

## 腫瘍微小循環におけるリポソーム輸送

## Liposomal Transport in Tumor Microcirculation

80716408 澤田英希 (Hideki Sawada) Supervisor 谷下一夫 (Kazuo Tanishita)

## 1 結論

リポソームは抗癌剤などの低分子薬物の輸送ツールとして、研究・製品化されている。癌化学療法の大きな限界は、生体に投与された抗癌剤が、体内に広く分布してしまい、*in vitro* での高い治療効果を発揮できないことである。そのため、リポソームに様々な機能を付加することで、腫瘍組織部位への薬剤の局在性を高める研究がなされている。

リポソームを腫瘍組織へ輸送、蓄積させ薬物を徐放する場合、重要となるのはリポソームの腫瘍組織内での挙動である。腫瘍組織内におけるリポソームの漏出性と間質における挙動が、リポソーム封入型薬剤の標的を決定付ける。つまり、リポソームの腫瘍組織内での挙動を理解し、適切な封入薬剤と組み合わせ、適切な時間での投与が行なわれることで、DDS (Drug Delivery System) として最大の効果を発揮出来る。

しかし、リポソームが腫瘍血管から組織へ漏出するという報告<sup>[1]</sup>はあるものの、未だそのメカニズムは不明な点が多い。

そこで本研究では、粒子径の均一なPEG修飾リポソーム集団を調製し、非侵襲的かつ経時的に生体内微小循環を観察できる動物モデルへ投与することで、複雑で不均一な腫瘍血管から腫瘍組織へリポソームが輸送される様子を解析した。

## 2 実験方法

## 2-1 動物モデル

C3H マウス (雌, 9-11 週齢, 20-24g) に、DSC (Dorsal Skinfold Chamber) 法<sup>[2]</sup>を用いた。腫瘍は、MCA (Mammary Carcinoma) を用い、観察部位に移植約 10 日後、観察を行なった。

## 2-2 DiI 蛍光染色 PEG リポソームの調製

薄膜状態のリン脂質に生理食塩水を加えて水和させ超音波処理を行なった後、エクストルージョン法を用いてサイジングを行ない、100~200nm の粒子径を持つリポソームを作成した。さらに、マウス生体内での蛍光顕微鏡観察のため、蛍光色素DiI(1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanineperchlorate, Molecular Probes)によるリポソーム膜染色を行なった。

## 2-3 蛍光染色赤血球を用いた血管イメージング

血管イメージングのため、蛍光色素 DiO (3,3'-dioctadecyloxycarbocyanine perchlorate, Molecular Probes) を用いて蛍光染色した赤血球 (DiO-RBC) をマウスへ投与、観察領域内血管中を流れる赤血球の様子を取得した。このとき DiO-RBC が通過する領域 (血管) は、時間経過に伴い輝度値が大きく変化する。一方、組織領域では輝度値はあまり変化しない。そこで、各ピクセルにおける観察時間内での輝度値の分散値を計算する<sup>[3]</sup>ことで、血管網をイメージングした。分散値を求める計算式(1)を以下に示した。

$$V(x,y) = \frac{1}{N-1} \left[ \sum_{i=1}^N I_i(x,y)^2 - \frac{1}{N} \left( \sum_{i=1}^N I_i(x,y) \right)^2 \right] \quad (1)$$

$V(x,y)$ :  $(x,y)$  ピクセルの分散値  $N$ : 総フレーム数  
 $I_i(x,y)$ :  $i$  番目フレーム  $(x,y)$  ピクセルのIntensity

## 2-4 リポソーム投与

調製したリポソームをマウス尾静脈より 0.2ml 投与し (10mg/ml), 投与後最大 12 時間までの対象小循環領域の蛍光観察を共焦点顕微鏡下で行った。

## 3 結果・考察

リポソーム投与後 4 h における健常組織と腫瘍組織の蛍光画像と各時間における同部位血管画像を取得した (Figure 1)。

本手法によって、生体内でのリポソームの輸送を経時的に観察するとともに、腫瘍血管の位置についても同定することができた。また、健常組織では血管からのリポソームの漏出は見られなかった。一方、腫瘍組織では、リポソームは血管内に蓄積し、組織へ有意に漏出していた。

これにより、平均粒子径 100~200nm のリポソームは、腫瘍組織特異的に蓄積し、抗がん剤輸送ツールとして有効なものであると考えられる。

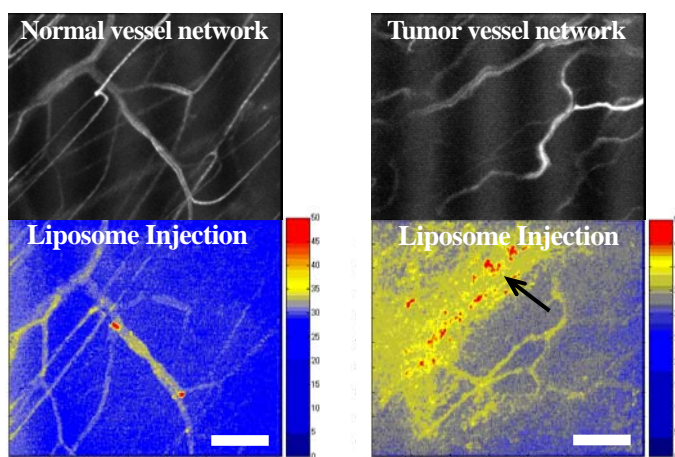


Fig. 1 Morphology of microcirculation (upper panels) & Concentration fields of liposomes (lower panels)

In tumor tissue, liposomes accumulated in blood vessels (arrow) and significantly extravasated. (Scale bar: 100 $\mu$ m)

## 参考文献

- [1] Unezaki S. (1996), International Journal of Pharmaceutics, 1444, 11-17
- [2] Ushiyama A. (2004), Microvascular Res, 68, 147-152
- [3] Japee SA. (2004), Microcirculation, 11, 39-54