

短報

# アントラサイクリン系抗がん剤エピルビシン封入 エマルジョンの心毒性軽減効果

小野浩重<sup>1)</sup>\*, 清水正高<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> 就実大学薬学部薬物療法設計学研究室, <sup>2)</sup> 宮崎県工業技術センター

## Reduction of the cardiotoxicity of anthracycline antibiotics, epirubicin by emulsification

Hiroshige Ono<sup>1)</sup>\*, Masataka Shimizu<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> *Department of Clinical Pharmacy, School of Pharmacy, Shujitsu University,*

<sup>2)</sup> *Miyazaki Prefectural Industrial Technology Center*

(Received 16 December 2013; accepted 22 January 2014)

---

### Abstract:

Anthracycline antibiotics epirubicin (EPI), a stereoisomer of adriamycin (ADR), has been shown to be less cardiotoxic than those receiving ADR at doses which produced the equal antitumor effects. Nevertheless, a clinically evident cardiotoxicity has been reported in patients receiving high-doses of EPI by combination of G-CSF, with EPI and other chemotherapy. It has been proposed that EPI-induced cardiotoxicity was attributed to the increase in lipid peroxidation resulted from the production of free radical.

We previously reported on the drug-releasing properties of EPI-emulsions prepared by a membrane-emulsification technique using lipiodol (LPD) containing EPI. In the present study, we investigated the disposition of EPI-emulsions in the body and the cardiotoxicity of EPI by the emulsification in ras. The release of EPI from the emulsion prepared by the membrane-emulsification technique with Shirasu Porous Glass (SPG) was found to be sustained in the tissue and plasma. The EPI levels in the heart after administration of EPI-emulsions were quite low compared with EPI-solution. The effectiveness of EPI-emulsions against EPI-induced cardiotoxicity was clearly confirmed by preventing the increase in the lipid peroxidation and CPK activity. The results suggested that the EPI-emulsion may be a useful preparation for reduction of the cardiotoxicity.

**Keywords:** EPI, cardiotoxicity, Shirasu Porous Glass (SPG), EPI-emulsion, lipiodol

---

## 緒言

アントラサイクリン系抗腫瘍性抗生物質の一つであるエピルビシン(EPI)は、急性白血病、悪性リンパ腫の他、乳癌、卵巣癌、胃癌、肝癌及び膀胱癌、腎盂・尿管腫瘍などの尿路上皮癌に対して使用されている。中でも乳癌の治療において重要な役割を担っており、手術可能例における術前、あるいは術後化学療法としてEPIとシクロホスファミド、フルオロウラシルを併用する3剤併用療法(CEF療法)が国際的に用いられてきた。また、2005年にはEPIとシクロホスファミドの2剤併用療法(EC療法)が認められ、標準治療として行われている。その他、切除不能な多血性肝細胞癌に対し、選択的腫瘍集積性を有する油性造影剤であるリピオドール(LPD)をキャリアとして用いた肝動脈化学塞栓療法(transcatheter arterial chemoembolization; TACE)が行なわれるようになり、本邦では標準的な治療法になっている<sup>1)</sup>。

がん化学療法は抗腫瘍効果の増強において治療率の向上に寄与している一方、特有の副作用があり、強い副作用のため治療継続が困難になりことがある。なかでも心臓は循環動態調節の中枢であり、不整脈、虚血や心不全などの有害事象を発生する可能性があり<sup>2)</sup>、心毒性の予防、早期発見・早期治療が不可欠である。

EPIはアドリアマイシン(ADR)の立体異性体であり、ADRと同等の優れた抗腫瘍効果を有し、さらにADRの重篤な副作用である心毒性を軽減した製剤であるが、近年のG-CSF製剤との併用によるEPIの増量や他の抗がん剤との多剤併用療法において心毒性の発現が確認されている<sup>3)</sup>。

EPIは他のアントラサイクリン系抗癌剤と同様、蓄積性の心毒性が発現する可能性があるため、他のアントラサイクリン系薬剤による前治療が限界量に達している患者には投与禁忌である。また、アントラサイクリン系薬剤未治療の場合でもエピルビシンの総投与量が900 mg/m<sup>2</sup>を超えるとうっ血性心不全の発現率が増加するこ

とから、総投与量が制限されている。

心毒性発現機序として、EPIがフリーラジカル産生のインデューサーとなり、細胞内の脂質過酸化を増加させることが報告されており<sup>4)</sup>、EPIの抗腫瘍効果の増強とともに、心毒性を軽減する製剤の研究が行われている<sup>5)</sup>。

EPIは水溶性であるため、TACEにおいてLPDに溶解させるのは困難であり、しばしばO/W型またはW/O型のエマルジョンとして治療に用いられている。我々は、EPIの抗腫瘍効果の増強と副作用の軽減を目的とし、南九州に豊富なシラスを主原料に開発した新素材であるシラス多孔質ガラス(SPG)を利用したSPG膜乳化法によりEPI含有W/O/W型エマルジョン(EPI-emulsion)を調製して薬物放出特性に関する検討を行ってきた<sup>6)</sup>。本研究ではEPI-emulsionの体内動態について検討するとともに、EPIによるラットでの心毒性発現に及ぼすEPI-emulsionの有効性についての評価を行った。

## 方法

### 1) SPG膜の特性

シラスの化学成分はSiO<sub>2</sub>とAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>を主成分としており、これに石灰やホウ酸などを加えてガラス溶解し、成形、熱処理、酸処理を経て50%の空隙率を形成する細孔のSPG膜を形成する。本膜は熱処理条件を調節することによって1 nm～50 μmの範囲で孔径を制御できるほか、孔径が均一であるため本膜を用いたSPG膜乳化法によりエマルジョンを調製することにより乳化粒子径を微細均一にコントロールできる<sup>7)</sup>。

### 2) EPI-emulsionの調製法及び粒度分布測定

SPG膜乳化法を用いたEPI-emulsionの調製法をFig. 1に示す。生理食塩液に溶解したEPIを内水相とし、油相である界面活性剤ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油(HCO40)含有LPD(ゲルベ・ジャパン株式会社)に添加して分散乳化(W/O)した後、孔径20 μmのSPG膜を装填した膜乳化装置に充填し、外水相である生理食塩液にシリン

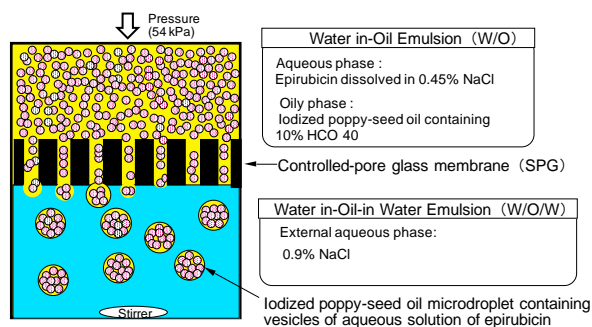


Fig.1. A conception diagram of preparation method by a membrane-emulsification technique.

ジポンプで加圧（流速 5 ml/hr）して W/O/W 型の EPI-emulsion を調製した。対照として W/O と生理食塩液をシリンジで採取し、2 本のシリンジにシリコンチューブを接続し手で往復 20 回ポンピングしてポンピングエマルジョンを調製し、両製剤をレーザー回折／散乱式粒度分布計（島津製作所製, SALD-2000）を用いて粒度分布を測定した。

### 3) 動物実験

6~7 週齢(体重 180-220g)の Wistar 系雄性ラット（九動より購入）を用い、EPI-solution, EPI-emulsion 各々 10mg/kg 及び生理食塩液(対照)を背部皮下または筋肉内投与後、血中及び心臓中 EPI 濃度の測定を行った(n=4)。また、EPI 誘発心毒性に対する EPI-emulsion の有効性を検討するため、心臓の脂質過酸化値及び血清中クレアチンホスフォキナーゼ(CPK)活性測定キット

(CPK II - テストワコー：和光純薬工業)を測定した。さらに、EPI-emulsion の in vivo での製剤特性を検討するため、筋肉内投与後に残存する EPI 濃度を測定した。得られたデータ値は平均値±標準偏差 (mean±S.D.) で表し、Student's-test を用いて統計学的処理を行った。

#### (1) 血中 EPI 濃度の測定

血中 EPI 濃度は、EPI 投与 0.5, 1, 3, 6, 12, 24 時間後に下腿静脈より採血して遠心分離した後、内部標準物質ダウノルビシン塩酸塩 0.02mL を加え、有機溶媒中で抽出後に高速液体クロマトグラフィー（島津製作所製, LC-10A）を用いて Wilma<sup>8)</sup>らの方法に従って血漿中 EPI 濃度を測定

した。検量線は 1.0~1000 nmol/ml の範囲で良好な直線性を示した(r=0.997)。なお、定量限界は 0.015 nmol/mL とし、平均及び標準偏差の算出において定量限界未満は 0 とした。

#### (2) 心臓中 EPI 濃度の測定

投与 1, 3, 6, 12, 24 時間後に麻酔下で下大静脈よりカニューレを挿入し、0.01M リン酸緩衝液(PH7.4)を圧入して肝灌流した後、心臓を摘出して 0.01M リン酸緩衝液(PH7.4)で 10% ホモジネートを調製し、血中 EPI 濃度の測定と同様の方法により心臓中 EPI 濃度を測定した。

#### (3) 筋肉内残存 EPI 濃度の測定

筋肉内投与を行った後、1, 3, 6, 12, 24 時間後に投与部位である大腿部筋肉の一定面積を摘出して 10%ホモジネートを調製し、有機溶媒で抽出後、血中 EPI 濃度の測定と同様の方法により EPI 濃度を測定した。

#### 4) 脂質過酸化値の測定

投与 1, 3, 7, 14 日後に心臓を摘出し、0.01M リン酸緩衝液(PH7.4)緩衝液で 10%ホモジネートを調製し、脂質過酸化値を測定した。脂質過酸化はテトラエトキシプロパンを標準物質とし、吸光光度法（測定波長 532 nm）により蛋白質 1 mg 当たりのチオバルビツール酸反応物質 (TBARS) 量として表した。なお、蛋白質量は Lowry 法<sup>9)</sup>に従って 750 nm における吸光度を測定した。

#### 5) CPK 活性の測定

投与 0.5, 1, 3, 7 日後に頸静脈より採血後に遠心分離し、得られた血清を測定試料に用いた。測定は CPK 活性測定キットを用い、吸光光度法により測定した。

## 結果・考察

ポンピングエマルジョンまたは SPG 膜乳化法を用いて調製した EPI-emulsion の粒度分布を Table 1 に示す。ポンピングエマルジョンでは内水相を包含したリピオドール粒子の平均粒子径は 113.6µm であり、粒子径分散係数  $\delta$ [ $^{10}D_w/o$

Table 1. Particle size distribution of the iodized poppy-seed oil microdroplets in EPI-emulsion and Pumping emulsion

Cumulative volume	Particle size (μm)	
	EPI-emulsion	Pumping emulsion
10%	40.497	44.590
50%	52.569	152.983
90%	67.128	258.577
Average	52.569	113.636
Dispersion coefficient (δ)	0.510	1.399

—<sup>90</sup>Dw/o) /<sup>50</sup> Dw/o]により粒子径の分散性を調べた結果、1.4 で多分散性であった。一方、EPI-emulsion は平均粒子 52.6μm でポンピングエマルジョンの約 1/2 の粒子径であり、分散係数 0.51 で単分散性の高い微細均一なエマルジョンが得られた。

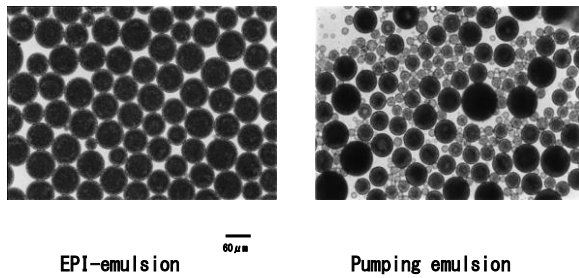


Fig.2. Light micrograph of W/O/W emulsion

光学顕微鏡画像 (Fig.2) により両剤の粒子を観察した結果、ポンピングエマルジョンでは油滴粒子が不均一であり、Table 1 に示した粒度分布と一致して平均粒子径より大きな粒子が多数みられた。また、水滴粒子が油滴に封入されていないエマルジョンが多数観察されたのに対し、EPI-Emulsion ではEPIを含む内水相水滴が油滴粒子に無数の小さな点として観察され、充填率の高い単分散性エマルジョンであることが確認された。

In vitro の実験により EPI-emulsion の製剤学的有用性が確認されたことから、本剤と臨床で

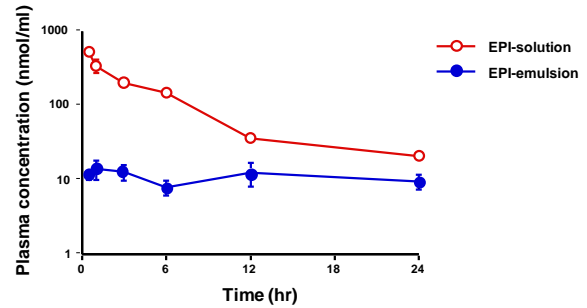


Fig.3. Plasma concentrations of epirubicin after injection of EPI-emulsion or EPI-solution

通常投与される EPI 水溶液をラットに投与し、血中濃度の推移を比較検討した (Fig.3) . その結果、EPI-solution 投与群の投与 30 分後の血中 EPI 濃度は 514.4 nmol/mL と高濃度を示し、その後徐々に減少し 24 時間後の値は 21.3 nmol/mL であった。本データをもとに台形公式により血漿中濃度曲線下面積 (AUC) を算出した結果、AUC (μg/hr/mL) は 6.29 であった。一方、EPI-emulsion 投与群では投与 30 分後の血中 EPI 濃度は 11.7 nmol/mL と低値を示し、その後も有意な変化はみられず AUC は 0.26 であった。

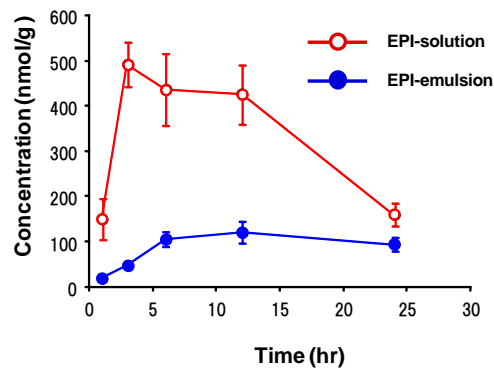


Fig.4. Epirubicin level in heart after injection of EPI-emulsion or EPI-solution

EPI は蓄積性の心毒性を発現するため、EPI-Solution, EPI-emulsion 投与後の心臓中 EPI 濃度を比較検討した (Fig.4) . EPI-solution 投与群における心臓中 EPI 濃度は投与 3 時間後にピークに達し、その後 12 時間後まで高濃度を示した。一方、EPI-emulsion 投与群での EPI 濃度は投与 1

時間後から12時間後まで徐々に上昇したものの、EPI-solution 投与群に比べて低い薬物濃度の推移を示し、AUCを比較した結果、EPI-solution 投与群のAUCは8.73でEPI-emulsionのAUC2.49に比べて約3.5倍高く、EPI-emulsionでは投与部位に残留することによりEPIの心臓への移行を抑制していることが示唆された。

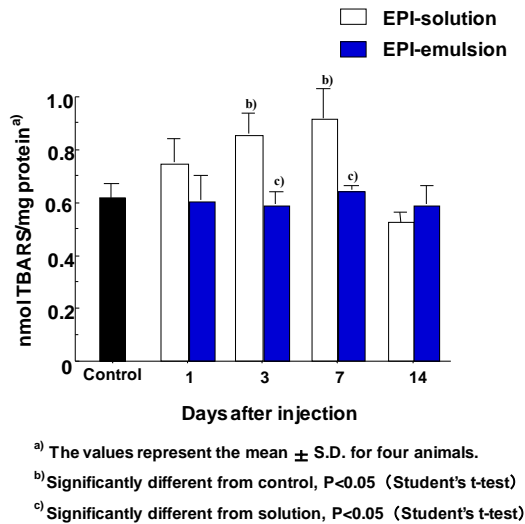


Fig.5. Lipid peroxidation in the heart of rats after injection of EPI-emulsion or EPI-solution

EPIの心臓中濃度に基づいたEPI誘発心臓毒性とEPI-emulsionの有効性を検討するため、EPI-solution投与群とEPI-emulsion投与群の脂質過酸化値を測定した(Fig.5)。その結果、EPI-solution投与群では投与3日後から心臓の脂質過酸化値の有意な増加を示し、投与7日後まで増加した。一方、EPI-emulsion投与群では投与1日後から14日後までコントロールと有意差はみられず、脂質過酸化値の増加を抑制した。

CPKは心臓をはじめ骨格筋、平滑筋など筋肉中にある酵素であり、これらの細胞に異常があるとCPKが血液中に流れ出すため、高い数値を示す。そこでEPIによる心筋障害に対するEPI-emulsionの有効性を検討するため、EPI-solution投与群とEPI-emulsion投与群の血清中CPKを比

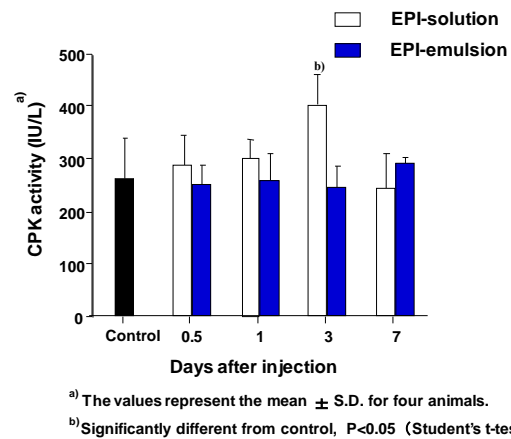


Fig.6. CPK activity in the heart of rats after injection of EPI-emulsion or EPI-solution

較検討した(Fig.6)。EPI-solution投与により血清中CPK活性が増加し、3日後には対照群の1.5倍まで増加して心筋障害が惹起していることが示唆された。これに対し、EPI-emulsion投与群では対照群と有意差がなく、脂質過酸化値と同様に組織移行性の低下による心毒性軽減効果が認められた。

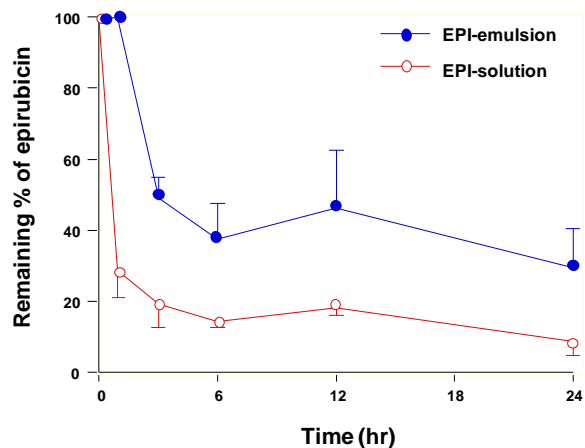


Fig.7. Epirubicin remaining level in femoral muscle after injection of EPI-emulsion or EPI-solution

EPI-solution投与群では高濃度の血中EPI及び心臓への移行による脂質過酸化値の増加と血清中CPK活性の増加が見られたが、EPI-emulsion投与群では血中及び心臓中EPI濃度の増加が抑制され、心毒性が軽減されることが確認された。

そこで、EPI-emulsion 投与後の体内挙動を明らかにするため、投与部位に残存する EPI 濃度の検討を行った。血中及び心臓中 EPI 濃度測定は EPI 皮下投与により実施したが、皮下投与後の残存 EPI 濃度の検出は困難であったため、皮下投与より吸収性の速い筋肉内投与を実施し、投与部位に残存する EPI 濃度を測定した (Fig.7)。その結果、EPI-solution 投与群は投与 1 時間後に投与量の 30%以下に低下し、24 時間後には 9.0%の残存率であった。一方、EPI-emulsion 投与群では 1 時間後ほぼ 100%投与部位に残存し、24 時間後においても 29.4%残存していることが確認された。今回、データを示していないが、EPI-emulsion 投与群の肝臓中 EPI 濃度を調べた結果、投与 12 時間後まで徐々に減少したが 24 時間後には有意な増加が見られた。

以上の結果、EPI-emulsion は投与部位に長く貯留し、徐々に血中及び組織中に移行する特性を有していることが確認され、心毒性を軽減することが明らかになった。EPI-emulsion は薬物保持率が高く均一な油滴径であることから、肝動脈注射において塞栓効果により腫瘍新生血管の阻害作用が期待され、臨床での TACE に適した安全性の高い製剤であると考えられる。

## 謝辞

本研究を行うに際し、終始御指導と御鞭撻を賜りました前宮崎医科大学 (現在宮崎大学) 教授・医学部附属病院薬剤部長の篠澤眞也先生に深甚なる感謝の意を表します。本研究の機会を与えて下さり、御助言、御協力を賜りました元宮崎県工業技術センター長の中島忠夫先生に深謝致します。本研究を行うに際し、御協力頂いた宮崎医科大学 (現在宮崎大学) 医学部附属病院薬剤部の柏木さつき元薬剤師に心から感謝致します。

## 引用文献

- 1) Matsui O., Kadoya M., et al. Small hepatocellular carcinoma treatment with Subsegmental trans-catheter arterial embolization. *Radiology*. 188 (1) 79-83 (1993).
- 2) 板垣文雄, 菅真悠子ほか. 血液疾患におけるアントラサイクリン系抗がん剤の累積投与量と心毒性発現. *医療薬学*, 34,297-301 (2008).
- 3) Ryberg M., Nielsen D., et al. Epirubicin cardiotoxicity: an analysis of 469 patients with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 11, 3502-3508 (1998).
- 4) Mimnaugh E.G., Kennedy K.A., et al. Adriamycin-enhanced membrane lipid peroxidation in isolated rat nuclei. *Cancer Res.*, 45, 3296-3304 (1985).
- 5) Takahashi A., Yamamoto Y., et al. NC-6300, an epirubicin-incorporating micelle, extends the antitumor effect and reduces the cardiotoxicity of epirubicin. *Cancer Sci.*, 104 (7), 920-925 (2013).
- 6) Ono H., Yamasaki K., et al. New approach for oral insulin preparation with emulsion as drug carrier. *Proceeding of the 36th SPG forum, international*. 31-34 (2001).
- 7) Shimizu M., Nakashima T. Preparation and its stability of monodispersed W/O/W emulsion by membrane emulsification. 宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告. 13-19 (2005).
- 8) Wilma I.W.D., Jan G., et al. Determination of epirubicin and its metabolite epirubicinol in saliva and plasma by HPLC. *Ther Drug Monit.*, 25, 433-440 (2003)
- 9) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193 (1), 265-275 (1951).