

胃癌腹膜播種に対する腹腔内抗癌剤治療に 関する基礎的検討

相馬大介

目 次

| | |
|------|---|
| はじめに | 1 |
|------|---|

第 1 章 P T X の静脈または腹腔内投与時の組織移行性の変化の検討

| | |
|------------------------|----|
| 1. 目的 | 5 |
| 2. 実験方法 | 8 |
| 2.1. 動物実験のデザイン | 8 |
| 2.2. PTX の濃度測定方法 | 9 |
| 2.3. 薬物動態のパラメーターの解析 | 9 |
| 2.4. 統計解析 | 10 |
| 3. 実験結果 | 11 |
| 3.1. 血清中の PTX 濃度の時間的推移 | 11 |
| 3.2. 組織中の PTX 濃度 | 13 |
| 3.2. 血清、組織中 PTX の薬物動態 | 14 |
| 4. 考察 | 16 |

第 2 章 高分子ミセル製剤 P T X - 3 0 W の胃癌腹膜播種に対する効果の検討

I 胃癌細胞株に対する高分子ミセル製剤 PTX-30W の効果の検討

| | |
|---------------|----|
| 1. 目的 | 19 |
| 2. 実験方法 | 22 |
| 2.1. マテリアルの準備 | 22 |
| 2.2. 細胞 | 25 |

| | | |
|--|-------------------------|----|
| 2. 3. | MTS assay | 25 |
| 2. 4. | フローサイトメトリーによる細胞周期の測定 | 26 |
| 2. 5. | 統計解析 | 26 |
| 3. | 実験結果 | 27 |
| 3. 1. | 細胞増殖に対する影響 | 27 |
| 3. 2. | 細胞周期に対する影響 | 28 |
| | | |
| II. 胃癌播種モデルに対する高分子ミセル製剤 PTX-30W の効果の検討 | | |
| 1. | 目的 | 31 |
| 2. | 実験方法 | 31 |
| 2. 1. | 腹膜播種に対する PTX-30W の作用の検討 | 31 |
| 2. 2. | 腹膜播種結節内の PTX 濃度の比較 | 32 |
| 2. 3. | 統計解析 | 32 |
| 3. | 実験結果 | 34 |
| 3. 1. | 腹膜播種に対する PTX-30W の作用の検討 | 34 |
| 3. 2. | 腹膜播種結節内の PTX 濃度の比較 | 38 |
| 4. | 考察 | 39 |
| | | |
| まとめ | | 44 |
| 結論 | | 45 |
| 謝辞 | | 46 |
| 文献 | | 47 |

図表目次

| | | |
|------|---|----|
| 図 1 | 腹腔内投与時の抗癌剤の吸収経路 | 5 |
| 図 2 | 播種結節に対する抗癌剤の IP、IV 投与における抗腫瘍効果 | 6 |
| 図 3 | IP、IV 投与時の血清中 PTX 濃度の経時的推移 | 11 |
| 図 4 | 組織中 PTX 濃度 | 13 |
| 図 5 | MPC コポリマー (PMB) の構造式 | 23 |
| 図 6 | 高分子型ミセル PMB30W の模式図 | 24 |
| 図 7 | MKN45P に対する PTX-Cre, PTX-30W の細胞増殖抑制効果 | 27 |
| 図 8 | Cremophor, PMB30W の MKN45P に対する細胞増殖への影響 | 28 |
| 図 9 | MKN45P に対する細胞周期への影響 | 30 |
| 図 10 | 腹膜播種モデルでの腫瘍増殖抑制効果 | 35 |
| 図 11 | 腹膜播種モデルでの生存率の検討 | 37 |
| 図 12 | 播種結節中の PTX 濃度 | 38 |
| 表 1 | 血清、組織中 PTX の薬物動態 | 15 |
| 表 2 | 播種モデルマウスの Group 分類 | 32 |

1. はじめに

腹膜播種は胃癌における最も頻度の高い転移・再発形式であり、漿膜浸潤を伴う未分化型癌では特に高率に認められる病態である。播種が進行すると、イレウスや水腎症、腹水貯留を併発し、いわゆる癌性腹膜炎の状態となり、全身状態は急速に悪化する。したがって、腹膜播種の治療は胃癌治療の中でも非常に重要な位置を占め、その成績は胃癌の予後を大きく左右する[1, 2]。腹膜播種に対しては、これまでに様々な治療法が試行されてきたが、満足できる奏効は認められておらず、いまだに「標準的治療」と言うべき治療法は存在しない。

新規抗癌剤であるパクリタキセル(PTX)は西洋イチイ(*Taxus brevifolia*)の樹皮から単離された天然有機化合物であり、有力な抗癌剤の一つとして広く臨床使用されている。その作用機序は、微小管の脱重合を阻害して、細胞分裂を障害することにより、強力な抗腫瘍効果を示すことがわかっており[3, 4]、現在では、卵巣癌、乳癌、非小細胞性肺癌、胃癌、子宮体癌などに対して広く承認されている。

PTXはその分子量が大きく、脂溶性であるという性質から、腹腔内投与時に長時間腹腔内濃度が高く維持され血液中に移行しにくいという特徴があり、血漿

中の薬剤の AUC/腹腔内の薬剤の AUC を比較すると、その値が著明に低くなるため、腹腔内投与に適した薬剤であることが以前より示唆されてきた[5-7]。欧米では、比較的古くから卵巢癌に対する術後補助化学療法としての PTX 腹腔内投与が行われ、その有効性が報告されている[8-11]。近年、米国の大規模臨床試験にて StageⅢの卵巢癌術後の補助化学療法としての PTX とシスプラチン(CDDP)の腹腔内投与が、全身投与に比較して MST(Mean Survival Time)で 16 ヶ月の増加をもたらすことが証明され、PTX の腹腔内投与は進行卵巢癌に対する標準治療と認識されてきている[12, 13]。本邦では、胃癌に対して Taxane 系薬剤が適応されており、腹膜播種症例に対しても PTX の腹腔内投与で著効を示したという症例報告が認められる[14-16]。これらの結果から、胃癌腹膜播種に対する PTX の腹腔内投与の有用性が推測されるが、まとまった症例数での臨床試験の結果はまだ報告されてはいない。また、腹膜播種の患者の多くは、腹膜以外にも多発性病変を有する場合が多く、抗癌剤の腹腔内投与が播種以外の病変に対する治療効果について検討する事も臨床的には重要であると思われる。

さて、抗癌剤をナノサイズの担体（ナノキャリア）によって分子修飾することにより、薬剤の腫瘍への局所選択的到達率を高め、がんに対する治療効果を

高めると共に副作用を軽減するという試みが盛んに行われている。これは、腫瘍組織では腫瘍血管の著しい透過性の亢進が起こっている一方で、血管系に見合うだけのリンパ系のシステムの増生がないため、正常血管では血管外に漏れにくい高分子物質も腫瘍血管からは漏出しやすく、いったん局所で漏出した高分子はその場に停留しやすいという、いわゆる EPR (enhanced permeability and retention) 効果を期待したものである。また、水溶性の抗癌剤においては、このナノキャリアを用いて高分子化、ミセル化することによって、腹腔内で停留性が高まり、より長時間高濃度に維持できることも報告されている[17-19]。一般に、高分子化、ミセル化した粒子は血管系からの吸収が悪く、主に乳班や stomata などの腹腔内リンパ組織から吸収されることが指摘されている[20]。これらは腹膜転移の初期の転移巣[21-23]であるため、高分子ミセル製剤を腹腔内投与すれば、初期の転移部位において選択的長時間に抗癌剤が作用するという利点もあると考えられる。しかし、キャリアの毒性の問題などから、高分子ミセル製剤の腹腔内投与に対する臨床応用はいまだ普及してはいない[24]。

脂溶性の PTX においても高分子ミセル製剤の開発がされ、全身投与での効果と安全性が証明されてきている[25, 26]。しかし、この PTX 内包高分子ミセル製

剤の腹腔内投与治療への応用についてはいまだ検討されていない。

以上のことを踏まえて、本研究では

1. PTX の腹腔内投与時の各臓器への薬剤移行性
2. 播種に対する PTX 内包高分子ミセル製剤の腹腔内投与の有用性

の 2 つを検討課題とした。

第1章 PTX腹腔内投与時の組織移行性の変化の検討

1. 目的

腹腔内投与時の抗癌剤の吸収経路としては、図1のシェーマに示すように

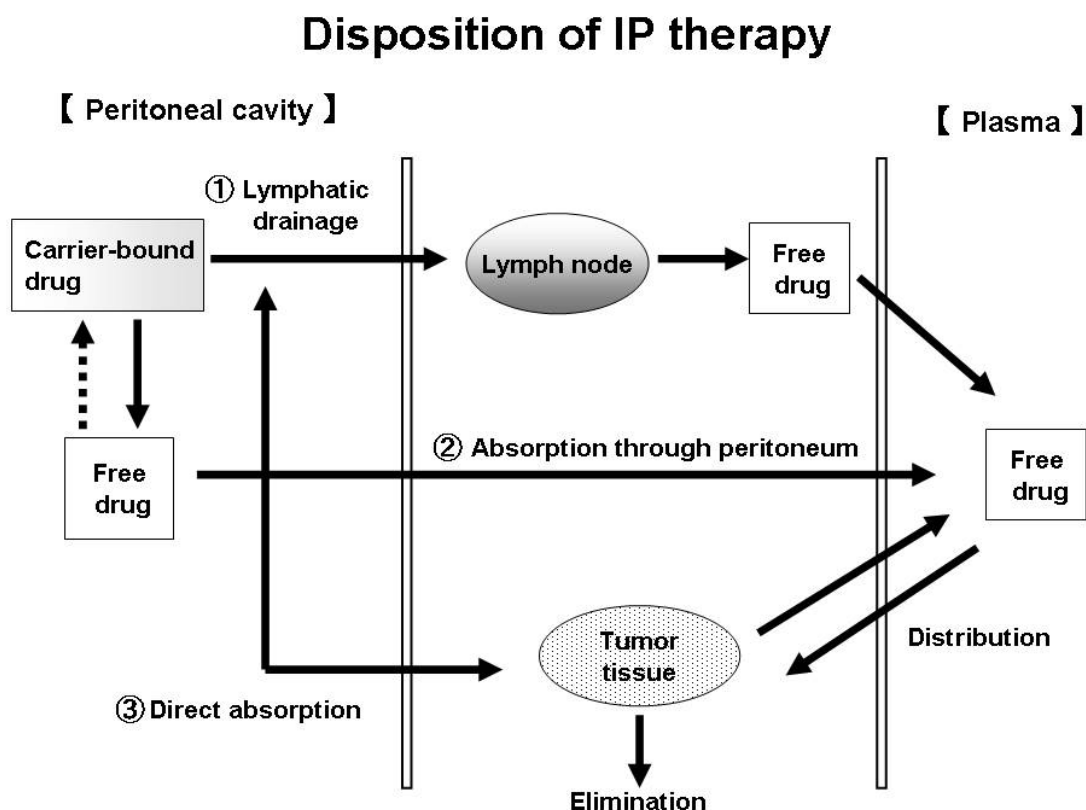


図1 腹腔内投与時の抗癌剤の吸収経路

- ① 腹膜→毛細血管→静脈（体循環）
- ② 腹膜に開いたリンパ管→胸管→静脈（体循環）
- ③ 腫瘍への直接浸潤

の3つルートが考えられる。前述の通り、PTXは分子量が大きく、脂溶性である

という性質から、腹腔内投与時に長時間腹腔内濃度が高く維持されるという特徴があり、がん細胞に直接、高濃度で接触する時間が長くなることで強い抗腫瘍効果が期待できると考えられる。

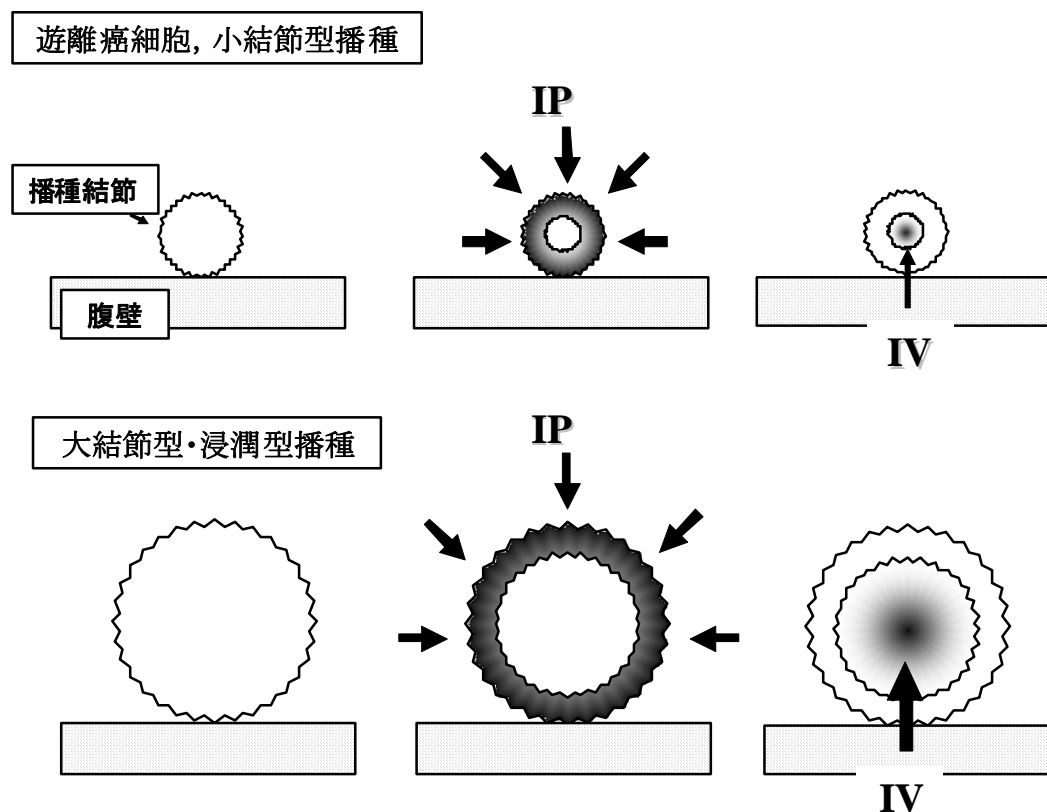


図2 播種結節に対する抗癌剤の IP、IV 投与における抗腫瘍効果

しかし、PTX の腫瘍組織への浸透性は表面から $100\ \mu\text{m}$ 程度という報告もあり [27]、比較的大きい腫瘍深部への直接浸透による治療効果には限界がある。したがって、PTX の腹腔内投与は直接浸透による効果だけでなく、腹腔内から吸収されて、全身の循環を介して再還流し組織へ再分布することによる治療効果も期待でき

と思われる(図2)。また、このことは、腹腔内投与が全身の循環を介して腹腔以外の病変にも効果を示す可能性をも示唆する。そこで、本章では、腹腔内投与時の PTX の薬物動態を、血中のみならず各臓器内での薬物濃度を経時的に測定し、静脈投与時と直接比較検討して明らかにすることを目的とした。

2 実験方法

2.1 動物実験のデザイン

使用動物は、日本白色ウサギ（体重 3.0-3.5kg，雌，埼玉実験動物供給所）を使用した。ウサギを無作為に腹腔内投与群(IP 群)、経静脈投与(IV 群)の 2 群に分けて 5mg/kg の PTX を投与した。薬剤の投与方法は IP 群ではケタミンとキシラジンの静脈投与による全身麻酔下に小開腹し、PTX(タキソール注射薬[※]，ブリストル製薬，東京)5mg/kg を 50ml の生理食塩水に希釈して 16G サーフロー針（テルモ、東京）を用いて腹腔内に投与した後閉腹した。IV 群は 22G サーフロー針を耳静脈に留置して PTX5mg/kg を 50ml の生理食塩水に希釈して約 1 分で投与した。検体の採取方法はまず血清は 0、0.5、1、3、6、12、24 時間（各 n=5）で耳静脈より採取した。他の組織は 0.5（n=1）、6、24 時間（n=5）でウサギを安楽死させて採取した。採取した組織は、肝臓、脾臓、卵巣、大網、後腹膜組織、胃、腸間膜リンパ節、心臓、肺であり、採取後-20℃で凍結して組織濃度測定まで保存した。

タキソール注射薬[※]：PTX を Cremophor EL とエタノール(1:1, v:v)に溶解して 6.0 mg/ml に調整したもの。

2.2 PTX の濃度測定方法

血清中及び各組織の PTX の濃度測定は高速液体クロマトグラフィー法(High performance liquid chromatography、以下 HPLC 法)によって測定した[28]。組織サンプルは組織量0.1-2.0gに対して、リン酸Buffer溶液を約1-2ml添加してホモジナイズした。ホモジナイズ処理後に1200rpmで5分間遠心を施行、その上清を前処理材料とした。血清および前処理材料500 μ lに5mlのn-butyl chloride、そして内部標準液として100 μ lのn-hexyl 4-hydroxybenzoate を加えて、5分間振盪した。その後に4℃、3000rpmで5分間遠心分離して有機溶媒を分取して、その残渣を移動相200 μ lに溶解してHPLCにて測定した。HPLC装置は、Shimadzu VP シリーズ（島津製作所、京都）、分析カラムには、L-column（4.6×250mm、化学物質評価機構）を使用した。測定条件に関して移動層はリン酸溶液-メタノール（30:70 v/v）、カラム温度は50℃、検出波長は227nm、流速は1.0ml/minに設定した。

2.3 薬物動態のパラメーターの解析

薬物動態パラメーターはモーメント法によってマクロプログラム

MOMENT (Excel) 用いて算出した [29]。薬物濃度一時間曲線下面積 (AUC) は投与開始後から、最終のサンプル採取時間までの範囲においてTrapezoidal法 [30] を用い算出した。

2.4 統計学的解析

各々の結果は平均±標準偏差で示した。測定結果の IP、IV の各 2 群間比較には Mann-Whitney U test を用いた。P 値は 0.05 を有意水準とした。

3 実験結果

3.1 血清中の PTX 濃度の時間的推移

IP 投与群、IV 投与群の各々の血清中の PTX 濃度を検討したものを図 3 に示す。

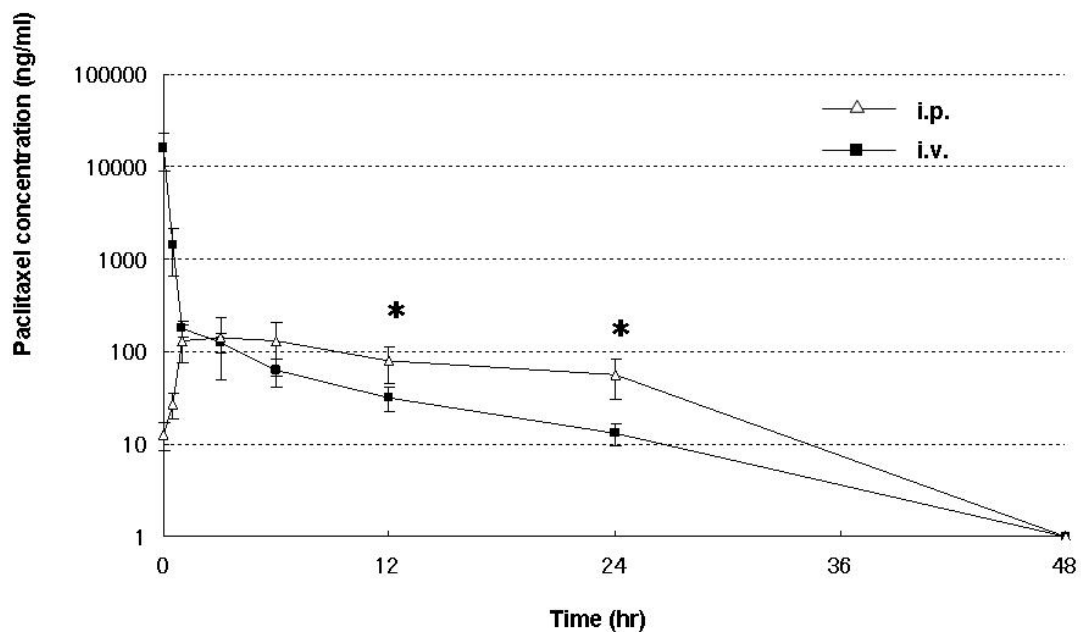


図 3 IP、IV 投与時の血清中 PTX 濃度の経時的推移 (n=5)

(*P<0.05)

IV 群では投与後 1 時間以内に急激な濃度の上昇がみられ、速やかに消退した。

投与後 24 時間ではその濃度は抗腫瘍効果発現濃度の最低ラインとほぼ同値まで

低下していた。それに対して IP 群では、IV 群と比較して血清中の PTX 濃度が緩

徐に上昇し、投与後 3 時間で最高濃度に達した。3 時間後以降では血清中 PTX 濃

度は IP 群が IV 群に比して高値を示し、12、24 時間後で有意差を認めた ($P < 0.05$)。

投与後 48 時間では両群とも血清中 PTX は有意な濃度としては検出されなかった。

3.2 組織中の PTX 濃度

次に組織中の PTX 濃度について各時間で検討した (図 4)。

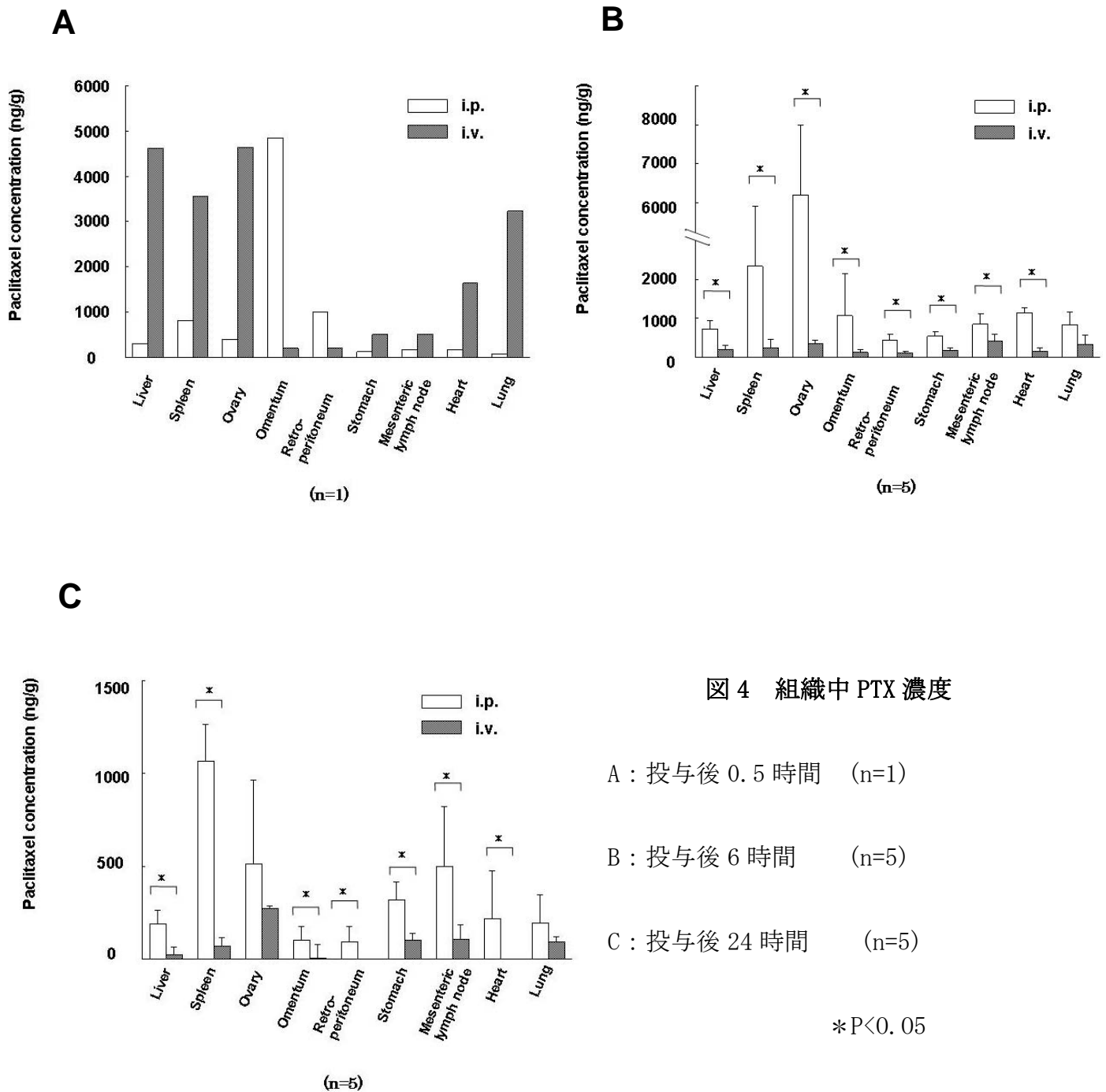


図 4 組織中 PTX 濃度

A : 投与後 0.5 時間 (n=1)

B : 投与後 6 時間 (n=5)

C : 投与後 24 時間 (n=5)

*P<0.05

投与 0.5 時間後では、血流移行性の良い肝臓、脾臓、肺などでは IV 投与群で非常に高い組織中 PTX 濃度が測定された(図 4A)。また、ほとんどの組織での PTX 濃度は IV 投与群が IP 投与群を上回ったが、大網と後腹膜組織では IP 投与群のほうが高値を示し、腹腔内投与された高濃度 PTX が直接浸透したためと推測された。一方、投与 6 時間後では腹腔内組織のみならず、全ての組織において、PTX 濃度で IV 投与群を上回った(図 4B)。投与 24 時間後では、それぞれの濃度は 6 時間と比べて低下していたが、ほぼ同様の傾向を認めた(図 4C)。

3.3 血清中、組織中 PTX の薬物動態

表 1 に、PTX の IP、IV 投与時における血清中と肝臓、リンパ節などの腹腔内組織の薬物動態の各パラメーターを示した。血清では、IP 群では C_{max} 、AUC とともに IV 群と比較して低値であったが、MRT の延長を認めた。IV 群では t_{max} は全組織で 0.5hr であったが、IP 群では大網のみ t_{max} が 0.5hr で、その他の組織では 6hr であった。肝臓では C_{max} 値、AUC とともに IV 群が IP 群を上回った。しかし、その他の組織では C_{max} 値は IV 群と IP 群でほぼ同等値を示しており、AUC は IP 群の方が IV 群を上回る結果であった。

表 1 血清、組織中の PTX の薬物動態

| Parameters | Serum | | Liver | | Omentum | | mesentric lymph node | | Stomach | | Ovary | |
|---|-------|------|-------|------|---------|------|----------------------|------|---------|------|-------|-------|
| | i.v. | i.p. | i.v. | i.p. | i.v. | i.p. | i.v. | i.p. | i.v. | i.p. | i.v. | i.p. |
| tmax | 0 | 3 | 0.5 | 6 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 6 | 0.5 | 6 | 0.5 | 6 |
| Cmax ($\mu\text{g/ml}$; $\mu\text{g/g}$) | 15.9 | 0.1 | 4.6 | 0.7 | 0.2 | 4.8 | 0.5 | 0.9 | 0.5 | 0.5 | 4.6 | 6.6 |
| AUC ₀₋₄₈ ($\text{hr}\times\mu\text{g/ml}$; $\text{hr}\times\mu\text{g/g}$) | 6.0 | 0.3 | 16.5 | 13.4 | 2.2 | 29.1 | 8.7 | 21.1 | 5.7 | 13.6 | 23.8 | 89.3 |
| AUC _{tissue} /AUC _{serum} ratio | 1.0 | 1.0 | 2.8 | 47.7 | 0.4 | 97.0 | 1.5 | 70.3 | 1.0 | 45.3 | 4.0 | 297.7 |
| MRT (hr) | 2.2 | 13.5 | 2.0 | 11.2 | 5.7 | 4.6 | 9.7 | 14.8 | 11.6 | 14.8 | 7.2 | 8.1 |

tmax=time to Cmax;Cmax=peak concentration;

AUC=area under the curve; MRT=mean residence time

4 考察

本実験によって、血清、および多くの組織における PTX 濃度は、IP 投与群の方が IV 投与群と比較して高いレベルで維持されることが証明された。特に、大網や後腹膜の脂肪組織では 24 時間までの全時間で IP 投与群の PTX 濃度が著明に高値をとることが明らかとなり、この結果は腹膜播種巣に対する PTX 腹腔内投与の利点を裏付ける上で非常に重要な事実であると考えられた。また、他の組織においても 6-24 時間での PTX 濃度は IP 投与群が IV 投与群を上回り、AUC 値では、腸間膜リンパ節、胃、卵巣など IP 投与群で IV 投与群を上回った。この結果は PTX の IP 投与が、腹腔内遊離腫瘍細胞や播種結節に対してだけでなく、胃癌の原発巣、リンパ節転移や卵巣転移に対しても IV 投与以上の治療効果を示す可能性があることを示唆している。

PTX はその分子特性から、IP 投与後の腹腔内濃度が高く維持されることが、すでに報告されており [5-7]、IP 施行して一週間後にも血漿中 PTX の濃度が検出可能であったという報告もある [31]。この事実は、PTX のような難溶性薬剤の腹腔内投与の際は、腹腔が大きなリザーバーのような働きを担い、薬剤を全身に緩徐に放出する機構を有していることが示唆していると考えられる。今回の検

討での血清中の PTX 濃度の推移は、これらの報告と合致する。しかしながら、各臓器中 PTX の AUC については、大網で約 10 倍、腸間膜リンパ節、胃、卵巣で約 2 倍以上 IP 投与群が IV 投与群より高いという予想以上の結果であった。

この理由としては、腹腔内臓器への PTX の直接浸透が関与している可能性が考えられる。実際、組織 AUC/血清 AUC の比は IP 投与群が IV 投与群と比較して非常に高値であった。しかしながら、腹腔以外の臓器でも投与 6 時間以降で IP 投与の組織中 PTX 濃度が IV 投与群を上回っており、全身循環からの再分布による経路も関係していることが考察される。また、特に大網組織や後腹膜組織では投与後 0.5 時間から、IP 投与群が IV 投与群を上回っており、これらの組織では PTX の直接浸透の影響が最も関与していると考えられる。しかし過去の文献では、腫瘍を含めた組織への抗癌剤の浸透は表面より数 mm に限られているとされており [32-34]、Taxane 系薬剤では表面から約 100 μ m までしか浸透しないという報告もあり [27]、直接浸透以外の機構も存在するかもしれない。腹腔内からの薬剤のもうひとつの吸収経路として、腹膜に開口したリンパ管を介して全身の循環に回る経路が上げられる。リンパ系の吸収による薬剤の移行動態については不明な点が多いが、血管からの移行に比べ緩やかであると考えられ、こ

れが大網や後腹膜組織における IP 投与後早期の高濃度の PTX 分布につながっている可能性が推測される。事実、波多江らはヤギへの PTX の腹腔内投与後の胸管中のリンパ液の濃度は血漿中の濃度の約 1000 倍であったと報告している[35]。いずれにせよ、大網や後腹膜は腹膜播種の好発部位であることを考えると、PTX の腹腔内投与は播種性転移巣に対して効率よく薬剤を集積させる極めて合理的な治療戦略であると考えられた。

今回の検討から PTX の腹腔内投与は、全身の臓器内において、長時間比較的高い濃度の PTX の薬剤分布をもたらす事が判明した。PTX の腹腔内投与は腹腔内遊離腫瘍細胞、播種性転移のみならず、リンパ節転移や原発巣などの再発巣に対しても有効性を発揮することが期待できると考えられた。

第2章 高分子ミセル製剤PTX-30Wの胃癌

腹膜播種に対する効果の検討

前章の検討にて、PTX の腹腔内投与は播種に対して有効であるだけでなく、全身循環へ緩徐に移行し腫瘍局所に再分布することによって全身の転移巣にも効果を示す可能性があることが証明された。反面、この事実はPTX の腹腔内投与の際にも全身投与と同様の副作用が出現する可能性があることを示唆している。

さて、タキソールの副作用として重要なものとしては、まずPTX の溶媒として含まれている Cremophor による気管支収縮や蕁麻疹、低血圧などを伴う過敏反応があげられる。このため、ステロイド剤や抗ヒスタミン剤の予防投与が必要であるが、それらの予防投与にもかかわらず1～3%程度でこの過敏反応が出現する[36]。また、PTX の用量制限毒性としては、好中球減少と末梢神経障害が重要である[37]。特に、末梢神経障害は投与の継続により発現頻度の高まる蓄積性の毒性であり、対処法が確立していない。そのため神経毒性の程度が強くなると抗腫瘍効果が持続していても治療を休止もしくは中止を余儀なくされる場合もある。

これらの欠点を補う目的で、PTX を有機溶媒なしに安全かつ簡便に投与でき、より腫瘍選択的移行性の高い PTX 内包製剤の開発がすすめられてきている [25, 26]。しかし、これらの新規薬剤についての過去の知見は、経静脈ルートでの全身投与の実験系で得られた事項に限られており、腹腔内に投与した場合の効果や副作用については殆ど検討されていない。一般に、高分子ミセルは薬剤をミセルから安定して緩徐に放出する特徴を有すること、腹腔内リンパ系を介して緩徐に吸収されることが予想されること [20] など考えると、腹腔内投与によってより強い播種抑制効果をもたらす可能性があると考えられる。当科では高度進行胃癌、再発胃癌に対する PTX 腹腔内投与を含む化学療法の臨床試験を行い、一定の効果と安全性を確認している。とくに PTX の腹腔内投与は腹膜播種に対して有用な治療法であり、新規の PTX 内包製剤の腹腔内投与における検討も臨床的に非常に重要な意味を持つと考えられる。そこで、本研究では PTX の高分子ミセルに PTX を内包した薬剤を用いて、その腹腔内投与の効果を検討することを試みた。

本研究に使用した高分子ミセルである PMB30W は、生態適合性に優れたリン脂質極性基を有する単量体である 2-メタクリロイルオキシエスチルホスホコリ

ン（以下 MPC）と疎水性の単量体であるメタクリル酸 n-ブチル（以下 BMA）の共重合体である MPC コポリマー poly[MPC-co-nbutyl methacrylate (BMA)]（以下 PMB）であり、この水溶液は難水溶性の薬物と混合することにより高濃度で均一な薬物水溶液が得られることが既に証明されている[38]。特に、MPC コポリマーのうちで PMB30W は 70mol% の疎水性の BMA ユニットを含むものであり、疎水性のユニットを多く含むのに関わらず水溶性であり、かつ水中に安定な疎水性ドメインを構築して疎水性物質を安定化して内包することが証明されており、PMB30W 水溶液中に 5mg/ml の高濃度の PTX を長期にわたり安定して可溶化できることが証明されている[39]。そこで、本研究では、この PMB30W を用いて溶解した PTX (PTX-30W) の腹腔内投与の播種に対する有用性を、従来の Cremophor 溶解 PTX (PTX-Cre) と比較検討して明らかにすることを目的とした。

I. 胃癌細胞株に対する高分子ミセル製剤 PTX-30W の in vitro における効果の検討

1. 目的

PTX 内包高分子ミセル PTX-30W の in vitro における胃癌細胞に対する効果を胃癌細胞株 MKN45P を用いて明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 材料と方法

2.1.1 試薬

2-メタクリロイルオキシエチルホスホコリン(MPC)とメタクリル酸 n-ブチル (BMA)の共重合体である MPC コポリマー(PMB-30W)は東京大学大学院工学系研究科マテリアル工学 石原一彦教授より供与を受けた。パクリタキセル(PTX)、Cremofor EL は SIGMA 社より購入した。

2.1.2 PTX の MPC コポリマーへの可溶化

PMB30W は、疎水性ユニット (メタクリル酸 n-ブチル (BMA) ユニット) (図 5) を 70 mol%含むにも拘わらず水溶性であり、かつ水中に安定な疎水性ドメイン

を構築することができ、疎水性物質を安定に内包することができる(図 6)ことは、これまでの研究で明らかになっている[38, 39]。今回、50 mg/ml 濃度のタキソールのエタノール溶液 1 ml を PMB の 5 重量%水溶液 9 ml 室温で滴加・混合し、0.22 μ m のフィルタを用いて濾過して 5.0 mg/ml の PTX 水溶液を得た (PTX-30W)。溶液は 229 nm の波長で UV 測定を行い、得られた水溶液中には凝集・沈殿は確認されず、濾液中に、全量のタキソールが可溶化されていることを確認した。これを 5 重量%水溶液で希釈して各濃度に調整して実験に用いた。対象となる PTX-Cre は Cremophor EL とエタノール(1:1, v:v)に溶解して 6.0 mg/ml に調整した。

PMB :poly[MPC-co-*n*butyl methacrylate(BMA)]

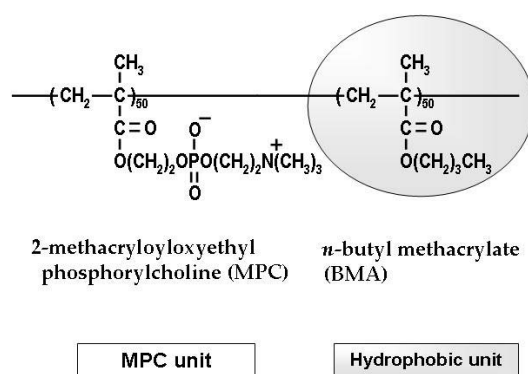


図 5 MPC コポリマー (PMB) の構造式

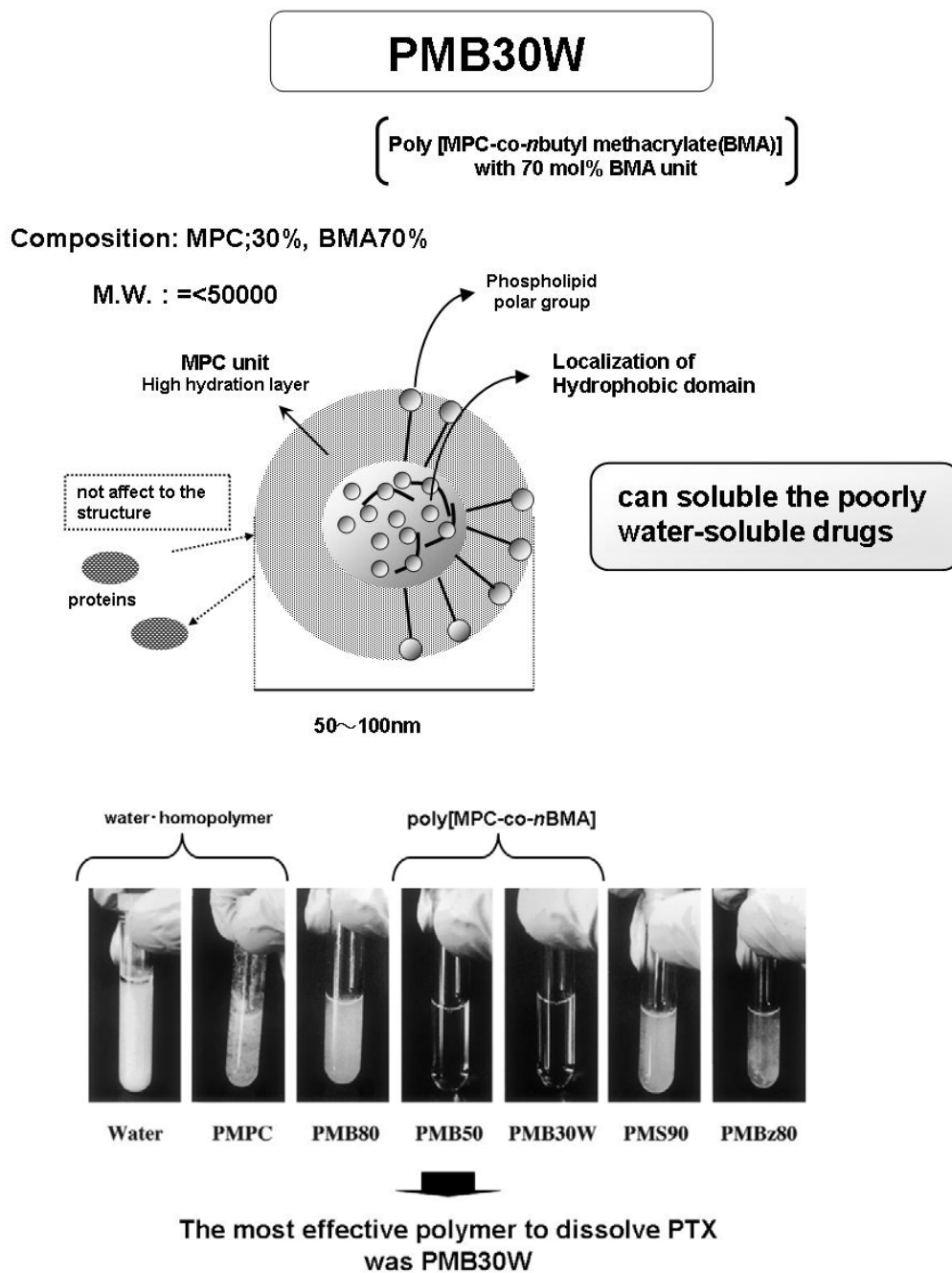


図 6 高分子型ミセル PMB30W の模式図

PMB30W 水溶液は MPC コポリマーの中で最も多く安定して PTX を溶解する。

2.2 細胞

ヒト胃癌細胞株 MKN45 は理研細胞開発銀行(つくば)より入手した。細胞は、DMEM(Sigma, Tokyo)に、10%FBS、ペニシリン、ストレプトマイシンを含む培養液で、37°C、5%CO₂気相下で培養した。これを、ヌードマウスの腹腔内に接種し、8 週後に犠牲死させ播種巣を採取し、これを継代し同様に再接種することで作製した高頻度胃癌腹膜播種株 MKN45P[40]を以下の実験に用いた。

2.3 MTS assay

PTX-30W と PTX-Cre の細胞増殖に及ぼす影響を検討するために、MKN45P を用いて MTS assay を行い、細胞増殖を比較した。96 ウェルプレートに 2×10^3 /well の濃度で細胞を播種して、24 時間後以降の各時点において、MTS 溶解液を製品プロトコール(CellTiter 96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay; Promega) に従い 20 μ l/well ずつ加え、さらに 3 時間培養後、プレートリーダーにて 490nm の吸光度を測定して、生細胞内における MTS から formazan への変換を定量的に測定した。

2.4 フローサイトメトリーによる細胞周期の測定

PTX-30W と PTX-Cre の細胞周期に及ぼす影響を検討するため、MKN-45P を用いて、フローサイトメトリーによる細胞周期の測定を行った。Cycle Test Plus DNA Reagent kits from Becton Dickinson (San Jose, CA)を用いて、そのプロトコールに従い Propidium iodide (PI) で染色した。フローサイトメトリーによる測定を行い、CellQuest acquisition software にて細胞周期の各分画の割合を測定した。

2.5 統計解析

各々の結果は平均±標準偏差で示した。測定結果の2群間の直接比較には Mann-Whitney U test を用いた。P値は0.05を有意水準とした。

3. 実験結果

3.1 細胞増殖に対する影響

PTX-Cre、PTX-30W の両群ともに溶媒の濃度を全て 0.1% に調整した。MTS assay の結果では、Control 群（無治療）と比較して両群ともほぼ時間、用量依存性に細胞増殖抑制効果が見られた（図 7）。3 日目で 50% 以上の増殖抑制効果がみられ、IC₅₀ 値は PTX-Cre 群で 0.060 μ g/ml、PTX-30W 群 0.054 μ g/ml で有意差は認めなかった。

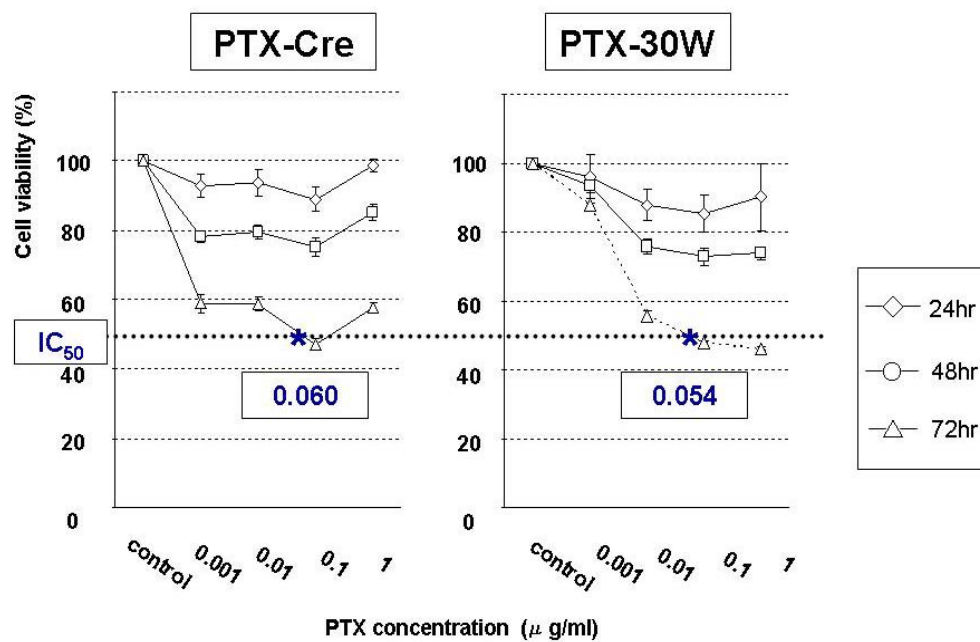


図 7 胃癌細胞株 MKN-45P に対する PTX-Cre、PTX-30W の細胞増殖抑制効果

データは平均と標準偏差を示す

溶媒自体の影響(図8)は0.1%PMB-30W群は全く細胞への影響が認められなかったのに対して 0.1%Cremophor 群では 48, 72 時間後で有意な ($P<0.05$) 増殖抑制効果が認められた。

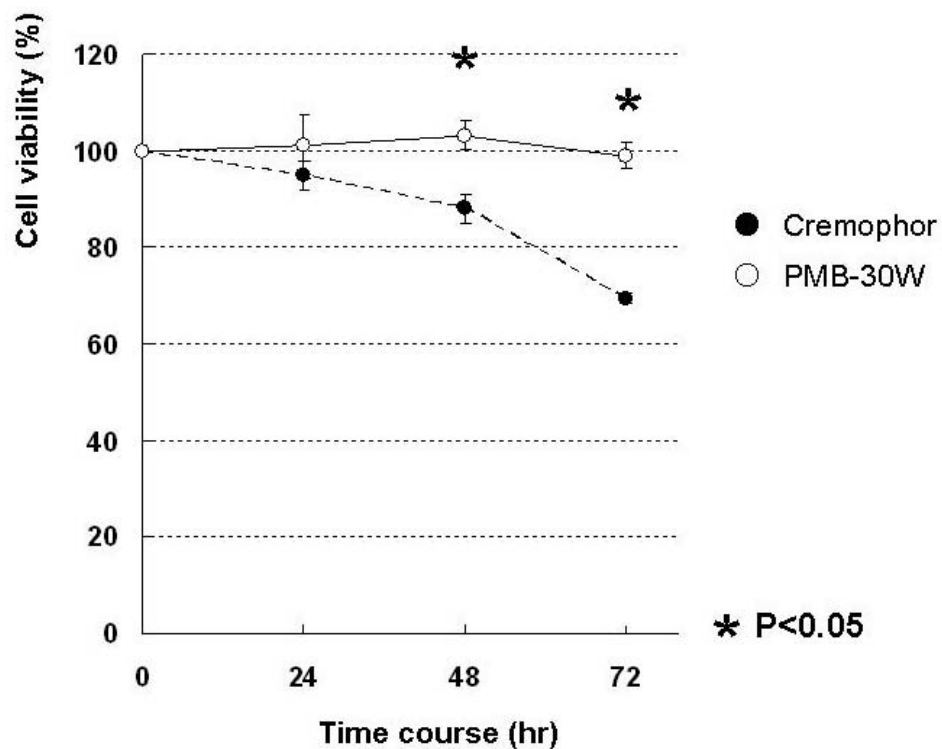


図8 Cremophor EL と PMB30W の胃癌細胞株 MKN45P に対する細胞増殖への影響

データは平均と標準偏差を示す (* $P<0.05$)

3.2 細胞周期に対する影響

PTX-Cre、PTX-30W を添加して 48 時間後の細胞周期への影響をフローサイトメトリーにて検討した(図9)。PMB-30W のみの添加ではコントロール群と比較して細

胞周期の変化は認めなかったが、Cremophor の添加により sub G1 期の割合が増加し、G2/M 期の割合が相対的に低下した。また、PTX 0.1 μ g/ml 濃度では、G2/M 周期の割合が PTX-30W 群で PTX-Cre 群に比較して有意に高値であった (PTX-Cre $31.28 \pm 4.03\%$ vs PTX-30W $46.10 \pm 8.96\%$ $P < 0.05$)。

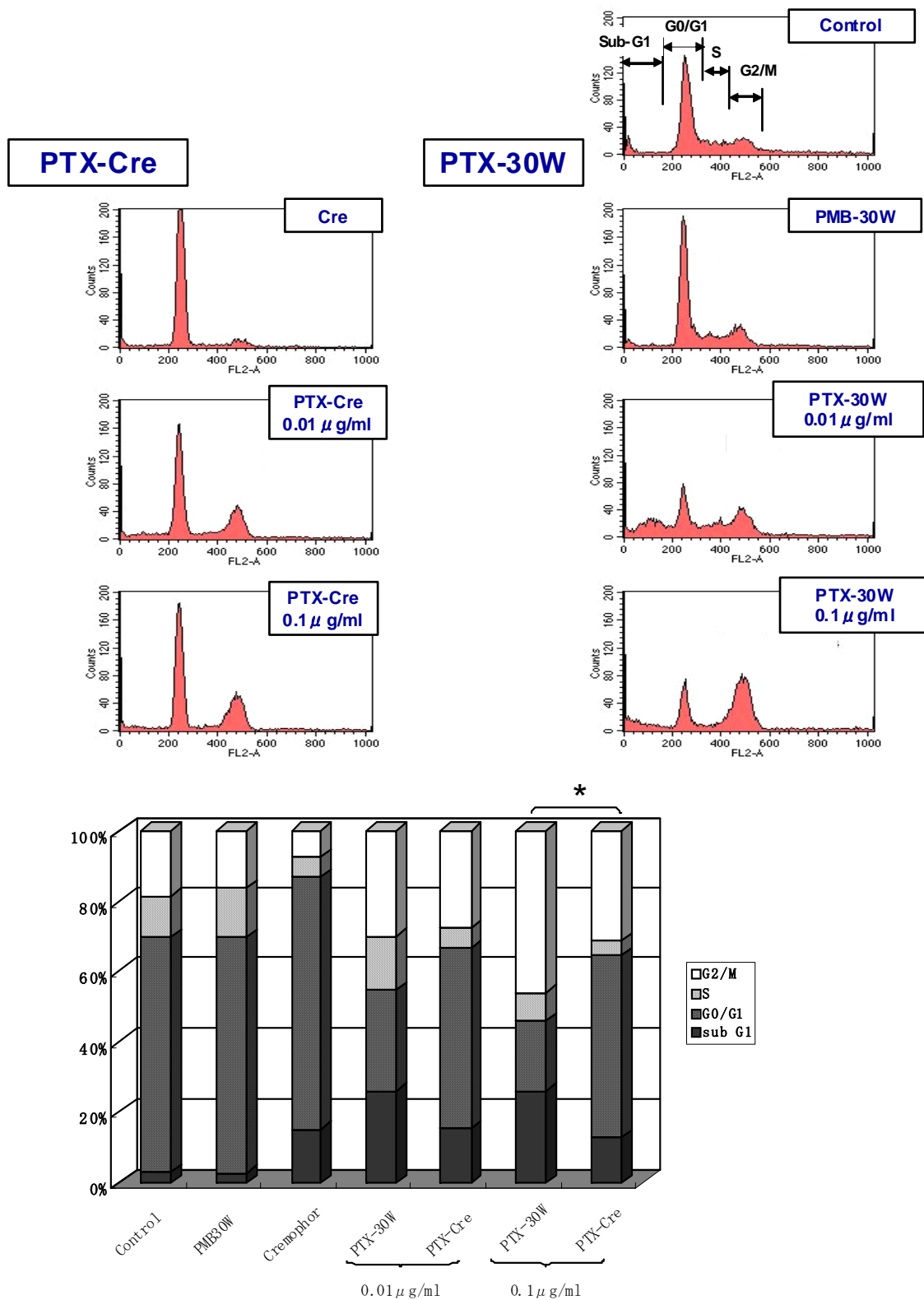


図 9 胃癌細胞株 MKN45P に対する細胞周期への影響

各々独立する 3 回の実験で得られた値の平均と標準偏差を示す (* $P < 0.05$)。

II. 胃癌播種モデルに対する高分子ミセル製剤 PTX-30W の in vivo における効果の検討

1. 目的

腹膜播種に対する PTX-30W の腹腔内投与の抗腫瘍効果を、ヌードマウスを用いた in vivo の実験系にて明らかにすることを目的とした。

2. 実験方法

2.1 腹膜播種に対する PTX-30W の作用の検討

MKN-45P 播種細胞を 5 週齢のヌードマウス（オリエンタル酵母、東京）の腹腔内に 3×10^6 個 注入して、播種モデルを作製した。注入後 1 週間目より、表 2 に示すように各 Group8 匹に分けて薬剤を週 1 回 3 週連続で腹腔内に投与した。4 週後に犠牲死させ、その播種巣の数、腫瘍総重量を測定した。また、各 Group10 匹として、60 日間観察して予後を検討した。投与する PTX 濃度は過去の文献を参考にして 20mg/kg ($400 \mu\text{g/ml}$) とした[41-43]。

表 2 播種モデルマウスの Group 分類

| | |
|------------------------|-------------------------------|
| Group I ; PBS 群 | PBS 1ml 投与 |
| Group II ; Cremophor 群 | Cremophor+PBS 1ml 投与 |
| Group III ; PTX-Cre 群 | PTX-Cre (20mg/kg) +PBS 1ml 投与 |
| Group IV ; PMB30W 群 | PMB30W+PBS 1ml 投与 |
| Group V ; PTX-30W 群 | PTX-30W (20mg/kg) +PBS 1ml 投与 |

2.2 腹膜播種結節内の PTX 濃度の比較

同様の方法で MKN-45P の播種巣が形成された 3 週後に PTX-Cre、PTX-30W をそれぞれ PTX20mg/kg 量の溶解したものを PBS1ml に希釈して腹腔内投与を行った。投与後 3, 12, 24 の各時間で両群とも各 5 匹ずつ犠牲死させて、播種結節を摘出した。検体は採取後-20℃で凍結、組織濃度測定まで保存した。播種結節内の PTX 濃度の測定は 2.1.2 と同様の方法にて HPLC 法にて測定した。

2.3 統計解析

各々の結果は平均±標準偏差で示した。統計解析はMann-Whitney U test を用

い、生存率についてはKaplan-Meier 法を用いて算出して、群間比較については Logrank-testを用いた。P値は0.05以下を有意水準とした。

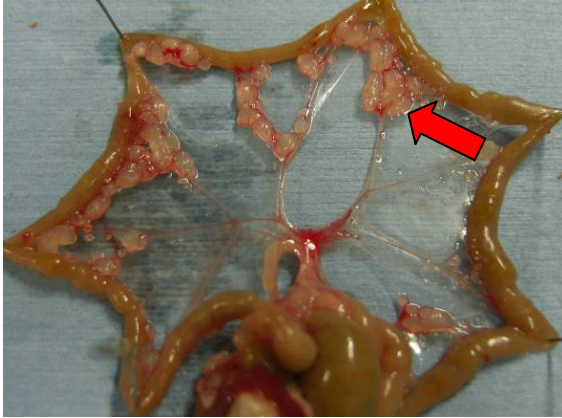
3. 結果

3.1 腹膜播種に対する PTX-30W の作用の検討

28 日後の時点で、全てのマウスは生存していた。PBS 群、Cremophor 群、PMB-30W 群では、胃周囲や腸間膜を中心に腹膜播種を多数認め、それらの群間では有意差を認めなかった。それに比較して、PTX-Cre 群ではその結節の数は有意に減少していた。しかし、PTX-30W 群では PTX-Cre 群と比較して、更に強い播種の抑制効果が認められた(図 10)。PTX-Cre と PTX-30W の 2 群で 1mm 以上の大きさの結節数と腫瘍総重量を比較すると、結節数は PTX-Cre 群平均 35.5 ± 12.5 個、PTX-30W 群 9.6 ± 8.3 個、腫瘍重量も PTX-Cre 群平均 218.8 ± 133.5 g、PTX-30W 群 55.0 ± 50.2 g であり、共に統計的に有意差をもって PTX-30W がより強い播種抑制効果を示していた。

60 日まで観察した生存率では、PTX-Cre 群はコントロール群と比較して有意な生存の延長を認めなかった。しかし、PTX-30W 群では 50 日目でも 50%の生存を認め、統計的にも有意な生存の延長を認めた(図 11)。(P<0.05)

A



Group I ; PBS



Group II ; Cremophor



Group IV ; PMB30W



Group III ; PTX-Cre



Group V ; PTX-30W

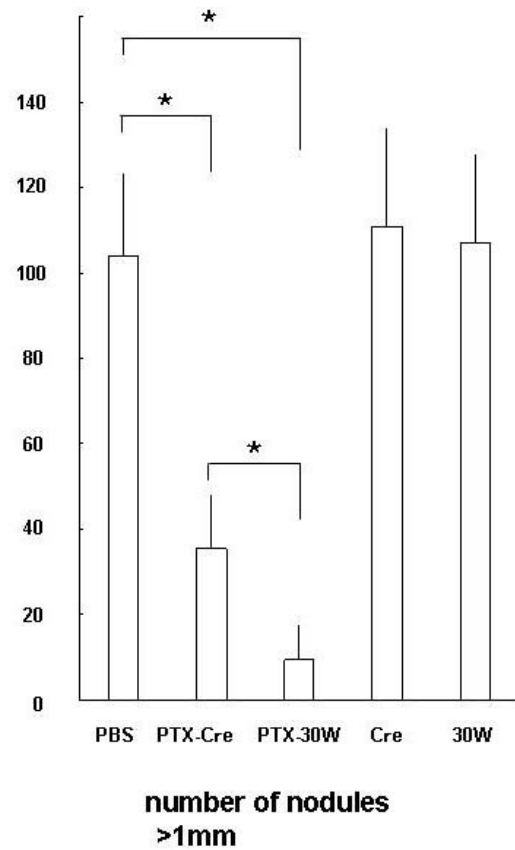
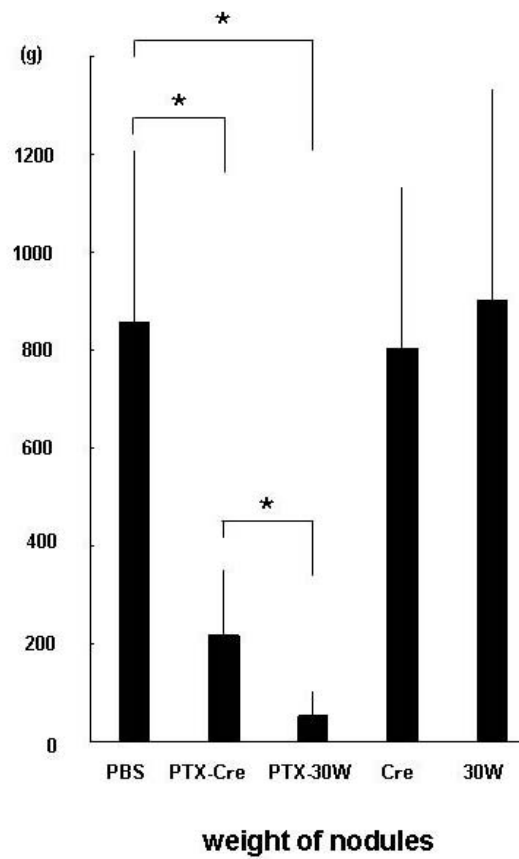
B**C**

図 10 腹膜播種モデルでの腫瘍増殖抑制効果。A は代表的な腹膜結節の写真

B 1mm 以上の腹膜播種の個数 C 腹膜播種の総重量 (各群 n=8)

データは平均と標準偏差を示す (* $P < 0.05$)

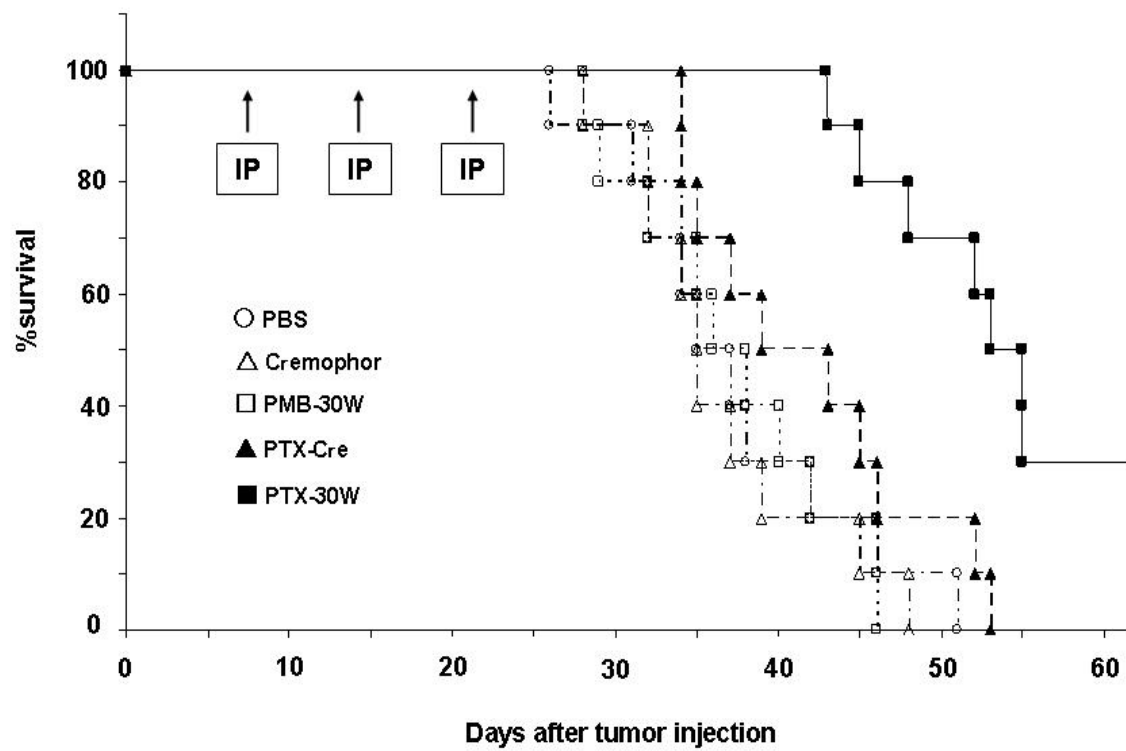


図 11 腹膜播種モデルでの生存率の検討 (各群 n=10) (P<0.05)

3.2 腹膜播種結節内の PTX 濃度の比較

次に、腹腔内に PTX-Cre、PTX-30W をそれぞれ投与した後の腹膜播種結節中の PTX の濃度推移を測定した。両群とも投与後 3 時間で最も高い濃度を示し、次第に低下したが、すべての時間において、腫瘍内の PTX 濃度が PTX-30W 群で有意に高値を示した(図 12)。

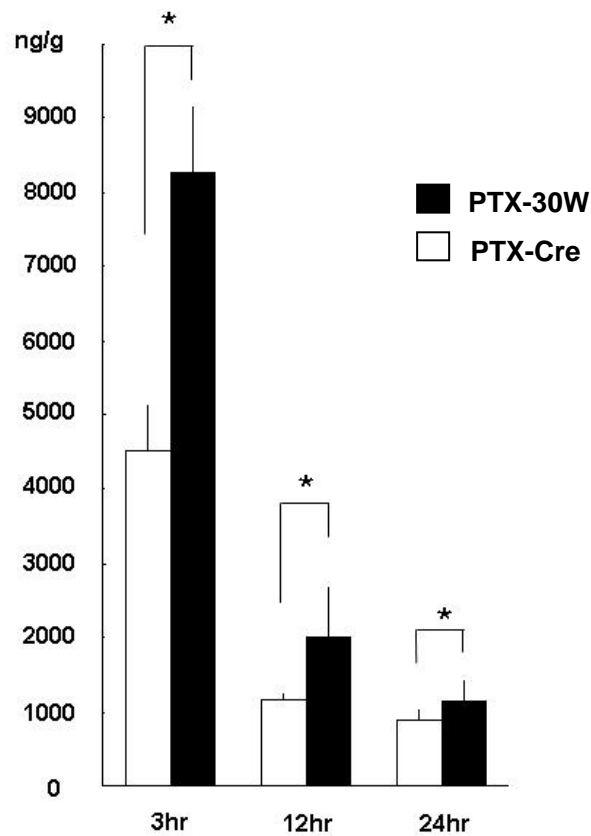


図 12 播種結節中の PTX 濃度 データは平均と標準偏差を示す(各群 n=5)

(* P<0.05)

4. 考察

抗癌剤の腹腔内への局所投与は高濃度の抗癌剤を直接癌細胞に接触させることを可能にするために腹膜播種の治療法としては有用性が高いことが推測される。しかし、腹膜組織には極めて発達した毛細血管網を介して高度な水分吸収能力を有しており、腹腔内に投与された水溶性抗癌剤は、水や電解質などと同様に速やかに循環血液中に吸収される。そのため、多くの注射用抗癌剤など水溶性の小分子からなる薬剤を腹腔内に投与しても、腹腔内には長時間滞留せず、抗癌剤を腹腔内の標的病巣に十分に作用させるのは困難であるとされている。

これに対して Taxane 系の抗癌剤の腹腔内投与は高分子、脂溶性であるという特徴から高濃度に長時間にわたり腹腔内に留まるため腹膜播種に対して有効であると考えられている。したがって、腹腔内投与にて効果を示すためには、まず腹腔内停留性が高いことが重要であると考えられる。

今回の検討では、高分子ミセル内包 PTX 製剤である PTX-30W は、従来用いられている Cremophor に溶解した PTX (PTX-Cre) と比較して、In vitro ではその腫瘍増殖抑制効果に差を認めなかったが、0.1 μ g/ml という比較的高い濃度の PTX 暴露によって 48 時間後により強い G2 arrest を誘導した。PTX の作用機序

は、チューブリンの重合を促進し、微小管の脱重合を阻害して、細胞分裂を障害することにより、強力な抗腫瘍効果を示す。よって、より強い G2 arrest が誘導されたということは PTX-30W は PTX-Cre と比較してより強い抗腫瘍効果を発揮することが考察される。この細胞周期に対する影響は、低濃度や短時間の実験条件では認められなかった。しかし通常の腹腔内投与では、数十から数百 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で投与される事を考慮すると、PTX が腹腔内から消失する時間経過が遅ければ、PTX-30W は in vivo でもより強い播種抑制効果を発揮する可能性があると考えられた。

実際に、PTX-30W を腹腔内投与すると、PTX-Cre よりも有意に強く腹膜播種を抑制し、生存期間も延長させた。この結果は、PTX-30W の細胞に対する作用のみならず、PTX-Cre と比較して播種組織により集積しやすい性質を有しており、このことが In vivo の奏効率の違いにつながっている可能性も考えられる。事実、腫瘍組織内の PTX 濃度を直接測定したところ、24 時間以内の全ての時間において、播種巣内の PTX 濃度は PTX-30W 投与群が PTX-Cre 投与群を有意に上回った。この事実から、PTX-30W は腹腔内停留性が高く、また PTX-Cre と比較して播種巣に、より高濃度に蓄積する性質があることが推測された。

PMB30Wによりミセル化した薬剤は、①大きさは粒径数十 nm のナノ粒子製剤である、②優れた生態適合性を有している、③生態に異物として認識されにくい特徴を有しており、動物実験にて、その安全性が証明されている[39, 44]ことから、この材質を用いたナノドラッグは経静脈的に投与後、安定し血中内に留まり、血管系の特殊性を有する腫瘍組織に選択的に集積しやすいことが予想されている。本実験結果は、腹腔内投与でもこの仮説が成立することを裏づけていると考えてよい。

では、PTX-30W が播種巣に高濃度集積する理由は腹腔内停留性が高いことによるためだけであろうか。腹腔内投与時の薬剤動態の特徴として、薬剤の播種組織への直接浸透性の問題がある。抗癌剤が腫瘍組織の表面からどの程度まで有効濃度を保って浸透するのかについてはまだ十分解明されていないのが実状である。ただし、がん細胞スフェロイドを用いた評価では、Taxane 系薬剤は表面から 100 μ m 程度までしか到達しなかったという報告[27]やマウスの胃癌細胞株播種モデルでは、粗大な播種巣を有するモデルに対しては PTX の腹腔内投与は静脈投与に比較して効果が劣るという報告[45]などから、1cm を超える粗大な播種巣の内部には有効濃度の薬剤は浸透しえないことが予想される。これに対

して高分子ミセルはスフェロイドを用いた評価でもミセル自体が深部まで浸透して到達することが報告されている[46]。一方、Cremophor ミセルは塩や有機物などの存在下でその安定性に影響が生じ、また内包した薬剤の放出を抑制するため、その薬剤の組織浸透性を弱めるということも報告されており[47]、これが腹腔内投与時の組織浸透性に不利に働いていることが推測される。したがって、PTX-30W は PTX-Cre と比較して、腹腔内でより安定した構造が長時間維持され、結果として播種巣に対してより効率的に PTX を到達させることが可能となったことが推測された。

腹腔内から薬剤が高分子ミセルに内包されたまま吸収される際には、乳班やストーマタなど腹膜転移の初期転移部位であるリンパ組織に比較的、長時間留まり、局所での DDS 効果も今回の結果に寄与していると考えられる。さらに、腹腔内から吸収された PTX-30W が全身循環を介した腫瘍組織へのいわゆる EPR 効果により効果的に移行したことも考察の一つとしてあげられる。しかし、腫瘍組織内の PTX 濃度を測定では、投与後短時間（投与後 3 時間）での両群の濃度の差が最も大きく、次第に差が小さくなる傾向が認められたことより、この差は、やはり PTX-30W は腫瘍組織への直接浸透性が優れていることに主に起因

すると考えて矛盾しないと考えられる。また In vitro での検討ではあるが、腫瘍細胞へ直接暴露した際、Cremophor 溶解 PTX と比較して PTX のミセル製剤が高い細胞質への蓄積性を示したという報告もあり[48]、このことも今回の結果に寄与している可能性が考察される。いずれにせよ、高分子ミセル製剤である PTX-30W の腹腔内投与は、従来の PTX 製剤と比較してより強い播種制御能力を発揮することが判明し、高分子ミセル製剤は腹腔内投与に適した剤型として臨床応用することが可能であると考えられた。臨床応用を目指す上で、今後はその副作用や他臓器への薬剤分布などの詳細な検討が必要と考える。

まとめ

腹膜播種に対する腹腔内 PTX 投与に関する基礎的検討から以下の知見を得た。

- ① IP 投与群の血清中 PTX は緩徐に上昇して、3 時間後以降では IV 投与群と比較して高値であり、12、24 時間後で有意差を認めた。また腹膜播種的好発する大網、後腹膜組織中 PTX 濃度は IP 投与群が全ての時間で上回り、投与 6 時間後以降では全て組織で IP 投与群の PTX 濃度が上回った。特にリンパ節、胃、卵巣では AUC 値も IV 投与群の 2 倍以上高い結果であった。
- ② マウス播種モデルにて、PTX-30W の腹腔内投与は PTX-Cre と比較して有意に強い播種の抑制効果と生存延長効果を認めた。また、投与後 24 時間以内の播種組織内の PTX 濃度は有意に PTX-30W 投与群が高かった。以上より PTX-Cre と比べて PTX-30W は腹腔内投与時において播種巣への薬剤の移行性に優れており、播種に対してより高い治療効果をもたらすことが判明した。

結論

PTX の腹腔内投与は、全身臓器に対しても高い薬剤移行性を示すことが証明され、腹膜病変以外への効果も期待される。またナノキャリアによる分子修飾を行うことにより、腹膜播種に対してさらに奏効率の高い治療法となりうると考えられた。

謝辞

本研究をすすめるにあたり、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室 北山 丈二先生には、テーマの設定から実験方法、データの解釈、研究のまとめ方にいたるまでの御指導と細やかな疑問への懇切丁寧なアドバイスをいただきました。

同教室 内川 千枝子女史、須永 昇技官には実験の遂行にあたり多大なるご協力を頂きました。本学大学院工学系研究科マテリアル工学専攻 石原 一彦教授、金野 智浩先生には多くの実験材料を供与していただき、具体的な実験方法、データの解釈など詳細にご指導いただきました。そして、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室 名川 弘一教授には終始にわたり、全面的なご支援を賜りました。ここに多大なる謝意を表します。

参考文献

- [1] C. H. Yoo, S. H. Noh, D. W. Shin, S. H. Choi, and J. S. Min, Recurrence following curative resection for gastric carcinoma, *Br J Surg*, 87 (2000) 236-242.
- [2] D. Z. Chu, N. P. Lang, C. Thompson, P. K. Osteen, and K. C. Westbrook, Peritoneal carcinomatosis in nongynecologic malignancy. A prospective study of prognostic factors, *Cancer*, 63 (1989) 364-367.
- [3] M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A. T. McPhail, Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*, *J Am Chem Soc*, 93 (1971) 2325-2327.
- [4] E. K. Rowinsky, L. A. Cazenave, and R. C. Donehower, Taxol: a novel investigational antimicrotubule agent, *J Natl Cancer Inst*, 82 (1990) 1247-1259.
- [5] J. L. Eiseman, N. D. Eddington, J. Leslie, C. MacAuley, D. L. Sentz, M. Zuhowski, J. M. Kujawa, D. Young, and M. J. Egorin, Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice, *Cancer Chemother Pharmacol*, 34 (1994) 465-471.
- [6] N. Furui, M. Yamazaki, K. Yokogawa, S. Fushida, K. Miwa, and K. Miyamoto, Ascites and the Plasma Concentration-Time Courses of the Taxanes Antitumor Agents Taxanes after an Intraperitoneal Administration in Patients with Peritoneal Tumors, *Jpn. J. Pharm Health Care Sci.*, 29 (2003) 263-269.

- [7] H. Gelderblom, J. Verweij, D. M. van Zomeren, D. Buijs, L. Ouwens, K. Nooter, G. Stoter, and A. Sparreboom, Influence of Cremophor El on the bioavailability of intraperitoneal paclitaxel, *Clin Cancer Res*, 8 (2002) 1237–1241.
- [8] M. Markman, B. N. Bundy, D. S. Alberts, J. M. Fowler, D. L. Clark-Pearson, L. F. Carson, S. Wadler, and J. Sickel, Phase III trial of standard-dose intravenous cisplatin plus paclitaxel versus moderately high-dose carboplatin followed by intravenous paclitaxel and intraperitoneal cisplatin in small-volume stage III ovarian carcinoma: an intergroup study of the Gynecologic Oncology Group, Southwestern Oncology Group, and Eastern Cooperative Oncology Group, *J Clin Oncol*, 19 (2001) 1001–1007.
- [9] E. de Bree, H. Rosing, J. Michalakis, J. Romanos, K. Relakis, P. A. Theodoropoulos, J. H. Beijnen, V. Georgoulis, and D. D. Tsiftsis, Intraperitoneal chemotherapy with taxanes for ovarian cancer with peritoneal dissemination, *Eur J Surg Oncol*, 32 (2006) 666–670.
- [10] M. S. Yen, C. M. Juang, C. R. Lai, G. C. Chao, H. T. Ng, and C. C. Yuan, Intraperitoneal cisplatin-based chemotherapy vs. intravenous cisplatin-based chemotherapy for stage III optimally cytoreduced epithelial ovarian cancer, *Int J Gynaecol Obstet*, 72 (2001) 55–60.
- [11] A. Polyzos, N. Tsavaris, C. Kosmas, L. Giannikos, M. Katsikas, N. Kalahanis, G. Karatzas, K. Christodoulou, K. Giannakopoulos, D. Stamatiadis, and N. Katsilambros, A comparative study of intraperitoneal carboplatin versus intravenous carboplatin with intravenous cyclophosphamide in both arms as initial chemotherapy for stage III ovarian cancer, *Oncology*, 56 (1999) 291–296.
- [12] D. K. Armstrong, B. Bundy, L. Wenzel, H. Q. Huang, R. Baergen, S.

- Lele, L. J. Copeland, J. L. Walker, and R. A. Burger, Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer, *N Engl J Med*, 354 (2006) 34-43.
- [13] P. A. Vasey, Ovarian cancer: front-line standard treatment in 2008, *Ann Oncol*, 19 Suppl 7 (2008) vii61-66.
- [14] S. Fushida, N. Furui, S. Kinami, I. Ninomiya, T. Fujimura, G. Nishimura, T. Ohta, K. Yokogawa, K. Miyamoto, and K. Miwa, Pharmacologic study of intraperitoneal paclitaxel in gastric cancer patients with peritoneal dissemination *Gan To Kagaku Ryoho*, 29 (2002) 2164-2167.
- [15] S. Fushida, F. Nao, S. Kinami, I. Ninomiya, T. Fujimura, G. Nishimura, T. Ohta, K. Yokogawa, K. Miyamoto, and K. Miwa, Pharmacologic study of intraperitoneal docetaxel in gastric cancer patients with peritoneal dissemination *Gan To Kagaku Ryoho*, 29 (2002) 1759-1763.
- [16] S. Tamura, H. Miki, K. Okada, T. Miyake, M. Yoshimura, R. Suzuki, S. Nakahira, K. Nakata, S. Okamura, K. Sugimoto, and Y. Takatsuka, Pilot study of intraperitoneal administration of paclitaxel and oral S-1 for patients with peritoneal metastasis due to advanced gastric cancer, *Int J Clin Oncol*, 13 (2008) 536-540.
- [17] A. Hagiwara, T. Takahashi, K. Sawai, C. Sakakura, H. Tsujimoto, T. Imanishi, M. Ohgaki, J. Yamazaki, S. Muranishi, A. Yamamoto, and T. Fujita, Pharmacological effects of 5-fluorouracil microspheres on peritoneal carcinomatosis in animals, *Br J Cancer*, 74 (1996) 1392-1396.
- [18] A. Hagiwara, T. Takahashi, K. Sawai, C. Sakakura, H. Tsujimoto, K. Osaki, T. Sakakibara, T. Ohyama, M. Ohgaki, and S. Muranishi,

Clinical trials with intraperitoneal cisplatin microspheres for malignant ascites--a pilot study, *Anticancer Drug Des*, 8 (1993) 463-470.

- [19] T. Sakakibara, F. A. Chen, H. Kida, K. Kunieda, R. E. Cuenca, F. J. Martin, and R. B. Bankert, Doxorubicin encapsulated in sterically stabilized liposomes is superior to free drug or drug-containing conventional liposomes at suppressing growth and metastases of human lung tumor xenografts, *Cancer Res*, 56 (1996) 3743-3746.
- [20] I. Rusznyak, M. Foldi, and G. Szabo, *Lymphatics and Lymph Circulation.*, Pergamon Press, Oxford, (1967) 478-497.
- [21] A. Hagiwara, T. Takahashi, K. Sawai, H. Taniguchi, M. Shimotsuma, S. Okano, C. Sakakura, H. Tsujimoto, K. Osaki, and S. Sasaki, Milky spots as the implantation site for malignant cells in peritoneal dissemination in mice, *Cancer Res*, 53 (1993) 687-692.
- [22] H. Tsujimoto, T. Takhashi, A. Hagiwara, M. Shimotsuma, C. Sakakura, K. Osaki, S. Sasaki, M. Shirasu, T. Sakakibara, and T. Ohyama, Site-specific implantation in the milky spots of malignant cells in peritoneal dissemination: immunohistochemical observation in mice inoculated intraperitoneally with bromodeoxyuridine-labelled cells, *Br J Cancer*, 71 (1995) 468-472.
- [23] M. Shimotsuma, M. W. Simpson-Morgan, T. Takahashi, and A. Hagiwara, Activation of omental milky spots and milky spot macrophages by intraperitoneal administration of a streptococcal preparation, OK-432, *Cancer Res*, 52 (1992) 5400-5402.
- [24] H. R. Rosen, G. Jatzko, S. Repse, S. Potrc, H. Neudorfer, P. Sandbichler, J. Zacherl, H. Rabl, P. Holzberger, P. Lisborg, and M.

Czejka, Adjuvant intraperitoneal chemotherapy with carbon-adsorbed mitomycin in patients with gastric cancer: results of a randomized multicenter trial of the Austrian Working Group for Surgical Oncology, *J Clin Oncol*, 16 (1998) 2733-2738.

- [25] A. Sparreboom, C. D. Scripture, V. Trieu, P. J. Williams, T. De, A. Yang, B. Beals, W. D. Figg, M. Hawkins, and N. Desai, Comparative preclinical and clinical pharmacokinetics of a cremophor-free, nanoparticle albumin-bound paclitaxel (ABI-007) and paclitaxel formulated in Cremophor (Taxol), *Clin Cancer Res*, 11 (2005) 4136-4143.
- [26] T. Hamaguchi, K. Kato, H. Yasui, C. Morizane, M. Ikeda, H. Ueno, K. Muro, Y. Yamada, T. Okusaka, K. Shirao, Y. Shimada, H. Nakahama, and Y. Matsumura, A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, *Br J Cancer*, 97 (2007) 170-176.
- [27] A. H. Kyle, L. A. Huxham, D. M. Yeoman, and A. I. Minchinton, Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors, *Clin Cancer Res*, 13 (2007) 2804-2810.
- [28] S. H. Lee, S. D. Yoo, and K. H. Lee, Rapid and sensitive determination of paclitaxel in mouse plasma by high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 724 (1999) 357-363.
- [29] K. Tabata, K. Yamaoka, A. Kaibara, S. Suzuki, M. Terakawa, and T. Hata, Moment analysis program available on. microsoft Excel., *Metabol. and Disp.*, 14 (1999) 286-293.
- [30] A. J. Bailer, and W. W. Piegorsch, Estimating integrals using quadrature methods with an application in pharmacokinetics,

Biometrics, 46 (1990) 1201-1211.

- [31] P. Francis, E. Rowinsky, J. Schneider, T. Hakes, W. Hoskins, and M. Markman, Phase I feasibility and pharmacologic study of weekly intraperitoneal paclitaxel: a Gynecologic Oncology Group pilot Study, *J Clin Oncol*, 13 (1995) 2961-2967.
- [32] G. Los, P. H. Mutsaers, W. J. van der Vijgh, G. S. Baldew, P. W. de Graaf, and J. G. McVie, Direct diffusion of cis-diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy, *Cancer Res*, 49 (1989) 3380-3384.
- [33] M. F. Flessner, J. D. Fenstermacher, R. L. Dedrick, and R. G. Blasberg, A distributed model of peritoneal-plasma transport: tissue concentration gradients, *Am J Physiol*, 248 (1985) F425-435.
- [34] G. Los, P. H. Mutsaers, W. J. Lenglet, G. S. Baldew, and J. G. McVie, Platinum distribution in intraperitoneal tumors after intraperitoneal cisplatin treatment, *Cancer Chemother Pharmacol*, 25 (1990) 389-394.
- [35] M. Hatae, The evaluation of the intraperitoneal chemotherapy, *Oncology and chemotherapy*, 15 (1999) 159-165.
- [36] E. A. Eisenhauer, W. W. ten Bokkel Huinink, K. D. Swenerton, L. Gianni, J. Myles, M. E. van der Burg, I. Kerr, J. B. Vermorken, K. Buser, and N. Colombo, European-Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion, *J Clin Oncol*, 12 (1994) 2654-2666.
- [37] E. K. Rowinsky, and R. C. Donehower, Paclitaxel (taxol), *N Engl J*

Med, 332 (1995) 1004-1014.

- [38] K. Ishihara, Y. Iwasaki, and N. Nakabayashi, Polymeric lipid nanosphere consisting of water-soluble poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate) Polym. J, 31 (1999) 1231-1236
- [39] T. Konno, J. Watanabe, and K. Ishihara, Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers, J Biomed Mater Res A, 65 (2003) 209-214.
- [40] A. Sako, J. Kitayama, H. Koyama, H. Ueno, H. Uchida, H. Hamada, and H. Nagawa, Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer, Cancer Res, 64 (2004) 3624-3628.
- [41] M. I. Nicoletti, V. Lucchini, M. D'Incalci, and R. Giavazzi, Comparison of paclitaxel and docetaxel activity on human ovarian carcinoma xenografts, Eur J Cancer, 30A (1994) 691-696.
- [42] D. Polizzi, G. Pratesi, M. Tortoreto, R. Supino, A. Riva, E. Bombardelli, and F. Zunino, A novel taxane with improved tolerability and therapeutic activity in a panel of human tumor xenografts, Cancer Res, 59 (1999) 1036-1040.
- [43] D. Sharma, T. P. Chelvi, J. Kaur, K. Chakravorty, T. K. De, A. Maitra, and R. Ralhan, Novel Taxol formulation: polyvinylpyrrolidone nanoparticle-encapsulated Taxol for drug delivery in cancer therapy, Oncol Res, 8 (1996) 281-286.
- [44] M. Wada, H. Jinno, M. Ueda, T. Ikeda, M. Kitajima, T. Konno, J.

- Watanabe, and K. Ishihara, Efficacy of an MPC-BMA co-polymer as a nanotransporter for paclitaxel, *Anticancer Res*, 27 (2007) 1431-1435.
- [45] N. Ohashi, Y. Kodera, H. Nakanishi, H. Yokoyama, M. Fujiwara, M. Koike, K. Hibi, A. Nakao, and M. Tatematsu, Efficacy of intraperitoneal chemotherapy with paclitaxel targeting peritoneal micrometastasis as revealed by GFP-tagged human gastric cancer cell lines in nude mice, *Int J Oncol*, 27 (2005) 637-644.
- [46] Y. Bae, N. Nishiyama, S. Fukushima, H. Koyama, M. Yasuhiro, and K. Kataoka, Preparation and biological characterization of polymeric micelle drug carriers with intracellular pH-triggered drug release property: tumor permeability, controlled subcellular drug distribution, and enhanced in vivo antitumor efficacy, *Bioconjug Chem*, 16 (2005) 122-130.
- [47] I. Knemeyer, M. G. Wientjes, and J. L. Au, Cremophor reduces paclitaxel penetration into bladder wall during intravesical treatment, *Cancer Chemother Pharmacol*, 44 (1999) 241-248.
- [48] J. You, F. Q. Hu, Y. Z. Du, and H. Yuan, High cytotoxicity and resistant-cell reversal of novel paclitaxel loaded micelles by enhancing the molecular-target delivery of the drug, *Nanotechnology*, 18 (2007) 495101-495108.