

新規肝細胞癌治療剤 ミリプラチンの研究開発

大日本住友製薬株式会社
製剤研究所
田 中 一 成
安全性研究所
国 松 武 史
薬物動態研究所
島 倉 仁
薬理研究所
花 田 充 治

Development of Miriplatin, a Novel Antitumor Platinum for Hepatocellular Carcinoma

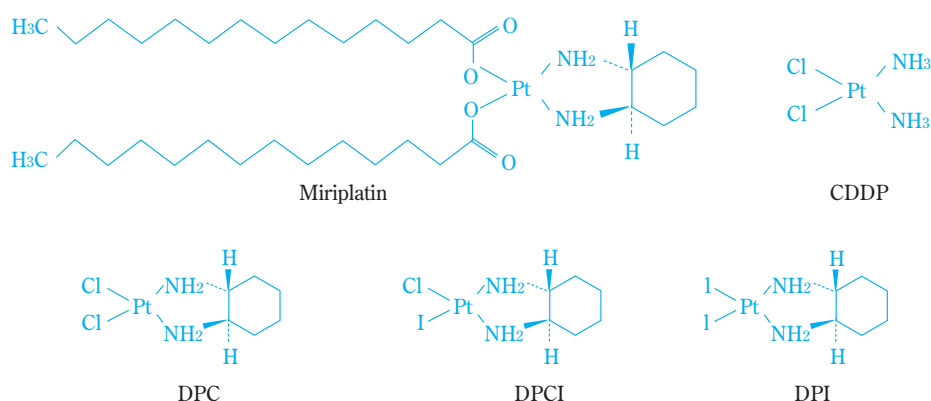
Dainippon Sumitomo Pharma Co., Ltd.
Formulation Research & Development Laboratories
Kazunari TANAKA
Safety Research Laboratories
Takeshi KUNIMATSU
Pharmacokinetics Research Laboratories
Jin SHIMAKURA
Pharmacology Research Laboratories
Mitsuharu HANADA

Miriplatin was approved for lipiodolization for the treatment of hepatocellular carcinoma in 2009. It is a lipophilic platinum complex containing myristates as leaving groups, and can be easily suspended in ethyl esters of iodized fatty acids obtained from poppy seed oil. Miriplatin suspension was active and was retained selectively in rat hepatic tumors after intra-hepatic arterial administration with reduced toxicities in normal livers and the whole body. In this review, we summarize the characteristic formulation, preclinical studies, and clinical studies of miriplatin.

はじめに

肝細胞癌の90%以上は肝炎ウイルスに起因する慢性肝炎・肝硬変を素地に発生し、治療後も高率に多中心性・異時性再発を繰り返すことから、肝予備能を維持しつつ腫瘍の病勢を制御することが生命予後を改善する^{1),2)}。そのような背景から、現在の肝細胞癌治療アルゴリズムは、肝障害度、腫瘍個数及び腫瘍径の3つの因子を治療の選択基準として組み立てられている³⁾。肝障害度が低度～中等度であり、3 cm以内の腫瘍が3個までであれば、外科切除あるいは内科的局所療法（ラジオ波熱凝固療法、マイクロ波凝固療法、経皮的エタノール注入療法）の対象となる。また、外科切除や内科的局所療法が適応できない進行肝細胞癌の場合には、肝動脈化学塞栓療法あるいはリピオドリゼーションといった肝動脈塞栓療法が広く施行されており、本邦では肝細胞癌の約30%がその治療対象となっている⁴⁾。これらの療法は、正常肝組織が門脈から約75%、

肝動脈から約25%と2重の血液供給を受けているのに対し、肝細胞癌が主に肝動脈から血液供給を受けていること、そして肝動脈内に投与された油性造影剤ヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル（懸濁用液）が腫瘍選択的に滞留することを背景にしている。リピオドリゼーションでは、肝細胞癌に滞留した懸濁用液から放出された制癌剤が抗腫瘍効果を担っていると考えられており、これに塞栓物質を併用する肝動脈化学塞栓療法では、更に肝動脈血流の遮断による効果も加わると考えられている。これら肝動脈塞栓療法に汎用される制癌剤は、シスプラチン（CDDP）、エピルピシン、ドキシソルピシン、マイトマイシンCあるいはジノスタチンスチマラマー（ZS）等である。これらの中でZSのみが懸濁用液に懸濁して肝動脈内投与する制癌剤として承認されているが、他の制癌剤はいずれも懸濁用液に懸濁して肝動脈内投与する用法・用量では認可されておらず、かつ水溶性であるために、最適な懸濁方法が標準化されていない。そのため、これまで肝動脈塞



Chemical structures of miriplatin (left upper), CDDP (right upper), DPC (left lower), DPCI (middle lower), DPI (right lower).

Fig. 1 Chemical structures

栓療法に汎用されてきたこれら制癌剤では、懸濁用液とともに腫瘍選択的に滞留する利点が十分に活かされていないと考えられた。そこで、懸濁用液への親和性が高い制癌剤を創製することによって、肝動脈塞栓療法において腫瘍局所での抗腫瘍効果を高めつつ、肝臓非腫瘍部や全身への影響を軽減できることを期待し、我々は脂溶性白金系制癌剤の研究開発を開始した。

国立がんセンターの前田らによって見出されたミリプラチン（ミリプラ[®]、(SP-4-2)-[(1R,2R)-cyclohexane-1,2-diamine-*N,N'*] bis (tetradecanoato-*O*) platinum) は、脱離基にミリスチン酸、担体配位子にジアミノシクロヘキサン（DACH）を有する2価の白金系制癌剤である（Fig. 1）⁵⁾。

脱離基に種々の脂肪酸を有する白金錯体を合成し、それら合成化合物の中から、懸濁用液への懸濁しやすさ、懸濁液から生理食塩水への白金放出性、さらに担癌マウスでの延命効果を指標にした *in vivo* 細胞増殖抑制作用の観点で本剤は選択された。本邦において、ミリプラチンは肝細胞癌におけるリピオドリゼーションを効能・効果として2009年に承認され、2010年1月から販売されている。承認されたミリプラチンの用法・用量では、本剤70 mgを懸濁用液3.5 mLに懸濁し、1日1回肝動脈内に挿入されたカテーテルより投与する。本剤の投与は、腫瘍血管に懸濁液が充満した時点で終了することとし、上限は1回6 mL（ミリプラチンとして120 mg）である。また、繰り返し投与する場合には、4週間以上の観察期間をおく必要がある。

以下、ミリプラチンの製剤の特徴、非臨床試験の成績及び臨床試験の成績について概略を示す。

製剤の特徴

ミリプラチン凍結乾燥製剤は、次の2点をその特徴とする。すなわち、懸濁用液に容易に懸濁可能であり、

かつ懸濁後の分散安定性が良好である。これらを達成するため、製剤化工程に凍結乾燥法を適用している。

ミリプラチン原薬結晶は原薬粒子同士の凝集性のため、超音波処理等の特殊な処理を加えない限り、懸濁用液に均一に分散させることは困難であった。しかし、凍結乾燥法によって得られたミリプラチン製剤は、平均粒子径が10 μm程度の球状微粒子を形成しており（Fig. 2）、粒子の比表面積も増大していた。このような粒子の改質によって、懸濁用液への濡れ性を高めた結果、懸濁用液を添加した直後にバイアルを手で振るだけの簡便な懸濁操作で、均一な懸濁液を調製することが可能となった（Fig. 3）。また、懸濁粒子は懸濁操作後、室温で24時間以上の長時間にわたって分散状態を維持することも確認された。

ミリプラチンが懸濁用液に対して高い親和性を有するのであれば、上述の通り調製されたミリプラチンのヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル懸濁液（ミリプラチン懸濁液）からは緩やかに白金成分が放出されると考えられた。そこで、回転振とう法による *in vitro* 放出試験系を構築し、ミリプラチン懸濁液からの白金成分の放出特性を評価した。最初に、生理食塩水を試験液として選択し、生理食塩水中の白金成分濃度を経時的に測定した。その結果、試験開始から1ヶ月後あるいは3ヶ月後の白金放出率は、それぞれ僅かに1%程度あるいは4%程度であり、ミリプラチン懸濁液からの白金成分の放出が極めて緩やかであることが確認された（Fig. 4-A）。次に、より生体環境を反映した系として、0.1% ポリソルベート 80 を含有するラット血清を試験液として同様の評価を行ったところ、生理食塩水よりも早い放出速度を示したが、白金放出率は2週間で約50%であり（Fig. 4-B）、ミリプラチン懸濁液が長期徐放性を持つことが示唆された。さらに、試験液を0.5 M塩酸に変更することで、加速的な評価を実施したところ、粒子径が大きい程、放出速度は低下した。90% D値

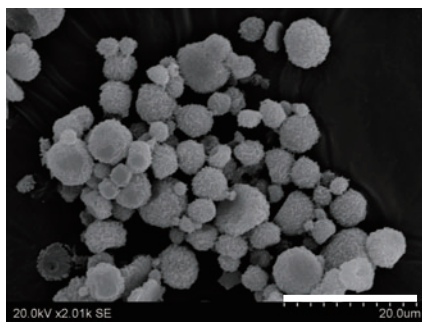


Fig. 2 Scanning electron micrograph of freeze-dried particle of miriplatin

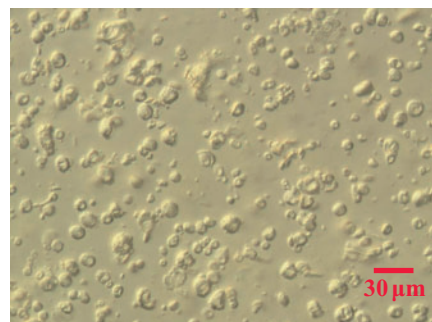
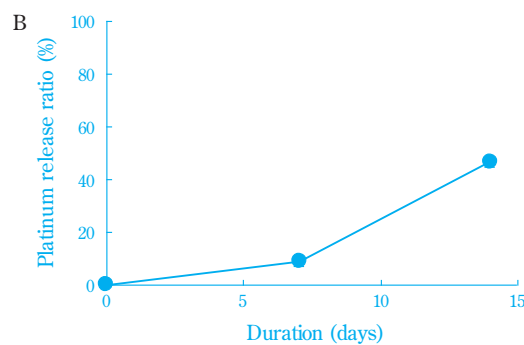
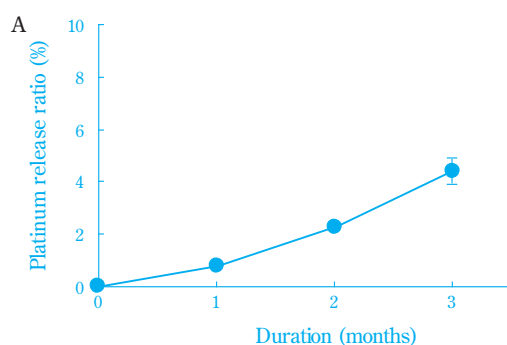
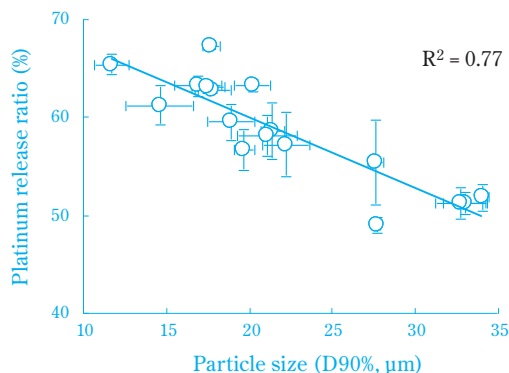


Fig. 3 Differential interference contrast micrograph of miriplatin suspended in ethyl ester of iodized fatty acids obtained from poppy seed oil



A) 0.1 mL of miriplatin suspension (20 mg/mL) was layered over 10 mL of physiological saline in test tubes. Test tubes were rotated vertically for 1, 2, and 3 months at 5 rpm in an incubator at 37°C.
 B) 0.5 mL of miriplatin suspension (20 mg/mL) was layered over 10 mL of rat serum containing 1% polysorbate 80 in test tubes. Test tubes were rotated vertically for 7 and 14 days at 5 rpm in an incubator at 37°C.
 The amounts of platinum in the aqueous phase were quantitatively analyzed by atomic absorption spectrometry. Platinum release ratio (%) was calculated with the following formula: $A/B \times 100$, where A is the amounts of platinum released in the aqueous phase, and B is the amounts of platinum in miriplatin suspension added into test tubes. All results are given as the mean \pm SD (n=3).

Fig. 4 Platinum release profile from miriplatin suspension to physiological saline (A) and rat serum (B)

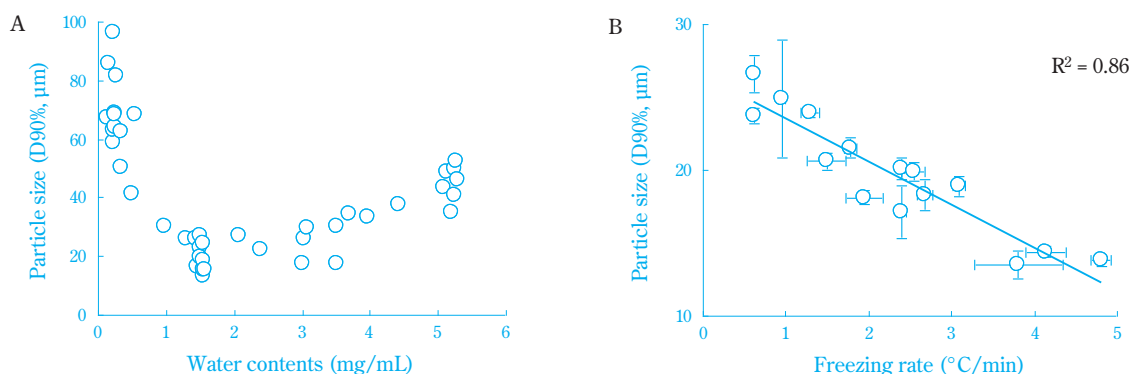


17 profiles of miriplatin with indicated particle size were suspended in ethyl ester of iodized fatty acids obtained from poppy seed oil (iodinated poppy seed oil). 0.1 mL of miriplatin suspension (20 mg/mL) was layered over 50 mL of 0.5 M HCl in test tubes. Test tubes were rotated vertically for 6 days at 15 rpm in an incubator at 25°C. All results are given as the mean \pm SD (n=3).

Fig. 5 Dependence of particle size on platinum release ratio

(全体積分布のうち、粒子径が小さい方から90%となる粒子径)と試験6日目の白金放出率の関係を確認したところ、両者には高い相関が認められた (Fig. 5)。従って、ミリプラチン懸濁液からの白金成分の放出制御には、製剤粒子径を規定することが重要であると考えられた。

これらの結果を受け、種々の製剤製造パラメータと製剤粒子径の関係を精査した結果、凍結乾燥前に調製する *tert*-ブチルアルコール溶液中の微量の水分含量及び凍結乾燥工程での凍結速度が重要であることが判明した (Fig. 6)。すなわち、適切な製剤粒子を達成するためには、*tert*-ブチルアルコール溶液中の水分含量を一定範囲に保ち、また凍結乾燥工程においては凍結速度を速くすることが必要であった。これらの検討から得られた知見に基づいて、商用生産においても適切な工程管理を設定し、目的とする粒子径を有する製剤の安定的な生産を実現している。



Miriplatin prepared under the indicated conditions was suspended in isopropyl myristate, and analyzed for particle size distribution. D90% represents a value on the distribution such that 90% of the particles have a volume of this value or less. All results are given as the mean in A, and the mean \pm SD (n=2 or 3) in B, respectively.

Fig. 6 Dependence of water contents in bulk solution (A), and freezing rates in freeze drying process (B) on particle size distribution

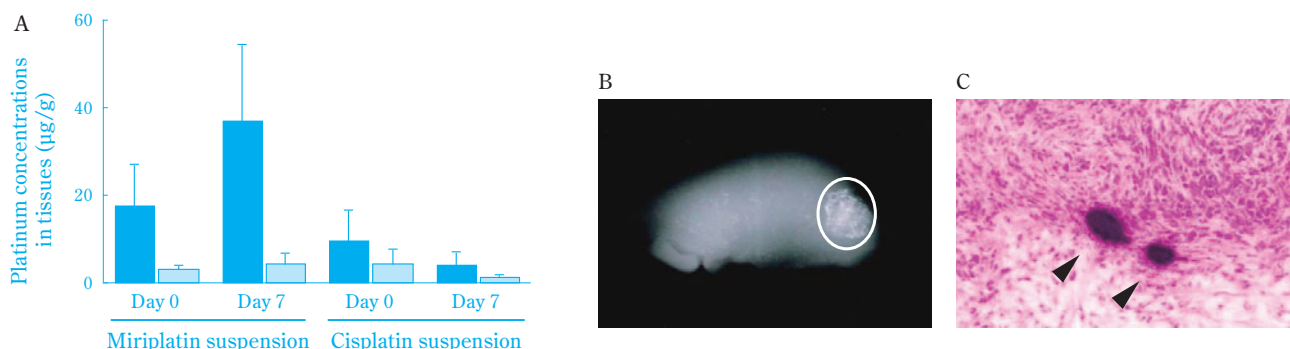
非臨床試験成績

1. 薬物動態

(1) 腫瘍滞留性

ミリプラチンは脂溶性化合物であるとともに、製剤の形状や粒子径が制御されているため、ミリプラチン懸濁液から血清や生理食塩水への白金成分の放出は緩やかに持続した。このようにミリプラチン懸濁液が徐放性を有しているならば、腫瘍滞留性が高まっていることが予想されたため、ラット移植肝癌モデルを用いて、肝動脈内投与後の組織内白金量をミリプラチン懸濁液とCDDPのヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル懸濁液(CDDP懸濁液)との間で比較した (Fig. 7-A) ⁶⁾。

その結果、いずれの薬剤も正常肝組織よりも腫瘍組織の方に高濃度に分布したが、腫瘍組織では、CDDP懸濁液よりもミリプラチン懸濁液の方が高い白金濃度を示した。経時的な変化に関しては、CDDP懸濁液の場合、投与7日後には組織内白金濃度が約1/3に低下したのに対し、ミリプラチン懸濁液の場合には7日後まで殆ど低下しなかった。また、ミリプラチン懸濁液を投与して7日後の肝臓を軟X線撮影すると、懸濁液が腫瘍組織選択的に滞留していることが明らかとなった (Fig. 7-B)。さらに、¹⁴C 標識したミリプラチン懸濁液を用いて、薬剤分布をマイクロオートラジオグラフィーで調べた結果、投与7日後には放射能が腫瘍血管内に分布している病理像が観察された (Fig. 7-C)。一方、正常肝に分布した放射能は、マクロファージ様細胞に



- A) Platinum concentrations in tumor and normal liver tissues. Miriplatin suspension (400 μ g/head) and CDDP suspension (400 μ g/head) were injected into the hepatic artery of AH109A tumor-bearing rats at the volume of 0.02 mL/head. Immediately and 7 days after the administration, resected livers were divided into tumor tissues (■) and normal liver tissues (□). Tissue homogenates incinerated using nitric acid and hydrogen peroxide were dissolved in 4% aqua regia and introduced to flameless atomic absorption spectrometry. All results are given as the mean \pm SD (n=7).
- B) Distribution of iodinated poppy seed oil. Miriplatin suspension (400 μ g/head) was injected into the hepatic artery of tumor-bearing rats at the volume of 0.02 mL/head. Seven days after the administration, resected livers were radiographed with a soft X-ray machine. White circle indicates tumor site.
- C) Distribution of ¹⁴C-labeled miriplatin. ¹⁴C-labeled miriplatin suspension (400 μ g/head) was injected into the hepatic artery of tumor-bearing rats at the volume of 0.02 mL/head. Seven days after the administration, resected livers were frozen, sectioned to 5 μ m slices, and subjected to microautoradiography. Arrow heads indicate tumor vessels filled with miriplatin suspension.

Fig. 7 Platinum concentrations in rat livers, distribution of iodinated poppy seed oil, and ¹⁴C-labeled miriplatin

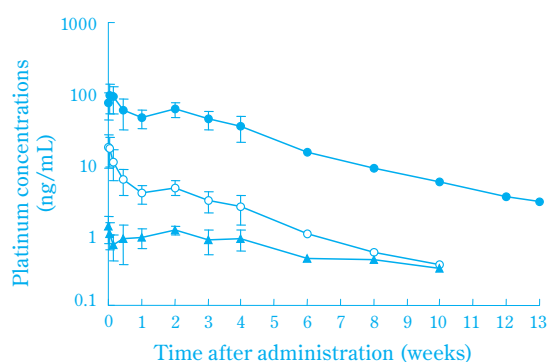
取り込まれている像が観察され、ミリプラチン懸濁液が肝実質細胞には広く分布しないと考えられた。

以上のことから、ミリプラチン懸濁液は、CDDP懸濁液よりも高濃度に長く腫瘍組織選択的に分布することが示された。

(2) イヌにおける薬物動態

ミリプラチンの全身レベルでの薬物動態を検討するため、ミリプラチン懸濁液を、臨床における投与方法と同様の手法、すなわち、大腿動脈からのカテーテル挿入により正常イヌに単回肝動脈内投与し、投与後13週まで、血漿中濃度、組織分布及び排泄率を測定した。

血漿中総白金濃度は低濃度で持続的な濃度推移を示



Total platinum (●), methanol extractable platinum (○), ultrafiltrable platinum (▲). All results are given as the mean \pm SD of six (-day 1) or four (day 3-week 4) animals, or the mean of two (week 6-13) animals.

Fig. 8 Plasma concentrations of platinum after single intra-hepatic arterial administration of miriplatin suspension to normal dogs at a dose of 2.4 mg/kg

し、白金成分の循環血中への移行が緩やかであることを反映していると考えられた (Fig. 8)。血中に放出された白金成分は、類薬であるCDDPやオキサリプラチンなどと同様に、血中で蛋白に不可逆的な結合をすることを考えられるため⁷⁾、総白金濃度に加え、メタノール抽出画分濃度 (蛋白可逆結合型成分及び蛋白非結合型成分が含まれる) 及び限外濾過液中濃度 (蛋白非結合型成分が含まれる) を測定した。メタノール抽出画分濃度及び限外濾過液中濃度は、それぞれ総白金濃度の10%程度、数%程度と低く、概ね総白金濃度と並行して推移した。これらのことから、肝動脈内投与後、血中に放出された白金成分は大部分が蛋白結合型で存在し、その多くは有機溶媒で抽出されない不可逆的な結合をしていることが示唆された。

組織分布については、投与後1日では、投与白金量の大部分が肝臓中に分布していた (Table 1)。肝臓以外の組織では、肺、胆嚢、脾臓、膵臓、腎臓皮質などで他よりも高い分布が認められたが、投与量に対する割合はいずれも1%未満であった。この結果から、肝動脈内投与により、ミリプラチン懸濁液が選択的に肝臓内に送達されていることが確認された。投与後日数の経過に伴い、体内に残留する白金量は低下したが、投与後1日と同様、大部分は肝臓中に分布しており、他の組織への分布量はわずかであった。また、投与後13週までに尿中に66.27%及び41.75%、糞中に10.81%及び9.75%、合計77.08%及び51.51%が排泄され、主要排泄経路は尿中であった。

以上の結果から、肝臓内に選択的に送達されたミリプラチン懸濁液は長期間肝臓内に滞留すること、その間、白金成分は徐々に循環血中へ放出され、主に尿中へ排泄されることが明らかとなった。

Table 1 Tissue distribution and excretion of platinum after single intra-hepatic arterial administration of miriplatin suspension to normal dogs at a dose of 2.4 mg/kg

Samples	Time after administration / Animal number					
	Day 1		Day 28		Week 13	
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
Brain	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Heart	0.02	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01
Lung	0.11	0.14	0.17	0.09	0.03	0.04
Liver (total)	82.50	81.95	44.85	40.79	15.38	16.32
Gall bladder	0.01	0.02	0.02	< 0.01	< 0.01	0.01
Spleen	0.05	0.06	0.12	0.06	0.04	0.05
Pancreas	0.03	0.09	0.97	< 0.01	0.20	< 0.01
Kidney (cortex)	0.06	0.09	0.54	0.41	0.39	0.31
Kidney (medulla)	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Excretion ^{a)}						
Urine	-	-	18.36	17.67	66.27	41.75
Feces	-	-	4.56	3.46	10.81	9.75
Total	-	-	22.92	21.14	77.08	51.51

Results are expressed as % of dose.

a) Cumulative excretion until the sacrifice.

(3) 活性体DPCの生成

一般的に、白金系制癌剤は、脱離基が遊離してDNAと結合すること（白金-DNAアダクト形成）により、抗腫瘍効果を発現すると考えられている。そして、白金系制癌剤の脱離基が生体中の求核因子と置換する求核置換反応は、非酵素的な物理化学的反応であり、オキサリプラチンやテトラプラチンのように担体配位子にDACHを有する白金系制癌剤の場合には、dichloro [(1*R*, 2*R*)-1,2-cyclohexanedamine-*N,N'*] platinum (DPC) が共通した活性体として報告されている^{7,8)}。従って、ミリプラチン懸濁液から放出される活性体もまたDPCであることが予想された。実際に、ミリプラチン懸濁液をEarle緩衝液（アミノ酸や蛋白質を含まないことを除き、組成は血清や培地と類似した緩衝液）と混合し、水相中へ放出された白金成分を分析すると、DPC、chloro [(1*R*, 2*R*)-1,2-cyclohexanediamine-*N,N'*] iodo platinum (DPCI) 又は [(1*R*, 2*R*)-1,2-cyclohexanediamine-*N,N'*] diiodo platinum (DPI) が主成分であり、中でもDPCが最も多かった（Table 2）。また、ミリプラチン懸濁液をラット、イヌ及びヒト血清と混合すると、蛋白結合体やアミノ酸配位体に加えて、DPCが検出された。

Table 2 Formation of DPC after incubation of miriplatin suspension with Earle's balanced salt solution for 7 days

		Concentrations in the buffer phase
Total platinum ^{a)} (µg/mL)		0.85 ± 0.09
	DPC	0.42 ± 0.03
Component ^{b)} (µg eq. Pt/mL)	DPI	0.044 ± 0.003
	DPCI	0.18 ± 0.02
	Total	0.65 ± 0.02

3 mL of miriplatin suspension (20 mg/mL) was layered over 6 mL of Earle's balanced salt solution in test tubes. Test tubes were rotated vertically for 7 days at 5 rpm in an incubator at 37°C. Buffer phase was analyzed by a) atomic absorption spectrometry or b) inductively coupled plasma-mass spectrometry combined with liquid chromatography. Results are given as the mean ± SD of triplicates.

一方で、*in vivo* 血漿試料においては、上述の通り血漿中白金成分の大部分は蛋白結合体として存在し、DPCは検出されなかった。この理由は、ミリプラチン懸濁液からの白金成分の放出が緩やかであることに加え、DPCが蛋白質やアミノ酸と結合し速やかに消失することによって、循環血中DPC濃度としては検出限界未満の極めて低濃度で推移するためであると考えられた。

2. 安全性

ミリプラチン懸濁液は、腫瘍近傍血管（固有肝動脈の可能な限り末梢から投与）を旨とした肝動脈内投与

が適用されることから、ミリプラチン懸濁液の安全性評価では、標的組織である肝臓への影響とミリプラチン懸濁液が循環血中に移行した場合の全身への影響について明らかにすることが必要であった。そこで、肝臓への影響については、臨床投与方法と同じ方法によりイヌに肝動脈内投与した系で評価し、全身への影響については、一般毒性評価及び生殖毒性評価では皮下投与で、安全性薬理評価及び遺伝毒性では静脈内投与で評価を行った。また、活性体であるDPCの安全性評価も実施した。

(1) ミリプラチンの安全性評価

(i) 一般毒性評価

① 肝臓における安全性評価

懸濁可能な最大濃度（20 mg/mL）のミリプラチン懸濁液を、臨床での最大投与量に相当する、あるいはそれを上回る投与量で、イヌの肝動脈内に単回及び反復投与（4週間に1回の頻度で計3回、又は計6回反復投与）した結果、単回投与で主として肝臓の血管内への投与液の塞栓によると考えられる変化が見られたが、反復投与によっても、増悪化は見られず、新たな所見も認められなかった。また、投与部位である血管への障害を示唆する所見も認められなかった。

肝細胞癌患者の多くが肝硬変を併発していることから、肝硬変併発時の本剤の安全性を検討するため、チオアセトアミドにより慢性肝炎や肝硬変に類似した肝障害を誘発したイヌを用いてミリプラチン懸濁液を肝動脈内に単回投与した。その結果、正常イヌを用いた試験と同様、主として肝臓の血管内への投与液の塞栓によると考えられる変化が認められたが、肝障害の増悪化並びに新たな所見は認められなかった。

② 全身における安全性評価

全身への高曝露を達成するために実施したラットの皮下投与の系では、1ヵ月間及び6ヵ月間の反復投与を行ったが、血漿蛋白の変動、血漿総コレステロールの増加及び肝臓重量の増加が認められたのみであり、全身性の毒性は極めて弱く、投与期間を延長することによって毒性が増強することもなかった。6ヵ月間投与試験における無毒性量は雄では25 mg/kg、雌では12.5 mg/kgであり、臨床の最大曝露量の約11倍に相当した。

また、安全性薬理評価として、ミリプラチンの各器官系の機能に及ぼす影響を*in vitro*系及び*in vivo*系で評価した。ミリプラチンのエマルジョン製剤をマウス、ラット、ネコ及びイヌへ単回静脈内投与し、中枢神経系、呼吸・循環器系、自律神経系・平滑筋、消化器系、泌尿器系及び血液系に及ぼす影響を検討した。*in vitro*試験では平滑筋及び血小板凝集能に及ぼす影響を

検討した。その結果、ミリプラチンに起因すると考えられる作用は認められなかった。

(ii) その他の安全性評価

① 遺伝毒性評価及び生殖発生毒性評価

遺伝毒性評価においては、細菌を用いた復帰突然変異試験で陽性であったが、培養細胞を用いた染色体異常試験及びミリプラチンエマルジョン製剤のマウスを用いた小核試験では陰性であった。

生殖発生毒性評価はラット及びウサギへの皮下投与の系で実施した。ラットにおける受胎能及び胚・胎児発生に関する試験、出生前及び出生後の発生並びに母動物の機能に関する試験、及びウサギにおける胚・胎児発生に関する試験を実施した。その結果、ラットの25 mg/kg以上の投与で母動物の機能に及ぼす影響及びそれに伴う出生児の生存性の低下が認められたが、ミリプラチンには胚・胎児致死作用及び催奇形作用はなく、胎児発育にも影響を認めなかった。

② 抗原性試験及び好酸球数増加に関する検討

臨床試験において、ミリプラチン特有の有害事象として、投与後1~3週間をピークとする一過性の好酸球百分率の増加が認められた。そこで、ミリプラチン投与時の抗原性を評価するために、各種抗原性試験を実施すると共に、機序解明を目的として種々の検討を実施した。その結果、ウサギ能動的全身性アナフィラキシー（ASA）反応、ウサギーモルモット受身皮膚アナフィラキシー（PCA）反応、モルモットASA反応、PCA反応及びマウスラットPCA反応ではすべて陰性であった。また、好酸球数増加の機序解明を目的として実施したウサギの静脈内投与試験、ラットの静脈内投与試験及び肝動脈内投与試験では一過性の血液中の好酸球数増加が認められた。ウサギの静脈内投与により抗ミリプラチン抗体（IgG）の上昇が認められたが、ラットの静脈内投与又は肝動脈内投与では抗体産生を認めなかった。以上により、ミリプラチンがアナフィラキシーのような重篤な抗原性を示す可能性は低いことが示唆された。ラットの肝動脈内投与試験では、投与3日後に好酸球の肝臓への浸潤、投与7日後に血液中及び骨髄中の好酸球数の増加、骨髄中のIL-5陽性細胞（T細胞）の増加が確認された。更に、ヒト好酸球を用いて、ミリプラチンの細胞遊走化能の検討を行った結果、ミリプラチン自身には好酸球の遊走化能がないことが明らかとなった。

これらの結果から、臨床試験で認められた好酸球数の一過性の増加は、ミリプラチン懸濁液の間接的な作用による肝臓への好酸球の遊走化とそれに引き続いて起こる骨髄中IL-5陽性細胞（T細胞）の増加に伴う骨髄中好酸球数の増加に起因する可能性が示唆された。

一方、肝臓への好酸球浸潤は一過性であり、血液学的検査、血液生化学検査に肝毒性を示唆する所見は認められなかったことから、重篤な肝障害を引き起こす可能性は低いことが示唆された。

(2) 活性体DPCの安全性評価

活性体DPCについては、全身曝露での毒性評価を実施するため、ラットに皮下投与を行い、DPCの毒性の質的把握を行った。その結果、投与部位への障害性変化及びDPCの細胞増殖抑制作用に起因すると考えられる種々の変化が認められ、反復投与試験における無毒性量は0.03 mg/kgであった。なお、前述のとおり、DPCはミリプラチン懸濁液投与後、蛋白等との反応により速やかに消失し、循環血中には検出されない。また、DPCの安全性薬理評価として、中枢神経系、呼吸・循環器系、平滑筋及び血液系に及ぼす影響を検討した。その結果、DPCは麻酔イヌの呼吸・循環器系に影響を及ぼしたが、いずれも高用量（3 mg/kg、静脈内投与）で認められた一過性の軽度な変化であった。

以上のように、ミリプラチン懸濁液を用いて、イヌに肝動脈内投与したところ、肝臓の血管内の塞栓によると考えられる変化が認められたものの、反復投与による増悪化は認められず、かつ肝障害のモデル動物を用いても、障害は増悪化しなかった。また、皮下投与により全身への影響を調べたところ、極めて弱いことが判明した。さらに、安全性薬理評価からミリプラチンは種々の器官系に対し、重篤な副作用を予測させる機能的変化を示さなかった。臨床試験で認められた好酸球数の増加は、ミリプラチンの間接的な作用による好酸球の肝臓への遊走化と、それに引き続いて起こる骨髄中IL-5陽性細胞（T細胞）の増加に伴う骨髄中の好酸球数の増加に起因する可能性が示唆され、アナフィラキシーのような重篤な抗原性を示す可能性は低いことも示唆された。

3. 薬効薬理

(1) 活性体DPCの*in vitro*細胞増殖抑制作用

ラットあるいはヒト由来の肝癌細胞株に対するミリプラチン、DPC、DPI、CDDP及びZSの*in vitro*細胞増殖抑制作用を検討した^{6),9)}。Table 3に示したように、IC₅₀値（細胞増殖を50%抑制する薬剤濃度）を指標にすると、DPCの*in vitro*細胞増殖抑制作用は、DPIよりも強く、CDDPやZSと同程度であった。なお、懸濁液を担体として用いない場合、難水溶性のミリプラチンには活性が認められなかった。従って、前述の*in vitro*及び*in vivo*における代謝経路の検討結果に加え、*in vitro*細胞増殖抑制作用の強さからも、ミリプラチンの主な活性体はDPCであると考えられた。

Table 3 *In vitro* antitumor activities of miriplatin, DPC, DPI, CDDP, and ZS against rat and human liver cancer cell lines

Cell Lines	IC ₅₀ (µg/mL)				
	Miriplatin	DPC	DPI	CDDP	ZS
AH109A	> 20	0.14 ± 0.07	0.83 ± 0.32	0.30 ± 0.07	0.13 ± 0.00
HepG2	> 20	0.26 ± 0.24	2.3 ± 1.0	0.96 ± 0.27	0.32 ± 0.19
HuH-7	> 20	1.9 ± 1.8	6.5 ± 2.4	1.2 ± 0.3	0.69 ± 0.18
Li-7	> 20	0.31 ± 0.02	2.1 ± 0.2	0.42 ± 0.03	0.22 ± 0.05

One day after the plating of cells into microplates, miriplatin, DPC, DPI, CDDP, and ZS were added as aqueous solutions. Cells were exposed to agents for three days at 37°C in 5% CO₂. The IC₅₀ value was defined as the concentration inhibiting cell growth by 50% compared with control. All results are given as the mean ± SD of triplicates.

(2) ミリプラチン懸濁液の *in vivo* 腫瘍増殖抑制作用

ラット移植肝癌モデル、ウサギ移植肝癌モデルあるいはラット化学肝発癌モデルといった種々の肝癌モデルにおいて、ミリプラチン懸濁液は単回肝動脈内投与により *in vivo* 腫瘍増殖抑制作用を示している^{6), 9)-11)}。これらの中から、ラット移植肝癌モデルにおいて、ミリプラチンと他剤の効力を比較した結果を **Table 4** に示した。

肝動脈化学塞栓療法やリピオドリゼーションでは、主に腫瘍の大きさ、血流動態、肝障害の程度に応じて投与量が個別に調整されるため、局所における有効性の根拠となる薬剤曝露量（投与量）は、懸濁液中の薬剤濃度により規定されると考えられる。そのため、懸濁液中の薬剤濃度を臨床で使用される濃度と同じに設定して、ミリプラチン、CDDP及びZSの3剤間で効力を比較した。投与1週間後の腫瘍増殖率を指標にすると、懸濁液と比較して、ZSのヨード化ケシ油脂肪酸エチルエステル懸濁液（ZS懸濁液、濃度1 mg/mL）には効果がなく、ミリプラチン懸濁液やCDDP懸濁液（ともに濃度20 mg/mL）では、腫瘍増殖率が有意に低下した。また、体重変化については、比較したいずれの場合にも有意な減少は認められなかった。なお、本

モデルにおいては、懸濁液単独では腫瘍増殖への影響は認められなかった。以上のことから、懸濁液中の薬剤濃度を臨床で使用される濃度と同じにした条件下では、ミリプラチン懸濁液の *in vivo* 腫瘍増殖抑制作用はZS懸濁液よりも強いことが示された。

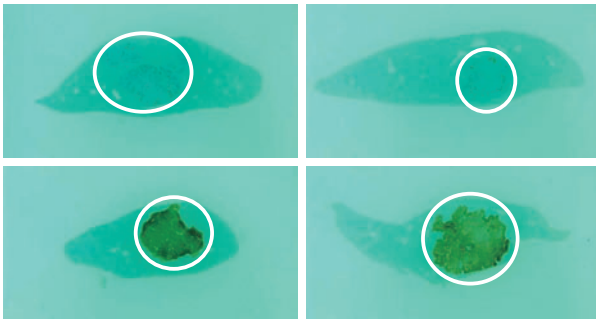
(3) 作用機序

白金系制癌剤の作用機序として、白金-DNAアダクト形成作用やアポトーシス誘導作用が重要であるとされている¹²⁾。これらの作用について、ラット肝癌細胞株AH109Aやヒト肝癌細胞株Li-7を用いて検討した結果、ミリプラチン懸濁液はCDDP懸濁液と同様に *in vitro* で白金-DNAアダクト形成作用やアポトーシス誘導作用を有することが示された^{6), 9)}。更に、ミリプラチン懸濁液を肝動脈内投与したラット移植肝癌モデルの腫瘍組織において、DNAに結合した白金が、1 µgのDNAあたり61 ± 52 pg検出されたことやterminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL) 染色陽性の細胞が認められたことから (**Fig. 9**)、*in vivo* においてもミリプラチンは白金-DNAアダクト形成作用やアポトーシス誘導作用を有することが示された⁶⁾。

Table 4 Antitumor activities of miriplatin suspension, CDDP suspension, and ZS suspension at the therapeutic dose after intra-hepatic arterial administration

Treatment	Dose (µg/head)	Tumor growth rate (%)	Body weight change (%)
Untreated		213 ± 29	-2.8 ± 7.3
Sham-operated		202 ± 106	-1.2 ± 2.1
Iodinated poppy seed oil		185 ± 37	-3.1 ± 3.2
Miriplatin suspension	400	67 ± 24	* -2.9 ± 1.9
CDDP suspension	400	33 ± 23	* -4.7 ± 4.3
ZS suspension	20	175 ± 31	-1.9 ± 1.7

Miriplatin suspension (400µg/head), CDDP suspension (400µg/head), ZS suspension (20µg/head), and iodinated poppy seed oil alone were injected into the hepatic artery of AH109A tumor-bearing rats at the volume of 0.02 mL/head. Seven days later, tumor growth rates and changes in body weight were evaluated. No agent was administered in the untreated group (only measurement of tumor size) or sham-operated group (measurement of tumor size and occlusion of the gastroduodenal artery). All results are given as the mean ± SD (n=7). A Dunnett test of the tumor growth rate or change in body weight at day 7 demonstrated a significant difference, **p* < 0.01, comparing the group treated with iodinated poppy seed oil alone to those treated with agents.



Miriplatin suspension (400 µg/head), CDDP suspension (400 µg/head), and iodinated poppy seed oil alone were injected into the hepatic artery of tumor-bearing rats at the volume of 0.02 mL/head. Three days after the administration, livers were resected and fixed in formalin. Paraffin sections of livers were stained by the TUNEL method and counter-stained with hematoxylin. (Left upper) untreated, (right upper) iodinated poppy seed oil alone, (left lower) miriplatin suspension, (right lower) cisplatin suspension. White circles indicate tumor sites.

Fig. 9 TUNEL staining of rat livers bearing tumors

臨床試験成績

ミリプラチンの第I相臨床試験は、CDDP抵抗性の肝細胞癌症例を対象に、1回あたりの投与量を最大6 mLに固定し、懸濁液中のミリプラチン濃度を漸増するデザインで実施された¹³⁾。その結果、肝動脈内投与1回あたりの最大許容量は20 mg/mL以上と推定されたことから、本剤の推奨用量は20 mg/mL（ミリプラチンとして120 mg）とされた。ミリプラチン投与後の最大血中白金濃度は5.3~14.2 ng/mLと非常に低く、また半減期も18~707日と極めて長かった。この推奨用量で実施された前期第II相臨床試験では、肝細胞癌症例15例中9例（60.0%）が肝癌治療直接効果判定基準のCR（腫瘍縮小効果100%あるいは壊死効果100%）であった¹⁴⁾。安全性については、グレード4以上の重篤な副作用は認められず、ほとんどが投与4~6週間後には回復した。さらに、本剤2回目投与から3ヶ月後に外科切除が行われた1例において、肝臓の非癌部に比べて癌部では組織内白金濃度が約9倍高かった。

続く後期第II相臨床試験では、ZS懸濁液（1 mg/mL）を対照薬とした並行群間比較試験により、ミリプラチン懸濁液（20 mg/mL）の有効性及び安全性が検討された¹⁵⁾。肝癌治療直接効果判定基準に準じて抗腫瘍効果を判定した結果、主要評価項目であるTE V（壊死効果100%又は腫瘍縮小率100%）の割合は、ミリプラチン懸濁液群（n=83）で26.5%、ZS懸濁液群（n=39）で17.9%であった。また、2年生存率はミリプラチン懸濁液群で75.9%、ZS懸濁液群で70.3%、3年生存率はミリプラチン懸濁液群で58.4%、ZS懸濁液群で48.7%であった。グレード3以上の有害事象の発現割合は、ミ

リプラチン懸濁液群では59.0%（49/83）、ZS懸濁液群では64.1%（25/39）であった。死亡を含む重篤な有害事象の発現割合は、ミリプラチン懸濁液群で10.8%（9/83）、ZS懸濁液群で7.7%（3/39）であった。死亡は、両群各1例に認められたが、ミリプラチン懸濁液群の死亡例についてミリプラチンとの因果関係は否定された。その他の重篤な有害事象は、ミリプラチン懸濁液群で8例、ZS懸濁液群では2例に認められた。ミリプラチン懸濁液群8例については、4例が重篤な有害事象発現により2回目の投与を中止したものの、8例とも無処置又は適切な処置により回復しており、2例は治験薬との因果関係が否定された。また、ZS懸濁液群で高率に発現した血管障害がミリプラチン懸濁液群では認められなかった。これらの成績から、ミリプラチンは懸濁用液に懸濁し肝動脈内に投与する唯一の既承認医薬品であるZSと比べて遜色ない抗腫瘍効果を示し、より安全で有用な薬剤であると考えられた。

一般的に、肝動脈化学塞栓療法における塞栓物質は、血流遮断効果による抗腫瘍効果の上乗せが期待できる一方、肝臓非癌部への影響も強めると懸念されている。前述のとおり、ミリプラチンの臨床試験はいずれもリピオドリゼーションで実施されており、塞栓物質の併用経験はなかった。そのため、少数例で塞栓物質を併用した本剤の安全性及び有効性を検討する目的のパイロット試験が行われた¹⁶⁾。その結果、塞栓材併用により抗腫瘍効果は増強される可能性が示唆され、安全性の面においては、リピオドリゼーションで実施した試験と比べて、臨床問題となる新たな有害事象や肝臓に対して大きな問題となる有害事象も認められなかった。

これらの試験成績をふまえ、塞栓材併用で本剤とエピルピシンを比較する第III相臨床試験が進行中である。

おわりに

静脈内注射剤としてのCDDPは、様々な癌種において標準的な併用化学療法を構成する制癌剤であるが、進行肝細胞癌に対する全身投与での効果は高くない。一方、肝細胞癌治療のリピオドリゼーションに応用されたCDDP懸濁液では、腫瘍選択的な薬剤分布や良好な抗腫瘍効果が報告されているが¹⁷⁾、CDDP懸濁液の調製方法は標準化されるには至っていない。肝動脈塞栓療法が進行肝細胞癌に広く施行されている実態に反して、本療法に使用すべき制癌剤については、臨床エビデンスが十分ではなく、いずれも標準治療薬として確立されているわけではない。そこで、優れた局所療法である肝動脈化学塞栓療法やリピオドリゼーションに使いやすい、すなわち懸濁液の調製が標準化・最適化された制癌剤を目指して、我々は懸濁用液への親和性が高い脂溶性白金系制癌剤をコンセプトにミリプラチンを創製した。

ミリプラチンは、肝細胞癌におけるリピオドリゼーションを効能・効果とする初めての白金系制癌剤である。

肝癌は本邦を含む東アジアで罹患率が高く、財団法人がん研究振興財団の「がんの統計'10」によれば、2005年の国内罹患数は、胃癌、肺癌、結腸癌、乳癌に次いで5番目に多い。また、原発性肝癌のうち、肝細胞癌が約90%を占めている。進行肝細胞癌では、肝予備能を維持しつつ腫瘍の病勢を制御することが生命予後を改善すると考えられているが、完全な治癒は殆ど見込めない。そして、最近では分子標的薬が導入されたとはいえ、肝細胞癌が極めて難治性である実態は未だ続いている。このような治療環境の中で、新規肝細胞癌治療剤ミリプラチンがより多くの患者にとって福音となることを期待している。

引用文献

- 1) J. M. Llovet, A. Burroughs and J. Bruix, *Lancet*, **362**, 1907 (2003).
- 2) J. M. Llovet and M. Beaugrand, *J. Hepatol.*, **38**, S136 (2003).
- 3) 科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン作成に関する研究班, “科学的根拠に基づく肝癌診療ガイドライン”, 2005年版, 金原出版 (2005).
- 4) 日本肝癌研究会追跡調査委員会, *肝臓*, **51**, 460 (2010).
- 5) M. Maeda, N. A. Uchida and T. Sasaki, *Jpn. J. Cancer Res.*, **77**, 523 (1986).
- 6) M. Hanada, A. Baba, Y. Tsutsumishita, Y. T. Noguchi, T. Yamaoka, N. Chiba and F. Nishikaku, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **64**, 473 (2009).
- 7) F. R. Luo, T-Y. Yen, S. D. Wyrick and S. G. Chaney, *J. Chromatograph. B*, **724**, 345 (1999).
- 8) S. G. Chaney, S. Wyrick and G. K. Till, *Cancer Res.*, **50**, 4539 (1990).
- 9) M. Hanada, A. Baba, Y. Tsutsumishita, T. Noguchi and T. Yamaoka, *Cancer Sci.*, **100**, 189 (2009).
- 10) S. Kishimoto, M. Fukui, S. Fukushima and M. Nakano, *Reg. Cancer Treat*, **1-2**, 25 (1992).
- 11) Y. Ono, H. Yoshioka, A. Ohkusa, T. Okafuji, A. Kawakami and O. Ishida, *J. Jpn. Soc. Cancer Ther.*, **27**, 49 (1992).
- 12) V. M. Gonzalez, M. A. Fuertes, C. Alonso and J. M. Perez, *Mol. Pharmacol.*, **59**, 657 (2001).
- 13) S. Fujiyama, J. Shibata, S. Maeda, M. Tanaka, S. Noumaru, K. Sato and K. Tomita, *Brit. J. Cancer*, **89**, 1614 (2003).
- 14) T. Okusaka, S. Okada, T. Nakanishi, S. Fujiyama and Y. Kubo, *Invest. New Drugs*, **22**, 169 (2004).
- 15) T. Okusaka, H. Kasugai, H. Ishii and SM-11355 Japan Study Group, *J. Clin. Oncol.*, **27**, 4583 (2009).
- 16) K. Ikeda, T. Okusaka, M. Ikeda and M. Morimoto, *Jpn. J. Cancer Chemother.*, **37**, 271 (2010).
- 17) J. Shibata, S. Fujiyama, T. Sato, S. Kishimoto, S. Fukushima and M. Nakano, *Cancer*, **64**, 1586 (1989).

PROFILE



田中 一成
Kazunari TANAKA

大日本住友製薬株式会社
製剤研究所
主任研究員



島倉 仁
Jin SHIMAKURA

大日本住友製薬株式会社
薬物動態研究所
主席研究員 薬学博士



国松 武史
Takeshi KUNIMATSU

大日本住友製薬株式会社
安全性研究所
主席研究員 薬学博士



花田 充治
Mitsuharu HANADA

大日本住友製薬株式会社
薬理研究所
主任研究員 農学博士