

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 3 日現在

機関番号： 31201
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22592098
 研究課題名（和文） リンパ管を標的とした口腔内ドラッグデリバリーシステム製剤の開発
 研究課題名（英文） Development of pharmaceutical preparation as intraoral drug delivery system for targeting the lymph vessel
 研究代表者
 佐塚 泰之（SADZUKA YASUYUKI）
 岩手医科大学・薬学部・教授
 研究者番号： 90162403

研究成果の概要（和文）：舌癌罹患による転移を予防することを目的とし、転移経路であるリンパ管を標的とした徐放性リポソームの開発を目的とし検討した。薬物投与部位での毒性を抑えるためにリポソーム膜が強固に形成する組成を明らかにし、放出時間を遅延させることが可能となった。また、少量の薬物投与で効果の増強と副作用の軽減が期待されるだけでなく、原発巣が存在する舌と転移先であるリンパ節の双方での薬物集積が認められた。以上の結果より、標的性および徐放性の両方を付与したリポソームの開発により、薬物の少量投与での原発巣の治療・転移の予防・副作用の軽減を可能にすることが期待された。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study had been to developing novel liposome which had abilities of both controlled release and targeting lymph node in order to prevent metastasis caused by tongue cancer. The liposomal membrane was made strong by optimum lipid components. Then, the liposome was possible to delay the release time of drug and be decreased toxicity at injection site was inhibited. The liposome with low dose was able to improving beneficial effect and decreasing adverse effect. Furthermore, the drug in liposome accumulated to both tongue with primary tumor and lymph node which is metastasis site. In conclusion, it was expected that the liposome which had ability both targeting and controlled release was able to therapy of primary tumor, prevention of metastasis and relief adverse effect with low dose.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学、病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード： 癌、ナノバイオ、リンパ、DDS

1. 研究開始当初の背景

（1）口腔領域の癌疾患のうち、舌癌は約50%を占める最も頻度が高い疾患である。舌

癌の多くは扁平上皮癌であるため、外科的な切除が有効な治療法と思われるが、実際には一次治療後も所属リンパ節への転移が多く

認められ、予後不良の原因となっている。即ち、舌癌治療において初期段階より転移を考慮した治療を行うことが治療成績を向上させるために極めて重要である。

口腔領域の腫瘍の転移は腫瘍細胞が原発巣から周囲のリンパ管に侵入し、所属リンパ節に到達することで惹起されるため、転移の予防にはリンパ管を利用することが有用であると予測された。しかしながら、腫瘍局所に薬物を投与しリンパ管を経由した治療は行われていないのが現状であった。連携研究者の藤村によりシスプラチン水溶液を投与した場合に所属リンパ節において白金が検出されたというリンパ管を利用した薬剤投与経路の報告が認められたが、舌癌の治療及び転移治療にドラッグキャリアを用いた報告はなかった。薬物のドラッグキャリア化は、単回投与で薬剤が組織局所および所属リンパ節に長期間にわたって有効濃度を維持できる長所を有するとともに頻回投与による口腔内の針傷が治りにくいという心配がなくなる。即ち、「標的性」と「徐放性」を保持した新規のリンパ管指向型薬剤の構築は治療効果の増大を可能にすると考えた。

(2) 徐放性薬剤としてナノパーティクルやエマルションなどの薬物キャリアが臨床にて使用されている。本研究では薬物キャリアの中でも形体やサイズのコントロールが容易なリポソームを使用することとした。一般的にリポソームの薬物放出機構は膜表面にpolyethyleneglycol (PEG) を修飾し、血中滞留性を向上させることによる。一方、本研究では原発巣と所属リンパ節の2か所へ薬剤を集積させた後にそれぞれの場所で薬物を徐々に放出する必要がある。即ち、これまでのリポソームの概念とは異なる、まったく新しい徐放性リポソーム薬剤の開発を必要とするものと考えた。

2. 研究の目的

(1) リポソームを用いて原発腫瘍と転移リンパ節の腫瘍細胞の増殖を抑制する。

(2) 投与量の減量による副作用の減少を可能にする。

(3) 最終目的として非侵襲的な粘膜経路の徐放性リポソームの開発をする。

3. 研究の方法

(1) 制がん剤シスプラチンのリンパ節到達確認

麻酔下にて、マウス左側の舌にシスプラチン溶液を投与し5分間のマッサージを行った。5分後より24時間後まで経時的に解剖を行い、所属リンパ節を摘出した。Particle Induced X-ray Emission (PIXE)を用いてリンパ節中の白金量を測定した。

(2) リポソームの舌およびリンパ節への分布検討

3-(1)と同様の方法にて実験を行い、100、300もしくは800 nmに粒子径をコントロールしたシスプラチン内封リポソームをマウス左側舌に投与した。投与24時間に解剖を行い舌およびリンパ節を摘出しPIXEにてシスプラチン濃度を測定した。

(3) Wrapped liposomeの調製

シスプラチンを内封したリポソームをさらに脂質で被覆した wrapped liposome を調製し検討した。荷電脂質と薬物をイオン結合による複合体とした後、リン脂質とPEG脂質にて被覆した。

(4) リポソーム構成脂質の検討

リポソームはリン脂質である L- α -distearoylphosphatidylcholine (DSPC)、コレステロール、荷電リン脂質である L- α -distearoylphosphatidyl-DL-glycerol (DSPG)からなる。これらの混合比率を変えることによりリポソーム膜の固さを検討した。リポソーム膜の固さは蛍光強度の変化より算出した流動性を指標とした。

(5) 抗腫瘍効果および体内分布評価 (*in vivo*)

*In vivo*にて最適なリポソームの体内分布および原発巣に対する抗腫瘍効果を検討するため、腫瘍移植10、13、16日目の3回、リポソームを投与した。最終投与より2日後に解剖を行い腫瘍および各臓器を摘出した。投与部位は腫瘍の周囲6点とし、合計でシスプラチンが0.06 mgとなるように希釈した。解剖日までは体重および腫瘍サイズを測定した。

4. 研究成果

(1) 制がん剤シスプラチンのリンパ節到達

確認 (Fig. 1)

シスプラチン水溶液を投与した後、24時間後まで白金がリンパ節へ集積していることが明らかとなった。また、左側舌に投与したにもかかわらず、右リンパ節への蓄積も認められたことから、左右のリンパには相互に行き来する経路があることが明らかとなった。

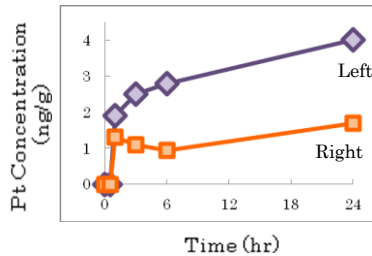


Fig. 1 The Pt accumulation in lymph node after CDDP solution injection

Each point represents mean. (n=4)

(2) シスプラチン内封リポソームの分布検討

シスプラチン内封リポソームの投与24時間後に解剖を行い PIXEにて白金量を測定した結果、舌およびリンパ節において白金が認められた。シスプラチン水溶液投与群では舌中で白金は検出されなかった一方、リポソーム投与群では舌中にて白金が検出された。すなわち、シスプラチン水溶液は速やかに舌より消失するが、リポソーム化により舌での滞留性を増大させることが明らかになった。また、粒子径が800 nmのときに舌にて高い白金量が得られ、リポソームの粒子径は白金の残存量に影響を及ぼすことが明らかとなった。本検討より、リポソームの粒子径は大きいほうが長時間舌へ留まることが可能であることが示唆された。しかしながら、リポソームが投与部位にて初期バーストすることに基づくと考えられる舌の正常細胞に対する細胞毒性が惹起されるという問題点が浮上した。

(3) Wrapped liposome の検討

シスプラチン水溶液およびシスプラチン内封リポソーム投与時に舌の投与部の細胞に壊死が認められたため、シスプラチンと舌投与部組織との接触を防ぐことを目的に、長時間薬物保持が可能なりポソームの組成を検討した。イオン結合により薬物を内封させたリポソームをさらに脂質2重膜で覆う wrapped liposome の調製を試みたが、シスプラチンと脂質とのイオン結合が弱くシスプラチンの放出を制御するには至らなかった。

(4) リポソーム構成脂質の検討 (Table 1)

構成脂質としてコレステロールを添加することにより膜の流動性が低くなるとの報告より、最適なコレステロール添加量を検討した。その結果、総脂質量に対して55.6%のコレステロール(200 μmol)を添加することが最も強固な膜を形成し、長時間の薬物保持が可能となることが予想された。

薬物のリポソームからの放出評価を実施した結果、24時間後に65.4%の薬物を保持し続けており、他群に比べ強固な膜を有するリポソームであることが明らかとなった。

Table 1 The liposomal membrane fluidity

Amount of cholesterol		Fluidity
μmol	%	
100	38.5	0.24
150	48.4	0.28
200	55.6	0.29
250	61.0	0.23
300	65.2	0.24
400	71.4	0.21

(5) 抗腫瘍効果および体内分布評価 (*in vivo*) (Fig. 2)

リポソーム投与群において、解剖時の原発巣の腫瘍重量は 4.2 ± 1.7 gであり、コントロール群の51%に抑制していたことより、原発巣に対する優れた抗腫瘍効果が認められた。

心臓、肝臓への薬物集積量はコントロール群に比べて低レベルであった。肺、腎臓においてはコントロール群と同程度の値が検出された。また、本検討において、投与部位における細胞壊死などの細胞毒性は認められず、固いリポソームを調製したことにより投与時にシスプラチンが放出しなかった、もしくは微量の放出に留めることが可能であったことが示唆された。

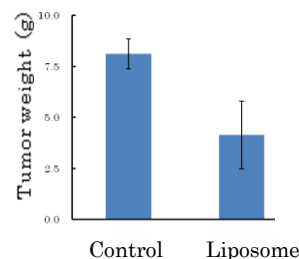


Fig. 2 Tumor weight

Each column represents mean \pm S.D. (n=3-4)

(5) 結語

舌癌の治療および発症後速やかに進行すると考えられている転移の予防を目的とし、薬物キャリア・リポソームを用いた検討を行った。リポソームの最適粒子径、最適な構成脂質および比率をリポソーム膜の流動性より評価し放出制御のコントロールを可能にできることが明らかとなった。また、口腔内DDS製剤の開発により、原発腫瘍の治療効果と副作用の減少効果が得られることが示唆される結果を得ることができた。しかしながら、もう一方の最大の目的である転移リンパ節を経由した抗転移効果について明らかにすることまで到達することができなかった。

標的性と徐放性を有するリンパ管指向型製剤の開発を目的とした本検討は舌癌治療の向上に重要であると考えており、到達に至らなかった検討についても今後、継続して実施する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計6件)

①佐塚 泰之、藤村 朗、杉山 育美、舌癌治療を目的とした24時間維持リポソームの検討、第28回日本 DDS 学会学術集会、2012年7月5日、札幌コンベンションセンター

②佐塚 泰之、DDS ナノキャリアを基盤とした新規アプローチと臨床への展開、第6回先端医療薬学研究センター講演会、2012年3月16日、岩手医科大学

③杉山 育美、佐塚 泰之、舌がん治療を目的とした舌内投与型リポソームの粒子径と薬物分布に関する検討、第70回日本癌学会総会、2011年10月3日、名古屋国際会議場

④佐塚 泰之、DDSキャリアとしてのリポソームの有用性とその展開、岩手県生物工学研究所第177回公開セミナー、2011年8月8日、岩手県生物工学研究所

⑤杉山 育美、藤村 朗、佐塚 泰之、舌がんの転移経路を利用した治療におけるリポソーム粒子径の影響、日本薬学会 第131年会、2011年3月29日、ツインメッセ

静岡 (東日本大震災により中止)

⑥藤村 朗、杉山 育美、佐塚 泰之、徐放性抗癌剤の開発ーリンパ管を利用した局所投与、岩手医科大学未来医療開発プロジェクトキックオフミーティング、2010年12月4日、岩手医科大学

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐塚 泰之 (SADZUKA YASUYUKI)
岩手医科大学・薬学部・教授
研究者番号：90162403

(2)研究分担者

杉山 育美 (SUGIYAMA IKUMI)
岩手医科大学・薬学部・助教
研究者番号：80509050

(3)連携研究者

藤村 朗 (FUJIMURA AKIRA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：80173459