覆リポソームと脳腫瘍指向性。DDS 5: 261-265, 1990.
- 6) 砂本順三：生体適合性人工細胞(リポソーム)の開発。病態生理 6: 771-780, 1987.
- 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：分子認識素子・多糖体コレステロール誘導体被覆リポソームのターゲティング効果。日本臨床 47: 194-199, 1989.
- 9) 佐藤智典, 秋吉一成, 砂本順三：分子認識素子を付与したリポソームの特異細胞への指向性。DDS 4: 7-11, 1989.
- 10) 山本正幸, 瀬川 徹, 吉田 亨, 門原留雄, 井沢邦英, 角田 司, 土屋涼一, 榎藤禎彦, 大畑教昭, 石井伸子, 小路敏彦, 森口信弘, 佐藤智典, 秋吉一成, 砂本順三：ガラクトース残基を有する多糖被覆リポソームを用いた肝癌化学療法への基礎的検討。DDS 6: 355-359, 1991.