

腹膜播種に対する抗癌剤の直接浸透に関する検討

亀井 隆雄

目次

序文	1
1. 背景と目的	6
2. 実験方法	
2.1. 材料	8
2.2. 細胞培養	8
2.3. PTX-30W および PTX-Cre	9
2.4. 蛍光顕微鏡による腹膜結節および肝臓、腎臓における PTX の分 布の観察	9
2.5. 浸透距離の測定	10
2.6. 内皮細胞の免疫染色	11
2.7. アポトーシスの観察	11
2.8. 統計分析	12
3. 結果	
3.1. 腹膜結節と肝臓、腎臓における静脈投与後の PTX の分布	13
3.2. 腹膜結節と肝臓、腎臓における腹腔内投与後の PTX の分布	15
3.3. 腹腔内投与された PTX は主に腫瘍の無血管領域に分布する	20

3.4. ex vivo における PTX の播種巢内分布	24
3.5. 高濃度の PTX はアポトーシスを誘導する	24
考察	27
まとめ	37
結論	38
謝辞	39
参考文献	40

図表目次

Fig. 1. 胃癌腹膜播種モデルへの OG-PTX 静脈投与後における腹膜結節 と肝臓と腎臓への集積パターン	14
Fig. 2. 胃癌腹膜播種モデルへの OG-PTX 腹腔内投与後における腹膜結 節と肝臓と腎臓への集積パターン	16
Fig. 3. OG-PTX の腹腔内投与および静脈投与 24 時間後の腹腔内腫瘍に おける腫瘍内蛍光強度	18
Fig. 4. 腹膜結節に対する溶媒の違いによる OG-PTX 直接浸透距離の比 較	19
Fig. 5. 腹膜播種に対する OG-PTX 静脈投与後、腹腔内投与後 48 時間の 蓄積パターンと血管との関係	21
Fig. 6. 腹膜播種に対する OG-PTX 腹腔内投与後 1 時間、24 時間の蓄積 パターンと血管の関係	22
Fig. 7. 肝臓、腎臓に対する OG-PTX 静脈投与後、腹腔内投与後の蓄積 パターンと血管との関係	23
Fig. 8. 切除後の播種結節に OG-PTX 溶液を浸した時の集積パターン	25

Fig. 9. 播種結節に対する腹腔内投与後の OG-PTX の集積とアポトーシ

スの観察 26

Fig. 10. 播種結節に対する抗癌剤の腹腔内投与、静脈投与におけるイメ

ージ 34

序文

腹膜転移は胃癌や卵巣癌において最も多い転移形式、再発形式のひとつであり、その頻度は 38%～46%と報告されている[1-4]。腹膜播種が進行すると、横隔膜や大網に豊富に存在するリンパ管開口部に腫瘍細胞が付着し、占拠することによって腹水のドレナージを阻害する。結果として腹水貯留を引き起こし、いわゆる「癌性腹膜炎」をきたす。また、腹膜播種は腸管の癒着による腹部膨満、食欲不振、腹痛、腸閉塞などをきたすため、苦痛を伴い、患者の QOL を著しく低下させる[4]。腹膜播種の治療は進行胃癌の治療の中で最も重要な位置を占めていると考えてよい。

腹膜播種に対しては、これまでさまざまな治療法が施行されてきたが、依然として満足できる奏功は認められておらず、いまだに標準というべき治療法は存在しない。進行胃癌に対する全身化学療法は、5-FU や cisplatin を基本とした治療が広く行われている[5]。現在、進行胃癌に対する標準全身化学療法とされている TS1+cisplatin において、進行再発胃癌患者全体の Median Survival Time (MST)は 13 ヶ月とされているが、その中で腹膜播種を有する患者の割合、その予後については明らかにされていない[6]。胃癌の播種患者のみを対象とした臨床試験は比較的少なく、5-FU と cisplatin の全身投与では患者の 27%で腹水の改

善を認めたが、Overall Survival(OS)は4.6ヶ月であるとされている[7]。また、5-FUとMethotrexateの全身投与でもMSTは5.2ヶ月と報告されており[8]、腹膜転移に対する全身化学療法ではその効果は限られている。その原因は、いわゆるperitoneal-plasma barrierが血管内から腹腔内への効果的な薬剤移行を妨げていることによるものと考えられている[9, 10]。一方、全腹膜切除や腹腔内温熱化学療法（HIPEC）などの積極的治療法も、1989年にSugarbakerによるCytoreduction+HIPECの併用の報告[11]、本邦での1994年の藤村による全腹膜切除の報告[12]以来、いくつかの報告がある。しかし、MSTはそれぞれ11-19ヶ月[13, 14]、19-21ヶ月[15, 16]とされており、全身化学療法と比較すると生存期間はやや延長しているような印象はみられるものの、治療に伴う合併症率と死亡率の高さが現実的な問題として残り、広く普及するには到っていない。

腹腔内化学療法は、抗癌剤を腹腔内に直接投与することにより播種結節に高濃度の薬剤を直接接触させることが可能であるため、胃癌に対しても古くから臨床応用されてきた。しかし、腹膜播種患者に対するCisplatinとMitomycin Cなどの腹腔内投与では、腹水の改善はみられるものの明らかな予後の延長は認められなかった[17, 18]。一方、近年の欧米の臨床試験にて、卵巣癌の腹膜播種に対してcisplatinとPaclitaxel(PTX)の反復腹腔内投与法が全身化学療法と比較し有意にMSTを延長させた事実が報告され(66ヶ月 vs. 50ヶ月)ている[19]。播種

を有する卵巣癌の推奨レジメンとして認知されるようになり[20]、播種治療における腹腔内化学療法の意義が再認識されるようになってきた。事実、胃癌の腹膜転移に対しても、全身化学療法に PTX の腹腔内投与を加えた治療が良好な臨床効果を見せている[21-23]。この理由として、PTX という薬剤は高い分子量と疎水性という分子特性から、腹腔内に投与された後は緩徐に吸収され、長時間腹腔内に停留する性質があることによると推定されている[24, 25]。また、血中に緩徐に移行することにより、全身への有害事象は軽微であることもその利点と考えられる[26, 27]。

しかし、PTX の腹腔内投与において、実際に PTX が播種巣内へどれくらい浸透し、どのような分布を示すのか？また、静脈投与時の薬剤分布とどのように違うのか？などについての根本的疑問は十分に解明されてはいない。放射線標識 PTX や蛍光色素を用いた癌細胞の multi-layered cell culture (MCC)への浸透を評価した過去の報告では、PTX は腫瘍表面から 60-150 μ m 程度の距離まで浸透しうると記載されている[28, 29]。その結果からすると、1mm に満たない微小結節では、腹腔内投与により腫瘍表面から薬剤が腫瘍結節全体に浸透するため大きな効果が期待できるが、大型結節では深部まで浸透しえないため、腹腔内投与のみでは十分な腫瘍抑制効果が得られないことが予想される。また、静脈内投与との薬剤分布の違いについては、Rat 腹膜播種モデルに対する cisplatin の腹腔

内投与が、静脈投与時の約 2 倍の腫瘍内濃度をもたらすとの報告がある[30]。しかし、PTX に関するデータはなく、腹腔内投与時の他の腹腔内正常臓器における薬剤分布については詳細に記載された文献は存在しなかった。

そこで、本研究においては、蛍光色素である Oregon green にてラベルした PTX (OG-PTX) を使用して、静脈投与後と腹腔内投与後それぞれの腹腔内結節と肝臓、腎臓における PTX の具体的な分布と腫瘍血管との関連の経時的変化を検討し、ドラッグデリバリーの観点から、腹腔内化学療法 of 臨床的有用性を考察した。

PTX は高い疎水性のため、実臨床ではポリオキシエチレンヒマシ油(Cremophor EL)と無水アルコールの混合物を溶媒として溶解されたものである Taxol®が使用されている。Cremophor EL には、副作用としてアナフィラキシー性の過敏反応の発現を認めることがある。そのため、PTX を投与する場合は、副腎皮質ステロイドとヒスタミン拮抗薬を前投与する必要があるが、それでも一定の比率で過敏反応が出現し、そのうち 1~3%は重篤な反応がみられるとの報告がある[31, 32]。そこで、本研究では生態適合性に優れた単量体である 2-メタクリロイルオキシエスチルホスホコリン(MPC)と疎水性の単量体であるメタクリル酸 n-ブチル(BMA)の共重合体である PMB-30W を用いて PTX を溶解し、高分子ミセル製剤である PTX-30W を作成した。PMB-30W は水溶性かつ両親媒性ポリマーであり、約 50nm の PTX のナノパーティクル PTX-30W を自発的に形成するこ

とができる[33, 34]。MPC コポリマーのうちで PMB30W は、70mol% の BMA ユニットを含むものである。疎水性のユニットが多いにもかか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、疎水性物質を最も安定化して内包することができる。5mg/ml の高濃度の PTX を PMB30W 水溶液中に長期にわたり、最も安定して可溶化できるため、PTX のナノ製剤として、適していると考えられる。過去の報告において、マウスの胃癌腹膜転移モデルに対し、PTX-30W を腹腔内へ投与した結果、Cremophor EL を溶媒とした Taxol®と比較して、腹膜結節中により深くまで浸潤し、高濃度の PTX を認め、腹膜転移の成長を抑制し、生存を延長させた[35]。しかし、腹膜播種に対する PTX-30W の腹腔内投与後と静脈投与後の薬剤分布やその経時的変化の観察、Taxol®との実際の浸透距離の比較については、いまだ検討されていなかった。本研究でこの薬剤の腹腔内投与後の動態を把握することにより、PTX-30W を用いた腹腔内化学療法の臨床応用の可能性を模索した。

1. 背景と目的

過去の研究において、胃癌、卵巣癌の腹膜播種に対する PTX の腹腔内投与は、全身化学療法に比べ、より高い有効性を示している[19-21]。その要因として、腹腔内投与時では、腫瘍結節への吸収が血流のみならず、薬剤の腫瘍結節に対する直接浸透による抗腫瘍効果があると考えられる。しかし、PTX 腹腔内投与後の組織浸透性については不明な点が多い。腫瘍内では、秩序のない腫瘍血管や機能的リンパ管の欠如により、毛細血管の透過性亢進とリンパ液のドレナージ障害を起こし、結果として正常組織と比較して血管周囲での間質圧が増加する[36-38]。さらに、透過性が亢進した血管からのフィブリノーゲン漏出やコラーゲンの堆積が高密度の細胞外基質を形成することにより、抗癌剤の分布を妨げているといわれている[38]。過去に、マウス乳癌やヒト前立腺癌に対しドキソルビシンを静脈投与し、腫瘍血管とともに薬剤の蛍光を観察した文献が報告されている[39, 40]。これらの研究では、血管周囲に薬剤が分布していることが確認されている一方、自然蛍光を利用しているため、蛍光強度が弱く、長時間の経時的変化が見られなかったとしている。本研究では、この欠点を補うべく Oregon green にて標識された PTX を使用し、より強度な蛍光下で腹腔内投与時と血管内投与時の PTX の薬剤分布を蛍光顕微鏡にて観察した。そして、薬剤の

分布状況とその経時的変化、腹膜結節と腹腔内の正常臓器である肝臓や腎臓における違いなどについて比較検討した。さらに、PTX の腹腔内投与時と静脈投与時における、腫瘍血管の解剖学的関連性、薬剤浸透後の腫瘍組織の変化を観察することとした。

2. 実験方法

2.1.材料

蛍光色素を結合させた PTX である Oregon green-conjugated 488 PTX (OG-PTX) は Molecular Probes 社(Portland, OR, USA)より、Cremophor EL は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) より、無水エタノールは和光純薬工業社(Osaka, Japan)より購入した。Rat Anti – Mouse platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) monoclonal 抗体は BD Bioscience (Franklin Lakes, NJ, USA)より、Alexa Fluor 594 goat Anti - Rat IgG、Hoechst 33342 は Molecular Probes 社(Portland, OR, USA)より、DAPI は Sigma-Aldrich 社(St. Louis, MO, USA)より購入した。Blocking One はナカライテスク社(Kyoto, Japan)より購入した。

2.2 細胞培養

ヒト胃癌細胞腹膜播種株 MKN45P を用いた。MKN45P は理研細胞開発銀行(つくば) より入手したヒト胃癌細胞株 MKN45 を培養し、これをヌードマウスの腹腔内に接種し、播種層を採取した。その後継代を繰り返し、同様に再接種をすることで、高頻度に播種層を形成する亜株を作成したものを使用した[41]。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, Tokyo)培養液で、37℃、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 PTX-30W および PTX-Cre

2-メタクリオ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学科の石原一彦教授より供与を受けた[33, 34]。ポリマーの分子量は約 50KDa である。50mg の PMB-30W を、10mL の蒸留水に溶解し、5%溶液とした。過去の文献では、ヌードマウスにおいて抗腫瘍効果を示す PTX 投与量は、腹腔内投与、静脈投与とも 20mg/kg-40mg/kg とされている[42, 43]。本研究では蛍光色素を観察できる投与量としていずれも 5mg/kg とした[35]。

PTX-30W は、OG-PTX を無水エタノールと 5% PMB-30W と PBS に溶解して作成した。対象となる PTX-Cre の溶媒には、実臨床で Taxol®の溶媒として使用されているポリオキシエチレンヒマシ油(Cremophor EL)と無水エタノールの混合液(1:1, V/V)を使用し、OG-PTX を溶解した。静脈投与では総量 100 μ l に、腹腔内投与では総量 1ml にした。

2.4 蛍光顕微鏡による腹膜結節および肝臓、腎臓における PTX の分布の観察

4 週齢雌の BALB/c ノードマウスは Charles River Japan, Inc. (Yokohama, Japan) より購入した。5 週齢のノードマウス 60 匹に対し、 3.0×10^6 個の MKN45P を 1ml の PBS に懸濁させ、腹腔内に注入した。MKN45P の腹腔内注入後 21 日目に、PTX-30W 溶液を 30 匹ずつ、静脈投与および腹腔内投与した。静脈投与、腹腔内投与の 1 時間、24 時間、48 時間後に 10 匹ずつそれぞれ犠牲死させて、腸間膜の播種結節と肝臓、腎臓を摘出した。標本は、4℃下にて 10%ホルマリンに 1 時間固定した後、脱ホルマリンのため 10%スクロースに 1 時間、15%スクロースに 1 時間、20%スクロースに一晩浸透させた。それを、O.C.T. compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) に包埋し、アセトンとドライアイスで冷却した n-ヘキサンにて急速凍結した。標本は、蛍光顕微鏡観察まで -80℃にて凍結保存した。観察時は、10 μ m の凍結切片にし、蛍光実体顕微鏡(BZ8000; Keyence, Osaka, Japan)を使用した。OG-PTX は励起波長 480nm、蛍光波長 510nm にて緑色の蛍光色素として観察され、いずれの写真も露光時間 5 ミリ秒、ISO 感度 200、コントラスト補正 OFF で撮影した。

2.5 浸透距離の測定

前述のノードマウス腹膜播種モデルに対し、PTX-Cre、PTX-30W を腹腔内投与し、1 時間、24 時間、48 時間後に犠牲死させた。それぞれの群において、10

匹のマウスからそれぞれ 1 個ずつ、合計 10 個の約 3-5mm 大の結節を選んだ。バックグラウンドと比較し、明らかに強く染色されている領域で、最も深い位置から腫瘍表面までの距離を測定し、mean±SD を PTX-30W と PTX-Cre それぞれで計算した。

2.6 内皮細胞の免疫染色

血管を検出するために免疫染色を行った。まず、凍結切片をマグネシウム、カルシウム含有 PBS にて 3 分間、3 回洗浄した。一次抗体として、Blocking One で 200 倍希釈した Rat Anti – MousePECAM-1monoclonal 抗体を使用し、60 分間、室温にて反応させた。その後 PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。続いて Blocking One で 200 倍希釈した Alexa Fluor 594 標識の 2 次抗体を 60 分間、暗所、室温にて染色し、PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。対比染色として、細胞核を DAPI にて染色した。10000 倍希釈の DAPI で暗所、室温にて 2 分間染色した後、PBS(+)にて 3 分間、3 回洗浄した。最後に、マウント液にて固定した。蛍光実体顕微鏡 (BZ8000; Keyence, Osaka, Japan)を使用し、PECAM-1 と DAPI はそれぞれ、赤色および青色として観察された。

2.7 アポトーシスの観察

2.5 と同様に血管を免疫染色した後、細胞核を Hoechst 33342 を使用して染色し、蛍光実体顕微鏡にてアポトーシスを観察した。

2.8 統計分析

Student's t test にて統計分析した。結果は平均値±標準偏差として示され、P 値は 0.05 未満を有意差とした。

3. 結果

3.1. 腹膜結節と肝臓、腎臓における静脈投与後の PTX の分布

腹腔内転移結節における PTX-30W の局所分布を調べるため、Oregon green を結合させた PTX (OG-PTX)を 5% PMB30W 溶液に溶解し、腹膜転移マウスに対し静脈投与および腹腔内投与を行った。Fig. 1. A-C に示すように、静脈投与 1 時間後では、腹膜結節内には OG-PTX はほとんど検出されなかった。24 時間後には結節内に弱い蛍光を観察することができたが、48 時間後には明らかに減少していた。次に、腹腔内の正常臓器における薬剤分布を調べるため、同じマウスの肝臓と腎臓を評価した。Fig. 1. D-F に示すように、静脈投与 1 時間後には、肝臓内に明るく均一な緑色蛍光が観察され、次第に蛍光量は減少したが、静脈投与 48 時間後においてもまだ有意な OG-PTX を観察することができた。腎臓においても同様に、1 時間後には全体に明るく均一に染色され(Fig. 1. G)、48 時間後にはやや蛍光強度の減退を認めるものの、腹膜結節に比較して明らかに強度に染色されていた(Fig. 1. I)。この事実は、多量の OG-PTX が 1 時間以内に容易に正常臓器に移行し、肝、腎実質内に分布し、時間的経過とともに正常臓器内の濃度が低下することを示している。また、静脈投与時に正常組織に暴露される OG-PTX の総量は播種組織よりも明らかに多いことを示していた。

静脈投与

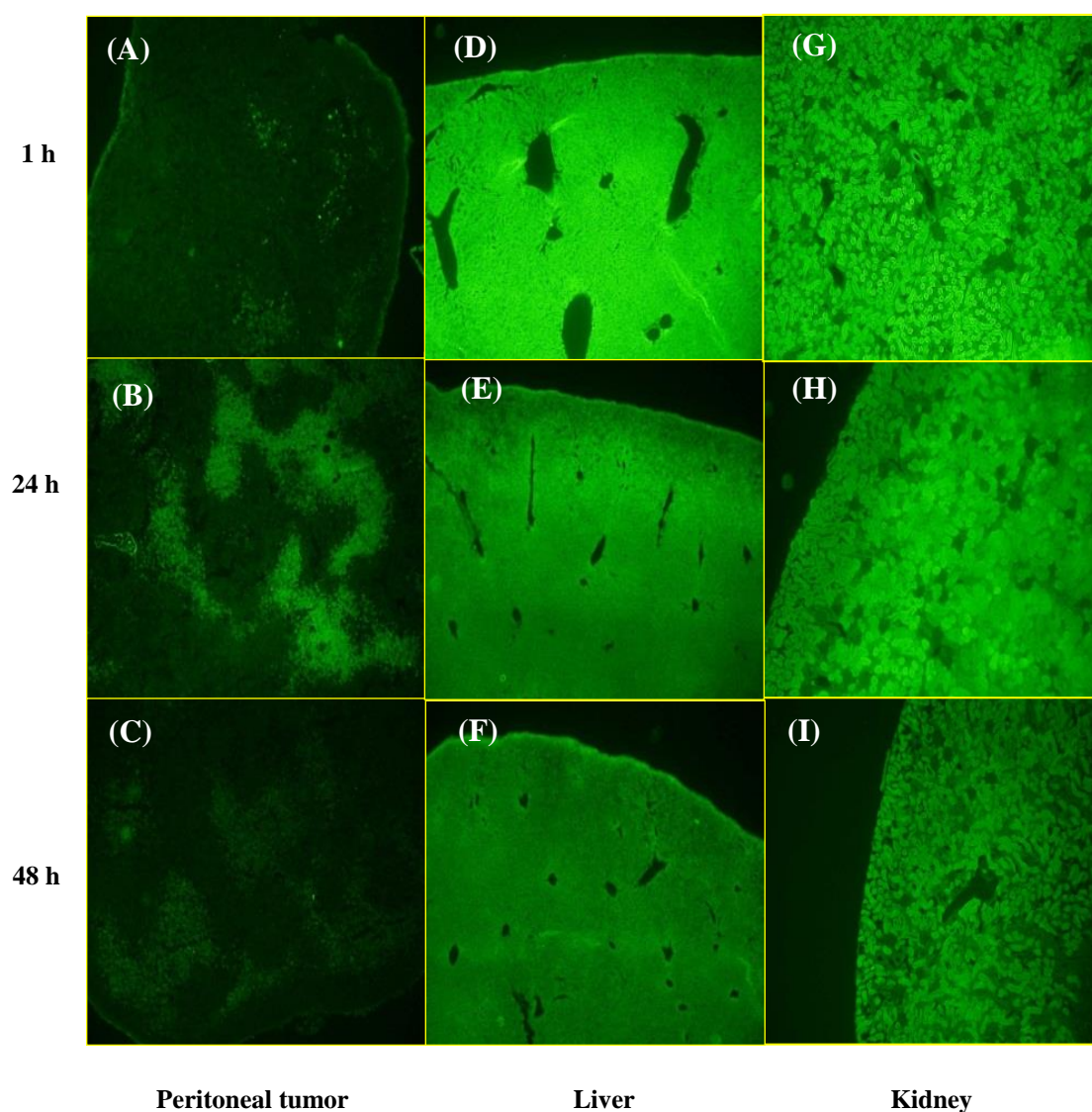


Fig. 1. 胃癌腹膜播種モデルへのOG-PTX 静脈投与後における腹膜結節と肝臓と腎臓への集積パターン

腹膜結節において、静脈投与では 24 時間後で弱く染色され(B)、48 時間後では明らかに減少していた(C)。正常臓器において、肝臓では 1 時間後で全体に強く染色され(D)、48 時間後では減退していたがまだ染色が残存していた(F)。腎臓でも 1,24 時間後で全体に強く染色され(G,H)、48 時間後でも減退していたが、染色が残存していた (I)。

3.2. 腹膜結節と肝臓、腎臓における腹腔内投与後の PTX の分布

静脈投与と比較すると、OG-PTX の腹腔内投与 1 時間後には、腹膜結節の表層部に明らかに高濃度の OG-PTX を検出することができた(Fig. 2. A)。また、緑色に強く染色されている範囲は、時間経過とともに次第に広がっていくことが観察され、24 時間後においては腫瘍の表層部に限られていたが、48 時間後にはより深くまで観察することができた(Fig. 2. A-C)。一方、肝臓に腹腔内投与された OG-PTX の分布は、明らかに腹腔内結節と異なっていた(Fig. 2. D-F)。腹腔内投与 1 時間後では、肝臓内が強く染色されており、静脈投与時よりも濃度は薄かったものの静脈投与と似た分布を示していた。しかし、腹腔内投与 24 時間後では、表層にやや強めの染色を認めるものの、明らかに全体の濃度は減少し、48 時間後にはほとんど観察することができなかった。24~48 時間後における肝臓内の OG-PTX の分布は、Fig. 2. E,F に示すように、明らかに腹膜結節より少量であることが示唆された。腎臓においては、1 時間後に腹膜結節と比較し均一に強い染色がみられたが、48 時間では明らかに減弱していた(Fig. 2. G-I)。どの時間帯においても、肝臓、腎臓ともほぼ一様に染色されており、部位に特徴的な染色の濃淡の差は見られなかった。

腹腔内投与

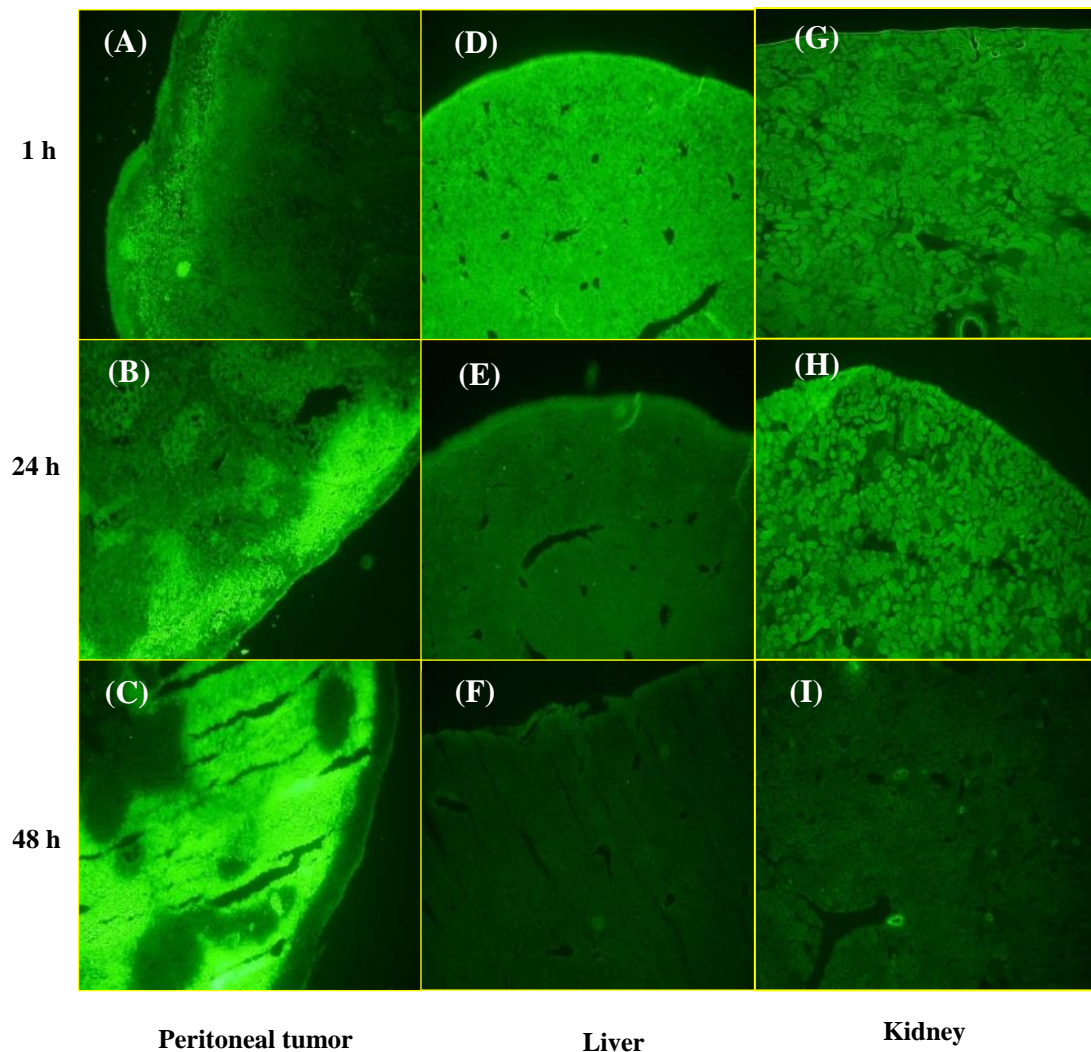


Fig. 2. 胃癌腹膜播種モデルへのOG-PTX腹腔内投与後における腹膜結節と肝臓と腎臓への集積パターン

腹膜結節において、腹腔内投与では1時間後より染色され(A)、48時間後にはさらに深部まで強く染色された(C)。正常臓器である肝臓では、1時間後で全体に強く染色されたが(D)、24,48時間後には腹膜結節に比べ明らかに少量であった(E,F)。腎臓では、1,24時間後で染色されるが(G,H)、48時間後には肝臓と同様に腹膜結節と比べ明らかに少量であった(I)。

蛍光顕微鏡による腫瘍の染色強度を客観的に評価する目的で、中心で切離したいくつかの腹膜播種層の切片を用いて画像解析を行った。すると、OG-PTX の静脈投与と腹腔内投与の間で、その分布は明らかな違いを見せた。Fig. 3 に示すように、静脈投与の 24 時間後では、腫瘍の内部に若干の濃淡の差が見られるが、その分布は腫瘍によって異なっており、一定の傾向は認めなかった。しかし、腹腔内投与の 24 時間後では、すべての腫瘍で辺縁部が濃染され、内部へいくにつれ蛍光は減弱していた。Fig. 2. A-C での時間経過とともに腫瘍表面からの緑色蛍光が広がっていく結果と併せると、OG-PTX の腹腔内投与では、主に腫瘍表面からの直接浸透により結節内に移行し、徐々に浸潤していることを明確に示していると考えられた。

次に、前述の画像解析システムを用いて、OG-PTX の腹腔内投与時における腹膜結節内の浸透距離を客観的に測定した。バックグラウンドと比較し明らかに強く染色されている領域において、最も深い位置から腫瘍表面までの距離を測定し、経時的な薬剤移行を検討した。Fig. 4 に示すように、PTX-30W の浸透距離は 24 時間後では約 500 μ m、48 時間後には約 1 mm に達していた。一方、Cremophol EL 溶解の PTX にて同様の方法で調べた時の浸透距離は、24 時間で約 100 μ m、48 時間で約 200 μ m であり、PTX-30W に比べて有意に短かった。(p<0.01)

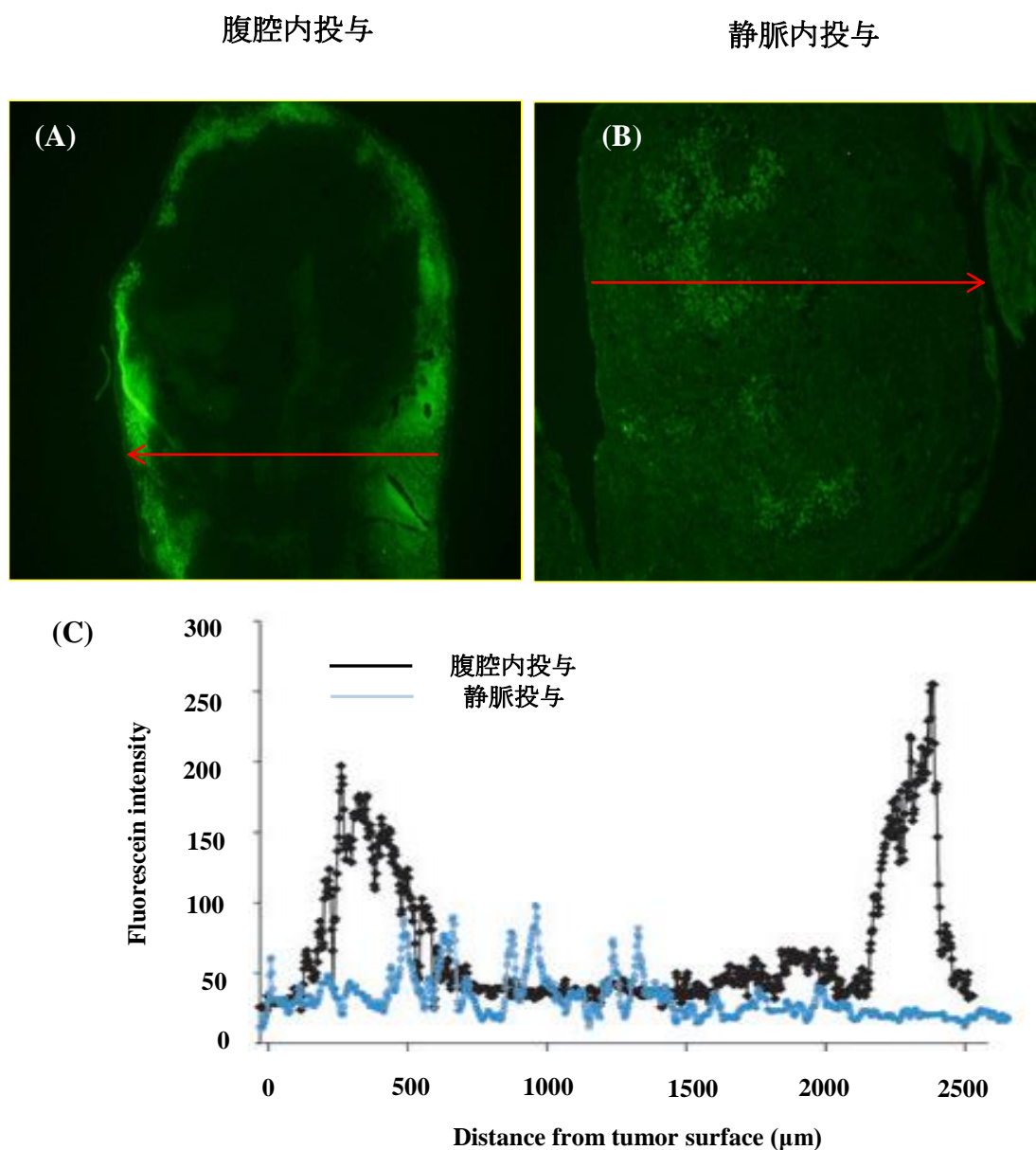
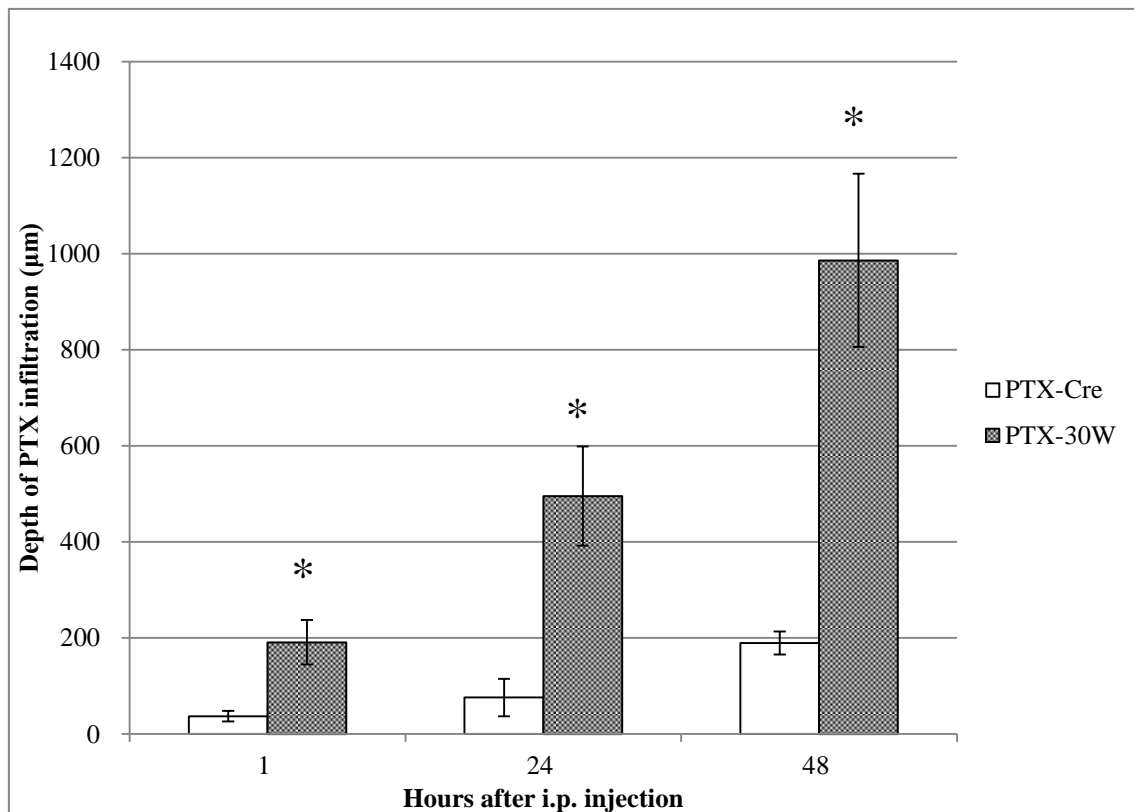


Fig. 3. OG-PTX の腹腔内投与および静脈投与 24 時間後の腹腔内腫瘍における腫瘍内蛍光強度

OG-PTX がバックグラウンドと比較し明らかに強く染色した領域において、腫瘍表面から最も深部へ浸透しているラインを腹膜腫瘍断片に赤矢印で示した。(A: 腹腔内投与, B: 静脈投与)。赤線上で蛍光強度を測定、プロットし、経時的な薬剤移行を観察した。腹腔内投与では、結節辺縁で濃染され、内部にいくにしたがい蛍光強度は減弱する(C)。



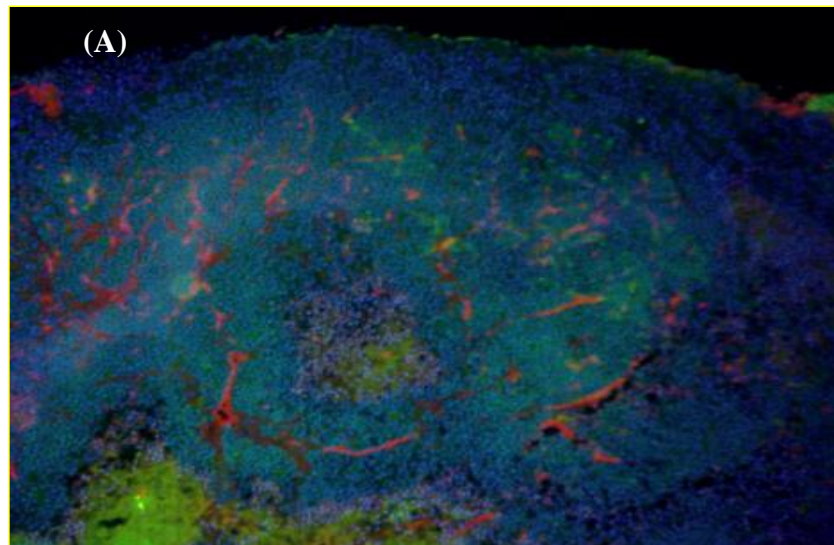
* P < 0.01

Fig. 4. 腹膜結節に対する溶媒の違いによる OG-PTX 直接浸透距離の比較

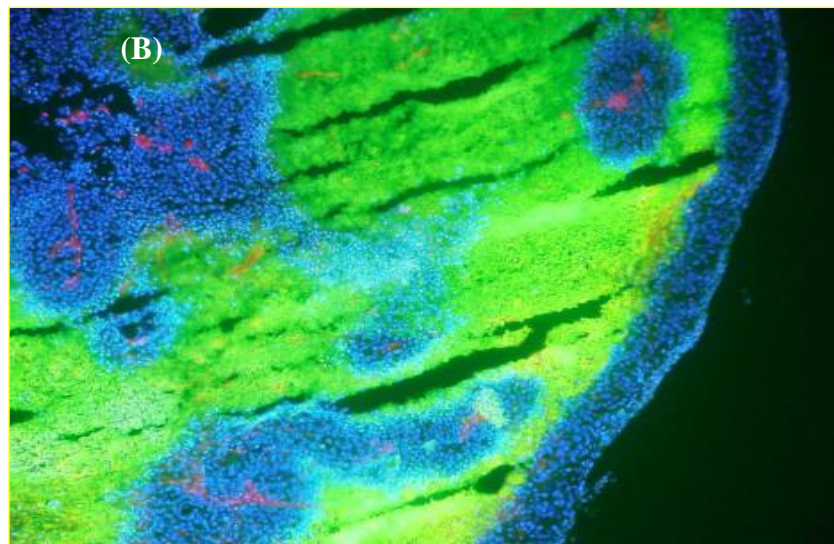
PTX-30W は PTX-Cre と比較し、腹腔内投与後には腹膜結節内により深く浸透する。浸透の深さは、それぞれの群において、10 匹のマウスから 1 個ずつ、合計 10 個の約 3-5mm 大の結節を選んだ。mean±SD を PTX-30W と PTX-Cre それぞれで計算した。いずれの時間においても、P<0.01 であった。

3.3. 腹腔内投与された PTX は主に腫瘍の無血管領域に分布する

播種巣内の PTX の分布状況を検討するために多重染色を施行した。OG-PTX は、静脈投与 24 時間後で、PECAM-1 によって赤く染色される腫瘍血管周囲に緑色の蛍光色素として観察された(Fig. 5. A)。一方、OG-PTX の腹腔内投与 48 時間後では、腹膜結節の表層から深部にかけて強い緑色蛍光が認められたが、OG-PTX が均等には蓄積されず、Fig. 5. B のように腫瘍血管を中心とした楕円状の領域において緑色蛍光が欠如していた。この傾向は、腹腔内投与 1 時間後、24 時間後では目立たず、時間経過とともに認められるものであることがわかった(Fig. 6)。また、PTX が強く染色される部位では、24 時間、48 時間で DAPI が染色されておらず、細胞死をおこしていると考えられた。一方、正常臓器における分布をみると、静脈投与では肝臓、腎臓ともに瀰漫性に強い緑色の蛍光染色を認めた (Fig. 7. A,B)。また、腹腔内投与でも静脈投与ほど強度ではないものの、静脈投与と同様の瀰漫性集積を認め、腹膜結節の場合とは対照的な結果であった(Fig. 7. C,D)。



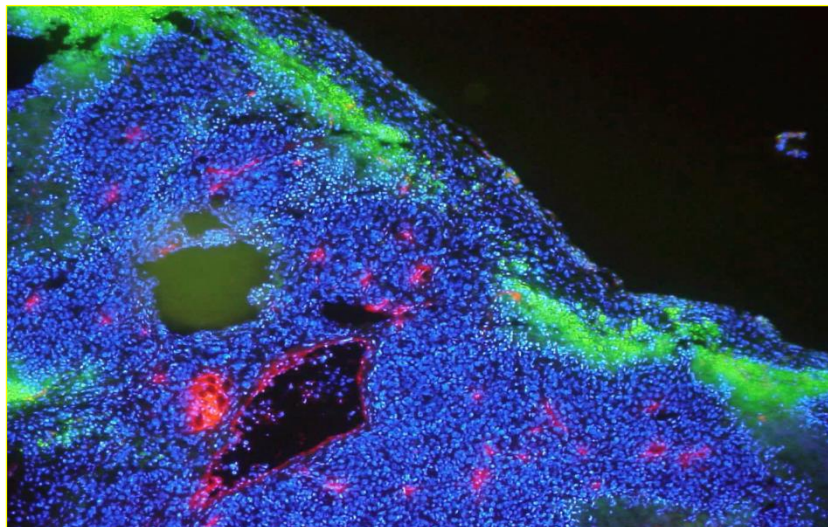
i.v.



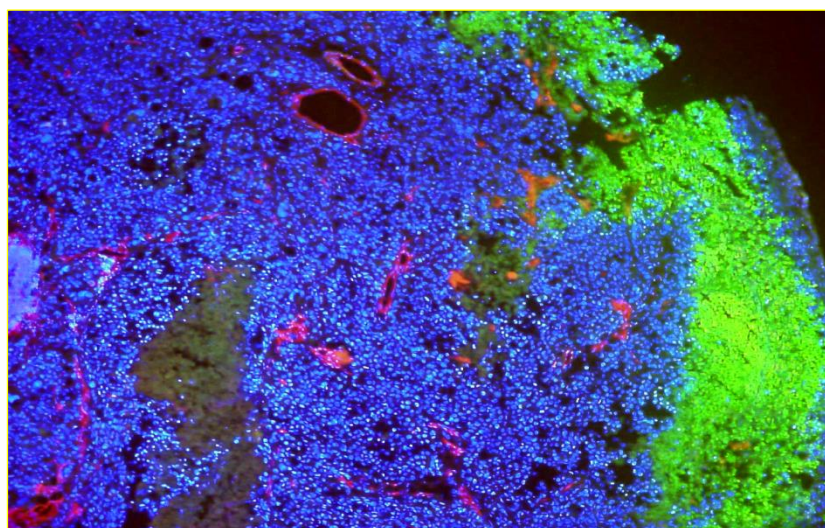
i.p.

Fig. 5. 腹膜播種に対する OG-PTX 静脈投与後、腹腔内投与後 48 時間の蓄積パターンと血管との関係

腹膜結節は OG-PTX の静脈投与 48 時間後(A)、腹腔内投与 48 時間後(B)で切除した。そして、血管は anti-PECAM-a mAb にて赤色に染色し、核は DAPI によって青色に染色した。(A)では緑に染色される OG-PTX の大部分は PECAM-1 陽性領域に認められたが、(B)では PECAM-1 陰性領域に強く検出され、PECAM-1 陽性血管周囲には OG-PTX の集積を認めなかった。



1h



24h

Fig. 6. 腹膜播種に対する OG-PTX 腹腔内投与後 1 時間、24 時間の蓄積パターンと血管との関係

OG-PTX 腹腔内投与後 1 時間、24 時間では PECAM-1 陽性血管周囲への OG-PTX の集積への欠如は顕著ではなかった。

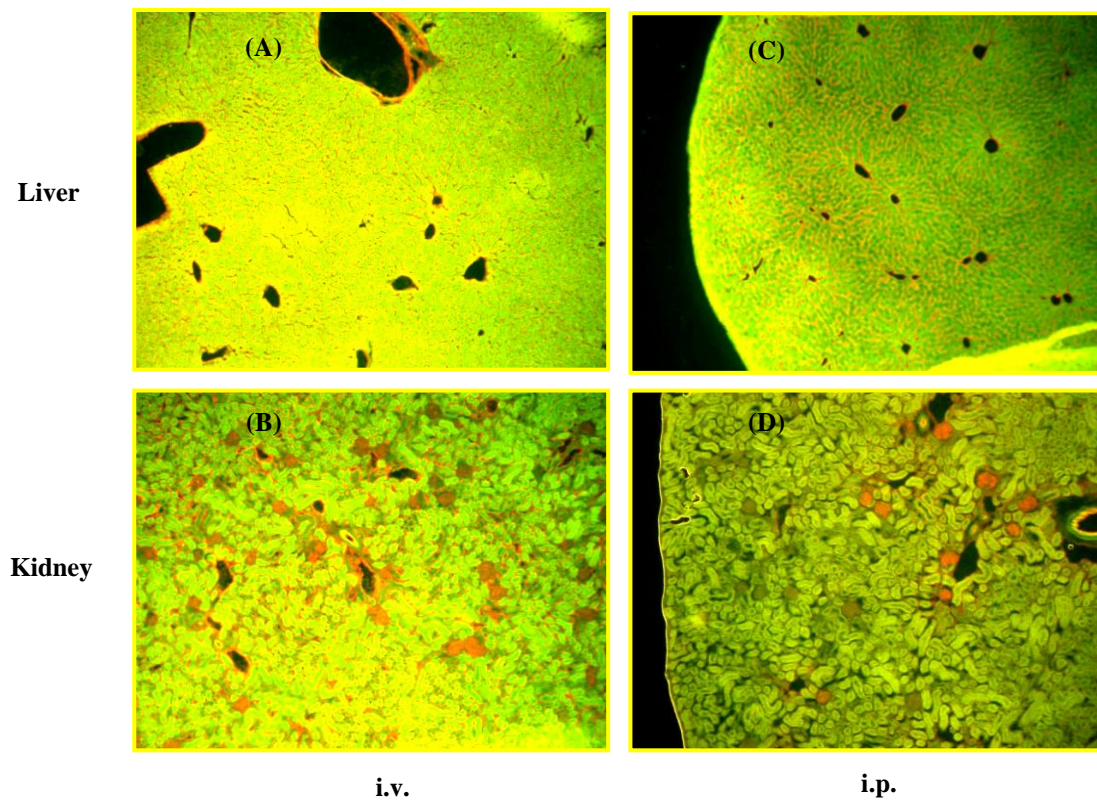


Fig. 7. 肝臓、腎臓に対する OG-PTX 静脈投与後、腹腔内投与後の蓄積パターンと血管との関係

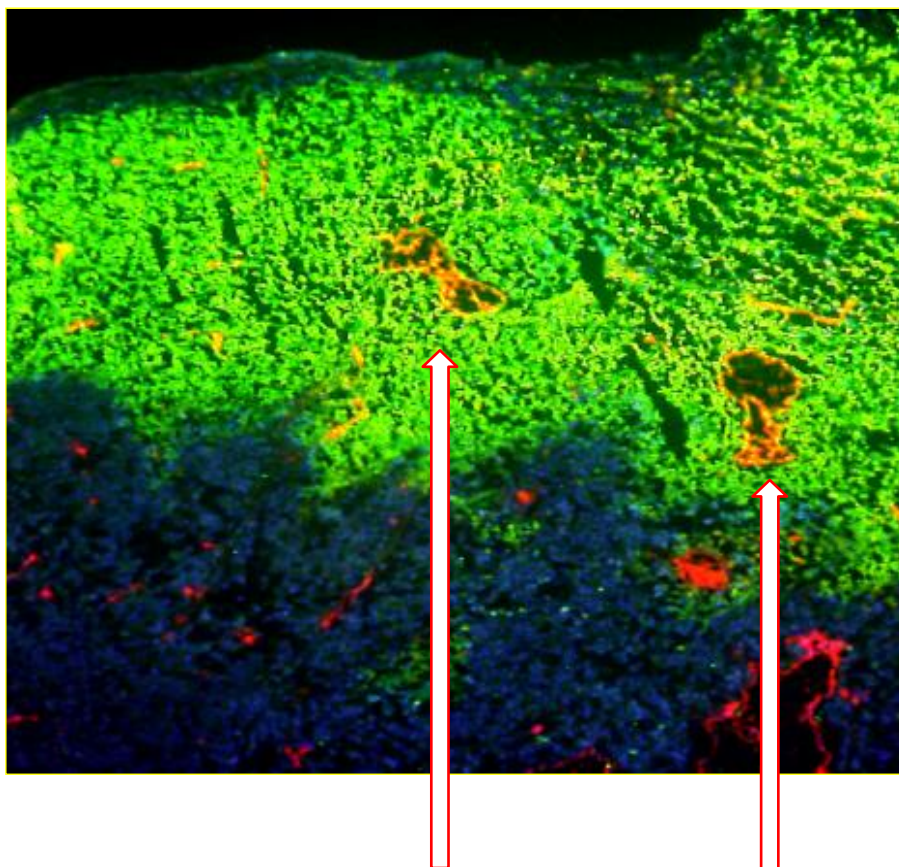
肝臓、腎臓においては OG-PTX の静脈投与 1 時間後で切除した。血管は anti-PECAM-a mAb にて赤色に染色した。正常臓器に対する静脈投与では、肝臓、腎臓ともに PECAM-1 陽性領域を中心に強い緑色の染色を認めた(A,B)。また、腹腔内投与では、静脈投与ほど強度ではないものの、PECAM-1 陰性領域に比べ、血管周囲への強い集積が認められた(C,D)。

3.4. ex vivo における PTX の播種巣内分布

次に、腹腔内投与後の OG-PTX の集積パターンが in vivo に特異的な現象であるかどうかを確認する目的で、切離した播種巣を OG-PTX 溶液に浸して OG-PTX の播種層内分布を観察した。Fig. 8 に示すように、この条件下では腫瘍表面からの OG-PTX の浸透はほぼ均等であり、腫瘍血管周囲の緑色蛍光の欠如は見られなかった。このことにより、腹腔内投与における播種組織への OG-PTX の特徴的な集積パターンは in vivo でのみ観察されることがわかった。

3.5. 高濃度の PTX はアポトーシスを誘導する

最後に、腹腔内投与後の播種巣内の腫瘍細胞の状態を検討するために、Hoechst 33342 にて染色した。PTX が集積している領域周囲の多くの腫瘍細胞では、中央部の細胞と比べて明るく染色され凝縮した形態の核が認められたため、これらの癌細胞がアポトーシスを引き起こしていることが示唆された(Fig. 9)。また、PTX の集積している部位の多くでは、Hoechst 33342 が欠如しており、アポトーシスを起こした結果、細胞死を起こしたと考えられた。



血管（赤色）周囲にも OG-PTX（緑色）を認める

Fig. 8. 切除後の播種結節に OG-PTX 溶液を浸した時の集積パターン

切除された腫瘍内には、OG-PTX は血管に関係なく均等に浸透した。腹膜結節は、切除後 24 時間 OG-PTX を含む溶液に浸し、固定した。OG-PTX は PECAM-1 陽性領域にも集積した。

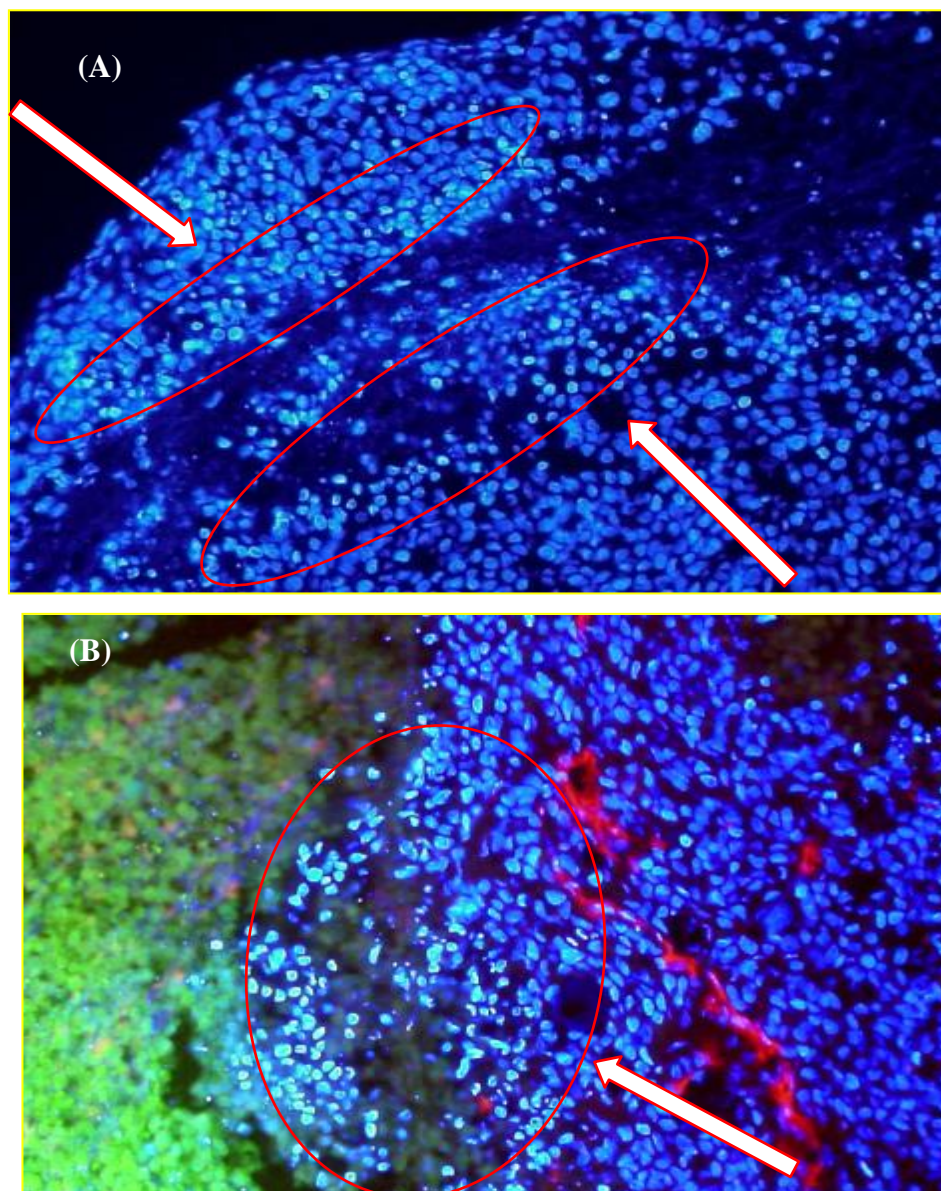


Fig. 9. 播種結節に対する腹腔内投与後のOG-PTXの集積とアポトーシスの観察

腫瘍細胞のアポトーシスは、PTX の集積した領域付近に存在した。腹膜腫瘍は PTX-30W の腹腔内投与 24 時間後に切除し、核は Hoechst 33342 にて染色された (×200) (A)。核の染色を OG-PTX で染色された緑色部位に重ね、anti-PECAM-1 にて腫瘍血管を赤色に染色した(×400) (B)。アポトーシスを起こしている核は、Hoechst33342 にてより明るく染色された (赤丸)。

考察

近年、癌に対するナノ粒子化製剤の有用性が指摘されてきている。一般に、抗癌剤をナノ粒子に封入することにより、薬物を選択的に癌組織内に到達させ、副作用を軽減し、効果的に薬効を発揮させることができる。これは、**enhanced permeability and retention (EPR)**効果によるものと考えられており、腫瘍周囲の新生血管は、正常血管に比べ血管内皮細胞に間隙が存在するため、正常血管では透過しない高分子薬剤が、腫瘍では組織内へと透過する。また、血管の増生に見合ったリンパ回収系の増生が少ないため、一旦腫瘍組織に漏出した高分子物質はその場に留まりやすいというものである[44-46]。一方、腹腔内投与時の薬物吸収動態において、腹膜からの吸収には、腹膜下の毛細血管系を介するルートとストーマタや乳斑というリンパ系組織を介するルートが考えられている。腹膜は血管内膜層に比べ疎であり、比較的小さな水溶性分子は自由に透過できるため、抗癌剤を腹腔内に投与しても、腹腔内に長時間滞留させることは困難である。高分子ミセル製剤は腹膜や毛細血管を通過することが困難であり、これらの物質はリンパ系を介した経路にて吸収される。リンパ系への吸収は非常に緩やかなため、長時間腹腔内滞留を可能にできる。また、ストーマタや乳斑は腹膜転移の初期の主な転移巣であり、この部位において選択的に長時間高濃度

の抗癌剤を作用させることができると考えられる[47]。

我々のグループにおける過去の研究で、PMB-30W に組み込まれた PTX の腹腔内投与はマウスモデルにおいて強い播種抑制効果を示し、それは PTX が播種結節内に高濃度に蓄積することに起因することが証明された[35]。そこで、本研究においては、蛍光色素によりラベルされた OG-PTX を *in vivo* に投与し、一定時間後に切除、腫瘍の組織切片を作成し、蛍光顕微鏡でその組織を観察することにより、静脈投与後と腹腔内投与後の PTX-30W の播種層内分布の違いを比較検討することにした。実際に、PTX-30W を腹腔内投与した場合、静脈投与後とは明らかに異なった腫瘍結節内薬剤分布を示すことが判明した。蛍光顕微鏡で観察すると、OG-PTX は静脈投与 24 時間後、播種結節の内部、主に腫瘍血管の周囲に淡く集積していた。この結果は、過去の研究においてドキソルビシンの静脈投与後の血管周囲への薬剤の集積（蛍光強度の半減距離は $40\text{-}50\ \mu\text{m}$ ）と一致していたが、その検討ではドキソルビシンの持つ自然蛍光を利用していたため、経時的变化は観察されていなかった[39, 40]。しかし、本研究では腹腔内結節における蛍光強度は、肝臓や腎臓と比較すると、48 時間までのどの時間においても明らかに微弱であることが判明した。この結果は、少なくとも 48 時間までの間では、腹腔内投与時の方が静脈投与時よりも血中濃度が低いことを示している。PTX-Cre を用いて腹腔内投与時と静脈投与時の血中濃度を比較した過去

の論文では、24 時間後以降において、腹腔内投与時の方が静脈投与時よりも血中濃度が高いと報告されている[48]。これは、PTX-30W が PTX-Cre よりも、腹腔内から血中への移行が緩序であることを表しており、高分子ミセル製剤の利点の一つであると考えられる。これに対して、腹腔内投与 1 時間後では播種結節の表層部に高濃度の PTX の集積を認め、少なくとも 48 時間後までは播種巣内の PTX 集積の範囲は拡がりを見せていた。また、播種巣内の蛍光強度は同じ腹腔内に位置する肝臓や腎臓よりも明らかに強く、本薬剤の腹腔内投与は結果として正常組織より播種巣内に優先的に蓄積していることが示唆された。今回使用された OG-PTX は、一度結合した微小管から離れる際、蛍光色素と PTX が別々に分らずに分離することが示されている[49]。すなわち、臓器内で PTX と蛍光色素が分離し、蛍光色素のみ臓器に残存しているわけではないことを示している。この事実はドラッグデリバリーの観点からみて、本薬剤の腹腔内投与の大きな利点であると考えられた。

実際の播種巣内に検出された蛍光は、投与直後はその周辺部分にのみ観察され、時間とともに深部に浸透しており、48 時間後の腫瘍結節内の PTX-30W の深さは、腫瘍結節表面からは約 1mm まで達していた。一方、PTX-Cre の浸透距離は 200 μ m 程度で、過去の *in vitro* の研究において 60-150 μ m に限られると示した報告とほぼ同等であった[28, 29]。また、24 時間後における PTX-Cre と

PTX-30W の比較では、過去の報告と同様の傾向を認めていた[35]。これらの結果より、PTX-30W は PTX-Cre と比較し、有意に深部へ達しており、PMB-30W を用いたナノミセル製剤は、腫瘍組織に対してより高い浸透能力を持っていることが判明した。いずれにせよ、本研究で確認した PTX の分布の経時的変化からみると、本薬剤の播種巣内蓄積はそのほとんどが腹膜結節への直接浸透によるものであると考えられた。

PMB-30W は 50nm のナノ粒子製剤であり、その外殻の MPC ユニットは、ミセルの水に対する溶解性を高め、静脈投与においては細網内皮系による非特異的な相互作用を減少させ、血中内での長期停留を可能にさせる。本研究の結果は、腹腔内においても同様の薬剤動態を示している可能性が考えられる[33, 34]。一方で、腫瘍内において観察される PTX がキャリアに封入されているか、あるいはキャリアから放出されているかは不明である。しかし、*in vitro* の研究では PTX-30W が細胞膜に対し高い親和性を持っていることが解っており、本溶媒が創るミセル表面の低電位がこのナノパーティクルの高い組織浸透性と関連している可能性が示唆されている[50]。PTX-Cre の浸透距離と比較してより深くまで浸透する事実を考慮すると、PTX-30W はナノミセルの形態を保ちつつ腫瘍組織内に浸透している可能性が高いと考えられる。

本研究における興味深い知見は、腹腔内投与された PTX-30W は、静脈投与と

は対照的に腫瘍内の乏血管領域に強く集積する傾向があることである。しかしこの特徴的な蓄積のパターンは、血流の豊富な肝臓や同時に検討した腎臓などの正常組織では認められなかった(Fig. 7)。また、切除した播種層を OG-PTX の溶液に浸している場合にも観察されなかった。したがって、この PTX の特徴的な蓄積パターンは、腹膜播種結節の血流が乏しく、薬剤の排出効果が少ないという *in vivo* の内部環境と密接に関係していると考えられる。すなわち、いったん腫瘍内へ浸透した PTX はリンパ経由の排出路が極めて乏しいため、腫瘍血管を通して排出されている可能性が考えられる。固形腫瘍における薬剤の組織内浸透性や蓄積性については、薬剤分子の大きさ、電荷、代謝効率などの多くの要因が抗癌剤の浸透性や腫瘍内分布と関連していることが知られているが、まだ十分な検討がなされていないのが実情である[40]。しかし、腫瘍組織の高度な線維化や高い間質圧などの腫瘍側因子が薬剤浸透を困難にしていると報告されている[36-38]。したがって、静脈投与では播種巣内に到達する薬剤濃度は比較的低いため、周囲の高い間質圧に妨げられ、腫瘍血管を通して血管外（腫瘍内）に深く浸透しえないのに対し、PTX の腹腔内投与では静脈投与時の数 100～数 1000 倍もの濃度の薬剤が長期にわたり播種巣表面に直接接触するため[26, 27]、同じ間質圧であっても腫瘍内部に浸透しやすいことが推測される。

本研究のもう一つの重要な知見は、PTX が蓄積した領域周辺の多くの腫瘍細

胞がアポトーシスを起こしていたことである。PTX は微小管を構成するチューブリンに結合し細胞分裂を阻害することによって、アポトーシスを誘導しうると考えられている。Kuh らは、放射線標識 PTX-Cre と xenograft モデルを用いて、高密度の腫瘍細胞の存在が高い腫瘍内間質圧と薬剤浸透を阻害する大きな要因であり、この腫瘍細胞がアポトーシスを起こすと間質圧の低下をきたし薬剤の浸透性を著明に促進させる事を報告している[51]。したがって、本研究で得られた知見から、腹腔内投与により腫瘍表層部に高濃度の PTX が蓄積し、大量の癌細胞のアポトーシスを誘導することにより、播種巣内部の間質圧の低下を来とし、結果として、静脈投与あるいは腹腔内投与後に全身に再分布した薬剤が、腫瘍血管からより深層部まで浸透することを容易にしている可能性が推測された。

これらの薬剤分布に関する研究結果より、腹膜播種の辺縁部に位置する腫瘍細胞に対しては腹腔内投与が非常に効果的であると考えられ、直径が 2mm 程度（双方向から 1mm くらいは浸潤しうるため）のいわゆる定義上の micrometastasis に相当する播種層に対しては、腹腔内投与のみで完全消失させる事も可能であると考えられる。一方、Fig. 10 のように播種結節が大型の場合には、腹腔内投与時の浸透距離を超えた内部には効果が及びにくいと考えられる。実際、卵巣癌の過去の研究では、ドキソルビシンの腹腔内投与は、薬剤浸透性が十分では

ないために、大きい腫瘍に対する効果は認められなかったと報告されている[52, 53]。したがって、大きな腫瘍に対しては、腫瘍血管内からの薬剤分布を期待して、抗癌剤の全身投与を併用することが有用であると考えられる。事実、本研究で観察された PTX の静脈投与と腹腔内投与の腫瘍内分布の相違から、PTX の全身投与と腹腔内投与を併用する方法はドラッグデリバリーにおける双方の欠点を補う形で、腹膜播種に対する理想的な治療方法となることが推測される。

この観点に基づいた PTX の全身＋腹腔内併用療法が胃癌の腹膜播種に対して著効を示している事は[21, 22]、極めて理にかなった現象であると思われる。

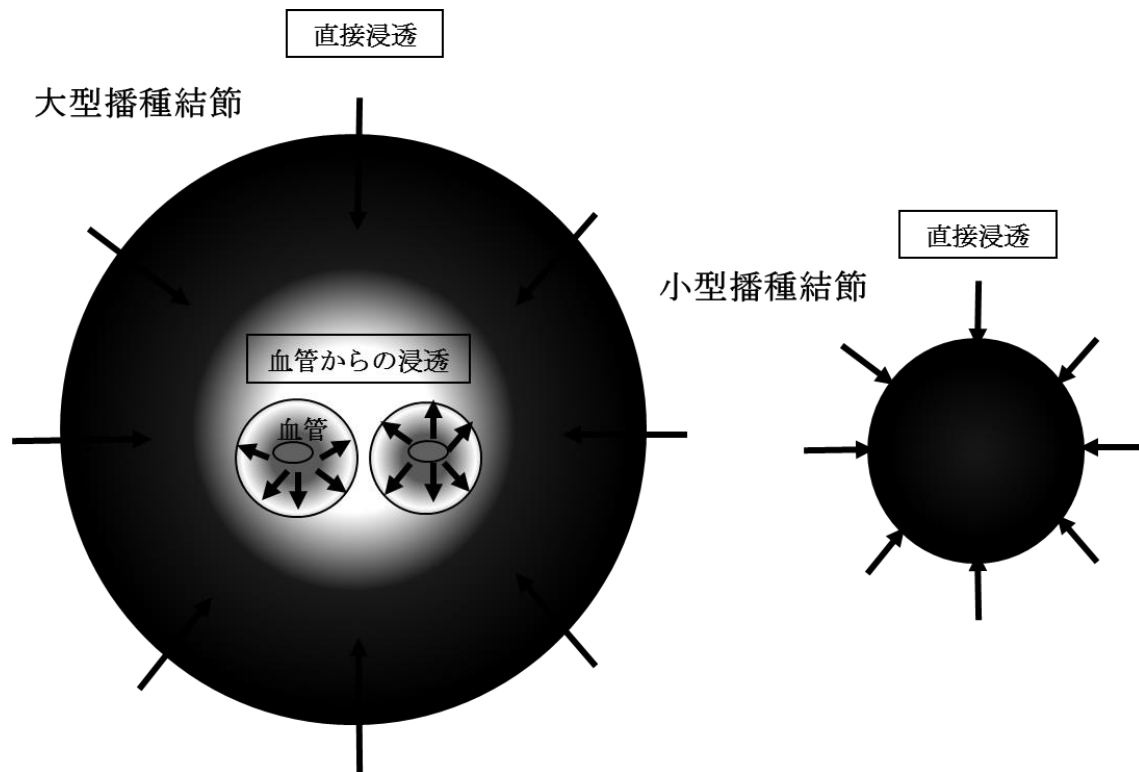


Fig. 10. 播種結節に対する抗癌剤の腹腔内投与、静脈投与におけるイメージ

最近の研究においては、高分子ナノミセルキャリアに組み込まれた抗癌剤は、長時間血流内にとどまることができ、EPR 効果により、正常組織と比べ腫瘍組織の間質に優先的に蓄積するため、治療上の有用性が指摘されている[44-46]。

実際、乳癌や肺癌、胃癌などの固形腫瘍に対して、PTX のナノミセル製剤と従来型 PTX を比較した臨床研究が行われている。転移性乳癌に対する Albumin-Bound Paclitaxel (Abraxan®) の臨床研究では、従来型 PTX と比較して、奏効率 (33% v 19%)、無増悪期間 (23.0 v 16.9 weeks) の改善を認め、Grade4 の好中球減少 (9% v 22%) を軽減させた[54]。非小細胞肺癌(StageIIIb, IV)に対しては、Albumin-Bound Paclitaxel と carboplatin の Weekly 投与が、奏効率(41% v 24%) を改善させ、Grade3 以上の末梢神経障害、好中球減少、関節痛、筋肉痛を軽減させた[55]。切除不能な再発胃癌に対する NK105 (Nippon Kayaku) 3-week cycle 投与の PhaseII study では、奏効率 25%、全生存期間 14.4 ヶ月、無増悪生存期間は 3 ヶ月であり、Grade3 以上の有害事象は好中球減少 (64.5%)、白血球減少 (17.5%) 末梢神経障害 (1.8%) であった[56]。しかしながら、いずれの研究も静脈からの全身投与を評価しており、PTX のナノミセル製剤の腹腔内投与時における臨床効果については明らかにされていなかった。PTX-30W は、実臨床では応用されていない。しかし、本研究において、PTX-30W の腹腔内投与が、PTX-Cre と比べてより効率的な腫瘍内薬剤分布を示すことから、腹膜播種に対す

るナノミセル化 PTX 製剤の腹腔内投与がより有効性を発揮する可能性が示唆される。事実、近年開発された PTX のナノ製剤 NK105 をマウス腹膜播種モデルに腹腔内投与した研究において、従来の PTX (PTX-Cre)と比較して、肝臓中の PTX 濃度に有意差がないにもかかわらず、播種結節中 PTX 濃度の有意な上昇を認め、より強い播種抑制効果を示すことも実証されている。[57]。これらの結果から、ナノミセル化 PTX の腹腔内投与は播種病変に対する理想的な治療戦略になる可能性が示唆された。

まとめ

腹膜播種に対し投与法の違いによる薬剤の腫瘍内分布に関する検討を行い、以下の結論を得た。

1. PTX-30W の腹腔内投与は、高濃度の薬剤を主に直接浸透により播種結節内に蓄積させることが期待できる。腹腔内投与された PTX-30W は、少なくとも腫瘍表層より約 1mm の深さまで到達しており、PTX-cre と比べて有意に深い部分まで浸透する。一方、同薬剤の静脈投与では、肝臓、腎臓などの血流の豊富な臓器と比べ微量の薬剤しか播種結節内には到達せず、腹腔内投与と比べその腫瘍内蓄積量は著明に少ない。

2. PTX-30W の腹腔内投与後の腫瘍内分布は、乏血管領域に高い集積を認め、腫瘍血管周囲ではむしろ欠如している傾向を認めた。また、腫瘍辺縁部の高濃度の PTX-30W の蓄積は、周囲の多くの腫瘍細胞のアポトーシスを誘導しており、これが抗腫瘍効果の一因であることが推測される。

結論

PTX 製剤の腹腔内投与、特に静脈投与との併用は、ドラッグデリバリーの観点から腹膜播種に対する有用な治療法であることが確認された。また、ナノ粒子化抗癌剤である PTX-30W は、より強い腫瘍内浸透性を有しており、腹膜播種に対する腹腔内化学療法における理想的な薬剤として臨床応用できる可能性があると考えられた。

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、研究のまとめ方から発表に至るまで終始熱心なご指導をいただきました。同教室、相馬大介先生、宮戸秀世先生、大谷研介先生、内川千枝子女史、網谷かほる女史には実験方法の習得にあたり多大なるご協力をいただきました。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：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. Yoo C.H., Noh S.H., Shin D.W., Choi S.H., and Min J.S., Recurrence following curative resection for gastric carcinoma. *Br J Surg*, 2000. 87(2): 236-42.
2. Wu C.W., Lo S.S., Shen K.H., Hsieh M.C., Chen J.H., Chiang J.H., Lin H.J., Li A.F., and Lui W.Y., Incidence and factors associated with recurrence patterns after intended curative surgery for gastric cancer. *World J Surg*, 2003. 27(2): 153-8.
3. Legge F., Petrillo M., Adamo V., Pisconti S., Scambia G., and Ferrandina G., Epithelial ovarian cancer relapsing as isolated lymph node disease: natural history and clinical outcome. *BMC Cancer*, 2008. 8: 367.
4. Lu Z., Wang J., Wientjes M.G., and Au J.L., Intraperitoneal therapy for peritoneal cancer. *Future Oncol*, 2010. 6(10): 1625-41.
5. Ajani J.A., Standard chemotherapy for gastric carcinoma: is it a myth? *J Clin Oncol*, 2000. 18(23): 4001-3.
6. 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., and 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*, 2008. 9(3): 215-21.
7. Iwasa S., Nakajima T.E., Nakamura K., Takashima A., Kato K., Hamaguchi T., Yamada Y., and Shimada Y., First-line fluorouracil-based chemotherapy for patients with severe peritoneal disseminated gastric cancer. *Gastric Cancer*, 2012. 15(1): 21-6.
 8. Yamao T., Shimada Y., Shirao K., Ohtsu A., Ikeda N., Hyodo I., Saito H., Iwase H., Tsuji Y., Tamura T., Yamamoto S., and Yoshida S., Phase II study of sequential methotrexate and 5-fluorouracil chemotherapy against peritoneally disseminated gastric cancer with malignant ascites: a report from the Gastrointestinal Oncology Study Group of the Japan Clinical Oncology Group, JCOG 9603 Trial. *Jpn J Clin Oncol*, 2004. 34(6): 316-22.
 9. Jacquet P. and Sugarbaker P.H., Peritoneal-plasma barrier. *Cancer Treat Res*, 1996. 82: 53-63.
 10. Sugarbaker P.H., Stuart O.A., Vidal-Jove J., Pessagno A.M., and DeBruijn E.A., Pharmacokinetics of the peritoneal-plasma barrier after systemic mitomycin C

- administration. *Cancer Treat Res*, 1996. 82: 41-52.
11. Sugarbaker P.H., Cunliffe W.J., Belliveau J., de Bruijn E.A., Graves T., Mullins R.E., and Schlag P., Rationale for integrating early postoperative intraperitoneal chemotherapy into the surgical treatment of gastrointestinal cancer. *Semin Oncol*, 1989. 16(4 Suppl 6): 83-97.
 12. 藤村 隆, 米村 豊, 藤田 秀人, 腹膜播種陽性胃癌に対し腹腔・上腸間膜動脈動注, 温熱腹膜灌流, 壁側腹膜全摘を施行した 1 例. *癌と化学療法*, 1994. 21(13): 2335-2337.
 13. Wu X.J., Yuan P., Li Z.Y., Bu Z.D., Zhang L.H., Wu A.W., Zong X.L., Li S.X., Shan F., Ji X., Ren H., and Ji J.F., Cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy improves the survival of gastric cancer patients with ovarian metastasis and peritoneal dissemination. *Tumour Biol*, 2013. 34(1): 463-9.
 14. Glockzin G., Schlitt H.J., and Piso P., Peritoneal carcinomatosis: patients selection, perioperative complications and quality of life related to cytoreductive surgery and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy. *World J Surg Oncol*, 2009. 7: 5.

15. Yonemura Y., Kawamura T., Bandou E., Takahashi S., Sawa T., and Matsuki N.,
Treatment of peritoneal dissemination from gastric cancer by peritonectomy and
chemohyperthermic peritoneal perfusion. *Br J Surg*, 2005. 92(3): 370-5.
16. Yonemura Y., Elnemr A., Endou Y., Ishibashi H., Mizumoto A., Miura M., and
Li Y., Effects of neoadjuvant intraperitoneal/systemic chemotherapy
(bidirectional chemotherapy) for the treatment of patients with peritoneal
metastasis from gastric cancer. *Int J Surg Oncol*, 2012. 2012: 148420.
17. Sautner T., Hofbauer F., Depisch D., Schiessel R., and Jakesz R., Adjuvant
intraperitoneal cisplatin chemotherapy does not improve long-term survival after
surgery for advanced gastric cancer. *J Clin Oncol*, 1994. 12(5): 970-4.
18. 荒井 邦佳, 北村 正次, 宮下 薫, 癌性腹膜炎に対する CDDP,MMC 併用腹
腔内反復投与法の経験. *癌と化学療法*, 1993. 20(11): 1642-1644.
19. Armstrong D.K., Bundy B., Wenzel L., Huang H.Q., Baergen R., Lele S.,
Copeland L.J., Walker J.L., and Burger R.A., Intraperitoneal cisplatin and
paclitaxel in ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2006. 354(1): 34-43.
20. Vasey P.A., Ovarian cancer: front-line standard treatment in 2008. *Ann Oncol*,
2008. 19 Suppl 7: vii61-6.

21. Ishigami H., Kitayama J., Kaisaki S., Hidemura A., Kato M., Otani K., Kamei T., Soma D., Miyato H., Yamashita H., and Nagawa H., Phase II study of weekly intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for advanced gastric cancer with peritoneal metastasis. *Ann Oncol*, 2010. 21(1): 67-70.
22. Tamura S., Miki H., Okada K., Miyake T., Yoshimura M., Suzuki R., Nakahira S., Nakata K., Okamura S., Sugimoto K., and Takatsuka Y., 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*, 2008. 13(6): 536-40.
23. 伏田 幸夫, 藤田 秀人, 木南 伸一, 二宮 致, 藤村 隆, 西村 元一, 太田 哲生, 胃癌腹膜播種における腹腔内化学療法の有用性と新規抗癌剤の貢献度. *癌と化学療法*, 2005. 32(11): 1691-1694.
24. Eiseman J.L., Eddington N.D., Leslie J., MacAuley C., Sentz D.L., Zuhowski M., Kujawa J.M., Young D., and Egorin M.J., Plasma pharmacokinetics and tissue distribution of paclitaxel in CD2F1 mice. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1994. 34(6): 465-71.
25. Gelderblom H., Verweij J., van Zomeran D.M., Buijs D., Ouwens L., Nooter K.,

- Stoter G., and Sparreboom A., Influence of Cremophor El on the bioavailability of intraperitoneal paclitaxel. *Clin Cancer Res*, 2002. 8(4): 1237-41.
26. Imano M., Imamoto H., Itoh T., Satou T., Peng Y.F., Yasuda A., Kato H., Shiraishi O., Shinkai M., Yasuda T., Takeyama Y., Okuno K., and Shiozaki H., Safety of intraperitoneal administration of paclitaxel after gastrectomy with en-bloc D2 lymph node dissection. *J Surg Oncol*, 2012. 105(1): 43-7.
27. Kurita N., Shimada M., Iwata T., Nishioka M., Morimoto S., Yoshikawa K., Higashijima J., Miyatani T., and Nakao T., Intraperitoneal infusion of paclitaxel with S-1 for peritoneal metastasis of advanced gastric cancer: phase I study. *J Med Invest*, 2011. 58(1-2): 134-9.
28. Kyle A.H., Huxham L.A., Yeoman D.M., and Minchinton A.I., Limited tissue penetration of taxanes: a mechanism for resistance in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(9): 2804-10.
29. Al-Abd A.M., Lee J.H., Kim S.Y., Kun N., and Kuh H.J., Novel application of multicellular layers culture for in situ evaluation of cytotoxicity and penetration of paclitaxel. *Cancer Sci*, 2008. 99(2): 423-31.
30. Los G., Mutsaers P.H., van der Vijgh W.J., Baldew G.S., de Graaf P.W., and

- McVie J.G., Direct diffusion of cis-diamminedichloroplatinum(II) in intraperitoneal rat tumors after intraperitoneal chemotherapy: a comparison with systemic chemotherapy. *Cancer Res*, 1989. 49(12): 3380-4.
31. Rowinsky E.K. and Donehower R.C., Paclitaxel (taxol). *N Engl J Med*, 1995. 332(15): 1004-14.
 32. Rowinsky E.K., Eisenhauer E.A., Chaudhry V., Arbuck S.G., and Donehower R.C., Clinical toxicities encountered with paclitaxel (Taxol). *Semin Oncol*, 1993. 20(4 Suppl 3): 1-15.
 33. Ishihara K., Iwasaki Y., and Nakabayashi N., Polymeric Lipid Nanosphere Consisting of Water-Soluble Poly(2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine-co-n-butyl methacrylate). *Polymer journal*, 1999. 31(12): 1231-1236.
 34. Konno T., Watanabe J., and Ishihara K., Enhanced solubility of paclitaxel using water-soluble and biocompatible 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. *J Biomed Mater Res A*, 2003. 65(2): 209-14.
 35. Soma D., Kitayama J., Konno T., Ishihara K., Yamada J., Kamei T., Ishigami H., Kaisaki S., and Nagawa H., Intraperitoneal administration of paclitaxel

- solubilized with poly(2-methacryloxyethyl phosphorylcholine-co n-butyl methacrylate) for peritoneal dissemination of gastric cancer. *Cancer Sci*, 2009. 100(10): 1979-85.
36. Jain R.K., Tong R.T., and Munn L.L., Effect of vascular normalization by antiangiogenic therapy on interstitial hypertension, peritumor edema, and lymphatic metastasis: insights from a mathematical model. *Cancer Res*, 2007. 67(6): 2729-35.
 37. Liu L.J., Brown S.L., Ewing J.R., and Schlesinger M., Phenomenological model of interstitial fluid pressure in a solid tumor. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys*, 2011. 84(2 Pt 1): 021919.
 38. Hassid Y., Eyal E., Margalit R., Furman-Haran E., and Degani H., Non-invasive imaging of barriers to drug delivery in tumors. *Microvasc Res*, 2008. 76(2): 94-103.
 39. Primeau A.J., Rendon A., Hedley D., Lilge L., and Tannock I.F., The distribution of the anticancer drug Doxorubicin in relation to blood vessels in solid tumors. *Clin Cancer Res*, 2005. 11(24 Pt 1): 8782-8.
 40. Minchinton A.I. and Tannock I.F., Drug penetration in solid tumours. *Nat Rev*

Cancer, 2006. 6(8): 583-92.

41. Sako A., Kitayama J., Koyama H., Ueno H., Uchida H., Hamada H., and Nagawa H., Transduction of soluble Flt-1 gene to peritoneal mesothelial cells can effectively suppress peritoneal metastasis of gastric cancer. *Cancer Res*, 2004. 64(10): 3624-8.
42. Milross C.G., Mason K.A., Hunter N.R., Chung W.K., Peters L.J., and Milas L., Relationship of mitotic arrest and apoptosis to antitumor effect of paclitaxel. *J Natl Cancer Inst*, 1996. 88(18): 1308-14.
43. Nicoletti M.I., Lucchini V., D'Incalci M., and Giavazzi R., Comparison of paclitaxel and docetaxel activity on human ovarian carcinoma xenografts. *Eur J Cancer*, 1994. 30A(5): 691-6.
44. Ranganathan R., Madanmohan S., Kesavan A., Baskar G., Krishnamoorthy Y.R., Santosham R., Ponraju D., Rayala S.K., and Venkatraman G., Nanomedicine: towards development of patient-friendly drug-delivery systems for oncological applications. *Int J Nanomedicine*, 2012. 7: 1043-60.
45. Matsumura Y. and Maeda H., A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and

- the antitumor agent smancs. *Cancer Res*, 1986. 46(12 Pt 1): 6387-92.
46. Maeda H., Wu J., Sawa T., Matsumura Y., and Hori K., Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, 2000. 65(1-2): 271-84.
 47. 辻本 洋行, 萩原 明於, 【がんの動注・局所治療】 腹腔内化学療法のための DDS. *Drug Delivery System*, 2007. 22(5): 522-529.
 48. Soma D., Kitayama J., Ishigami H., Kaisaki S., and Nagawa H., Different tissue distribution of paclitaxel with intravenous and intraperitoneal administration. *J Surg Res*, 2009. 155(1): 142-6.
 49. Diaz J.F., Strobe R., Engelborghs Y., Souto A.A., and Andreu J.M., Molecular recognition of taxol by microtubules. Kinetics and thermodynamics of binding of fluorescent taxol derivatives to an exposed site. *J Biol Chem*, 2000. 275(34): 26265-76.
 50. Goda T., Goto Y., and Ishihara K., Cell-penetrating macromolecules: direct penetration of amphipathic phospholipid polymers across plasma membrane of living cells. *Biomaterials*, 2010. 31(8): 2380-7.

51. Kuh H.J., Jang S.H., Wientjes M.G., Weaver J.R., and Au J.L., Determinants of paclitaxel penetration and accumulation in human solid tumor. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 290(2): 871-80.
52. Carney M.E., Lancaster J.M., Ford C., Tsodikov A., and Wiggins C.L., A population-based study of patterns of care for ovarian cancer: who is seen by a gynecologic oncologist and who is not? *Gynecol Oncol*, 2002. 84(1): 36-42.
53. Bristow R.E., Zahurak M.L., del Carmen M.G., Gordon T.A., Fox H.E., Trimble E.L., and Montz F.J., Ovarian cancer surgery in Maryland: volume-based access to care. *Gynecol Oncol*, 2004. 93(2): 353-60.
54. Gradishar W.J., Tjulandin S., Davidson N., Shaw H., Desai N., Bhar P., Hawkins M., and O'Shaughnessy J., Phase III trial of nanoparticle albumin-bound paclitaxel compared with polyethylated castor oil-based paclitaxel in women with breast cancer. *J Clin Oncol*, 2005. 23(31): 7794-803.
55. Socinski M.A., Bondarenko I., Karaseva N.A., Makhson A.M., Vynnychenko I., Okamoto I., Hon J.K., Hirsh V., Bhar P., Zhang H., Iglesias J.L., and Renschler M.F., Weekly nab-paclitaxel in combination with carboplatin versus solvent-based paclitaxel plus carboplatin as first-line therapy in patients with

advanced non-small-cell lung cancer: final results of a phase III trial. *J Clin Oncol*, 2012. 30(17): 2055-62.

56. Kato K., Chin K., Yoshikawa T., Yamaguchi K., Tsuji Y., Esaki T., Sakai K., Kimura M., Hamaguchi T., Shimada Y., Matsumura Y., and Ikeda R., Phase II study of NK105, a paclitaxel-incorporating micellar nanoparticle, for previously treated advanced or recurrent gastric cancer. *Invest New Drugs*, 2012. 30(4): 1621-7.
57. Emoto S., Yamaguchi H., Kishikawa J., Yamashita H., Ishigami H., and Kitayama J., Antitumor effect and pharmacokinetics of intraperitoneal NK105, a nanomicellar paclitaxel formulation for peritoneal dissemination. *Cancer Sci*, 2012. 103(7): 1304-10.