

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590053

研究課題名(和文) 抗癌薬や遺伝子治療薬を封入した肝臓表面適用シート製剤の開発

研究課題名(英文) Development of sheet formulation containing anticancer drugs and gene medicine for application to liver surface

研究代表者

西田 孝洋 (NISHIDA, Koyo)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授

研究者番号：20237704

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌薬5-FUを封入した肝臓表面適用シート製剤の作製を試み、さらに製剤の最適化を目指して、代謝阻害剤が5-FUの肝臓内動態に及ぼす影響を調べた。生体内分解性の乳酸・グリコール酸共重合体とヒドロキシプロピルセルロースを用いて、長期に渡って5-FUを徐々に放出する肝臓表面適用シート製剤を試作できた。また、5-FUの肝臓表面投与後の肝臓局所での集積性を向上させるため、代謝阻害剤であるギメラシルが有効であることを示し、併用する代謝阻害剤の最適比を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We tried to manufacture the sheet formulation containing anticancer drug 5-FU for application to liver surface. In addition, we examined the influence of metabolic inhibitors on the hepatic disposition of 5-FU, aiming to optimize the sheet formulation. We could manufacture the sheet formulation containing anticancer drug 5-FU for application to liver surface by employing biodegradable macromolecules poly (lactic-co-glycolic acid) and hydroxypropyl cellulose. From the sheet formulation, the containing 5-FU was gradually released for a long period time. Moreover, we found that gimeracil a metabolic inhibitor was useful to improve the bioavailability of 5-FU in the liver, and obtained the optimal combination ratio.

研究分野：薬剤学

キーワード：がん 製剤 コントロールドリリース

## 1. 研究開始当初の背景

癌治療においては、全身や臓器内非病巣への抗癌薬の分布に伴う重篤な副作用が大きな障壁となっている。肝癌の治療においても、病巣部位に抗癌薬を送達させる研究が、国内外で活発に展開されている。しかし、経口や静脈内投与などの従来の投与方法では、肝臓全体へ薬物が一様に分布するため、薬物の化学的、製剤学的修飾による一般的な DDS の手法では、病巣部位での薬物濃度の精密なコントロールは難しいのが現状である。

そこで、投与経路や形態を工夫する DDS に着目し、腹腔内の肝臓表面から肝細胞内部へ薬物を浸透させる投与形態では、病巣部位近傍に薬物が滞留する可能性が極めて高いと推測した。これまでに、肝臓表面投与後の薬物動態や製剤化の基本条件、および遺伝子治療薬への展開に関して、下記に示す知見を得てきた。

(1) 円筒状の拡散セルを試作して、ラットの肝臓表面に貼り付け、薬物を直接投与することにより、吸収部位を肝臓表面に限定した実験系を確立し、肝臓表面からの薬物吸収を世界で初めて実証した。

(2) 脂溶性や分子量などの物理化学的性質に基づいて、ラットの肝臓表面よりモデル化合物が吸収されることを明らかにした。

(3) FITC デキストランや抗癌薬 5-フルオロウラシルを拡散セルでラットの肝臓表面へ投与したところ、静注では肝臓内にほぼ均一に分布したのに対し、投与部位近傍に高度に集積した。

(4) ラットおよびマウス腹腔内の肝臓表面へプラスミド DNA を適用することにより、効率的な遺伝子導入が可能であることを明らかにした。

(5) ラットの肝臓表面からの薬物吸収動態に及ぼす投与薬液の容量や適用面積、および粘性添加物の影響を調べ、製剤設計の基本指針を得た。一方、実際の投与形態を想定した腹腔内投与の結果より、製剤自体の腹腔内での滞留性向上が臨床応用へ向けた重要な課題であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、腹腔内の肝臓などの臓器表面からの薬物吸収を利用するドラッグデリバリーシステム (DDS) の構築を目指して、肝臓表面からの薬物吸収・分布特性および抗癌薬や遺伝子治療薬の肝臓表面への適用に最適な製剤の基本条件を明らかにしてきた。生体膜付着性などの物理化学的因子を容易にコントロールできる、生体内分解性の肝臓表面適用シート製剤を作製し、封入する薬物の高分子化修飾等による肝指向性増強の手法と組み合わせ、抗癌薬や遺伝子治療薬の理想的な空間的・時間的制御が可能な DDS 製剤が開発できるという着想に至った。

本研究課題では、癌化学療法や重篤な疾患

治療へ肝臓表面法を展開するために、病巣部位近傍に長期間滞留し、選択的な薬物集積を可能にし、徐放化や代謝分解阻害などの多様な機能を有するシート状の DDS 製剤を開発することを目的とした。研究代表者は、肝臓表面からの良好な薬物吸収および高い集積性から、新規投与形態に基づく DDS としての臓器表面投与の有用性を示してきた。さらに、肝臓表面への適用に最適な製剤の基本条件を調べ、腹腔内での製剤自体の滞留性の重要性を示唆してきた。本研究課題では、抗癌薬や遺伝子治療薬の臨床応用に最適な多様な機能を有する肝臓表面適用シート製剤の開発を遂行した。平成 24 年度では、肝臓表面投与法の臨床応用を想定し、シリンジを用いた腹腔内のラット肝臓表面への薬物投与実験により薬物吸収動態をまず解析した。さらに眼粘膜適用製剤で得た技術を応用して、抗癌薬を封入した肝臓表面適用シート製剤を試作した。平成 25 年度では、シート製剤の最適化を図り、毒性などの基本的特性を調べた。さらに、平成 26 年度では、シート製剤に機能的な特性を付与するために、代謝阻害剤の肝臓内動態への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 腹腔内投与における粘性添加剤の影響

Carboxymethylcellulose sodium salt, polyvinyl alcohol, sodium alginate, polyvinylpyrrolidone, hydroxypropylcellulose を粘性添加剤として薬物溶液 (10 mg/mL) に添加した。Pentobarbital 麻酔下、Wistar 系雄性ラットの左大腿部動脈にカニューレを施した。シリンジを用いて肝臓表面近傍に薬液を投与した。経時的に血液を採取して、血漿中物濃度を測定した。

### (2) 肝臓表面適用シート製剤の試作

5-FU 含有シート製剤の作製: poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)、hydroxypropyl cellulose (HPC)、5-FU を acetone に溶解し、30°C で 24 時間静置して溶媒を留去した。乾燥後、直径 9 mm の円形に切り取り 5-FU 含有シート製剤とした。

In vitro 5-FU 放出性評価: 5-FU 含有シート製剤を 37°C の PBS (pH 7.4) 中に添加した。180 rpm で攪拌しながら経時的にサンプリングを行い、5-FU の放出量を紫外可視分光光度計により定量した。

### (3) シート製剤への代謝阻害剤の適用に関する基礎的検討

Wistar 系雄性ラットの左大腿部動脈にカニューレを施した。円筒状の拡散セルを肝臓表面に装着し、5-FU をセル内に投与した。代謝阻害剤として、gimeracil および uridine を併用した。経時的に血液を採取して、血漿中物濃度を測定し、さらに肝臓残存量を調べた。

#### 4. 研究成果

(1) 腹腔内投与における粘性添加剤の影響  
病巣部位近傍に選択的な薬物集積を可能にする新規投与形態として、腹腔内の肝臓表面への投与法を提案し、肝臓表面投与法の臨床応用を想定し、シリンジを用いた腹腔内のラット肝臓表面への薬物投与実験により薬物吸収動態をまず解析した。

吸収動態を検討するためのモデル薬物である phenolsulfonphthalein (Mw 354) の *in vivo* ラット腹腔内投与実験の結果、薬物血漿中濃度から推測される薬物吸収速度からは、いずれも粘性添加剤併用時でも投与部位における薬物の高い吸収抑制効果は認められず、薬液が腹腔内で希釈されたことなどが考えられた。したがって、腹腔内の肝臓表面へ適用する際には、シート製剤などによる製剤学的修飾を施し、薬物の局所滞留性を高める工夫を施す必要性が示唆された。

#### (2) 肝臓表面適用シート製剤の試作

肝臓表面における薬物の滞留性を向上させるために、抗がん薬 5-FU を含有するシート製剤の試作を試みた。シート製剤の形成に必要な生分解性のポリマーおよび肝臓表面に選択的に付着する高分子添加剤をスクリーニングし、5-FU を封入できる最適な配合条件を調べた。検討の結果、poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)、hydroxypropyl cellulose (HPC)、5-FU を acetone に溶解し、30~35℃で24時間静置してシートを作製した。シート製剤を37℃のPBS (pH 7.4)中に添加し、180 rpmで撹拌しながら経時的にサンプリングを行い、シート製剤の *in vitro* における5-FU放出量を測定した結果、シート製剤中のPLGA含有率を増加させることで、48時間後の5-FU放出量は約40%まで抑制された。したがって、5-FUを封入した均一な形状の徐放化に優れたシート製剤を、再現性良く作製できる実験条件を確立できた。

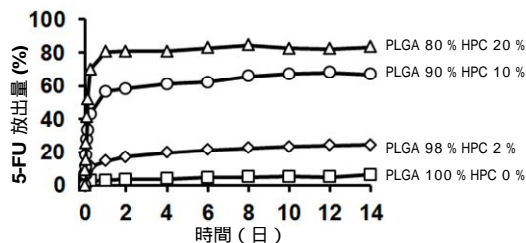


図1 シート製剤からの *in vitro* 5-FU放出量の経時変化

一方、初期の薬物放出速度(初期バースト)が大きいため、初期バーストを抑制できるシート製剤の最適な製剤処方を検討したところ、poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA)、hydroxypropyl cellulose (HPC)の混合比などの作製条件を最適化し、初期バーストの抑制に成功した(図1)。また、*in vivo* 腹腔内

においてシート製剤から放出される抗癌薬による毒性が懸念されるため、シート製剤にPLGAシートを重ね合わせた、片面(臓器表面への装着面)のみから薬物放出される二層型シート製剤の試作を試みた。従来のPLGAとHPCを含有するシート製剤に、PLGAのみのシートを重ね合わせて二層型シート製剤を作製できた。二層型シート製剤は、*in vitro* 評価においてPLGAシート側からの5-FUの放出を顕著に抑制した。その結果、肝臓の投与部位以外の葉や腹腔内の他臓器への障害性、全身循環への移行性を減少できる可能性が期待された。一方、ラット *in vivo* 評価において、二層型シート製剤は28日後も肝臓表面に滞留した。さらに、肝機能診断薬(AST, ALT測定キット)や我々が新たに開発した高分子マーカーを用いる手法による毒性評価では、二層型シート製剤の毒性は認められなかった。次の段階として、ラット腹腔内での二層型シート製剤を肝臓表面に適用後の5-FUの肝臓内動態を予備的に調べたところ、封入している5-FUの肝臓内動態を最適化するために、代謝阻害剤や吸収促進剤を二層型シート製剤に含有させる必要性が示唆された。

肝臓は生体内の恒常性維持に重要な役割を果たしており、肝疾患には生命を左右する重篤なものが多いため、新規投与形態に基づく肝臓内病巣部位への肝疾患治療薬のDDSも非常に有意義である。また、世界中で初の試みとして肝臓に着目したが、臓器表面へのシート製剤の適用は、他の腹腔内臓器においても可能と考えられる。本研究における斬新な投与法に関する検討が、外科手術後の腹膜播種の補助療法や腹膜硬化症などの難治性疾患に対する標的細胞選択的な遺伝子治療の確立に寄与できるものと期待できる。

#### (3) シート製剤への代謝阻害剤の適用に関する基礎的検討

封入している5-FUの肝臓内動態を最適化するために、代謝阻害剤などをシート製剤に含有させる必要性が示唆された。そこで、肝臓表面投与後の5-FUの局所動態を向上させるために、5-FUの代謝阻害剤であるgimeracilおよびuridineの併用による5-FUの肝臓への集積性に対する影響を検討した。円筒状の拡散セルを用いて5-FUをラットの肝臓表面へ代謝阻害剤と同時に適用したところ、180分後の5-FUの吸収率はいずれの条件においても約70%であり、gimeracilやuridine併用の肝臓表面からの吸収に及ぼす影響は認められなかった。肝臓表面投与180分後の肝臓内の拡散セル直下部位における5-FU濃度は、uridineを併用した場合、有意な差は認められなかった。一方、gimeracilを併用した場合は、コントロールと比較して有意に高くなり、効果が最大となる濃度が得られた。さらに、gimeracilの併用条件では、肝臓内の拡散セル直下部位における5-FU濃度は、投与360分後においても高く維持さ

れた。したがって、gimeracil の併用により投与部位近傍への 5-FU の集積性は向上し、5-FU の局所動態を制御できる可能性が示された。

今回得られた知見に基づいて、gimeracil を含有させたシート製剤の作製を既に開始しており、肝臓表面投与法の臨床応用を想定した DDS 製剤を開発する上で、重要な基礎情報が得られた。今後の展望として、肝癌モデル動物における肝臓表面適用シート製剤の治療効果を検討し、さらに遺伝子治療薬を封入した肝臓表面適用シート製剤を開発していく。

#### 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3件)

Mine T, Miyamoto H, Yoshikawa N, Fumoto S, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K, Effect of absorption enhancers on the absorption of FD-4 as a poorly absorbable marker macromolecule from the liver surface in rats, J Drug Del Sci Tech, 査読有り、24 巻、2014、386-389

Hirata H, Miyamoto H, Shimokawa K, Nakashima M, Nakayama M, Fumoto S, Nishida K, Novel diagnostic method of peritoneal injury using dual macromolecular markers, Biol. Pharm. Bull., 査読有り、37 巻、2014、262-267  
DOI: 10.1248/bpb.b13-00730

Kodama Y, Horishita M, Fumoto S, Mine T, Miyamoto H, Yoshikawa N, Hirata H, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K, Effect of viscous additives on the absorption and hepatic disposition of 5-fluorouracil (5-FU) after application to liver surface in rats, J. Pharm. Pharmacol., 査読有り、64 巻、2012、1438-1444  
DOI: 10.1111/j.2042-7158.2012.01514.x.

##### [学会発表](計6件)

西田孝洋、肝臓表面投与後の 5-FU の肝臓集積性に対する血管収縮剤および代謝阻害剤の効果、第 30 回日本 DDS 学会学術集会、2014 年 7 月 30 日、慶應義塾大学薬学部(東京都)

飯屋洋佑(西田孝洋)、抗がん薬の肝臓表面投与を可能とするシート型製剤の開発とその最適化、日本薬学会第 134 年会、2014 年 3 月 30 日、熊本市体育館(熊本県・熊本市)

下川研太(西田孝洋)、局所化学療法を目指す

した肝臓表面適用シート製剤の作製とその最適化、第 30 回日本薬学会九州支部大会、2013 年 12 月 6 日、長崎国際大学薬学部(長崎県・佐世保市)

下川研太(西田孝洋)、乳酸グリコール酸共重合体を用いた肝臓表面適用シート製剤の基礎的検討、バイオマテリアル学会九州講演会 2013、2013 年 9 月 20 日、熊本大学(熊本県・熊本市)

下川研太(西田孝洋)、肝臓表面投与法の臨床応用を目指した投与形態及び製剤開発に関する基礎的検討、日本薬学会第 133 年会、2013 年 3 月 28 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

西田孝洋、新規投与形態 DDS の製剤学的工夫、医療薬学フォーラム 2012/第 20 回クリニカルファーマシーシンポジウム、2013 年 7 月 21 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

##### [図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計1件)

名称：研磨剤を含有する核酸導入剤  
発明者：麓伸太郎、西田孝洋  
権利者：長崎大学  
種類：特許  
番号：特開 2013-053125  
出願年月日：2011 年 9 月 6 日  
取得年月日：2013 年 3 月 21 日  
国内外の別：国内

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/dds/index-j.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

西田 孝洋 (NISHIDA, Koyo)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授  
研究者番号：20237704

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
嶺 豊春 (MINE, Toyoharu)

宮元 敬天 (MIYAMOTO, Hirotaka)

平田 春奈 (HIRATA, Haruna)

吉川 直樹 (YOSHIKAWA, Naoki)