

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07891

研究課題名(和文) 高選択的な局所化学療法を目指した肝臓表面適用二層型シート製剤の開発

研究課題名(英文) Development of two-layer sheet formulation for application to liver surface to attain specific local chemotherapy

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：抗癌薬5-FUおよび代謝阻害剤ギメラシルを封入した二層型の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、添加剤の含有が5-FUの肝臓内動態に及ぼす影響を調べた。生体内分解性の基剤とヒドロキシプロピルセルロースを用いて二層型の肝臓表面適用シート製剤を作製し、肝臓局所での集積性を向上させることができた。また、本シート製剤の担癌マウスでの肝内分布を調べたところ、有意な肝局所集積性が見られた。

研究成果の概要(英文)：We tried to manufacture the two-layer sheet formulation containing anticancer drug 5-FU and metabolic inhibitors for application to liver surface. In addition, we examined the influence of viscous additives on the hepatic disposition of 5-FU, aiming to optimize the sheet formulation. We could manufacture the two-layer sheet formulation containing anticancer drug 5-FU for application to liver surface by employing biodegradable macromolecules and hydroxypropyl cellulose. The two-layer sheet could increase the availability of 5-FU in the specific region in the liver. Moreover, we found that the accumulation of 5-FU in the liver was improved in the tumor mice model.

研究分野：薬剤学

キーワード：コントロールドリリース DDS製剤 薬物吸収

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。肝癌の治療でも、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ドラッグデリバリーシステム (DDS) の手法では、病巣部位における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。

そこで研究代表者は、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。肝臓表面投与後の薬物動態や製剤設計の基本条件、および遺伝子治療薬への展開に関して、これまでに下記に示す知見を得てきた。

(1) 円筒状の拡散セルを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の可能性を証明した。さらに、肝臓表面からの薬物吸収が、脂溶性や分子量などの物理化学的性質に依存することを明らかにした。

(2) FITC デキストランや抗癌薬 5-Fluorouracil (5-FU) を拡散セルでラットの肝臓表面へ投与したところ、投与部位近傍に高度に集積した。

(3) 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、選択的かつ効率的な遺伝子導入が可能であることを明らかにした。

(4) 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。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を示唆した。

したがって、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、シート状の製剤を作製し、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 製剤を開発できるという着想に至った。

予備的な検討として、眼粘膜適用製剤の作製条件を参考にして、生分解性ポリマーの乳酸グリコール酸重合体と生体膜付着性を有するヒドロキシプロピルセルロースを選択して、5-FU を封入した均一な円形状のシート製剤の作製に成功している。invitro においてシート製剤からの持続的な 5-FU の放出が認められ、その放出速度を添加剤の組成比により調節可能であった。しかしながら、単層で構成されるシート製剤の場合、腹腔側への抗癌薬の放出に伴う毒性が強く懸念される。

そこで、片面 (臓器表面への装着面) からの薬物放出を可能にする二層型シート製剤の開発を計画した。

2. 研究の目的

癌治療では、抗癌薬の癌病巣以外への分布に伴う副作用が大きな障壁となっている。選択性が高い局所化学療法を目指して、抗癌薬や遺伝子治療薬を封入した肝臓表面適用二層型シート製剤を開発する。研究代表者は、肝臓表面からの薬物吸収・分布特性および肝臓表面への薬物投与に最適な製剤の基本条件を明らかにしてきた。本研究課題では、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、腹腔への薬物漏れも抑制できる二層型シート製剤を作製する。さらに最終的には、抗癌薬や遺伝子治療薬を封入した二層型シート製剤を肝臓表面の癌病巣に適用し、肝癌の治療実験を行う計画としている。肝臓などの腹腔内臓器表面からの薬物吸収を利用する製剤を、臨床応用するための基盤を確立することが大きな目的である。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下記に示すステップで遂行した。

平成 27 年度では、片面からの薬物放出を可能にする 5-FU 含有二層型シート製剤の設計をし、5-FU 含有二層型シート製剤をラット肝臓表面に貼付し、シート製剤からの 5-FU 放出性および薬物動態を評価した。

平成 28 年度では、局所化学療法を目指した担癌マウスの肝臓表面へ適用可能な抗癌薬 5-FU 含有シート製剤を作製し、シート製剤適用時の 5-FU 肝内分布を正常マウスの結果と比較した。

さらに、平成 29 年度では、マウスとラットにおいて肝臓表面投与時の薬物動態に差異があるか調べるため、マウスにおいて拡散セルを用いて肝臓表面に各種薬物を投与し、肝臓表面からの薬物吸収性と分布を評価した。

3. 研究の方法

(1) 5-FU 含有二層型シート製剤の作製および薬物動態の評価

シート製剤の基剤には、生体適合性を有する Poly (D, L-lactide-co-glycolide) (PLGA) を選択し、5-FU と Gimeracil の放出制御を目的として Hydroxypropyl cellulose (HPC) を使用した。シート中に 5-FU を 6 mg 封入し、Gimeracil とのモル比が 1:0.1 となるように設計した。拡散セルへ基剤、薬物、添加剤の混合液を滴下し、風乾させた。さらに腹腔側への薬物放出を抑制するために、薬物含有シートと非含有シートとの二層構造とした。二層型シート製剤からの薬物放出性を invitro において確認したのち、Wistar 系雄性ラットの肝臓表面へ貼付し、2、4、8、14 日後の 5-FU の肝臓・血漿中分布および血清トランスアミ

ナーゼ活性を評価した。

(2) 担癌マウスにおける薬物動態の評価

PLGA と 5-FU を acetone に溶解後風乾し、acetone を留去した。乾燥後、直径 12 mm の半円に切り取り PLGA のみのシートと重ね合わせ、5-FU 含有量の異なる 6 種類のシート製剤を作製した。5-FU 放出性評価：シート製剤を 37 °C の phosphate buffered saline (pH7.4) の水面に静置した。200 rpm で搅拌しながら経時的にサンプリングし、5-FU の放出量を紫外可視分光光度計により定量した。担癌マウスの作製：Hepa1-6 細胞(マウス肝癌由来細胞株)を C57BL/6J マウスの肝臓に接種し、1 週間飼育した。5-FU 肝内分布の評価：シート製剤を正常マウスの肝臓表面あるいは担癌マウスの腫瘍表面に貼付した。貼付 1 週間後の 5-FU の肝内濃度および血漿中濃度を HPLC-UV(266 nm)により定量した。

(3) マウスとラットにおける薬物吸収性の比較

ddY 系雄性マウスの肝臓に、適用面積 0.28 cm² のガラス製拡散セルを貼付し、マーカー物質である phenolsulfonphthalein (PSP)、bromophenol blue、bromsulphalein、5-fluorouracil、あるいは分子量の異なる FITC-dextran を拡散セル内に滴下した。一定時間後に拡散セル内残存液を回収し、下大静脈から採血後、肝臓を採取した。拡散セル内残存率、血漿中および肝臓中薬物濃度を測定した。拡散セル内残存率の経時変化より吸収速度定数 k_a を求め、見かけの透過係数 P_{app} を算出した。

4. 研究成果

(1) 5-FU 含有二層型シート製剤の作製および薬物動態の評価

5-FU と Gimeracil を含有し、高分子添加剤として HPC を用いた肝臓表面適用二層型シート製剤を作製できた。In vitro において 5-FU、Gimeracil いずれも徐放性が確認された。さらに、HPC の含有量を変化させることで薬物放出速度の異なるシート製剤の設計が可能であることが示唆された。二層型シート製剤をラット肝臓表面へ貼付後、5-FU を貼付部位選択的に高率に送達でき、シート中へ HPC を添加することで貼付部位への 5-FU 移行性が大きく向上した。この理由として、HPC を含有したシート製剤では 5-FU 放出量が多いことと、HPC 自体が肝臓表面から取り込まれて 5-FU の局所滞留性に寄与した可能性が考えられる。血漿中の 5-FU 濃度は二層型シート製剤貼付部位と比較して極めて低く、血清トランスアミナーゼ活性は無処理の群と二層型シート製剤貼付群で有意な差は認められなかった。したがって、二層型シート製剤による全身性の副作用及び肝障害は低いものと推察された。以上の結果より、肝臓表面投与法の臨床応用を目指したシート製剤の

開発について有益な知見が得られた。

(2) 担癌マウスにおける薬物動態の評価

シート製剤中の 5-FU 含有量を変化させることにより、5-FU の放出速度を調節できることが明らかとなった。5-FU のシート製剤からの放出プロファイルを速度論的に解析したところ、Higuchi 式に従い、マトリックス型製剤であることが示唆された。

正常マウスおよび担癌マウスのいずれにおいても、シート製剤適用部位に 5-FU が集積し、血漿中への 5-FU の移行も抑制できることが明らかとなった。さらに、正常マウスと比較して、担癌マウスのシート製剤適用部位における 5-FU 濃度は約 12 倍高くなった。この理由として、腫瘍での血流低下や 5-FU の代謝酵素活性低下の影響が考えられる。

以上の結果より、肝臓表面へ適用可能なシート製剤を用いて病巣部位局所的に抗癌薬を選択的に送達できる可能性が示された。

(3) マウスとラットにおける薬物吸収性の比較

マウス肝臓表面からも一次速度式に従い吸収され、良好な薬物吸収が認められた。マウスにおいても分子量の増大に伴い吸収率が低下する傾向があり、 P_{app} と分子量の平方根の逆数には良好な相関が見られた。ラットの肝臓表面からは分子量 7 万の物質が吸収されたのに対し、マウスでは 4 万程度が吸収の限界であることが明らかとなった。マウス肝臓表面からの P_{app} はラットより低くなる傾向を示し、特に分子量が小さい物質でその傾向が顕著であった。

静脈内および腹腔内投与と比較し、マウスにおいても投与部位に選択的で持続的な PSP の集積が認められた。マウスの肝臓表面投与でも、PSP の血漿中濃度に対する肝臓中濃度比が高くなり、全身への薬物暴露量が減少する可能性が示唆された。

以上の結果より、マウスを用いた肝臓表面投与において、特に低分子の薬物を適用する際は、ラットにおける吸収性との違いに留意する必要性が明らかとなり、今後の製剤設計を進める上で有益な知見が得られた。

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)

Kodama Y, Horishita M, Tokunaga A, Miyamoto H, Fumoto S, Sasaki H, Nakamura J, Nishida K, Influence of vasomodulators and tumor transplantation on the disposition of 5-fluorouracil after application to the liver surface in rats, Biopharm Drug Dispos, 査読有り, 38 巻, 2017, 367-372 DOI: 10.1002/bdd.2073

Shimokawa K, Wakasugi K, Tomonaga R, Utsunomiya K, Miyamoto H, Fumoto S, Nishida K、Effect of metabolic inhibitors on the hepatic disposition of 5-fluorouracil after application to the rat liver surface、Biol Pharm Bull、査読有り、39 巻、2016、361-367
DOI: 10.1248/bpb.b15-00757

[学会発表](計 8 件)

田中里奈子(西田孝洋)、マウスとラットの種差による肝臓表面投与時の薬物動態の差異に関する研究、第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017 年 11 月 26 日、崇城大学薬学部(熊本県・熊本市)

赤城友章(西田孝洋)、肝臓表面に貼付する抗がん薬含有二層型シート製剤からの薬物放出性に及ぼす添加剤の影響、第 34 回日本薬学会九州支部大会、2017 年 11 月 26 日、崇城大学薬学部(熊本県・熊本市)

西田孝洋、5-Fluorouracil と代謝阻害剤を含有した肝臓表面適用二層型シート製剤の動態評価、第 33 回日本 DDS 学会学術集会、2017 年 7 月 6 日、みやこめっせ(京都府・京都市)

鶴崎好美(西田孝洋)、局所化学療法を目指した肝臓表面適用シート製剤の作製と担癌マウスを用いた薬物肝内分布の評価、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 11 日、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県・鹿児島市)

宇都宮研(西田孝洋)、肝臓表面に適用する 5-FU 含有二層型シート製剤の開発に関する基礎的検討、第 32 回日本薬学会九州支部大会、2015 年 11 月 28 日、九州保健福祉大学薬学部(宮崎県・延岡市)

西田孝洋、Development of two-layer sheet formulation containing 5-FU and its pharmacokinetic consideration after application to rat liver surface、日本薬物動態学会第 30 年会、2015 年 11 月 13 日、タワーホール船堀(東京都)

西田孝洋、肝臓表面投与法の臨床応用を目指した 5-FU 含有二層型シート製剤の開発、第 31 回日本 DDS 学会学術集会、2015 年 7 月 3 日、京王プラザホテル(東京都)

下川研太(西田孝洋)、肝臓表面投与後の 5-FU の肝臓集積性に及ぼす代謝阻害剤の影響、日本薬剤学会第 30 年会、2015 年 5 月 21 日、長崎ブリックホール(長崎県・長崎市)

[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 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[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

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

下川 研太 (SHIMOKAWA, Kenta)

平田 春奈 (HIRATA, Haruna)