

《研究速報》

リポソームの腫瘍診断薬への応用に関する基礎的検討

荻原 泉* 小島 周二* 久保寺昭子**

I. 緒 言

リン脂質は水溶液に懸濁した場合、二分子膜よりなる閉鎖小胞を形成する。この小胞はリポソームと呼ばれ、生体膜モデルのひとつとして広く用いられている。また、近年では、マイクロカプセルとして、投与薬剤の急性毒性の軽減、薬剤やホルモン等の組織到達性の改善、あるいは欠損酵素の細胞内への補給等に應用され、注目を集めている¹⁾。核医学の分野でも、リポソームに¹¹¹Inや^{99m}Tcを保持させ、腫瘍やリンパ、心臓などの画像診断に用いる試みが諸外国でなされている²⁾。

リポソームは、その構成脂質、粒径、表面荷電の有無、脂質膜修飾物質の有無などによって *in vivo* での動態を異にし、これらの因子と腫瘍集積性との関連についても、現在、研究が進められている。ごく最近では、Proffittら³⁾が、アミノマンノース誘導体で膜を修飾した、電荷をもたない小さな一枚膜リポソームを用いて、高い集積率を得ることに成功したと報告している。

これらの報告を踏まえ、本研究では、多重膜リポソーム (MLV) および小さな一枚膜リポソーム (SUV) に⁶⁷Gaを封入し、リポソームの腫瘍診断薬への応用に関する基礎的検討を行った。腫瘍モデルにはエールリッヒ固型癌を用い、現在臨床的に繁用されている⁶⁷Ga-citrateとの比較を加えた。

* 帝京大学薬学部放射薬品学教室

** 東京理科大学薬学部放射薬品学教室

受付：59年3月19日

最終稿受付：59年5月2日

別刷請求先：神奈川県津久井郡相模湖町寸沢嵐 1091-1

(☎ 199-01)

帝京大学薬学部放射薬品学教室

小島 周二

II. 実験方法

1. ⁶⁷Ga 封入リポソームの作製

L- α -distearoylphosphatidylcholine (DSPC), cholesterol (CH) は Sigma 社製を用いた。DSPC: CH (2:1, モル比) の脂質混合物より常法に従って薄膜を形成し、0.9% NaCl/5 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) に溶解した 1 mM ニトリロ三酢酸ナトリウム (NTA) を加えて、60° 湯浴中で膨潤、懸濁させた。MLV 作成の場合には、この懸濁液に bath 型 sonicator (Branson, B-220H) で 10 分の超音波処理を施した。また、SUV の場合は probe 型 (Branson sonifer model 200) で 30 分超音波処理の後、30,000×g, 20 分の遠心分離を行い、その上清を用いた。おのおののリポソーム懸濁液を Sephadex G-50 カラムにかけ、0.9% NaCl で溶出し、遊離の NTA を除去した。リポソームの溶出位置は 550 nm の吸光度測定により確認した。リポソーム内への⁶⁷Gaの封入は、⁶⁷GaCl₃ (日本メジフィジックス社製) を用い、Hwangらの方法⁴⁾に準じて行った。

2. 体内動態の検討

移植 9~10 日めのエールリッヒ腹水癌細胞 (1 × 10⁷ cells) を ddY 雄性マウス (6 週齢) の右肢皮下に移植し、10 日めのものを用いた。⁶⁷Ga 封入リポソームは脂質として約 0.5 mg (約 5 μ Ci)/mouse を *i. v.* 投与した。⁶⁷Ga-citrate (日本メジフィジックス社製) は 0.08 M クエン酸ナトリウムで希釈し、5 μ Ci/mouse を *i. v.* 投与した。一定時間ののち、動物を撲殺、臓器を摘出して、おのおのの放射活性分布をウエル型シンチレーションカウンター (Aloka ARC-300) で測定した。

III. 結 果

Figure 1 は, ^{67}Ga 封入 SUV i. v. 投与後の放射活性の腫瘍への取り込みと血中濃度の経時変化を示したものである。血中からの消失は比較的すみやかであり, 24時間後には約 1% 投与量/ml にまで減少した。一方, 腫瘍への放射活性分布は投与後 12 時間でピークに達し, 以後ゆるやかに減少した。この結果, 投与 24 時間後には腫瘍/血液比 8.0 の値を得た。なお, 他の臓器に関しては, 肝

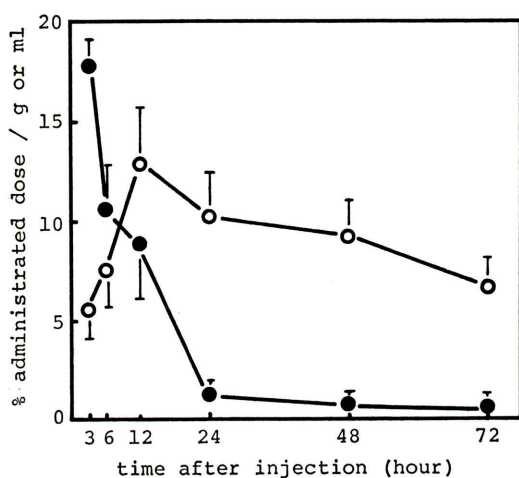


Fig. 1 Time courses of distribution of ^{67}Ga -SUV in tumor and blood after i.v. injection.

Each point represents the mean \pm SD for 6 animals.

○—○: Tumor, ●—●: Blood

Table 1 In vivo distribution of ^{67}Ga -citrate, ^{67}Ga -MLV and ^{67}Ga -SUV at 24 hr after i.v. injection

Organ	% administered dose per gram of tissue		
	^{67}Ga -citrate	^{67}Ga -MLV	^{67}Ga -SUV
Tumor	4.15 \pm 0.56	2.81 \pm 0.89	10.15 \pm 0.56
Muscle	0.49 \pm 0.04	0.37 \pm 0.07	0.45 \pm 0.12
Liver	8.11 \pm 0.74	29.66 \pm 2.98	11.82 \pm 1.92
Spleen	4.97 \pm 0.44	25.10 \pm 0.86	27.96 \pm 8.39
Kidney	13.00 \pm 2.67	4.15 \pm 0.91	4.75 \pm 1.35
Lung	2.67 \pm 0.53	2.81 \pm 0.31	1.80 \pm 0.38
Heart	1.46 \pm 0.28	0.98 \pm 0.27	1.08 \pm 0.11
Blood	2.16 \pm 0.27	1.54 \pm 0.27	1.27 \pm 0.12

Each value represents the mean \pm SD for 6 animals

臓, 脾臓, 腎臓で 6~24 時間にとりこみのピークがみられ, 心臓, 肺臓では経時的に減少した。また, 筋肉にはほとんど集積がみられなかった。

良好な腫瘍/血液比が得られた投与 24 時間後の時点での放射活性の臓器分布を ^{67}Ga -citrate と比較した。また, ^{67}Ga 封入 MLV に関しても, 投与 24 時間後の時点で比較検討を行った (Table 1). ^{67}Ga 封入リポソームの体内動態は, SUV, MLV のいずれとも, ^{67}Ga -citrate とは明らかに異なり, 特に肝臓, 脾臓への蓄積が顕著であった。また, 血中濃度は SUV や MLV の方が ^{67}Ga -citrate よりも低く, リポソームの血中クリアランスの速いことが示された。腫瘍への取り込みは ^{67}Ga -SUV が最も高く, ^{67}Ga -citrate の約 2.5 倍にあたる 10.2% 投与量/g にのぼった。対照的に ^{67}Ga -MLV の集積率は 2.8% 投与量/g にとどまった。

IV. 考 察

リポソームはその性状, 粒径により, multi-lamellar vesicle (MLV), small unilamellar vesicle (SUV), large unilamellar vesicle (LUV) の三者に大別される。放射性核種を保持させた MLV および SUV の腫瘍集積性については幾つかの報告があり, 粒径, 表面電荷等との関連性が検討されている⁵⁻⁷⁾。

本研究では, MLV および SUV の生体動態について検討し, 両者の腫瘍等積性に大きな差があることを明らかにした (Table 1). SUV は MLV の 3.6 倍の集積率を示し, 腫瘍診断への応用には SUV の方が適していることが示唆された。今回用いた MLV, SUV はともに電荷をもたず, 組成も同じであるため, この差異は粒径によるものと考えられる。SUV は 30~60 nm の比較的均一な粒径をもつものに対し, MLV はこれよりかなり大きく, 100 nm 以上に広い分布をもつ。

静脈投与後, リポソームはすみやかに肝・脾などの網内系に捕捉される⁸⁾。MLV はこの捕捉がきわめて速く, 短時間に血中から消失する。一方, SUV は比較的捕捉されにくく, 血中濃度も比較的高く維持される⁹⁾。この結果, 腫瘍と相互作用

をもつ時間が長くなり、とりこみの増加を導くことが予想される。また、粒径が小さいために血管を透過して組織に到達しやすいことも一因であろう。特に腫瘍は毛細管の透過性が正常組織より高いことが知られており¹⁰⁾、SUVの高い腫瘍集積率はこのことに起因することが考えられる。

⁶⁷Ga 封入 SUV を ⁶⁷Ga-citrate と比較した場合、腫瘍集積率は約 2.5 倍の値を示し、かつ SUV は血中消失が比較的速く筋肉にはほとんど集積しないことから、腫瘍/血液比、腫瘍/筋肉比はおのこの ⁶⁷Ga-citrate の 4.1 倍、2.5 倍にのぼった。これらの点より ⁶⁷Ga 封入 SUV の腫瘍診断薬としての有用性が示唆された。さらに電荷や脂質の流動性等の影響についても検討が必要と考えられる。

⁶⁷Ga-citrate は腫瘍部位のみでなく炎症部位にも集積性を示すため、現在のところ両者の核医学的判別は不可能とされており、腫瘍特異性をもつ診断薬の開発が望まれている。一方、リポソームを目的とする組織・細胞に特異的に集めさせる操作・修飾、すなわち targeting は、リポソームをマイクロカプセルとして利用する上で、現在注目を集めている主題のひとつである。腫瘍に関しても、腫瘍特異抗体を膜に結合させ、特異的な腫瘍集積性をもつリポソームを作製することが試みられており¹¹⁾、腫瘍診断の分野にも targeting を導入することにより、特異的診断への飛躍的な発展が期待される。

謝辞：本研究を行うにあたり、⁶⁷GaCl₃ および ⁶⁷Ga-citrate をご提供頂きました日本メジフィジックス社に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Gregoriadis G: The carrier potential of liposomes in biology and medicine. *N Engl J Med* **95**: 704-710, 765-770, 1976
- 2) Caride VJ: Liposomes for diagnostic imaging. *Radiopharmaceuticals—Structure activity relationships—*, Spencer RP eds. Grune & Stratton Inc, New York, 1981
- 3) Proffitt RT, Williams LE, Presant CA, et al: Tumor-imaging potential of liposomes loaded with In-111-NTA: Biodistribution in mice. *J Nucl Med* **24**: 45-51, 1983
- 4) Hwang KJ, Merruam JE, Beaumier PL, et al: Encapsulation, with high efficiency, of radioactive metal ions in liposomes. *Biochim Biophys Acta* **716**: 101-109, 1982
- 5) Neerunjun ED, Hunt R, Gregoriadis G: Fate of a liposome-associated agent injected into normal and tumor-bearing rodents. *Biochem Soc Trans* **5**: 290-291, 1977
- 6) Richardson VJ, Jeyasingh K, Jeskes RF, et al: Possible tumor localization of Tc-99m-labeled liposomes: Effects of lipid composition, charge and liposome size. *J Nucl Med* **19**: 1049-1054, 1978
- 7) Hnatowich DJ, Clancy B: Investigation of a new, highly negative liposomes with improved biodistribution for imaging. *J Nucl Med* **21**: 662-669, 1980
- 8) Gregoriadis G, Ryman BE: Fate of protein-containing liposomes injected into rats. An approach to the treatment of storage diseases. *Eur J Biochem* **24**: 485-491, 1972
- 9) Juliano RL, Stamp D: The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem Biophys Res Commun* **63**: 651-658, 1975
- 10) Ackdrman NB, Hechmer PA: Studies on the capillary permeability of experimental liver metastases. *Surg Gynecol obst* **146**: 884-888, 1978
- 11) Hashimoto Y, Sugawara M, Masuko T, et al: Antitumor effect of actinomycin D entrapped in liposomes bearing subunits of tumor-specific monoclonal immunoglobulin M antibody. *Cancer Res* **43**: 5328-5334, 1983

Summary

Basic Study on the Application of Liposome to Tumor Imaging Agent

Izumi OGIHARA*, Shuji KOJIMA* and Akiko KUBODERA**

* *Department of Radiopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Teikyo University, Kanagawa*

** *Department of Radiopharmacy, School of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo, Tokyo*

In vivo distribution of liposomes entrapped ^{67}Ga was studied in mice bearing Ehrlich solid tumor. Small unilamellar vesicle (SUV) entrapped ^{67}Ga was preferentially concentrated in liver, spleen and tumor. Tumor uptake of ^{67}Ga -SUV was 10.2% administered dose per gram of tumor at 24 hr after i.v. injection. This value was about 2.5 times that of

^{67}Ga -citrate. Tumor to blood ratio and tumor to muscle ratio were respectively. 4.1 and 2.5 times higher than those of ^{67}Ga -citrate respectively.

These results suggested the possible application of liposome to tumor imaging agents.

Key words: liposome, ^{67}Ga , tumor, diagnostic agent.