

学 位 論 文 要 旨

氏 名 中田 浩史

論 文 名 Span80 ナノベシクルによる新規 DDS を用いたカフェイン併用
化学療法の開発

学位論文要旨

【緒言】 予後不良であった転移を伴う骨肉腫は、近年カフェイン併用化学療法による悪性腫瘍治療が著明な効果を上げているが、多彩な有害事象により、治療からのドロップアウトをみる例も少なくない。これらの問題点を改善すべく、我々は非イオン性界面活性剤 Span80 を用いて、従来のリポソームよりも膜流動性や膜融合性に優れている超微小なベシクルを開発してきた。本論文では、Span80 ナノベシクルを用いたカフェイン併用化学療法によるマウス骨肉腫化学療法モデルが、有害事象の発現を抑制した上で、従来の化学療法よりも高い治療効果を発揮することを提示する。

【材料と方法】 ①治療モデルに用いる薬剤；化学療法剤としてイフォスファミド (IFO) を、治療効果増強剤として安息香酸ナトリウムカフェイン (CSB) を用いた。 ②化学療法剤内包 Span80ベシクルの作製・精製；Span80, Tween80, コレステロールから二段階乳化法を用いて、薬剤を内包したSpan80ナノベシクルを作製した。投与直前にエクストルーダーを用いて平均117nmに粒径を揃えた。 ③in vitroにおけるカフェインおよび抗癌剤内包ベシクルによる抗腫瘍効果の解析；マウス骨肉腫細胞株LM8を24穴培養プレートに散布し、培養液中にPBS (陰性コントロール)、CSB、PBS内包Span80ベシクル (PV)、CSB内包Span80ベシクル (CV)、イフォスファミド内包Span80ベシクル (IV)、IV+CSB、またはIV+CVを培養液中に加えた。 ④トリパンブルーによる死細胞の定量；2時間のインキュベーションの後、0.4%トリパンブルーを加えて数分間染色し、倒立顕微鏡で各ウェル3枚以上撮影した。取り込んだ画像をImage Pro Plusソフトウェアで解析し、死細胞の比率を計算した。 ⑤PI法を用いたアポトーシスの解析；③で薬剤とインキュベーションした細胞を1時間後にPIで染色し、フローサイトメーターで生細

氏名 中田 浩史

胞、アポトーシス細胞、細胞断片のpopulationを解析した。⑥マウス骨肉腫治療モデル；マウス骨肉腫細胞株LM8とその由来マウスC3H/HeJを用いて骨肉腫治療モデルとした。骨肉腫細胞LM8をC3H/HeJマウスの背部皮下に移植し、腫瘍体積が500mm³に達した日を薬剤投与開始日（day0）として、PBS（陰性対照）、CV、IF0、IV、IV+CSB または IV+CVをday0、2、4に投与した。体重及び腫瘍体積を毎日測定した。Day7にマウスを解剖し、腫瘍および全臓器を病理組織学的解析に供した。⑦病理組織学的解析；腫瘍および全臓器のホルマリン固定パラフィン包埋切片を病理組織学的に解析した。腫瘍は壊死部と非壊死部の面積を測定、壊死率をもとめた。全臓器を病理組織学的に解析し、有害事象をスクリーニングした。⑧孕任性試験；IV、IV+CV投与後の雄マウスを6週齢の雌マウスと掛け合わせ孕任性試験を行った。また得られた仔マウスに奇形がないか解析した。⑨体重、腫瘍体積および腫瘍壊死率をANOVA法およびt検定で解析した。

【結果】 ①in vitroにおける抗腫瘍効果の解析；PBS、CSB、PV、CVでは殆ど死細胞を認めなかった。IF0投与で13%、IV投与で28%、IF0+CV投与では75%に死細胞を認めた。IV+CV投与では死細胞は98%にのぼった。②PI法によるアポトーシスの解析；PBS、CSB、PV、CVではほとんど細胞死が認められなかったのに対し、IF0、IVでは約13%、IF0+CSB、IV+CSBでは25-32%にアポトーシス細胞を認め、IV+CVではほとんど生細胞を認めなかった。③in vivoにおける抗腫瘍効果の解析；投与7日目の腫瘍体積の平均値はPBS>CV>IF0>CV>IV+CSB>IV+CVとなり、コントロールに比べて、IV+CSBおよびIV+CV投与群は有意に腫瘍体積増加を抑制した。④in vivo毒性・副作用の解析；各群間で体重に有意差を認めなかった。IF0静注群では腎臓に尿細管傷害とメサングウム増殖性糸球体腎炎を、精巣に生殖細胞の壊死を伴う造精の停止を認めたが、IV投与群では病理組織学的に心、肺、肝、腎、脾、副腎、精巣、唾液腺、涙腺、消化管に異常所見を認めなかった。⑤孕任性試験；IV投与後の雄マウスを用いて孕任性試験を行ったところ、孕任性は保たれており、誕生したマウスに奇形も認めなかった。

【まとめ】 これらの結果より、ifosfamide vesicle と CSB vesicle の同時投与がもっとも強い抗腫瘍効果を発揮し、少なくとも組織学的、生化学的に明らかな有害事象を誘導しないことが明らかとなった。

キーワード（3～5）	Drug delivery system (DDS) Span80 骨肉腫
------------	---