

論文の内容の要旨

論文題目 腹膜播種に対する抗癌剤の直接浸透に関する検討

氏名 亀井隆雄

胃癌において腹膜播種は最も多い転移、再発形式のひとつである。腹膜播種の進行はいずれ癌性腹膜炎を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させる。しかし、これまでの腹膜播種に対する治療では、満足する奏功は得られておらず、いまだに標準的な治療法は存在していない。腹腔内化学療法は、高濃度の薬剤を直接播種結節に接触させることができるため、その臨床効果が期待されている。胃癌の腹膜転移においても、全身化学療法に Paclitaxel(PTX)の腹腔内投与を加えた治療法が著効したとの報告を認める。しかし、PTX の腹腔内投与において、実際の薬剤の浸透距離や分布の経時的变化、また静脈投与時との薬剤分布の違いについては十分に解明されていない。また、腹腔内投与時の正常臓器における薬剤分布については、いまだ詳細に検討されていない。

近年、ナノ粒子化製剤の有用性が指摘されている。一般に、抗癌剤をナノ粒子に封入することにより、薬剤を選択的に癌組織内に到達させ、副作用を軽減させることができる。過去の研究において、高分子ミセルである 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)に PTX を内包した PTX-30W をマウスの胃癌腹膜播種モデルに腹腔内投与した結果、Cremophor EL を溶媒とした PTX(PTX-Cre)と比較し、腹膜結節中により高濃度の PTX を認め、腹膜転移の成長を抑制し、生存を延長させたことが報告されている。

本研究では、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播種結節と肝臓、腎臓における PTX の分布状況とその経時的変

化を比較検討した。さらに腫瘍血管との関連性、薬剤浸透後の腫瘍組織の変化も観察した。

ヒト胃癌細胞である MKN45 のマウス腹膜播種モデルを用いて、PTX-30W の静脈投与時と腹腔内投与時それぞれの腹膜結節および肝臓、腎臓における薬剤分布を観察した。静脈投与 24 時間後には、PTX が腹膜播種巣の血管周囲に淡く集積されていたが、48 時間後には明らかに減少していた。正常臓器である肝臓や腎臓では、1 時間後より PTX の集積を多量に認め、48 時間後にも有意な PTX を観察することができた。これに対し腹腔内投与時では、1 時間後には腹膜播種結節表面に多量の PTX が蓄積されており、その浸透範囲は徐々に拡大した。48 時間後には腫瘍の表層から約 1mm の深さまで達していた。肝臓や腎臓においては、1 時間後には全体に均一な PTX の集積を認めたが、24 時間後には明らかに蛍光強度は減少し、48 時間後にはほとんど観察することができなかった。

次に、中心で切離した腹膜播種層の切片を用いて画像解析し、腫瘍内の染色強度を客観的に評価した。静脈投与では PTX の腫瘍内分布は結節によって異なっており一定の傾向は認めなかったが、腹腔内投与ではいずれの結節においても腫瘍辺縁部が濃染され、内部にいくにつれ蛍光が減弱していた。腹腔内投与時の浸透距離を測定したところ、PTX-30W では 1mm であったのに対し、PTX-Cre では 200 μ m 程度で有意に短かった。

続いて、播種層内の PTX の分布状況を調べるため腫瘍血管を染色した。腹腔内投与では、いずれの時間においても PTX は結節内に均等に染色されず、腫瘍血管の周囲が楕円状に欠如していた。この像は、血管周囲が淡く染色されていた静脈投与時の像とは対照的であった。一方、正常臓器における分布では、静脈投与、腹腔内投与とも瀰漫性集積を認め、腹膜結節の場合とは対照的であった。切離した播種結節を PTX 溶液に浸して、PTX の腫瘍内分布と腫瘍血管との関連性を観察したところ、PTX の浸透は均等であり、腫瘍血管周囲の集積の欠如は認められなかった。

最後に、腹腔内投与後の播種層内の腫瘍細胞の状態を観察する目的で、Hoechst 33342 にて染色した。静脈投与時と比較すると、PTX 蓄積部位周囲には、はるかに多くのアポトーシス細

胞を認めた。

本研究において、PTX-30W の静脈投与後では、主に播種結節の腫瘍血管周囲に淡く集積していた。経時的变化を観察すると、腹腔内結節における蛍光強度は、肝臓や腎臓と比較し、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。これは静脈投与時に正常組織に暴露される PTX の総量が播種組織よりも明らかに多い事を示している。これに対し、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 時間後までは播種層内の PTX 集積の範囲は拡がりを見せていた。また、播種層内の蛍光は、同じ腹腔内に位置する肝臓や腎臓よりも明らかに強く、結果として本薬剤の腹腔内投与では、PTX が正常組織より播種層内に優先的に蓄積していることが示唆された。この事実は、本薬剤の腹腔内投与の大きな利点であると考えられた。また、PTX の分布の経時的变化をみると、投与直後から徐々に深部に浸透していた。腫瘍内の蛍光強度が内部にいくにつれ減弱していたとの結果も併せると、本薬剤の腹腔内投与後の播種層内蓄積は、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。薬剤浸透を阻害する要因として、腫瘍組織の高度な線維化や高い間質圧の存在が報告されている。したがって、静脈投与時では血流内の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、血管外に深く浸透できないのに対し、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播種層表面に直接接触するため、腫瘍内部に浸透しやすいことが推測される。

PTX-30W の腹腔内投与後に播種層内に検出された蛍光は、48 時間後には腫瘍結節表面から約 1mm までに達していた。PTX-Cre の浸透距離は 200 μ m 程度であったのに対し、PTX-30W は有意に深部へ達しており、PTX-30W を用いたナノミセル製剤は腫瘍組織に対して高い浸透能力を持っていることが判明した。ナノ粒子製剤は静脈投与において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が、腹腔内投与時でも同様の薬物動態を示している可能性が示唆された。また、PTX-30W は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、本薬剤の腹腔内投与時にもナノミセルの形態を保ちつつ浸透している

可能性が高いと考えられる。

本研究において、腹腔内投与された PTX-30W は、静脈投与時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が新たに判明した。血流豊富な正常臓器や、切除した播種層を PTX 溶液に浸した場合にはその傾向がなかった事実を考慮すると、腹腔内投与時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 はリンパ経路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。

また、PTX が蓄積した領域周辺の多くの腫瘍細胞はアポトーシスを起こしていた。過去の報告では、腫瘍内において高密度の腫瘍細胞による高い間質圧が薬剤浸透を阻害し、腫瘍細胞がアポトーシスを引き起こすことにより間質圧を低下させ、薬剤浸透を促進させることが報告されている。したがって、本研究の結果から、腫瘍表層部に高濃度の PTX が蓄積し、多量のアポトーシスを誘導することによって間質圧の低下を招き、薬剤浸透を促進させていることが推測された。

本研究の結果により、腹膜播種辺縁部の腫瘍細胞に対しては腹腔内投与が非常に有効であると考えられ、直径 2mm 程度の小型結節で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た。しかし、大型結節の場合には、腹腔内投与のみでは内部には効果が及びにくく、静脈投与と併用する方法が、ドラッグデリバリーの観点からみても腹膜播種に対する有用な治療であることが推測された。また、ナノ粒子化抗癌剤 PTX-30W の腹腔内投与は PTX-Cre と比較して、播種結節に対し強い浸透性を有しており、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。