

博士論文

胃癌腹膜播種に対する腹腔内化学療法における
ドラッグデリバリーシステムの工夫

江本 成伸

目次

要旨	1
1. 序文.....	2
2. 方法.....	8
2.1 材料	8
2.2 細胞培養	8
2.3 実験動物	9
2.4 細胞増殖実験	9
2.5 マウスにおける NK105 腹腔内投与の腹膜播種および皮下腫瘍への効果 の検討	10
2.6 マウスにおける NK105 腹腔内投与後の腹腔内および腹膜結節・肝臓へ の PTX の分布の検討	11
2.7 ウサギにおける NK105 腹腔内投与後の血中薬物動態の検討	12
2.8 統計解析	13
3. 結果.....	14
3.1 細胞増殖実験	14
3.2 マウスにおける NK105 腹腔内投与の腹膜播種および皮下腫瘍への効果 の検討	16
3.3 マウスにおける NK105 腹腔内投与後の腹腔内および腹膜結節・肝臓へ の PTX の分布の検討	20
3.4 ウサギにおける NK105 腹腔内投与後の血中薬物動態の検討	22
4. 考察.....	25
5. 結論.....	33
6. 謝辞.....	34
7. 引用文献.....	35

図表目次

図 1	EPR 効果による腫瘍へのナノ粒子の集積	4
図 2	NK105 の構造	6
図 3	細胞増殖実験(MTS アッセイ)	15
図 4	解剖時における各群の腹膜播種(A-C)および皮下腫瘍(D-F) .	17
図 5	マウス腫瘍モデルにおける PTX-Cre と NK105 抗腫瘍効果	18
図 6	薬剤腹腔内投与後の各時間における腹腔内および播種結節・肝臓中の PTX 濃度	21
図 7	ウサギにおける PTX-Cre および NK105 腹腔内投与後の血中 PTX 濃度	23
表 1	解剖時(Day 19)における各群の体重および肝機能・腎機能	19
表 2	ウサギへの各薬剤腹腔内投与後の薬物動態パラメータ	24

要旨

腹腔内化学療法は胃癌腹膜播種に対する新たな治療戦略として期待されている。また、ナノ粒子化抗癌剤の腫瘍への選択的集積による有用性が指摘されている。本研究では、ナノミセル化パクリタキセル NK105 の腹腔内投与が、速やかな播種結節への浸透と血中移行により腹膜播種および皮下腫瘍に高い抗腫瘍効果を示すことを動物実験により明らかにした。また、長時間の血中滞留と腫瘍への薬剤集積により、副作用の軽減と抗腫瘍効果の増強がもたらされることが示された。今後、臨床における NK105 の腹腔内投与への応用が期待される。

1. 序文

胃癌において腹膜播種は最も頻度の高く、予後不良な進展形式である[1, 2]。進行再発胃癌の標準治療として、我が国では S-1 + シスプラチンによる全身化学療法が行われているが、生存期間中央値 13.0 ヶ月と未だ十分な成績とは言えない[3]。全身に投与された抗癌剤は腹腔内への移行が悪く、その効果は限られている[4]。現在、胃癌腹膜播種症例に対して確立された治療法はなく、全身化学療法と緩和医療が行われているのが現状である。1978年に Dedrick らが抗癌剤の腹腔内投与の薬物動態学的な理論的根拠を提唱して以来[5]、卵巣癌においては、腹腔内化学療法の安全性と有効性が示され[6]、3つの第 III 相試験を経て[7-9]、NCCN のガイドライン上で標準的治療の一つとして認定されている[10]。胃癌においても近年、臨床試験において腹腔内化学療法の有効性が示されている[11-13]。

腹腔内化学療法において、投与された薬剤が播種結節に浸透し抗腫瘍効果を発揮するためには、薬剤の腹腔内滞留性・結節への浸透性が高いことをはじめとした薬物動態が非常に重要になる。固形癌に対する代表的な抗癌剤の一つであるパクリタキセル(PTX)は疎水性であるため、実臨床ではポリオキシエチレンヒマシ油(Cremophor EL)とエタノールを用いて溶解され、PTX-Cre の形で商品

名タキソール(Bristol-Myers Squibb, New York, NY, USA)として販売されている[14]。PTX-Cre は、PTX 分子の周囲に Cremophor 分子が界面活性剤としてミセルを形成しているために、10-12 nm という、他の抗癌剤に比べて大きな粒子として溶液中に存在している。このため腹腔内に投与した際、腹膜中皮層から毛細血管へ直接吸収されることがなく、リンパ管開口部を経て吸収されるために、他の水溶性低分子抗癌剤に比べて腹腔内に長く滞留すると考えられている[15-17]。一方で Cremophor EL はアレルギー反応を引き起こしやすく、PTX-Cre は前投薬を行っても 2-4%の患者でアナフィラキシーを含む重篤なアレルギー反応を惹起するとされている[14]。高分子ヒアルロン酸やヒアルロン酸ハイドロゲルと PTX を一緒に腹腔内投与することにより腹膜からの吸収をさらに遅延させる試みはこれまで行われて、抗腫瘍効果の増強が報告されている[18, 19]。

粒子径が 20-100 nm と大きなナノ粒子は、正常組織では血管から漏れることが無い。一方で血管透過性の亢進した腫瘍組織では血管外へ漏出し、組織へ浸透する。そして、腫瘍組織ではリンパ系が未発達であるためナノ粒子はドレナージされずにそこに長く停留することで抗腫瘍効果を発揮する。この腫瘍組織への高分子の受動的集積の増強は、Enhanced permeability and retention effect

(EPR 効果) として、1986 年に松村らにより報告された(図 1)[20]。以来、様々なナノ粒子化抗癌剤が開発されてきている[21-23]。

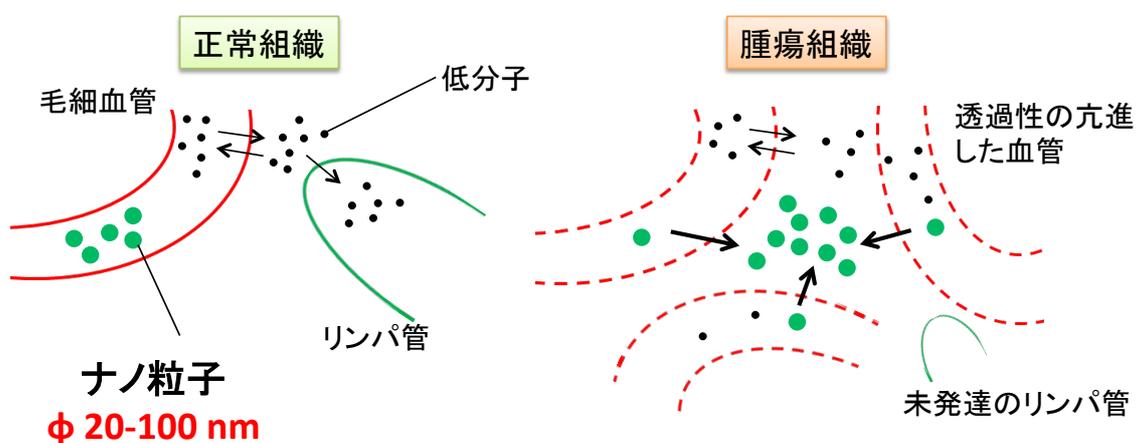


図 1 EPR 効果による腫瘍へのナノ粒子の集積
(文献[23]より引用)

正常組織においては、低分子薬剤は毛細血管から組織間質へ自由に流出し、リンパ管経由でドレナージされる。ナノ粒子は粒子径が大きいため毛細血管から漏出しにくい。一方で腫瘍組織においては、血管の透過性が亢進しているため、ナノ粒子も腫瘍組織間質へ流出する。リンパ管が未発達であるため流出したナノ粒子は長時間腫瘍組織間質に滞留し、抗腫瘍効果を発揮する。

腹膜播種に対するナノ粒子化抗癌剤の腹腔内投与の安全性・効果および薬物動態についてはこれまでほとんど検討されていない。当科ではこれまでに、生体適合性に優れた 2-メタクリロイルオキシエステルホスホコリン(MPC)と疎水性のメタクリル酸 n-ブチル(BMA)の共重合体である両親媒性ポリマー PMB-30W を用いて PTX を溶解し、高分子ミセル製剤である PTX-30W を作成、マウス腹膜播種モデルへの腹腔内投与で PTX-Cre と比較して抗腫瘍効果の増強と生存期間の延長がもたらされることを報告した[24]。また、PTX-30W が腹腔内投与後、PTX-Cre と比較して播種結節の表面よりより深部へ浸透していることを報告した[25]。このメカニズムとして、粒子径が大きいことで腹膜からの吸収が遅れ、それにより播種結節が長く薬剤に曝露されることで、薬剤の結節表面からより深部への浸透がもたらされるのではないかという仮説を設定した。

今回、ナノミセル化 PTX としてすでに製剤化され、臨床試験が進行中である NK105 (日本化薬、東京)を用いて、ナノ粒子化 PTX の腹腔内投与に関するさらなる基礎的検討を行った。NK105 は、PTX、ポリエチレングリコール(PEG)とポリアスパラギン酸からなる両親媒性のポリマーからなる、PTX 内包ミセル製剤である(図 2)[26]。疎水性の PTX とポリアスパラギン酸ポリマーが内核、親水性の PEG ポリマーが外殻となり、水に溶解する。このため、Cremophor EL や

エタノールが含有されていないという利点も持つ。NK105 のミセルは各粒子径の平均が 85 nm であり、EPR 効果の期待されるナノ粒子化製剤となっている。

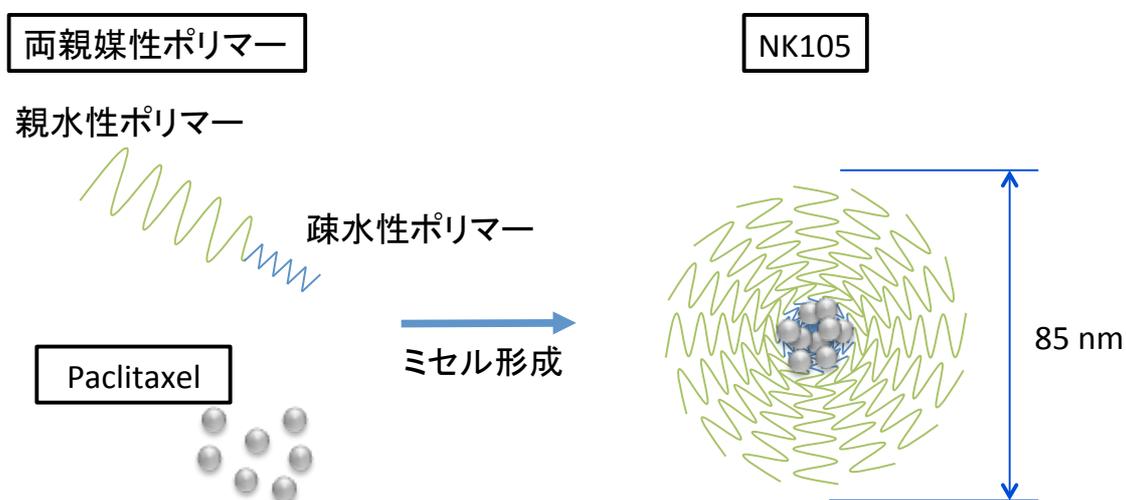


図 2 NK105 の構造

NK105 ポリマーは PEG ポリマーと修飾ポリアスパラギン酸ポリマーから構成され、ポリマーの分子量は約 20,000 (PEG 部分が 12,000、ポリアスパラギン酸部分が 8,000)である。これを疎水性の PTX と混和することで、PTX と疎水性のポリアスパラギン酸ポリマーを内核とし親水性の PEG を外殻としたミセルが形成される。生理食塩水または PBS に溶解したとき、ミセルの直径は平均 85 nm (20-430 nm)となる。

動物実験において、NK105 の静脈投与は、マウス皮下腫瘍に対して PTX-Cre と比較して高い抗腫瘍効果をもたらし、かつ毒性が低いことが示されている[26, 27]。ヒトにおいても、第 I 相臨床試験において安全性が示され、進行再発胃癌における第 II 相試験において、奏効率 25%、全生存期間 14.4 ヶ月と良好な成績が報告されている[28, 29]。これらを踏まえ、転移・再発乳癌における第 III 相試験が現在進行中である。

本研究では、胃癌腹膜播種に対する NK105 の腹腔内投与を今後臨床に応用していくことを念頭に置き、動物モデルを用いて NK105 の腹腔内投与の腹膜播種と皮下腫瘍への効果と腹腔内投与後の PTX の生体内分布と血中動態を検討した。

2. 方法

2.1 材料

PTX-Cre と NK105 は、日本化薬株式会社(東京)より供与を受けた。PTX-Cre は、市販のパクリタキセル NK 注 (タキソール注のジェネリック) であり、PTX 濃度 6 mg/ml として、Cremophor/ethanol (1 : 1, v/v) に調整されているものである。NK105 は、過去に報告されている方法により作成され[26]、4.1%の PTX を含む粉末として供与された。概略としては、NK105 ポリマーは PEG ポリマーと修飾ポリアスパラギン酸ポリマーからなり、ポリマーの分子量は約 20,000 (PEG 部分が 12,000、ポリアスパラギン酸部分が 8,000) である。これを疎水性の PTX と混和することで、PTX と疎水性のポリアスパラギン酸ポリマーを内核とし親水性の PEG を外殻としたミセルが形成される。生理食塩水または PBS に溶解したとき、平均直径 85 nm (20-430 nm) のミセルが形成される[26, 27]。

2.2 細胞培養

ヒト胃癌腹膜播種株である MKN45P を用いた。MKN45P は、ヒト胃癌細胞株 MKN45(理研細胞開発銀行、つくば)を培養し、これをヌードマウスの腹腔内に接種し播種巣を採取、その後、これをさらに継代し、同様に再接種すること

を繰り返し、高頻度に播種を形成する亜株として作成したものである[30]。これを 10% FCS, 100 units/mL ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを含む DMEM(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)培養液で、37°C、5% CO₂ 気相下で培養し、subconfluence に達したのち EDTA と trypsin にて剥離し、実験に使用した。

2.3 実験動物

SPF のメス BALB/c ノードマウスはチャールズリバー・ジャパン(横浜)から購入した。23°Cの空調管理設備にて、12 時間ごとの明暗管理下で飼育した。メスの日本白色ウサギは、埼玉実験動物供給所(埼玉)より購入し、餌と水を自由に飲める環境で個別に飼育した。全ての動物実験は東京大学の動物実験ガイドラインに従って行った。

2.4 細胞増殖実験

PTX-Cre と NK105 の細胞増殖への影響を比較検討するため、MKN45P を用いて MTS assay を行った。96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1×10^3 の濃度で細胞を播種し、24 時間後にウェル内の PTX の濃度が、0, 0.001, 0.01, 0.1, 1

$\mu\text{g/mL}$ となるように PBS または PTX-Cre, NK105 を加えた。72 時間後の時点で MTS 溶液を製品プロトコール(CellTiter 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, WI, USA)に従い、 $20\ \mu\text{L/well}$ ずつ加え、さらに 3 時間培養後、プレートリーダーにて 490 nm 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。各濃度 3 ウェルずつ実験を行い、平均と標準偏差を算出した。

2.5 マウスにおける NK105 腹腔内投与の腹膜播種および皮下腫瘍への効果の検討

8 週齢のメスの BALB/c ノードマウスに、MKN45P 2×10^6 個を 1 mL の PBS に浮遊させ腹腔内へ注入し、同時に MKN45P 1×10^6 個を $200\ \mu\text{L}$ の PBS に浮遊させマウスの側背部に皮下注した。これにより、皮下腫瘍と腹膜播種を有するマウスモデルとした。これを無作為にコントロール群、PTX-Cre 群、NK105 群の 3 群に分けた。各群それぞれ、 $N = 10, 7, 7$ とした。コントロール群についてであるが、Cremophor 単独では PBS と有意差がないことが先行研究で示されており [18, 24]、また、NK105 については、PTX を含まない状態ではミセルが安定化されず外殻のポリマーのみの投与は不可能であったため、PBS のみを

コントロール群とした。7日目、14日目に、コントロール群には1 mLのPBSを、PTX-Cre群・NK105群には、それぞれ体重あたり40 mg/kgのPTXを含む各薬剤を1 mLのPBSに溶解して投与した。

週3回、キャリパーにて皮下腫瘍の長径(L)(mm)と短径(S)(mm)を測定した。腫瘍の体積は、 $(L \times S^2)/2$ (mm³)の近似式にて計算した。細胞接種後19日目にマウスを犠牲死させ解剖した。犠牲死は、吸入麻酔下の心臓採血により行った。開腹し、0.5 mm以上の腸間膜結節の個数を数え、その総重量を測定した。血液は、15分室温に静置した後、700g×5分、4℃にて遠心し、上清を分離した。紫外線吸光法にてAST, ALT, 尿素窒素(UN)を、酵素法にてクレアチニン(Cre)を測定した(SRL、東京)。

2.6 マウスにおけるNK105腹腔内投与後の腹腔内および腹膜結節・肝臓へのPTXの分布の検討

7週齢のメスのBALB/cヌードマウスに、MKN45P 3×10^6 個を1 mLのPBSに浮遊させ腹腔内へ注入した。14日後、PTX-Cre群とNK105群の2群に無作為に分けた。各群N = 9匹とした。それぞれ、体重あたり40 mg/kgのPTXを含む各薬剤を1 mLのPBSに溶解して腹腔内投与した。薬剤投与後、4, 24, 48

時間後に各群 3 匹ずつマウスを犠牲死させ、解剖した。腹腔内残留液を採取し、重量を測定した。腹腔内残留液中の PTX 濃度を HPLC 法にて測定した(SRL、東京)。また、腹膜播種結節と肝臓を切り出し、PBS で洗浄したのち、重量を測定、1% Tween 20 を含む TBS 1 mL を加えてホモジナイズ、破砕液を 11,270 g × 5 分遠心し、上清中の PTX 濃度を HPLC 法にて測定した(SRL、東京)。

2.7 ウサギにおける NK105 腹腔内投与後の血中薬物動態の検討

3.0-3.5 kg のメスの日本白色ウサギを使用した。ケタミン 50 mg/kg とキシラジン 3 mg/kg の臀部への筋注による全身麻酔下に、中腹部で小開腹し、8-Fr のネラトンカテーテルを腹腔内に挿入した。PTX-Cre 群と NK105 群の 2 群に無作為に分け、各群 N = 3 匹とした。それぞれ、体重あたり 5 mg/kg の PTX を含む各薬剤を 25 mL の生理食塩水に溶解して腹腔内投与し、3-0 ナイロンにて閉腹した。薬剤投与後、0.5, 6, 12, 24, 48 時間の時点で耳静脈より 2 ml 採血を施行し、血液を 15 分室温に静置した後、700g × 5 分、4°Cにて遠心し血清を分離、血清中の PTX 濃度を HPLC 法にて測定した(SRL、東京)。各時間における PTX 濃度をプロットし、曲線下面積(AUC)は、台形法にて計算した。

2.8 統計解析

MTS assay と、血液生化学・血中薬物濃度・生体内薬剤分布の各値については、Student の t 検定を用い、多群間の比較における *post hoc* 解析は ANOVA と Tukey-Kramer 法を用いた。結果は、平均±標準偏差(SD)で表示した。播種結節の数・重量・皮下結節の体積については、Kruskal-Wallis 検定を用い、多群間の比較における *post hoc* 解析は Wilcoxon 検定と Bonferroni 補正法を用いた。 $P < 0.05$ を有意とした。解析ソフトは JMP ver. 9.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA)を用いた。

3. 結果

3.1 細胞増殖実験

MKN45P の増殖は、PTX-Cre、NK105 によって、それぞれ PTX 濃度が 0.01 μ g/mL までは用量依存性に抑制され、それ以上の濃度では横ばいとなった (PTX 濃度間の比較における P 値は、0 と 0.001、0.001 と 0.01、0.01 と 0.1、0.1 と 1 (いずれも μ g/mL) の各群間で、PTX-Cre において $P < 0.0001$, $P = 0.023$, $P = 0.098$, $P = 0.48$ 、NK105 において $P < 0.0001$, $P = 0.015$, $P = 0.57$, $P = 0.77$ となった)。PTX-Cre と NK105 の薬剤間の有意差はいずれの濃度においても認めなかった (図 3)。

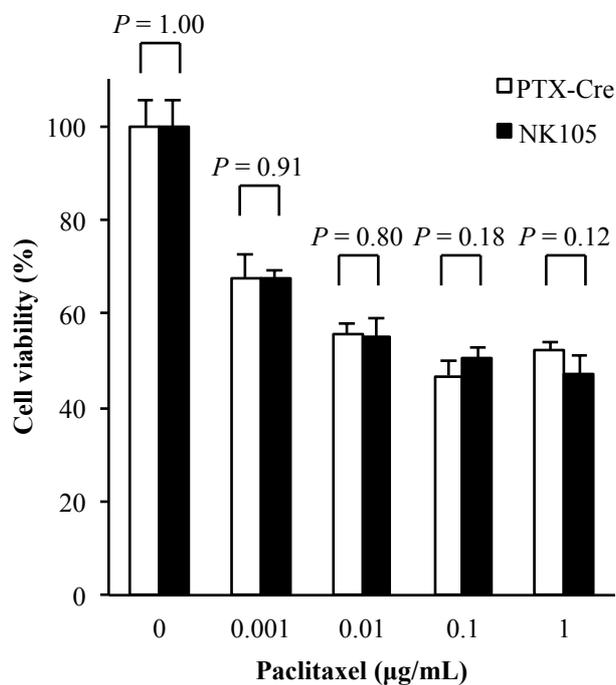


図 3 細胞増殖実験(MTS アッセイ)

ヒト胃癌細胞株 MKN45P に対する、*in vitro*における PTX-Cre および NK105 の細胞増殖への影響を検討した(N = 3)。いずれの PTX 濃度においても、生細胞数の割合に両群間に有意差は認められなかった。

3.2 マウスにおける NK105 腹腔内投与の腹膜播種および皮下腫瘍への効果の検討

実験 19 日目の解剖の時点でコントロール群のマウス 2 匹が死亡していた。各群のマウスの腸間膜の腹膜播種および、皮下腫瘍の代表的な写真を図 4 に示す。

皮下腫瘍の体積および重量は、NK105 群においてコントロール群と比較して有意に減少しており、PTX-Cre 群とコントロール群の間には有意差を認めなかった(図 5A, B)。播種結節の個数と重量は、PTX-Cre 群および NK105 群のいずれにおいてもコントロール群と比較して有意に減少しており、NK105 群においては PTX-Cre 群と比較しても有意に減少していた(図 5C, D)。表 1 に解剖時における各群の体重、血清中の AST、ALT、尿素窒素(UN)、クレアチニン(Cre)の値を示す。PTX-Cre 群と NK105 群の間にはいずれの項目も有意差を認めなかった。

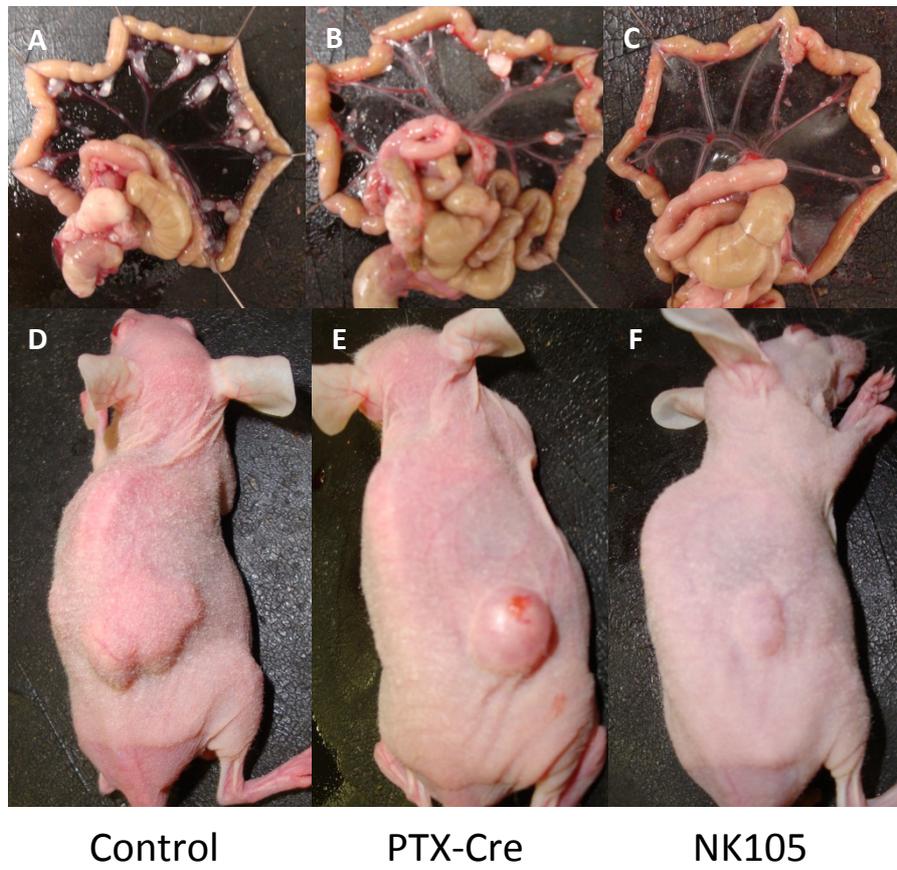


図 4 解剖時における各群の腹膜播種(A-C)および皮下腫瘍(D-F)
各群の代表的な写真を示す。A, D) Control 群、B, E) PTX-Cre 群、C, F) NK105 群

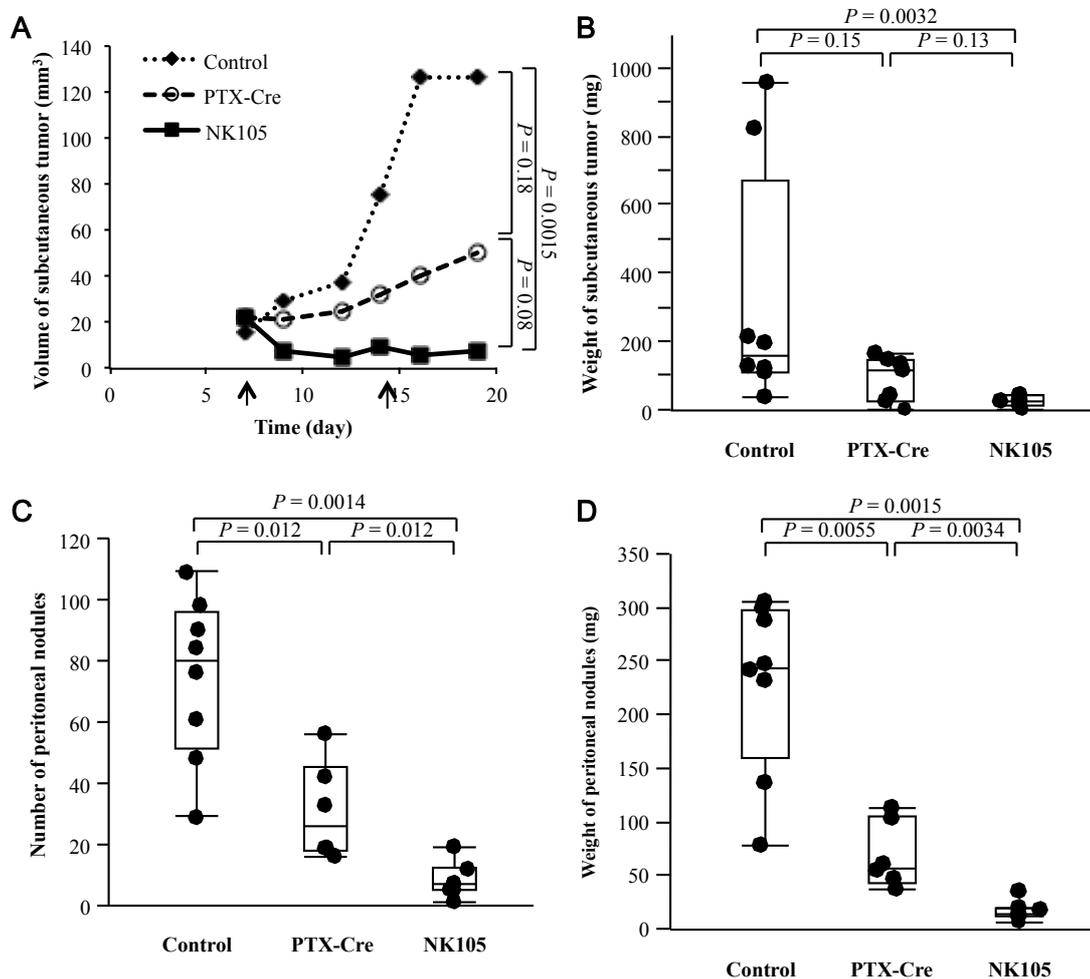


図 5 マウス腫瘍モデルにおける PTX-Cre と NK105 抗腫瘍効果

MKN45P を皮下および腹腔内に注入し、腫瘍を形成したヌードマウスにおいて、7日目、14日目 (A の矢印↑) に PBS, PTX-Cre, NK105 を腹腔内投与した (N = 7~10)。解剖時には NK105 群において Control 群と比較して有意に皮下腫瘍が体積 (A) および重量 (B) とともに減少していた。また、解剖時の腹膜播種結節の個数 (C) および重量 (D) は PTX-Cre 群および NK105 群のいずれにおいてもコントロール群と比較して有意に減少しており、NK105 群においては PTX-Cre 群と比較しても有意に減少していた。

表 1 解剖時(Day 19)における各群の体重および肝機能・腎機能

	Control	PTX-Cre	NK105
体重(g)	18.1 ± 1.0	19.5 ± 1.6	19.9 ± 2.5
AST (IU/L)	419 ± 156	226 ± 127	223 ± 149
ALT (IU/L)	79 ± 31	46 ± 12	48 ± 12
UN (mg/dL)	42 ± 5	46 ± 2	48 ± 3
Creatinine (mg/dL)	0.19 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.02

データは平均 ± 標準偏差で示す。いずれの項目も PTX-Cre 群と NK105 群に有意差を認めなかった。

3.3 マウスにおける NK105 腹腔内投与後の腹腔内および腹膜結節・肝臓への PTX の分布の検討

薬剤腹腔内投与後、4 時間において、腹腔内に残留した薬液の量は PTX-Cre 群において有意に多く、4, 24 時間の時点において残留液中の PTX 濃度も PTX-Cre 群にて有意に高値を示した(図 6A, B)。一方で、播種結節破碎液中の PTX 濃度は薬剤腹腔内投与後 4 時間において、NK105 群で有意に高く、24, 48 時間では各群間に有意差は認められなかった(図 6C, D)。

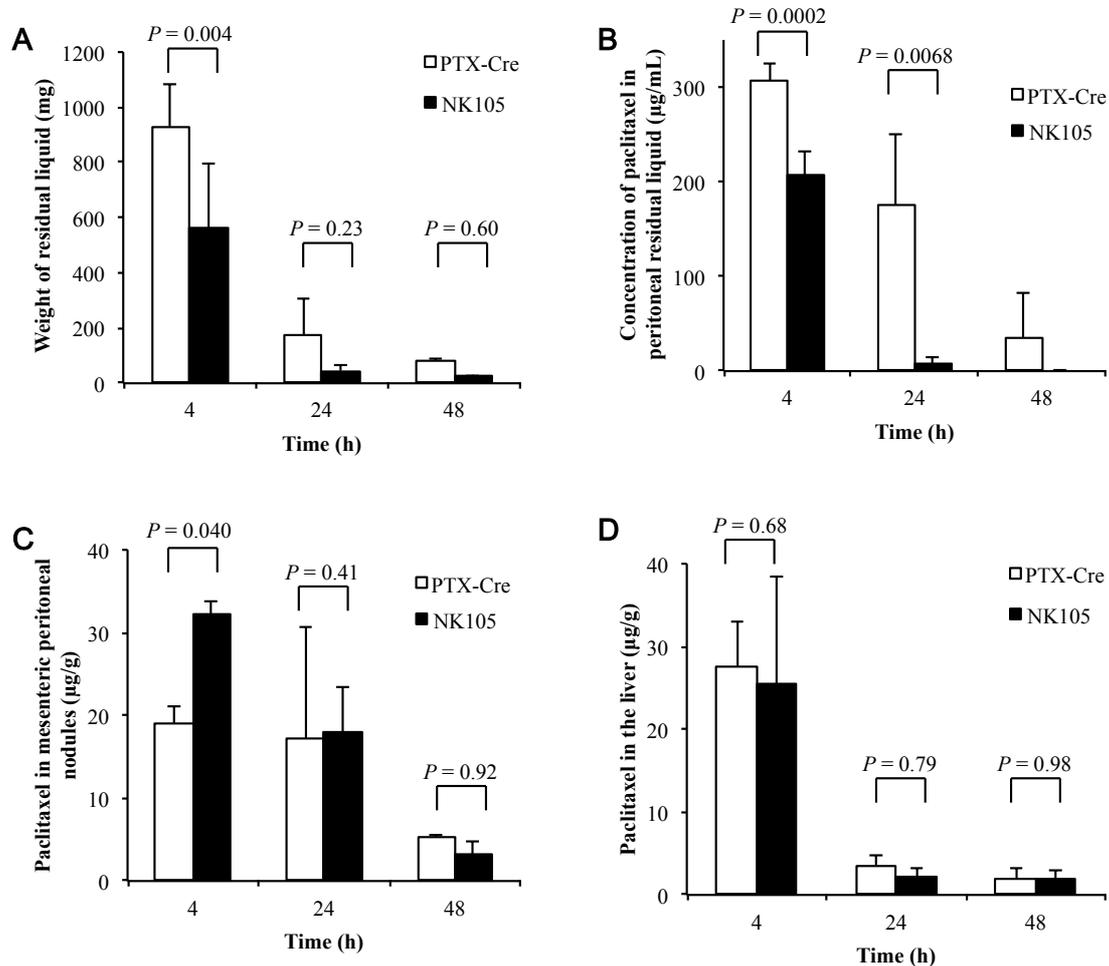


図 6 薬剤腹腔内投与後の各時間における腹腔内および播種結節・肝臓中の PTX 濃度

PTX-Cre, NK105 を腹腔内投与した後、4, 24, 48 時間後の腹腔内残留液の量 (A) およびその PTX 濃度 (B)、腹膜播種結節 (C)・肝臓 (D) ホモジネート液中の PTX 濃度を HPLC 法にて測定した (N = 3)。腹腔内投与から 4 時間後における肝臓中の PTX は両群間に有意差を認めないにもかかわらず、播種結節中の PTX は NK105 群で有意に高値を示した。NK105 群の 48 時間後における腹腔内残留液中の PTX 濃度は測定感度以下であり、検定は施行しなかった。

3.4 ウサギにおける NK105 腹腔内投与後の血中薬物動態の検討

薬剤腹腔内投与後の血中 PTX 濃度の推移を図 7 に示す。血中 PTX 濃度は、薬剤腹腔内投与後 0.5 時間では、PTX-Cre 群で有意に高く、6, 12, 24, 48 時間では NK105 群で有意に高かった。いずれの群も 6 時間(T_{max})で最高血中濃度(C_{max})に達した。最高血中濃度(C_{max})と血中濃度-時間曲線下面積(AUC_{0-48h})は NK105 群で有意に高値を示した(表 2)。

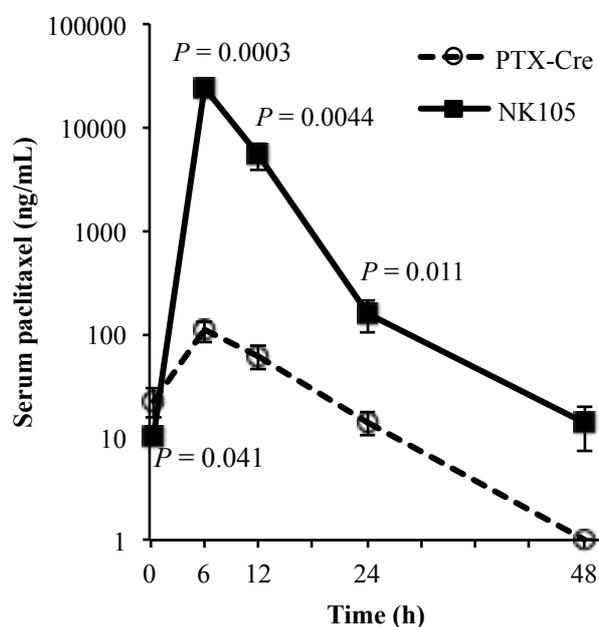


図 7 ウサギにおける PTX-Cre および NK105 腹腔内投与後の血中 PTX 濃度

ウサギに 5 mg/kg の PTX を含む PTX-Cre および NK105 を腹腔内投与し、0.5, 6, 12, 24, 48 時間後に耳静脈より採血を行った(N = 3)。血清中の PTX 濃度を HPLC 法にて測定した。腹腔内投与後 0.5 時間では PTX-Cre 群が、6, 12, 24 時間では NK105 群が有意に高い血中 PTX 濃度を示した(P 値は各時間における両薬剤群間の PTX 濃度を比較したものを示す)。48 時間における PTX-Cre 群の血中濃度は測定感度以下であったため、検定は行っていない。

表 2 ウサギへの各薬剤腹腔内投与後の薬物動態パラメータ

	PTX-Cre	NK105	<i>P</i>
T_{\max} (h)	6 ± 0	6 ± 0	1.000
C_{\max} (ng/mL)	108 ± 25	24100 ± 3560	< 0.001
AUC_{0-48h} (ng · h/mL)	6 ± 0	191000 ± 32100	< 0.001

データは平均±標準偏差で示す。 C_{\max} , AUC ともに NK105 群で著明に高値を示した。

4. 考察

NK105 の静脈投与については、PTX-Cre と比較した臨床的優位性が過去に報告されている[26-29]。主にナノ粒子であることで EPR 効果による腫瘍への受動的集積がもたらされることと、溶媒に Cremophor・エタノールを含有しないことが主たる特徴で、動物において血中での長時間滞留性および EPR 効果による腫瘍への選択的集積[26]、末梢神経障害の軽減[27]が報告された。さらに、15名の腹膜播種患者を含む 56 名の進行・再発胃癌患者における第 II 相臨床試験において、25%の奏効率・55%の病勢コントロール率、PTX-Cre と同等の血液毒性・末梢神経障害が本邦より報告された[29]。本研究では NK105 の腹腔内投与後の効果および薬物動態を明らかにすることを目的とした。当初、NK105 の粒子径に着目し、腹腔内投与後、腹腔内に長時間滞留するのではないかと予想した。しかし、本研究の結果、NK105 は PTX-Cre と比較してより速く腹腔内から消失し血中に移行することが判明した。

全身循環に移行した後の血中薬物動態であるが、 C_{max} , AUC とともに NK105 において PTX-Cre と比較し著明に高値を示した。NK105 群において、PTX-Cre 群と比較して皮下腫瘍の抑制が強く認められたことは、主に高い血中 PTX 濃度が長く持続することによると考えられる。腹腔内滞留性が低いにもかかわらず、

NK105が播種に対しても高い効果を示した一因として、長い血中滞留性により、血管経由で多量のPTXが播種に到達し浸透したと考えられる。

一方、薬剤腹腔内投与後4時間の腹膜結節中のPTX濃度はPTX-Cre群に比べてNK105群で有意に高値を示した。この時点は、血中濃度が最高に達するより早期であり、結節表面からのNK105の浸透力が高いことが推測される。血流が豊富で、血中薬物動態の影響が強いと考えられる肝臓におけるPTX濃度に両群で有意差が認められないことから、播種結節表面からのNK105のより迅速かつより深部への浸透が示唆され、播種への抗腫瘍効果をもたらしたと考えられる。当科から先行研究が報告されているPTX-30Wは、2-メタクリロイルオキシエステルホスホコリン(MPC)と疎水性のメタクリル酸 n-ブチル(BMA)からなる生体適合性両親媒性ポリマーPMB-30Wを用いた、粒子径が50 – 100 nmのナノミセル化パクリタキセルである。PTX-30Wでは、これを蛍光標識したPTXを用いて作成し腹腔内投与し、播種結節切片における蛍光観察を行うことで、結節表面から深部への優れた浸透力が立証されている[24, 25]。また、このPTX-30Wは、本研究と同様のマウスの腹膜播種モデルに投与することで、PTX-Creと比較して高い抗腹膜播種効果が示されている[24]。NK105も、PTX-30Wと類似したミセル製剤であり、同様の現象が起こっていると推測され

る。これを立証するためにポリマーまたは PTX に蛍光標識した NK105 を用いた同様の実験を計画し、蛍光標識を試みたが、現在のところ、標識によりミセルが安定化せず挙動が変化してしまったため、蛍光ミセルの作成に至っていない。

他の PEG ポリマーによるナノミセル化 PTX である PTX-PEG_{5k}-CA₈ NPs に蛍光標識をし、卵巣癌のマウス腹膜播種モデルへ腹腔内投与したところ、播種結節への強い集積と結節深部への浸透を示し、それにより従来の PTX と比較して抗腫瘍効果が増強したという報告もあり [31]、PEG の特性が NK105 の結節への浸透に寄与している可能性がある。

また、他の研究で、PMB-30W 等の両親媒性ポリマーと細胞膜の親和性の高さについての報告がある [32]。これらのポリマーはエンドサイトーシスではなく、ポリマーと細胞膜の融合によって細胞膜を破壊することなく速やかに細胞質に侵入することが示されている。播種結節への浸透や腹膜の通過が同様のメカニズムによってもたらされている可能性が推測される。他に、アルブミンと PTX を結合させたナノ粒子化 PTX である nab-PTX (アブラキサン) が、腫瘍の間質の細胞を抑制し、線維化を抑制したという報告があり、ナノ粒子化 PTX が間質への高い浸透を示している可能性も考えられる [33]。いずれにせよ、NK105 がど

のようなメカニズムで播種結節に速やかに浸透するのか、今後検討していく必要がある。

また本研究では、NK105 の腹腔から血中への速やかな移行が新たな知見として得られた。粒子径が大きな薬剤は腹膜のリンパ管開口部から緩徐に吸収されることが従来から知られているが[15]、NK105 は 85 nm という粒子径にもかかわらず、比較的早期の血中移行を示した。短時間の移行であるので、腹膜下の毛細血管を経由した移行が関与している可能性も考えられ、吸収経路に関する検討が必要である。仮に NK105 が毛細血管経由で吸収されるとすれば、大きな粒子が毛細血管に入るメカニズムとしては、腹腔内での構造変化(PTX と結合する物質の変化)もしくは、中皮細胞や腹腔内の他の細胞に一旦取り込まれ、分解・吸収されるなどの可能性が推測される。詳細な機序に関しては今後検討していく必要がある。

静脈投与された NK105 の血中薬物動態は、マウスおよびヒトにおいて報告されており、いずれにおいても、NK105 が PTX-Cre と比較して高い血中濃度を持続することが示されている[26, 28]。遊離 PTX は早期に肝臓で代謝されることから[14]、NK105 はミセルの状態を保ったまま肝臓での代謝を免れて血中を循環していると考察されており、ステルス効果と命名されている[26, 28]。ナノ

粒子が正常組織に取り込まれにくいという EPR 効果がその一因であると考えられる。今回、ウサギにおいて腹腔内から血中へ吸収された NK105 が長時間にわたり血中を循環し、さらにマウスにおける副作用に差が見られなかったのはこれらの研究結果と一致する結果であった。血中濃度の上昇が必ずしも有害事象につながらない点は、ヒトにおける NK105 の静脈投与の第 I 相臨床試験の結果とも一致している[28]。

NK105 のもう一つの利点は Cremophor とエタノールを用いずに水に溶解される点である。本研究の予備実験として、同じヌードマウスに PTX-Cre と NK105 を投与濃度を変えて腹腔内投与したところ、PTX-Cre は 50 mg/kg で投与後の振戦や数時間にわたる寡動状態などの有害事象が生じ、80 mg/kg では 1 日以内に死亡した。同様の結果が、Cremophor とエタノールの溶媒のみの投与でも起こった。一方、NK105 は、100 mg/kg の投与でも外見上の有害事象は生じなかった。NK105 の方が明らかに毒性が低いことが判明したが、本研究では、両群ともに外見上の有害事象の生じない、40 mg/kg に設定した。

体重減少、肝障害、腎障害に関しては PTX-Cre 群・NK105 群で有意差が見られなかった。肝臓中の PTX 濃度も両群で有意差が認められず、先述のとおり、血中濃度が高くても EPR 効果により正常組織中には取り込まれにくいというナ

ノ粒子の特性であると考えられる。

腹腔内化学療法においては、腹腔内での長時間滞留性と全身循環からの速やかな排泄が重要であると考えられてきた[34]。また、臨床においては、原発巣と播種巣の両方をターゲットとするために、一般に静脈投与などの全身投与と腹腔内投与が併用される。NK105 は、腹腔内投与後、腹腔内から速やかに吸収され、長時間全身循環するという結果であったが、播種結節にも速やかに浸透し、かつ全身循環中は正常組織には入りにくいいため、腹腔内投与のみで効果的に原発巣(本研究における皮下腫瘍に相当)に対しても抗腫瘍効果を発揮すると期待される。

NK105 の静脈投与後の血中動態は動物およびヒトですでに報告されており、PTX-Cre と比較して高い血中濃度が長時間持続することが知られている[26, 28]。本研究における NK105 の腹腔内投与においては、投与後の腹腔内からの吸収が速やかであることから、投与数時間後以降の血中動態は NK105 を静脈投与した場合と類似していると考えられる。NK105 の抗腹膜播種効果について、高い血中滞留性から血管を介した腹膜播種への薬剤移行の寄与がその大部分であれば、静脈投与でも十分に効果が得られると考えられる。本研究では、静脈投与と腹腔内投与の効果の直接比較は行っていないため、腹腔内投与された

NK105 が、腹腔内から吸収されるまでの間に播種結節への直接浸透や遊離癌細胞への殺細胞効果などの、静脈投与に上乘せされる効果がどの程度あるかは不明である。ヒトにおいては胃癌腹膜播種患者における PTX-Cre の腹腔内投与を含むレジメンにおける第 II 相臨床試験の生存期間中央値が 23.6 ヶ月[13]、進行再発胃癌患者における NK105 の静脈投与の第 II 相試験の生存期間中央値が 14.4 ヶ月であり[29]、今回、動物において NK105 の腹腔内投与が PTX-Cre の腹腔内投与に優越することを示せたことで、動物における NK105 の腹腔内投与と静脈投与の比較を省略しても、ヒトにおいて NK105 の腹腔内投与の第 I, II 相試験を行うことの根拠となりうると考えられる。

本研究の限界であるが、まず、動物実験において動物種の統一ができなかったことである。抗腫瘍効果や臓器中 PTX 濃度の測定にはヌードマウスを用いたのに対し、血中濃度測定には、採血手技上の問題からウサギを用いた。2 つ目は、NK105 のポリマー単独でのコントロールを取れなかったことである。NK105 は内核の PTX があって初めて安定なミセルを形成するため、外殻の PEG ポリマー単独で実験に用いることができなかった。3 つ目は有害事象の測定において、コントロール群で体重減少・肝障害・腎障害が認められたことである。いずれも癌の進行による影響であると考えられるが、薬剤による障害を正確に評価す

るためには播種のないマウスを使って比較検討する必要がある。しかし、実臨床において投与するのは担癌生体であり、担癌マウスにおいて副作用が認められなかったことは有意義な所見であると考えられる。

腹腔内投与された NK105 は粒子径が大きいにもかかわらず、腹腔内から速やかに吸収された。腹腔内滞留性は必ずしも粒子径によるものではないことが、示唆された。従来から、滞留性向上のための工夫として行われている、ハイドロゲルや pH 感受性を用いた薬剤の徐放[18, 19, 35-38]や分子標的薬 bevacizumab を用いた腹膜の透過性の調節[39]、細胞表面抗原に対するターゲティング[40-42]などのドラッグデリバリーシステムと組み合わせることで NK105 の腹腔内滞留性をさらに向上させることができれば、より播種結節への表面からの直接浸透による効果を増強させることができると期待される。

5. 結論

NK105 の腹腔内投与では、PTX-Cre の腹腔内投与と比較して、マウスの腹膜播種に対してより高い抗腫瘍効果が認められた。また、皮下腫瘍に対しては、NK105 群でのみ、コントロール群と比較における抗腫瘍効果を認めた。

NK105 は腹腔内投与後に、速やかに腹膜から吸収され、全身循環へ移行し、高い血中濃度と長い血中滞留を示した。腹腔内投与後 4 時間において、腫瘍内の PTX 濃度は、NK105 群で有意に高く、播種結節への速やかな直接浸透が播種への効果増強の一因であると考えられる。

以上より、NK105 を用いた腹腔内化学療法は、腹膜播種に対して有望な治療法になりうると考えられる。

6. 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：北山丈二准教授には、テーマの設定から実験方法、研究のまとめ方から発表に至るまで終始熱心な御指導を頂きました。同教室：山口博紀先生には、動物実験・結果の解釈と発表を中心に基礎から御指導頂きました。同教室：石神浩徳先生には、学会・論文発表を中心に御指導頂きました。同教室：内川千枝子女史、網谷かほる女史、齋藤有女史には、実験方法の習得・実験の遂行にあたり多大なる御協力を頂きました。日本化薬株式会社には、NK105 の供与および、実験方針やデータの解釈など詳細に御指導頂きました。そして、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室：渡邊聡明教授、本学大学院医学系研究科腫瘍外科学教室：名川弘一前教授には終始にわたり全面的な御支援を賜りました。ここに多大なる謝意を表します。

7. 引用文献

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D: **Global cancer statistics.** *CA Cancer J Clin*, **61(2)**:69-90, 2011.
2. Isobe Y, Nashimoto A, Akazawa K, Oda I, Hayashi K, Miyashiro I, Katai H, Tsujitani S, Kodera Y, Seto Y, Kaminishi M: **Gastric cancer treatment in Japan: 2008 annual report of the JGCA nationwide registry.** *Gastric Cancer*, **14(4)**:301-316, 2011.
3. Koizumi W, Narahara H, Hara T, Takagane A, Akiya T, Takagi M, Miyashita K, Nishizaki T, Kobayashi O, Takiyama W, Toh Y, Nagaie T, Takagi S, Yamamura Y, Yanaoka K, Orita H, Takeuchi M: **S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial.** *Lancet Oncol*, **9(3)**:215-221, 2008.
4. Brigand C, Arvieux C, Gilly FN, Glehen O: **Treatment of peritoneal carcinomatosis in gastric cancers.** *Dig Dis*, **22(4)**:366-373, 2004.

5. Dedrick RL, Myers CE, Bungay PM, DeVita VT, Jr.: **Pharmacokinetic rationale for peritoneal drug administration in the treatment of ovarian cancer.** *Cancer Treat Rep*, **62**(1):1-11, 1978.
6. Markman M, Rowinsky E, Hakes T, Reichman B, Jones W, Lewis JL, Jr., Rubin S, Curtin J, Barakat R, Phillips M, et al.: **Phase I trial of intraperitoneal taxol: a Gynecologic Oncology Group study.** *J Clin Oncol*, **10**(9):1485-1491, 1992.
7. Alberts DS, Liu PY, Hannigan EV, O'Toole R, Williams SD, Young JA, Franklin EW, Clarke-Pearson DL, Malviya VK, DuBeshter B: **Intraperitoneal cisplatin plus intravenous cyclophosphamide versus intravenous cisplatin plus intravenous cyclophosphamide for stage III ovarian cancer.** *N Engl J Med*, **335**(26):1950-1955, 1996.
8. Markman M, Bundy BN, Alberts DS, Fowler JM, Clark-Pearson DL, Carson LF, Wadler S, Sickel J: **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**(4):1001-1007, 2001.

9. Armstrong DK, Bundy B, Wenzel L, Huang HQ, Baergen R, Lele S, Copeland LJ, Walker JL, Burger RA: **Intraperitoneal cisplatin and paclitaxel in ovarian cancer**. *N Engl J Med*, **354**(1):34-43, 2006.
10. Morgan RJ, Jr., Alvarez RD, Armstrong DK, Boston B, Burger RA, Chen LM, Copeland L, Crispens MA, Gershenson D, Gray HJ, Grigsby PW, Hakam A, Havrilesky LJ, Johnston C, Lele S, Matulonis UA, O'Malley DM, Penson RT, Remmenga SW, Sabbatini P, Schilder RJ, Schink JC, Teng N, Werner TL: **Epithelial ovarian cancer**. *J Natl Compr Canc Netw*, **9**(1):82-113, 2011.

11. Kodera Y, Ito Y, Ito S, Ohashi N, Mochizuki Y, Yamamura Y, Koike M, Fujiwara M, Nakanishi H, Nakao A: **Intraperitoneal paclitaxel: a possible impact of regional delivery for prevention of peritoneal carcinomatosis in patients with gastric carcinoma.** *Hepatogastroenterology*, 54(75):960-963, 2007.
12. Ishigami H, Kitayama J, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, Hidemura A, Kaisaki S, Nagawa H: **Phase I pharmacokinetic study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer.** *Oncology*, 76(5):311-314, 2009.
13. Ishigami H, Kitayama J, Kaisaki S, Hidemura A, Kato M, Otani K, Kamei T, Soma D, Miyato H, Yamashita H, Nagawa H: **Phase II study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis.** *Ann Oncol*, 21(1):67-70, 2010.
14. Rowinsky EK, Donehower RC: **Paclitaxel (taxol).** *N Engl J Med*,

332(15):1004-1014, 1995.

15. Markman M: **Intraperitoneal antineoplastic drug delivery: rationale and results.** *Lancet Oncol*, 4(5):277-283, 2003.
16. Eiseman JL, Eddington ND, Leslie J, MacAuley C, Sentz DL, Zuhowski M, Kujawa JM, Young D, Egorin MJ: **Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice.** *Cancer Chemother Pharmacol*, 34(6):465-471, 1994.
17. Gelderblom H, Verweij J, van Zomeren DM, Buijs D, Ouwens L, Nooter K, Stoter G, Sparreboom A: **Influence of Cremophor El on the bioavailability of intraperitoneal paclitaxel.** *Clin Cancer Res*, 8(4):1237-1241, 2002.
18. Yamada J, Kitayama J, Tsuno NH, Yamashita H, Miyato H, Soma D, Otani K, Kamei T, Ishigami H, Hidemura A, Kaisaki S, Takahashi K, Nagawa H: **Intra-peritoneal administration of paclitaxel with non-animal stabilized hyaluronic acid as a vehicle--a new strategy against peritoneal**

- dissemination of gastric cancer. *Cancer Lett*, **272**(2):307-315, 2008.
19. Bajaj G, Kim MR, Mohammed SI, Yeo Y: **Hyaluronic acid-based hydrogel for regional delivery of paclitaxel to intraperitoneal tumors.** *J Control Release*, **158**(3):386-392, 2012.
 20. Matsumura Y, Maeda H: **A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs.** *Cancer Res*, **46**(12 Pt 1):6387-6392, 1986.
 21. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R: **Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy.** *Nat Nanotechnol*, **2**(12):751-760, 2007.
 22. Davis ME, Chen ZG, Shin DM: **Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer.** *Nat Rev Drug Discov*, **7**(9):771-782, 2008.
 23. Matsumura Y, Kataoka K: **Preclinical and clinical studies of**

- anticancer agent-incorporating polymer micelles. *Cancer Sci*, 100(4):572-579, 2009.
24. Soma D, Kitayama J, Konno T, Ishihara K, Yamada J, Kamei T, Ishigami H, Kaisaki S, Nagawa H: **Intraperitoneal administration of paclitaxel solubilized with poly(2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer.** *Cancer Sci*, 100(10):1979-1985, 2009.
25. Kamei T, Kitayama J, Yamaguchi H, Soma D, Emoto S, Konno T, Ishihara K, Ishigami H, Kaisaki S, Nagawa H: **Spatial distribution of intraperitoneally administrated paclitaxel nanoparticles solubilized with poly(2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) in peritoneal metastatic nodules.** *Cancer Sci*, 102(1):200-205, 2010.
26. Hamaguchi T, Matsumura Y, Suzuki M, Shimizu K, Goda R, Nakamura I, Nakatomi I, Yokoyama M, Kataoka K, Kakizoe T:

- NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation, can extend in vivo antitumour activity and reduce the neurotoxicity of paclitaxel. *Br J Cancer*, **92**(7):1240-1246, 2005.
27. Negishi T, Koizumi F, Uchino H, Kuroda J, Kawaguchi T, Naito S, Matsumura Y: **NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, is a more potent radiosensitising agent compared to free paclitaxel.** *Br J Cancer*, **95**(5):601-606, 2006.
28. Hamaguchi T, Kato K, Yasui H, Morizane C, Ikeda M, Ueno H, Muro K, Yamada Y, Okusaka T, Shirao K, Shimada Y, Nakahama H, Matsumura Y: **A phase I and pharmacokinetic study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle formulation.** *Br J Cancer*, **97**(2):170-176, 2007.
29. Kato K, Chin K, Yoshikawa T, Yamaguchi K, Tsuji Y, Esaki T, Sakai K, Kimura M, Hamaguchi T, Shimada Y, Matsumura Y, Ikeda R: **Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for**

previously treated advanced or recurrent gastric cancer.

Invest New Drugs, **30**(4):1621-1627, 2012.

30. Sako A, Kitayama J, Koyama H, Ueno H, Uchida H, Hamada H, Nagawa H: **Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer.** *Cancer Res*, **64**(10):3624-3628, 2004.
31. Xiao K, Luo J, Fowler WL, Li Y, Lee JS, Xing L, Cheng RH, Wang L, Lam KS: **A self-assembling nanoparticle for paclitaxel delivery in ovarian cancer.** *Biomaterials*, **30**(30):6006-6016, 2009.
32. Goda T, Goto Y, Ishihara K: **Cell-penetrating macromolecules: direct penetration of amphipathic phospholipid polymers across plasma membrane of living cells.** *Biomaterials*, **31**(8):2380-2387, 2010.
33. Alvarez R, Musteanu M, Garcia-Garcia E, Lopez-Casas PP, Megias D, Guerra C, Munoz M, Quijano Y, Cubillo A,

- Rodriguez-Pascual J, Plaza C, de Vicente E, Prados S, Tabernero S, Barbacid M, Lopez-Rios F, Hidalgo M: **Stromal disrupting effects of nab-paclitaxel in pancreatic cancer.** *Br J Cancer*, **109(4):926-933**, 2013.
34. Dedrick RL, Flessner MF: **Pharmacokinetic problems in peritoneal drug administration: tissue penetration and surface exposure.** *J Natl Cancer Inst*, **89(7):480-487**, 1997.
35. Bajaj G, Yeo Y: **Drug delivery systems for intraperitoneal therapy.** *Pharm Res*, **27(5):735-738**, 2010.
36. Emoto S, Yamaguchi H, Kamei T, Ishigami H, Suhara T, Suzuki Y, Ito T, Kitayama J, Watanabe T: **Intraperitoneal administration of cisplatin via an in situ cross-linkable hyaluronic acid-based hydrogel for peritoneal dissemination of gastric cancer.** *Surg Today*, 2013.
37. Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK: **Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation.** *Nat Med*,

- 3(2):177-182, 1997.
38. Bae Y, Nishiyama N, Fukushima S, Koyama H, Yasuhiro M, Kataoka K: **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**(1):122-130, 2005.
39. Shah DK, Veith J, Bernacki RJ, Balthasar JP: **Evaluation of combined bevacizumab and intraperitoneal carboplatin or paclitaxel therapy in a mouse model of ovarian cancer.** *Cancer Chemother Pharmacol*, **68**(4):951-958, 2011.
40. Cirstoiu-Hapca A, Buchegger F, Lange N, Bossy L, Gurny R, Delie F: **Benefit of anti-HER2-coated paclitaxel-loaded immuno-nanoparticles in the treatment of disseminated ovarian cancer: Therapeutic efficacy and biodistribution in mice.** *J Control Release*, **144**(3):324-331, 2010.
41. De Stefano I, Battaglia A, Zannoni GF, Prisco MG, Fattorossi A,

Travaglia D, Baroni S, Renier D, Scambia G, Ferlini C, Gallo D:

Hyaluronic acid-paclitaxel: effects of intraperitoneal administration against CD44(+) human ovarian cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol*, **68**(1):107-116, 2011.

42. Patriarca C, Macchi RM, Marschner AK, Mellstedt H: **Epithelial cell adhesion molecule expression (CD326) in cancer: a short review.** *Cancer Treat Rev*, **38**(1):68-75, 2012.