単離腫瘍灌流実験系を利用した薬物移行特性
評価法の開発

井本博文・大河内一宏・高倉喜信・橋田 充・瀬崎 仁*

Development of evaluation method for drug disposition in tumor using tissue-isolated tumor perfusion system

New method to evaluate drug disposition characteristics in tumor was developed employing rat tissue-isolated Walker 256 carcinosarcoma perfusion system. Mitomycin C and its lipophilic and macromolecular prodrugs used as a prototype of targeting DDS were administered from the arterial side by bolus injection or constant infusion. By applying moment analysis and so on, disposition characteristics of these drugs in tumor were elucidated and discussed in relation to their physicochemical properties.

These experimental system was thus suggested to be useful in evaluating drug disposition in tumor.

Hirofumi Imoto・Kazuhiro Ohkouchi・
Yoshinobu Takakura・Mitsuru Hashida・
Hitoshi Sezaki*

*key words : disposition characteristics,
tissue-isolated tumor preparation,
perfusion experiment, moment theory*

ドラッグデリバリーシステム(DDS)の開発においては、素材や製剤手法など調製にかかわる方法論の開発とともに、作成されたシステムが設計されたとおりの機能性を有するかどうかを評価する方法論の確立が重要な役割を果たす。とりわけ、標的作用部位への選択的送達を目的としたターゲティング型 DDS の開発においては、薬物の標的への移行動態を定量的に把握し、システムの物理化学的特性と関連づけて解析することを可能にする実験解析系の開発が不可欠の条件になるものと考えられる。

筆者らの研究グループでは、こうした観点から、

抗癌剤を対象にしたターゲティング型 DDS の開発¹⁻³⁾と並行して、癌病巣における薬物移行動態の評価解析系の開発を行ってきた。すでに、担癌マウスを用いた全身投与系における癌病巣への分布特性の評価解析法⁴⁾、リンパ指向性 DDS の評価法⁵⁾、あるいは VX2 担癌家兎下肢灌流実験系を利用した組織移行性評価法⁶⁾について報告を行っているが、今回、ラット単離腫瘍組織標本に対する血管灌流実験系を利用して、腫瘍組織における薬物動態を解析する方法を開発したので報告する。

ここで利用した単離腫瘍組織標本は、Gullino らによって 1961 年に報告されたもので⁷⁾、現在に至るまで彼や共同研究者の Jain らによって腫瘍組織の生理学的特性の研究に利用されている⁸⁾。筆者らは、この実験系では家兎下肢を用いる系などとは異なり、完全に単離された状態で腫瘍病巣の灌流が行える点に注目し、同時に、筆者らがすでに理論誘導を行った indicator dilution 実験に対するモーメント解析法⁹⁾と組み合わせることにより、腫瘍病巣における薬物動態の解析を可能にした。

材料と方法

(1) 単離腫瘍標本の作成

Wistar 系雌性ラット(6週齢)の左腹部を切開し、左卵巢周囲脂肪組織に約 2 mm 角に切った Walker 256 癌肉腫切片を移植後、脂肪組織全体を薄いプラスチックフィルムで包み、周囲と隔離した状態で腹部皮下空間に固定し、腫瘍を成長させた。1週間後にプラスチックフィルムを交換し、腫瘍が約 2 cm 径に成長した移植後 2 週間の時点で灌流実験を行った。

(2) 灌流実験手技

腫瘍移植ラットを開腹し、左腎動静脈付近より

* Department of Basic Pharmaceutics, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University 京都大学薬学部薬剤学教室

図1 ラット単離腫瘍灌流実験系の概要

分岐している腫瘍部へ向かう血管系を残して、左腎および副腎動静脈、下大動静脈の心臓側と側腹血行路を結紮した。ただちに、カテーテルを下大動脈つづいて下大静脈の末梢側に挿入し、動脈側より注入した灌流液が、腫瘍組織中を経て静脈側より流出することを確認した。灌流液には 90% O_2 -5% CO_2 で平衡化した 4.7% ウシ血清アルブミン含有タイロード液を用い、流速は 0.8 ml/min に設定した。

(3) 薬物の腫瘍組織内動態解析法

薬物の組織移行性評価法は、大きく、動脈側に瞬時投与したあとと静脈側に流出する薬物の希釈曲線を解析する indicator dilution 実験 A と、一定濃度の薬物を動脈側より定速で供給し、静脈側への流出液あるいは組織内濃度の変化を観察する定速注入実験 B にわけられる。それぞれの実験方法に対し、実験結果から組織内動態を示すパラメータを誘導する解析法が存在するが、得られる情報の内容が異なるので、評価対象薬物(DDS)の特性、実験精度などに応じた選択が必要である。

実験 A：瞬時投与実験(indicator dilution 実験)

瞬時投与は、灌流回路に六方バルブインジェクターを組み込み、これを用いて薬物を矩形注入することにより行った(図1)。各標本に対して、評価対象薬物と血管内のみを通過し、組織側へ移行

しない標準物質(vascular reference substance, VRS)であるエバンスブルー標識ウシ血清アルブミン(EB/BSA)を注入し、それぞれの dilution curve を得た。得られた dilution curve にモーメント解析を適用し、曲線下面積(AUC)と平均通過時間(MTT)のようなモーメントパラメータ(moment parameter)を求め、つづいて、分布・消失の各側面から局所薬物動態を表す分布容積、回収率などの高次のパラメータ(disposition parameter)を導いた⁹⁾。

実験 B：定速注入実験

一定濃度の薬物を含む灌流液を 3 時間連続して灌流した後灌流液を切り替え、血管内に残留した薬物を 5 分間洗い流し、この間の静脈側流出液中の薬物濃度を定量した。また、灌流終了後、組織中に蓄積した薬物濃度を定量した。組織中薬物濃度を、この間の灌流液中薬物濃度の AUC で除すことにより、組織取り込み速度を計算した。

(4) 評価薬物

本実験系の DDS 評価における有用性を明らかにするために、筆者らの研究室で開発したマイトマイシン C(MMC)の脂溶性低分子プロドラッグと高分子化プロドラッグ(図2)を抗癌剤 DDS のプロトタイプとし、それぞれの腫瘍組織移行性を評価した。MMC の脂溶性プロドラッグとして選んだ pentyloxycarbonyl-MMC(pentyl-MMC)

図 2 評価対象としたマイトマイシンCプロドラッグの化学構造

は、MMC の活性発現基であるアジリジン基に脂溶性側鎖を導入したもので、オクタノール/水間分配係数が 0.41 (MMC) から 279.2 (pentyl-MMC) へと増大し高い脂溶性を有している。

一方、高分子化プロドラッグとしては、MMC を平均分子量 7 万の dextran に結合させ、正および負電荷を付与した MMC-dextran 結合体 (MMCDcat.), (MMCDan.) を選んだが、これらは生理的条件下 (pH 7.4, 37°C) で自然加水分解により MMC を徐放 (放出半減期 24~35 hr) することが確かめられている。

結果と考察

移植した腫瘍の成長とともに、移植部位である脂肪組織は、平均 8 グラムの腫瘍細胞により構成された単離腫瘍組織となり、それに伴って、卵巣と脂肪組織に血流を供給していた 1 組の動静脈は腫瘍組織への血流の供給にその機能を転じた。形態的には特に腫瘍組織からの血流が戻る静脈の拡張が顕著であった。

このように作成した単離腫瘍組織が 1 対の動静脈により栄養支配を受けることにより、正常組織を含まずに、腫瘍病巣のみを選択的に灌流することが可能となった。

そこでつぎに、本実験系の薬物移行動態評価に

図 3 pentyl-MMC 瞬時投与実験により得られた典型的な dilution curve

における有用性を明らかにするために、pentyl-MMC と MMC の移行動態を、瞬時投与実験により検討した。pentyl-MMC を動脈側より矩形で投与することにより得られた dilution curve (図 3) は、同一の標本から得られた VRS の dilution curve と比較して、最高濃度の低下と後半の濃度低下の遅延化を特徴とし、組織への取り込みと血管灌流液へのもどりがこれらに反映されているものと推察された。

また、MMC についても同様に dilution curve が得られた。そこで、dilution curve より表 1 に

表1 dilution curve をモーメント解析して算出したパラメーター

	pentyl-MMC	MMC	VRS
AUC (%・投与量・秒/ml)	4526	5678	8266
平均通過時間: MTT (秒)	68.6	72.1	58.3
回収率: F	0.55	0.69	1
分布容積 (ml/g)	0.197	0.172	0.092
CLint. u (ml/min/g)	0.465	0.0541	—

示すようにモーメントパラメーターと局所動態をあらわすパラメーターを算出し、移行現象の定量化を図った。VRS と比較して pentyl-MMC、MMC では、AUC の低下、平均通過時間の延長が認められ、また、分布容積もおおの VRS の 2.1 倍と 1.9 倍に増大し、両薬物が血管外組織へ移行していることも示唆された。pentyl-MMC と MMC とを比較すると、VRS の AUC に対する MMC の AUC の比としてあらわされる回収率 F において、MMC は 0.69 であったのに対し、pentyl-MMC では 0.55 となり、組織に取り込まれる割合は pentyl-MMC のほうが大きいことが示唆された。また、蛋白質非結合型薬物の組織における処理の受けやすさを示す CLint. u の値でみると、pentyl-MMC が MMC の 8.6 倍となり、前者が組織に効率よく取り込まれ薬効を発現することが示唆された。

一方、今回の実験系で得られる VRS の分布容積 (0.092 ml/g) は組織単位重量当りの血管内容積に相当するが、この値は Walker 256 癌肉腫についての他の方法で求められた値ともほぼ一致し、本実験系が腫瘍標本の特性を代表していることが示された。

以上の結果より、今回採り上げた pentyl-MMC のように、脂溶性グループを抗癌剤分子構造中に導入することにより、特に動注療法などにおける抗癌剤の腫瘍組織移行性をいちじるしく向上することが示唆されるとともに、本実験系がこうした DDS アプローチの定量的評価に有用であることが確かめられた。

つぎに、MMC-デキストラン結合体をモデルに用いて、本実験系の高分子化プロドラッグ型 DDS

図4 定速注入実験により求めたマイトマイシンC-デキストラン結合体の腫瘍組織取り込み速度

の腫瘍組織移行性評価系としての有用性を検討した。腫瘍標本における高分子物質の毛細血管透過性はいちじるしくわるく、いずれの高分子化プロドラッグでも瞬時投与実験では有意な組織取り込みは認められなかったため、以下の実験は定速注入法により行った。定速注入実験終了後、腫瘍組織を細胞増殖部位と壊死部位に分別し、おのの組織中薬物濃度を定量し、組織取り込み速度を求めたところ、図4に示したように、細胞増殖部において分子全体として正電荷を持つ MMCDcat. の組織取り込み速度は負電荷を持つ MMCDan. の約 10 倍の値を示した。このように高分子化プロドラッグが緩除にはあるが腫瘍組織に蓄積すること、また、電荷が移行・蓄積に大きな影響を与えることが示唆され、併せて本実験系を用いた定速注入実験が高分子性薬物の腫瘍移行性評価の有用な手段になることが示唆された。

結 語

ラットに移植した Walker 256 単離腫瘍標本を用いて、灌流実験系を作成し、薬物を動脈側から注入後得られる静脈側流出パターンあるいは腫瘍組織内濃度を、薬動学的に解析することによって、薬物の腫瘍病巣局所における移行特性の評価が可能となった。

本実験およびその解析系は、腫瘍組織を標的と

するターゲティング型 DDS の開発に、種々の貴重な情報をもたらすものと思われた。

文 献

- 1) Hashida, M. et al. : Role of intramuscular administration of water-in-oil emulsions as a method for increasing the delivery of anticancer agents to regional lymphatics. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 5 (3) : 225-239, 1977.
- 2) Sasaki, H. et al. : Development of lipophilic prodrugs of mitomycin C. III. Physicochemical and biological properties of newly synthesized alkoxy-carbonyl derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* 31 (11) : 4083-4090, 1983.
- 3) Sezaki, H. et al. : Soluble macromolecular carriers for the delivery of anticancer drugs. *Advanced Drug delivery Rev.* 3 : 247-266, 1989.
- 4) Takakura, Y. et al. : Disposition and tumor localization of mitomycin C-dextran conjugates in mice. *Pharm. Res.* 4 : 293-300, 1987.
- 5) Takakura, Y. et al. : Enhanced lymphatic delivery of mitomycin C conjugated with dextran. *Cancer Res.* 44 : 2505-2510, 1984.
- 6) Atsumi, R. et al. : Disposition characteristics of mitomycin C-dextran conjugate in normal and tumor-bearing muscles of rabbits. *Cancer Res.* 47 : 5546-5551, 1987.
- 7) Gullino, P. M., Grantham F. H. : Studies on the exchange of fluids between host and tumor. I. A new method for growing "tissue-isolated" tumors in laboratory animals. *J. Natl. Cancer Inst.* 27 : 679-693, 1961.
- 8) Sevic, E. M., Jain, R. K. : Blood flow and venous pH of tissue-isolated Walker 256 carcinoma during hyperglycemia. *Cancer Res.* 48 : 1201-1207, 1988.
- 9) Kakutani, T. et al. : A new method for assessment of drug disposition in muscle : Application of statistical moment theory to local perfusion systems. *J. Pharmacokin. Biopharm.* 13 : 609-631, 1985.