

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5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791195

研究課題名（和文） 治療抵抗性肝腫瘍の化学塞栓療法における薬剤溶出性高吸水性ポリマーの開発

研究課題名（英文） Optimization of loading superabsorbent polymer microspheres with anticancer drugs for use in chemoembolization of liver tumors unresponsive to standard therapy

研究代表者

前田 登 (MAEDA NOBORU)

大阪大学・医学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：00506488

研究成果の概要（和文）：

本研究は、治療抵抗性肝腫瘍に対する薬剤溶出性高吸水性ポリマーの標的化学塞栓を、腫瘍局所制御の向上に結びつく、より効果的に臨床応用可能なドラッグデリバリーシステムとして適正化することを目的とした。抗癌剤としてシスプラチン、エピルビシン、イリノテカンを使用する場合は、溶媒としてそれぞれヨード造影剤、非イオン性等浸透圧ヨード造影剤、点滴静注用イリノテカン溶解原液を使用するのが適当であった。家兎肝腫瘍モデルを用いた検討の結果、腫瘍局所制御の向上が期待された。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study was to optimize the preparation for loading superabsorbent polymer (SAP) microspheres with anticancer drugs as an efficient drug delivery system for use in chemoembolization of liver tumors unresponsive to standard therapy in clinical practice. Iodinated contrast medium, nonionic isosmotic iodinated contrast medium and undiluted irinotecan solutions for intravenous drip infusion were most suitable for solvent in loading SAP microspheres with cisplatin, epirubicin and irinotecan, respectively. This result of in vivo study in a rabbit model with transplanted liver VX2 tumors suggested that chemoembolization with anticancer drug-loaded SAP microspheres was more effective in suppressing the tumor growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：動脈塞栓術・化学塞栓療法・薬剤溶出性塞栓物質・高吸水性ポリマー・肝腫瘍・抗癌剤・エピルビシン・イリノテカン

1. 研究開始当初の背景

癌化学療法において抗癌剤の腫瘍選択性を高め、かつ副作用を軽減させるため、薬物療

法の最適化を図るドラッグデリバリーシステム(DDS)の研究が世界で盛んに行われている。本邦では、肝細胞癌に対する

interventional radiology (IVR)の技術が発達しており、特に切除不能例では動脈塞栓術 (TAE)が治療の主体である。通常のTAE自体、油性造影剤リピオドール(Lp)と抗癌剤の懸濁液と多孔性ゼラチン粒(GP)を組み合わせることによる、抗癌剤の腫瘍内停滞及び徐放効果を図った一種のDDSの応用である。しかし、Lpは抗癌剤の担体として重要だが、非癌部肝実質の胆管周囲叢や類洞など微小循環をも塞栓するため肝障害が無視できないという問題がある。一方、予後を規定している治療抵抗性の転移性肝腫瘍に対してはゼラチンスポンジ細片(GS)単独による姑息的TAEで延命効果を計るが、治療効果は必ずしも満足できるものではない。またGPやGSは再吸収されるため塞栓効果は一時的で血管再開通は免れない。

我々のグループでは、従来のTAEの問題を解決し得る独自の塞栓物質として高吸水性ポリマー(SAP)を開発してきた。SAPは正確に粒子径の調整が可能な非吸収性微小球であり、無毒性の生体適合性に優れた材料である。臨床応用では、SAP単独でも標的塞栓により強い腫瘍壊死効果を示すが、腫瘍辺縁では局所再発も見られ、局所制御を更に高める工夫が必要であった。SAPの吸水・膨潤率は、分散媒の種類によって異なり、また分散媒間で可逆的である。この性質を利用し、濃度依存性が高く肝細胞癌にも比較的感受性が高いCDDP微粉末を溶解させた抗癌剤水溶液をSAPに含ませ、血管内で再び抗癌剤を溶出する薬剤溶出性高吸水性ポリマー(Drug Eluting Superabsorbent polymer microspheres=DESAP)を開発してきた。家兎肝 VX2 腫瘍モデルを用い、in vivo で検討を行ったところ、腫瘍内 CDDP 濃度を高め、腫瘍の増大効果を抑制する可能性を示唆し、生体内での致死的な有害事象を起こさない結果を得た。この結果を踏まえた治療抵抗性の転移性肝腫瘍への臨床応用では、有害事象は認めず、標的塞栓により腫瘍壊死効果を示した。しかしながら、SAPへのCDDP水溶液の吸収は効率が悪く、十分量の抗癌剤の腫瘍内停滞及び徐放効果が得られているとは言い難く、改良の工夫が必要である。

また、抗癌剤も腫瘍により感受性が異なるので、多種多様な抗癌剤のDESAPの開発も必要である。ただ後者はCDDPと同様の方法でのin vitro や in vivo での検討が容易である。これらの改善、開発により、肝細胞癌や予後を規定している治療抵抗性の転移性肝腫瘍への新たな治療選択として有用性が期待できる。

欧米ではDDSに高い関心が持たれ、既に製品化されたものがある。しかしながら、本邦でも欧米でも治療抵抗性の転移性肝腫瘍へのDDSの応用の報告は乏しい。それに対し我々

はSAPを用いたTAEの有効性と安全性を既に報告し、CDDPを用いたDESAPについては基礎的検討を終えている。本研究における一種類の塞栓物質自体に多種類の薬剤溶出性を持たせたDESAPの開発は、DDSの分野では稀有の試みであり、かつ臨床実用化が十分期待でき、治療抵抗性の多血性転移性肝腫瘍への新たな治療選択となるものと予測される。技術面を含めた様々な検討や知識の蓄積を現時点より行っておくことは、国際競争という観点からも、先見性のある意義の大きい事項と考えられる。また、我々は高吸水性ポリマー(SAP)に関する知識・経験を数多く持っており、この研究に対する必要性を強く認識するに至った。

2. 研究の目的

本研究「治療抵抗性肝腫瘍の化学療法塞栓における薬剤溶出性高吸水性ポリマーの開発」では、肝腫瘍に対するDESAPの標的塞栓を、「治療域」と「安全域」のバランスを失うことなく、腫瘍局所制御の向上に結びつく、より効果的に臨床応用可能なDDSを開発することを目的とする。

(1) 第一の目的は、我々のグループがこれまで開発してきたDESAPへのシスプラチン(CDDP)吸収率を上昇させ、より高濃度のCDDPを吸収したDESAPを作製することにより、臨床応用性を高めることである。

(2) 第二の目的は、CDDP以外の抗癌剤(塩酸エピルビシン(EPIR)、塩酸イリノテカン(CPT-11))を使用した新たなDESAPの開発である。最終的には治療抵抗性の転移性肝腫瘍を標的とし、多種多様な抗癌剤を用いて臨床応用性を高める。

3. 研究の方法

【基礎検討】

(1) CDDPの各種溶媒への溶解性及び配合安定性の検討

各種ヨード(I)及びガドリニウム(Gd)造影剤、(生理および10%)食塩水5mLにCDDP50mgを懸濁、振とう(25°C、24時間)、ろ過液中のCDDP量を原子吸光光度法で測定した。配合安定性は各種溶液に生食を加え、経時的にHPLCでCDDP量を測定した。HPLCによるCDDP定量は、日本薬局方外医薬品規格シスプラチンの定量法(検出波長210nm、40°C)に準じた。

(2) SAPのEPIR溶解液の吸収性及び溶出性の確認

各種I造影剤、生理食塩水に溶解させたEPIR溶液(5mg/mL、10mg/mL)1mLを作成し、SAP(50-100 μ m径、2mg)を投入、経時的に溶液中のEPIR濃度をHPLCで計測した。次にEPIRを吸収膨潤したSAP粒子を各種I造影剤、生理食塩水で洗浄後、生理食塩水40mL中に

投入し、経時的に溶出液中 EPIR 濃度を HPLC で計測した。EPIR 吸収後の SAP 粒径変化を計測した。

(3) SAP の CPT-11 溶解液の吸収性及び溶出性の確認

点滴静注用 CPT-11 溶解液 (20mg/mL) を生理食塩水あるいは注射用水で希釈し、各種濃度 CPT-11 溶液 (20 (無希釈)、10、4mg/mL) を作成。この CPT-11 溶液 2.5mL 中に SAP (100-150 μm) 粒子 25mg を投入、120 分後の溶液中の CPT-11 濃度を HPLC で計測し、吸収能を算出した。CPT-11 溶液 (20mg/mL) のみ、15 分後の溶液中 CPT-11 濃度も計測した。次に、CPT-11 溶液 (50mg/2.5mL) で作成した CPT-11 吸収粒子を各種濃度 NaCl 水溶液 (0.9 (生理食塩水)、0.45、0.23、0.1、0% (注射用水)) 50mL 中に投入。室温下の振盪器で振盪 (300/分) 後、120 分後まで経時的に溶出液中 CPT-11 濃度を HPLC で計測し、算出した。CPT-11 吸収後の SAP 粒径変化を計測した。

【動物実験】

(4) 家兎肝 VX2 腫瘍モデルに対する CPT-11 溶出性 SAP (CPT-11-DESAP) の in vivo での検討

治療抵抗性転移性肝腫瘍を想定し、家兎肝 VX2 腫瘍モデルに CPT-11 溶出性 SAP を使用し、肝動脈化学塞栓療法 (TACE) を施行した。対照群 (TAI+SAP 群) は同量の CPT-11 溶液動注後、同量の SAP で TAE 施行した。

①各処置は筋注および全身麻酔で施行。

②VX2 腫瘍組織を家兎肝に移植。

③14 日後に造影 CT 施行後 CPT-11-DESAP で TACE (DESAP 群) あるいは CPT-11 溶液動注後、SAP で TAE (TAI+SAP 群) 施行。

④各群について末梢静脈血における CPT-11、SN-38、SN-38G 各濃度の経時変化 (5 分、10 分、30 分、60 分、24 時間、7 日) を測定。また、0 分、24 時間、7 日後の血液検査 (血液生化学) も施行。

⑤7 日後に造影 CT 施行後、腫瘍内、腫瘍辺縁部及び周囲肝における CPT-11、SN-38 各濃度測定。

⑥CT 画像ワークステーションを用いた、腫瘍体積変化の計測。腫瘍増大率 (%) を [(治療後体積) - (治療前体積) / 治療前体積] × 100 で算出。

各群 n=6 とし比較検討を行った。

CPT-11-DESAP の調整は

SAP3mg/CPT-11:12mg/0.6mL/1羽とした。

4. 研究成果

(1) CDDP の各種溶媒への溶解性及び配合安定性

25°C での溶解度は、非イオン性 I 造影剤 2.4-5.2mg/mL、Gd 造影剤 7.6-10 (以上)mg/mL、

食塩水 1.7-1.9mg/mL であった。

配合安定性は、24 時間後の CDDP 残存率が I 造影剤 85%以上、Gd 造影剤 20-35%だった。

CDDP の Gd 造影剤への溶解度は高いが、配合安定性が極めて低いため、CDDP の溶解液には I 造影剤を使用するのが適当と考えられた。

本研究以前の結果によると、溶媒に非イオン性 I 造影剤イオヘキソールを用いた場合、イオン性 I 造影剤イオキザグル酸と比較し、SAP に吸収される CDDP 量は 10 倍になるが、SAP の膨潤率も 2.5 倍 (SAP はイオヘキソール、イオキザグル酸使用時に各々 5 倍、2 倍に膨潤) になる。

以上から現時点では、溶媒に非イオン性 I 造影剤イオヘキソールを用いて SAP に CDDP を吸収させることが適当と考えられるが、膨潤後の SAP 粒径が大きく、近位塞栓が予測される場合は、溶媒にイオン性 I 造影剤イオキザグル酸の使用が推奨される。

(2) SAP の EPIR 溶解液の吸収性及び溶出性
イオン性 I 造影剤イオキザグル酸使用時、SAP は EPIR を吸収しなかった。それ以外の非イオン性 I 造影剤や生理食塩水では、EPIR 溶液 (5mg/mL、10mg/mL) に投入した場合、90 分以上で 100%、60-80% 吸収した。

フローの無い環境では 8 時間まで薬剤溶出濃度は上昇し、それ以降は一定となった。薬剤溶出量が頭打ちとなっていることから、粒子と溶出液との間で一定の濃度比以上では放出しない可能性が考えられたので、粒子を再度ろ取り、洗浄後、生理食塩水 40mL 中に再投入し、溶出濃度を計測したが、これも 8 時間まで薬剤溶出濃度は上昇したが、それ以降は一定となった。

吸収後の粒径変化は 4.6-3.1 倍だった。非イオン性等浸透圧 I 造影剤イオジキサノール及び生理食塩水を用いた場合、各々 3.5 倍、3.3 倍と比較的膨潤率が低かった。

以上より、各種溶媒とも十分量の EPIR 量を SAP に吸収させることができるが、非イオン性等浸透圧 I 造影剤イオジキサノールや生理食塩水を使用した場合、SAP の膨潤率を比較的抑制でき、標的塞栓性を高めると推測される。特に X 線透視下で視認できる非イオン性等浸透圧 I 造影剤イオジキサノールの使用が EPIR 溶液の溶媒として推奨される。

(3) SAP の CPT-11 溶解液の吸収性及び溶出性

CPT-11 溶解液を生理食塩水で希釈した各濃度溶液 (20mg/mL、10mg/mL、4mg/mL) に対する SAP の 120 分後 CPT-11 吸収率は、各々 92、62、45% であったのに対して、CPT-11 溶解液を注射用水で希釈した各濃度溶液 (20mg/mL、10mg/mL、4mg/mL) に対する 120 分後 CPT-11 吸収率は、各々 92、90、87% であった。CPT-11

溶液(20mg/ml)の15分後CPT-11吸収率は60%であった。

薬剤溶出率は、生理食塩水中では10分以内に90%以上溶出するが、各濃度NaCl水溶液(0.45%、0.23%、0.1%、0%)中では、120分後に各々約80%、60%、40%、30%が溶出した。

吸収後の膨潤率は、各濃度CPT-11溶液(20mg/ml、10mg/ml、4mg/ml)に対して、2.6倍、3.3倍、4.9-5.7倍となった。

以上より、溶媒に点滴静注用CPT-11溶解液(20mg/ml)原液を使用して、SAP内に薬剤を吸収させると、SAPのCPT-11吸収率は高く、膨潤率も抑制でき、標的塞栓性を高めると推測される。点滴静注用CPT-11溶解液(20mg/ml)原液を希釈せずに使用するのが適当と思われる。

またNaClは吸収能を低下させ、溶出能を加速させる可能性が示唆されるので、CPT-11吸収SAPのカテーテル内での後押しには、注射用水の使用が推奨される

(4) 家兔肝 VX2 腫瘍モデルに対する CPT-11-DESAP の in vivo での検討

薬剤注入後5、10、30、60分、24時間、7日における血液中CPT-11平均濃度(ng/ml)は、DESAP群：1717、1672、2087、1982、11、0.2、TAI+SAP群：2578、2533、2593、2933、8、0、同血液中SN-38平均濃度(ng/ml)は、DESAP群：25、22、20、14、0.6、0、TAI+SAP群：58、47、29、19、0.2、0、同血液中SN-38G平均濃度(ng/ml)は、DESAP群：26、28、28、23、5、0.2、TAI+SAP群：76、75、57、42、5、0.5、であった。

腫瘍内、腫瘍辺縁部及び周囲肝の平均CPT-11濃度($\mu\text{g/g}$)は、DESAP群：0.03、0.01、0.01、TAI+SAP群：0、0、0、平均SN-38濃度($\mu\text{g/g}$)は、DESAP群：0.46、0、0、TAI+SAP群：0.06、0、0であった。

血液生化学では、薬剤注入前、薬剤注入後24時間、7日における血液中平均AST(U/L)は、DESAP群：11、571、11、TAI+SAP群：11、430、12、平均ALT(U/L)は、DESAP群：26、726、98、TAI+SAP群：22、491、74、平均 γ GTP(U/L)は、DESAP群：12、29、27、TAI+SAP群：13、20、14、平均ALP(U/L)は、DESAP群：84、128、59、TAI+SAP群：78、89、59、平均T-Bil(mg/dL)は、DESAP群：0.2、0.2、0.2、TAI+SAP群：0.3、0.2、0.2、平均Alb(g/dL)は、DESAP群：3.7、3.6、3.6、TAI+SAP群：3.7、3.5、3.5、平均LDH(U/L)は、DESAP群：150、2622、38、TAI+SAP群：223、2629、67であった。

腫瘍増大率は、DESAP群で 7.2 ± 31 、TAI+SAP群で 145 ± 144 であった。

血液中CPT-11およびSN-38濃度ともDESAP群がTAI+SAP群よりも低い傾向を示し、また

腫瘍内でDESAP群は高濃度を示した。特にCPT-11よりもその代謝物で抗腫瘍効果の強いSN-38の濃度が腫瘍内で高かった。血液生化学は両群ともおおむね同様の値を示した。腫瘍増大率はTAI+SAP群で有意に高かった($p=0.04$)。

以上より、CPT-11-DESAPの組織内での薬剤徐放効果が示唆され、抗腫瘍効果の強いSN-38の腫瘍内での貯留も示され、腫瘍増大率も抑制された。

この結果から今後DESAPの臨床応用は可能と思われる、腫瘍局所制御の向上が期待される。

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)

[雑誌論文] (計2件)

① Maeda N, Osuga K, Shimazu K, Morii E, Mikami K, Hori S, Nakazawa T, Higashihara H, Tomoda K, Nakamura H, Tomiyama N. In vivo evaluation of cisplatin-loaded superabsorbent polymer microspheres for use in chemoembolization of VX2 liver tumors. J Vasc Interv Radiol. 査読有 2012;23(3):397-404.

② Maeda N, Osuga K, Mikami K, Higashihara H, Mikami K, Tomoda K, Hori S, Nakazawa T, Nakamura H. In vitro characterization of cisplatin-loaded superabsorbent polymer microspheres designed for chemoembolization. J Vasc Interv Radiol. 査読有 2010. 21(6):877-81.

[学会発表] (計5件)

① 岸本健太郎、前田登、日高国幸、大須賀慶悟、田中会秀、中村純寿、小野祐介、中澤哲郎、東原大樹、富山憲幸 イリノテカンを用いた薬剤溶出性高吸水性ポリマー(Hepasphere)のin vitroでの検討 第42回日本IVR学会総会 2013. 5. 16 軽井沢

② 岸本健太郎、前田登、大須賀慶悟、田中会秀、中村純寿、小野祐介、中澤哲郎、東原大樹、富山憲幸 イリノテカンを用いた薬剤溶出性高吸水性ポリマー(Hepasphere)のin vitroでの検討 第72回日本医学放射線学会総会・学術集会 2013. 4. 14 横浜

③ Maeda N, Osuga K, Tanaka K, Kishimoto K, Nakamura M, Nakazawa T, Higashihara H, Tomoda K, Tomiyama N. In vitro characterization of epirubicin-loaded Hepaspheres (superabsorbent polymer microspheres) designed for chemoembolization. American Roentgen Ray

Society (ARRS) 2012 Annual Meeting
2012. 4. 29 Vancouver, Canada

④前田登、大須賀慶悟、東原大樹、中澤哲郎、友田要、富山憲幸 エピルビシンを用いた薬剤溶出性高吸水性ポリマー (Hepasphere) のin vitroでの検討 第40回日本IVR学会総会 2011. 5. 20 青森

⑤前田登、大須賀慶悟、東原大樹、中澤哲郎、友田要、富山憲幸 エピルビシンを用いた薬剤溶出性高吸水性ポリマー (Hepasphere) のin vitroでの検討 第70回日本医学放射線学会総会・学術集会 2011. 5 横浜(web開催)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 登 (MAEDA NOBORU)
大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教
研究者番号：00506488

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：