アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体(ADM-OXD)の
実験動物における生体内動態

藤田 浩・岡本公彰・高尾亜由子*

Pharmacokinetics of adriamycin-oxidized dextran conjugate (ADM-OXD) in experimental animals

Pharmacokinetics of ADM-OXD were studied by HPLC method in rabbits and Sarcoma 180 bearing mice and compared with those of ADM.

- ① The plasma level of ADM-OXD was high and persisted for a long time. The drug level in the blood cells was lower than that in the plasma.
- ② The tissue level of ADM-OXD was not so high in an early time after administration, but remained for several days. ADM-OXD distributed highly in tumor tissues as compared with ADM administered mice. ADM-OXD liberated free ADM in normal and tumor tissues.
- ③ ADM-OXD was excreted predominantly into the urine.
- ④ The liver-injured mice treated with CCl₄ showed analogous drug level in the plasma and tumors, while lower level in the liver, as compared with control mice.

Hiroshi Fujita・Masaaki Okamoto・
Ayuko Takao*

key words : pharmacokinetics,
adriamycin-oxidized dextran conjugate,
HPLC, rabbits, Sarcoma 180 bearing mice

アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体(ADM-OXD)はミドリ十字中央研究所の上田¹⁾, 菊川²⁾, 棟近³⁾らの開発した抗癌剤の高分子結合体で, 分子量約7万のデキストランを酸化して得られるポリアルデヒドにアドリアマイシン(ADM)を Schiff ベースで結合したものである。

ADM-OXD は, ADM に比し水溶性が高い。中性では ADM の遊離はほとんどないが, 酸性条件

下で ADM の遊離が促進される。¹⁻³⁾

ADM-OXD のマウス, ラットに対する LD₅₀ 値は, ADM に比し 3~4 倍大きく, 低毒性である。

マウス, ラットの実験癌¹⁾やヌードマウス接種ヒト癌⁴⁾に, ADM-OXD は ADM に比し効果が強く, 高い治療係数を示す。

¹⁴C-ADM-OXD を用いたアイソトープ法による体内動態の研究²⁾から, 本剤は ADM に比し, 高い血中濃度を持続し, AUC が大きい。腫瘍内への分布量が多い。ADM-OXD は尿から優先的に排泄される。

以上の ADM-OXD の毒性や抗腫瘍性の特性は, その生体内挙動が ADM に比し変化したことにより起因すると考えられる。

アイソトープ法による薬物濃度の測定は, ADM-OXD とこれから遊離された free の ADM の区別や ADM の未変化体と代謝物の区別ができない。

今回, 筆者らは高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて, ADM-OXD 投与動物の体内動態を, 結合体を含む総 ADM(total ADM)と遊離された ADM(free ADM)をべつべつに測定し, ADM 投与動物の体内動態と比較検討したので報告する。

方 法

(1) ADM-OXD 投与後の総 ADM の測定

血漿, 尿, 胆汁はそのまま加水分解を行い, 組織は氷冷下, 20 mM の PBS, pH7.2 にてホモジネートとしたあと, 1/10 量の 11NHCl を加え, 55°C90 分加水分解を行った。生じた ADM のアグリコンを図 1 に示す手順で抽出し, HPLC にて分離定量した。HPLC はコスモシール 5C₁₈ カラム

* Department of Bacteriology, School of Dental Medicine, Tsurumi University 鶴見大学歯学部細菌学教室

図1 Assay method of total and free ADM

* These procedures were employed for quantitative analysis of total ADM.

を用い、移動相としてギ酸にて pH4.0 に調整した 1% triethylamine と CH₃CN の混液(75/25)を用い、流速 1.0 ml/min, カラム温度 45°C の条件で分析を行った。蛍光光度計にて励起波長 470 nm, 蛍光波長 560 nm で検出定量し、アグリコン量を総 ADM 量に換算した。

(2) ADM-OXD 投与後の遊離 ADM の測定

血漿、尿、胆汁はそのまま HPLC にて分離定量した。組織は PBS でホモジナイズし、加水分解の操作を行わないでクロロホルム・メタノール混液で抽出し、以下総 ADM 定量法の手順に準じて分離定量した。

(3) ADM 投与後の ADM 濃度の測定

以前筆者らが発表した方法⁵⁾に従って、試料をクロロホルム・メタノールで抽出し、逆相系のカラム μ -Bondapak phenyl を用い、HPLC 法で分離定量した。

図2 Plasma levels of total and free ADM after administration of ADM-OXD in rabbits

結果

(1) 血中濃度

図2は、日本白色種ウサギ(3~4 kg)に ADM-OXD を 5 mg as ADM (ADM 含有量)/kg 静脈内投与後の総アドリアマイシン total ADM (ADM-OXD+free ADM) と遊離した free ADM の血中濃度を示している。total ADM は血漿中に高濃度に長時間持続して観測されているのに対し、free ADM はtotal ADM より3桁以上低濃度であった。

この結果から、ADM, OXD は血中ではほとんど分解されることなく、結合体のままで徐々に組織へ移行すると考えられる。

表1は pharmacokinetic parameters を示している。total ADM の $t_{1/2\alpha}$, β , γ はそれぞれ 0.3, 7.6, 49.8 時間となが、分布相も終末相も ADM 投与ウサギの成績⁵⁾に比し長く、クリアランスは遅く、AUC はきわめて大きい値を示している。

total ADM の AUC は 336.0 と大きいのにに対し、free ADM の AUC は $0.437 \mu\text{g} \cdot \text{hr/ml}$ ときわめて小さく、血中では、ADM の遊離がほとんどないことを示唆している。

図3は、ウサギに ADM-OXD 5 mg as ADM/kg および ADM 2mg/kg 静注後の血漿中および血球中あるいは全血中の薬剤濃度を示している。

ADM は、血液から組織への移行が速やかであるため、分布相の下降が急峻で低値の血中濃度を示した。ADM の全血中濃度は血漿中濃度より高

表 1 Pharmacokinetic parameters of ADM-OXD in rabbits (dose : 5 mg as ADM/kg, i. v)

		total	free
A	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	90.01	0.351
B	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	16.41	0.060
C	($\mu\text{g}/\text{ml}$)	1.617	0.012
α	(1/hr)	2.204	12.08
β	(1/hr)	0.092	0.827
γ	(1/hr)	0.014	0.037
t 1/2 α	(hr)	0.314	0.057
t 1/2 β	(hr)	7.556	0.838
t 1/2 γ	(hr)	49.82	18.76
K 12	(1/hr)	1.417	6.770
K 21	(1/hr)	0.440	2.671
K 13	(1/hr)	0.113	2.394
K 31	(1/hr)	0.020	0.143
Kel	(1/hr)	0.322	0.970
V 1	(L/kg)	0.046	11.81
V 2	(L/kg)	0.149	29.93
V 3	(L/kg)	0.262	196.4
Vd	(L/kg)	0.457	240.1
Cl	(L/hr/kg)	0.014	11.45
AUC ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)		336.0	0.437

図 3 Plasma and blood cells levels of total ADM after administration of ADM-OXD or ADM in rabbits

図 4 Tissue levels of total ADM after administration of ADM-OXD in S. 180 bearing mice

い、血球、特に白血球への移行が顕著であることによると考えられる。

ADM-OXD 投与後の total ADM の血中濃度

は高値に持続して観察されている。この場合は、ADM 投与の場合と逆に、血漿中濃度のほうが血球中濃度よりも高い。ADM-OXD の血球への移行が遅く、少ないためと考えられる。

(2) 組織内濃度

図 4 は Sarcoma 180 (以下 S. 180) 皮下担癌マウスに ADM-OXD 10 mg as ADM/kg 静注後の組織内 total ADM 濃度を示している。

実験方法は、ICR ♂マウス 40 匹の背部皮下に S. 180 を接種し、2 週間後に薬剤を投与し、図に示す 8 時点で各 5 匹ずつクロロフォルムでマウスを屠殺し、採血後、尿、胆汁、各臓器を採取し、5 匹分の試料をプールして薬剤濃度を測定した。

図に示すごとく、total ADM は肝にもっとも高濃度に、腎、脾も高濃度に長時間分布している。ついで心、腫瘍の順となる。腫瘍内濃度は 2 日間下降することなく長時間観察され、48 時間後には第 3 位の高さであった。肺、胃、脾、皮膚、小腸は上記の組織に比し下降が速やかで低値である。筋肉は低濃度、脳はもっとも低い。本剤は、血液-

図 5 Plasma and tissue levels of total and free ADM after administration of ADM-OXD in S. 180 bearing mice (dose : 10 mg as ADM/kg, i.v)

脳関門を移行しにくいと考えられる。

図 5 は、上記の担癌マウスにおける ADM-OXD 静注後の血漿、肝、心、腫瘍の total ADM と free ADM の濃度の推移を示している。

血漿中濃度は、マウスにおいてもウサギと同様のパターンを示し、total ADM は高濃度で緩徐に下降するのに対し、free ADM はきわめて低値であった。free および total ADM の AUC はそれぞれ 0.398, 201.1 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$ 、その比は 0.2% で、血漿中での結合体からの ADM の遊離はほとんどないと考えられる。

肝、心、腫瘍など組織中で、ADM-OXD から free ADM の遊離が生じている

free および total ADM の AUC の値とその比は、肝 129.0, 1199.0 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 10.8%, 心 21.0, 302.2 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 6.9%, 腫瘍 30.9, 235.7 $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$, 13.1% であった。心組織に比し、腫瘍組織に free ADM の率の高いことが注目される。

ADM-OXD は、エンドサイトーシスで組織細胞内に取り込まれたあと、ライソゾームと融合し、酸性条件下で ADM を遊離して核に作用し、薬効

図 6 Tissue levels of total ADM after administration of ADM-OXD or ADM in S. 180 bearing mice

を発揮するものと考えられる³⁾。腫瘍細胞で、高分子抗癌剤の取り込みが盛んに生じ、酸性度が強いといわれる腫瘍細胞内での free ADM の遊離が

表 2 Urine and bile levels of total and free ADM after administration of ADM-OXD in mice (dose: 10 mg as ADM/kg. i. v.)

time	total ADM ($\mu\text{g ADM/ml}$)	free ADM ($\mu\text{g ADM/ml}$)
urine		
5 min	19.646	0.933
30 min	104.749	5.357
1 hr	19.185	3.129
2 hr	35.007	4.020
4 hr	17.613	3.285
7 hr	3.287	0.744
24 hr	—	—
48 hr	ND	0.162
bile		
5 min	ND	—
30 min	ND	—
1 hr	1.007	—
2 hr	0.639	—
4 hr	1.410	—
7 hr	5.501	—
24 hr	ND	—
48 hr	—	—

ND: not detected.—: not tested

著明に生じていることを示唆している。

図 6 は, S. 180 担癌マウスに, ADM-OXD あるいは ADM を ADM 量として同量に静注し, 肝, 心, 腫瘍内の ADM 濃度を比較したものである。

肝, 心では投与後 5 時間までは, ADM 投与群のほうが高いが, それ以後は ADM-OXD 群のほうが高い。ADM-OXD は取り込みはおそいが, 長時間組織内に停滞し, ゆるやかに下降する。腫瘍内濃度は ADM-OXD 群は, ADM 群に比し, 投与初期から各時点とも約 4 倍高濃度に分布している。このような腫瘍への集中性 (passive targeting) は, Lewis 肺癌や Walker carcinoma 256²⁾でも観察されており, 本剤形のもっとも注目すべき特徴である。

(3) 尿中, 胆汁中濃度

表 2 は S. 180 担癌マウスに ADM-OXD 静注後の尿中, 胆汁中の total ADM と free ADM の濃度を示している。

その結果, ADM-OXD は投与後比較的早期に尿中に高濃度排泄されている。尿中では total

図 7 Effect of CCl_4 on plasma and tissue levels of total ADM after administration of ADM-OXD in S. 180 bearing mice

ADM の濃度が free ADM 濃度より高いことより, 大部分結合型のまま尿に排泄され则认为られる。胆汁中濃度は低い。

一般に, ADM などのアンスラサイクリン系薬剤は, 主に胆汁中に排泄される性質を有する⁵⁾が, デキストラン結合体とすることにより, 排泄動態が大きく変化したことは興味深い。

^{14}C 標識 ADM-OXD をマウスおよびラットに投与後 24 時間内の尿中回収率は 50% 強, 胆汁中回収率は 10% 強であったと報告されている²⁾。

(4) 肝障害マウスにおける体内動態

図 7 は, S. 180 担癌マウスに, 四塩化炭素 (CCl_4 25% オリーブ油溶解液/ml/kg, 経口投与, 48 時間後実験) で肝機能障害マウスを作成し, 無処置担癌マウスと対比して, ADM-OXD 投与後の total ADM 量を測定した結果をあらわしている。

肝障害マウスは肝組織内 ADM 濃度の軽度の低下をきたしたが, 血漿中および腫瘍内濃度は対照群とほとんど差はみられなかった。

肝障害時に ADM を投与した場合は, 血中濃度や肝以外の組織内濃度が上昇し, 強い体内動態の変化をきたす⁵⁾のに対し, ADM-OXD では体内動態の変化が少ないことは, 本剤形は尿排泄型であ

ることによるためと推察される。

結 論

アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体 (ADM-OXD) の生体内動態を、ウサギと Sarcoma 180 担癌マウスを用いて、HPLC 法にて検討し、アドリアマイシン (ADM) の生体内動態と比較した。

- ① ADM-OXD の血漿中濃度は高値で長時間持続して観測された。血球中濃度は血漿中濃度より低値であった。
- ② ADM-OXD の組織内濃度は投与後早期は ADM ほど高くなかったが、数日間にわたり持続して分布した。ADM-OXD は腫瘍内に ADM 投与群よりも高値に分布した。ADM-OXD は正常および腫瘍組織内で ADM を遊離した。
- ③ ADM-OXD は尿から優先的に排泄された。
- ④ 四塩化炭素処置肝障害マウスは対照群に比し、肝内薬物濃度の軽度の低下をきたしたが、血漿中、腫瘍内濃度に変化をきたさなかった。

本研究の一部は文部省がん特別研究(1)助成金(馬場・秋吉班)によった。なお、薬物の供与、薬剤濃度測定に助力されたミドリ十字中央研究所の各位に深謝いたします。

文 献

- 1) Ueda, Y., Munechika, K., Kikukawa, A., Kanou, Y., Yamanouchi, K., Yokoyama, K.: Comparison of efficacy, toxicity and pharmacokinetics of free adriamycin and adriamycin linked to oxidized dextran in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 37: 1639-1641, 1989.
- 2) 菊川彰人, 棟近公司, 上田泰生, 山内紘一, 横山和正, 塚越 茂: アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体の担癌動物における分布特性. *Drug Delivery System* 5: 255-260, 1990.
- 3) 棟近公司, 中江 孝, 菊川彰人, 上田泰生, 山内紘一, 横山和正, 塚越 茂: アドリアマイシン-酸化デキストラン複合体の細胞内存在形態について, *Drug Delivery System* 6: 127-131, 1991.
- 4) 藤田昌英, 藤田史子, 田口鐵男: アドリアマイシン-デキストラン複合体 (ADM-OXD) のヒト癌・ヌードマウス系における効果. 第 38 回日本化学療法学会総会講演抄録. 1990, p 93.
- 5) 藤田 浩, 刀根 弘, 井口博史, 庄村智子: 抗癌剤の Pharmacodynamics—特に Adriamycin, THP-adriamycin, Aclacinomycin について—. *Oncologia* 7: 92-106, 1983.