

実用化を企図した
リポソーム化 Oxaliplatin (l-OHP) 製剤の開発研究と
臨床応用に向けた有用性評価

2022

土井祐輔

目次

略語一覧	4
第1章 序論	7
第2章 リポソーム化 I-OHP 製剤の実用化を見据えた製剤設計に関する検討	15
第1節 緒言	15
第2節 実験方法	17
第1項 試薬・原料	17
第2項 動物	17
第3項 リポソーム化 I-OHP の調製及びその評価	17
第4項 I-OHP・リン脂質に対する安定化剤のスクリーニング評価	18
第5項 種々の保存条件における製剤の安定化評価	18
第6項 I-OHP リポソームの血中滞留性評価	19
第7項 統計	19
第3節 結果及び考察	20
第1項 リポソーム化 I-OHP の製造工程	20
第2項 リポソーム化 I-OHP における脂質安定性の重要性	21
第3項 I-OHP 封入リポソームの安定化に向けた添加剤のスクリーニング	24
第4項 安定処方におけるリポソーム化 I-OHP の長期安定性	31
第4節 小括	36
第3章 リポソーム化 I-OHP の体内動態、抗腫瘍効果及び腫瘍内分布の評価	39
第1節 緒言	39
第2節 実験方法	41
第1項 試薬及び原料	41
第2項 I-OHP 封入リポソームの調製	41
第3項 使用した動物、癌細胞	41
第4項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の体内動態評価	42
第5項 ヒト大腸癌株担癌マウスに対するリポソーム化 I-OHP の抗腫瘍効果	42
第6項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の腫瘍内分布の評価	43
第3節 結果及び考察	44
第1項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の体内動態評価	44
第2項 ヒト大腸癌株担癌マウスに対するリポソーム化 I-OHP の抗腫瘍効果	47
第3項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の腫瘍内分布の評価	50
第4節 小括	55
第4章 製剤の特性を踏まえたリポソーム化 I-OHP の安全性に関する多角的評価	59

第1節 緒言.....	59
第2節 実験方法.....	62
第1項 試薬及び原料.....	62
第2項 1-OHP 封入リポソームの調製.....	62
第3項 使用した動物.....	62
第4項 ラットにおけるリポソーム化1-OHPの反復投与毒性試験.....	62
第5項 ラットにおけるリポソーム化1-OHPの末梢神経毒性評価.....	62
第6項 ブタを用いたCARPAモデルによるリポソーム化1-OHPのIR評価.....	63
第3節 結果及び考察.....	65
第1項 ラットにおけるリポソーム化1-OHPの反復投与毒性試験.....	65
第2項 ラットにおけるリポソーム化1-OHPの末梢神経毒性評価.....	68
第3項 ブタを用いたCARPAモデルによるリポソーム化1-OHPのIR評価.....	73
第4節 小括.....	77
第5章 リポソーム化1-OHPとS-1の併用療法の開発と腫瘍内微小環境の変化.....	81
第1節 緒言.....	81
第2節 実験方法.....	84
第1項 試薬・原料.....	84
第2項 使用した動物及び癌細胞の培養, 担癌モデルの作製.....	84
第3項 リポソーム製剤の調製.....	85
第4項 S-1と1-OHPリポソームの併用療法における抗腫瘍効果.....	85
第5項 S-1投与がPEG修飾リポソームの生体内分布に及ぼす影響.....	86
第6項 S-1投与がPEG修飾リポソームの腫瘍内蓄積及び分布に及ぼす影響.....	86
第7項 免疫染色によるアポトーシス評価.....	87
第8項 腫瘍血管の灌流評価.....	87
第9項 統計学的評価.....	88
第3節 結果及び考察.....	89
第1項 S-1とリポソーム化1-OHP製剤の併用療法の有用性評価.....	89
第2項 S-1投与がPEG修飾リポソームの腫瘍集積及び分布に与える影響.....	93
第3項 S-1投与が腫瘍内微小環境に与える影響とPEG修飾リポソームの腫瘍集積性向上のメカニズムの解明.....	97
第4節 小括.....	107
第6章 総括.....	111
引用文献.....	119
論文目録.....	132
謝辞.....	133

略語一覽

ADCC:	antibody dependent cellular cytotoxicity
ALT:	alanine aminotransferase
API:	active pharmaceutical ingredient
AST:	aspartate aminotransferase
AUC:	area under the curve
BSA:	bovine serum albumin
BWC:	body weight change
CARPA:	complement activation-related pseudoallergy
CAR-T:	chimeric antigen receptor T-cell
CDC:	complement dependent cytotoxicity
CDDP:	cisplatin
CDHP:	gimeracil
CHE:	cholesteryl hexadecylether
CMC:	chemistry, manufacturing and control
CR:	complete response
CV:	central venous
DACH:	diaminocyclohexane
DLS:	dynamic light scattering
DDS:	drug delivery system
DPD:	dihydropyrimidinedehydrogenase
DSPE:	1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
EPR:	enhanced permeability and retention
FITC:	fluorescein isothiocyanate
5-FU:	5-fluorouracil
GMP:	good manufacturing practice
Hb:	hemoglobin
HR:	heart rate
HSPC:	hydrogenated soy phosphatidylcholine
ICP/MS:	inductively coupled plasma mass spectrometry
IR:	infusion-related reaction
LNP:	lipid nanoparticle
l-OHP:	Oxaliplatin
LV:	leucovorin
MES:	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid

MPS:	mononuclear phagocyte system
MTD:	maximum tolerated dose
NBCD:	non-biological complex drug
NLT:	not less than
PAP:	pulmonary artery pressure
PD:	progressive disease
PDI:	polydispersity index
PEG:	polyethylene glycol
PES:	polyether sulfone
PK:	pharmacokinetics
PR:	partial response
PUF:	plasma ultrafiltrate
QOL:	quality of life
QTPP:	quality target product profile
RBC:	red blood cell
RES:	reticuloendothelial system
RI:	radio-isotope
RTV:	relative tumor volume
SAP:	systemic artery pressure
SD:	stable disease
SR-XRF:	synchrotron radiation X-ray fluorescence
TFF:	tangential flow filtration
TGF:	transforming growth factor
TGI:	tumor growth inhibition
TNF:	tumor necrosis factor
TRIS:	Tris (hydroxymethyl) aminomethane
TSP-1:	thrombospondin-1
TUNEL:	terminal transferase dUTP nick end labeling
TV:	tumor volume
UV:	ultraviolet
VEGF:	vascular endothelial growth factor
WBC:	white blood cell

第1章 序論

癌化学療法の現状と課題

広く知られている通り、癌は日本における死因の第一位となっている。国立がん研究センターの統計 (Table 1-1) によると、癌種毎の罹患数は男性では、前立腺癌、胃癌、大腸癌の順、女性では乳癌、大腸癌、肺癌の順となっている。また、死亡数は、男性では肺癌、胃癌、大腸癌の順、女性では大腸癌、肺癌、膵臓癌の順となっている。日本人が一生のうちに癌と診断される確率は男女ともに50%を超えており、癌で死亡する確率は男性が26.7%、女性17.8%となっている。癌は、多くの疾病を乗り越えてきた人類が未だ打ち勝つことのできない疾病と言える。

Table 1-1 : 国立がん研究センターによる癌種毎の罹患数及び死亡数の統計

がん統計のまとめ		1位	2位	3位	4位	5位
罹患数	総数	大腸	胃	肺	乳房	前立腺
	男性	前立腺	胃	大腸	肺	肝臓
	女性	乳房	大腸	肺	胃	子宮
死亡数	男女計	肺	大腸	胃	膵臓	肝臓
	男性	肺	胃	大腸	膵臓	肝臓
	女性	大腸	肺	膵臓	胃	乳房

国立がん研究センター 最新がん統計 (2021.08.03) より引用及び一部改変

そのため、日々進展している医学領域の中でも、癌治療は最も盛んに研究されている分野の一つであり、とりわけ癌化学療法はその発展が顕著である。これまでに多様なコンセプトの抗癌剤が開発されており、直接的に細胞傷害性を発揮するもの、免疫学的作用に基づき抗腫瘍活性を発揮するもの、癌細胞の遺伝子異常を認識して殺細胞的に働くもの、または癌細胞の成長を担う成長因子を阻害するものなど、コンセプト・モダリティともに多様なものが存在する [1-3]。また、モノクローナル抗体が癌治療薬として有用な分子であると証明されているのは周知の事実であり、リガンドまたは受容体に結合しシグナル伝達を遮断するブロッキング抗体、ターゲット分子に結合しシグナル伝達を上昇させるアゴニスト抗体、標的分子と結合し抗体依存性細胞障害活性 (ADCC) や補体依存性細胞障害活性 (CDC) を誘導する抗体なども開発されてきた。加えて、タンパク質工学の進展により、抗体薬物複合体の台頭、bispecific 抗体や T-cell engager 等の非天然型の人工配列を用いたタンパク質も治療に用いられ、既に癌化学療法に欠かせない存在となっている [4-9]。さらには、CAR-T などに代表される細胞医療も開発され、一部の条件においては完全寛解も達成し得るとの結果が得られており、医薬品開発がもたらす選択肢の拡大は癌治療に大きく貢献している。

このように、癌治療における薬物療法は大きな発展を遂げ、そのパラダイムは大きくシフトしてきた。一方で、依然として細胞障害性の高い化学療法剤、いわゆる抗癌剤のニーズは高く、レジメンに欠かせない存在である [10, 11]。これら抗癌剤を主とするレジメンでは、副作用の問題から治療を中断せざるを得ないケースも多く、個々の薬剤が持つ毒性を如何に管理するかが課題であり、今なお検討の余地がある。これら副作用の発現には、薬物動態的な要因が影響しており、投与された抗癌剤は前述の抗体医薬やその他の標的化治療薬のように選択性を有する物ではなく、癌組織、正常組織に等しく移行する [12]。よって、腫瘍組織で抗腫瘍活性を発揮するのと同様に正常組織においても抗癌剤の殺細胞活性は発揮されてしまうため、細胞増殖が盛んな骨髄、消化管上皮等は特にその影響を受けやすく、骨髄抑制や消化管障害はほとんどの抗癌剤で共通して発現し得る毒性である。加えて、個々の抗癌剤が、それぞれの作用機序に応じて発現する特徴的な毒性も重要な因子として考慮すべきであろう。一例として本研究で取り扱う Oxaliplatin (l-OHP) の事例を以下に紹介する。

大腸癌治療における l-OHP

大腸癌は男女を問わず罹患率、死亡率ともに上位を占める癌種であり、その化学療法では、白金錯体である l-OHP がキードラッグとなっている。切除不能再発・進行直腸結腸癌におけるファーストラインである FOLFOX (l-OHP, 5-fluorouracil, leucovorin) の抗腫瘍効果は CR (Complete Response) 2.0%, PR (Partial Response) 53.1%, SD (Stable Disease) 36.7%, PD (Progressive Disease) 3.2%であり、奏効率は 55.1%, さらに SD を含めた病勢抑制率は 91.8%であり、大腸癌治療のゴールドスタンダードとして世界各国で用いられている [13, 14]。このような FOLFOX を特徴づけるキードラッグとなっているのが l-OHP である。l-OHP は第 3 世代の白金錯体型抗癌剤であり、同じ白金錯体型抗癌剤のシスプラチン (CDDP) と同様に高い抗腫瘍効果を保ちながら、CDDP の持つ顕著な腎毒性の軽減に成功した薬剤である [15-18]。さらには、血液毒性や難聴などの毒性もほぼ発現せず、CDDP 耐性を獲得した癌種においても抗腫瘍効果を示す革新的な薬剤である。一方で、l-OHP は特徴的な末梢神経毒性を惹起することが広く知られており、安全性の観点から課題となっている [19-23]。末梢組織に分布した l-OHP が神経細胞を障害し、蓄積性の神経毒性が生じるものと考えられている。この毒性が患者の quality of life (QOL) を大きく低下させるため、治療効果が得られているにも関わらず、治療を中断したり継続を断念したりするケースも散見される。このように、末梢神経毒性は l-OHP を用いた治療で最も患者の QOL を悪くさせる副作用である。l-OHP が大腸癌のみならず膵臓癌や胃癌にも使用される有用な医薬品であることを踏まえると、末梢神経毒性の軽減による治療継続性の向上は、現時点でも大きなニーズとして存在すると考えられる。現に、その軽減に向けた臨床評価は数多く実施されているが、未だ世界標準となる解決策は見出されていない [24-28]。QOL の向上に根差した医薬品開発は現在のトレンドであり、l-OHP の神経毒性改

善に向けたアプローチは、今後より一層重要性を増すと考えられる。

QOLの改善に向けたDDS開発

前述の通り、現状の医薬品開発において、QOL改善の取り組みは益々重要性が増している。現代社会はあらゆる分野においてグローバル化が進み、地球規模で物事を考える機会が増えているが、人類に共通した課題として高齢化は避けて通れない。例えば、先進国、開発途上国を問わず出生率の低下が進んでおり、特に日本を含むアジアや欧州の一部の国では高齢者人口が増加している。近い将来、人口に占める高齢者の割合は30%を超えると見込まれており、さらには100歳を超える長寿化も見込まれている [29]。こういった超高齢者社会の出現は、医薬品開発の中にも変容をもたらしており、創薬コンセプトのパラダイムシフトや剤形工夫を通じた患者に優しい製剤開発など、QOLの改善に繋がる技術革新が進んできている。経口剤の分野では、利便性や服薬コンプライアンスの管理などセルフメディケーションに適した経口剤の開発が進められており、高齢化社会が抱えるニーズに対応した技術革新であると言える。このような社会情勢に合わせた製剤技術の発展がQOLの向上に寄与したのと同様に、癌治療においてもQOLを考慮した医薬品やレジメンの開発が進められてきた。高齢者の治療においては、癌などの疾患の場合、完治よりも高いQOLの下で生活を継続することが重要となる場面があり、特にその疾患の治療が苛酷な場合は重要性が増すと考えられる。例えば、化学療法においては、他剤併用が基本となり、患者への負担が大きいことから、如何にQOLを高く維持した上で治療を継続できるかを考慮した治療薬・レジメンの開発が重要となる [30-32]。加えて、上述した社会の高齢化とリンクして労働人口の減少が課題として挙げられていることから、日本社会が活力を維持していくために意欲と能力の高い高齢者の労働力が不可欠であるとも言える。そういった観点からもQOLを意識した医薬品開発は社会的な意義が大きく、重要な因子として考慮すべきと考えられる。

このように、癌治療を考える上でQOLを加味した抗癌剤開発は重要であることから、その改善に向けたモダリティの変革が進み、多様なコンセプトの医薬品が使用可能となっている [33]。平行して、従来の低分子化合物の利便性や治療プロファイルの改善を目的としたドラッグデリバリーシステム(DDS)医薬品の開発も進化を遂げてきた[34-36]。DDSは、製剤学的な手法によって、薬物の放出制御や徐放、各種障壁の透過、ターゲティングなど様々な機能を付与することが可能であることから、臨床における治療プロファイルの知られた既存化合物の改良や新規のモダリティの送達に幅広く利用されている [37]。その中でも、リポソームはリン脂質を基材とした脂質二重膜からなる閉鎖小胞であり、生体成分であるリン脂質から構成されるため、毒性や抗原性が低く安全性が高いことが知られている [38]。また、リポソーム内部の水相に水溶性薬物、膜内に脂溶性薬物を安定的に包埋することが可能である。これらのドラッグキャリアを用いたターゲティングDDSは、内封したActive Pharmaceutical Ingredient (API)の薬物動態や薬力学を変化させ、副作用の軽減

や薬効の増強が期待されるため、患者の QOL の向上につながると期待される。DDS 技術を活用することで、抗がん剤の薬物動態の制御を通じて効果・毒性のバランスを改善できれば、QOL の向上に寄与する有用な戦略となり得る。

抗がん剤の薬物動態を制御し、高い薬効と副作用の軽減 (QOL の向上) を達成する手段の一つとして、前述のリポソームを含むナノ DDS, 特に表面を Polyethylene glycol (PEG) で修飾することで長期血中滞留性を獲得したステルスリポソームが有望な候補となり得る。腫瘍組織では、血管新生促進因子が優位になることで、内皮細胞の増殖が速くなり、構造的に異常な新生血管が形成される (Figure 1-1)。新生血管は血管として未熟であるため、内皮細胞同士の接着が疎で、血管の支持体であるペリサイトも少ない。さらに、内皮細胞の外側に存在する基底膜の厚さも血管の部位によって異なっているため、血管の透過性が亢進している。加えて、本来は血管から漏出した巨大分子の回収を担うリンパ系も十分に発達していないことから、腫瘍実質中に漏れ出したナノサイズの粒子はそのまま貯留される (Figure 1-2)。[39]以上のようにナノサイズの粒子は、上述したような腫瘍内の異常な微小環境を介して、正常組織よりも腫瘍組織に対して効率的に蓄積することから前述の効果・毒性のバランスの達成に寄与しうる。これは EPR 効果(enhanced permeability and retention effect)と呼ばれ、ステルスリポソームなどの長期血中滞留性を有するナノキャリアを腫瘍への薬物送達に用いる根幹となっている [40, 41]。これらの機序に基づく DDS として、Doxil® (liposomal doxorubicin)は日米欧含む全世界でカポジ肉腫や乳がん、卵巣がんを対象に [42, 43], Onivyde® (liposomal irinotecan も同様に日米欧で膵臓癌を対象に承認され [44, 45], 上市されている。臨床試験段階においても E7389-LF (リポソーム化エリブリン; エーザイ) [46]や FF-10832 (リポソーム化ゲムシタビン; 富士フィルム) [47]等のリポソーム化医薬品が開発されている。このように EPR 効果を利用した DDS 製剤の開発は非常に活発であり、今後もその有用性や活躍の場はさらに広がると考えられる。以上のような背景から、本研究では、EPR 効果に基づくリポソーム DDS を用いて 1-OHP の体内動態を制御し、選択的な腫瘍への送達を達成することで、抗腫瘍効果の増強と神経毒性を含む毒性を軽減したリポソーム化 1-OHP 製剤の開発を試みることにした。

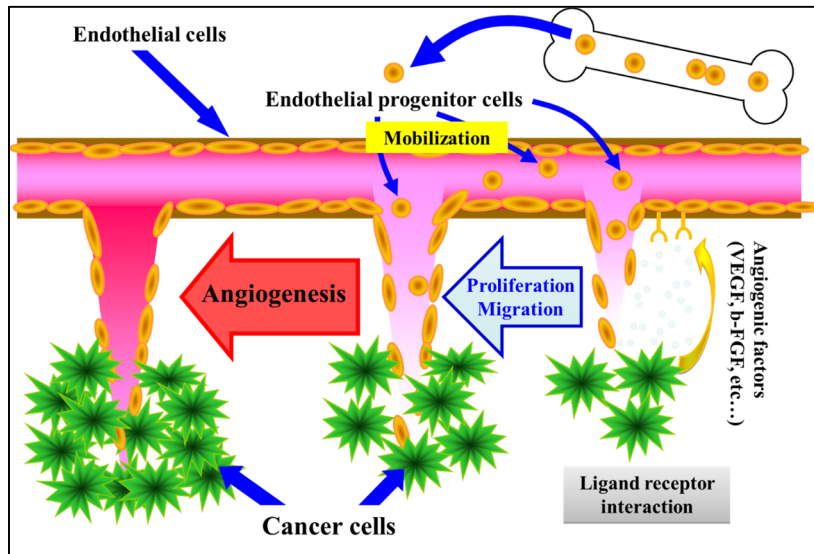


Figure 1-1: Characteristics of tumor angiogenesis and angiogenic microvasculature

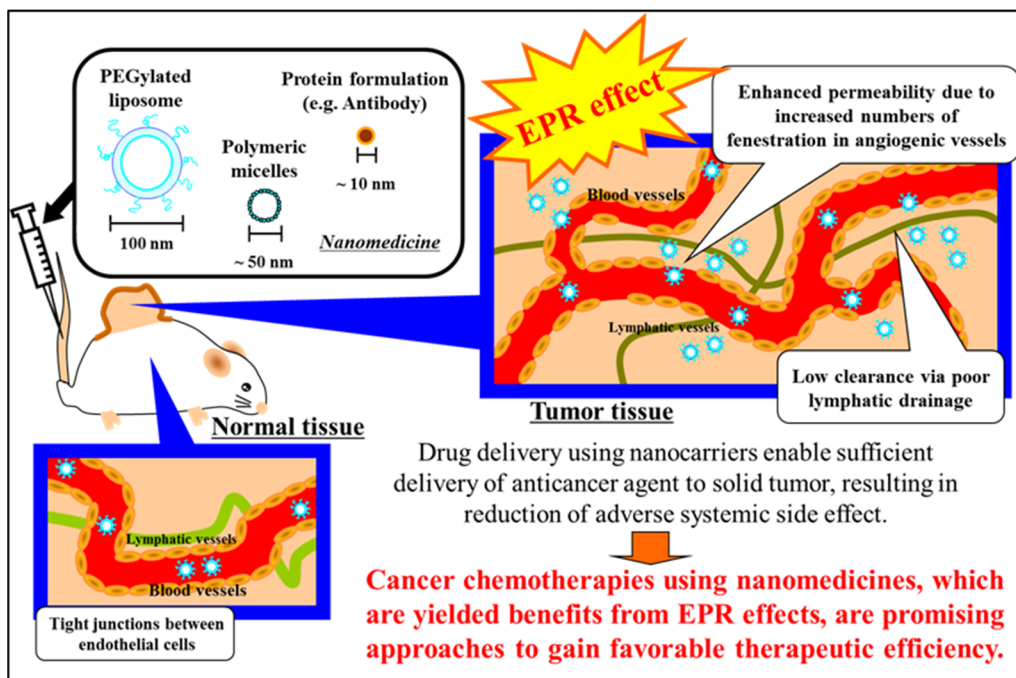


Figure 1-2: Cancer chemotherapeutics using EPR effect-based nanocarrier

実用化を企図したリポソーム化1-OHPの開発

本研究で取り組むリポソーム製剤の開発に当たっては、臨床応用、最終的には上市というところをエンドポイントとして位置付け、実用化に必要な開発上の課題を念頭において検討することとした。リポソームを用いた DDS は基礎研究で幅広く用いられており、有望なシーズであると考えられる一方で、医薬品としての実用化に向けては、いわゆる“死の谷”が存在する[48]。死の谷には巨額の開発費用であったり、シーズを実際に臨床へと移転する際の規制であったり、様々な壁が存在する。規制という側面、すなわちレギュラトリーサイエンスの観点からも、リポソーム製剤は難度の高い医薬品であり、製薬企業の研究者としてリポソーム製剤を開発する際にはこの点を加味した戦略が重要である。リポソーム製剤は、製剤の持つ物理化学的特性それ自身が機能を生み、その医薬品のコンセプトとなるため、処方・組成、品質特性、製造方法及び管理方法、脂質成分の管理、規格及び試験方法、安定性などの広範な領域で開発初期から厳格な管理が求められる。特に、使用する構成脂質が使用実績の無いものである場合、GMP に準拠した製造法や品質管理が課題となることがあるため[49]、新規組成とした場合には、安全性の検証 [50]や事業性・供給安定性への考慮も必要となる。さらには、リポソーム製剤間の同等性検証は複雑であり、血中滞留性や薬物の放出性、細胞への取り込み等、多様な因子が絡み合うため、臨床試験開始後の変更は難易度が高く、開発初期から臨床後期・上市も見据えたデザインを製剤に盛り込むことが肝要となる。このような背景から、日米欧の規制当局からも Non-Biological Complex Drugs (NBCD)の代表的な事例として、Chemistry, Manufacturing and Control (CMC) の課題が多い難易度の高い製剤であるとみなされている[51]。そのため、本研究では Doxil® や Onivyde®で採用されているステルスリポソームを鋳型として用いることとした。既に数々の製品が上市されているため、体内での挙動や安全性に対する理解が進んでいることに加え、製造方法や品質管理の手法も一定程度確立されていることから、医薬品としての実用化を目指す上で非常に多くのアドバンテージを有している。このような既存のキャリアを用いることで化合物の持つ特性を改善し、製剤のコンセプトが達成できるのであれば、臨床現場へのアクセスが容易な DDS 製剤開発手法となる[52]。このような背景に基づき、広く実績が積み重ねられているステルスリポソームに 1-OHP を封入し、その製剤のコンセプトの検証を通して、実用化に根差したリポソーム製剤の開発を目指した (Figure 1-3)。

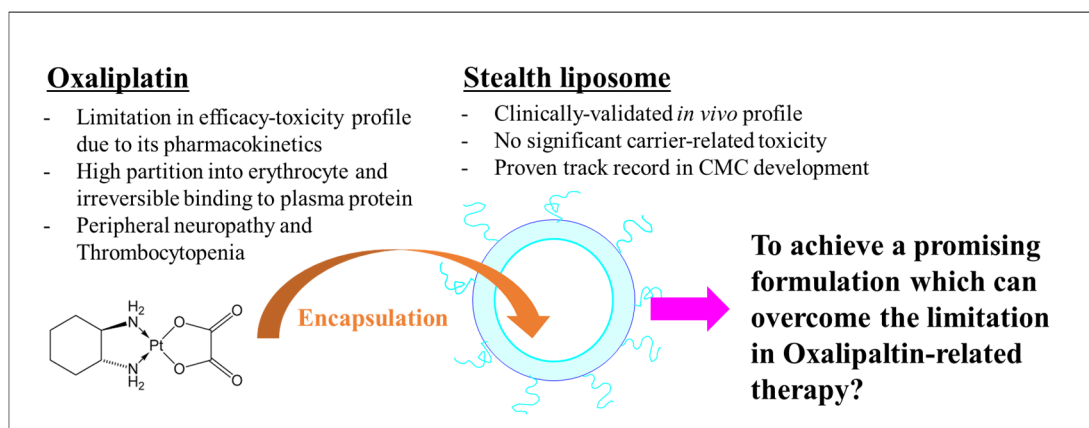


Figure 1-3: Concept to develop I-OHP DDS by means of stealth liposome

以上の背景から、本研究では、ステルスリポソームに I-OHP を封入した DDS 製剤の開発を志向し、研究を実施した。まずは、実用化に際してのみならず非臨床開発においても欠かさない製剤の長期保存安定性の確保を目指し、有効成分 (API)、脂質成分やリポソームとしての特性を踏まえた製剤化検討を実施し、臨床応用に耐える安定性が得られるよう工夫を重ねた (第 2 章)。次いで、得られた製剤について、体内動態、腫瘍移行性、抗腫瘍活性及び腫瘍内での I-OHP の挙動を評価し、当初設定したコンセプトに合致する製剤が得られているかどうかを検証した (第 3 章)。さらに、リポソーム製剤の非臨床評価として必要となる反復投与毒性試験で全般的な安全性を確認し、I-OHP 固有の毒性である神経毒性とリポソーム製剤で頻発する急性輸注反応 (infusion reaction; IR) の発現について、評価を進めた (第 4 章)。最後に、開発したリポソーム化 I-OHP を用いて、臨床現場に即した併用レジメンを前提として、その治療効果を最大化するために既存の抗癌剤を用いた相乗的な併用効果を発揮するレジメン開発を目指し、その有用性と科学的な根拠について検討を実施した (第 5 章)。最後に総括として、本研究により得られたリポソーム化 I-OHP 及び癌治療における DDS の今後の展望について議論した。

第2章 リポソーム化 I-OHP 製剤の実用化を見据えた製剤設計に関する検討

第1節 緒言

第1章でも述べた通り、I-OHP は癌化学療法に用いられる薬物であり、特に大腸癌患者に対して良好な治療成績を発揮しており、キードラッグとして広く認知されている。しかしながら、血球や血漿タンパク質への結合や非特異的な組織移行などの薬物動態学的な課題、それに伴う末梢神経毒性の発現や血小板減少等の毒性学的な課題もあることが知られている [53-55]。本研究では、DDS による体内動態制御を行うことで、I-OHP の持つ薬物動態学的な課題を克服した DDS 製剤の開発を目指した。I-OHP に対する DDS としては、高分子ミセルを応用した DACH-Pt micelle など存在するが [56, 57]、複数の化学反応を伴う製造工程を有し、厳密に言えば有効成分が I-OHP では無く、その derivative であることから、実用化に向けたハードルは高い。また、I-OHP は水溶性であり、電解質との配合など化学的相互作用に起因した安定性の低さなどから [58, 59]、内部に薬物を保持できる水相を有するリポソームは I-OHP にとって好適なキャリアとなると考えられた。本研究では、冒頭で述べた I-OHP の課題と個々のリポソームキャリアの機能を照らし合わせ、代表的なキャリアであるステルスリポソームを用いることとした。ステルスリポソームは、抗癌剤の“器”として多くの知見が蓄積されており、適切な組成・設計が概ね完成されている。このため、ステルスリポソームを用いることで目的とする製品特性が得られるのであれば、技術上及び規制上の難易度を低減させる有用な戦略となり得る [52, 60]。このような背景から、本研究ではステルスリポソームをキャリアとして選定し、I-OHP を内封した DDS 製剤（リポソーム化 I-OHP）の開発を目指した。

臨床応用や上市など実用化を見据えた製剤開発を進める場合には、対象疾患や剤形に応じた製品の特性を具体化し、その目標に向けて製剤化検討を進めることが望ましい。特にリポソーム製剤のような複雑な製剤の場合には、目標とする製品のプロファイルを予め設定しておき、それを達成できるような製剤化研究を進める必要がある。これは目標製品品質プロファイル（Quality Target Product Profile; QTPP）として広く知られており、剤形を問わず、製剤開発時の指針として活用されている[61]。設定した QTPP は将来的な製品の品質規格とも関連することが多く、QTPP の達成に向けて製剤化検討を進めることで、合理的・効率的な開発が可能となる。そこで、まず始めに、本研究で開発を進めるリポソーム化 I-OHP の概要とその QTPP を設定することにした(Figure 2-1)。リポソーム化 I-OHP は長期血中滞留性に基づいた EPR 効果による腫瘍への I-OHP デリバリーを期待するため、静脈内投与型のリポソーム製剤とした。薬物 (I-OHP) 濃度としては、I-OHP の溶解度とリポソームへの封入効率を考慮して、1 mg/mL に設定した。次いで、リポソームの物性として最も重要となる粒子径については、代表的なステルスリポソームであるドキシルと同等の粒子径をターゲットとして設定した。また、I-OHP の内封率（総 I-OHP の内、リポソーム内水相中の存在比

率) としては、外水相中 I-OHP が増えれば増えるほど遊離型 I-OHP と似た生体内挙動を示すことになるため、リポソーム製剤としての特性を発揮するために、少なくとも 95%以上は内封されたものを目標とした。最後に、保存に関する項目として、冷蔵保存で 12 ヶ月以上の保管を設定した。なお、静脈内投与製剤に必須の要件となる無菌性や不溶性異物などの項目は、実際の製造時の装置・設備・環境などに依存する因子であるため、本研究における目標からは除外した。

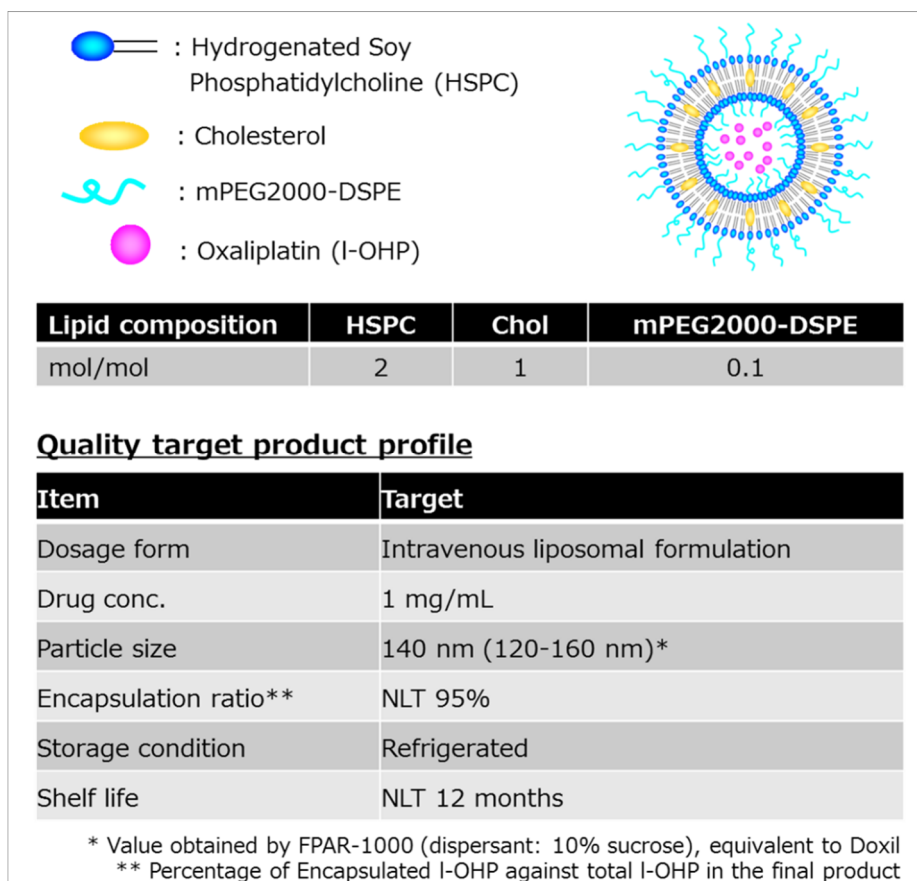


Figure 2-1: Schematic diagram of liposomal I-OHP and its quality target product profile

以上の背景に基づいて、本検討では、設定した QTPP を満たすリポソーム化 I-OHP を得ることを目的として検討した。QTPP の達成に向けて解決すべき課題として長期安定性の確保を見出し、その解決に向けて取り組んだ。長期安定性の確保には、リン脂質の安定化が重要と考えられたため、リポソーム化 I-OHP 中の脂質成分や I-OHP それ自体の安定性を踏まえた処方設計し、長期保存可能なリポソーム化 I-OHP の開発を目指した。また、この開発の過程の中で保存中のリン脂質の分解と *in vivo* におけるリポソームの血中滞留性に相関性があると示唆されたため、許容可能なリン脂質分解量を検討し、長期保存時の製剤の有効期間について議論した。

第2節 実験方法

第1項 試薬・原料

水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine; HSPC), コレステロール (Chol) 及び 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (mPEG2000-DSPE)は日油株式会社 (東京, 日本) から購入した. 1-OHP は Heraeus GmbH (Hanau, Germany) から購入した. Tris (hydroxymethyl) aminomethane (TRIS), Bis(2-hydroxyethyl)iminotris(hydroxymethyl) methane (Bis-TRIS), taurine 及び histidine は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) より購入した. 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (MES)は同仁化学株式会社 (熊本, 日本) から購入した.

その他, 実験に用いた試薬は分析グレード以上のものを用いた.

第2項 動物

実験動物は BALB/c 雄性マウス(5 週齢, 体重約 20 g)を日本 SLC (静岡, 日本) より購入して用いた. 実験動物は飲料水及び餌に自由にアクセスが可能であり, 一定温湿度, 12 時間の明暗周期を設け, 管理された環境で飼育した. すべての動物実験は, 徳島大学の動物実験の倫理に従い実施された.

第3項 リポソーム化 1-OHP の調製及びその評価

リポソーム製剤の脂質組成は HSPC/Chol/mPEG2000-DSPE (2/1/0.1, mol/mol)とし, エタノール注入法にて調製した [62]. 簡潔に調製方法を示す. 最終の製剤量に対して 10v/v%量のエタノールに必要量の脂質を溶解した脂質溶液と 10% sucrose 溶液に溶解した 8 mg/mL の 1-OHP 水溶液を調製した. この脂質溶液と 1-OHP 溶液を 65°C に加温し, 1-OHP 溶液中に脂質溶液を 3~4 回に分けて段階的に添加し, 乳化させた. ここで得られた粗リポソームはエクストルージョンによって粒子径調整に供し, 400 nm, 200 nm, 100 nm のポリカーボネートフィルター (Nuclepore, CA, USA) を通過させた. 目標粒子径は, 10% sucrose を分散媒とした際に, 140 nm (target range: 120–160 nm, polydispersity index: ~0.1)となるまでエクストルージョンを継続した. 粒度分布測定には FPAR-1000 粒径アナライザー (大塚電子株式会社, 日本). 未封入の 1-OHP は 300 kDa のポアサイズを有する polyether sulfone (PES)フィルター (Sartorius GmbH, Germany) を用いた限外ろ過で, 10% sucrose と置換することにより除去した. 安定化検討におけるそれぞれの安定化剤は, 限外ろ過後の製剤に高濃度の添加剤溶液として最終濃度が 3 mM となるように後添し, 添加した安定化剤はリポソームの外水相に局在するように設計した. その後, pH 調整剤を使用して pH 6.5 に調整した.

調製したリポソーム製剤は, 1-OHP 及び HSPC の含量を UPLC (Waters Acquity system) に YMC-Pack PVA-SIL-NP column (5 µm 4.6×150 mm, YMC)を接続した HPLC 法により測定した. 移動相としては 70% MeOH, 30% 2-propanol の混液を用いて, 測定試料はこの移動相を用いて任意の倍率で希釈した試料を用いた. 1-OHP は UV 210 nm で検出し, 脂質は荷電化

粒子検出器 (Corona Ultra, Dionex) を用いてそれぞれ測定した。この HPLC 測定では、リン脂質の定量による脂質分解の挙動と同時に、分解産物 (すなわちリゾリン脂質) の増加傾向を評価することができる。

第 4 項 1-OHP・リン脂質に対する安定化剤のスクリーニング評価

安定化剤は、1-OHP 及びリポソーム膜の主要構成成分である HSPC との配合適性 (安定性における相性) からスクリーニングした。1-OHP の試料としてはその水溶液を、HSPC の試料としては空リポソーム (1-OHP 非含有) をそれぞれ用いた。HSPC はリン脂質であり、別々の系で各種添加剤との配合適性を評価した。使用した安定化剤は主に緩衝剤であり、注射剤、もしくはリポソームで広く使用[63-65]されているものを選定してスクリーニングに用いた。

1-OHP の評価では、1 mg/mL の 1-OHP 水溶液を母液として用いた。この母液に対して、各安定化剤 (クエン酸、酒石酸、ヒスチジン、タウリン、Tris, Bis-Tris, MES 及び HEPES) の濃度として 3 mM (水酸化ナトリウム、もしくは硫酸を用いて pH 6.0~6.5 に調整) の水溶液を加えて、1-OHP 濃度として 0.05 mg/mL になるように希釈した。1-OHP は熱などの物理的なストレスに対してきわめて安定であるため、安定化剤間の相対的な安定性評価を容易にするため、通常の苛酷安定性試験の条件 (温度) よりも高い 60°C で 10 日間保管した。1-OHP の保存前後の濃度を HPLC で測定し、比較した。

HSPC の評価で用いる空リポソームは、前項の調製法に準じて調製しており、10% sucrose 中に HSPC 濃度として 20 mM となるように調製した。これを母液として用いて、先に示した 1-OHP の評価と同様に 3 mM (pH 6.0~6.5) の各安定化剤溶液を用いて 20 倍希釈して測定検体とした。こちらは苛酷安定性試験で一般的に用いられる 40°C で 10 日間にて保管した。

第 5 項 種々の保存条件における製剤の安定化評価

第 3 節 第 2 項で述べた安定化剤を含まない製剤の安定性試験は、加速条件 (25°C) で製剤を 3 ヶ月保管し、実施した。外観、粒子径、pH 及び HSPC 含量を測定し、保存前後のこれら理化学的項目を評価した。

第 3 節 第 3 項以降で述べた候補安定化剤を用いた製剤の安定性評価は、苛酷条件 (40°C) 及び長期保存条件 (4°C) 下において実施した。それぞれの安定化剤は高濃度水溶液として調製し、最終濃度が 3 mM となるように第 3 項の リポソーム化 1-OHP に添加し、pH を 6.0~6.5 となるように調整した。調製したサンプルは 40°C、もしくは 4°C (2-8°C) で保管した。粒子径、総 1-OHP 量 (1-OHP 含量)、HSPC 含量、外水相 1-OHP 濃度及び pH を、40°C では 2 週間後及び 4 週間後、4°C では 6 ヶ月後及び 12 ヶ月後にそれぞれ測定した。保存前後の理化学的項目を比較して安定性を評価した。

第 6 項 1-OHP リポソームの血中滞留性評価

1-OHP リポソームは、10% sucrose を媒体とし、1-OHP 濃度として 7 mg/kg となるようにマウス尾静脈から投与した。投与したマウスからの採血スケジュールは、第 3 節 第 2 項の実験では投与から 6, 24, 72 時間後、第 3 節 第 3 項の実験では投与から 1, 8, 24, 48 時間後とし、抗凝固剤（ヘパリン）の存在下で採血した。得られた全血サンプルは 4°C で 15 分、3000 rpm で遠心処理し、血漿を得た。得られた血漿サンプルは、サンプル中のリポソームを破壊し、血漿中の Pt（1-OHP の代替マーカーとして測定）を定量するために 1% triton-X/1 N HCl で 5 倍希釈した。Pt 定量には原子吸光光度計 Z-5700（日立製作所、東京、日本）を使用した。血漿サンプル中の Pt 定量結果については、遊離型の 1-OHP は静脈内投与後速やかに血中循環から消失するため [66]、血漿中の Pt 濃度はリポソーム内に内封された 1-OHP 量に換算することが可能である。また、得られた血漿中濃度推移のデータから、多指数曲線フィッティングと最小二乗パラメータ推定プログラム SAAM II (SAAM Institute, Seattle, WA, USA) を用いて、薬物動態パラメータを算出した。

第 7 項 統計

全ての測定結果は平均値と標準偏差、もしくは代表値として表した。統計学的解析は GraphPad InStat (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) により、両側 unpaired t 検定を実施した。有意水準は P 値を 0.05 未満に設定した。

第3節 結果及び考察

第1項 リポソーム化 I-OHP の製造工程

第2章 第3項の製造方法に従い、リポソーム化 I-OHP を製造した。Figure 2-2 にその製造工程を示した。リポソーム化 I-OHP は、65°C に加温し I-OHP を溶解した 10% sucrose 溶液中に、同じく 65°C に加温した脂質の EtOH 溶液を添加する EtOH 注入法にて、調製した。水相中で均一な脂質の分散状態を得るために、TK ホモミキサー Mark II (特殊機化, 日本) を用いて乳化した。65°C の加温を継続しながら耐圧ピストンポンプを用いて、0.4 μm 、0.2 μm 及び 0.1 μm の孔径を有するポリカーボネートフィルターを設置したフィルターホルダーを通過させた。粒子径を測定しながら通過回数をコントロールすることで、120-160 nm に調整した。この段階では、リポソームの外水相にも I-OHP が存在するため、外水相中の I-OHP 及び EtOH を除去するため、限外ろ過カートリッジを用いた Tangential flow filtration (TFF) によって、I-OHP を含まない 10% sucrose 溶液と溶媒交換した。得られたリポソーム製剤は、I-OHP 濃度として 1 mg/mL となるように濃度調整し、除粒子フィルターでろ過した後、0.2 μm の無菌ろ過フィルターでろ過滅菌し、リポソーム化 I-OHP 製剤を得た。得られた製剤の drug/lipid ratio から計算した I-OHP の封入効率 (収率) は、15~20%程度であると考えられた。封入効率は高いと言えないものの、本製造プロセスでは 0.5~2 L のバッチサイズで複数ロット製造しており、重大なトラブルなくリポソーム化 I-OHP を製造可能であった。このことから、再現性の高い堅牢なプロセスであることを確認することができた。

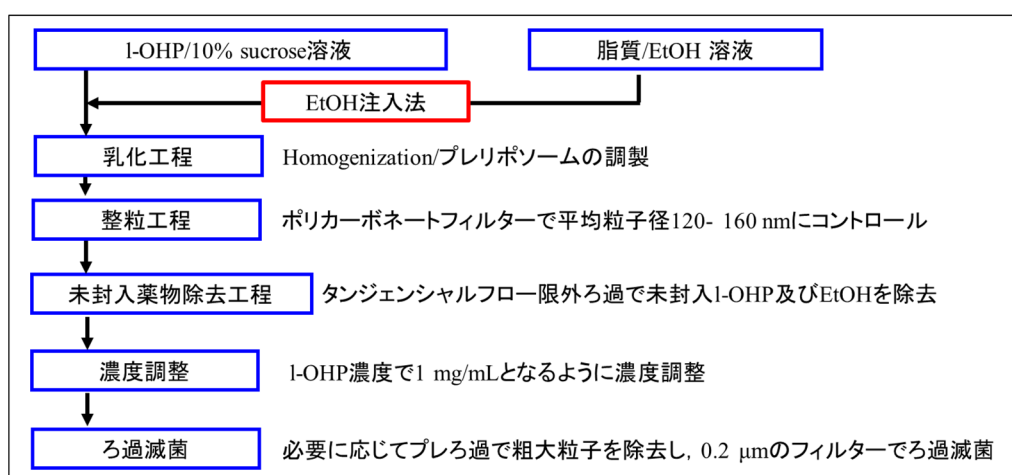


Figure 2-2: Manufacturing flow of liposomal I-OHP in pilot scale (0.5-2 L)

次いで、得られた製剤の分析結果を Table 2-1 に示した。平均粒子径や I-OHP 濃度は、予め設定し Fig. 2-1 に示した目標値を達成できた。また、参考値として HSPC の濃度を測定し、得られた製剤の drug/lipid ratio を計算した。最後に、外水相中の I-OHP 濃度を測定したところ、4.2 $\mu\text{g/mL}$ であり、I-OHP の内封率は 99.6% (リポソーム外の I-OHP は 0.4%) であった。本製造フローの未封入薬物除去工程では、製剤容量に対して 10 倍容量の溶媒置換を実施し

ているが、この条件によって、十分な未封入薬物除去が達成できると考えられた。以上の結果から、リポソーム化 I-OHP の製造工程として設定したフローによって、任意の製造スケールにおいて、長期安定性以外の QTPP を満たす製剤が安定して製造可能であることが示された。

Table 2-1 Analytical results of liposomal I-OHP manufactured at 0.5-2 L scale

Test item	Target	Results
Particle size (nm, Mean \pm S.D.)	140 nm (120-160 nm)	143.7 \pm 34.3 nm
I-OHP conc. (mg/mL)	0.9-1.1 mg/mL	1.03 mg/mL
HSPC conc. (mg/mL)	Report result	37.6 mg/mL
Drug/Lipid ratio	Report result	27.4
External I-OHP conc. (μ g/mL)	Report result	4.2 μ g/mL
Encapsulation ratio (%)	More than 95%	99.6%

第 2 項 リポソーム化 I-OHP における脂質安定性の重要性

第 1 項で用いた製造プロセスにより、あらかじめ設定した目標値を満たすリポソーム化 I-OHP が問題無く製造可能であった。一方で、本製剤の実用化を目指す上では、QTPP として挙げた長期安定性に関する評価が必須となる。そこで、長期保存後の物性評価を想定し、製造後一定期間が経過したサンプルにおいて製剤の外観、pH、リン脂質 (HSPC) 含量を測定した。

まず、保存前後のリポソーム化 I-OHP の外観を確認した (Figure 2-3)。A が調製直後 (fresh)、B が 25°C で約 1 ヶ月保管したサンプル、C が 25°C で約 3 ヶ月保管したサンプルである。画像から明らかのように、サンプル C では、明らかにサンプルが白濁しており、他サンプルと比較して濁りが増していることがわかった。一方で、サンプル A と B はほぼ同等の外観であり、リポソーム製剤で一般的な青みがかった乳白光を呈する液体であった。このように A 及び B と比較して C では全く異なる外観を示したが、興味深いことに、平均粒子径は A が 133.2nm、C が 129.1nm であり、PDI は両者とも 0.01 であったことから、平均粒子径が同等であるのみならず、粗大粒子等も含まない単分散の製剤を維持していると考えられた。また、これらの製剤で pH と HSPC 含有量を測定した (Table 2-2)。その結果、pH 及び HSPC 含量はともに保存時間が長くなるにつれて低下及び減少した。また、定量対象ではないもののクロマトグラム中にリゾリン脂質のピークが検出されたことから、HSPC 含量の低下は、保存による HSPC の加水分解の可能性が高いと考えられた。

サンプル B と C は、両者ともに HSPC の分解が示唆されたが、白濁の程度が異なった。これは、HSPC の分解副産物である遊離脂肪酸やリゾリン脂質が有する界面活性作用によって説明可能であると考えている。これら分解産物がミセルを形成する量に達するとそれらのミセルに水和水を奪われ、リポソーム自身のコロイドとしての安定性が低下し、一過性

及び可逆的な凝集物が生じたことで白濁を呈すると考えられた (サンプル C)。しかしながら、粒子径測定時などの希釈操作を経ることで、通常の分散状態に戻った結果、DLS での粒子径変化は認められないと考えられた。

以上の結果から、I-OHP 封入リポソームを長期保存した場合、リン脂質の分解が課題になると考えられた。水溶液中の脂質二重膜は主要な構成成分であるリン脂質の加水分解を受けやすく、また、その加水分解産物である脂肪酸 (カルボン酸) は系中の pH 低下をもたらすため、pH が酸性にシフトすることで加水分解の加速が想定される [67]。加えて、I-OHP の不純物 (分解物) として微量に産生され得るシュウ酸も pH の低下に寄与する。このため、緩衝作用を有しない水溶液中でリポソームを保管することは、リン脂質の分解において負のサイクルを生みやすいと考えられた (Figure 2-4)。

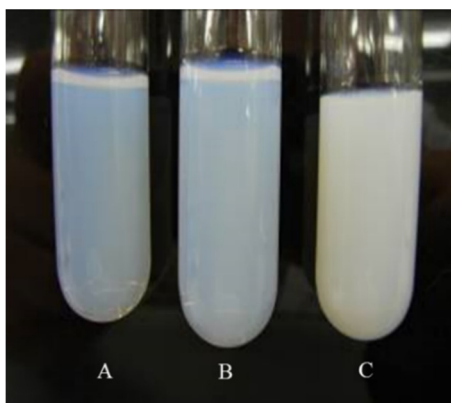


Figure 2-3: Appearance of PEGylated liposomal I-OHP

Appearances of PEGylated liposomal I-OHP before or after storage under accelerated degradation conditions (25°C) were compared. Sample B and sample C were stored for approx. 1 month and approx. 3 months, respectively. Sample A was a newly prepared fresh formulation.

Table 2-2: Physicochemical analysis (pH and HSPC content) in various samples of PEGylated liposomal I-OHP

Sample	A	B	C
pH	5.9	4.9	3.2
HSPC content (%)	106.8	92.4	69.3

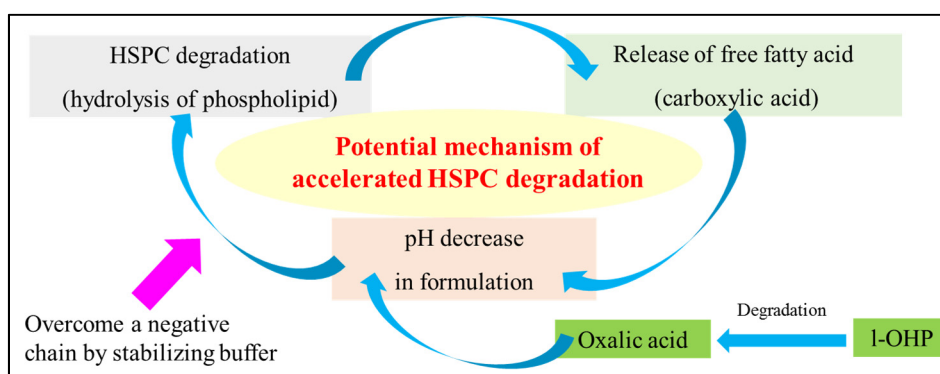


Figure 2-4: Potential mechanism of accelerated HSPC degradation in liposomal I-OHP

先の検討において、リポソーム化 I-OHP の長期保存においては、リン脂質である HSPC が分解すると示唆された。このため、HSPC の安定化がリポソーム製剤の安定化を図る上で重要と考えられた。極端な議論をすれば、HSPC は添加剤であるため、製剤のコンセプト（体内動態の制御）に影響しなければ、その分解を考慮する必要はない。そこで、HSPC の分解が製剤特性に与える影響を評価するために、先のサンプル A 及び C をマウスに投与し、内封薬物である I-OHP (Pt) の血漿中濃度推移を測定し、血中滞留性を評価した (Figure 2-5)。Figure 2-5 から明らかな通り、サンプル A とサンプル C の 6 時間後の血漿中濃度を比較すると、サンプル C では約 75% 低下しており、fresh なサンプル A に対して保存後のサンプル C では明らかな血中滞留性の低下が認められた。さらに、サンプル A は循環半減期が約 20 時間であった一方で、サンプル C では約 11 時間であり、血中からの消失速度の増加が確認された。以上より、リン脂質の分解は静脈内投与後のリポソームに内封された I-OHP の血中滞留性の低下をもたらした。このような製剤の劣化に伴う *in vivo* 特性の変化は、固形腫瘍への薬物送達の減少にリンクすることから、製剤の治療効果を損なう可能性がある [68]。よって、リポソーム化 I-OHP の実用化に向けては、長期保存中の製剤の安定性を向上させる必要があると考えた。

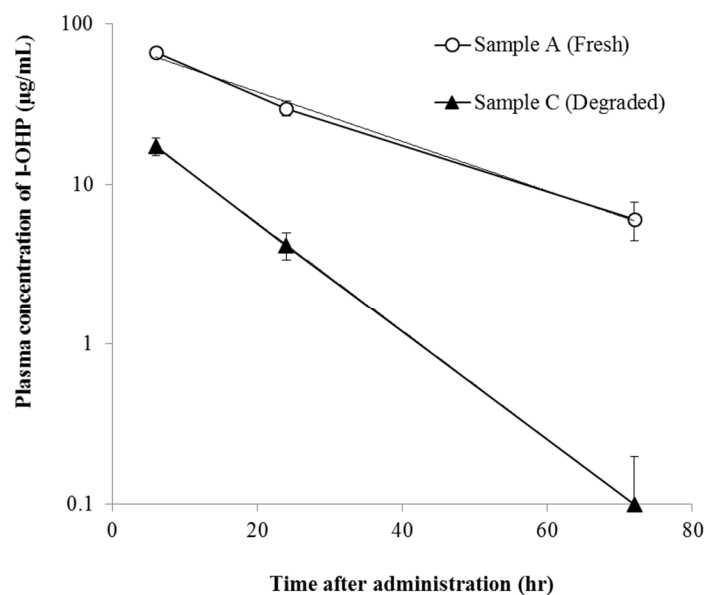


Figure 2-5: Influence of storage on pharmacokinetic profiles of PEGylated liposomal I-OHP

The pharmacokinetics of Sample C (stored at 25°C for a 3 months) and Sample A (freshly prepared) were determined after intravenous injection into mice. All values were expressed as mean \pm SD (n=5).

第3項 I-OHP 封入リポソームの安定化に向けた添加剤のスクリーニング

リポソーム化 I-OHP の長期安定性を確保するためにはリン脂質である HSPC の安定化が必要と考えられた。前項で考察したように、HSPC の分解には製剤 pH の低下に伴う加水分解の関与が示唆されている。また、HSPC の加水分解が生じた場合、体内動態の変化のみならず、その産物としてのリゾリン脂質が細胞毒性を示すこと[69]が示唆されており、分解の抑制はいずれにせよ重要となる。一方で、HSPC の安定化を目的として pH 緩衝作用を得るために種々の塩を添加すると I-OHP が容易に分解することが知られている[70]。すなわち、HSPC の安定化を目指して緩衝剤で pH をコントロールすると I-OHP の分解が懸念されるため、リポソーム化 I-OHP の安定性向上は、これらの因子を十分に考慮して検討する必要がある。以上の背景から、本項では、I-OHP 封入リポソームの安定化に適した添加剤を選定することを目的に検討を実施した。I-OHP は水溶液として、一方で、HSPC は水溶液として調製することが困難であるため、水中に分散させて空リポソームとして調製し、各種添加剤と共存させた際の安定性について評価した。

始めに、I-OHP の結果について示す (Table 2-3)。Control として用いた Sucrose 溶液中で保管した I-OHP は、60°C で 10 日間という苛酷な条件で保存したにも関わらず残存率が 85% 以上であり、非常に安定であった。よって、その他の添加剤ではこの control に近い残存率

が得られたものが I-OHP との配合性が高い添加剤であると言える。同様の条件において、MES 緩衝液 (pH6.5) とタウリン溶液 (pH6.5) 中で保管した I-OHP も残存率 75%以上であり、比較的安定であった。一方で、pH6.5 のヒスチジン、TRIS、bis-TRIS および HEPES 水溶液中の I-OHP は、残存率の低下が著しく、分解が進行しやすいと考えられた。その中でも、Doxil®など既存のリポソーム製剤の安定化剤として添加されていることが知られているヒスチジンとクエン酸では、I-OHP のほぼ全量が分解していた。I-OHP は、電解質の存在下で分解が加速することが知られており、臨床の投与現場でも生理食塩液との混合が禁忌となっている。今回得られた結果も電解質との配合が好ましくないことを支持する結果であると考えられた。以上の結果から、I-OHP の安定性は添加剤種の影響を大きく受けるため、慎重に選択する必要がある。sucrose、次いで MES もしくは taurine の適性が高いと考えられた。また、いずれの添加剤も I-OHP との配合性が高いとは言えないため、I-OHP との接触は最小限に、HSPC との接触は最大限にすることを狙い、リポソーム外水相のみに添加することが望ましいと考えられた。

次いで、HSPC との配合適性評価を目的とし、各種添加剤溶液で空リポソームの母液を 20 倍希釈することで、外水相のみを各種添加剤溶液とした空リポソームの安定性を評価した (Table 2-4)。40°C で 10 日間の保存によって、sucrose 溶液中のプラセボリポソームでは、HSPC の残存率が 50%以下となっており、顕著な分解が生じていると示唆された。また、同等以上の分解が taurine 溶液でも確認され、これら二つの添加剤では、HSPC の保護は達成できないと考えられた。これらは他の添加剤と比較すると緩衝作用は無い、もしくは弱く、HSPC の保護には緩衝能が重要であると考えられた [71, 72]。一方、クエン酸やヒスチジンはリポソームの安定化剤として多く採用されていることを示唆するように、HSPC に対して高い安定化効果を発揮し、残存率は 90%以上であった。酒石酸、bis-TRIS、TRIS、MES および HEPES は、残存率が 75%以上となっており、クエン酸やヒスチジンには劣るものの HSPC の劣化を防止する効果を示した。以上のことから、今回用いた添加剤においては、程度に差はあったものの、sucrose と taurine 以外は HSPC に対する安定作用を有する事が示された。

Table 2-3: Effect of excipient on I-OHP concentrations in PEGylated liposomal I-OHP during storage.

Sample	Storage condition	Stabilizing agent	Initial	After storage	% of initial after storage
I-OHP ($\mu\text{g/mL}$)	10 days at 60°C	Sucrose (Control)	50.6 \pm 3.1	43.1 \pm 2.6	85.2
		Citric acid	50.5 \pm 4.0	0.8 \pm 0.6	1.6
		Tartaric acid	50.4 \pm 2.5	15.4 \pm 1.4	30.6
		Histidine	46.0 \pm 2.3	ND*	-
		Taurine	50.6 \pm 3.0	38.4 \pm 4.0	75.9
		Tris	50.7 \pm 3.2	29.4 \pm 3.5	58.0
		Bis-TRIS	50.8 \pm 2.2	32.8 \pm 3.8	64.6
		MES	50.6 \pm 2.6	40.2 \pm 4.2	79.4
		HEPES	50.6 \pm 3.4	25.8 \pm 3.3	51.0

* ND represents no I-OHP peak was obtained

The samples were stored in the presence of each excipient at 60°C for 10 days. The content of I-OHP was determined.

Table 2-4: Effect of excipient on stabilizing HSPC in PEGylated liposomal I-OHP during storage.

Sample	Storage condition	Stabilizing agent	Initial	After storage	% of the content after storage
HSPC (mg/mL)	10 days at 40°C	Sucrose (Control)	0.68 \pm 0.07	0.33 \pm 0.04	48.5
		Citric acid	0.71 \pm 0.04	0.69 \pm 0.04	97.2
		Tartaric acid	0.84 \pm 0.04	0.67 \pm 0.03	79.8
		Histidine	0.72 \pm 0.04	0.68 \pm 0.05	94.4
		Taurine	0.66 \pm 0.05	0.27 \pm 0.04	40.9
		Tris	0.72 \pm 0.02	0.62 \pm 0.05	86.1
		Bis-Tris	0.75 \pm 0.06	0.66 \pm 0.04	88.0
		MES	0.74 \pm 0.06	0.62 \pm 0.02	83.8
		HEPES	0.73 \pm 0.04	0.57 \pm 0.06	78.1

The samples were stored in the presence of each excipient at 40°C for 10 days. The content of HSPC was determined.

さらに、今回の結果のまとめとして、保存前後の l-OHP および HSPC の残存率を Figure 2-6 に示した。Sucrose 及び taurine を除くすべての添加剤は HSPC の安定化に寄与したが、一方で l-OHP の安定性には明らかな負の影響を示した。MES のみが HSPC に対する保護作用を示しながら、l-OHP に対しても相対的に良好な配合適性を示した添加剤であった。本剤を医薬品として考えた場合、Active pharmaceutical ingredient (API)である l-OHP の分解は最もケアすべき品質項目であり、その分解は極力ゼロに近づけることが望ましい。一方で、HSPC はあくまでもキャリアの構成成分であるため、そのキャリアの機能に影響を与えない程度の分解は許容可能である。よって、l-OHP への影響が最も少ない MES を安定化剤として用い、その上で生じる HSPC の分解量を測定し、それが許容可能な水準であるかどうかを見極めていくこととした。

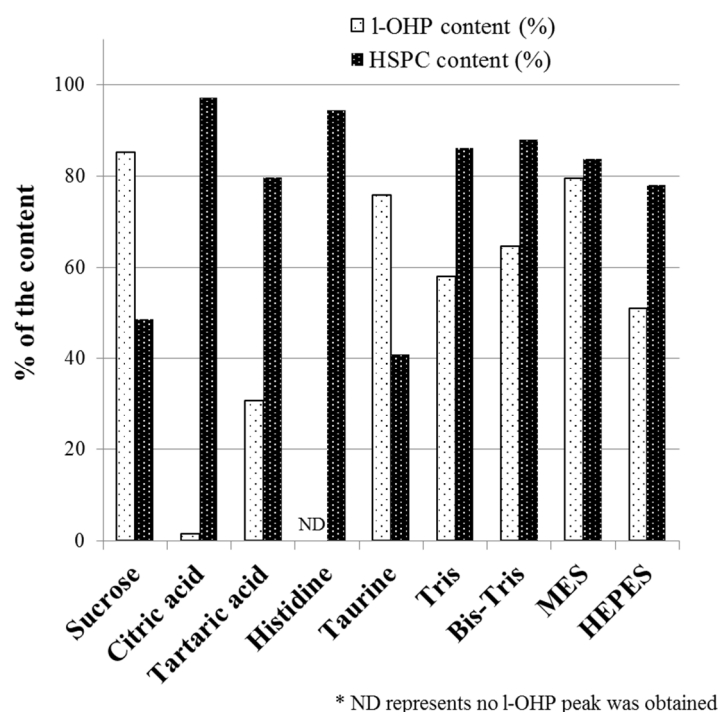


Figure 2-6, Comparison of each excipient with respect to degradation of l-OHP and HSPC during storage.

The data of “% of the content” were calculated by division of mean value after storage by the value before storage from Table 2-3 and Table 2-4. The values represent percentage of l-OHP and HSPC on pre- and post-storage.

先の検討において、最も適した添加剤は MES である事が示されたため、本検討では実際のリポソーム化 I-OHP の外水相に対して MES を添加し、その安定化効果を検証した。比較対象として、TRIS、タウリン、ヒスチジンを対照群に設定し、評価した。

本検討では、リポソームの外水相にこれら安定化剤を添加し、I-OHP とこれら安定化剤が接触しないような設計とし、40°C で 4 週間保存し安定性を評価した (Table 2-5)。いずれの製剤においてもリポソームの粒子径は添加剤の有無・種類に関わらず、有意な変化を示さなかった。I-OHP 含量については、いずれの群においても経時的な減少が認められた。TRIS、タウリン及び MES の添加群においては、control である no stabilizer の群と同程度の減少率であり、それら安定化剤の添加による明確な減少は認められなかった。一方で、ヒスチジンについては明らかな I-OHP 濃度の低下が確認された。先の検討でもヒスチジンは I-OHP の分解を加速させたが、今回の検討でもそれが再現された。リポソーム膜を介して内側 (I-OHP) と外側 (ヒスチジン) にそれぞれ存在するはずであるにもかかわらず分解が進行したことから、Fick の法則に従って I-OHP がリポソーム外に、ヒスチジンがリポソーム内に分配されることで、I-OHP とヒスチジンが接触し、I-OHP の分解が生じた可能性がある。

HSPC 含量においても、いずれの群においても経時的な含量低下が認められた。特に安定化剤を含まない no stabilizer の群においては、40°C 4 週間の保存で大きく HSPC 濃度が低下しており、約半量が分解することが確認できた。各安定化剤を添加した群においては、no stabilizer よりも HSPC が安定化されており、MES > ヒスチジン > Taurine > TRIS の順で HSPC の含量低下が少なく、これら安定化剤がリポソーム中のリン脂質の保護に寄与していた。興味深いことに、先の空リポソームを用いた検討では、非常に高い HSPC 安定化効果を示していたヒスチジンは、実製剤に添加すると MES よりも安定化効果は低かった。また、空リポソームでは安定化効果がほぼ認められなかった Taurine も、実製剤中に添加すると一定の脂質保護作用を有すると示唆された。よって、これら安定化剤のスクリーニングでは実製剤に添加した際の挙動を確認することが重要であると考えられた。

さらに、リポソームからの I-OHP 漏出を評価するために外水相中の I-OHP 濃度を評価した。No stabilizer, TRIS 及び Taurine 群では顕著な外水相 I-OHP 濃度の増加が認められた一方で、ヒスチジン、MES では濃度増加は認められなかった。No stabilizer の群で認められた濃度増加は脂質分解に伴う内封物質 (I-OHP) の放出であると考えられ、Taurine では脂質分解が若干抑制された結果、外水相濃度が no stabilizer よりも低いと考えられた。一方、TRIS においては脂質分解量が多いにも関わらず Taurine 群よりも外水相濃度が低いことが、これは TRIS と I-OHP の配合適性が高くないため、外水相に漏出してきた I-OHP が分解したためであると考えられた。TRIS では上述の I-OHP 含量が低下していることも、この考察を支持する結果であると考えられた。Taurine 群では外水相 I-OHP は増加しなかったが、Taurine は I-OHP との相性が非常に悪く、仮にリポソーム外に I-OHP が漏出してもすぐさま分解するため検出できないと考えられた。

最後に製剤 pH の経時変化を確認した。No stabilizer 群では経時的な pH 低下を示し、

Histidine, Taurine および TRIS は、緩やかな pH 低下を示した。一方、MES を含む製剤では pH の低下は確認されなかった。pH の低下は 1-OHP や HSPC の分解とリンクしている傾向にあり、pH の低下はこれらの項目において、分解が生じている事を示す一つの指標になると考えられた。

以上の結果から、実際のリポソーム化 1-OHP に添加した際に安定化剤として最も効果的に作用するのは MES であると考えられた。一方で、本検討は、40°C という苛酷な条件で評価した結果であるため、実保存環境を反映した安定性試験を次項で実施した。

Table 2-5: Comparison of physicochemical stability of PEGylated liposomal l-OHP for various excipients with storage time.

	No stabilizer			3 mM Tris			3 mM Taurine			3 mM Histidine			3 mM MES		
	Initial	2 weeks	4 weeks	Initial	2 weeks	4 weeks	Initial	2 weeks	4 weeks	Initial	2 weeks	4 weeks	Initial	2 weeks	4 weeks
Particle size (nm, Mean \pm S.D.)	151.1 \pm 44.9	157.5 \pm 34.6	162.9 \pm 37.3	144.6 \pm 48.9	151.9 \pm 35.1	162.0 \pm 43.2	142.4 \pm 55.8	141.1 \pm 44.2	149.3 \pm 45.1	152.8 \pm 45.3	149.0 \pm 29.5	159.1 \pm 36.7	147.1 \pm 47.1	144.9 \pm 42.6	153.3 \pm 47.6
l-OHP conc. (mg/mL)	0.96	0.93	0.92	0.92	0.86	0.82	0.95	0.93	0.90	0.94	0.82	0.69	0.92	0.90	0.88
HSPC conc. (mg/mL)	30.7	21.8	14.7	30.1	24.9	17.6	30.3	26.6	21.0	31.3	28.1	26.4	28.9	27.1	25.0
External l-OHP conc. (μ g/mL)	1.9	111.0	343.8	1.7	42.0	207.6	1.8	16.8	123.6	1.6	2.0	14.7	2.1	2.6	6.1
pH	5.3	4.3	3.9	6.2	4.4	3.9	6.3	5.1	4.6	6.5	5.7	5.4	6.3	6.2	6.1

The samples were stored in the presence of each excipient at 40°C up to 4 weeks.

第4項 安定処方におけるリポソーム化 I-OHP の長期安定性

ここまでの検討において、リポソーム化 I-OHP の安定化剤として、MES が最適であることが確認できた。一方で、臨床開発や上市に至る実用化を考慮した際には、長期安定性について多くの注意を払う必要がある[73]。製造から検査、試験、出荷判定までに 2~3 ヶ月、グローバルな供給網の場合には、さらに輸出入に 2 ヶ月程度、各国の distributor による医療機関への delivery に 1~2 ヶ月程度要することもあり、製造から使用開始までの流通過程で 6 ヶ月程度経過していることも珍しくない。また、恒常的な生産を考慮すると予期せぬトラブルシューティングなども想定される。1 ロット当たりの生産数量がどれだけの期間で消費されるかは、対象疾患・治療ライン・治療レジメンから予測される使用量に大きく左右されるが、少なくとも 12 ヶ月の長期安定性が担保されなければ、広く使用される製品として供給することは困難である。よって、本項では MES 含有製剤を用い、実際の保存条件に相当する 4°C (2-8°C)での長期安定性試験を実施した。

本検討では対照群として、安定化剤を含まない no stabilizer 群を設定し、MES の添加効果を検討した (Table 2-6)。平均粒子径は、12 ヶ月までの保存期間において、いずれの群も明確な変化を示さず、PDI も 0.1 であったことから、リポソーム粒子のサイズや粒度分布は変化していないと考えられた。また、同様に、I-OHP の分解も両群で 12 ヶ月まで観察されなかった。HSPC では大きな経時変化が認められ、no stabilizer 群では 12 ヶ月間にわたって徐々に HSPC が分解し、最終的には約 50%の分解が認められた。一方で、MES 存在下では 6 ヶ月間まで HSPC 濃度の低下は観察されず、その後 6 ヶ月間にわたって緩やかな低下が生じ、約 15%の分解が確認された。また、外水相 I-OHP 濃度について、no stabilizer の群においては、6 ヶ月まで濃度上昇が認められなかったが、12 ヶ月時点は明確に濃度が増加した。MES を添加した製剤では、12 ヶ月間に渡って I-OHP の外水相濃度の増加を防ぐことができた。さらに、no stabilizer 群では経時的な pH の低下を示したが、MES を含むサンプルは 12 ヶ月間安定した pH を示した。以上のことから、MES は 4°C で少なくとも 12 ヶ月間は HSPC と I-OHP の両方の劣化を防ぐことができることがわかった。

Table 2-6: Physicochemical stability of PEGylated liposomal l-OHP in the presence of MES at 2-8°C.

	No stabilizer			3 mM MES		
	Initial	6 months	12 months	Initial	6 months	12 months
Particle size* (nm, Mean \pm S.D.)	154.2 \pm 42.2	152.2 \pm 46.0	135.0 \pm 54.0	159.9 \pm 46.1	151.6 \pm 38.8	142.4 \pm 45.9
Oxaliplatin conc. (mg/mL)	0.95	0.97	0.93	0.94	0.95	0.94
HSPC conc. (mg/mL)	31.1	24.9	15.9	31.1	31.0	26.4
External Oxaliplatin conc. (μ g/mL)	2.0	4.6	30.1	2.1	1.4	1.1
pH	5.1	4.4	3.4	6.3	6.1	5.8

* Poly dispersity index at all analysis were 0.1

ここまでの検討において、MES を添加することで、I-OHP への悪影響を最小限に留めつつ、HSPC の安定化を達成し、長期に渡ってリポソーム化 I-OHP の理化学的性質を維持できる製剤を得ることができた。しかしながら、これら製剤においても、保存による変動は完全に抑制することは困難であり、一定の劣化は避けられないと考えられた。事実、MES を添加した製剤においては約 15% の HSPC 分解が確認されている。よって、長期保存後のリポソーム化 I-OHP が functionality (長期血中滞留性) を維持しているかの確認を目的として、マウスモデルによる静脈内投与後の血中濃度推移 (ICP/MS による Pt 測定) を検討した (Figure 2-7)。その結果、MES 含有製剤は、2~8°C で 12 ヶ月間保存した後の製剤を投与しても、fresh な製剤の経時的血中濃度推移のグラフと重なった。一方で、MES を添加せずに保存した製剤では、fresh な製剤及び MES 含有製剤と比較して、投与初期から血中濃度が低く、内封化合物である I-OHP のクリアランスが速いことが確認された。具体的には、MES を添加せずに保存した製剤を投与したマウスにおける I-OHP の血漿中濃度は、6 時間後および 24 時間後に新鮮な製剤および MES 添加製剤と比較して 50% 程度低いことがわかった。よって、no stabilizer の製剤では 1 年間の保存によってその理化学的な評価項目、特に脂質分解の変化が大きいが、それらの変化は *in vivo* での挙動にも影響を与えると示唆された。

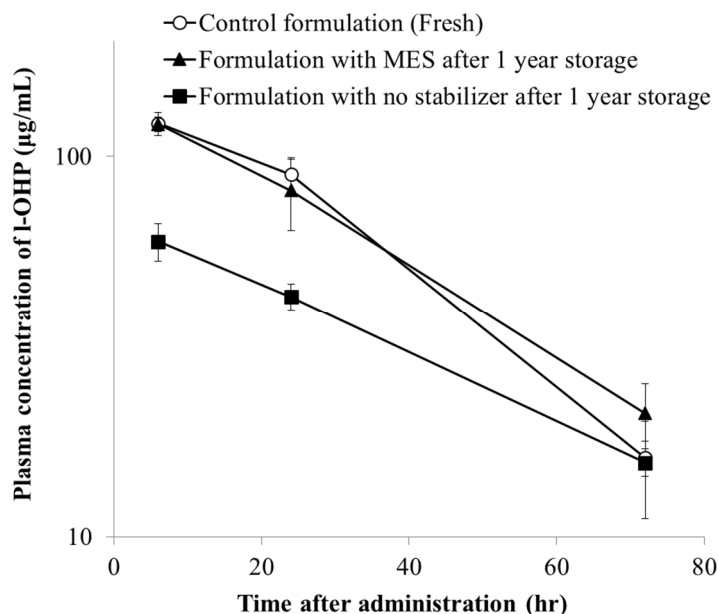


Figure 2-7: Pharmacokinetics of the formulations stored at 4°C for 1 year.

PEGylated liposomal I-OHP, stored under refrigerated conditions for 1 year in the presence or absence of MES, was injected into BALB/c inbred naïve mice via the tail vein. Blood samples were collected as a function of time and Pt levels in the blood were determined by atomic absorption photometry. All values were expressed as mean \pm SD (n=5).

先の検討において、脂質（HSPC）分解がリポソーム化 I-OHP の薬物動態に及ぼす可能性が示された。よって、HSPC の分解と血中滞留性への影響を定量的に評価するために、HSPC の分解量（残存率）が異なる 3 つの製剤を調製し、静脈内投与後の I-OHP の血漿中濃度を測定（ICP/MS による Pt 測定）した（Figure 2-8）。HSPC が約 23% 分解した製剤（グラフ中の“77.6%”群）と fresh な製剤（グラフ中の“100%”群）を比較すると、その血漿中 I-OHP 濃度はほぼ同等であった。HSPC 分解率 23% の製剤は、初期及び 72 hr 時点の I-OHP 濃度が fresh な製剤よりもやや低いが、PK パラメータとして算出した AUC で比較すると、fresh な製剤で $3501.1 \pm 67.0 \mu\text{g h/mL}$ 、HSPC 分解率 23% の製剤で $3799.2 \pm 267.4 \mu\text{g h/mL}$ ($p=0.135$) であり、両製剤は静脈内投与後の血中滞留性において同等と見なすことができると考えられた。よって、HSPC の分解量が 23% 程度までは、その体内動態に影響は無く、許容可能な分解量と示唆された。

一方で、HSPC が約 50% 分解している製剤（グラフ中の“52.8%”群）は、すべての時点において血漿中 I-OHP 濃度が他の 2 群よりも大幅に低下していた。この製剤の分析結果から、リポソーム外に漏出していたのは全 I-OHP の 3% であることがわかっている ($0.03 \text{ mg/mL external oxaliplatin vs } 1 \text{ mg/mL total oxaliplatin}$)。よって、投与前からリポソーム外に漏出していたことが原因ではなく、脂質分解に伴ってリポソーム膜が不完全なものであったがために、投与直後に一部のリポソームが崩壊した、もしくは、リポソーム自身の血中滞留性が低下したことが原因と考えられた。

以上の結果を踏まえると、MES を含有した製剤の 2-8°C で一年間保存した製剤の HSPC 含量は約 85% であったことから（Table 2-6）、血中滞留性の観点から許容可能な分解量であり、*in vivo* プロファイルを変化させずに 1 年以上の保存が可能であることが示唆された。

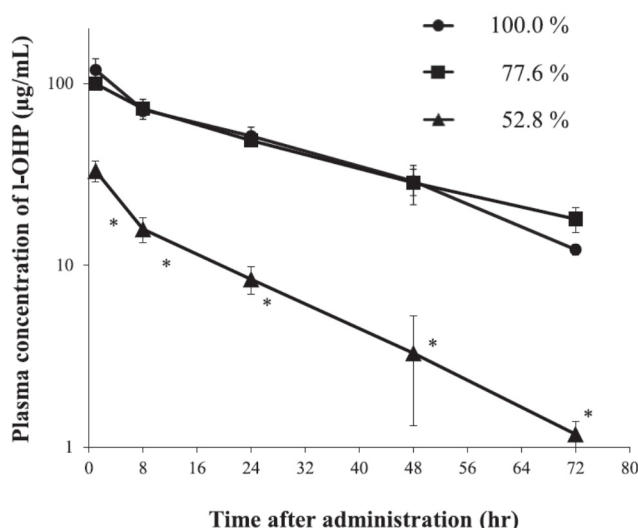


Figure 2-8: Relationship between the degree of HSPC degradation and pharmacokinetics of PEGylated liposomal I-OHP

PEGylated liposomal I-OHP with three designated levels of HSPC degradation (residual HSPC rate)

were injected into naïve mice via the tail vein. Blood samples were collected as a function of time and Pt levels in the blood were determined by atomic absorption photometry. All values were expressed as mean \pm SD (n=5).

第4節 小括

本章では、リポソーム化 I-OHP の実用化に向けた取り組みの一つとして、臨床応用のみならず非臨床試験でも重要となる長期保存の達成に向けた安定性向上に取り組んだ。

第1項では、まず、開発したリポソーム化 I-OHP の製造方法で、目標とする物性を有する製剤を製造可能か検証した。スケールアップの実績も豊富なエタノール注入法によるリポソームの調製からエクストルージョンによる粒子径調整を用いることで、非臨床試験も見越した製造スケールで目的とする製剤を得ることができた。得られた製剤は、長期安定性以外の QTPP を全て満たす品質の製剤であった。

第2項では、先に述べた長期安定性の確保に向け、リポソーム化 I-OHP の安定性について検討した。室温 (25°C) で一定期間保管した製剤では性状の変化 (白濁) 及び主要な構成脂質である HSPC の分解が確認された。これらのリポソームでは平均粒子径の変動は伴わないにも関わらず、内封薬物である I-OHP 濃度で静脈内投与後の血漿中濃度推移を確認したところ、その半減期は大きく短縮していた。以上のことから、HSPC の分解抑制 (安定化) は非常に重要な課題であることがわかった。

第3項では、リポソーム化 I-OHP の安定性の向上に向けて、適切な安定化剤を選定すべくスクリーニング試験を実施した。注射剤として一般的に使用可能である、または、リポソーム製剤で広く使用される添加剤を用いて、I-OHP・空リポソーム (HSPC) との配合適性について比較検討を実施した。その結果、いずれの添加剤も I-OHP に対しては少なからずネガティブに作用 (分解を促進) し、HSPC の安定化効果としては強弱があることがわかった。よって、I-OHP と HSPC の間でバランスを取った安定化剤の選定が必要となった。最も適切な安定化剤候補として、I-OHP に対する悪影響が小さく、HSPC に対する安定化効果が moderate な MES を選定した。実際に製剤に添加する際には、MES を外水相のみに添加することで I-OHP と MES の接触を最小限にするよう設計した。この製剤において苛酷試験 (40°C) で安定性を確認したところ、TRIS、タウリン、ヒスチジンを含む製剤では I-OHP、もしくは HSPC のいずれかが大きく分解したのに対し、MES 添加製剤では双方の安定性が確保可能な製剤が得られた。

第4項では、第3項までで得られた MES 添加製剤が実際の保存条件でどの程度安定で、また、どの程度の期間までその functionality (機能性：長期血中滞留性) を維持できるかを検討した。臨床で想定している保存条件である 2-8°C で一年間保存したところ、MES による安定化効果は顕著であり、安定化剤を含まない製剤と比較して HSPC は大きく安定化できた。一方で、I-OHP の安定性は安定化剤を含まない製剤と同程度であり、その他の項目においても変動は認められなかった。よって、MES 添加によってコンセプトを達成し得る安定化が可能であった。実際に、1年保管した製剤をマウスに投与し、血中滞留性を比較したところ、安定化剤を含まない1年保管後の製剤では大きく血中滞留性が低下したのに対し、MES 含有製剤では fresh な製剤と同等の滞留性を示した。この結果を補強するために、3水準の HSPC 分解率が有する製剤を調製し、その体内動態を比較したところ、HSPC の分解が

23%までであればリポソーム化 1-OHP の血中滞留性はほとんど変わらない事が示された。よって、保存中の HSPC の分解は、少なくとも 23%までは許容可能であると示唆された。

以上より、本章では、1-OHP を含むステルスリポソームは、長期保存中にリン脂質 (HSPC) の分解により長期血中滞留性が失われるため、製剤安定化が必要であることを見出した。この安定性確保に向けた検討の結果、MES の添加により 1-OHP の分解を最小限にしつつ HSPC の安定性を向上させ、冷蔵庫 (2-8℃) で 12 ヶ月間保存しても本来の血中滞留性が維持される製剤が得られた。本研究によって、臨床応用のために長期保存が必要なリポソーム製剤ではリン脂質の安定性を考慮する必要がある、期待される *in vivo* 特性を踏まえたリン脂質の品質規格 (分解の許容範囲) が重要であると示された。

第 3 章 リポソーム化 1-OHP の体内動態、抗腫瘍効果及び腫瘍内分布の評価

第 1 節 緒言

Oxaliplatin (1-OHP)は第 3 世代の白金錯体型抗癌剤であり、同じ白金錯体型抗癌剤の Cisplatin (CDDP)と同様に高い抗腫瘍効果を持ちながら、CDDP の持つ顕著な腎毒性の軽減に成功した薬剤である [15]。腎毒性の軽減のみならず、血液毒性や難聴などの毒性もほぼ発現しないという結果が報告されており、さらには、CDDP に対する耐性を獲得した癌種においても抗腫瘍効果を示す革新的な薬剤である [16, 17]。一方で、臨床現場では、動物実験で見られたような単剤での抗腫瘍効果が認められず、5-FU の存在下でのみ beneficial な治療効果が得られること、血漿タンパク質への不可逆的結合や血球への移行が多いことが知られており [66]、意図しない全身への分布と不十分な腫瘍移行量などの体内動態特性がそれらの課題をもたらした要因の一つと考えられる。非特異的な分布を減らし、体内動態を制御することが、1-OHP の治療効果を高める上で重要なアプローチと考えられた [74]。

抗癌剤の効果・毒性のバランス改善を目指す上で、リポソームなどのドラッグキャリアを用いた体内動態制御は広く用いられているアプローチである。リポソームをキャリアとして用いる場合には、その消失・排泄経路について理解する必要があるが、一般に肝臓や脾臓に存在する単核食細胞系 (MPS) の細胞により認識され、循環血中から除去される。これは MPS がリポソームを生体にとって異物として捕捉・処理していることを意味し、そのシステムは細網内皮系 (RES) として知られている。RES による捕捉を回避する手段として、膜表面をポリエチレングリコール (PEG; polyethylene glycol) で修飾したステルスリポソームが成功例として知られている [52, 60]。ステルスリポソームは、膜表面の PEG が水和層を形成しオプソニンタンパク質の吸着を阻害することでマクロファージによる取り込みを抑制し、また、リポソーム自身のマクロファージへの非特異的接着を抑制することで取り込みを阻害すると考えられている。こうして RES による捕捉を回避したステルスリポソームは、数日に渡って血中に存在する長期血中滞留性を獲得している [75, 76]。この長期血中滞留性は腫瘍への抗癌剤の効率的デリバリーを達成する上で不可欠である。腫瘍内では血管新生が盛んであり、新生血管では内皮細胞の間隙が大きく、微粒子が血流から腫瘍実質へと浸透することができる。また、本来であればこれらの微粒子はリンパ系によって回収され、排出されるが、腫瘍中ではリンパ系が未発達であり、腫瘍実質に到達した微粒子は長期に渡って留まることが知られている。このように血中の微粒子が腫瘍へと蓄積し、留まりやすいという性質は、Enhanced Permeability and Retention effect (EPR) 効果として、ステルスリポソームが癌へのターゲティングに用いられる根幹となっている [77, 78]。よって、ステルスリポソームによる抗がん剤 DDS は広く研究対象となっており、Doxil® (ドキシルビシンを内封したステルスリポソーム) や Onivyde® (イリノテカンを内封したステルスリポソーム) は実用化された代表例である [79]。カポジ肉腫や乳がんに対して使用され

る Doxil®や膀胱癌に対して使用される Onivyde®は、内封した化合物の体内動態を改変し、全身分布を抑制しつつ効率的な腫瘍送達を達成できるリポソーム DDS として広く知られている [43, 44].

以上の背景から、ステルスリポソームによる DDS を駆使し、I-OHP の持つ *in vivo* の体内動態特性を改善することで、治療効果の向上を達成したリポソーム化 I-OHP の開発を目指した。第 2 章で示したように、I-OHP のキャリアとしては、ステルスリポソームを選定し、その標準的な組成・デザイン (HSPC に代表される相転移温度が高いホスファチジルコリンを基材とし、コレステロール及び mPEG2000-DSPE で長期血中滞留性を付与した粒子径が 50~200 nm 程度のリポソーム)[80]により製剤を得た。第 2 章の検討において、I-OHP の“器”としてステルスリポソームに期待する機能である血中滞留性も踏まえた安定性の確保にも取り組み、1 年以上の保存でも長期血中滞留性を維持可能な製剤が得られている。そこで本章では、この製剤を用いて、序論で示したコンセプトの検証を実施することとした。すなわち、期待するプロファイルとして、担癌モデルマウスにおいて内封した I-OHP の血中滞留時間の延長、それに付随した腫瘍集積性の向上、結果として抗腫瘍効果の増強が得られるか、評価した。さらに、リポソームによってデリバリーされた I-OHP が腫瘍内でどのような分布様式を取るかを micro-synchrotron radiation X-ray fluorescence (μ -SR-XRF)により評価した。

第2節 実験方法

第1項 試薬及び原料

水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine; HSPC), コレステロール (Chol) 及び 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (mPEG2000-DSPE)は日油株式会社(東京, 日本)から購入した. 1-OHP は Heraeus GmbH (Hanau, Germany) から購入した. Evans blue は富士フィルム和光純薬工業(大阪, 日本)から購入した. Tissue-Tek OCT compound はサクラフィンテックジャパン(東京, 日本)から購入した. FITC-labeled *Lycopersicon esculentum* (Tomato) lectin (FITC-lectin)は Vector Laboratories (CA, USA)から購入した.その他, 実験に用いた試薬は分析グレード以上のものを用いた.

第2項 1-OHP 封入リポソームの調製

以下に1Lスケールでの調製方法を示す.

60~70°Cに加温した100 mLの無水エタノール中に, 約60 gの混合脂質粉末(HSPC/ Chol/ mPEG2000-DSPE= 2/ 1/ 0.1, mol/mol) [80]を添加・攪拌し, 脂質溶液とした. 別容器に, 同じく60~70°Cの加温下で900 mLの8 mg/mL 1-OHP in 10% sucroseを調製し, オキサリプラチン溶液とした. オキサリプラチン溶液は, 常にHSPCの相転移温度以上を保てるよう, 60~70°Cの加温を継続し, ホモミキサー等の乳化機を用いて攪拌しながら, 前述の脂質溶液を一定速度で少量ずつ添加し, 均一な乳化状態を得た. 続いて, 加圧により0.2 µmのポリカーボネートフィルター (Nuclepore, CA, USA)を数回通過させ, 複数枚の0.2 µmフィルターや0.1 µmフィルターを適宜用いながら整粒した. 粒子径は10% sucrose分散媒中において, DLSの平均粒子径が100~150 nm程度のリポソーム分散液を得た.

次いで, 未封入のオキサリプラチンを除去するために, tangential flow 限外ろ過膜 (Polyether sulfone, 300 kDa, 0.1 m²)を用いた限外ろ過 (Sartorius GmbH, Germany)にて10% sucrose bufferによるバッファー交換を実施した. この工程を経て, 未封入の1-OHPを除去すると同時にリポソーム化1-OHPを得た.

調製したリポソーム製剤は, 1-OHP及びHSPCの含量をUPLC (Waters Acquity system)にYMC-Pack PVA-SIL-NPカラム (5 µm 4.6×150 mm, YMC)を接続したHPLC法により測定した. 移動相としては70% MeOH, 30% 2-propanolの混液を用いて, 測定試料はこの移動相を用いて任意の倍率で希釈した溶液を用いた. 1-OHPはUV 210 nmで検出し, 脂質は荷電化粒子検出器 (Corona Ultra, Dionex)を用いてそれぞれ測定した.

第3項 使用した動物, 癌細胞

DLD-1ヒト大腸癌細胞およびC26マウス大腸癌細胞は医用細胞資源センター(東北大学加齢医学研究所, 仙台市, 日本)より入手した. HT-29ヒト大腸癌細胞は(財)癌研究会より入手した. 細胞は, 熱非働化牛胎児血清(全体の10%), 100 units/mL ペニシリン, 100 µg/mL

ストレプトマイシン (ICN Biomedicals, Irvine, CA) を添加した RPMI-1640 培地 (富士フィルム和光純薬工業) で、5%CO₂ インキュベーターで 37°C にて培養した。

BALB/c マウス (雄, 5 週齢) および BALB/c nu/nu マウス (雄, 5 週齢) は、日本 SLC (静岡, 日本) もしくは日本クレア株式会社 (静岡, 日本) から購入した。実験動物は飲料水と餌に自由にアクセスでき、管理された環境条件 (一定の温湿度, 12 時間の暗・明サイクル) 下で飼育した。担癌モデルの作製においては、BALB/c nu/nu マウスの脇腹に DLD-1 細胞 (2×10⁶ 細胞/マウス) を、BALB/c マウスの脇腹に C26 細胞 (2×10⁶ 細胞/マウス) をそれぞれ皮下接種し、DLD-1 担癌モデルおよび C26 担癌モデルを樹立した。HT-29 担癌モデルは、BALB/c nu/nu マウスの皮下で継代移植・維持していた腫瘍を採取し、約 2 mm 角のフラグメントを作製し、移植針で後背部に移植して樹立した。全ての動物実験は、腫瘍の大きさが 50-100 mm³ に達した時点で開始した。

第 4 項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の体内動態評価

HT-29 担癌マウスモデルに対し、I-OHP リポソームを 4.2 mg/kg となるように尾静脈投与した。投与後 3, 6, 24, 48, 72, 96, 168 時間後 (各群各ポイント 3 匹ずつ) に、イソフルラン麻酔下のマウス後大静脈から、ヘパリン入りのシリンジを用いて全血を採取 (約 1 mL) した。全血は遠心分離 (3000 rpm, 15 分, 4°C) を行い、必要量の血漿 (100 μL) を得た。残りの血漿 (約 300 μL) は各ポイント毎でプールし、限外濾過フィルター (Amicon Ultra, MILLIPORE) を用いてさらに遠心 (3000 rpm, 20 から 60 分, 4°C) し、限外濾過血漿 (以下, PUF) を得た。採血後のマウスは放血により安楽死させ、腫瘍を採取し、重量を測定した。重量を測定した腫瘍は、測定まで血漿及び PUF とともにディープフリーザー (-80°C) で保存した。測定時には、サンプルに濃硝酸を加え、電子レンジ (600 W, 25 分, 50°C ; ETHOS TC, Milestone general, Kanagawa, Japan) で消化した。サンプル中の白金 (Pt) 含有量の測定は、ICP-MS (Agilent 7500 series; YOKOKAWA analytical systems, Tokyo, Japan) を用いた。安定化時間 60 秒, ポンプ回転速度 0.15 回転/秒, 測定イオンは白金 (Pt) 195 *m/z*, 標準物質ユウロピウム (Eu) 153 *m/z* の測定条件において、その血中滞留性及び腫瘍移行性を評価した。

第 5 項 ヒト大腸癌株担癌マウスに対するリポソーム化 I-OHP の抗腫瘍効果

HT-29 担癌マウスモデルは、腫瘍フラグメントの移植から 11 日後に各群に割り付けを行い、割り付け日を Day 0 とした。遊離型 I-OHP, リポソーム化 I-OHP とともに、I-OHP として 4.2, もしくは 7.0 mg/kg を Day 1, 8, 15 にマウス尾静脈から投与した。

腫瘍径及び体重は、1 週間に 2~3 回の頻度で測定した。腫瘍径はデジタルノギス (デジタルチックキャリパ : CD-10C, 株式会社ミットヨ, 神奈川, 日本) を用いて長径・短径を計測した。腫瘍体積は下記式を用いて計算した。体重は電子天秤 (LP2200S, ザルトリウス株式会社, 東京, 日本) を用いて測定した。

$$TV (\text{mm}^3) = (\text{長径}) \times (\text{短径}) \times (\text{短径}) / 2$$

$$RTV = (\text{各測定日の腫瘍体積}) / (\text{群分け日の腫瘍体積})$$

$$TGI(\%) = [(\text{Control 群の平均 RTV}) - (\text{薬剤投与群の平均 RTV})] / (\text{Control 群の平均 RTV}) \times 100$$

第 6 項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の腫瘍内分布の評価

DLD-1 担癌マウスに対し、遊離型 I-OHP, またはリポソーム化 I-OHP (4.2 mg/kg) を週 1 回, 合計 3 回静脈内投与した. 各投与から 24 時間後にマウスを安楽死させ, 腫瘍を摘出し, ドライアイスアセトンを用いて Tissue-Tek OCT コンパウンド中で凍結させた. 凍結試料はクライオスタット (ライカマイクロシステムズ株式会社, 東京, 日本) を使用して 10 μm 厚の切片を作製した. $\mu\text{-SR-XRF}$ は SPring-8 (大型放射光施設 Super Photon ring-8 GeV, 兵庫, 日本) のビームライン BL37XU (8 GeV, 約 100 mA) を用いた. 腫瘍試料に, Pt L α 線 (励起: 9.441 keV), Pt L β 線 (励起: 11.069 keV), Fe K α 線 (励起: 6.398 keV) を高効率で励起する 13.5 keV の X 線を照射した. 蛍光 X 線は, 大気中, 室温下で Si 固相検出器を用いて測定した. $\mu\text{-SR-XRF}$ 装置の最大分解能は 0.5 μm 角であり, 8 mm 角の腫瘍全体像 (励起時間 1 秒, 分解能 50 μm 角) の取得に 7.2 時間以上を要した. 蛍光 X 線強度を入射 X 線強度 I_0 で正規化し, 2 次元元素マップを作成した.

さらに, C26 担癌マウスに 3 日に 1 回, リポソーム化 I-OHP (4.2 mg/kg) を 3 回静脈内投与した. 最後の投与から 3 日後, さらに Evans blue (0.1 mg/100 μL /mouse) を静脈内投与し, その 4 時間後に FITC-lectin (0.1 mg/100 μL /mouse) を投与した. FITC-lectin 投与 3 分後にマウスを安楽死させ, クライオスタットを用いて腫瘍切片 (厚さ 10 μm) を作製した. 切片は MAS コートスライド (松波硝子, 大阪, 日本) にマウントした. Evans blue (excitation at 550 nm, emission at 610 nm) と FITC-lectin (excitation at 494 nm, emission at 518 nm) の蛍光を蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence, 大阪, 日本) で検出し, 画像を取得した. 無作為に選んだ切片から 16 枚の画像を用い, 血管からの透過エリア面積を以下の式で算出した.

$$\text{Permeable area (\%)} = \text{Evans blue positive area (\%)} - \text{FITC-lectin positive area (\%)}$$

第3節 結果及び考察

第1項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の体内動態評価

ヒト大腸癌株 HT-29 のヌードマウス皮下移植モデルを用いて、リポソーム化 I-OHP の血中滞留性及び腫瘍移行性を、遊離の I-OHP と比較検討した。

I-OHP 及びリポソーム化 I-OHP をそれぞれ 7 mg/kg の投与量で静脈内単回投与し、体内動態を評価した。I-OHP は生体内に投与されると速やかに代謝物へと変化し、intact な化合物として測定することが困難であるため、Pt 濃度の測定をもって薬物濃度の測定とした[66, 81]。血漿中、腫瘍中、限外ろ過血漿中の経時的な Pt 濃度推移をそれぞれ Figure 3-1, 3-2, 3-3 に、得られた薬物動態パラメータを Table 3-1 に示した。

血漿中 Pt 濃度 (Figure 3-1) は、リポソーム化 I-OHP が測定した全タイムポイントにおいて遊離の I-OHP よりも高値を示し、 C_{max} で約 240 倍、AUC で約 180 倍高く、およそ一週間にわたって I-OHP が血漿中に存在することが明らかとなった。遊離の I-OHP を静脈内投与した場合、赤血球への移行、血漿タンパクへの不可逆的結合、また、腎排泄によって、血漿中から速やかに消失する。リポソーム化 I-OHP では、それらの分布・排泄を回避し、血中においてリポソーム内に I-OHP が安定に保持されたため、高い血漿中濃度を維持できたと考えられた。よって、血漿中の薬物濃度としては莫大な量の I-OHP が動物に曝露されているように見えるが、実際に血中で bioavailable な I-OHP は非常に少なく、これが直接、正常組織への悪影響を及ぼすことはないと考えられた。

次いで、腫瘍内 Pt 濃度 (Figure 3-2) であるが、遊離型 I-OHP よりもリポソーム化 I-OHP が高値を示し、 C_{max} で約 9 倍、AUC で約 15 倍高かった。腫瘍内の Pt 濃度は、リポソーム化 I-OHP の T_{max} が投与後 48 時間であったのに対して、遊離の I-OHP は 6 時間であった。これは、リポソーム化 I-OHP が EPR 効果に基づき徐々に腫瘍へと蓄積し、貯留されていたことを示す結果であると考えられた。以上のように、リポソーム化 I-OHP では、リポソーム製剤のコンセプトの一つである高い血中滞留性と高い腫瘍移行性が確認された。

最後に、限外ろ過血漿中の Pt 濃度 (Figure 3-3) の結果を示した。限外ろ過血漿中の Pt 濃度を測定することで、血漿中で薬効・毒性を示し得る遊離型の薬物濃度を評価することができる。先の血漿中 Pt 濃度の結果と同様に、本結果においても、リポソーム化 I-OHP の方が高値を示したが、その程度は C_{max} で 3 倍、AUC で約 10 倍であった。また、 T_{max} がリポソーム化 I-OHP で 24 時間、I-OHP で 3 時間であった。リポソーム化 I-OHP では限外ろ過血漿中の I-OHP 濃度が、遊離型 I-OHP の投与時よりも高い傾向であったが、上述の血漿中濃度を考慮するとろ過血漿中の I-OHP 濃度は極めて低く、すぐさま毒性につながる可能性は低いと考えられた。

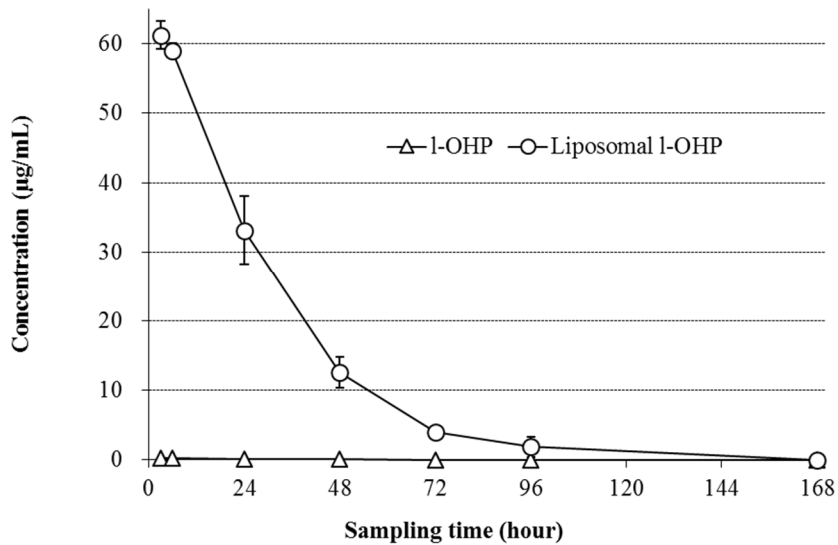


Figure 3-1: Platinum concentration in plasma of HT-29 xenograft model mice after administration of liposomal l-OHP

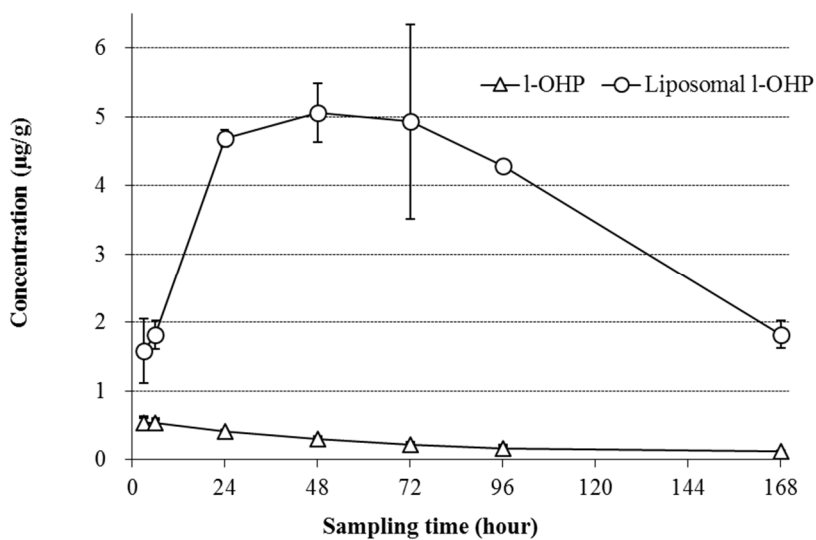


Figure 3-2: Platinum concentration in tumor of HT-29 xenograft model mice after administration of liposomal l-OHP

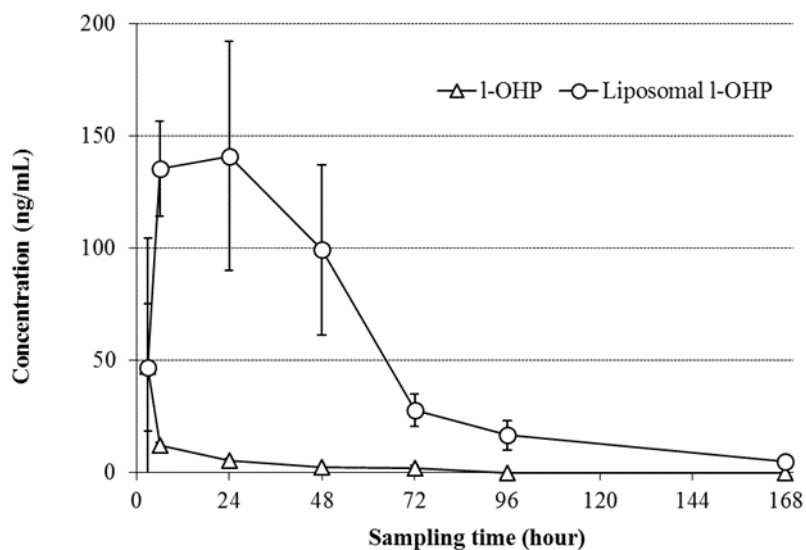


Figure 3-3: Platinum concentration in plasma ultrafiltrate (PUF) of HT-29 xenograft model mice after administration of liposomal l-OHP

Table 3-1: Pharmacokinetics parameter in HT-29 xenograft model mice after administration of liposomal l-OHP

		Tmax	Cmax	t _{1/2}	AUC _{last}	AUC _{inf}	V _{dss}	CL
		h	µg/mL	h	h·µg/mL	h·µg/mL	mL/kg	mL/h/kg
Liposomal l-OHP (7 mg/kg/day)	Plasma	3	61.24	15.0	2085.5	2086.4	40	2
	Tumor	48	5.054	64.7	635.5	805.6	—	—
	PUF	24	0.141	39.1	8.6	8.9	—	—
l-OHP (7 mg/kg/day)	Plasma	3	0.256	48.1	11.0	11.7	14274	291
	Tumor	6	0.538	71.7	40.6	52.4	—	—
	PUF	3	0.047	24.9	0.7	0.8	—	—

Tmax: maximum drug concentration time, Cmax: maximum drug concentration
t_{1/2}: half-life period, AUC : area under the blood concentration time curve
V_{dss} : volume of distribution at steady state, CL : clearance

第2項 ヒト大腸癌株担癌マウスに対するリポソーム化 I-OHP の抗腫瘍効果

ヒト大腸癌株 HT-29 のヌードマウス皮下移植モデルを用いて、I-OHP 及びリポソーム化 I-OHP の腫瘍増殖抑制効果と全身毒性への影響として体重変化を評価した。治療開始からの相対腫瘍体積の経時的变化を Figure 3-4 に、体重変化を Figure 3-5 に示した。また、治療を終了した Day 22 及びその回復期までの Day 36 における死亡個体数、腫瘍体積 (TV)、相対腫瘍体積 (RTV)、腫瘍増殖抑制率 (TGI) 及び体重変化 (BWC) を、それぞれ Table 3-3 及び Table 3-4 に示した。

相対腫瘍体積のグラフ (Fig. 3-4) においては、遊離型 I-OHP (4.2 mg/kg) 及びリポソーム化 I-OHP (4.2 mg/kg 及び 7.0 mg/kg) を投与した群で、いずれも Control に対して腫瘍増殖の抑制効果が確認できた。また、リポソーム化 I-OHP は 4.2 mg/kg 及び 7.0 mg/kg の両投与量において、7.0 mg/kg の遊離型 I-OHP よりも腫瘍増殖を抑制できることが明らかとなった。HT-29 に対する腫瘍増殖抑制効果 (Table 3-3, 3-4) は、Day 22 において遊離型 I-OHP 群の TGI 値が 26.6%、リポソーム化 I-OHP 7 mg/kg 群では 50.7%、4.2 mg/kg では 39.5%であり、全ての投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。特に、4.2 mg/kg のリポソーム化 I-OHP が 7.0 mg/kg の遊離型 I-OHP よりも高い抗腫瘍効果を発揮しており、これは先の PK の検討の結果からも示唆される通り、リポソーム化によって腫瘍移行性が改善されたことが抗腫瘍効果の増強に繋がったと考えられた。また、いずれの投与群においても Control と比較して、明確な体重変化は認められず、遊離型とリポソーム化 I-OHP の間でも差を認めなかった (Fig. 3-5)。加えて、Day 22 及び 36 のいずれの判定日においても死亡したマウスはいなかったことから、Fig. 3-5 の体重減のデータと同様に、重篤な毒性は無かったと考えられた。Fig. 3-3 の結果からリポソーム化 I-OHP 投与群で限外ろ過血漿中 I-OHP 濃度が高かったため毒性に対する影響も議論したが、上述の結果を踏まえると、毒性への影響が小さい、もしくはほとんど無い量であったと考えられた。以上のことから、リポソーム化 I-OHP は I-OHP の体内動態を制御することで、毒性を増強させることなく抗腫瘍効果を顕著に増強できることが明らかとなった。

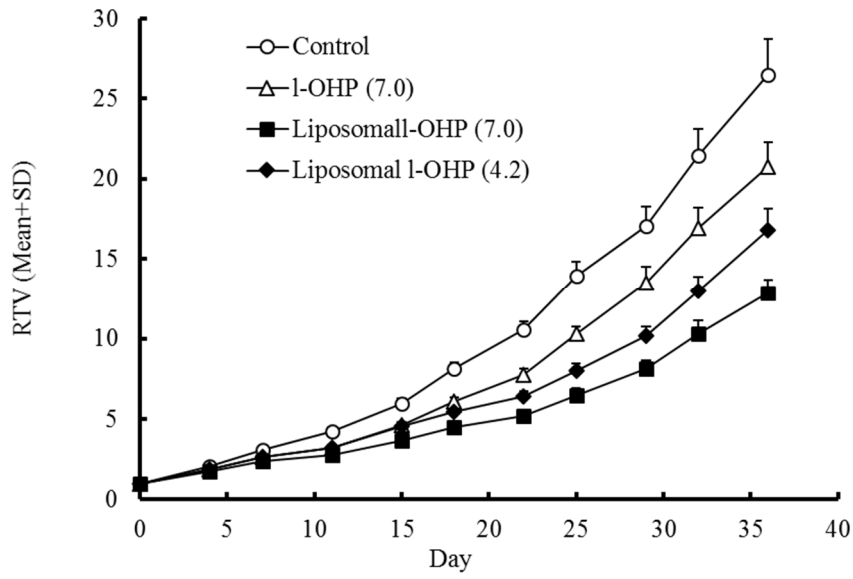


Figure 3-4: Tumor growth suppression effect of liposomal l-OHP in HT-29 xenograft model mice

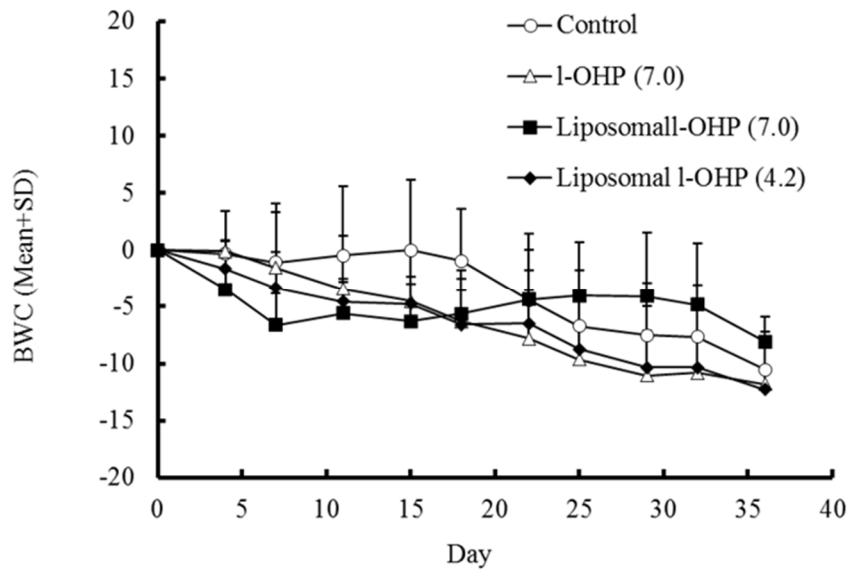


Figure 3-5: Body weight change of liposomal l-OHP in HT-29 xenograft model mice

Table 3-3: therapeutic effect of liposomal I-OHP in HT-29 xenograft model mice HT-29 (Day 22)

Drug	Dose (mg/kg/day)	Treatment	No. of Animals	No. of Death	TV ^{a)} (mm ³ , mean ± SD)	RTV ^{b)} (mean ± SD)	TGI ^{c)} (%)	BWC ^{d)} (% mean±SD)
Control	–	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	1420.35 ± 70.74	10.56 ± 0.52	-	-4.42 ± 5.82
I-OHP	7	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	1039.05 ± 59.64	7.75 ± 0.39 **	26.6	-7.80 ± 4.26
Liposomal I-OHP	7	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	695.20 ± 33.87	5.21 ± 0.33 ***#	50.7	-4.38 ± 4.43
Liposomal I-OHP	4.2	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	860.87 ± 42.24	6.39 ± 0.34 **	39.5	-6.48 ± 4.77

** : p < 0.01 by Student's *t*-test as compared with the control group.

: p < 0.01 by Student's *t*-test as compared with the I-OHP group.

a) : Tumor volume (TV) on Day 22 was calculated according to the following formula: $TV = (\text{length}) \times (\text{width})^2 / 2$

b) : Relative tumor volume (RTV) on Day 22 was calculated as the ratio of TV on Day 22 to that on Day 0 according to the following formula:

$$RTV = (TV \text{ on Day 22}) / (TV \text{ on Day 0})$$

c) : Tumor growth inhibition rate (TGI) on Day 22 on the basis of RTV was calculated according to the following formula:

$$TGI (\%) = [(\text{mean RTV in control group}) - (\text{mean RTV in treatment group})] / (\text{mean RTV in control group}) \times 100$$

d) : Body weight change (BWC, %) on Day 22 were calculated according to the following formula:

$$BWC (\%) = [(BW \text{ on Day 22}) - (BW \text{ on Day 0})] / (BW \text{ on Day 0}) \times 100$$

Table 3-4: therapeutic effect of liposomal I-OHP in HT-29 xenograft model mice HT-29 (Day 36)

Drug	Dose (mg/kg/day)	Treatment	No. of Animals	No. of Death	TV ^{a)} (mm ³ , mean ± SD)	RTV ^{b)} (mean ± SD)	TGI ^{c)} (%)	BWC ^{d)} (% mean±SD)
Control	–	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	3562.13 ± 324.95	26.49 ± 2.27	-	-10.52 ± 4.67
I-OHP	7	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	2783.23 ± 214.37	20.77 ± 1.51 **	21.6	-11.82 ± 4.58
Liposomal I-OHP	7	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	1711.99 ± 101.16	12.82 ± 0.86 ***#	51.6	-8.08 ± 6.73
Liposomal I-OHP	4.2	Days 1,8 and 15, i.v.	6	0	2260.59 ± 204.79	16.78 ± 1.39 **	36.7	-12.29 ± 4.29

** : p < 0.01 by Student's *t*-test as compared with the control group.

: p < 0.01 by Student's *t*-test as compared with the I-OHP group.

a) : Tumor volume (TV) on Day 36 was calculated according to the following formula: $TV = (\text{length}) \times (\text{width})^2 / 2$

b) : Relative tumor volume (RTV) on Day 36 was calculated as the ratio of TV on Day 36 to that on Day 0 according to the following formula:

$$RTV = (TV \text{ on Day 36}) / (TV \text{ on Day 0})$$

c) : Tumor growth inhibition rate (TGI) on Day 36 on the basis of RTV was calculated according to the following formula:

$$TGI (\%) = [(\text{mean RTV in control group}) - (\text{mean RTV in treatment group})] / (\text{mean RTV in control group}) \times 100$$

d) : Body weight change (BWC, %) on Day 36 were calculated according to the following formula:

$$BWC (\%) = [(BW \text{ on Day 36}) - (BW \text{ on Day 0})] / (BW \text{ on Day 0}) \times 100$$

第 3 項 ヒト大腸癌株担癌マウスにおけるリポソーム化 I-OHP の腫瘍内分布の評価

ここまでの検討で示したように、EPR 効果に基づく効率的な腫瘍デリバリーによって、リポソーム化 I-OHP が高い治療効果を示すことが明らかとなった。リポソーム化 I-OHP の治療効果を理解する上で、内封薬物である I-OHP の腫瘍内分布を直接評価することは重要である。よって、リポソーム化 I-OHP の抗腫瘍効果の更なる解析を目的として、 μ -SR-XRF を用いた腫瘍組織における I-OHP の微小分布を検討した。本実験では、Pt 原子のシグナルを検出することで I-OHP の分布を評価した。Fig. 3-6 に示すように、リポソーム化、もしくは遊離型の I-OHP を投与したマウスの腫瘍組織切片に一次 X 線を照射し、Pt 原子から発生する固有の蛍光 X 線を検出することで、Pt (すなわち I-OHP) の腫瘍内局在を可視化することができる。同様の原理を用いて、Fe 原子のシグナルを検出することでヘムタンパク質の局在を評価した。ヘムタンパク質は赤血球中に存在し、赤血球は血管外に漏出しないことから、Fe のシグナルを検出することは、腫瘍血管の造影とみなすことができると考えた。

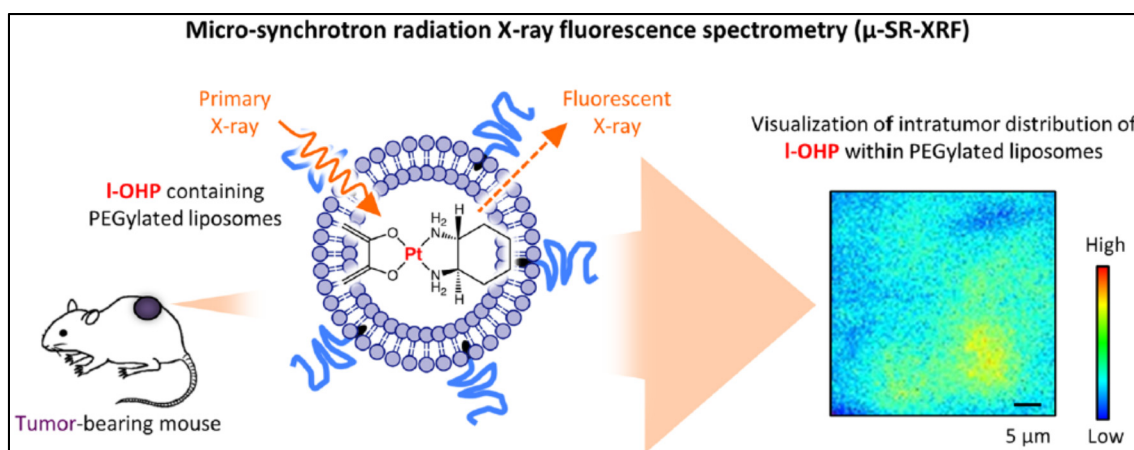


Figure 3-6; Schematic diagram of I-OHP detection using micro-synchrotron radiation X-ray fluorescence [82]

本検討では、Figure 3-7 に示すように、 μ -SR-XRF を用いて腫瘍組織切片中の任意の箇所を対象とし、I-OHP (Pt) と血管 (Fe) を同一の腫瘍組織切片において同時に造影した。Control (未治療) 群の腫瘍組織切片からは、Pt のシグナルは検出されなかった。一方で、遊離の I-OHP、またはリポソーム化 I-OHP 投与後の腫瘍組織切片においては Pt のシグナルが明確に検出された。また、リポソーム化 I-OHP 投与群の腫瘍組織切片において、Pt のシグナルが多く検出されたことから、腫瘍への I-OHP 送達はリポソーム化によって促進されたと考えられた。一方で、腫瘍組織切片における Pt の局在と血管 (Fe) の位置関係は、リポソーム化 I-OHP と遊離型 I-OHP 投与群で異なる傾向を示した。遊離型 I-OHP を投与した群の切片では、I-OHP を表す Pt が幅広く検出され、血管を表す Fe から離れた領域でも検出された。

これは、遊離の I-OHP は低分子であるため、拡散によって血管から遠く離れた領域まで浸潤したことが要因と考えられた。これに対して、リポソーム化 I-OHP を投与した腫瘍切片では、Pt のシグナルは Fe のシグナルとほぼ co-localize しており、血管近傍へのリポソーム化 I-OHP の蓄積が示唆された。以上の結果から、遊離型及びリポソーム化の I-OHP はいずれも血管を介して腫瘍中に分布しているが、リポソーム化 I-OHP でより多くの I-OHP が腫瘍に蓄積している一方で、リポソーム化によって腫瘍内での拡散が一部抑制されている傾向が確認された。

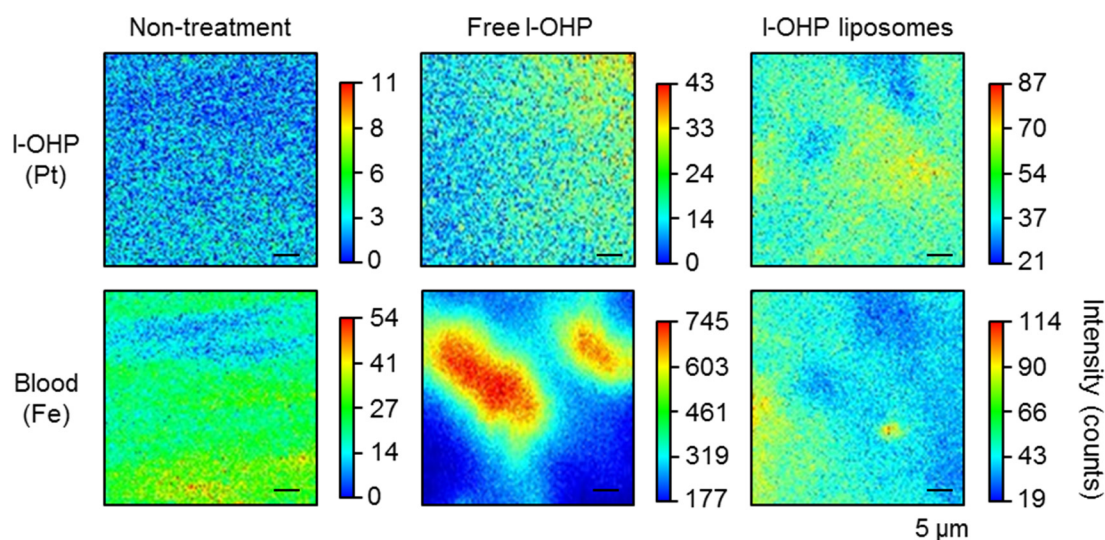


Figure 3-7: Visualization of the intratumor distribution of I-OHP using μ -SR-XRF.

DLD-1-tumor-bearing mice were intravenously injected with a single dose of either free I-OHP or I-OHP liposomes (4.2 mg I-OHP/kg). At 24 h post injection, the tumors were excised and the intratumor distribution of I-OHP was determined using μ -SR-XRF. I-OHP was detected via Pt intensity, and blood was detected via Fe intensity. The image shown is typical of 3 independent experiments.

次いで、リポソーム化 I-OHP を複数回投与した際の I-OHP の腫瘍蓄積を μ -SR-XRF を用いて評価した。既報にて、蛍光標識したリポソームを用い、繰り返し投与したリポソーム化 I-OHP は、時系列的な血管系の変化をもたらし、より多くの腫瘍集積を可能とすることが明らかにされている [83, 84]。しかしながら、その腫瘍集積の変化が、真に内封薬物である I-OHP に関連しているかは明らかとなっていない。そこで、本実験では、複数回に渡って投与されたリポソーム化 I-OHP が、次に投与したリポソーム化 I-OHP の腫瘍内への蓄積にどのような影響を与えるかを、 μ -SR-XRF を用いて遊離型 I-OHP と比較した。結果を Figure 3-8 に示す。比較評価を容易にするために、全てのサンプルにおいて、Pt シグナルの強度を最大 255, 最低 0 に固定して評価した。遊離型の I-OHP 投与群においては、3 回の遊離型 I-OHP

の投与によって、その腫瘍内 I-OHP の蓄積はわずかに増加する傾向にあったが、その分布のパターンはほとんど変化しなかった。一方、リポソーム化 I-OHP の投与群においては、3 回の繰り返し投与によって I-OHP に由来する Pt の腫瘍蓄積量が顕著に増加した。Pt シグナルの強度をリポソーム化 I-OHP の three doses に合わせて設定したため、それ例外の画像では Pt シグナルがほぼ検出されていないように見えるが、これはリポソーム化 I-OHP ではそれほど顕著な蓄積量の増加が認められたことを意味する。また、リポソーム化 I-OHP の投与 1 回では、2 回目の投与時のリポソーム化 I-OHP の分布を大きく変えなかった。これらの結果は、蛍光標識リポソームを用いた既報の結果と完全に一致し、リポソーム化 I-OHP を繰り返し投与は、I-OHP の腫瘍内蓄積量を顕著に高めることができることを示唆している。EPR 効果による抗癌剤デリバリーも一回投与では十分ではなく、その分布は限定的である一方、リポソーム化 I-OHP を繰り返し投与することで次に投与したリポソーム化 I-OHP の腫瘍移行量の増大と分布の拡大をもたらした。ここで得られた結果はリポソーム化 I-OHP の治療効果を考える上で非常に重要な知見であり、リポソーム化 I-OHP では治療の継続性を高めることが抗腫瘍効果の増強に重要であると考えられた。

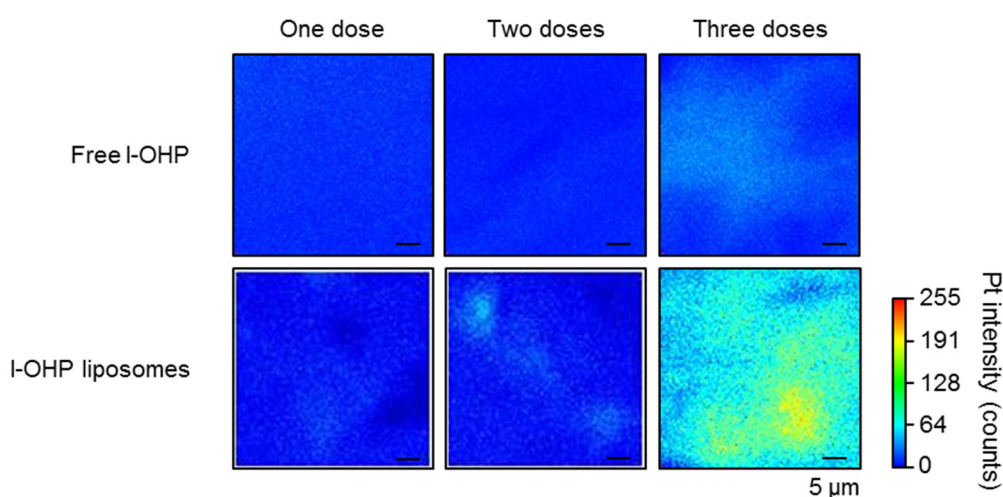


Figure 3-8: I-OHP accumulation in tumor tissue following the repeated administration of I-OHP liposomes.

DLD-1-tumor-bearing mice were intravenously injected with 1, 2 or 3 doses of either free I-OHP (4.2 mg/kg) or I-OHP liposomes (4.2 mg I-OHP/kg) once a week. At 24 h post injection, the tumors were excised and 10- μ m-thick sections were frozen. Intratumor distribution of I-OHP was determined using μ -SR-XRF. I-OHP was detected via Pt intensity. Maximal Pt intensity in the image was fixed at 255 and the minimum was set at 0 for all samples. The image shown is typical of 3 independent experiments.

さらに、リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与時の腫瘍全体の分布について検討した。腫瘍内の Pt 分布と血管の co-localize を同時に評価し、低倍率の μ -SR-XRF を用いた空間的マッピングにより、分布を視覚化した。結果を Figure 3-9 に示す。先の検討と同様に Pt シグナルにより I-OHP を、Fe シグナルにより血管を造影し、画像処理ソフトである ImageJ を用いて Figure 3-9 の Merged を作成した。リポソーム化 I-OHP の投与により、I-OHP に由来する Pt のシグナルが腫瘍全体から検出されており、また、血管に由来する Fe シグナルと沿った分布を示した。加えて、Pt シグナルの分布は腫瘍組織の周縁部位に多く分布しており、Fe シグナルの分布も同様であった。これらの結果から、リポソーム化 I-OHP による治療期間において、キャリアであるリポソームのみならず内封した I-OHP が血管と同様に腫瘍の周縁部位に分布していることが明らかとなった。

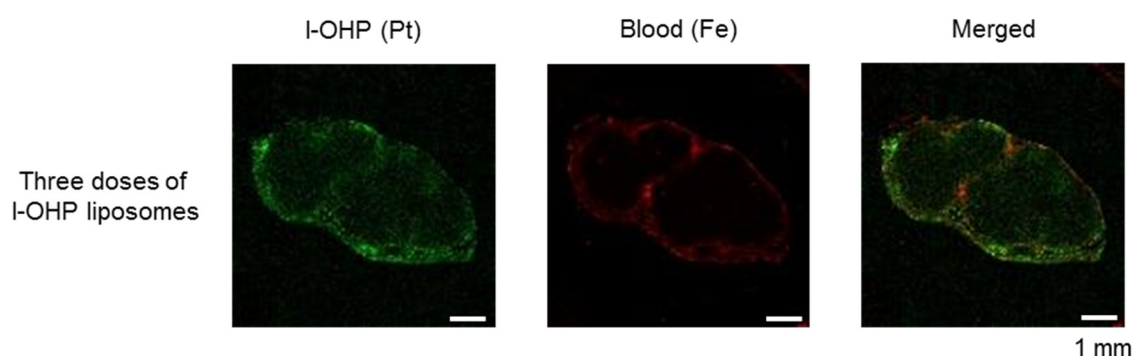


Figure 3-9: Total intratumor distribution of I-OHP after repeated doses of I-OHP liposomes.

DLD-1-tumor-bearing mice were intravenously injected with 3 doses of I-OHP liposomes (4.2 mg I-OHP/kg) once a week. At 24 h post injection, the tumors were excised, and 10- μ m-thick tumor-sections were frozen. Intratumor distribution of I-OHP was determined by μ -SR-XRF. I-OHP was detected via Pt intensity, and blood was detected via Fe intensity. The image shown is typical of 3 independent experiments.

最後に、リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与時における腫瘍血管の透過性について検討した (Figure 3-10)。上述の通り、過去の検討において、繰り返し投与による血管系の経時的変化を通じてリポソーム及び内封化合物である I-OHP が腫瘍内に広く分布することを確認している。しかしながら、繰り返し投与によって、なぜ腫瘍内分布パターンの変化が生じるのか、そのメカニズムについては明らかとなっていない。本項ではこのメカニズム解明に向けた検討として、C-26 担癌モデルを用いて、リポソーム化 I-OHP の投与が腫瘍血管の透過性に与える影響を評価した。アルブミンに対して結合性を示す Evans blue を投与し、Evans blue の腫瘍内分布化を観察することで、腫瘍内血管密度及び血管透過性、さらには腫

瘍組織内での血漿（アルブミン）の拡散状況を間接的に観察できると考えた。

C-26 担癌マウスにリポソーム化 I-OHP を weekly で 3 回尾静脈投与し、最終投与の 3 日後に、Evans blue 及び血管の造影のための FITC-lectin を尾静脈から投与した。リポソーム化 I-OHP を投与していない非治療群において、C-26 腫瘍内に FITC が多く検出されており、本担癌モデルでは血管新生が強く誘導されていることが示唆された。また、リポソーム化 I-OHP 投与群においては、FITC 及び Evans blue がより多く検出され、血流を有する血管系が多く、また、それらの透過性が亢進していることが示唆された。リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与と血管透過性の関連をより深く考察するために、取得した腫瘍組織切片中の FITC 及び Evans blue の画像から、blood permeable area を計算した。非治療群においては限定的な血管透過性（permeable area: $16.5 \pm 7.8\%$ ）であった。対照的に、リポソーム化 I-OHP を繰り返し投与した群においては顕著な腫瘍血管の透過性亢進及び血管外への血漿拡散領域の拡大が認められた（permeable area: $27.8 \pm 10.9\%$ ）。

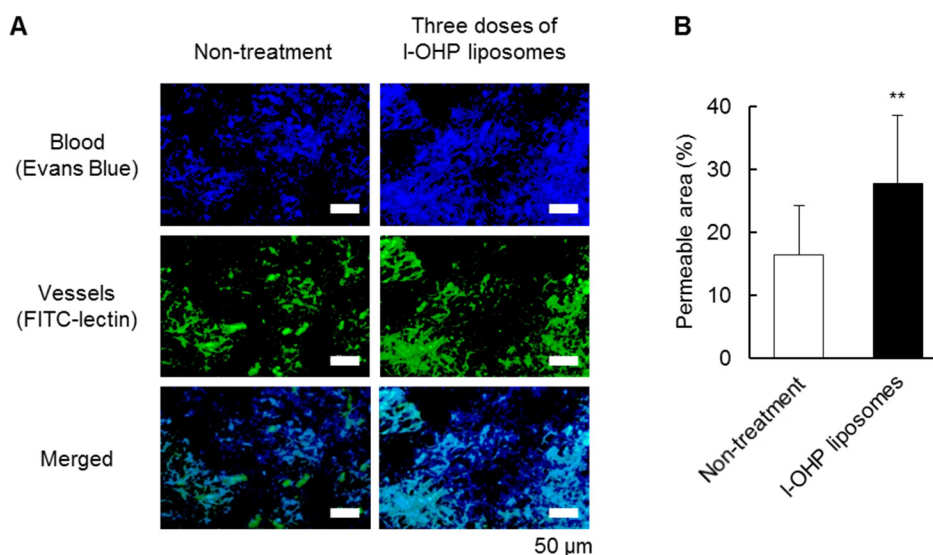


Figure 3-10: Tumor vascular permeability following the repeated administration of I-OHP liposomes.

C26-tumor-bearing mice were intravenously injected with 3 doses of I-OHP liposomes (4.2 mg I-OHP/kg) once every 3 days. On day 3 after the last injection, the tumors were excised following injections of Evans blue (0.1 mg/0.1 ml/mouse) and FITC-lectin (0.1 mg/0.1 ml/mouse). Frozen tumor sections were prepared with a thickness of 10 μm. (A) The fluorescence of Evans blue (Ex: 550 nm, Em: 610 nm) and FITC-lectin (Ex: 494 nm, Em: 518 nm) was observed with a fluorescence microscope. (B) Permeable areas were calculated using a formula described in the section titled “Evaluation of blood perfusion and/or permeability in the tumor tissue.” The data were calculated using 16 independent graphical images for each treatment group (** $P < 0.01$).

第4節 小括

本章では、ステルスリポソームを“器”として用いたリポソーム I-OHP について、序論で示したコンセプトを達成できるか検証した。担癌モデルマウスを用いて、リポソーム化 I-OHP の血中滞留性、腫瘍移行性及び抗腫瘍効果の評価を通じて、その有用性を検証することができた。

第1項では、“器”である一般的なステルスリポソームに I-OHP を封入し、その体内動態を評価した。ステルスリポソームに封入することで、I-OHP の血漿タンパク・血球への移行が回避可能となり、I-OHP の持つ特殊な体内動態特性を改変することに成功した。また、ステルスリポソームは RES による捕捉から逃れやすく設計されていることから、内封薬物である I-OHP は血中滞留性を獲得することができ、遊離型 I-OHP に比べて EPR 効果に基づく腫瘍移行量を大幅に増加させることができた。

第2項では、I-OHP の効率的な腫瘍デリバリーを実現することで、担癌マウスモデルにおいて、明確な全身毒性の上乗せ無く抗腫瘍効果を増強させることを示した。治療終了時における Tumor growth inhibition (TGI; 腫瘍増殖抑制率) は、遊離型 I-OHP 群で 26.6% であり、リポソーム化 I-OHP 7.0 mg/kg 群で 50.7%、4.2 mg/kg で 39.5% であり、全ての投与群で有意な腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、遊離型 I-OHP (7.0 mg/kg) に対して、リポソーム化 I-OHP (4.2 mg/kg) の投与によって同等以上の腫瘍増殖抑制効果を発揮することを示し、リポソーム化 I-OHP は投与量を下げつつ治療継続性の向上をもたらす可能性があると考えられた。よって、リポソーム化 I-OHP はヒト大腸癌株のモデルにおいて、明らかな効果・毒性のバランス改善を得ることができた。

第3項では、このような強い抗腫瘍効果に対する更なる検討として、 μ -SR-XRF を用いて腫瘍内の I-OHP の分布を視覚的に評価した。その結果、I-OHP のリポソーム化によって多量の Pt が腫瘍内にデリバリー可能であることが示された。また、繰り返し投与によってその移行量と分布領域が拡大していることが明らかとなった。この背景には、リポソーム化 I-OHP を繰り返し投与することで腫瘍血管外の癌細胞が傷害されることで腫瘍実質中の物理的圧力が低下することで、間接的に腫瘍血管系の透過性が亢進されたと示唆された。この結果は、今回得られた抗腫瘍効果を裏付けるのみならず、過去の研究とも一致する結果であった。

以上の検討において、I-OHP をステルスリポソームに封入することで、I-OHP の体内動態特性を改善し、腫瘍への選択性を向上させることで、抗腫瘍効果の増強を達成したリポソーム製剤が得られた。特に、高い抗腫瘍効果が得られる背景として、リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与によって、後から投与するリポソーム化 I-OHP の腫瘍移行量が増大し、分布も拡大したことが要因であると示唆された。このことは、EPR 効果による抗癌剤デリバリーも少ない投与回数では恩恵が小さいケースもあり、繰り返し投与することによってその有用性が高まることを示唆する重要な知見であると考えられた。リポソーム化 I-OHP では末梢神経毒性の軽減により治療の継続性を高めることを目標としているが、これは抗腫

瘍効果の増強にも繋がる因子であると考えられた。よって、次章では、本製剤の更なる有用性評価として、1-OHP 固有の毒性である末梢神経毒性を含む全般的な安全性を評価する。

第4章 製剤の特性を踏まえたリポソーム化 1-OHP の安全性に関する多角的評価

第1節 緒言

リポソーム化抗癌剤の臨床試験を目指すに当たっては、非臨床試験において、錠剤や注射剤のような一般的な剤形の製剤とは異なる考え方が求められる。例えば、Doxil®やOnivyde®では、内封された化合物はそれぞれドキソルビシン及びイリノテカンであり、既に承認された薬剤であるため、多くの毒性情報が入手可能である。一方で、リポソーム化抗癌剤はそれらを遊離型で投与した状態とは全く異なる体内動態を示すため[85]、リポソーム化抗癌剤の非臨床開発に関しては特別な注意を払う必要があり、厚生労働省より個別のガイドラインが発出されている[86]。当該ガイドラインによると、遊離型の抗癌剤単体での毒性データが入手可能である場合は、同じ臨床投与経路を用いてリポソーム化抗癌剤製剤の毒性評価を考慮すればよく、適切な動物種において反復投与毒性試験を実施することが推奨されている。企業研究においては、このような規制文書に沿った製剤特性の評価が求められ、特にリポソーム製剤などの必ずしも一般的とは言えない剤形の場合は、これらのガイドラインを踏まえたデータ収集の重要性が高くなる [87, 88]。

前述の反復投与毒性試験は、一般的に発現し得る血液毒性などの評価が中心となるが、抗癌剤固有の毒性がリポソーム化によってどのように変化するかを評価することも重要である。Oxaliplatin (1-OHP) は主に消化器癌で広く使用される薬剤であるが、臨床ではその投与によって末梢神経毒性が必発することが課題となっている [89]。この神経障害には、投与直後から発現する急性神経障害と、長期間の投与に伴って発現する遅発性の慢性神経障害がある [19, 20]。急性神経障害は、冷たい飲料などの低温刺激により惹起されるしびれ・疼痛などの知覚障害が知られている [21-23]。蓄積性の毒性である慢性神経障害は、手足のしびれや感覚異常、疼痛などを中心とした機械刺激によって発現することがわかっている。これらの神経障害は可逆性であるが故に、投与を中断すれば回復するが、治療継続性を著しく低下させることから、1-OHP レジメンの有用性を下げる要因となっている。このため、様々な予防・治療法が末梢神経毒性の緩和のために検討されているが、コンセンサスとなるようなものは現時点でも得られていない [25, 90-94]。薬物動態的な観点からこの発現機構を考察すると、1-OHP は血漿タンパク質への不可逆的結合や血球への移行が多いことが知られており[66]、意図しない全身への分布が関与していると考えられる。実際に1-OHP の PK と神経毒性の相関が報告されており [74, 95]、曝露の増加に伴う末梢組織への移行増大が関与していると考えられている。本研究で開発したリポソーム化 1-OHP は、血中での 1-OHP 漏出がほとんど無く、非選択的な体内分布を抑制することが示唆されており、このような体内動態制御によって、末梢組織への移行が少なくなることから、神経毒性の軽減に寄与する可能性がある。

さらに、リポソームの臨床使用においては、急性の **infusion-related reaction (IR)** が比較的よく認められることが知られている (Table 4-1)。IR は意図したものではなく、リポソームのようなナノ医薬品のみならず、リコンビナント抗体などのバイオ製品や核酸などでも薬効用量付近で発現することが知られている [96]。個々の薬剤でメカニズムは異なるが、臨床症状には共通項が多く、皮膚の紅潮や動悸、体の痛み、呼吸困難、悪寒・発熱など多様な症状が発現することが知られている。これら副反応は正確な評価が求められるだけでなく、5%未満の患者に稀に発生し得る重大な IR は、潜在的に致命的な結果をもたらすことがあるため適時に適切な処置が必要となる [97]。特に臨床試験の初期においては、被験薬に対する経験も蓄積されていないため、IR の発現頻度や強度を非臨床試験の中で評価できれば有用なリスク低減になり得る。実際に、本章の冒頭で述べたリポソーム製剤開発のガイドラインにおいても、潜在的な IR の評価を目的とした試験を考慮すべきと記載されている。IR の評価においては、ブタを用いた **complement activation-related pseudoallergy (CARPA)** 試験が知られている [98] (Figure 4-1)。これは、対象となる製剤をブタに投与し、種々の臨床反応を評価することで、IR に伴う症状の定量、感度、特異性、再現性、バラツキなどを評価することが可能となる。すなわち、IR の発現が非臨床試験から一定程度予測可能になることから、臨床初期の想定外事象が発生するリスクを低減するアプローチとなり得る。

Table 4-1: Representative IR symptom caused by intravenously administered Liposomal drug product [96]

Drug	Active ingredient	Type of liposome	Symptom
Doxil, Caelyx	Doxorubicin	Stelath liposome (PEGylated)	Flushing, shortness of breath, facial swelling, headache, chills, back pain, tightness in the chest or throat, hypotension
DaunoXome	Daunorubicin	Liposome (naked)	Back pain, flushing, chest tightness
Ambisome	Amphotericin B	Liposome (naked)	Chills, rigors, fever, nausea, vomiting, cardiorespiratory events
Onyvide	Irinotecan	Stelath liposome (PEGylated)	Rash, urticaria, periorbital oedema (pruritus)
Vyxeos	Daunorubicin and Cytarabine	Liposome (naked)	Dyspnoea, headaches, chills, rash, nausea, vomiting, oedema

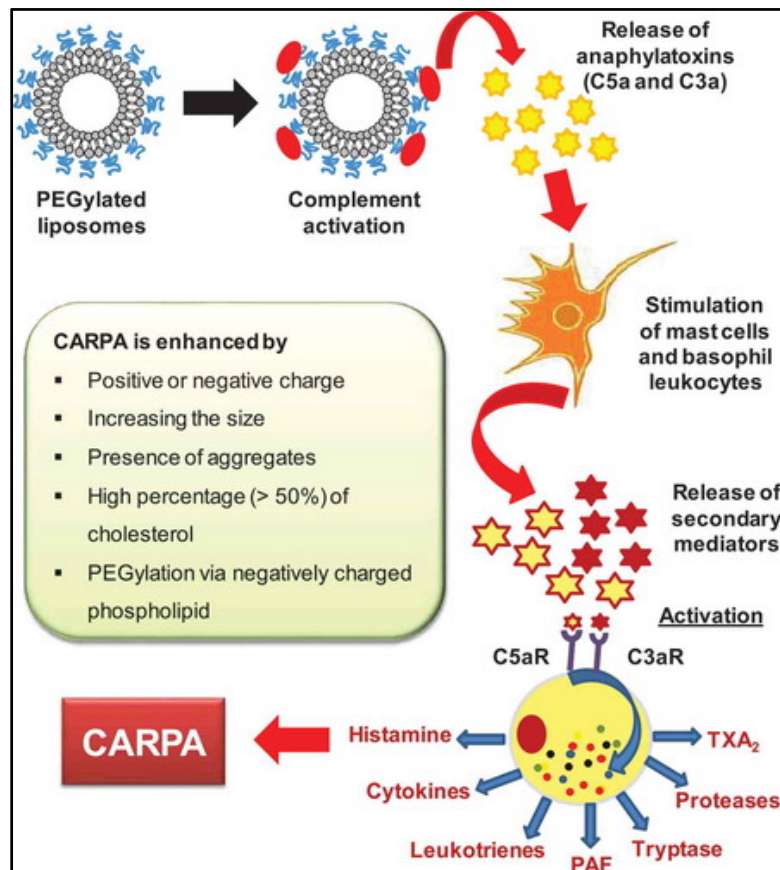


Figure 4-1: Mechanism of CARPA phenomenon induced by Liposomal drug products[99]

以上の背景から、本章ではリポソーム化 I-OHP の安全性を主軸とした検討を実施した。まずは、ラットに対する反復投与毒性試験を実施し、所見や体重変化、血液学的及び血液生化学的項目からリポソーム化 I-OHP の全般的な安全性を評価した。次いで、内封薬物である I-OHP に特徴的な神経毒性について検討した。I-OHP の DDS 化によって最も期待されるのが、神経毒性軽減であるが、既報を参考としたラットモデルにおいて、冷感及び機械的刺激に対する反応の両面から検討した。最後に、キャリアであるステルスリポソームに特徴的な毒性である IR について、CARPA モデルを用いて評価した。Doxil®や Onivyde®などステルスリポソームの IR 発現については一定の知見はあるものの、抗癌剤の種類にも依存することが示唆されていることから、リポソーム化 I-OHP におけるデータを取得することは重要である [100].

第2節 実験方法

第1項 試薬及び原料

水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine; HSPC), コレステロール及び 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (mPEG2000-DSPE)は日油株式会社(東京, 日本)から購入した. 1-OHP は Heraeus GmbH (Hanau, Germany) から購入した. Caelyx (Liposomal doxorubicin, equivalent to Doxil) は Janssen Pharmaceutics N.V.から購入した.

また, zymosan は Sigma から購入した. Thromboxane B2 (TxB2) kit は Amersham (UK)から購入した. その他, 実験に用いた試薬は分析グレード以上のものを用いた.

第2項 1-OHP 封入リポソームの調製

第3章 第2節 第2項に示した調製法及び分析法を用いた.

第3項 使用した動物

リポソーム化 1-OHP の繰り返し投与による一般毒性評価及び末梢神経毒性評価では, Crl:CD (SD)ラット (雄, 5 週齢) を日本チャールズ・リバー (神奈川, 日本) から購入して用いた. 実験動物は飲料水と餌に自由にアクセスでき, 管理された環境条件 (一定の温湿度, 12 時間の暗・明サイクル) 下で飼育した.

リポソーム化 1-OHP の IR 評価には, CAPRA モデルとして感受性の高いブタを用いた. Duroc and Hungarian landrace の混合品種の雄ブタ (14~18 週齢, 20~25kg) を, Research Institute of Animal Breeding and Nutrition (Herceghalom, Hungary)から購入した. 実験動物は飲料水自由にアクセスでき, 餌は一日二回専用の飼料を与えた.

第4項 ラットにおけるリポソーム化 1-OHP の反復投与毒性試験

遊離型 1-OHP, リポソーム化 1-OHP とともに, 1-OHP として 10 mg/kg (iv)で 2 週間に 1 回投与し, それを 3 回継続した. 投与期間中は臨床症状, 死亡率, 体重変化を計測し, 終了時に血球数の計測及び肝機能評価を通じて毒性を評価した. 血球数の計測は, 血液測定装置 ADVIA120 (Siemens Healthcare Diagnostics Manufacturing Ltd.)を用いて, 白血球 (WBC), 赤血球 (RBC) 及び血小板 (platelet) を測定した. また, 血液生化学的評価として, 自動分析装置 JCA-BM6070 (JEOL Ltd.) を用いて AST 及び ALT を測定した.

第5項 ラットにおけるリポソーム化 1-OHP の末梢神経毒性評価

ラットを用いた末梢神経毒性の評価においては, 過去の検討や既報 [101, 102]の結果に基づき, 1-OHP として 2 mg/kg (iv), 4 mg/kg (iv)で, 2 回/週で 2 週間投与を継続した. 今回の投与条件における 1-OHP の薬理作用の発現を確認するため, 投与期間中のラットの体重変化も記録した.

機械刺激に対する末梢神経毒性評価には von Frey test[103]を用いた。対象となるラットを測定用ケージ（底部が網状の構造）に収容し、左後肢及び右後肢の足蹠に von Frey フィラメント（0.6, 1.0, 1.4, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 15.0 及び 26.0 g）で刺激し、2回連続してフィラメント刺激に対する等比反応が見られた値（フィラメントのグラム数）を疼痛閾値として記録した。両肢の結果の合計値をデータとして採用した。

冷感刺激に対する神経毒性は Jourdan らの方法に準じた手法を採用した [101]。10°C（許容範囲： $\pm 0.2^\circ\text{C}$ ）に設定したユニットクールサーモ（UTC-1000, アズワン株式会社）を用いて、ラットの尾の先端部から尾根部に向かって約 5 cm のところまでを恒温槽の冷水に浸漬し、ラットの尾における冷感刺激の反応時間を測定した。

本実験におけるデータは、平均値 \pm 標準誤差で表示し、各測定ポイントで有意差検定を実施した。5%未満を有意水準として採用した（SAS 9.1.3, SAS Institute Japan）。また、control に対する薬剤投与群は Dunnett 検定（両側）、遊離型 I-OHP に対するリポソーム化 I-OHP は Student の t 検定（両側）で評価した。

第 6 項 ブタを用いた CARPA モデルによるリポソーム化 I-OHP の IR 評価

ブタを用いた CAPRA 評価の詳細については、既報の方法に従って行った[104, 105]。簡潔に、麻酔下・閉胸状態において、リポソーム化 I-OHP を投与（個々の実験における投与量・投与方法・スケジュールについては Table 4-9 及び 4-10 に示した）し、心血管系パラメータ、呼吸、皮膚、体温や血球測定により評価した。

動物は Calypsol/Xilazine で鎮静させた後、イソフルラン（O₂ 中 2~3%）の吸入により麻酔した。また、全ての手術はポビドンヨード（10%）で皮膚を消毒した後、実施した。気道の確保を目的とし、気管内に 6-7 号の気管用チューブを挿管し、必要に応じて強制換気を可能な状態とした。実験中、動物は自発的な呼吸が可能であった。呼吸はパルスオキシメーター（尾部に固定）を用いて組織酸素飽和度（SpO₂）を測定することでモニターし、体温は直腸で測定した。手術中は気管チューブにカプノグラフ（CAP10 Medlab, Medlab Medizinische Diagnosegeräte GmbH, Karlsruhe, Germany）を接続し、終末呼気 CO₂ 濃度（EtCO₂）と呼吸数をモニターした。肺動脈血圧（PAP）は、Swan-Ganz catheter（AI-07124, 5 Fr, 110 cm, Arrow Internat Inc.）を右外頸静脈から肺動脈に導入し、測定した。さらに、全身動脈圧（SAP）を記録するために左大腿動脈に、生理食塩水や薬剤の投与ルートとして左外頸静脈に、血液のサンプリングルートとして左大腿静脈に、カテーテルを設置した。血液サンプルの分析には Diatron Vet haematology analyzer（Diatron MI PLC, Budapest, Hungary）を用いた。なお、本実験では、PAP、SAP 及び心拍数（HR）の変化をモニターし、その他のパラメータは PAP の変化と一致しているので本論文では提示しない [104, 105]。

参考までに、実験に用いたブタの系統における過去 4 年間の PAP、SAP 及び HR の平均値（n=144）は以下の通りであった。

- ✓ PAP (mmHg): 10.53 ± 2.732
- ✓ SAP (mmHg): 69.54 ± 9.684
- ✓ HR (BPM): 96.68 ± 15.415

第3節 結果及び考察

第1項 ラットにおけるリポソーム化 I-OHP の反復投与毒性試験

第3章 第2節で示した通り、担癌マウスモデルを用いた検討において、リポソーム化 I-OHP は、I-OHP の体内動態を制御することで、腫瘍への分布様式・移行量の改善、抗腫瘍効果の増強を達成できた。また、I-OHP の半減期の延長及び分布の変化によって毒性発現が影響を受ける可能性があるが、担癌マウスモデルを用いた検討では I-OHP に対して少なくとも体重変化にみる毒性の上乗せは無かった。しかしながら、臨床を目指した製剤開発においては、体重変化のみならず、より広範な評価が必要であり、また、緒言での述べたように規制への対応を踏まえ、ガイドラインを参照した繰り返し投与時の安全性評価が必要である。よって、本検討では、より詳細な毒性評価及びガイドラインへの対応を目的として、ラットを用いた繰り返し投与時の安全性を検討することとした。この際、遊離型 I-OHP (市販されている I-OHP 製剤) との比較が重要となるため、その致死用量が 18~24 mg/kg (単回投与) 付近であることから、14 mg/kg を繰り返し投与時の maximum tolerated dose (MTD) に設定し、1水準下の dose として 10 mg/kg を設定し、リポソーム化 I-OHP の安全性を評価した。

Table 4-2 にラットの臨床所見及び最終評価期間までの死亡率を示す。遊離型 I-OHP の投与群 (10 and 14 mg/kg) においては、自発行動の減少、低体温、軟便、るい瘦、呼吸の低下、側臥位及び皮膚の蒼白など、非常に多くの所見が観察された。一方で、リポソーム化 I-OHP の投与群においては、いずれの投与量においてもいかなる臨床所見も確認されなかった。合わせて、評価期間 (投与開始から 42 日まで) において、遊離型 I-OHP の投与群 (10 and 14 mg/kg) ではおよそ半数の個体が死亡、もしくは瀕死状態のため犠牲死されたのに対し、リポソーム化 I-OHP ではそのような個体は認められなかった。

Table 4-2: Systemic toxicity caused by 3 repeated doses of liposomal I-OHP (clinical sign, mortality)

	Control	Oxalipaltin		Liposomal-Oxalipaltin	
		10 mg/kg	14 mg/kg	10 mg/kg	14 mg/kg
Clinical sign	No clinical sign	Decrease in spontaneous activity, Hyperthermia, Soft stool, Emaciation, Bradypnea, lateral position, blanching/pale skin		No clinical sign	No clinical sign
Mortality (%)*	0 (0/5)	62.5 (5/8)	50.0 (4/8)	0 (0/8)	0 (0/8)

* Mortality, which includes death and sacrifice due to moribundity, was evaluated at the timing of study completion.

次いで、Table 4-3 に各群における体重変化を示す。最終投与 (3rd dosage) の 5 日後までに、I-OHP 投与群で死亡、または瀕死状態に伴う犠牲死により例数が減少したため、31 日の体重測定を最終ポイントとした。いずれの群においても経時的な体重の増加が確認されたが、その程度は Control 群で最も大きかった。リポソーム化 I-OHP (10 and 14 mg/kg) は Control 群よりも体重増加が少なく、投与量間で明確な違いを認めなかった。遊離型の I-OHP

投与群においては、さらに体重増加の抑制が確認され、また、その程度は 10 mg/kg よりも 14 mg/kg で顕著であり、投与量依存的であった。以上のことから、両薬剤において、投与によって体重増加の抑制をもたらすような毒性が発現しており、その程度は遊離型 I-OHP で強いと考えられた。

Table 4-3: Systemic toxicity caused by 3 repeated doses of liposomal I-OHP (body weight change)

Day	Control		Oxaliplatin				Liposomal-Oxaliplatin			
			10 mg/kg		14 mg/kg		10 mg/kg		14 mg/kg	
0	182.8	± 6.6	183.1	± 4.8	181.9	± 5.5	183.4	± 6.4	181.5	± 6.5
7	245.4	± 9.7	205.9	± 7.0	201.3	± 13.6	227.5	± 13.4	220.6	± 9.0
14	300.9	± 16.0	252.0	± 16.7	243.3	± 12.3	277.1	± 23.9	268.5	± 13.8
21	340.3	± 19.5	255.4	± 32.9	245.8	± 12.9	303.9	± 30.5	293.0	± 17.8
28	374.9	± 23.7	261.8	± 60.4	243.4	± 39.2	333.4	± 37.7	321.9	± 17.4
31*	387.1	± 20.9	292.3	± 20.8	256.3	± 24.7	337.9	± 36.6	321.4	± 16.5

* Day 31 was the final day of safety assessment by multiple death or sacrifice due to the severe toxicity in Oxaliplatin-treated group.

さらに、投与終了後の血球数を測定し、Table 4-4 に示した。代表的な血液学的な毒性の指標となる白血球、赤血球及び血小板について評価した。まず、白血球について Control と比較すると、リポソーム化 I-OHP の両投与量ではわずかに増加傾向が認められ、遊離型 I-OHP では顕著な減少が確認された。この減少は 10 mg/kg と 14 mg/kg で概ね同程度であったことから、白血球に対する毒性は plateau に達していると考えられた。同様の傾向は血小板数においても確認され、リポソーム化 I-OHP では若干の増加傾向、遊離型 I-OHP では顕著な減少が確認された。但し、10 mg/kg と 14 mg/kg の減少の程度は投与量依存的であった。最後に赤血球については、他の血球より程度は小さいものの、同様の傾向であった。リポソーム化 I-OHP 投与群では Control に対する減少幅が小さく、遊離型では大きかった。以上のことから、血液学的な評価においても、リポソーム化 I-OHP の安全性の高さを示すことができた。

リポソーム化 I-OHP を投与した群において、Control よりも白血球・血小板数が増加傾向にあった。通常、抗癌剤投与に伴う骨髄抑制では、血球減少を補うために造血系が血球の産生速度を高めるが、リポソーム化 I-OHP では骨髄抑制が軽度であったため、骨髄抑制による血球減少よりも造血系の産生速度が上回ったためにこのような現象が見られたと考えている。また、血小板減少については、末梢神経毒性ほどではないものの、I-OHP を用いた治療で課題となる毒性の一つであるが [106]、遊離型 I-OHP でこの毒性が強く発現した系において、リポソーム化 I-OHP では軽度であったことから、更なる有用性を示す結果であると考えられた。

Table 4-4: Hematological toxicity caused by 3 repeated doses of liposomal l-OHP

Hematology	Control	Oxalipaltin		Liposomal-Oxalipaltin	
		10 mg/kg	14 mg/kg	10 mg/kg	14 mg/kg
WBC (10^3 xuL)	8.9 ± 1.5	1.9 ± 0.2	1.1 ± 0.5	10.3 ± 2.4	10.3 ± 3.0
RBC (10^6 xuL)	8.0 ± 0.3	6.5 ± 1.5	3.8 ± 1.7	6.5 ± 0.7	6.5 ± 0.8
Platelet (10^5 xuL)	8.7 ± 0.6	4.5 ± 3.2	1.7 ± 2.2	10.7 ± 2.9	11.5 ± 1.9

最後に、血液生化学的な項目として AST, ALT の測定結果を Table 4-5 に示した。遊離型 l-OHP 及びリポソーム化 l-OHP のいずれの投与群においても、AST 及び ALT の項目で Control との顕著な違いを認めなかった。一般に、リポソーム製剤の主要な消失経路として肝臓への蓄積が挙げられるため、肝臓への毒性には注意を払うべきである。今回評価した AST 及び ALT は肝臓に対する傷害の指標となるが、Control と比較して、遊離型 l-OHP 及びリポソーム化 l-OHP において、いずれの投与量でも明確な差を認めなかった。この結果から、リポソーム化 l-OHP が顕著な肝毒性を示す可能性は低いと考えられた。これは、遊離型 l-OHP がそうであったように l-OHP 自体が肝細胞に対する影響が小さいと考えられること、静脈内投与されたリポソームは肝臓に蓄積するものの直接の取り込み経路はマクロファージ等による貪食であるため肝実質細胞では無いこと、等が要因であると考えられた。

Table 4-5: Hepatic toxicity caused by 3 repeated doses of liposomal l-OHP

Blood chemistry	Control	Oxalipaltin		Liposomal-Oxalipaltin	
		10 mg/kg	14 mg/kg	10 mg/kg	14 mg/kg
AST (IU/L)	73.6 ± 10.7	64.3 ± 15.7	74.5 ± 21.7	68.6 ± 13.0	73.2 ± 9.0
ALT (IU/L)	32.0 ± 5.2	36.0 ± 12.1	30.5 ± 7.5	32.6 ± 3.9	28.8 ± 0.8

第2項 ラットにおけるリポソーム化 I-OHP の末梢神経毒性評価

前項で示したように、リポソーム化 I-OHP は、遊離型 I-OHP に対して顕著な一般毒性の軽減に成功した。一方で、I-OHP に特徴的な毒性である末梢神経毒性については未評価であった。本項では、リポソーム化がもたらす I-OHP の末梢神経毒性への影響について、冷感刺激及び機械刺激による疼痛閾値を指標として、ラットを用いた tail immersion 法及び von Frey method によりそれぞれ評価した (Figure 4-2)。遊離型及びリポソーム化 I-OHP の投与量は、それぞれ 2 及び 4 mg/kg を設定した。

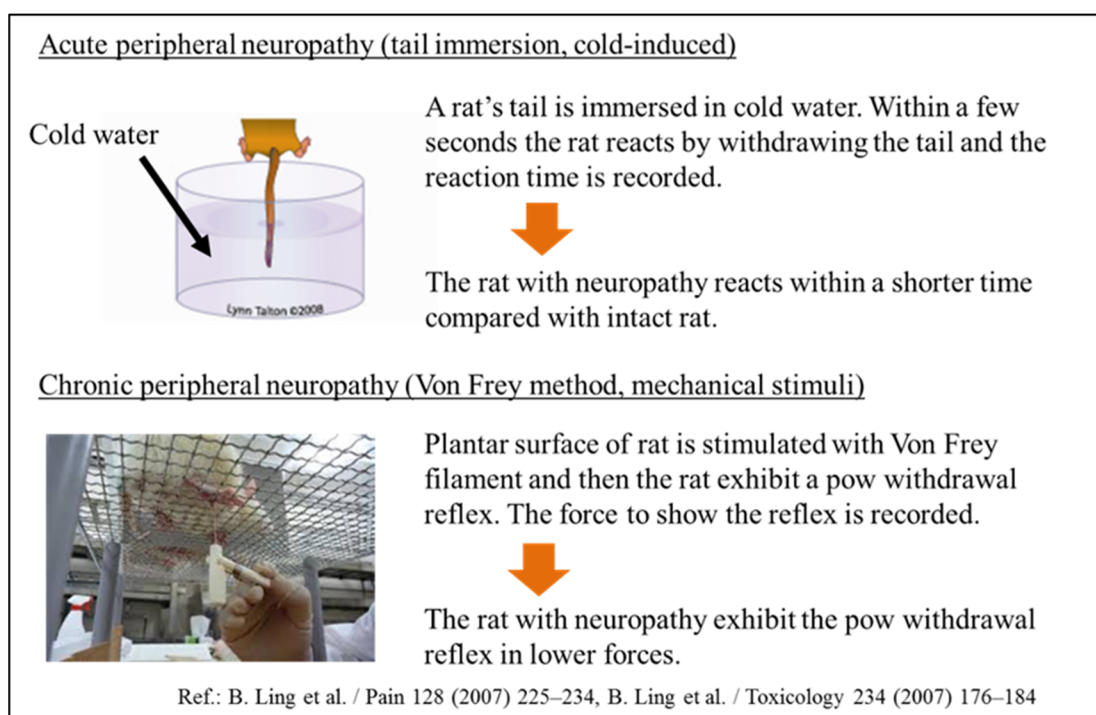


Figure 4-2: Assessment of peripheral neuropathy in pre-clinical rat model

冷感刺激に対する疼痛閾値変化の結果を Figure 4-3 及び Table 4-6 に示す。遊離型 I-OHP の投与群においては、2 及び 4 mg/kg の両投与量において、Control と比較して Day 14 から Day 35 まで継続して疼痛閾値の低下が確認された。すなわち、臨床で確認されている副作用と同様に、末梢神経毒性が発現し、冷感に対する感受性が増大したと考えられた。また、遊離型の I-OHP では今回の両投与量でほぼ同等の疼痛閾値が確認されたことから、冷感刺激に対する感受性増加は 2 mg/kg で頭打ちになっていると考えられた。一方で、リポソーム化 I-OHP は、4 mg/kg の投与群において、Day 21 から Day 35 まで継続して Control に対する有意な疼痛閾値の低下が認められたが、2 mg/kg においては、Day 35 でのみ有意な疼痛閾値の低下が認められ、その他の時点においては Control と同等であった。以上の結果から、リポソーム化 I-OHP は 4 mg/kg でも疼痛閾値低下が軽減される傾向にあり、また、その持続期間も短いことから、冷感過敏の惹起が、遊離型よりも軽度であると考えられた。

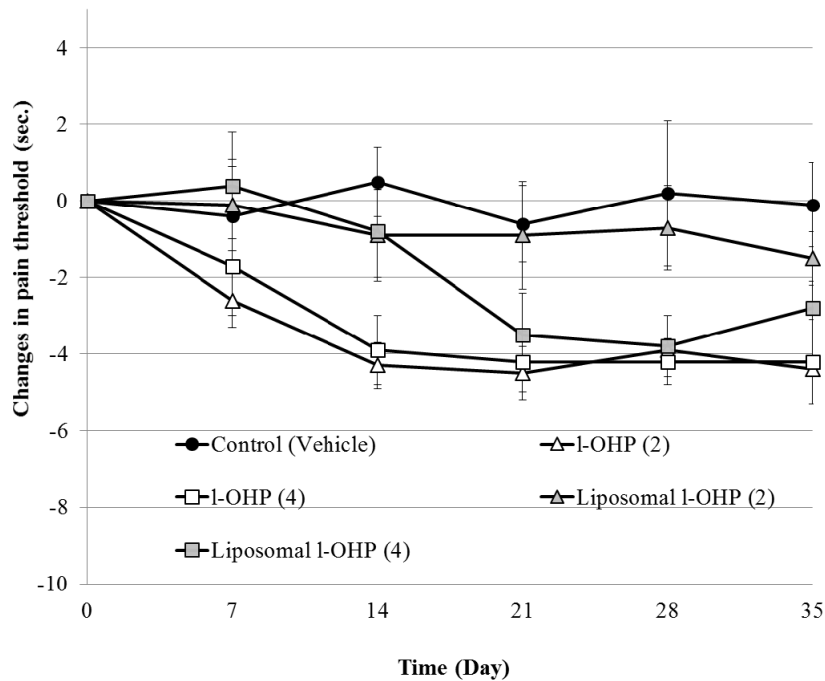


Figure 4-3: Time course changes in pain threshold by l-OHP administration (cold stimuli)

Table 4-6: Effects of Liposomal l-OHP on pain threshold (response latency, cold stimuli) in rats

Test group	Volume (mL/kg)	N	Experimental day					
			Pre	7	14	21	28	35
Pain threshold (Response latency, sec)								
Control	2	6	9.6 ±1.2	9.2 ±0.7	10.1 ±0.8	9.1 ±0.7	9.8 ±1.0	9.5 ±0.7
Liposomal l-OHP (2 mg/kg)	2	6	8.4 ±1.0	8.4 ±1.2	7.6 ±0.6 #	7.6 ±0.5 ##	7.7 ±0.6 #	6.9 ±0.6 **
l-OHP (2 mg/kg)	2	6	9.7 ±0.7	7.1 ±0.8	5.4 ±0.3 **	5.2 ±0.4 **	5.8 ±0.4 **	5.3 ±0.3 **
Liposomal l-OHP (4 mg/kg)	4	6	8.9 ±0.7	9.3 ±0.9	8.1 ±1.0 b	5.4 ±0.6 **	5.1 ±0.5 **	6.1 ±0.2 **
l-OHP (4 mg/kg)	4	6	8.6 ±1.1	6.9 ±1.1	4.8 ±0.6 **	4.4 ±0.6 **	4.4 ±0.5 **	4.4 ±0.1 **

Test solutions were administered intravenously twice a week for 2 weeks.

Each value represents the mean ± S.E.

Pain threshold (Response latency, sec) was measured by the tail immersion test (10° C).

** : P<0.01; significant difference from control group by Dunnett's multiple comparison test

: P<0.05, ## : P<0.01; significant difference between Liposomal l-OHP (2 mg/kg) and l-OHP (2 mg/kg) group by Student's t-test

b : P<0.05, bb : P<0.01; significant difference between Liposomal l-OHP (4 mg/kg) and l-OHP (4 mg/kg) group by Student's t-test

次いで、機械刺激に対する疼痛閾値の結果を Figure 4-4 及び Table 4-7 に示した。遊離型 l-OHP の投与群においては、2 及び 4 mg/kg の両投与量において、Control と比較して Day 7 から Day 35 まで継続して疼痛閾値の低下が確認された。すなわち、上述の冷感刺激の実験と同様に臨床での副作用を反映するように、末梢神経毒性が発現し、機械刺激に対する感受性が増大したと考えられた。リポソーム化 l-OHP は、4 mg/kg の投与群において、Day 7 から Day 35 まで継続して Control に対する有意な疼痛閾値の低下が認められたものの、遊離型の 2 mg/kg と比較しても、疼痛閾値低下が有意に抑制された。また、驚くべきことに、リポソーム化 l-OHP の 2 mg/kg では、評価の全期間において疼痛閾値の低下が認められなかった。以上の結果から、遊離型の l-OHP では今回の両投与量でほぼ同等の疼痛閾値が確認されたことから、機械刺激に対する感受性増加は 2 mg/kg で頭打っていると考えられた。他方では、リポソーム化 l-OHP は 4 mg/kg でも遊離型の 2 mg/kg より軽度であり、リポソーム化の 2 mg/kg では発現しないという結果になった。よって、本モデルにおける末梢神経毒性の発現は、リポソーム化 l-OHP を使用することで完全に抑制することはできないものの、遊離型に対しては有意に抑制可能であると示唆された。このことは臨床における治療可能期間の延長や、中断期間の短縮に貢献する可能性があり、リポソーム化 l-OHP を開発することは、末梢神経毒性に苦しむ患者への貢献につながると考えられた。

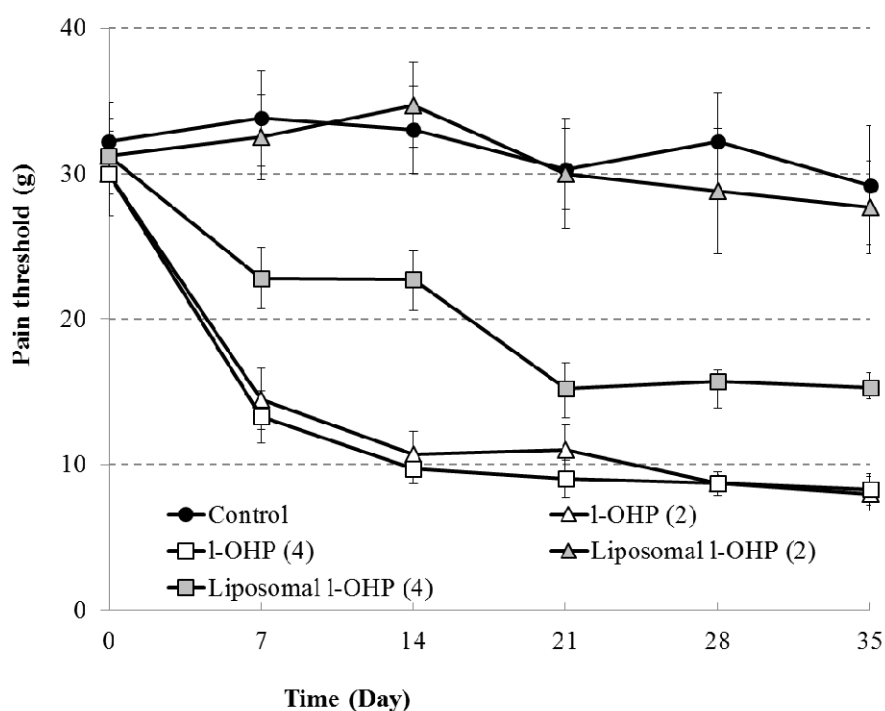


Figure 4-4: Time course changes in pain threshold by l-OHP administration (mechanical stimuli)

Table 4-7: Effects of Liposomal l-OHP on pain threshold (mechanical stimulus) in rats

Test group	Volume (mL/kg)	N	Experimental day					
			Pre	7	14	21	28	35
Pain threshold (mechanical stimulus, g)								
Control	2	6	32.2 ±2.7	33.8 ±3.3	33.0 ±3.0	30.3 ±2.8	32.2 ±3.3	29.2 ±4.1
Liposomal l-OHP (2 mg/kg)	2	6	31.2 ±2.6	32.5 ±2.9	34.7 ±2.9	30.0 ±3.8	28.8 ±4.3	27.7 ±3.2
l-OHP (2 mg/kg)	2	6	30.0 ±2.9	14.5 ±2.1 **	10.7 ±1.6 **	11.0 ±1.7 **	8.7 ±0.8 **	8.0 ±1.2 **
Liposomal l-OHP (4 mg/kg)	4	6	31.2 ±3.5	22.8 ±2.1 *	22.7 ±2.0 *	15.2 ±1.8 **	15.7 ±0.8 **	15.3 ±1.0 **
l-OHP (4 mg/kg)	4	6	30.0 ±2.9	13.3 ±1.8 **	9.7 ±1.0 **	9.0 ±1.3 **	8.7 ±0.8 **	8.3 ±1.1 **

Test solutions were administered intravenously twice a week for 2 weeks.

Each value represents the mean ± S.E.

Pain threshold (g) was measured with von Frey filament by mechanical stimulus.

*: P<0.05, **: P<0.01; significant difference from control group by Dunnett's multiple comparison test

#: P<0.01; significant difference between Liposomal l-OHP (2 mg/kg) and l-OHP (2 mg/kg) group by Student's t-test

b: P<0.05, bb: P<0.01; significant difference between Liposomal l-OHP (4 mg/kg) and l-OHP (4 mg/kg) group by Student's t-test

最後に、本実験結果の妥当性評価の一環として、用いたラットの体重変化の結果を Figure 4-5 及び Table 4-8 に示す。これまでの検討において、遊離型及びリポソーム化 l-OHP はいずれも、投与に伴う薬物動態学的・薬力学的な反応として、一般的な毒性の指標である体重変化が見られることがわかっている。よって、本モデルでの体重変化を確認することで、適切な l-OHP の曝露の下で神経毒性の多寡を評価していることが確認できると考えた。Control と比較して、遊離型及びリポソーム化 l-OHP の 2 mg/kg では体重増加が抑制傾向にあり、4 mg/kg では有意な抑制が認められた。よって、今回の投与条件においても両剤が薬理作用を発揮するような十分な曝露が得られており、適切な条件下で評価されたと考えられた。

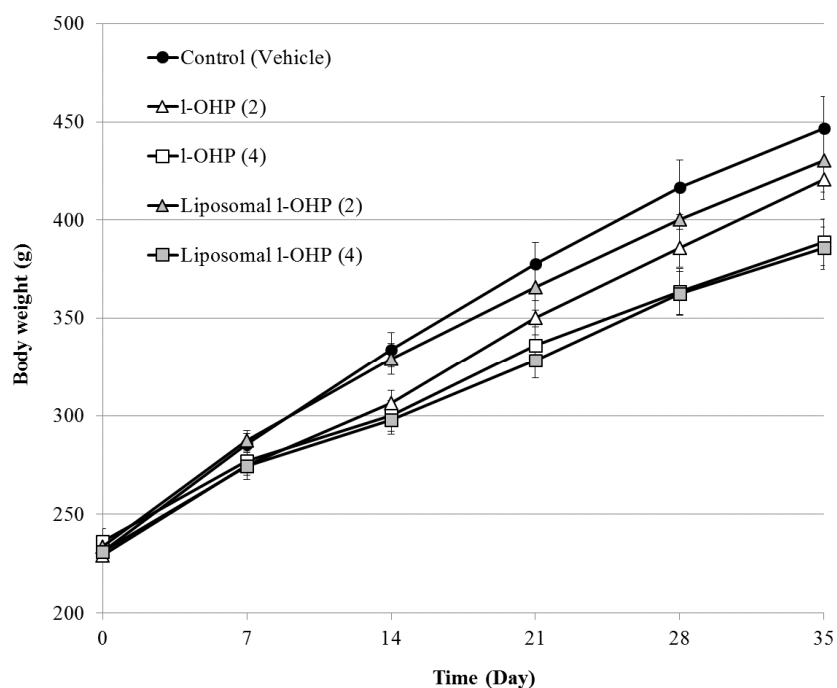


Figure 4-5: Time course changes in body weight by I-OHP administration

Table 4-8: Effects of Liposomal I-OHP on body weight in rats

Test group	Volume (mL/kg)	N	Experimental day					
			Pre	7	14	21	28	35
Control	2	6	230.9 ±3.7	285.4 ±5.6	333.7 ±8.9	377.5 ±11.2	416.5 ±13.9	446.8 ±16.0
Liposomal I-OHP (2 mg/kg)	2	6	233.4 ±4.4	287.3 ±5.3	329.0 ±8.0	365.7 ±11.7	400.2 ±15.4	430.2 ±16.2
I-OHP (2 mg/kg)	2	6	229.3 ±2.8	274.7 ±3.9	306.3 ±6.5	350.1 ±8.8	385.7 ±9.6	420.6 ±10.2
Liposomal I-OHP (4 mg/kg)	4	6	231.0 ±4.2	274.4 ±6.8	297.7 ±7.2 *	328.2 ±8.9 **	362.5 ±11.2 *	385.7 ±10.7 *
I-OHP (4 mg/kg)	4	6	236.3 ±6.3	277.1 ±7.4	300.0 ±7.8 *	336.0 ±9.6 *	363.5 ±11.6 *	388.6 ±11.9 *

Test solutions were administered intravenously twice a week for 2 weeks.

Each value represents the mean ± S.E.

*: P<0.05, **: P<0.01; significant difference from control group by Dunnett's multiple comparison test

No significant difference between Liposomal I-OHP (2 mg/kg) and I-OHP (2 mg/kg) group by Student's t-test (P>0.05)

No significant difference between Liposomal I-OHP (4 mg/kg) and I-OHP (4 mg/kg) group by Student's t-test (P>0.05)

第3項 ブタを用いた CARPA モデルによるリポソーム化 I-OHP の IR 評価

本項では、リポソームなどのナノ DDS を静脈内投与した際に生じる infusion-related reaction (IR) について、リポソーム化 I-OHP での発現有無を評価した。検討では合計 4 匹のブタを用い、n=2 で 2 つの実験を実施した。まず始めに、リポソーム化 I-OHP の IR 惹起作用の評価を目的とし、bolus 及び infusion で投与量・速度の影響を評価した。本実験における投与プロトコルを Table 4-9 に示した。Table 4-9 の投与プロトコルに従って投与した際の心血管系パラメータ (PAP, SAP, HR) の変動を Figure 4-6 に示した。最も過敏に pseudoallergic 反応を反映するパラメータは、PAP と SAP であり、HR の変化は重篤な SAP の変化に伴う二次的なものと解釈される[104, 105]。

陰性対照である Saline 5 mL を 5 秒間で静脈内投与し、パラメータの変動を評価したところいずれの動物でも変化を認めなかった。次いで、0.1 mg PL/kg (リン脂質量として) の投与量でリポソーム化 I-OHP を投与したところ、いずれのブタでも同様の挙動であり、Animal# 1-1 の場合を記載すると、投与 2 分後の PAP が 0.97 mmHg、SAP が 1.4 mmHg 上昇し、わずかな変動を認めたが、生理学的に明らかな心血管系の変化は起こらなかった。さらに、Animal# 1-1 では 10 倍量である 1.0 mg PL/kg、Animal# 1-2 では再度 0.1 mg PL/kg の投与を実施したところ、いずれも変化は無かった。よって、初回投与ではわずかな心血管系パラメータの変動を認めたものの、以降の投与では変動を認めなかったことから、リポソーム化 I-OHP は明確な IR を誘導しない、もしくは脱感作作用を有する可能性があると考えられた。

さらに、臨床投与を模した形で infusion 投与における変化も評価した。Infusion 投与においては低速 (30 mL/h) での注入による変動を見極めた後に、投与速度 (150 mL/h) でも評価した。3.0 mg/kg のリポソーム化 I-OHP を 30 mL/h で開始したところ、緩やかに軽度な PAP 上昇を引き起こした。また、SAP は変化を認めなかったが HR は徐々に上昇する傾向が見られた。Infusion の開始から 15 分後に投与速度を 150 mL/h に上げると、さらにゆっくりとした PAP の上昇が起こり、注入終了までのその高値は維持された。低速投与時と同様に SAP は変化しなかったが、HR はわずかながら緩やかな上昇を示した。これは長時間の麻酔による影響であると考えられた。点滴投与中に観察された緩徐な変動はすべて生理的に生じ得る変動の範疇であり、薬剤投与による明確な影響はないと考えられた。

実験の最後に、陽性対象としての Zymosan A を投与したところ、投与後 1 分で急激な PAP の上昇とわずかな HR 上昇を認めた。また、Animal# 1-2 では軽度の SAP 上昇も観察された。Zymosan 投与により、全身及び肺局所において二相性の血管作動性を示す典型的な過敏性反応が生じたものと考えられた。

Table 4-9: Administration protocol of liposomal l-OHP to evaluation of IR induction

Animal #	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Step 5
1-1	Saline (Negative control)	Liposomal l-OHP (bolus, 0.1 mg PL/kg)	Liposomal l-OHP (bolus, 1 mg PL/kg)	Liposomal l-OHP (infusion, 3 mg/kg, increased from 30 to 150 mL/h)	Zymosan A (0.1 mg/kg) (positive control)
1-2		Liposomal l-OHP (1st) (bolus, 0.1 mg PL/kg)	Liposomal l-OHP (2nd) (bolus, 0.1 mg PL/kg)	Liposomal l-OHP (infusion, 3 mg/kg, Increased from 30 to 150 mL/h)	

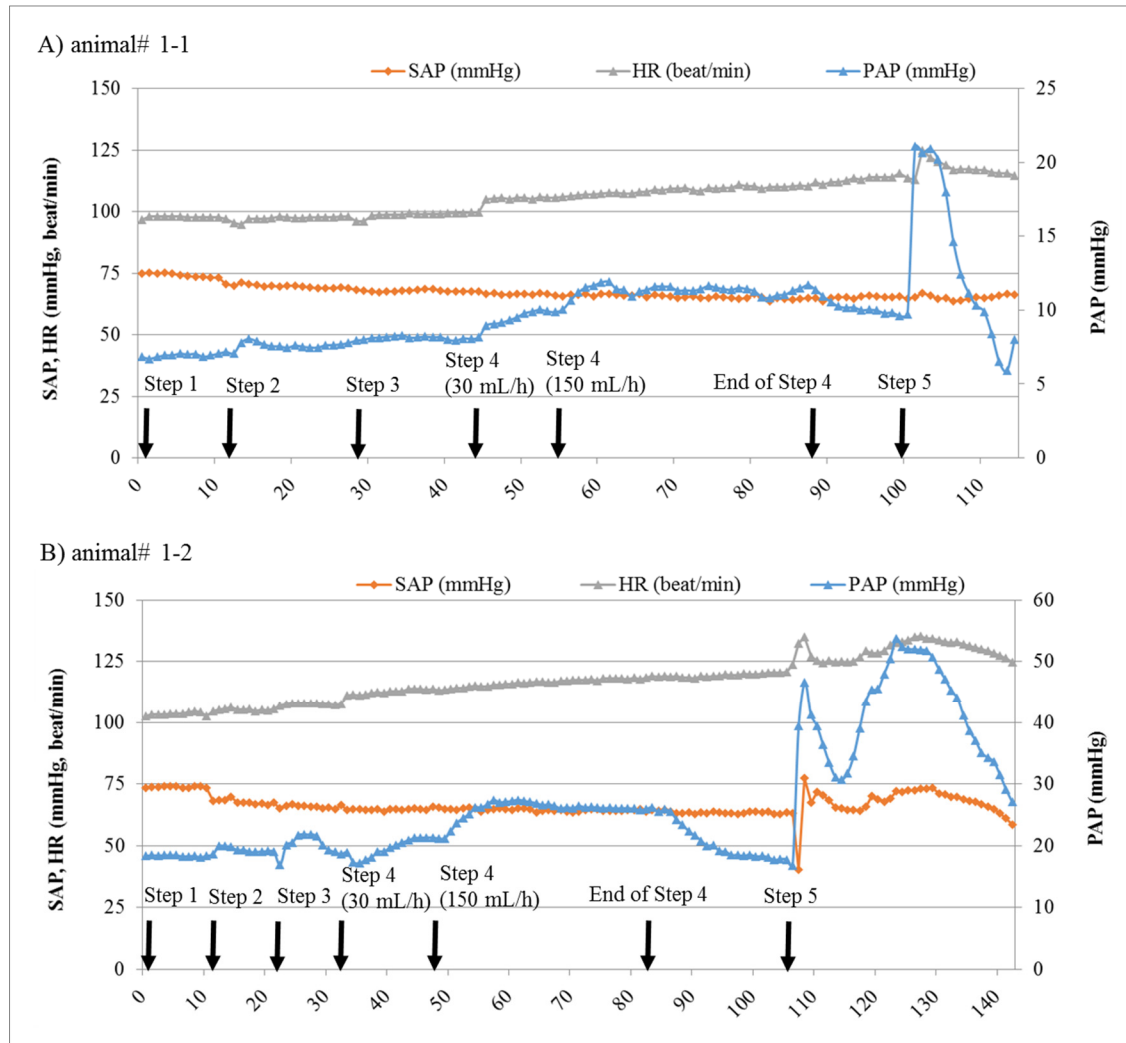


Figure 4-6: Cardiovascular changes recorded in animal# 1-1 and 1-2 following treatment with liposomal l-OHP.

The upper and lower panels present the same data in absolute blood pressure and heart rate values and in %, related to baseline.

先の実験において、リポソーム化 I-OHP は明確な IR を誘導しない、もしくは脱感作作用を有すると示唆された。よって、本実験では、Saline 投与の後、治療用量の投与で点滴投与することで、リポソーム化 I-OHP の IR をより鋭敏に捉えることを目的とした。本実験の投与プロトコールを Table 4-10 に示した。投与プロトコールに従って処置した際の心血管系の変化 (PAP, SAP, HR) を Figure 4-7 に示した。

まず、陰性対照である Saline 5 mL を 5 秒で静脈内投与し、心血管パラメータに影響を与えないことを確認した。次いで、治療用量相当 (3 mg/kg) の投与量で点滴投与を開始した。低速投与 (30 mL/h) を開始したところ、先の検討と同様に、ゆっくりとした軽度の PAP 上昇を示し、SAP の低下と HR のわずかな低下が確認された。点滴速度を 150 mL/h に上げたところ、更なる PAP の緩徐な上昇が見られ、投与終了時に最大値となった。輸液中の SAP 上昇は 3.7 mmHg と最小で、ゆっくりと安定した HR の上昇 (4.5%) が見られた。これらの変化はすべて生理学的に重要なものではなかった。本実験系における 3 mg/kg の投与は、PAP の緩やかな上昇を惹起したのみで、有意な過敏症を発現しなかった。

リポソーム化 I-OHP の投与終了後に、上市済みステルスリポソーム製剤であるリポソーム化ドキシソルビシン(Doxil/Caelyx)を bolus で投与した。Doxil は心血管系パラメータに影響することが確認されているため [107], 交差性の脱感作の有無を評価することができる。Figure 4-7 の Step 3 で示したように、0.5 mg/kg でリポソーム化ドキシソルビシンを投与してもパラメータに顕著な変化が認められなかったことから、リポソーム化 I-OHP と Doxil の間に交差性の脱感作作用が存在することが示された。実験の最後に、陽性対照である Zymoxan A を静脈内投与すると、急激な PAP, SAP 及び HR の上昇が確認され、典型的な過敏症様反応が引き起こされた。

以上の結果から、リポソーム化 I-OHP の初回点滴投与においても過敏症反応やアナフィラキシーの惹起を示唆するデータは得られなかった。一般にステルスリポソームなどのナノ DDS 製剤では infusion reaction の発現は不可避であると考えられているが、驚くべきことに、本検討で調製したリポソーム化 I-OHP では発現リスクは高くないと考えられた。また、Doxil との交差性脱感作を有することも示唆された。

Table 4-10: Administration protocol of liposomal I-OHP and Doxil to evaluation of IR induction

Animal #	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4
2-1	Saline (Negative control)	Liposomal I-OHP (infusion, 3 mg/kg, increased from 30 to 150 mL/h)	Liposomal Dox. (bolus, 0.5 mg PL/kg)	Zymosan A (0.1 mg/kg) (positive control)
2-2		Liposomal I-OHP (infusion, 3 mg/kg, 150 mL/h)	Liposomal Dox. (bolus, 0.5 mg PL/kg)	

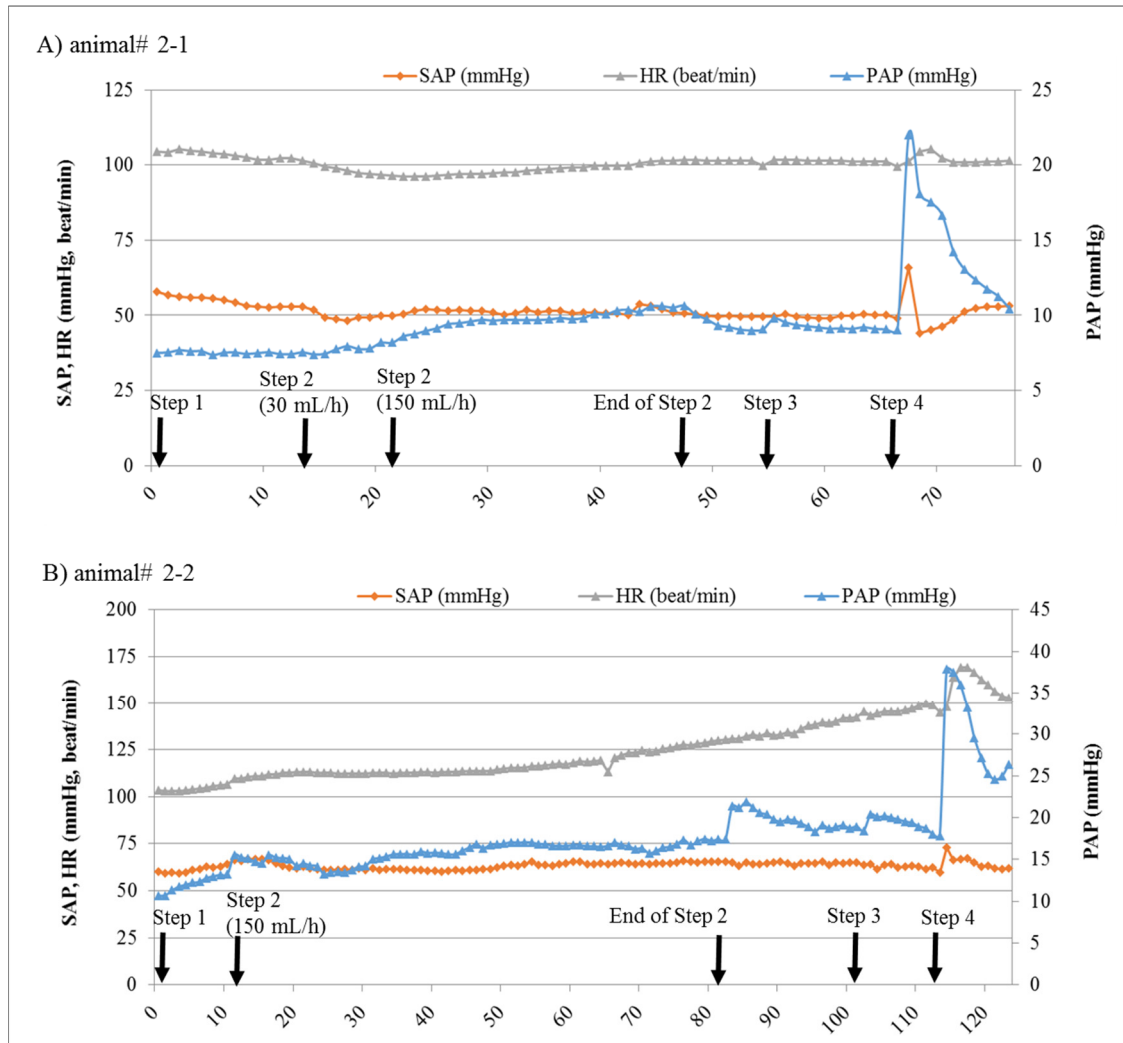


Figure 4-7: Cardiovascular changes recorded in animal# 2-1 and 2-2 following treatment with liposomal I-OHP and Doxil.

The upper and lower panels present the same data in absolute blood pressure and heart rate values and in %, related to baseline.

第4節 小括

本章では、リポソーム化 I-OHP の安全性に関する評価を実施した。

第1項では、既存の抗癌剤をリポソーム化した際に必須となる非臨床試験として、ラットを用いた繰り返し投与時の毒性評価を実施した。I-OHP をステルスリポソームに封入することで、遊離型の I-OHP と比較して、体重変化や臨床所見、血液毒性など様々な項目において、毒性軽減が達成可能であることを示した。遊離型の I-OHP では 10 mg/kg が lethal dose 50 (LD50) に相当すると示唆されたが、リポソーム化 I-OHP では 14 mg/kg でも明確な毒性を示さなかった。また、興味深いことに、ステルスリポソームの主要な消失経路となる肝臓に対しても強い毒性は認められなかった。これは、リポソーム製剤の消失経路としては肝臓が主要な臓器ではあるものの、肝臓実質では無くマクロファージなど細網内皮系による貪食が中心であるためと考えられた。よって、ステルスリポソームに I-OHP を封入することで安全性を大きく向上できることを確認できた。

第2項では、リポソーム化 I-OHP において最もフォーカスすべき神経毒性軽減について検討した。ラットモデルにおいて、cold immersion 法と von Frey test によって、薬剤投与に伴う疼痛閾値の変化を評価したところ、遊離型 I-OHP では臨床の結果を支持するように明確な疼痛閾値の低下が認められたが、リポソーム化 I-OHP では軽度であった。この結果から、I-OHP をステルスリポソームに封入することで、化合物の持つ特徴的な末梢神経毒性を軽減できることが示唆された。I-OHP は血漿タンパク質への共有結合、赤血球への不可逆的な移行が知られているが、繰り返し投与によりこれらの血中成分への移行が飽和し、曝露の増加に伴う末梢組織への蓄積が神経毒性に相関する可能性も示唆されている [74]。本研究で開発したリポソーム化 I-OHP は、体内動態を制御し、末梢組織での過度の曝露を抑制することで、神経毒性の発現を抑制すると考えられた。

第3項では、リポソーム製剤の投与に伴って発現することが知られている Infusion reaction (IR) について検討した。この検討では、ブタを用いた CARPA モデルを用い、リポソーム化 I-OHP の投与に伴う心血管系パラメータの変動を評価した。Szebeni らによると、肺動脈血圧 (PAP) と全身動脈血圧 (SAP) が、IR の惹起を最も良く反映するパラメータであるが、リポソーム化 I-OHP は bolus 投与においても、また、治療域用量の点滴投与においてもそれらパラメータに変化を認めなかった。代表的なステルスリポソーム製剤である Doxil® では IR の発現を示唆するデータが得られているが [107]、リポソーム化 I-OHP ではそういった可能性を示唆する結果は得られていない。IR の発生には、ナノ粒子であるという特性以外にも、化合物による差異も関連すると言われており [96]、この点においてステルスリポソームと I-OHP は望ましい組み合わせであると考えられた。

以上の結果から、I-OHP をステルスリポソームに封入することで、安全性の観点からもコンセプト通りの *in vivo* 特性を有するリポソーム製剤が得られた。よって、製剤としての品質も考慮した上で、効果と毒性のバランスに優れた I-OHP 製剤の開発に成功し、有用な抗癌剤となることが期待される。一方で、現状の癌化学療法では多剤併用による治療が一般

的であることから、本剤を用いた治療レジメンの提案も実用化に向けた課題であると考えた。よって、次章では、現行の癌化学療法レジメンとリポソーム製剤をマッチングさせた治療法の提案に向けた研究に取り組むこととした。

第5章 リポソーム化 I-OHP と S-1 の併用療法の開発と腫瘍内微小環境の変化

第1節 緒言

前章までの検討で、Oxaliplatin (I-OHP)を封入したリポソーム製剤について、品質面から実用化を見据えた製剤開発と動物モデルを用いた抗癌剤 DDS としての有用性検証を進めてきた。しかしながら、如何に有用な抗癌剤 DDS を開発したとしても、現在の癌化学療法では単剤による治療は多くなく、特に一次・二次治療が単剤治療となることは稀であり、複数の抗癌剤を併用する多剤併用療法が主流である [108-110]。併用療法においては、異なる作用機序を持つ抗癌剤の併用によって相乗的な抗腫瘍効果を期待し、また、個々の抗癌剤が持つ特徴的な副作用が発現する頻度を低下させることが目的である。例えば、I-OHP が広く用いられている大腸癌の場合、I-OHP, leucovorin (LV), 5-fluorouracil (5-FU)の3剤を併用する FOLFOX が広く用いられている[13] (Figure 5-1)。FOLFOX においては、単剤での抗腫瘍効果が認められず 5-FU の存在下のみ使用が許可されていること、投与により末梢神経毒性が必発することなど、主薬となる I-OHP に起因する課題が存在する [19, 89]。I-OHP の治療効果及び継続性を高めることは、FOLFOX の課題を克服することにもつながるが、ここまでの検討により、これらの課題は I-OHP のリポソーム化によって達成されることが期待される。

一方で、FOLFOX においては、5-FU が 1~2 日程度の長期間の持続静注によって投与されるため、入院が必要となるケースも多い (Figure 5-1)。また、5-FU を充填したバルーンと小型のポンプを用いた外来での持続静注も可能ではあるものの、CV (Central Venous)ポートに針が刺さったままの状態では生活することは患者にとって負担であり、取り扱いを誤れば感染症のリスクも増加するため、患者の QOL を著しく低下させる [111]。この 5-FU の持続静注に代わるものとして、経口投与型抗癌剤である S-1 に期待が寄せられている [112-116]。S-1 は、tegafur (5-FU のプロドラッグ)、5-chloro-2, 4-dihydropyridine (CDHP : 5-FU 分解阻害剤)、potassium oxonate (Oxo : 消化管毒性軽減剤) を 1 : 0.4 : 1 (mol/mol) で組み合わせた配合剤である。S-1 中の CDHP が有する biochemical modulation は、5-FU の分解経路における律速酵素である (dihydropyrimidinedehydrogenase: DPD)を強力的に阻害することで血中濃度を高く維持することが可能となり、5-FU 持続静注の薬物動態を模倣したプロファイルが得られることから、FOLFOX における 5-FU の持続静注の代替手段となり得る [117]。また、経口剤であることから、上記の 5-FU 持続静注と異なり、最大耐用量 (MTD) に満たない投与量を頻回投与することが可能であるため、効果を維持しつつ QOL の向上にも寄与すると考えられる。このような背景から、FOLFOX の代替法として 5-FU/LV を S-1 に置き換えたレジメン SOX (I-OHP+S-1)が臨床開発されており [111, 118]、FOLFOX と同等以上の治療効果のみならず利便性や QOL の改善が可能なレジメンとして期待されている。

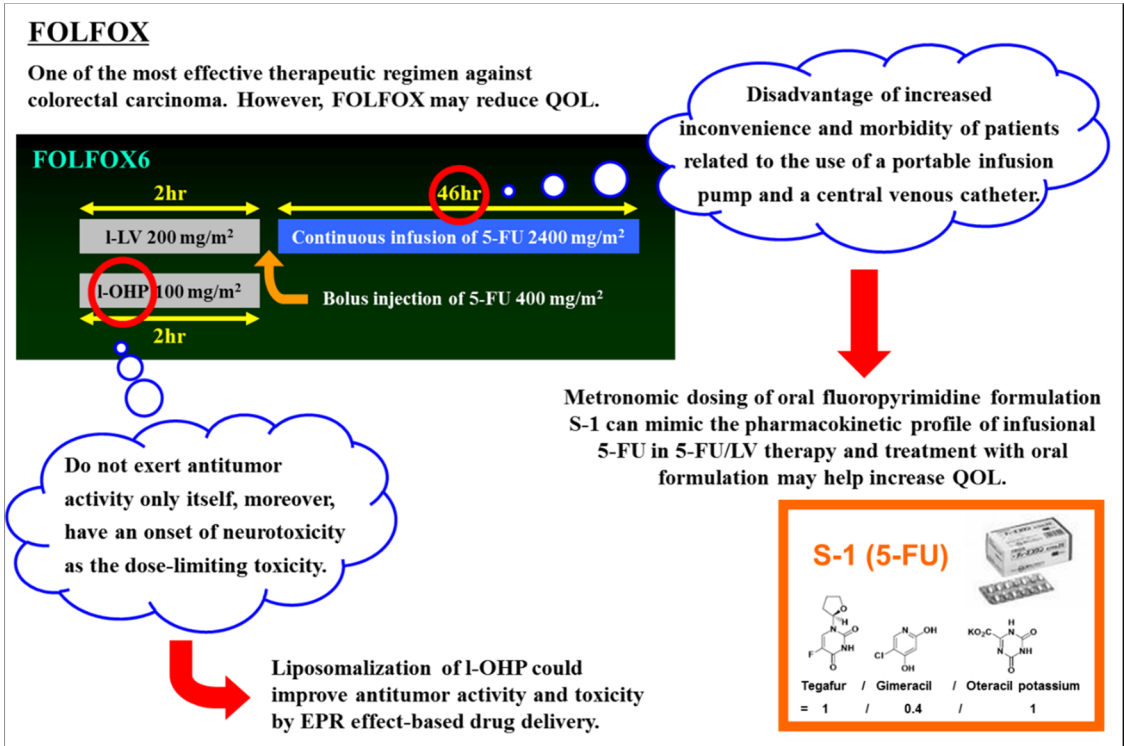


Figure 5-1: Schematic diagram of characteristics of I-OHP-based therapy, FOLFOX

S-1 のように、単回投与における MTD よりも低用量を長期間繰り返し頻回投与する療法は metronomic chemotherapy と定義されている [119-121]. Metronomic chemotherapy は 1 回の投与量が少なく他の抗癌剤との長期併用が可能であり、tegafur や capecitabine, cyclophosphamide など経口投与可能な抗癌剤が metronomic chemotherapy に適している [122-124]. Metronomic chemotherapy は本来の抗癌作用に加え、血管新生阻害療法としての側面も併せ持つことが知られている [125]. 実際、S-1 は血管新生阻害因子である Thrombospondin (TSP)-1 の発現量を亢進させ、血管新生阻害作用を示すことが報告されている [126, 127]. TSP-1 は血管内皮細胞に発現している CD36 を介在し、カスパーゼ-3 の活性化もしくは Fas リガンドの発現増加によりアポトーシスを誘導するため、S-1 の metronomic chemotherapy は腫瘍血管系に対する作用も有することが知られている [128]. 他方では、低用量の抗癌剤投与による腫瘍血管系も含めた微小環境変化がナノ DDS との併用に有用であることを示す報告もあり [129-132], S-1 の metronomic chemotherapy とリポソーム化 I-OHP の併用により、薬物同士の作用機序を超えた併用効果が得られる可能性もある。

以上の背景から、S-1 を用いた metronomic chemotherapy とリポソーム化 I-OHP の併用における抗腫瘍効果、毒性並びに併用時のリポソーム化 I-OHP の体内挙動について検討を行った。体内動態評価の結果から、S-1 による metronomic chemotherapy がナノ粒子の腫瘍集積性に影響することが示唆されたため、ナノ DDS の腫瘍集積増強作用 (priming) を有するかどうかを検証した。次いで、その priming 作用がどのように惹起されているかを理解するた

めに、S-1 投与時の腫瘍内微小環境の変化を検討し、ナノ粒子の腫瘍内挙動との関連を評価した。これらの検討を通じ、S-1 の metronomic chemotherapy と I-OHP 封入リポソーム製剤の併用療法の有用性について評価した。

第2節 実験方法

第1項 試薬・原料

水素添加大豆ホスファチジルコリン (hydrogenated soy phosphatidylcholine; HSPC) 及び 1, 2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-n-[methoxy(polyethylene glycol)-2000] (mPEG2000-DSPE)は日油株式会社 (東京, 日本) から入手した. コレステロールは和光純薬 (大阪, 日本) から購入した. 1-OHP 及び経口投与型フッ化ピリミジン製剤 S-1 (tegafur, 5-chloro-2, 4-dihydropyridine 及び potassium oxonate の3成分を含有)は大鵬薬品工業 (東京, 日本) から入手した. ^3H -Cholesterylhexadecyl ether (^3H -CHE)は Perkin Elmer Japan (Yokohama, Japan) から購入した. 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiI)及び 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate (DiD)は Invitrogen (Paisley, UK)より購入した. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled rat anti-mouse CD31 monoclonal antibody は Chemicon international (Temecula, CA, USA)より購入した. Hoechst 33342 及び 3,3'- diheptyloxacarbo-cyanine iodide (DiOC₇) は AnaSpec (Freemont, CA, USA)から購入した. FITC-dextran (M.W. 150,000)及び Drabkin's reagent は Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)から購入した. In Situ Cell Death Detection Kit (TMR red)は Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)から購入した. その他, 実験に用いた試薬は分析グレード以上のものを用いた.

第2項 使用した動物及び癌細胞の培養, 担癌モデルの作製

5週齢の雄性 BALB/c マウス及び BALB/c nu/nu マウスは日本 SLC (日本, 静岡) から購入した. 実験動物は, 飲料水と餌に自由にアクセスでき, 管理された環境条件 (一定の湿度, 12時間の暗・明サイクル) 下で飼育された. すべての動物実験は, 日本における動物愛護・人権ガイドラインに準拠して実施された.

Colon 26 (C26) マウス大腸癌細胞株は, Cell Resource Center for Biomedical Research (東北大学加齢医学研究所, 日本, 仙台市) より購入した. ヒト大腸癌細胞株 DLD-1 及び DLD-1/FU (5-FU 耐性) は, 大鵬薬品工業から入手した [133]. 各細胞株は, 10%の熱非働化牛胎児血清 (日本バイオセラム, 広島, 日本), 100 units/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin (ICN Biomedical, Aurora, OH, USA) を添加したダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) (Nissui Pharmaceutical, Tokyo, Japan) 及び RPMI-1640 培地 (富士フィルム和光純薬, 大阪) で, それぞれ 37°Cの 5% CO₂ インキュベーター内で培養した.

BALB/c マウスには, 2×10^6 個の C26 細胞を 200 µL の DMEM 培地に懸濁して背部皮下接種した. BALB/c nu/nu マウスには, 2×10^6 個の DLD-1, もしくは DLD-1/FU 細胞を 200 µL の RPMI1640 培地に懸濁させて背部皮下に接種した. 移植した癌細胞が増殖し, 腫瘍体積が 40-60 mm³ に達した時点で治療を開始した.

第3項 リポソーム製剤の調製

ラボスケールにおける I-OHP リポソーム製剤の調製

HSPC/コレステロール/mPEG2000-DSPE (2/1/0.2, mol/mol) からなる I-OHP 含有 PEG 修飾リポソームを、既報の逆相蒸発法による調製法で調製した [134]. 未封入の I-OHP は透析カセット (Slyde-A-Lyzer, 10000MWCO; Pierce, Rockford, IL, USA) を用いて、5%ブドウ糖を用いて透析を行った. 得られた製剤中の I-OHP は、原子吸光光度計 Z-5700 (Hitachi, Tokyo, Japan) で定量化した. リン脂質濃度は比色法で測定した [135]. 粒子径は、NICOMP 370 HPL を用いて測定した. I-OHP のリポソームへの封入効率は、透析 (未封入 I-OHP 除去) 前後の drug/lipid 比を計算することで算出した. 我々の調製法における封入効率はおよそ 20% であり、この値は他の研究グループが報告している数値よりも 3 倍程度高く、高封入効率な調製法である.

蛍光・RI 標識化 PEG 修飾リポソームの調製

PEG 修飾リポソームの生体内分布を評価するために、蛍光色素 DiI・DiD や RI (³H-CHE) で標識したリポソームを調製した. 調製法を以下に示す.

PEG 修飾リポソームは、HSPC/コレステロール/mPEG2000-DSPE (2/1/0.2, mol/mol) の脂質組成にて、バンガム法を用いて調製した [136]. 簡潔に説明すると、必要量の構成脂質をクロロホルムに溶解させ、1 mol% の疎水性蛍光色素 (DiI または DiD), もしくは放射性標識体である ³H-CHE を共溶解し、脂質中に取り込ませた. この脂質溶液は回転式エバポレーター内で有機溶媒を蒸発させた後、ガラス容器の壁面に脂質薄膜を構成させた. 得られた脂質薄膜を 5%ブドウ糖で水和させ、粗リポソーム分散液を得た. リポソームは、孔径 400, 200 及び 100 nm のポリカーボネート膜フィルター (Nuclepore, Pleasanton, CA, USA) を順次通過させて、押し出すことによって粒子径を調整した. リポソームの平均粒子径は、NICOMP 370 HPL (Particle Sizing System, San Diego, CA, USA) を使用して測定し、100 nm 程度であることを確認した. 脂質濃度は比色法で測定した [135].

第4項 S-1 と I-OHP リポソームの併用療法における抗腫瘍効果

C26 細胞を皮下接種した BALB/c マウスにおいて、腫瘍の体積が 40-60 mm³ に達した時点で治療を開始し、治療開始日を 0 日目とした.

各薬剤の投与スケジュールは以下の通りとした.

1. S-1 (metronomic dosage) : 6.9 mg tegafur/kg/dose で 0 日目から 21 日目まで毎日経口投与した.
2. 遊離型またはリポソーム化 I-OHP : 0, 7 および 14 日目に I-OHP として 4.2 mg/kg とするようマウス尾静脈より投与した.
3. 1 と 2 の併用療法 : 0, 7, 14 日目に遊離型またはリポソーム化 I-OHP を 4.2 mg/kg とするようマウス尾静脈より投与し、S-1 は 6.9 mg tegafur/kg/dose を 0 日目から 21 日目ま

で連日経口投与した。

腫瘍は3日おきにノギスを用いて長径・短径を計測した。腫瘍体積は次A式を用いて計算した。抗腫瘍活性は、相対腫瘍体積(B式)の変化を評価することにより評価、腫瘍増殖抑制率はC式によって算出した。

$$\text{A): Tumor volume [TV, (mm}^3\text{)]} = 0.5 \times \text{Length} \times \text{Width}^2$$

$$\text{B): Relative tumor volume (RTV)}$$

$$= \text{Tumor volume on day n} / \text{Tumor volume on day 0}$$

$$\text{C): Tumor growth inhibition rate [TGI, (\%)]}$$

$$= [1 - (\text{mean RTV of treated group}) / (\text{mean RTV of control group})] \times 100$$

第5項 S-1投与がPEG修飾リポソームの生体内分布に及ぼす影響

C26担癌モデルマウスに対し、腫瘍の体積が40-60 mm³に達したことを確認し、S-1の投与を開始した。S-1は6.9 mg tegafur/kgで毎日7日間投与し、S-1投与最終日にリポソーム製剤を投与した。

リポソーム自体の分布を評価するために、³H-CHE標識PEG修飾リポソームを脂質量として25 mg/kgで静脈内投与した。リポソーム投与後24時間に腫瘍、血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓のサンプルを採取した。血液以外の組織サンプルは洗浄し、余分な液体を除去した後、重量を測定した。試料中の放射能は既報の通り測定した[137]。

さらに、内封薬物であるI-OHPの生体内分布を評価するために、I-OHPリポソーム製剤(I-OHPとして4.2 mg/kg)を静脈内注射した。投与後6, 12, 24, 36, 48, 72及び120時間に血漿を採取し、その後マウスを犠牲死して腫瘍及び骨髄を摘出し、重量を測定した。その後、サンプルに濃硝酸を加え、電子レンジ(600 W, 25分, 50°C; ETHOS TC, Milestone general, Kanagawa, Japan)で消化した。サンプル中の白金(Pt)含有量は、ICP-MS(Agilent 7500 series; YOKOKAWA analytical systems, Tokyo, Japan)を用いて測定した。薬物動態パラメータは、多指数曲線フィッティングと最小二乗パラメータ推定プログラムSAAM II(SAAM Institute, Seattle, WA, USA)を用いて算出した。

第6項 S-1投与がPEG修飾リポソームの腫瘍内蓄積及び分布に及ぼす影響

C26, DLD-1, DLD-1/FU担癌モデルマウスに対し、腫瘍の体積が40-60 mm³に達したことを確認し、S-1の投与を開始した。S-1は6.9 mg tegafur/kgで毎日7日間投与し、S-1投与最終日に蛍光(DiI, DiDもしくはDiR)標識PEG修飾リポソームをリン脂質量として25 mg/kgで静脈内投与した。

*in vivo*イメージングでは、マウスにDiDもしくはDiR標識PEG化リポソームを尾静脈投与し、任意の時間において蛍光画像分析装置LAS-4000 IR(富士フィルム, 東京, 日本)で画像取得した。蛍光画像は1/100秒の露光時間にて取得した。

次いで、リポソームの腫瘍内分布では、マウスに DiI 標識 PEG 化リポソーム尾静脈内投与し、投与 24 時間後にマウスを犠牲死させた。蛍光デキストランによる血管造影では、犠牲死 5 分前に FITC-dextran (5 mg/マウス) を尾静脈内投与した。マウスから腫瘍を採取し、ドライアイスアセトンにより OCT コンパウンド (サクラファインテクニカル, 東京, 日本) 中で腫瘍を凍結させ、凍結試料はクライオスタット (Leica Microsystems, Solms, Germany) で厚さ 5 μm の切片に切り出し、スライドガラスにマウントし、空气中で乾燥させた。サンプルは蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察し、PEG 化リポソームの腫瘍内分布を評価した。各群において 3 個の腫瘍を対象とし、各腫瘍から少なくとも 10 枚の無作為に選択した切片から 30 枚の画像を取得し、解析ソフトウェア (BZ analyzer, Keyence) を用いて解析した。

第 7 項 免疫染色によるアポトーシス評価

血管内皮細胞及びアポトーシス細胞の免疫組織化学的染色は、それぞれ抗 CD31 Ab および Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) 染色を用いて行った。S-1 (6.9 mg tegafur/kg/day) で 7 日間投与したマウスの腫瘍を、最終の S-1 投与から 24 時間後に採取し、摘出した腫瘍はドライアイスアセトンにより OCT コンパウンド中で凍結させた。凍結試料をクライオスタットで 5 μm の厚さで切片化し、スライドガラスにマウントし、空气中で乾燥させた。試料を 4% PFA で 15 分間インキュベートして順次固定し、PBS で洗浄し、5%ウシ血清アルブミン (BSA) in PBS を用い室温で 30 分間ブロッキングをした。さらに、PBS で洗浄後、サンプルを FITC 標識ラット抗マウス CD31 抗体 (1:500) と共に 4°C で一晩インキュベートした。TUNEL 染色はキットで指定されたプロトコールに従い実施した。核染色は Hoechst 33342 (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) と共に室温で 5 分間インキュベートし、PBS で洗浄した。その後、免疫染色した腫瘍切片サンプルを蛍光顕微鏡 BZ-9000 で観察した。

第 8 項 腫瘍血管の灌流評価

S-1 投与が腫瘍の血液灌流に及ぼす影響を調べるために、Hoechst 33342 と DiOC₇ を用いた double fluorescent dye method[138]により評価した。S-1 (6.9 mg tegafur/kg/day) を 7 日間投与した C26 担癌マウスに、20 分の間隔を開けてそれぞれの蛍光色素を静脈内投与した (1st: Hoechst 33342 (15 mg/kg), 2nd: DiOC₇ (1 mg/kg))。DiOC₇ の投与 5 分後にマウスを犠牲死し、腫瘍を摘出した。OCT コンパウンド中で凍結した腫瘍切片 (厚さ 10 μm) をレーザー走査型共焦点顕微鏡 (LSM 510, Zeiss, Oberkochen, Germany) を用いて観察した。

また、腫瘍の血流を定量化するために、腫瘍組織中のヘモグロビン (Hb) 及び注入した FITC-dextran の蛍光強度を測定した。S-1 (6.9 mg tegafur/kg/day) を 7 日間投与した C26 担癌マウスに、FITC-dextran (5 mg/マウス) を静脈内投与し、5 分後にマウスを犠牲死させ、腫瘍を摘出した。腫瘍を氷冷しながらホモジナイズし、得られたホモジネートを 14,000 $\times\text{g}$ で 4°C, 15 分間遠心分離した。ここで得られた上清を測定に供した。試料中の赤血球に由

来する Hb は, 既報の方法に従って, 分光光度計で 540 nm における試料の吸光度を測定し, 腫瘍内の総血液量の指標とした[139]. さらに, 蛍光分光光度計 (日立, 東京, 日本) を用いて, ex/em =495/520 nm で, 試料中の FITC-dextran ンの FITC の蛍光強度を腫瘍内で血流のある血管量の指数として測定した. 相対的灌流指数は, 以下の式に従って算出した.

Relative perfusion index

= [Fluorescent intensity of FITC (functional vessel)/OD₅₄₀ of Hb (blood volume)]

第 9 項 統計学的評価

全ての測定結果は平均値と標準偏差, もしくは代表値として表した. 統計学的解析は GraphPad InStat (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)により, 両側 unpaired t 検定を実施した. 有意水準は P 値を 0.05 未満に設定した.

第3節 結果及び考察

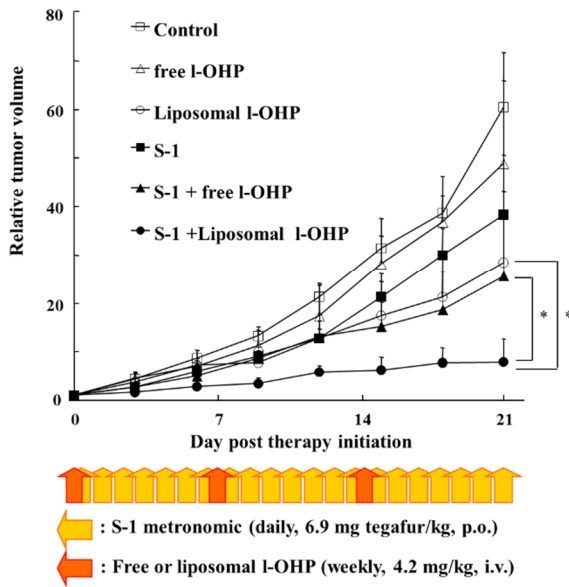
第1項 S-1 とリポソーム化 I-OHP 製剤の併用療法の有用性評価

緒言でも述べたとおり，S-1 は FOLFOX の有する臨床上の課題を解決する一つの手段となり得ることから，I-OHP との併用レジメン開発も進んでいる[111, 118]. 薬物同士の相性が良好であると示されたコンビネーションであることから，本研究で開発したりポソーム化 I-OHP との併用療法の有用性について検討した.

抗腫瘍効果に関する結果を Figure 5-2 に示す. まずは，ベースレジメンとなる遊離型 I-OHP と S-1 それぞれの単独・併用治療における抗腫瘍効果の結果について述べる. 遊離型 I-OHP 単剤で治療した場合，今回の投与量ではほとんど抗腫瘍効果は得られなかった (TGI: 19.0%). 静脈内に投与された I-OHP は，腎排泄を受けることで速やかに血中から消失するうえ，血中の I-OHP の大半は赤血球や血漿タンパク質に結合した状態で存在するため薬効を発揮しないと考えられた. また，S-1 の metronomic chemotherapy は，遊離型 I-OHP 単剤と比較して高い抗腫瘍効果を示した (TGI: 36.5%). S-1 は metronomic に連日投与することに加え，5-FU の分解酵素 CDHP の作用により 5-FU が長時間血中に存在している状態となるため，抗腫瘍効果を誘導したものと考えられた. S-1 と遊離型 I-OHP の 2 剤の併用における抗腫瘍効果は，それぞれを単独で用いる場合よりも顕著に高い抗腫瘍効果が得られた (TGI: 57.7%). これは I-OHP が 5-FU の存在下で強い効力を発揮するという臨床でのエビデンスと同じく，相性の良いそれぞれの薬剤特性が相まって得られた結果であると考えられた.

次いで，本検討の主目的である S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用療法の抗腫瘍効果を検討した. まず，リポソーム化 I-OHP について，第二章の結果に違わず遊離型 I-OHP と比較して高い抗腫瘍効果を示し，S-1 と free I-OHP の併用群と同程度の強い抗腫瘍効果を示した (TGI: 52.9%). また，S-1 とリポソーム化 I-OHP を併用することで，他の群と比較して有意に高い抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなり，その腫瘍増殖抑制率 (TGI) は 87.0% と非常に高いものであった. このような結果が得られた理由としては，先ほど述べた I-OHP と S-1 (5-FU) という薬剤のコンビネーションの相性の良さによる部分も当然考えられるが，これまでに示したように EPR 効果に基づく抗癌剤デリバリーを metronomic chemotherapy が増強させたことも大きく寄与していると考えられた. すなわち，S-1 の metronomic chemotherapy による腫瘍内の血流改善等によってリポソームの腫瘍移行性が亢進し，腫瘍への I-OHP 蓄積量が増大した結果，上記のような高い抗腫瘍効果が得られたものと考えられた.

(A) Anti-tumor activity of each treatment



(B) Tumor growth inhibition of each treatment

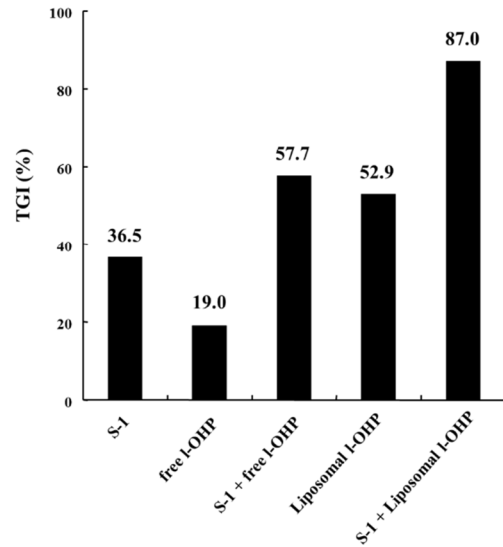


Figure 5-2: Antitumor activity of and liposomal I-OHP in combination with metronomic S-1 dosing against Colon26 murine colorectal carcinoma

(A) The antitumor effect was evaluated using subcutaneous tumor established by injecting 2×10^6 Colon26 murine colorectal carcinoma cells in the flank of the abdominal region of male BALB/c mice. N=5 mice per group. $p < 0.05$. (B) TGI was evaluated using Colon26-tumor bearing BALB/c mice treated with metronomic S-1 dosing and liposomal I-OHP at 21 days post initiation of therapy.

また、毒性の指標として治療期間中の体重変化を評価した (Figure 5-3)。遊離型 I-OHP, S-1, リポソーム化 I-OHP の単独投与を受けた群は、未処置群と比較して体重変化にほぼ違いが見られず、今回用いた dose では体重減に繋がるような毒性は発現しないことが明らかとなった。しかしながら、S-1 と遊離型 I-OHP, S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用群では、未処置群と比較して同程度の体重減が確認された。また、S-1 と遊離型 I-OHP の併用群においては I-OHP の投与直後に速やかな体重減少が観察されたが、S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用群においては徐々に体重減が発現する傾向にあった。S-1 と遊離型 I-OHP もしくはリポソーム化 I-OHP を併用することで、投与する抗癌剤の総量が増加することから、体重減に現れるような毒性が発現したと示唆された。また、S-1 との併用療法において、遊離型 I-OHP は投与直後から正常組織に細胞傷害性を発揮するため速やかな体重減が観察されたものと考えられた。他方で、リポソーム化 I-OHP では、リポソームそれ自体は肝脾を除く正常組織への移行が極めて少なく、血中を滞留するリポソームから徐々に放出された I-OHP が正常組織に対してダメージを与えた結果、徐々に体重減が発現したものと考えられる。結果として、S-1 と遊離型 I-OHP もしくはリポソーム化 I-OHP の併用群においては、ある程度の全身性の毒性が発現することがわかった。しかしながら、抗腫瘍効果において見られたよ

うなりポソーム化による上乗せ効果は毒性では見られないことがわかった。

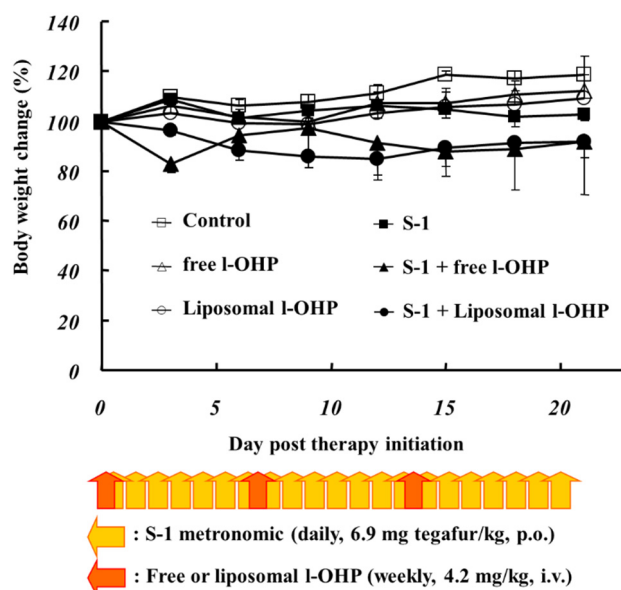


Figure 5-3: Body weight changes of Colon26 murine colorectal carcinoma-bearing mice treated with metronomic S-1 dosing and liposomal I-OHP

The body weight change was evaluated using colon26-tumor bearing BALB/c mice. The body weight was measured at 3 day intervals. N=5 mice per group.

Figure 5-4 (A)は血漿中の Pt 濃度に基づきの血漿中濃度変化をグラフにしたものである。グラフから読み取れる通り、未処置群と S-1 処置群の間に差は認められず、S-1 処置がリポソーム化 I-OHP の血漿中濃度変化には影響を与えないことがわかった。よって、S-1 処置は I-OHP 含有 PEG 修飾リポソームの血中からの消失速度および血中における PEG 修飾リポソームからの I-OHP の放出速度に影響を与えないと考えられた。同時に、これらの結果は、S-1 投与が PEG 修飾リポソームの主要なクリアランス経路である肝臓、脾臓に影響を与えないことを示すと考えられた。さらに、未処置群と S-1 処置群において、骨髄への I-OHP の移行量を評価した。骨髄への抗癌剤の移行量を測定することは、抗癌剤の代表的な毒性である骨髄抑制を評価する上で重要である。Figure 5-4 (B)に示すように、未処置群と比較すると、有意ではないものの、S-1 処置群の方が骨髄中の I-OHP 濃度が若干高い傾向が見られた。これは骨髄への I-OHP の移行が亢進されている事を示唆するようなデータであるが、S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用群、S-1 と遊離型 I-OHP の併用群を比較しても著しい体重変化は見られていないことから、今回観察された骨髄中 I-OHP 濃度の上昇は、直接体重減に結びつくような重篤な影響は惹起しないものと考えられた。また、第 2 章に示した通り、I-OHP のリポソーム化によって、血液毒性の顕著な改善が認められたことから、今回の骨髄移行量の差が I-OHP と S-1 の併用において障壁となる可能性は低いと考えられた。

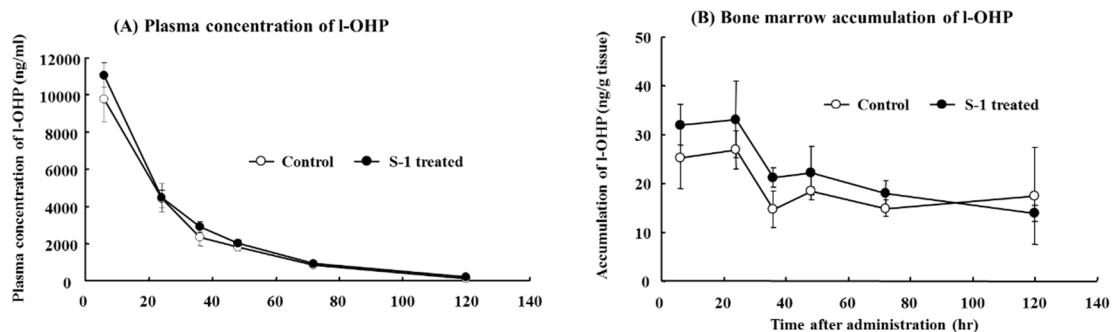


Figure 5-4: Blood circulation and accumulation in bone marrow of liposomal I-OHP in Colon26 tumor bearing mice treated with metronomic S-1 dosing.

Blood circulation (A) and accumulation in bone marrow (B) of I-OHP encapsulated in PEG-liposome was evaluated using colon26-tumor bearing BALB/c mice treated with metronomic S-1 dosing. N=5 mice per group.

最後に、S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用療法における相乗的な抗腫瘍効果のメカニズム解明に向け、I-OHP の腫瘍移行性を経時的に評価した。その結果 (Figure 5-5)、投与初期においてわずかではあるものの S-1 処置群で有意に高い I-OHP 濃度が認められた。さらに、興味深い事に、未処置群においては、腫瘍内 I-OHP 濃度が投与後 24 時間以降 36 時間後にかけて速やかに減少したのに対して、S-1 処置群では 24 時間後から少なくとも 48 時間後までは高い I-OHP 濃度を保っていた。よって、S-1 処置によってリポソームに内封された I-OHP の腫瘍への集積が増加し、腫瘍内に長時間にわたって留まる傾向があることが分かった。

腫瘍内での I-OHP の存在様式は、①リポソーム内に保持されたまま存在する、②リポソームから漏れて癌細胞などに移行した、③血中で漏れたものが血漿タンパクや血球に結合した、等の状態が考えられる。未処置群で腫瘍内の I-OHP が 24 時間以降減少していることから、リポソームからリリースされた I-OHP が全身循環に戻った、もしくは、リポソームに保持されたまま腫瘍から排泄 (全身血流に戻る、リンパに移行するなど) されたと考えられ、これが S-1 併用群ほど高い薬理効果が得られなかった理由ではないかと考えている。一方、S-1 処置群では、未処置群よりも I-OHP 濃度が長く維持されており、腫瘍内での I-OHP、もしくはリポソームの滞留時間が延長されていた。リポソームの腫瘍内運命に関してはこれまでほとんど明らかになっておらず、腫瘍内での薬物放出が単なる受動的拡散による膜透過であるのか、腫瘍間質中の酵素などによる膜崩壊や癌細胞による取り込みの結果であるか不明である。I-OHP 滞留時間延長のメカニズムとしては、S-1 処置による腫瘍内の微小環境変化 (癌細胞や間質細胞の細胞死誘導によりライソソーム由来酵素の分泌など) がリポソームの崩壊を促し内封薬物である I-OHP の放出を助長した、S-1 の metronomic な投与により血管新生やリンパ管新生が阻害されたことで、リポソーム化 I-OHP や放出された

l-OHP が腫瘍間質中で回収されにくい環境となった，等を挙げる事が可能と考えられた。

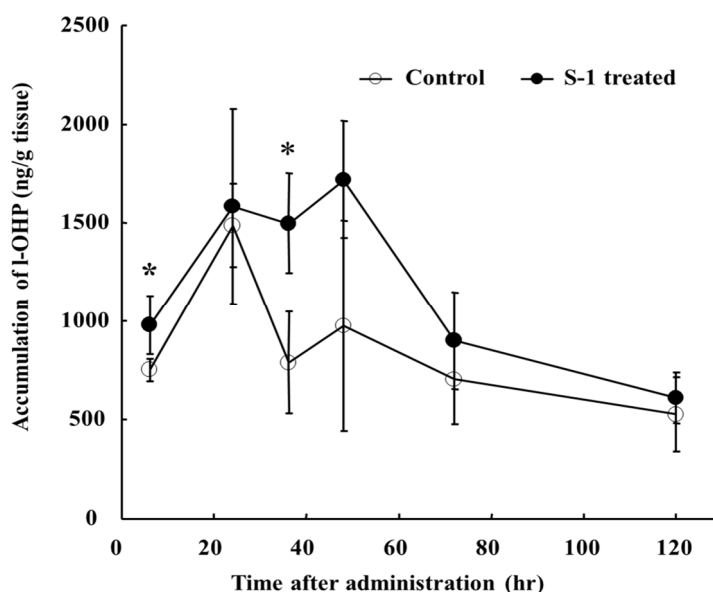


Figure 5-5: Tumor accumulation of liposomal l-OHP in Colon26 tumor bearing mice treated with metronomic S-1 dosing

Tumor accumulation of l-OHP encapsulated in PEG-liposome was measured using colon26-tumor bearing BALB/c mice treated with metronomic S-1 dosing. N=3 mice per group. *p<0.05

第2項 S-1 投与が PEG 修飾リポソームの腫瘍集積及び分布に与える影響

第1項で示したように，S-1 の metronomic chemotherapy とリポソーム化 l-OHP を併用することで l-OHP の腫瘍蓄積性が向上したが，これは S-1 併用によってリポソームの腫瘍移行性が亢進されたためと仮定した．ナノ粒子の腫瘍集積性に与える因子を検討するため，モデルナノ粒子として放射性標識した PEG 修飾リポソームを用いて，C26 担癌マウスにおける生体内分布を評価した．本検討では，担癌マウスに S-1 を連日経口投与（7日間）した後，放射標識したリポソームを静脈内投与し，各臓器への蓄積量を比較した．

Figure 5-6 にリポソーム投与 24 時間後のリポソームの蓄積量を示した．血液，心臓，肺，肝臓，脾臓及び腎臓への蓄積量は，未処置群と S-1 を投与した群において差は認められなかった．一方で腫瘍においてのみ，投与後 24 時間で PEG 修飾リポソームの腫瘍への集積が有意に促進された（1.3 倍）．血液中の濃度において差が見られないにも関わらず，腫瘍への蓄積量が増加していたことから，S-1 の投与によって腫瘍内で何らかの変化が生じることで，S-1 の投与がリポソームの腫瘍集積に対する促進作用として機能したと考えられた．また，リポソームの主要臓器への集積には影響を与えなかったことから，S-1 の投与は体内分布や正常組織内に既に存在するリポソームに対する血管の透過性に影響を与えないことが示唆された．

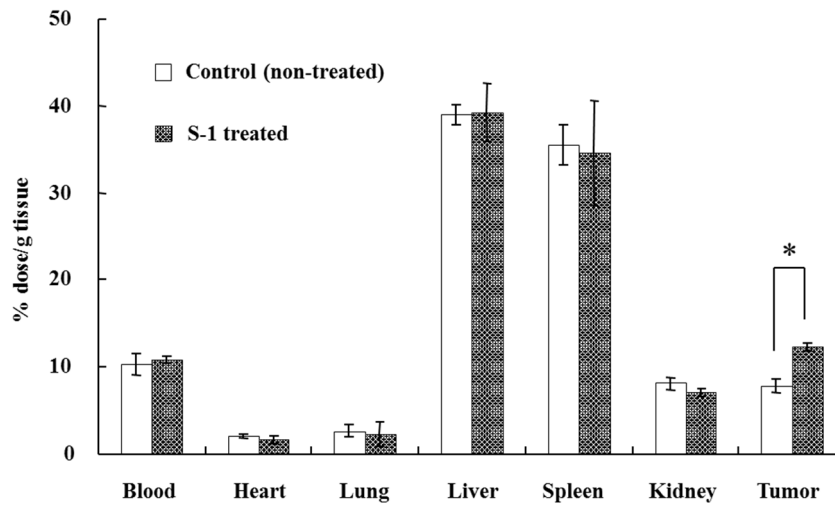


Figure 5-6: Effect of metronomic S-1 dosing on accumulation of PEG-coated liposome in tumor and major organs.

Biodistribution of PEGylated liposome was determined at 24 h following intravenous injection in tumor-bearing mice pretreated with or without metronomic S-1 dosing (6.9 mg tegafur/kg) for 7 days. Data represent mean \pm S.D. (n=3). **, $p < 0.005$ versus Control.

次に、近赤外蛍光色素である DiR で標識した PEG 修飾リポソームを静脈内投与し、腫瘍へのリポソーム蓄積量の経時的変化を *in vivo* imaging system で評価した (Figure 5-7). 未処置群, S-1 処置群のいずれにおいても時間依存的に DiR 由来の蛍光強度が増加していき、リポソームが蓄積していく様子が確認された。これは EPR 効果によってナノ粒子であるリポソームが蓄積していることを示すデータであると考えられた。また、未処置群と S-1 投与群の比較においては、リポソーム投与から 6 時間後では両者の蛍光強度に違いは認められないものの、12 及び 24 時間後では、S-1 投与群でリポソームの腫瘍蓄積量の増加が多く認められた。加えて、投与後 36 時間以降においても、両群ともにリポソームの腫瘍蓄積は持続的に増加しており、S-1 処置群においてより高いリポソームの腫瘍蓄積が認められた。よって、S-1 処置によるリポソームの腫瘍蓄積向上は一過性のものではなく連続的なものであることが示唆された。さらに、未処置群においてはリポソームの投与から 48 時間後をピークに蛍光強度が低下する傾向が認められたが、S-1 投与群においては 72 時間以降も蛍光が強く維持されていた。前項で示した I-OHP の腫瘍内蓄積量の検討では、S-1 処置は腫瘍内での I-OHP の滞留時間が延長されることが示唆されたが、その要因がリポソーム自身の腫瘍内の retention が高まったためであることを支持する結果となった。

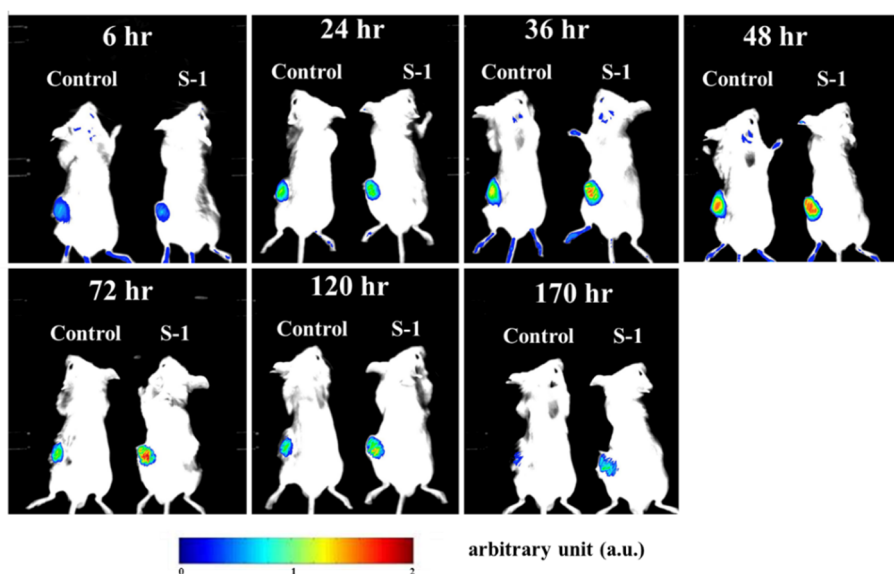


Figure 5-7: *in vivo* imaging of tumor accumulation of PEGylated liposome with or without S-1 treatment

The accumulation of PEGylated liposomes in the tumor was recorded by LAS-4000IR following an intravenous injection. Near infrared fluorescence dye, DiR, labeled PEGylated liposomes were intravenously injected in colon26-tumor-bearing mice. Before receiving an intravenous injection of PEGylated liposomes, left mice had received saline and right mice had received S-1 (6.9 mg tegafur/kg, p.o.) for 7 days.

ここまでの検討において、S-1 処置がモデルナノ粒子であるリポソームの腫瘍集積を高めることがマクロな視点から示された。その腫瘍集積の増加を、腫瘍内分布や局在などのよりミクロな視点から評価すべく、蛍光色素 DiI で標識した PEG 化リポソームを S-1 処置した担癌マウスに静脈内投与し、その腫瘍内分布を評価した (Figure 5-8)。腫瘍切片を作製し、切片上に分布した DiI 由来の蛍光を観察することでリポソームの分布を検討したところ、いずれの処置群においても腫瘍内にリポソームが到達し、広く分布していた。未処置群である Control においては、その分布パターンは不均一であり、蛍光は腫瘍周縁部に集中して検出された。一方で、S-1 処置群の腫瘍では、分布パターンに不均一な箇所は多く存在するものの、腫瘍組織全体を通してより広く、より均一に分布していることがわかった。さらに、取得した腫瘍切片の蛍光組織像に対して画像解析を実施した。この評価においては、蛍光がまとまって観察される箇所、すなわちリポソームの集積箇所 (hot spot) の数をカウントすることができる。必ずしもリポソームの集積量の絶対値を反映しているわけではないが、腫瘍内における EPR 効果が得られた箇所をカウント可能と考えた。この評価結果において、S-1 処置した腫瘍切片では、DiI 標識したリポソーム由来の蛍光スポット、すなわち hot spot の数が未処置群よりも相対的に増加した。このことは、S-1 による腫瘍内微小環境の変化がリポソームの腫瘍内分布を改善することを示すと考えられた。

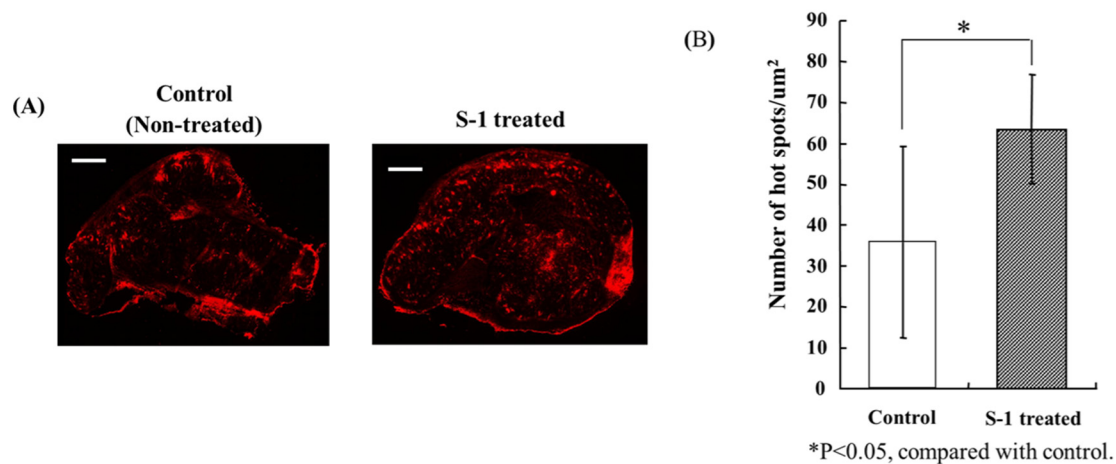


Figure 5-8: Effect of tumor priming with S-1 dosing on tumor accumulation and intratumor distribution of test PEGylated liposome.

DiI-labeled PEGylated liposomes were intravenously injected into the mice bearing colon26 tumor, which had been treated with either S-1 or 5% sucrose (control) for 7 days. At 24 h post-injection, tumors were harvested and the tumor sections subsequently analyzed with a fluorescence microscope.

(A) Intratumoral distribution of PEGylated liposomes in the tumor section. One representative picture from three independent tumors in each treatment group is shown. Magnification, $\times 200$. Bars indicate 1 mm. (B) Red spot relating to the region of test PEGylated liposome accumulated was analyzed with a software package (BZ analyzer). * $P < 0.05$ vs control.

ここまでの検討により、S-1 処置によりリポソームの腫瘍集積性の増強には、腫瘍血管から腫瘍実質に漏出した局在部位 (hot spot) の増加が寄与しており、その分布もより均一になることが明らかとなった。さらに、腫瘍組織における PEG 化リポソームの微小拡散をより高倍率で組織学的に検討した。DiI 修飾したリポソームを投与して 24 時間後の hot spot におけるリポソームと血管の位置関係を、FITC-dextran をマウスの屠殺 5 分前に投与し腫瘍微小血管を蛍光色素で造影し、評価した (Figure 5-9)。未処置群及び S-1 処置群ともに FITC の蛍光を取り囲むようにリポソーム脂質膜ラベルである DiI 由来の蛍光が観察され、リポソームが血管から漏出している事が確認された。しかしながら、未処置群においては比較的血管の近傍に DiI 由来の蛍光が集積しており、リポソームの腫瘍実質中の拡散性が低いことが確認された。一方で、S-1 処置群では未処置群と比較して実質内において、より血管から離れた領域まで DiI の蛍光が拡散しており、リポソームの腫瘍間隙中での拡散の促進が認められた。よって、S-1 処置はリポソームの腫瘍内分布を均一なものにするのみならず、血管外に漏出した後の腫瘍間隙中の拡散も向上させることが明らかとなった。腫瘍の血管外の領域 (間質) では、癌細胞の増殖によってもたらされる物理的圧力、またはそれに起因する間隙の狭さ、細胞外マトリックスの存在等によって微粒子の拡散が抑制されている。S-1

投与によってナノキャリアの腫瘍実質内での拡散が増強された原因については未だ明らかではないが、S-1 処置によって血管近傍の癌細胞が減少することで、物理的圧力の低下、細胞間隙の増加が見込めるため、リポソームの腫瘍実質中の拡散が増大したものと思われた。このような腫瘍組織へのリポソームの送達を妨げるバリアを回避することで、リポソームの腫瘍組織への移行性および拡散性を改善することが可能と考えられる。本研究においても、これら種々の要因により、S-1 の metronomic chemotherapy 後に、リポソームの腫瘍組織への移行および内部での拡散が促進されたものと考えられた。

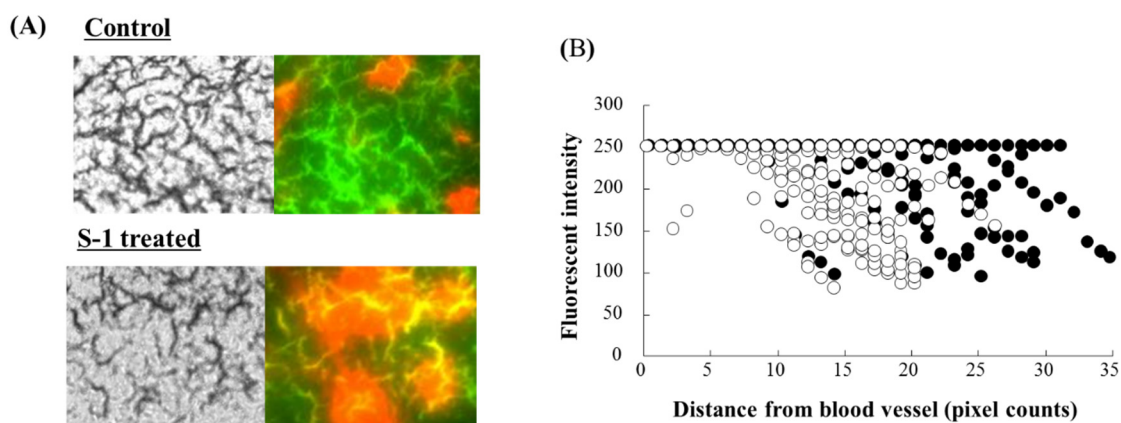


Figure 5-9: Effect of S-1 priming on intratumoral liposome diffusion from tumor vasculature

(A) Extravasation of PEGylated liposome (Red, DiI) from tumor vessels (Green, blood vessels). One representative picture from three independent tumors in each treatment group is shown. Magnification, $\times 400$. (B) Liposome diffusion in the tumor interstitium of either control (open circles) or S-1 treated mice (solid circles). DiI-labeled PEGylated liposome was intravenously injected. For fluorescence angiography, 5 min before scarification, FITC-dextran was intravenously administered into the mice. Tumor sections were observed by a fluorescence microscope. At least ten randomly selected sections per tumor and 30 images were analyzed.

第3項 S-1 投与が腫瘍内微小環境に与える影響と PEG 修飾リポソームの腫瘍集積性向上のメカニズムの解明

本項では、S-1 を用いた metronomic chemotherapy によってモデルナノ粒子であるリポソームの腫瘍移行性が増強されるメカニズムの解明を試みた。

S-1 によるリポソームの移行性変化は腫瘍特異的なものであったことから、腫瘍内微小環境の変化がリポソームの腫瘍移行の増加を招いた可能性が高いと考えた。先に述べたように、S-1 が細胞傷害性を有する抗癌剤であることを考慮して検討を行った。すなわち、血管近傍の癌細胞はその強い増殖能によって血管を圧迫し、血流を遮断し、微粒子が漏れ出す

血管外スペースの減少，腫瘍実質内圧の増加を招くことが知られている．S-1 処置が血管近傍の癌細胞に傷害を与えることで，前述のようなバリアを破壊し，リポソームの腫瘍移行を亢進したのではないかと考えた．そこで，S-1 処置によってもたらされる細胞死を腫瘍切片における TUNEL 染色を用いて評価した．

結果を Figure 5-10 に示す．未処置群においてはほとんどアポトーシス細胞は検出されなかったが，S-1 処置により CD31 陽性の血管内皮細胞だけではなく，血管近傍の癌細胞にも高度にアポトーシスが誘導されることが明らかとなった．Metronomic chemotherapy は血管新生阻害作用のみならず，抗癌剤本来の作用である細胞死を血管近傍の癌細胞に対して誘導していることが示唆された．5-FU は時間依存的に細胞死を誘導するため，MTD による大量投与よりも，S-1 (modulator である CDHP の存在により 5-FU の血中有効濃度が長期間持続可能) の metronomic chemotherapy のような繰り返し投与の方が殺細胞活性を発揮しやすい．5-FU 系の薬剤を metronomic に投与することは，5-FU の作用機序を考慮した理にかなった投与方法である．以上のように，S-1 処置は血管近傍の癌細胞にアポトーシスを誘導し，血管を圧迫から開放することで血流を改善することが示唆された．そこでこのような血流の改善が，リポソームの腫瘍内における分布を均一なものへと変化させたのではないかと仮説を立て，さらなる検討を実施した．

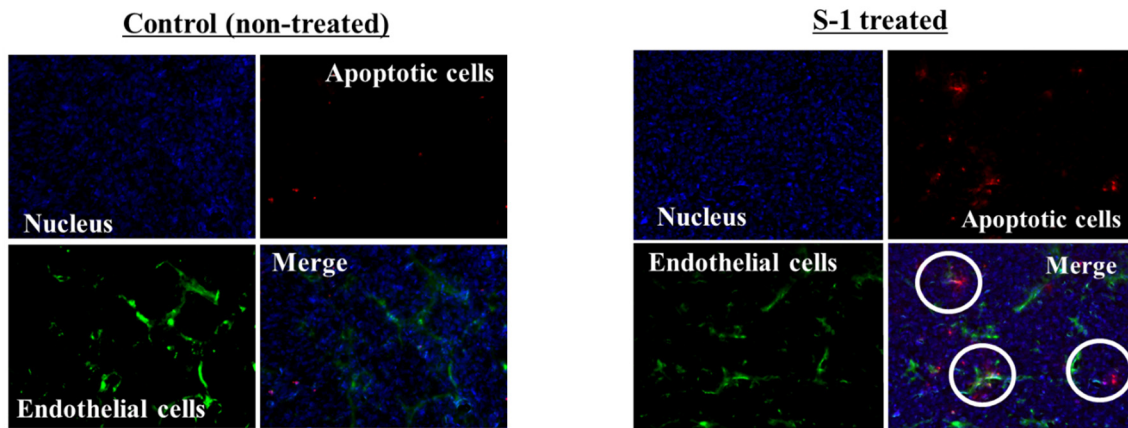


Figure 5-10: Apoptosis of cancer and endothelial cells induced by treatment with metronomic S-1 dosing

Apoptosis induction by metronomic S-1 dosing was evaluated using TUNEL staining (apoptosis), anti-CD31 antibody (endothelial cells), Hoechst 33342 (nucleus), and observed under fluorescent microscopy BZ-9000 (KEYENCE) at 200-fold magnification. Treatment with metronomic S-1 dosing induce apoptosis of not only endothelial cells but cancer cells surrounding the blood vessels.

細胞傷害性薬剤が癌細胞の増殖により圧迫された血管を開放するという報告 [140]を基に、CD31 抗体による組織免疫染色を用いて未処置群、S-1 処置群における血管の管腔構造を観察した (Figure 5-11). 未処置群においては約 50%の血管で閉じた管腔構造が確認された. これに対して、S-1 処置群では、未処置群と比較して開いた管腔構造を持つ血管が約 30%も多く確認された. このような結果が得られた理由としては、先に述べたように血管近傍の癌細胞はその増殖能が高く血管を物理的に圧迫しやすいが、S-1 処置がもたらす癌細胞の死によりその圧迫から開放されたことが考えられる. または、腫瘍をマクロな視点で捉えた際に、S-1 処置によって腫瘍の増殖速度が低下することで、上記のような血管圧迫が低減された可能性もある. いずれにせよ、S-1 の metronomic chemotherapy では開いた管腔構造が多くなり、結果として血管構造が改善され、連続的な血流が形成された可能性が高い.

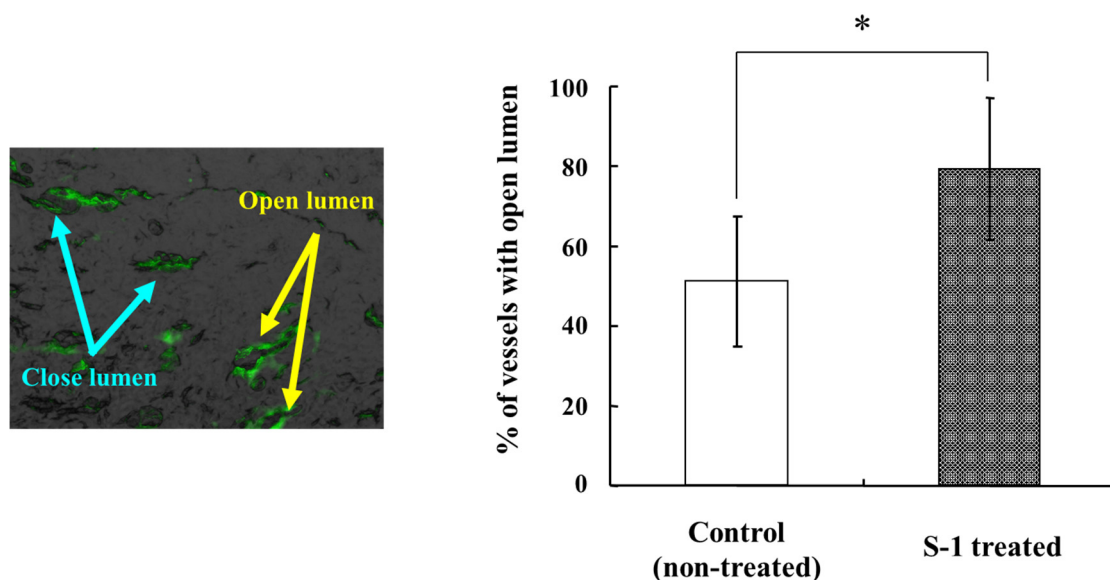


Fig. 5-11: Lumen of collapsed blood vessels are opened after relieving compressive force generated by cancer cells

Number of blood vessels with open lumen was counted using the photograph that contain at least five blood vessels with both open and closed. N=20 photograph per group. *p<0.001

正常組織における血流は連続的であるが、腫瘍内の血管は先に述べたような圧迫などにより、その血流は途絶えがちで不連続であることが知られている [140]. すなわち正常組織の血流と比較すると腫瘍内の血流は異常な状態であると言える. そこで、Figure 5-11 で得られたように圧迫されていた血管が開放された結果、血流が連続性の高い正常なものに変えられているのか評価を試みた. 方法としては、血流の正常化の評価に頻用される double fluorescent dye 法を用いた. この方法では 2 種の蛍光色素を静脈内投与しており、同時に 2 種類を投与した場合には血管のほぼ同じ領域を染色するが、時間差を設けて投与すること

で血流の連続性を評価する優れた手法である[138].

未処置群及び S-1 処置群, それぞれの結果を Figure 5-12 に示す. 未処置群においては, 腫瘍の周縁部では 2 種類の蛍光が重なった領域 (白矢印) が観察されたが, 中央部では 2 種の蛍光色素それぞれに由来する蛍光が腫瘍組織切片上の異なる領域で観察された. このことから, 未処置群においては周縁部では血流が連続的であるが, 中央部では非連続的であると示唆された. 一方で, S-1 処置群では, 腫瘍周縁部はもちろんのこと, 腫瘍中央部にも 2 種類の蛍光色素が重なった領域 (白矢印) が多く観察され, 未処置群よりも腫瘍内全域で連続的な血流を有していると考えられた. これらのことから, 通常 of 腫瘍内部では不連続である血流が S-1 処置によって連続性を増していることが明らかとなった.

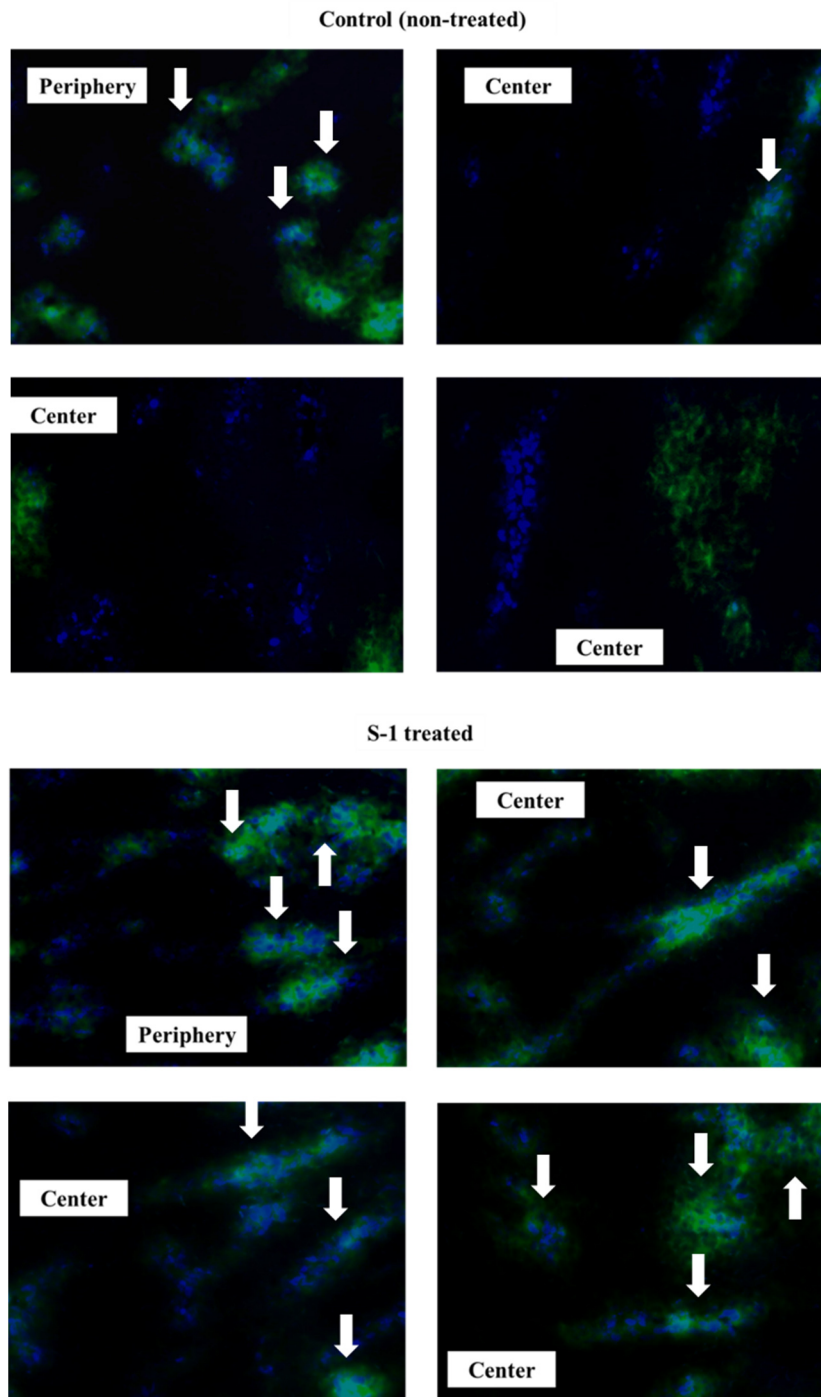


Figure 5-12: Effect of tumor priming with S-1 on tumor blood flow

Visualization of fluctuations in vessel perfusion was done using the double-fluorescent dye method. The sections of control tumor and S-1 treated tumors following intravenous injection with the perfusion markers, Hoechst 33342 (blue) and DiOC7 (green) were observed under a fluorescence microscope. One representative picture from three independent tumors in each treatment group is shown. Magnification, $\times 400$.

さらに、FITC-dextran を用いて腫瘍内の血液環流度を定量的に評価した。FITC-dextran の静脈内投与は血流のある血管の造影に多用されている。この方法を応用して血流量の指標として FITC-dextran による蛍光強度を、血流の有無に関わらない総血液量の内在的な指標として Hemoglobin (Hb)量を測定した (Figure 5-13)。この両者の比を算出 (perfusion blood/total blood= perfusion index) することで血液環流度の指標とした。まずは、Hb 定量による腫瘍血管の量的変化について検討した。既報 [126]及び今回の結果においても、S-1 は血管新生阻害作用を有することが示唆されているが、Hb 定量による腫瘍全体の血管量を評価しても、未処置群とほとんど差は見られなかった。Metronomic chemotherapy は微小血管の新生阻害は腫瘍全体の血管量・血液量にはほとんど影響しないと考えられた。次いで、腫瘍血管の環流度の指標となる perfusion index については、未処置群と比較して S-1 処置群で有意に改善していた。これは先の検討で得られた血管構造の正常化・血流の連続性向上の結果を支持するものであった。よって、S-1 処置によって血管が圧迫から開放され、血流が正常化されたために、腫瘍へのリポソーム蓄積量の増加及び腫瘍内におけるリポソームの均一な分布につながったものと考えられた。

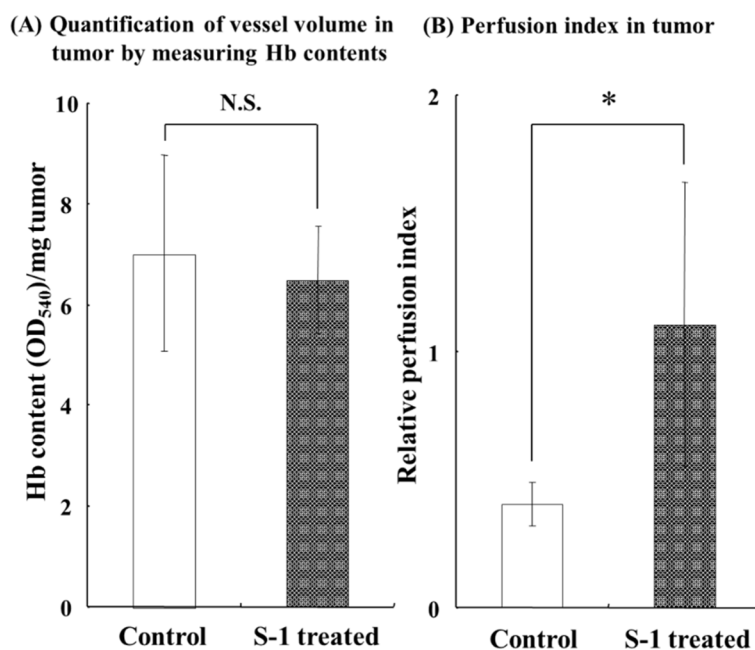


Fig. 5-13: Assessment of vascular formation and functionality in tumor treated with metronomic S-1 dosing.

A) Tumor vascular formation was determined by blood vessel volume derived from tumor Hb content. There is no significant difference in vascularization between control and S-1 treated tumor. (B) Tumor vessel perfusion was evaluated by calculating a ratio of functional vessel (FITC-dextran vessels) index to all vessel (Hb) index. Metronomic S-1 dosing significantly improves blood flow in tumor. N=5 mice per group. *p<0.05

これまでの結果から、S-1 による **metronomic chemotherapy** によって、リポソームをモデルとしたナノ粒子の腫瘍移行量を増加させ、腫瘍内の分布を均一にすることが可能と考えられた。すなわち EPR 効果に基づく腫瘍デリバリーが改善できる事が示唆された。また、この効果は、**metronomic chemotherapy** による抗癌剤の低濃度・間歇的な曝露がもたらす腫瘍血管近傍における癌細胞へのアポトーシスが大きく関与している事が示唆されてもいる。しかしながら、S-1 の **metronomic chemotherapy** がもたらした腫瘍内微小環境変化は様々な要因が複雑に絡み合っていることが想定されるため、単一の要因検討の結果をもってその機構を証明することは容易ではない。よって、癌細胞の S-1 (正確には 5-FU) への感受性に着目した。5-FU に対する感受性が低い癌細胞種を用いることで、S-1 処置による癌細胞の死が PEG 修飾リポソームの腫瘍移行性変化にもたらす影響をリセットすることが可能となる。5-FU に対する感受性の異なる細胞種を比較することで、S-1 処置がもたらす癌細胞の死がリポソームの腫瘍移行性亢進に重要な要因であるかを検討することとした。結果を Figure 5-14 に示す。5-FU 感受性である DLD-1 担癌マウスにおいては、先の検討と同様に、未処置群、S-1 処置群ともに、EPR 効果によって 48~72 時間後まで時間依存的な PEG 修飾リポソームの蓄積が確認された (Figure 5-14 (A))。また、S-1 処置群においては、リポソームの脂質膜ラベルである DiD 由来の蛍光が腫瘍内で強く検出され、その腫瘍蓄積量の増加が未処置群よりも顕著であり、S-1 処置によってリポソームの腫瘍移行性が亢進されることが確認された。また、未処置群ではリポソームの投与から 48 時間後をピークに蛍光の低下が認められたが、S-1 処置群では 72 時間後においても蛍光が強く検出され、その後も強い蛍光を保っていた。このように 5-FU 感受性である DLD-1 tumor においては、Colon26 腫瘍での結果と同様の結果が得られた。由来臓器が同一であるとは言え、ヒトとマウスの種差が存在する異なる癌細胞種でも、S-1 **metronomic chemotherapy** によって PEG 修飾リポソームの腫瘍移行性亢進が見られた。これは、この現象が単一の癌細胞種に限定して生じたものではなく、一定の普遍性を有することを示唆するものである。

次いで、5-FU 耐性を有する DLD-1/FU 担癌マウスにおいても同様の検討を実施した (Figure 5-14 (B))。この検討においてもリポソームが時間依存的に腫瘍に蓄積していく様子が観察された。しかしながら、興味深いことに、DLD-1/FU tumor においては、DLD-1 tumor とは異なり、S-1 処置による PEG 修飾リポソームの腫瘍移行性の亢進は観察されなかった。Figure 5-14 (C)は、DLD-1 tumor 及び DLD-1/FU tumor の両群において、未処置群の腫瘍から検出される蛍光強度と S-1 処置群の腫瘍から検出される蛍光強度の比をグラフ化したものである。DLD-1 tumor のグラフより、24, 48, 120 時間と比較して、6, 72 時間では S-1 処置群のリポソームの腫瘍集積が未処置群よりも高いという結果になった。この結果は、S-1 処置がリポソームの腫瘍集積速度を高め、また腫瘍からのクリアランスを低下させたことを示唆している。一方、DLD-1/FU tumor においては、6, 24, 48 時間においてわずかに S-1 処置群が未処置群を上回ったが、その後は未処置群との間に差はほぼ見られなかった。DLD-1 tumor で見られたような 6, 72 時間で他の時間よりも S-1 処置群の蛍光強度比が高く

なるような変化は観察されず、リポソーム腫瘍集積速度の向上やクリアランスの低下は見られなかった。

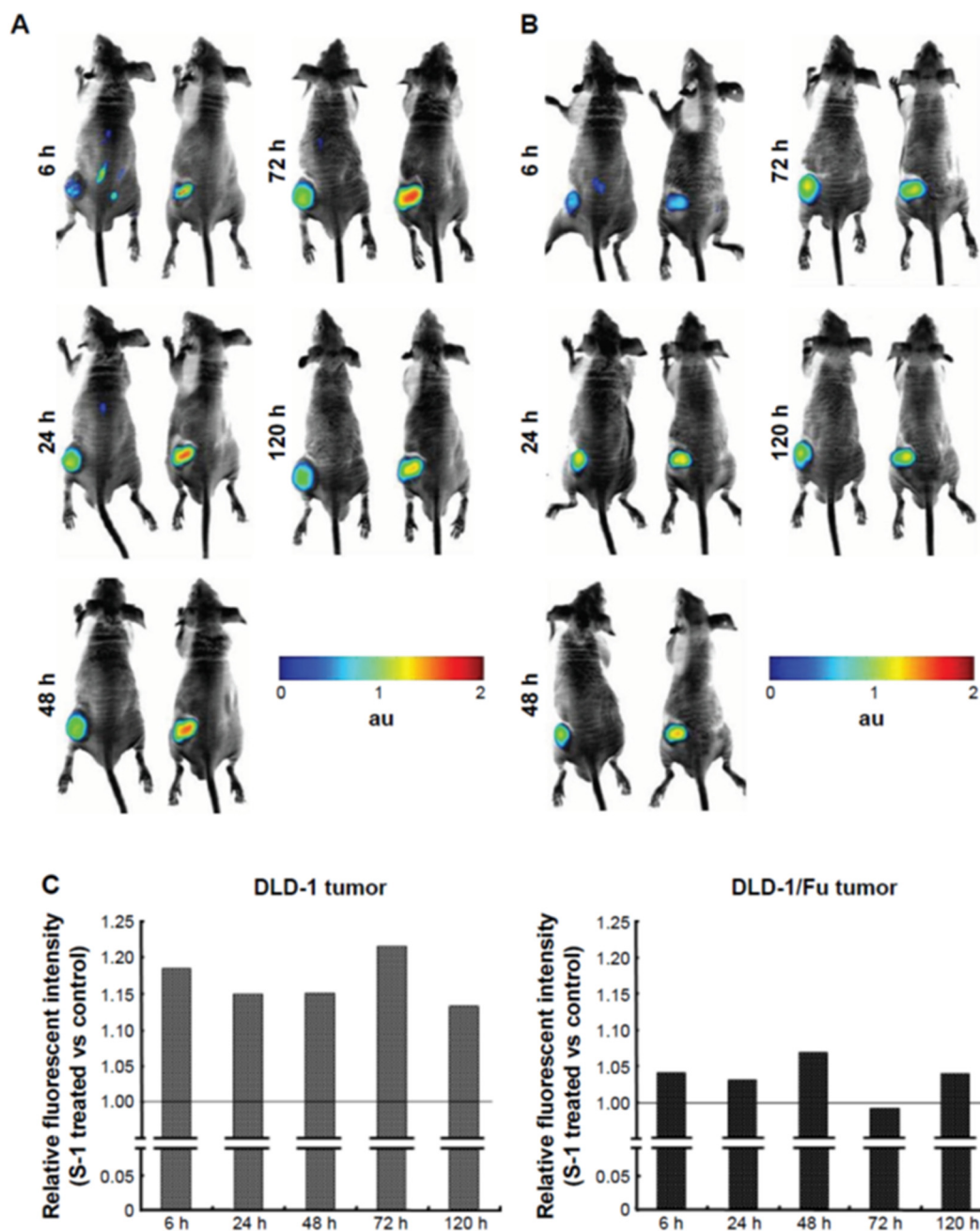


Figure 5-14: Effect of tumor priming with S-1 on accumulation of PEGylated liposome in 5-FU-resistant tumor, DLD-1/FU, *in vivo*.

The accumulation of PEGylated liposomes in the tumor was recorded by LAS-4000IR following an intravenous injection. Near infrared fluorescence dye, DiD, labeled PEGylated liposomes were intravenously injected in (A) DLD-1-bearing nude mice and (B) DLD-1/FU-bearing nude mice. (C)

Quantitative analysis of the bioluminescence photon counts was used as a measure of intratumor accumulation. Before receiving an intravenous injection of PEGylated liposomes, left mice had received saline and right mice had received S-1 (6.9 mg tegafur/kg, p.o.) for 7 days.

第4節 小括

本章ではリポソーム化 I-OHP と S-1 の metronomic chemotherapy の併用療法の有用性について検討した。

第1項では、本併用療法における治療効果の検証を目的として、遊離型 I-OHP, S-1, それらの併用効果も含めて比較検討した。その結果、S-1 とリポソーム化 I-OHP の併用においては、遊離型 I-OHP と S-1 併用群やリポソーム化 I-OHP 単剤群などでは確認されなかった強い、また、相乗的な抗腫瘍効果が確認された。このような抗腫瘍効果の増強が得られたのに対して、毒性の指標として評価した体重減においては顕著な上乘せは認められず、S-1 と遊離型の I-OHP の併用と同程度の安全性が期待できると考えられた。加えて、S-1 併用群ではリポソーム化 I-OHP の血中濃度等には影響を与えずに腫瘍においてのみ I-OHP の蓄積量が増加することが示された。よって、S-1 と併用することで、リポソーム化 I-OHP の体内動態には影響を与えずに腫瘍への I-OHP のデリバリーが増強されたと考えられた。

次いで、第2項では、第1項で得られた S-1 の metronomic chemotherapy による I-OHP の腫瘍蓄積量の増加が、キャリアであるリポソームの腫瘍移行性が向上したためであると仮定し、S-1 併用がナノ粒子の腫瘍集積性の増強作用を有するかどうかを検証した。RI ラベルしたリポソームを担癌マウスに投与し、S-1 処理の影響を評価したところ、他臓器への集積性を変化させずに腫瘍への蓄積量を増加させることがわかった。この背景には、*in vivo* imaging system の実験より、腫瘍への集積速度及び腫瘍内の滞留時間の向上の寄与が示唆され、さらに、腫瘍内での分布様式も変化している事が示された。腫瘍組織切片を用いた評価において、リポソームの分布領域の拡大とその均一性の改善が認められ、血管からより離れた領域までリポソームが拡散していることが明らかとなった。

最後に、第3項では、第2項で得られた S-1 によるリポソームの腫瘍移行量増加がどのように惹起されているかを理解するために、S-1 投与時の腫瘍内微小環境の変化を検討した。まずは、S-1 の細胞障害性を有する抗癌剤である特性を考慮し、そのアポトーシス誘導について評価したところ、血管内皮細胞と血管近傍の癌細胞に多くアポトーシスを誘導することがわかった。このような血管近傍の癌細胞の死は、腫瘍中の圧迫された血管構造への影響を通じて血流を改善することが知られており、同様の評価を実施したところ、S-1 処置によって、開いた管腔構造を持つ血管の増加、それに伴う血流の連続性を示唆するデータが得られた。これらのデータの裏付けとして、S-1 (直接的には 5-FU) への耐性を有する癌細胞株を用いて、腫瘍移行量の増加が得られるか検討したところ、耐性株では S-1 によるリポソームの腫瘍移行性向上は認められなかった。このように、持続的な細胞死がもたらす血流の改善及び腫瘍血管外間隙の増加が S-1 処置によるリポソームの腫瘍移行性向上に関与したと考えられた。

以上の結果から、リポソーム化 I-OHP と S-1 の metronomic chemotherapy の併用の有用性を示すことができた。本併用療法は、FOLFOX における 5FU 持続静注を S-1 に置き換えることで、利便性及び QOL という観点からもレジメンの改善につながるのみならず、効果・

毒性のバランスに優れた治療効果をもたらすことがわかった。さらに、このような優れた治療効果は、単純な他剤併用効果では無く、S-1 の持続的な癌細胞への殺細胞活性が腫瘍内微小環境を改善し、リポソームによる I-OHP デリバリーを向上させたことを明らかにした。以上の結果は、本研究で開発したリポソーム化 I-OHP と S-1 併用が合理的な戦略であることを示すとともに、その有用性を一段と支持するものと考えている。本項で示したように、併用薬物である抗癌剤の殺細胞活性がリポソームの腫瘍移行性に影響を与えるという現象は、リポソームを用いた癌治療レジメン全般で考慮すべきものであり、本研究におけるキーポイントの一つであると考えている。

第6章 総括

本研究では、リポソーム DDS を用いた Oxaliplatin (I-OHP) の体内動態特性の改善により、抗腫瘍効果の増強と神経毒性軽減を含む安全性全般の向上を達成したリポソーム化 I-OHP の開発を目指した。開発に際しては、製薬企業の研究員の使命である医薬品の開発という視点から、製剤としての現実性や規制要件 (regulatory science) を踏まえ、如何にしてリポソーム化 I-OHP を癌患者の下に送り届けるかを意識して研究を計画・遂行した。このような背景の下、リポソーム化 I-OHP の開発では DDS の“器”の開発に重点を置くのではなく、ステルスリポソームという既にある“器”を用いた。これにより、前述のような現実性や規制対応に対する既存の知見を最大限に活用し、迅速かつ確実な製剤開発が可能になると考えた。具体的には、ステルスリポソームは体内動態や安全性について数多くの知見が蓄積されており [52, 60]、適切な組成・設計が概ね完成されていること [80]、医薬品への応用を鑑みた際の製造・品質管理・原材料のサプライチェーンなど CMC (Chemistry, Manufacturing and Control) 開発における障壁が小さいことから、実現可能性が高い DDS 製剤の開発にもつながると考えた。また、患者への貢献を考えた場合、必ずしも革新性が求められる訳ではなく、シンプルかつ堅牢な設計とすることで、迅速に広く安定的に供給することが可能となるため、実用化という視点に立つと有用な選択肢となり得るとも考えた。

このような背景から、ステルスリポソームを用いて、リポソーム化 I-OHP の開発を進めた。この際に重要となる長期血中滞留性や非選択的な体内分布抑制は、ステルスリポソームに標準的に備えられた特性であるが、長期保存を経てもそれら特性を保持されていることは非臨床試験を進める上でも重要である。さらに、臨床応用を目指す上では、製造から品質試験、検査・包装、輸送などを考慮すると数ヶ月は経過してしまうため、少なくとも1年以上の保存安定性を確保する必要がある。よって、リポソーム化 I-OHP 開発の取り掛かりとして、安定性に関する検討に取り組んだ (第2章)。その結果、リポソーム化 I-OHP は特別な対策無しには保存中にリン脂質が分解し、リン脂質の分解に伴いステルスリポソーム製剤の根幹となる血中滞留性が低下することがわかり、その管理の重要性を示すことができた [141]。リン脂質は水溶液中でエステル結合部位が容易に加水分解を受け、脂肪酸が遊離し、リゾリン脂質が産生される。このリゾリン脂質は毒性上も問題となる可能性があり、また、界面活性作用を有することからリポソーム膜の完全性を失わせる一因となるため [69, 142]、リン脂質の分解を最小限に抑え、管理可能な範囲に落とし込むことが肝要である。リン脂質の分解を最小限に抑えるには、加水分解の速度を押さえる、すなわち、低温 (2-8°C) での保管と pH を中性で維持できるような緩衝剤を添加することが効果的である。しかしながら、I-OHP を内封薬物とする場合、I-OHP は物理的な安定性は非常に高いが、化学的には不安定な錯化合物であり、系中の塩の存在により容易に分解することが知られている [58, 59]。よって、リポソーム化 I-OHP 製剤の安定化に向けては、水分散液中で I-OHP とリン脂質を同時に安定化する処方を探した。その結果、リン脂質・I-OHP の

双方に適切な配合適性を示す緩衝剤として 2-morpholinethansulfonic acid (MES)を選定した。pH 6.0 程度の MES 緩衝液を用いることで、1-OHP への負の作用を最低限に留めつつ、リン脂質の保護作用を発揮することができた。また、この安定化効果を製剤の長期安定性という観点からも検証し、リン脂質の分解を一定範囲にコントロールすることで、保存 1 年を経ても製造直後の体内動態特性を保持できることを示した。よって、当初目標としていた臨床試験初期で最低限必要となる保存安定性は確保できたと考えられた。一方で、リン脂質の分解を完全に抑制することができず、市販に向けた更なる長期保管を目指す場合には、安定化剤の再検討やリン脂質分解量の許容幅を拡大するための検討などが必要になる可能性がある。いずれにせよ、リポソームにおける一般的な物理化学的性質の評価は、主に粒子径、薬物の封入率及び薬物含量に関連した研究が多い中で [143-146]、本研究は脂質の分解に焦点を当てた重要な研究であると考えている。医薬品として実用化する際には、血中滞留性などの重要な項目が有効期間（保管可能期間）に渡って同等のプロファイルを示すことが必須であるが、本研究結果で示したリン脂質の分解がもたらす体内動態への影響は、水溶性の抗癌剤を内封したリポソーム製剤で普遍的に考慮すべき重要な論点と考えられた。

続いて、ステルスリポソームという既存の“器”を用いることで、リポソーム化 1-OHP が DDS として期待された性能を発揮できるかを検証した。具体的には、序論で掲げたコンセプトの検証に向け、マウス担癌モデルを用いて、得られた製剤の薬物動態特性や抗腫瘍効果を検討した（第 3 章）。その結果、リポソーム化 1-OHP は遊離型の 1-OHP と比較して静脈内投与後の血漿中濃度を高く維持し、高い血中滞留性を有することがわかった。また、この血中滞留性に付随して、EPR 効果に伴う効率的な腫瘍への集積性向上も確認された。これらの体内動態特性の改変に伴い、ヒト大腸癌 HT-29 担癌マウスにおいて明確に毒性が増加すること無く、抗腫瘍効果を顕著に増強することが明らかとなった。また、遊離型 1-OHP の 7.0 mg/kg と比較して、リポソーム化 1-OHP の 4.2 mg/kg の方が高い抗腫瘍効果を示しており、薬効を維持しつつ投与量を下げることが可能であると示唆された。このような強い抗腫瘍効果を説明するための更なる検討として、 μ -SR-XRF を用いて腫瘍内の 1-OHP の分布を視覚的に評価した。その結果、遊離型の 1-OHP と比較して、1-OHP のリポソーム化によって多量の Pt がデリバリー可能であることが示された。また、リポソーム化 1-OHP の腫瘍内分布は単回投与では血管周辺に集中しているが、繰り返し投与によってその移行量と分布領域が拡大していることがわかった [82]。繰り返し投与によって、静脈内投与した FITC-lectin 及び Evans blue の拡散領域の比が増加したことから、腫瘍内の血管透過性がの上昇に伴い、このような分布パターンの変化が見られたと考えられた。これらの結果は、今回得られた抗腫瘍効果を裏付けるのみならず、既報とも一致する結果であった [83, 84]。先に述べたように、リポソーム化 1-OHP は遊離型 1-OHP よりも少ない投与量で同等以上の抗腫瘍効果が期待できる。1-OHP ベースの治療では累積投与量が神経毒性発現に重要となることが知られていることから [74]、リポソーム化 1-OHP は投与期間の延長、すなわ

ち治療継続性の向上にも寄与すると考えられた。このことは、リポソーム化 I-OHP が繰り返し投与によって腫瘍内分布を改善していくことを踏まえると、単剤投与においても合理的な治療レジメンを提供できる製剤であると考えられた。

しかしながら、いざ臨床に移行すると EPR 効果に基づく DDS 製剤が期待された機能を発揮できない事例が複数報告されており、このような状況はナノ医薬品の設計と臨床応用における課題となっている [147-149]。リポソーム化 I-OHP においても、最初に投与したものの腫瘍移行性が低ければ繰り返し投与の恩恵を受けることも困難であると考えられる。実際に、ナノ医薬品及びリポソーム製剤の先駆けと言える Doxil® の事例を挙げると、確かに ERR 効果は存在すると考えられる [150]。一方で、固形癌に対する治療効果として、必ずしも遊離のドキソルビシンに対して優位な改善が認められておらず [151]、EPR 効果の有用性は限定的であるとするグループも存在している [152]。この背景には、EPR 効果は受動的に生じるため、間質圧や血流の不連続性など不均一な腫瘍内微小環境が障壁になることが挙げられる [153-157]。このような障壁を打破する手法として、リポソーム化 I-OHP と S-1 の **metronomic chemotherapy** が応用可能な戦略となり得ると考えている (第 5 章)。この併用療法がもたらす抗腫瘍効果の増強は、単なる相加的な作用というよりもむしろ相乗的に作用していることが示唆されており、これは薬物同士の相性の良さに合わせて、S-1 がリポソーム化 I-OHP の腫瘍移行を促進することが寄与していることが示された [158, 159]。S-1 を低用量で頻回投与 (**metronomic chemotherapy**) することで、血管近傍の癌細胞に傷害を与え、微小血管を癌細胞の増殖による圧迫から解放し、血流を正常化することが確認されている。このことによって、リポソームの腫瘍内における分布を均一なものにし、血管外のスペースを増加させることでリポソームの血管外における拡散を向上させることが示された。すなわち、S-1 の **metronomic chemotherapy** を用いて、持続的な癌細胞への殺細胞活性に基づく腫瘍内微小環境の改善により、ステルスリポソームの腫瘍移行性と分布様式を改善することが明らかとなった。先にも述べたように、リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与は次に投与するリポソームの移行性を高めることが示されたものの、そもそも EPR 効果が限定的な腫瘍においては限定的な作用しか期待できない。S-1 による血流の正常化や血管外への漏出の促進など腫瘍内微小環境の改善により、人為的にリポソームが移行しやすい環境を作り出した後、リポソーム化 I-OHP の繰り返し投与による腫瘍移行並びに抗腫瘍効果増強を狙うことで、本併用療法の価値は最大化されたと考えられた [83, 84]。同じような効果を目論んで、EPR 効果の普遍性を高めるアプローチとして、血管内皮増殖因子 (VEGF) 阻害剤 [160]、angiotensin-II [161]、tumor necrosis factor α (TNF- α) [162]、tumor matrix modulator [163]、低用量 transforming growth factor (TGF)-beta タイプ I 受容体阻害剤 [164] などの薬剤と併用する戦略が提唱されている。これらの戦略は、上述の S-1 との併用レジメンと同様に、腫瘍内微小環境を能動的に制御する手法として期待されるが、薬剤自体が臨床応用されておらず容易に適用することはできない。一方で、リポソーム製剤と既存の抗癌剤を用いた **metronomic chemotherapy** との併用レジメンは即座に応用可能な戦

略であり、特に本研究で用いた S-1 はエルプラット（遊離型 I-OHP 製剤）との併用療法が既に SOX 療法として臨床試験も複数進行しているため、化合物としての相性も良好である。さらに、S-1 は連日経口で服用する薬剤であることから、投薬形態も *metronomic chemotherapy* とマッチするため、本研究で示した併用療法を臨床で体現する上で、最良のコンビネーションであると考えられた [111, 118]。

以上のように、本検討では、リポソーム化 I-OHP の単剤での薬効や繰り返し投与による腫瘍移行の増強、また高い実現性と相乗的な併用効果をもたらす S-1 との併用療法の開発など、その有用性を強く支持するデータを多く得ることができた。一方で、抗癌剤の開発では効果のみならず、その安全性に関する評価が極めて重要であり、リポソーム化 I-OHP の開発に際して考慮すべき毒性についても評価を重ねた（第 4 章）。まず、臨床移行を目指す上では繰り返し投与時の毒性プロファイルの明確化が必要とされていることから [165]、ラットにおける反復投与毒性試験を実施した。遊離型の I-OHP に比べて、外観所見や血液・血液生化学的項目においても大きく毒性が軽減されており、特に I-OHP で問題となり得る血小板減少の軽減が確認された [106]。さらに、I-OHP の使用で最も問題となる末梢神経毒性について、ラットを用いた冷感刺激、機械刺激のモデルの両方で軽減されることが示唆された。末梢神経毒性軽減の可能性については、ステルスリポソームを用いた I-OHP の DDS において最も期待されたポイントであり、重要なアドバンテージになると考えている。I-OHP による末梢神経毒性は、投与直後から出現する急性神経障害と、治療の長期化に伴う総投与量の増加に起因する遅発性の慢性神経障害があるが [19, 20]、急性神経障害の症状は、低温刺激によって発現し、疼痛などの知覚神経障害が主体となる [21-23]。一方、慢性神経障害は、持続する手足のしびれや感覚異常、疼痛を呈することが知られており、ボタンがかけにくい、物がつかめない、転びやすいなど日常生活に支障をきたす運動機能障害が出現する [21]。いずれも QOL を大きく低下させるため、これまでに臨床試験で多くの発症予防・対処法が検討されており、特に、カルシウム/マグネシウム（グルコン酸カルシウム/硫酸マグネシウム）の静脈内投与は、国内でも複数の施設で予防に用いられ、抗腫瘍効果に影響を与えずに使用できる [26, 27, 90]。しかしながら、FOLFOX にベバシズマブが加わりレジメンが煩雑になるにつれて、カルシウム/マグネシウム療法は使用されなくなってきた。したがって、現時点では I-OHP の末梢神経障害は決定的な予防・治療策は存在せず、休薬・減量・他薬への切り替えが中心となるため、改善に対するニーズは極めて高い。よって、本研究で開発したリポソーム化 I-OHP は、特異的かつ最も敬遠され得る副作用である末梢神経毒性について冷感刺激と機械刺激の両者を軽減することが示唆されたことは非常に意義深い。あくまでも軽減であって発現自体を抑えるという結果にはならなかったが、著しく QOL を低下させ、生存率を脅かすことにもつながる神経毒性を、レジメンを複雑化することなく、軽度にする、もしくは治療継続性を高めることが可能なリポソーム化 I-OHP は、臨床上の期待値が高い製剤であると言える。

さらに、リポソーム製剤の投与に伴う毒性として広く知られている *infusion reaction (IR)*

についても検討した(第4章) [96]. 臨床での IR はしばしば重篤な副反応として生命を脅かすような症例も報告されていることから, このリスクについては, 非臨床試験で可能な限り評価することが望ましい. IR を非臨床試験で評価する手法として CARPA が知られており, その誘導機構に関する研究は Doxil®を中心に行われているが, PEG 修飾タンパク製剤, 抗体医薬, 造影剤においても CARPA が誘導されることが既に明らかになっている[166]. PEG 化製剤に対してのみ CARPA が起こるわけではないため, 抗 PEG IgM の関与については明らかではなかったが, 最近ブタを用いた研究において, CARPA 発現時に抗 PEG IgM と補体 C3 の消費が確認され, 古典経路を介しても CARPA が誘導されることが明らかになっている [167]. このような急性アレルギー様症状は, Doxil® においては約 19% (Doxil® インタビューフォームより), siRNA 医薬品である Onpattro® においては約 27% (Onpattro® インタビューフォームより) の患者で報告されており, これを回避するために抗炎症・抗アレルギー薬の前投与や製剤の点滴速度を抑えることで対応している. また薬物を含まない空のナノキャリアを前投与することで, CARPA のような急激なアレルギー様症状を予防する試みも研究レベルで行われている [107]. このような研究が進められる一方で, リポソーム化 1-OHP は治療用量域の点滴投与・速度においても肺動脈血圧, 全身動脈血圧及び心拍数に明確な影響は認めず, CARPA 反応は惹起されなかった. IR の発生には, ナノ粒子であるという特性以外にも, 化合物による差異も関連すると言われており [96], この点において 1-OHP をリポソーム化する有用性を支持する結果であると考えられた.

以上の通り本検討から, 1-OHP をステルスリポソームに封入することで, 特別な機能性素子の付与や膜組成の改良などを行うことなく, 期待されたコンセプトを達成できることを明らかにした. 現在の癌治療 DDS 研究は, 送り手(キャリア)の革新性に焦点を当てた研究が主流である中で, 既に完成されたキャリアであるステルスリポソームによる体内動態制御を 1-OHP に適用し, 医療現場のニーズに寄り添った開発コンセプトを達成することができた. これは決して普遍的に達成可能であった訳ではなく, 1-OHP の課題解決手段として, ステルスリポソームの持つ体内動態特性が合致していたことが重要であると考えている. 例えば, リポソーム化 1-OHP と同様に癌を対象とした製剤開発を行う場合でも, ステルスリポソームは, 血液癌のように血中を滞留する癌細胞にはターゲティングが困難であるし, 固形癌であってもリポソームごと癌細胞への内在化が求められるようなケースでは適切なキャリアでは無いかもしれない[168]. こういった, 既存のキャリアで十分にコンセプトが達成できない場合において, 新規の処方や機能性素子を用いた改良を実施すれば合理的である. 今回のケースのように, 1-OHP の課題解決手段としてステルスリポソームを用いることで事業上や規制上のハードルを下げつつ, 臨床上の課題を克服し得る機能を得るというアプローチは, 実現可能性を高めながらニーズを的確に反映できる戦略となる. さらに本研究では, 製剤の開発のみならず, 受け手である腫瘍へのアプローチも含めた癌治療戦略を提示した. 癌化学療法においては, 多剤併用療法が基本であるが, 本研究で示した併用療法は, 既に臨床で使用されている S-1 の通常の投与形態にリポソーム化 1-OHP

をオンするだけで、その有用性が科学的に説明可能な併用療法が提供できる [158, 159]. 本研究で開発したリポソーム化 I-OHP 及び S-1 との併用療法が、既存の I-OHP を用いた治療レジメンに代わる選択肢となって癌患者に貢献することを希望するとともに、癌治療発展の一助となることを期待している.

引用文献

1. Rosenblum, D., et al., *Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 1410.
2. Sun, G., et al., *Role of Small Molecule Targeted Compounds in Cancer: Progress, Opportunities, and Challenges*. Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 694363.
3. Bracci, L., et al., *Immune-based mechanisms of cytotoxic chemotherapy: implications for the design of novel and rationale-based combined treatments against cancer*. Cell Death Differ, 2014. **21**(1): p. 15-25.
4. Scott, A.M., J.P. Allison, and J.D. Wolchok, *Monoclonal antibodies in cancer therapy*. Cancer Immun, 2012. **12**: p. 14.
5. Weiner, L.M., R. Surana, and S. Wang, *Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(5): p. 317-327.
6. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 450-461.
7. Hargadon, K.M., C.E. Johnson, and C.J. Williams, *Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors*. Int Immunopharmacol, 2018. **62**: p. 29-39.
8. Einsele, H., et al., *The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types*. Cancer, 2020. **126**(14): p. 3192-3201.
9. Huehls, A.M., T.A. Coupet, and C.L. Sentman, *Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy*. Immunol Cell Biol, 2015. **93**(3): p. 290-296.
10. Marin, J.J., et al., *Importance and limitations of chemotherapy among the available treatments for gastrointestinal tumours*. Anticancer Agents Med Chem, 2009. **9**(2): p. 162-184.
11. Schirmmayer, V., *From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review)*. Int J Oncol, 2019. **54**(2): p. 407-419.
12. Maeda, H. and M. Khatami, *Analyses of repeated failures in cancer therapy for solid tumors: poor tumor-selective drug delivery, low therapeutic efficacy and unsustainable costs*. Clin Transl Med, 2018. **7**(1): p. 11.
13. de Gramont, A., et al., *Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2000. **18**(16): p. 2938-2947.
14. Giacchetti, S., et al., *Phase III multicenter randomized trial of oxaliplatin added to*

- chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer.* J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 136-147.
15. Kidani, Y., M. Noji, and T. Tashiro, *Antitumor activity of platinum(II) complexes of 1,2-diamino-cyclohexane isomers.* Gan, 1980. **71**(5): p. 637-643.
 16. Mathe, G., et al., *Antitumor activity of l-OHP in mice.* Cancer Lett, 1985. **27**(2): p. 135-143.
 17. Tashiro, T., et al., *Antitumor activity of a new platinum complex, oxalato (trans-1-1,2-diaminocyclohexane)platinum (II): new experimental data.* Biomed Pharmacother, 1989. **43**(4): p. 251-260.
 18. Extra, J.M., et al., *Phase I study of oxaliplatin in patients with advanced cancer.* Cancer Chemother Pharmacol, 1990. **25**(4): p. 299-303.
 19. Cassidy, J. and J.L. Misset, *Oxaliplatin-related side effects: characteristics and management.* Semin Oncol, 2002. **29**(5 Suppl 15): p. 11-20.
 20. Ocean, A.J. and L.T. Vahdat, *Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: pathogenesis and emerging therapies.* Support Care Cancer, 2004. **12**(9): p. 619-625.
 21. Gamelin, E., et al., *Clinical aspects and molecular basis of oxaliplatin neurotoxicity: current management and development of preventive measures.* Semin Oncol, 2002. **29**(5 Suppl 15): p. 21-33.
 22. Grothey, A., *Oxaliplatin-safety profile: neurotoxicity.* Semin Oncol, 2003. **30**(4 Suppl 15): p. 5-13.
 23. Pasetto, L.M., et al., *Oxaliplatin-related neurotoxicity: how and why?* Crit Rev Oncol Hematol, 2006. **59**(2): p. 159-168.
 24. Hochster, H.S., A. Grothey, and B.H. Childs, *Use of calcium and magnesium salts to reduce oxaliplatin-related neurotoxicity.* J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 4028-9.
 25. Cascinu, S., et al., *Neuroprotective effect of reduced glutathione on oxaliplatin-based chemotherapy in advanced colorectal cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial.* J Clin Oncol, 2002. **20**(16): p. 3478-3483.
 26. Grothey, A., L.L. Hart, and K.M. Rowland. *Intermittent oxaliplatin (oxali) and time-to-treatment-failure (TTF) in metastatic colorectal cancer (mCRC): Final results of the phase III CONcePT trial.* in ASCO Annual Meeting. 2008: J Clin Oncol.
 27. Nickevich, D.A., A. Grothey, and J.A. Sloan. *Effect of intravenous calcium and magnesium (IV CaMg) on oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity (sNT) in adjuvant colon cancer: Results of the phase III placebo-controlled, double blind NCCTG trial N04c7.* in ASCO Annual Meeting. 2008: J Clin Oncol.
 28. Cassidy, J., G.A. Bjarnason, and T. Hickish. *Randomized double blind (DB) placebo*

- (Plcb) controlled phase III study assessing the efficacy of xaliproden (X) in reducing the cumulative peripheral sensory neuropathy (PSN) induced by the oxaliplatin (Ox) and 5-FU/LV combination (FOLFOX-4) in first-line treatment of patients (pts) with metastatic colorectal cancer (MCRC). in ASCO Annual Meeting. 2006: J Clin Oncol.
29. 元気百歳になる方法. Available from:
https://www.ilcJapan.org/aging/doc/booklet_genki100.pdf.
 30. Dehkordi, A., M.S. Heydarnejad, and D. Fatehi, *Quality of Life in Cancer Patients undergoing Chemotherapy*. Oman Med J, 2009. **24**(3): p. 204-207.
 31. Heydarnejad, M.S., D.A. Hassanpour, and D.K. Solati, *Factors affecting quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy*. Afr Health Sci, 2011. **11**(2): p. 266-270.
 32. SHIBAYAMA, K., et al., *Quality of Life During Chemotherapy in Japanese Patients with Unresectable Advanced Pancreatic Cancer*. Asian J Human Services, 2020. **19**: p. 42-54.
 33. Debela, D.T., et al., *New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives*. SAGE Open Med, 2021. **9**: p. 20503121211034366.
 34. Shi, J., et al., *Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities*. Nat Rev Cancer, 2017. **17**(1): p. 20-37.
 35. Wu, W., Y. Pu, and J. Shi, *Nanomedicine-enabled chemotherapy-based synergetic cancer treatments*. J Nanobiotechnology, 2022. **20**(1): p. 4.
 36. Wei, G., et al., *Recent progress in nanomedicine for enhanced cancer chemotherapy*. Theranostics, 2021. **11**(13): p. 6370-6392.
 37. Liu, P., G. Chen, and J. Zhang, *A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives*. Molecules, 2022. **27**(4).
 38. Beltrán-Gracia, E., et al., *Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications*. Cancer Nano, 2019. **10**: p. 11.
 39. Jain, R.K., *Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers*. J Clin Oncol, 2013. **31**(17): p. 2205-2218.
 40. Shi, Y., et al., *The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy*. Theranostics, 2020. **10**(17): p. 7921-7924.
 41. Maeda, H., *The 35th Anniversary of the Discovery of EPR Effect: A New Wave of Nanomedicines for Tumor-Targeted Drug Delivery-Personal Remarks and Future Prospects*. J Pers Med, 2021. **11**(3).
 42. Duggan, S.T. and G.M. Keating, *Pegylated liposomal doxorubicin: a review of its use in metastatic breast cancer, ovarian cancer, multiple myeloma and AIDS-related*

- Kaposi's sarcoma*. *Drugs*, 2011. **71**(18): p. 2531-2558.
43. Barenholz, Y., *Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned*. *J Control Release*, 2012. **160**(2): p. 117-134.
 44. Frampton, J.E., *Liposomal Irinotecan: A Review in Metastatic Pancreatic Adenocarcinoma*. *Drugs*, 2020. **80**(10): p. 1007-1018.
 45. Passero, F.C., Jr., et al., *The safety and efficacy of Onivyde (irinotecan liposome injection) for the treatment of metastatic pancreatic cancer following gemcitabine-based therapy*. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2016. **16**(7): p. 697-703.
 46. Sato, J., et al., *Dose Escalation Data from the Phase 1 Study of the Liposomal Formulation of Eribulin (E7389-LF) in Japanese Patients with Advanced Solid Tumors*. *Clin Cancer Res*, 2022. **28**(9): p. 1783-1791.
 47. Matsumoto, T., et al., *A Liposomal Gemcitabine, FF-10832, Improves Plasma Stability, Tumor Targeting, and Antitumor Efficacy of Gemcitabine in Pancreatic Cancer Xenograft Models*. *Pharm Res*, 2021. **38**(6): p. 1093-1106.
 48. Gamo, N.J., et al., *Valley of death: A proposal to build a "translational bridge" for the next generation*. *Neurosci Res*, 2017. **115**: p. 1-4.
 49. Ramos-Martinez, B., J.M. Alonso-Herreros, and A.M. Martin de Rosales-Cabrera, *The importance of quality control in raw materials used in pharmaceutical formulations*. *Farm Hosp*, 2020. **44**(1): p. 32-33.
 50. Abrantes, C.G., D. Duarte, and C.P. Reis, *An Overview of Pharmaceutical Excipients: Safe or Not Safe?* *J Pharm Sci*, 2016. **105**(7): p. 2019-26.
 51. Schellekens, H., et al., *How to regulate nonbiological complex drugs (NBCD) and their follow-on versions: points to consider*. *AAPS J*, 2014. **16**(1): p. 15-21.
 52. Immordino, M.L., F. Dosio, and L. Cattel, *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. *Int J Nanomedicine*, 2006. **1**(3): p. 297-315.
 53. Andre, T., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2343-2351.
 54. Andre, T., et al., *Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3109-3116.
 55. Susman, E., *Progressive advanced breast cancer: disease-control option with gemcitabine-oxaliplatin regimen*. *Oncol Times*, 2005. **27**: p. 38.
 56. Ueno, T., et al., *Assessment of antitumor activity and acute peripheral neuropathy of 1,2-diaminocyclohexane platinum (II)-incorporating micelles (NC-4016)*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 3005-3012.

57. Xiao, H., et al., *Delivery of active DACH-Pt anticancer species by biodegradable amphiphilic polymers using thiol-ene radical addition*. *Macromol Biosci*, 2012. **12**(3): p. 367-373.
58. Alberto, M.E., et al., *The degradation pathways in chloride medium of the third generation anticancer drug oxaliplatin*. *J Phys Chem B*, 2008. **112**(35): p. 10765-10768.
59. Jerremalm, E., et al., *Oxaliplatin degradation in the presence of chloride: identification and cytotoxicity of the monochloro monooxalato complex*. *Pharm Res*, 2004. **21**(5): p. 891-894.
60. Bulbake, U., et al., *Liposomal Formulations in Clinical Use: An Updated Review*. *Pharmaceutics*, 2017. **9**(2).
61. Namjoshi, S., et al., *Quality by Design: Development of the Quality Target Product Profile (QTPP) for Semisolid Topical Products*. *Pharmaceutics*, 2020. **12**(3).
62. Pons, M., M. Foradada, and J. Estelrich, *Liposomes obtained by the ethanol injection method*. *Int J Pharm*, 1993. **95**(1-3): p. 51-56.
63. **WARNING: INFUSION REACTIONS, MYELOSUPPRESSION, CARDIOTOXICITY, LIVER IMPAIRMENT, SUBSTITUTION** Available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2007/050718s029lbl.pdf.
64. **WARNING: SEVERE NEUTROPENIA and SEVERE DIARRHEA**. Available from:
https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2015/207793lbl.pdf.
65. Bhowmick, S., et al., *Liposome composition and method of preparing the liposome (WO2016013031A1)*.
66. Graham, M.A., et al., *Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: a critical review*. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(4): p. 1205-1218.
67. *Avanti POLAR LIPIDS Storage & Handling of Lipids*. Available from:
<https://avantilipids.com/tech-support/storage-handling-of-lipids>.
68. Gabizon, A.A., *Liposome circulation time and tumor targeting: implications for cancer chemotherapy*. *Adv Drug Deliv Rev*, 1995. **16**(2-3): p. 285-294.
69. Yuan, Y., et al., *The bioactive phospholipid, lysophosphatidylcholine, induces cellular effects via G-protein-dependent activation of adenylyl cyclase*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(43): p. 27090-27098.
70. Mehta, A.M., et al., *Stability of oxaliplatin in chloride-containing carrier solutions used in hyperthermic intraperitoneal chemotherapy*. *Int J Pharm*, 2015. **479**(1): p. 23-27.
71. Grit, M., W.J. Underberg, and D.J. Crommelin, *Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions*. *J Pharm Sci*, 1993. **82**(4): p.

- 362-366.
72. Grit, M., et al., *Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions*. Int J Pharm, 1989. **50**(1): p. 1-6.
 73. Livingston, A.N. and T.J. Mattingly, 2nd, *Drug and medical device product failures and the stability of the pharmaceutical supply chain*. J Am Pharm Assoc (2003), 2021. **61**(1): p. e119-e122.
 74. Ito, Y., et al., *Assessment of Oxaliplatin-induced Chronic Neuropathy and Anticancer Efficacy Through Pharmacokinetic and Toxicodynamic Evaluation of a Rat Model of Colorectal Cancer*. Anticancer Res, 2019. **39**(8): p. 4207-4213.
 75. Moghimi, S.M. and J. Szebeni, *Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties*. Prog Lipid Res, 2003. **42**(6): p. 463-478.
 76. Ranson, M.R., et al., *Caelyx (stealth liposomal doxorubicin) in the treatment of advanced breast cancer*. Crit Rev Oncol Hematol, 2001. **37**(2): p. 115-120.
 77. Maeda, H., et al., *Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review*. J Control Release, 2000. **65**(1-2): p. 271-284.
 78. Maeda, H. and Y. Matsumura, *EPR effect based drug design and clinical outlook for enhanced cancer chemotherapy*. Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(3): p. 129-130.
 79. Allen, T.M. and P.R. Cullis, *Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(1): p. 36-48.
 80. Charrois, G.J. and T.M. Allen, *Drug release rate influences the pharmacokinetics, biodistribution, therapeutic activity, and toxicity of pegylated liposomal doxorubicin formulations in murine breast cancer*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1663**(1-2): p. 167-177.
 81. Takimoto, C.H., et al., *Oxaliplatin pharmacokinetics and pharmacodynamics in adult cancer patients with impaired renal function*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(16): p. 4832-4839.
 82. Ando, H., et al., *Intratumoral Visualization of Oxaliplatin within a Liposomal Formulation Using X-ray Fluorescence Spectrometry*. Mol Pharm, 2018. **15**(2): p. 403-409.
 83. Nakamura, H., et al., *Sequential treatment of oxaliplatin-containing PEGylated liposome together with S-1 improves intratumor distribution of subsequent doses of oxaliplatin-containing PEGylated liposome*. Eur J Pharm Biopharm, 2014. **87**(1): p. 142-151.
 84. Nakamura, H., et al., *Intra-tumor distribution of PEGylated liposome upon repeated injection: No possession by prior dose*. J Control Release, 2015. **220**(Pt A): p. 406-413.

85. Krishna, R., et al., *Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **298**(3): p. 1206-1212.
86. リポソーム製剤の開発に関するガイドライン(平成28年3月28日付 厚生労働省医薬・生活衛生局審査管理課長通知(薬生審査発0328第19号)). Available from: <https://www.pmda.go.jp/files/000211460.pdf>.
87. *Liposome Drug Products: Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation*. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/liposome-drug-products-chemistry-manufacturing-and-controls-human-pharmacokinetics-and-labeling-documentation>.
88. *Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product*. Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-data-requirements-intravenous-liposomal-products-developed-reference-innovator_en.pdf.
89. 江頭, 伸., 雄. 川尻, and 了. 大石, *抗がん剤による末梢神経障害の治療薬の現状*. 日薬理誌, 2010. **136**: p. 275-279.
90. Gamelin, L., et al., *Prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity by calcium and magnesium infusions: a retrospective study of 161 patients receiving oxaliplatin combined with 5-Fluorouracil and leucovorin for advanced colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 4055-4061.
91. Grothey, A., et al., *Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7*. J Clin Oncol, 2011. **29**(4): p. 421-427.
92. Wang, W.S., et al., *Oral glutamine is effective for preventing oxaliplatin-induced neuropathy in colorectal cancer patients*. Oncologist, 2007. **12**(3): p. 312-319.
93. von Delius, S., et al., *Carbamazepine for prevention of oxaliplatin-related neurotoxicity in patients with advanced colorectal cancer: final results of a randomised, controlled, multicenter phase II study*. Invest New Drugs, 2007. **25**(2): p. 173-180.
94. Mitchell, P.L., et al., *Addition of gabapentin to a modified FOLFOX regimen does not reduce oxaliplatin-induced neurotoxicity*. Clin Colorectal Cancer, 2006. **6**(2): p. 146-151.
95. Ito, Y., et al., *Pharmacokinetic and toxicodynamic evaluation of oxaliplatin-induced neuropathy and hematological toxicity in rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 2018.

- 81(1): p. 155-161.
96. Szebeni, J., et al., *Roadmap and strategy for overcoming infusion reactions to nanomedicines*. Nat Nanotechnol, 2018. **13**(12): p. 1100-1108.
 97. Lenz, H.J., *Management and preparedness for infusion and hypersensitivity reactions*. Oncologist, 2007. **12**(5): p. 601-609.
 98. Szebeni, J., et al., *A porcine model of complement-mediated infusion reactions to drug carrier nanosystems and other medicines*. Adv Drug Deliv Rev, 2012. **64**(15): p. 1706-1716.
 99. Mohamed, M., et al., *PEGylated liposomes: immunological responses*. Sci Technol Adv Mater, 2019. **20**(1): p. 710-724.
 100. Rosello, S., et al., *Management of infusion reactions to systemic anticancer therapy: ESMO Clinical Practice Guidelines*. Ann Oncol, 2017. **28**(suppl_4): p. iv100-iv118.
 101. Descoeur, J., et al., *Oxaliplatin-induced cold hypersensitivity is due to remodelling of ion channel expression in nociceptors*. EMBO Mol Med, 2011. **3**(5): p. 266-278.
 102. Shigematsu, N., et al., *Neuroprotective effect of alogliptin on oxaliplatin-induced peripheral neuropathy in vivo and in vitro*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 6734.
 103. Chaplan, S.R., et al., *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw*. J Neurosci Methods, 1994. **53**(1): p. 55-63.
 104. Szebeni, J., et al., *A porcine model of complement activation-related pseudoallergy to nano-pharmaceuticals: Pros and cons of translation to a preclinical safety test*. Prec Nanomed, 2018. **1**: p. 63-73.
 105. Urbanics, R., P. Bedócs, and J. Szebeni, *Lessons learned from the porcine CARPA model: constant and variable responses to different nanomedicines and administration protocols*. Eur J Nanomedicine, 2015. **7**: p. 219-231.
 106. Ghazanfar, H., I. Nawaz, and N. Ali, *Oxaliplatin-Induced Thrombocytopenia: A Case Report and Review of Pathophysiology of Various Speculative Mechanisms*. Cureus, 2020. **12**(8): p. e9929.
 107. Szebeni, J., et al., *Prevention of infusion reactions to PEGylated liposomal doxorubicin via tachyphylaxis induction by placebo vesicles: a porcine model*. J Control Release, 2012. **160**(2): p. 382-387.
 108. DeVita, V.T., Jr. and E. Chu, *A history of cancer chemotherapy*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8643-8653.
 109. Bayat Mokhtari, R., et al., *Combination therapy in combating cancer*. Oncotarget, 2017. **8**(23): p. 38022-38043.
 110. Tan, A.C., et al., *Systematic review of combinations of targeted or immunotherapy in advanced solid tumors*. J Immunother Cancer, 2021. **9**(7).

111. Yamada, Y., et al., *Phase I/II study of oxaliplatin with oral S-1 as first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer*. Br J Cancer, 2008. **98**(6): p. 1034-1038.
112. Shirasaka, T., et al., *Antitumor activity of 1 M tegafur-0.4 M 5-chloro-2,4-dihydropyridine-1 M potassium oxonate (S-1) against human colon carcinoma orthotopically implanted into nude rats*. Cancer Res, 1996. **56**(11): p. 2602-2606.
113. Takechi, T., et al., *Antitumor activity and low intestinal toxicity of S-1, a new formulation of oral tegafur, in experimental tumor models in rats*. Cancer Chemother Pharmacol, 1997. **39**(3): p. 205-211.
114. Sakata, Y., et al., *Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur-0.4 M gimestat-1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients*. Eur J Cancer, 1998. **34**(11): p. 1715-1720.
115. Sakuramoto, S., et al., *Adjuvant chemotherapy for gastric cancer with S-1, an oral fluoropyrimidine*. N Engl J Med, 2007. **357**(18): p. 1810-1820.
116. Shirao, K., et al., *Phase II study of oral S-1 for treatment of metastatic colorectal carcinoma*. Cancer, 2004. **100**(11): p. 2355-2361.
117. Nakamura, K., et al., *Phase I trial of oral S-1 combined with gemcitabine in metastatic pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2005. **92**(12): p. 2134-2139.
118. Baba, H., et al., *S-1 and oxaliplatin (SOX) plus bevacizumab versus mFOLFOX6 plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer: updated overall survival analyses of the open-label, non-inferiority, randomised phase III: SOFT study*. ESMO Open, 2017. **2**(1): p. e000135.
119. Simsek, C., E. Esin, and S. Yalcin, *Metronomic Chemotherapy: A Systematic Review of the Literature and Clinical Experience*. J Oncol, 2019. **2019**: p. 5483791.
120. Maiti, R., *Metronomic chemotherapy*. J Pharmacol Pharmacother, 2014. **5**(3): p. 186-192.
121. Kerbel, R.S. and B.A. Kamen, *The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(6): p. 423-436.
122. Ma, C.L., R.J. Sun, and J. Li, *Short-term effect of metronomic chemotherapy of low-dose Tegafur on patients with primary hepatic carcinoma after radiofrequency ablation*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018. **22**(12): p. 3742-3748.
123. Peristeri, D.V., et al., *Metronomic chemotherapy with cyclophosphamide for the treatment of advanced hepatocellular cancer: A case report*. Ann Med Surg (Lond), 2021. **72**: p. 103043.
124. Shi, M., et al., *A study of capecitabine metronomic chemotherapy is non-inferior to conventional chemotherapy as maintenance strategy in responders after induction*

- therapy in metastatic colorectal cancer*. *Trials*, 2020. **21**(1): p. 249.
125. Norrby, K., *Metronomic chemotherapy and anti-angiogenesis: can upgraded pre-clinical assays improve clinical trials aimed at controlling tumor growth?* *APMIS*, 2014. **122**(7): p. 565-579.
126. Ooyama, A., et al., *Anti-angiogenic effect of 5-Fluorouracil-based drugs against human colon cancer xenografts*. *Cancer Lett*, 2008. **267**(1): p. 26-36.
127. Tsuji, W., et al., *Orally administered S-1 suppresses circulating endothelial cell counts in metastatic breast cancer patients*. *Int J Clin Oncol*, 2014. **19**(3): p. 452-459.
128. Jimenez, B., et al., *Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1*. *Nat Med*, 2000. **6**(1): p. 41-48.
129. Mpekris, F., et al., *Normalizing tumor microenvironment with nanomedicine and metronomic therapy to improve immunotherapy*. *J Control Release*, 2022. **345**: p. 190-199.
130. Khawar, I.A., J.H. Kim, and H.J. Kuh, *Improving drug delivery to solid tumors: priming the tumor microenvironment*. *J Control Release*, 2015. **201**: p. 78-89.
131. Ishida, T., E. Shiraga, and H. Kiwada, *Synergistic antitumor activity of metronomic dosing of cyclophosphamide in combination with doxorubicin-containing PEGylated liposomes in a murine solid tumor model*. *J Control Release*, 2009. **134**(3): p. 194-200.
132. Lu, D., et al., *Tumor priming enhances delivery and efficacy of nanomedicines*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007. **322**(1): p. 80-88.
133. Nakata, E., et al., *S-1, an oral fluoropyrimidine, enhances radiation response of DLD-1/FU human colon cancer xenografts resistant to 5-FU*. *Oncol Rep*, 2006. **16**(3): p. 465-471.
134. Abu-Lila, A., et al., *Oxaliplatin targeting to angiogenic vessels by PEGylated cationic liposomes suppresses the angiogenesis in a dorsal air sac mouse model*. *J Control Release*, 2009. **134**(1): p. 18-25.
135. Bartlett, G.R., *Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids*. *J Biol Chem*, 1959. **234**(3): p. 469-471.
136. Ishida, T., et al., *Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections*. *J Control Release*, 2003. **88**(1): p. 35-42.
137. Harashima, H., et al., *Kinetic analysis of AUC-dependent saturable clearance of liposomes: mathematical description of AUC dependency*. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1993. **21**(3): p. 299-308.
138. Bhattacharya, A., et al., *Tumor vascular maturation and improved drug delivery induced by methylselenocysteine leads to therapeutic synergy with anticancer drugs*.

- Clin Cancer Res, 2008. **14**(12): p. 3926-3932.
139. Balasubramaniam, P., A. Malathi, and C. Viswanathan, *A simple technique for hemoglobin estimation to screen for anaemia*. Indian J Physiol Pharmacol, 1992. **36**(3): p. 213-214.
 140. Padera, T.P., et al., *Pathology: cancer cells compress intratumour vessels*. Nature, 2004. **427**(6976): p. 695.
 141. Doi, Y., et al., *Long-term storage of PEGylated liposomal oxaliplatin with improved stability and long circulation times in vivo*. Int J Pharm, 2019. **564**: p. 237-243.
 142. 藤田, 哲. and 一.昭. 鈴木, *大豆リゾリン脂質の界面活性の研究(第1報)-水溶液の性質, 湿潤と浸透作用*. Nippon Nogeikagaku Kaishi, 1990. **64**: p. 1355-1360.
 143. Briuglia, M.L., et al., *Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release*. Drug Deliv Transl Res, 2015. **5**(3): p. 231-242.
 144. Mahmud, M., et al., *Long-Circulating Curcumin-Loaded Liposome Formulations with High Incorporation Efficiency, Stability and Anticancer Activity towards Pancreatic Adenocarcinoma Cell Lines In Vitro*. PLoS One, 2016. **11**(12): p. e0167787.
 145. Zhang, L. and S. Granick, *How to stabilize phospholipid liposomes (using nanoparticles)*. Nano Lett, 2006. **6**(4): p. 694-698.
 146. Sabin, J., et al., *Size and stability of liposomes: a possible role of hydration and osmotic forces*. Eur Phys J E Soft Matter, 2006. **20**(4): p. 401-408.
 147. Ikeda-Imafuku, M., et al., *Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation*. J Control Release, 2022. **345**: p. 512-536.
 148. Prabhakar, U., et al., *Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology*. Cancer Res, 2013. **73**(8): p. 2412-2417.
 149. Maeda, H., *The EPR effect: its history, development and future implication*. Drug Delivery System, 2018. **33**(2): p. 80-88.
 150. Gabizon, A., H. Shmeeda, and Y. Barenholz, *Pharmacokinetics of pegylated liposomal Doxorubicin: review of animal and human studies*. Clin Pharmacokinet, 2003. **42**(5): p. 419-436.
 151. Northfelt, D.W., et al., *Pegylated-liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin, and vincristine in the treatment of AIDS-related Kaposi's sarcoma: results of a randomized phase III clinical trial*. J Clin Oncol, 1998. **16**(7): p. 2445-2451.
 152. Danhier, F., *To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?* J Control Release, 2016. **244**(Pt A): p.

- 108-121.
153. Ejigah, V., et al., *Approaches to Improve Macromolecule and Nanoparticle Accumulation in the Tumor Microenvironment by the Enhanced Permeability and Retention Effect*. Polymers (Basel), 2022. **14**(13).
 154. Stylianopoulos, T., et al., *Causes, consequences, and remedies for growth-induced solid stress in murine and human tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(38): p. 15101-15108.
 155. Griffon-Etienne, G., et al., *Taxane-induced apoptosis decompresses blood vessels and lowers interstitial fluid pressure in solid tumors: clinical implications*. Cancer Res, 1999. **59**(15): p. 3776-3782.
 156. Jain, R.K., *Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(8): p. 570-576.
 157. Nia, H.T., et al., *Solid stress and elastic energy as measures of tumour mechanopathology*. Nat Biomed Eng, 2016. **1**.
 158. Doi, Y., et al., *Improvement of intratumor microdistribution of PEGylated liposome via tumor priming by metronomic S-1 dosing*. Int J Nanomedicine, 2016. **11**: p. 5573-5582.
 159. Doi, Y., et al., *Combination therapy of metronomic S-1 dosing with oxaliplatin-containing polyethylene glycol-coated liposome improves antitumor activity in a murine colorectal tumor model*. Cancer Sci, 2010. **101**(11): p. 2470-2475.
 160. Tong, R.T., et al., *Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3731-3736.
 161. Iyer, A.K., et al., *Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting*. Drug Discov Today, 2006. **11**(17-18): p. 812-818.
 162. Seki, T., et al., *Tumour necrosis factor-alpha increases extravasation of virus particles into tumour tissue by activating the Rho A/Rho kinase pathway*. J Control Release, 2011. **156**(3): p. 381-389.
 163. Eikenes, L., et al., *Hyaluronidase induces a transcapillary pressure gradient and improves the distribution and uptake of liposomal doxorubicin (Caelyx) in human osteosarcoma xenografts*. Br J Cancer, 2005. **93**(1): p. 81-88.
 164. Kano, M.R., et al., *Improvement of cancer-targeting therapy, using nanocarriers for intractable solid tumors by inhibition of TGF-beta signaling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(9): p. 3460-3465.
 165. *Guideline for the Development of Liposome Drug Products (March 2016, MHLW, Japan)*. Available from:

https://www.nihs.go.jp/drug/section4/160328_MHLW_liposome_guideline.pdf.

166. Szebeni, J., *Complement activation-related pseudoallergy: a stress reaction in blood triggered by nanomedicines and biologicals*. *Mol Immunol*, 2014. **61**(2): p. 163-173.
167. Kozma, G.T., et al., *Pseudo-anaphylaxis to Polyethylene Glycol (PEG)-Coated Liposomes: Roles of Anti-PEG IgM and Complement Activation in a Porcine Model of Human Infusion Reactions*. *ACS Nano*, 2019. **13**(8): p. 9315-9324.
168. Caviglia, C., et al., *Monitoring cell endocytosis of liposomes by real-time electrical impedance spectroscopy*. *Anal Bioanal Chem*, 2020. **412**(24): p. 6371-6380.

論文目録

1. Combination therapy of metronomic S-1 dosing with oxaliplatin-containing polyethylene glycol-coated liposome improves antitumor activity in a murine colorectal tumor model. **Doi Y.**, Okada T., Matsumoto H., Ichihara M., Ishida T., Kiwada H., *Cancer Science*, 101, 2470-2475 (2010)
2. Improvement of intratumor microdistribution of PEGylated liposome via tumor priming by metronomic S-1 dosing. **Doi Y.**, Abu Lila A.S., Matsumoto H., Okada T., Shimizu T., Ishida T., *International Journal of Nanomedicine*, 11, 5573-5582 (2016)
3. Intratumoral Visualization of Oxaliplatin within a Liposomal Formulation Using X-ray Fluorescence Spectrometry. Ando H., Abu Lila A.S., Tanaka M., **Doi Y.**, Terada Y., Yagi N., Shimizu T., Okuhira K., Ishima Y., Ishida T., *Molecular Pharmaceutics*, 15, 403-409 (2018)
4. Long-term storage of PEGylated liposomal oxaliplatin with improved stability and long circulation times *in vivo*. **Doi Y.**, Shimizu T., Ishima Y., Ishida T., *International Journal of Pharmaceutics*, 564, 237-243 (2019)

謝辞

本研究の遂行及び本論文の執筆にあたり、多大なるお時間を割いて頂き、長年に渡りご指導・ご鞭撻を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 石田竜弘教授に心から感謝の意を表します。

また、本論文の執筆にあたり、的確なご指導・ご鞭撻ならびに激励を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 衛生薬学分野 小暮健太郎教授に厚く御礼申し上げます。

同じく、終始ご懇意なるご指導・ご鞭撻を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 創薬理論化学分野 立川正憲教授に深く御礼申し上げます。

本研究に際し、有益なご助言・ご指導を賜りました徳島大学 際田弘志名誉教授に心から感謝の意を表します。また、本論文の執筆にあたり、的確かつ有益なご指導・ご助言を賜りました徳島大学 大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野 異島優准教授、清水太郎特任助教、安藤英紀特任助教に深く御礼申し上げます。

実験・評価手法や論文執筆において、親身に的確かつ有益なご指導・ご鞭撻を賜りました大阪医科薬科大学薬学部 衛生化学研究室 奥平桂一郎教授、公益財団法人 高輝度光科学研究センター(JASRI) 利用研究促進部門 コーディネータ・特別研究員 八木直人博士、JASRI 放射光利用研究基盤センター 散乱・イメージング推進室 寺田靖子博士に深く御礼申し上げます。

また、徳島大学 大学院医歯薬学研究部 薬物動態制御学分野での実験実施や論文執筆において、多くの支援を賜りました Amr Selim Abu Lila 博士、市原理子博士、岡田知子修士、松本春奈修士、田中真生修士にも厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始御懇意なるご指導・ご鞭撻を賜り、長年に渡る論文執筆へのご理解を頂き、後押しして頂いた大鵬薬品工業株式会社 馬場一彦博士、木下真宏博士、大西敬人博士、尾形哲夫博士、中村文彦博士、岡田慎治修士、川真田秀樹博士に心から感謝申し上げます。また、日頃から有益なご指導・ご鞭撻を賜りました大鵬薬品工業株式会社の諸先輩、同輩、後輩の皆様に心から御礼申し上げます。

最後になりましたが、深い理解をもって常に支えてくれた家族、そして郷里の両親に深く感謝致します。