

リポソーム封入シスプラチンの脳腫瘍血管透過性に関する超微形態学的研究

柴田 尚武・陣内 敬文・森 和夫

Ultrastructural Study of Capillary Permeability of Liposome-encapsulated Cisplatin in an Experimental Rat Brain Tumor Model

Shobu SHIBATA, Takafumi JINNOUCHI and Kazuo MORI

Department of Neurosurgery, Nagasaki University, Nagasaki

Abstract

The anticancer chemotherapeutic agent cisplatin (cis-diamminedichloroplatinum) has several disadvantages, including extreme nephrotoxicity, rapid binding to plasma proteins, and poor penetration into the central nervous system. Liposomes would seem to be suitable as carriers of cisplatin to brain tumors. This ultrastructural study was undertaken to identify the capillary permeability of liposome-encapsulated cisplatin in a rat brain tumor model. Brain tumors were induced transplacentally with a single intravenous dose of 50 mg/kg of ethylnitrosourea (ENU). One ml of liposome-encapsulated cisplatin and ferritin prepared from phosphatidylcholine and cholesterol (molar ratio 7:2) was administered *via* the carotid artery to rats with ENU-induced brain tumors. The tumor platinum content and that of the contralateral hemisphere were assayed by flameless atomic absorption spectrometry. The presence of ferritin-bearing liposomes was demonstrated by electron microscopy of brain capillary endothelium as well as tumor cells. Thirty minutes after drug administration, the average dry-weight platinum concentrations were $3.98 \pm 0.50 \mu\text{g/g}$ within the intracerebral tumors and $0.72 \pm 0.24 \mu\text{g/g}$ in the contralateral hemispheres. Electron microscopic ultrastructural study, which can distinguish ferritin-bearing liposomes from cell materials, demonstrated the presence of liposomes containing ferritin in both cell surface folds and capillary endothelial cells and also within tumor cells. An enlarged electron micrograph of a liposome with a diameter of approximately $0.2 \mu\text{m}$ suggested the presence of ferritin molecules in the lamellar structure. Liposome-encapsulated cisplatin is apparently able to pass the blood-brain barrier and should be useful in the chemotherapy of glioma.

Key words: liposome, cisplatin, ethylnitrosourea, experimental brain tumor, blood-brain barrier

I はじめに

悪性グリオーマに対して優れた抗腫瘍効果を持つシスプラチン(cis-diamminedichloroplatinum: CDDP)をリポソームに封入することによって、血液脳関門を通し、腎毒性を抑え、治療効果を高めることを目的として研究を行って

る。今回はリポソーム封入シスプラチン(Lip-CDDP)を ethylnitrosourea (ENU)誘発グリオーマラットに動注し、腫瘍血管透過性について電顕的観察を行った。

脳腫瘍に対する化学療法において、抗癌剤の腫瘍組織への移行は重要である。抗癌剤の移行の問題点の一つとして、血液脳関門がある。また、脳腫瘍血管では正常毛細血

長崎大学脳神経外科

Address reprint requests to: S. Shibata, M.D., Department of Neurosurgery, Nagasaki University, 7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852.

受稿 1987年11月19日 受理 1988年3月25日

管に比し、透過性が亢進していることが知られている。薬剤の腫瘍血管に対する透過性が高ければ薬剤の組織内濃度は高くなり、その効果が十分期待される。抗癌剤の脳腫瘍血管透過性の解明を目的とした。

II 実験方法

1. ENU 誘発グリオーマラット

妊娠14日目の Wistar 系ラットにアスコルビン酸で pH 7.2 に調整した N-ethyl-N-nitrosourea (ENU; 半井化学薬品工業, 京都) を 50 mg/kg 尾静脈より注入した。大脳に肉眼的腫瘍を認めた生後 4 ヶ月から 6 ヶ月までの仔ラット 20 匹を材料とした。

2. リポソーム封入シスプラチン・フェリチン(Lip-CDDP・FT)の調製

卵黄から抽出した phosphatidylcholine 30 mg, cholesterol 4.4 mg (構成モル比 7:2) をクロロホルム 5 ml に溶解し、陰圧下で乾燥させて脂質の薄膜を作製した。これに CDDP 0.5 mg/ml とフェリチン(FT) 10 mg/0.1 ml (電頭用マーカー; シグマ社, セントルイズ) を混入し、膨潤させたのち、ミキサーにて振盪を繰り返し、遠心分離した。生食水を加えて 1 ml とし、多重層リポソーム(multilamellar vesicle)を作製した。

3. 一般操作

ENU 誘発グリオーマラット 20 匹の腫瘍側半球の内頸動脈より、調製後 48 時間以内の Lip-CDDP・FT 1 ml を注入した。この際、pterygopalatine artery と外頸動脈は結紮し、頭蓋内へ選択的に流入させた。30 分後に経左心室的にグルタル固定液で灌流固定を行い、腫瘍と非腫瘍(対側半球)組織を採取した。一部はプラチナ濃度測定のための試料とした。オスミウムによる二重固定を行い、脱水後包埋し、超薄切片を作製し、一部は未染色、他は酢酸ウラニル・クエン酸鉛で二重染色した。プラチナ濃度は試料を北里バイオケミカル・ラボラトリーズに凍結輸送し、原子吸光法にて測定した。

III 結果

1. プラチナ濃度

Lip-CDDP の力価測定は、Lip-CDDP・FT 1 ml を凍結融解にて破壊し、遊出した CDDP のプラチナ濃度を原子吸光法で測定した (Table 1)。3 検体の平均プラチナ濃度は 28.3 $\mu\text{g/ml}$ であった。したがって、CDDP の封入効率は 5.7% であった。

Lip-CDDP・FT 1 ml 動注 30 分後の組織内プラチナ濃度は、7 検体の平均で腫瘍 3.98 \pm 0.50, 非腫瘍(対側半球) 0.72 \pm 0.24 $\mu\text{g/g}$ dry weight であった (Table 2)。したがっ

て、腫瘍組織内で有意に高濃度であった ($p < 0.01$)。

2. 電顕所見

Fig. 1 は Lip-CDDP の negative stain 像で、直径 0.1 ~

Table 1 Platinum concentration of liposome-encapsulated cisplatin

| Sample No. | Platinum concentration ($\mu\text{g/ml}$) |
|------------|---------------------------------------------|
| 1 | 14.6 |
| 2 | 44.0 |
| 3 | 26.4 |
| Average | 28.3 |

Table 2 Platinum concentrations in tumor and in the contralateral hemisphere

| Animal No. | Platinum concentration ($\mu\text{g/g}$ dry weight) | |
|------------------|------------------------------------------------------|--------------------------|
| | Brain tumor | Contralateral hemisphere |
| 1 | 5.56 | 0.82 |
| 2 | 3.33 | 0.72 |
| 3 | 4.35 | 0.53 |
| 4 | 3.70 | 1.75 |
| 5 | 4.00 | 0.30 |
| 6 | 2.11 | 0.92 |
| 7 | 4.81 | 0.06 |
| Average \pm SD | 3.98 \pm 0.50* | 0.72 \pm 0.24 |

*Significantly different from normal (contralateral hemisphere), $p < 0.01$.

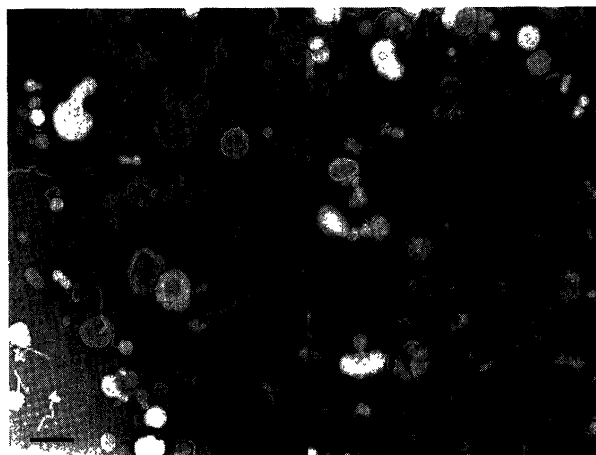


Fig. 1 Electron photomicrographs showing typical multilamellar liposome-encapsulated cisplatin. Negative staining with 2% potassium phosphotungstate. Bar = 0.2 μm .

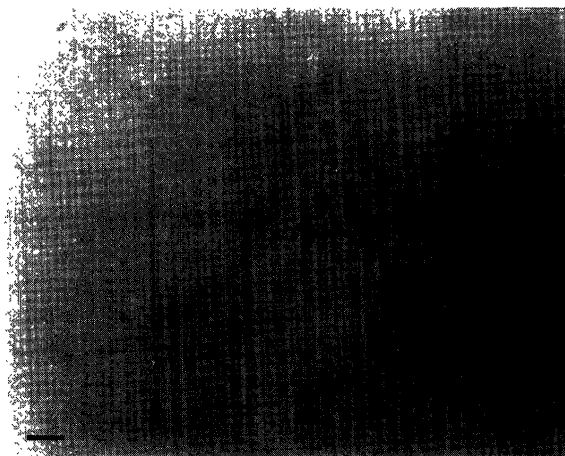


Fig. 2 Electron photomicrograph of an ethylnitrosourea (ENU)-induced brain tumor specimen after injection of liposome-encapsulated cisplatin and ferritin. Liposome containing ferritin (arrow) can be seen in the cytoplasm near the nucleus. The specimen was observed without contrast staining. Bar=0.5 μ m.

0.2 μ m の多重層リポソームを認めた。

Fig. 2 は腫瘍組織切片の未染色像で、腫瘍細胞内の Lip-CDDP・FT の FT が陽性に抽出されていた。一方、二重染色像では Lip-CDDP・FT が腫瘍血管内皮と接触して取り込まれようとしている像と vesicle 内に取り込まれている像がみられた (Fig. 3A)。ついで腫瘍細胞内に取り込まれようとしている像と腫瘍細胞質内に取り込まれた像がみられ、これらの像はいずれも強拡大により FT 陽性の多重層リポソームであることが確認された (Fig. 3B, C)。また、壊れたリポソームから流出した多数の FT 粒子も観察された (Fig. 3)。

以上、Lip-CDDP・FT は腫瘍血管内皮の pinocytotic vesicle 内にまず取り込まれて abluminal 側に移動し、不規則な basal lamina を貫通して腫瘍細胞質内に侵入し、一部は細胞小器管、核にも到達していた。血管内皮細胞間の junction には破綻はみられず、ここを通過する像はみられなかった。

IV 考 察

1. ENU 誘発ラットグリオーマの腫瘍血管について

著者らは実験脳腫瘍モデルとして用いられることの多い ENU 誘発ラットグリオーマと 9L 細胞移植ラットグリオーマの腫瘍血管微細構造の違いを電顕観察し、ヒトグリオーマ血管と比較し報告した⁶⁾。ENU 誘発ラットグリオーマでは腫瘍血管内皮に肥厚、surface infolding、pinocytotic vesicle や vacuole の増加、perivascular space の拡大がみら



Fig. 3 Electron photomicrographs of ENU-induced brain tumor specimens after injection of liposome-encapsulated cisplatin and ferritin. The specimens were observed with contrast staining. A: Liposomes containing ferritin in a surface infolding (arrowhead) and in the vesicle (arrow) of a capillary endothelial cell. Bar=0.5 μ m. B: Liposome containing ferritin (arrow) attached to a tumor cell surface. inset: Enlarged electron micrograph of the liposome. Bars=1 μ m and 0.2 μ m. C: Liposome containing ferritin (arrow) in the cytoplasm close to the organelles. inset: Enlarged electron micrograph of the liposome. Bars=1 μ m and 0.2 μ m.

れ、血管内皮細胞間には luminal 側や abluminal 側に離開を認める長短さまざまな tight junction を認めた。レプリカ膜では 7~8 条の strand より成る tight junction を認め、pinocytotic vesicle は平均 $18/\mu\text{m}^2$ と増加していた^{2,12,13,21}。一方、9L 細胞移植ラットグリオーマでは腫瘍血管は直径 $10\mu\text{m}$ 以上の比較的大型のものが多く、内皮は菲薄化し、随所に fenestration を認め、perivascular space は著明に拡大していた。血管内皮細胞間の junction は、短縮あるいは伸展しているもの、離開しているものなどさまざまな像がみられた。レプリカ膜では血管内皮に多数の fenestration が集簇して存在し、pinocytotic vesicle も平均で $23/\mu\text{m}^2$ と増加していたが、tight junction は検出できなかった。すなわち、ENU 誘発ラットグリオーマでは tight junction を有し、fenestration はなく、pinocytotic vesicle の増加により血管透過性亢進をきたしており、ヒトグリオーマ腫瘍血管と類似していた¹⁶。しかし、腫瘍性格に問題がある。

ENU 誘発ラットグリオーマは主として oligodendroglioma であるが、腫瘍の増大に伴い、一部は ependymoma 様構造や astrocytoma 様腫瘍を混在する anaplastic glioma であることを示し、astrocytoma よりむしろ oligodendroglioma や anaplastic glioma の実験モデルとして取り扱うほうが適当と思われた^{11,17,22}。一方、一定の大きさの腫瘍を作製することができるため、治療効果判定モデルに用いられることが多い 9L 細胞移植ラットグリオーマは、ヒト metastatic brain tumor と同様に腫瘍血管内皮細胞に tight junction はなく、また fenestration が存在することより著明な透過性亢進をきたすものと考えられた。したがって、これらの実験脳腫瘍モデルを使用する際には目的に応じて使い分けることが肝要である。

2. Lip-CDDP について

CDDP は抗腫瘍剤中、重金属(白金)を含んだ唯一の薬剤であり、悪性グリオーマに対して *in vitro* における殺細胞効果は優れている^{8,9,15}が、*in vivo* においては血液脳関門を通過しがたく、抗腫瘍効果は十分でない^{1,3,7,18,19}。また、腎毒性が強く、各種の中和剤(亜セレン酸、次硝酸ビスマス、チオ硫酸ナトリウム、ホスホマイシン)が試みられているが、いずれも実用化は困難であり、臨床的には水分負荷が行われている。そこで、著者らは CDDP をリポソームに封入することによって血液脳関門を通し、腎毒性を抑え、治療効果を高めることを目的として、悪性グリオーマに対する Lip-CDDP 療法の基礎的研究を行っている^{4,5,10,14,23,24}。

本実験では、抗腫瘍剤の腫瘍組織への移行が重要であるとの観点から、抗腫瘍剤の脳腫瘍血管透過性について、Lip-CDDP・FT を ENU 誘発グリオーマラットに動注し

て検討した。その結果、電顕標本で血管腔、内皮細胞の vesicle 内および basal lamina の外側にリポソームが存在することを確認した。このことは、血管を通過して抗腫瘍剤が脳腫瘍細胞へ到達する過程の観察を可能にしたもので、脳腫瘍の化学療法の改善に有用な情報を提供するものと考ええる。さらに、別に発表する予定であるが、9L 細胞移植 15 日目のグリオーマラットを用い、CDDP 1 ml (0.5 mg) 静注群と Lip-CDDP 5 ml (0.14 mg) 静注群で 2 時間後の臓器内プラチナ濃度を原子吸光法で測定したところ、CDDP 静注群では腎、肝、肺の順に高濃度であったのに対し、Lip-CDDP 静注群では脾、肝、腎の順であった²⁰。したがって、CDDP の腎毒性は防止できたが、新たに肝・脾障害の検討が必要となった。CDDP は肝の薬物代謝酵素には影響を与えないと言われているが、やはり内頸動脈注入により CDDP 投与量を少なくしたり、あらかじめリポソームを単独注入することによって Lip-CDDP の脾・肝取り込みをブロックすることなどの工夫が必要である。

リポソームは大きさ、膜の多重度、膜脂質の組成、膜表面の電荷を変えることにより、特定の臓器や組織、細胞に選択性を持たせることが可能である。本実験に用いた多重層リポソームは中性リポソーム [egg phosphatidylcholine (PC) + cholesterol (CL) ; モル比 7 : 2] であり、CDDP 封入率も 5.7% と悪く、グリオーマ内への取り込みも低かった。リポソームの改良が今後の研究課題であるが、まず CDDP 封入率を高めるために安定性のある小さな一枚膜リポソーム (small unilamellar vesicle) を作製中である。また、本リポソームとは別に、陽性荷電リポソーム (PC + CL + stearyl amine ; モル比 7 : 1 : 3)、陰性荷電リポソーム (PC + CL + phosphatidic acid ; モル比 7 : 1 : 3) および低い膜流動性を持つ中性リポソーム (dipalmitoyl PC + CL ; モル比 7 : 1) を調製してグリオーマ内への取り込みを検討したところ、dipalmitoyl PC + CL リポソームがもっとも高く、他の 3 種では有意差がなかった。今後詳細に検討していく予定である。

V ま と め

ENU 誘発グリオーマラットに対する Lip-CDDP・FT 動注により、CDDP は腫瘍組織内に高濃度に移行した。これは、腫瘍血管内皮細胞の pinocytotic vesicle の増加と活性化による Lip-CDDP・FT の取り込み亢進のためと考えられた。

本研究は、文部省科学研究費補助金「がん」特別研究 60015076 を用いて行われた。

文 献

- 1) Bonnem EM, Litterst CL, Smith FP: Platinum concentrations in human glioblastoma multiforme following the use of cisplatin. *Cancer Treat Rep* 66: 1661-1663, 1982
- 2) Cox DJ, Pilkington GJ, Lantos PL: The fine structure of blood vessels in ethylnitrosourea-induced tumors of the rat nervous system. With special references to the breakdown of the blood-brain barrier. *Br J Exp Pathol* 57: 419-430, 1976
- 3) Feun LG, Stewart DJ, Maor M, Leavens M, Savaraj N, Burgess A, Yung WA, Benjamin RS: A pilot study of cis-diamminedichloroplatinum and radiation therapy in patients with high grade astrocytomas. *Journal of Neuro-oncology* 1: 109-113, 1983
- 4) Freise J, Mueller WH, Magerstedt P, Schmoll HJ: Pharmacokinetics of liposome encapsulated cisplatin in rats. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 258: 180-192, 1982
- 5) Gregoriadis G: The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N Engl J Med* 295: 704-710, 1976
- 6) 陣内敬文, 柴田尚武, 福嶋政昭, 森 和夫: ENU 誘発ラットグリオーマと 9L 細胞移植ラットグリオーマの腫瘍血管の超微形態学的観察. *Neurol Med Chir (Tokyo)* (掲載予定)
- 7) 金子貞男, Clendenon NR, Kartha M: 悪性グリオーマに対する cis-DDP と放射線併用療法の基礎的研究. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 23: 917-923, 1983
- 8) 加藤 俊, 太田和雄, 新島端夫(編): シスプラチン —その臨床応用—. 東京, 協和企画通信, 1983, 214 pp
- 9) 加藤恭三, 吉田 純, 井上 達, 小林達也, 景山直樹: 悪性脳腫瘍に対する cisplatin の効果 —基礎的および臨床的検討—. *癌と化療* 11: 1794-1800, 1984
- 10) 鬼頭 晃, 吉田 純, 景山直樹, 井上 達, 阿部博子, 有地 滋, 小嶋仲夫, 八木国夫: リポソームを用いる脳腫瘍の化学療法に関する基礎的研究 —ヒト glioma 細胞に関するサルファタイド挿入リポソームの親和性—. *脳と神* 39: 783-788, 1987
- 11) 増本英男: ENU 誘発ラット膠腫の初期発生過程における細胞分化とグリア反応 —電顕および H-チミジン組織オートラジオグラフィによる解析—. *長崎医学会誌* 62: 92-104, 1987
- 12) 峯 豊: ラット脳腫瘍における血液脳関門の障害について —Horseradish peroxidase を用いた電顕的研究—. *長崎医学会誌* 58: 98-116, 1983
- 13) Nishio S, Ohta M, Abe M, Kitamura K: Microvascular abnormalities in ethylnitrosourea (ENU)-induced rat brain tumors: Structural basis for altered blood-brain barrier function. *Acta Neuropathol (Berl)* 59: 1-10, 1983
- 14) 小山内たか, 永井克孝: 血液—脳関門とリポソーム. *神研の進歩* 28: 580-588, 1984
- 15) Prestayko AW, Crooke ST, Caster SK (eds): *Cisplatin, Current Status and New Developments*. New York, Academic, 1980, 527 pp
- 16) 柴田尚武, 福嶋政昭, 陣内敬文, 森 和夫: 脳腫瘍血管透過性の超微形態 —Glial と non-glial tumor の違い—. *神経病理学* 6: 387-393, 1985
- 17) 下川 功, 前田 公, 徳永茂樹, 増本英男, 松尾 武, 池田高良: ラットグリオーマにおいて免疫組織化学的に認識される astrocytic cell の性格について. *脳と神* 39: 861-868, 1987
- 18) Stewart DJ, Leavens M, Maor M, Feun L, Luna M, Bonura J, Caprioli R: Human central nervous system distribution of cis-diamminedichloroplatinum and use as a radiosensitizer in malignant brain tumors. *Cancer Res* 42: 2474-2479, 1982
- 19) Stewart DJ, Wallace S, Feun L, Leavens M, Young SE, Handel S, Mavligit G, Benjamin RS: Phase I study of intracarotid artery infusion of cis-diamminedichloroplatinum (II) in patients with recurrent malignant intracerebral tumors. *Cancer Res* 42: 2059-2062, 1982
- 20) Takada M, Yuzuriha T, Katayama K, Iwamoto K, Sunamoto J: Increased lung uptake of liposomes coated with polysaccharides. *Biochim Biophys Acta* 802: 237-244, 1984
- 21) 埜本勝司, 玉木紀彦, 松本 悟: Ethylnitrosourea の経胎盤投与による実験的脳腫瘍 (第 2 報) —ENU 経胎盤投与による実験的脳腫瘍の血管構築について—. *脳と神* 29: 27-35, 1977
- 22) 徳永茂樹: ENU 誘発ラット膠腫における細胞分化の特性 —電顕免疫組織化学的検索—. *長崎医学会誌* 62: 105-117, 1987
- 23) Yagi K, Naoi M, Sakai H, Abe H, Konishi H, Arichi S: Incorporation of enzyme into the brain by means of liposomes of novel composition. *Journal of Applied Biochemistry* 4: 121-125, 1987
- 24) Yatvin MB, Muhlensiepen H, Porschen W, Weinstein JN, Feinendegen LE: Selective delivery of liposome-associated cis-dichlorodiammineplatinum (II) by heat and its influence on tumor drug uptake and growth. *Cancer Res* 41: 1602-1607, 1981

[別刷請求先: 〒852 長崎市坂本町7-1, 長崎大学脳神経外科, 柴田尚武]