

P-1115

P - 1115

生体内濃度シミュレーションを用いた
in vitroにおける抗癌剤の細胞増殖抑制効果

貞方 久人、富田 勉、竹田 美文 (シネ・サイエンス研究所)

目的

抗癌剤の効果と安全性を考える上で、薬剤の体内動態を検討することは極めて重要である。抗癌剤の体内動態をシミュレートし、それに基づいて薬剤の効果や安全性をin vitroで検討できる実験系があると非常に有用である。我々は、血中濃度推移をin vitroで再現するためのtwo-compartment open modelに従った簡便な灌流装置を考案し、抗菌薬の評価を行ってきた。本研究では、この装置を細胞に応用して、抗癌剤を異なる投与方法で投与した時の癌細胞に対する影響を調べた。

方法

〈5-FUを急速静注した時と持続静注した時の癌細胞に対する効果の比較〉

〈細胞〉 HCT-116 (ヒト結腸腺癌)
 〈薬剤〉 5-FU
 〈培養液〉 継代用培地: DMEM+10%FCS
 灌流用培地: DMEM+1%FCS

〈投与量の設定〉

ヒトに5-FUを500mg投与した時の血中濃度の実測値から薬物動態パラメータを得た。

これをもとにして、infusionは20 µg/mlの濃度が24時間維持されるように点滴時間を25時間15分とした。この時のAUCは19.8 mg/ml・minだった。bolusは1日1回5日間連続投与し、AUCの合計がinfusionと同じ19.8 mg/ml・minとなるように設定した (Fig. 3 薬剤濃度グラフ)。

〈薬剤の効果の評価〉

5-FUの効果は顕微鏡下で細胞を観察して評価した。5-FUの投与開始から24時間おきにデジタルカメラで撮影し、画像から生細胞数をカウントした。

〈血中濃度をシミュレートするための灌流装置〉

フラスコAの部分で薬剤の血中濃度を再現した (Fig. 1)。フラスコAの直後に横0.5cm、長さ2cm、高さ0.2cmのチャンバーを置き、その中で細胞を培養した。装置全体は37°Cに維持した。

〈灌流装置における薬剤濃度の測定〉

上記の投与量でbolus投与を1回行った時の血中濃度推移をシミュレートした (Fig. 2)。理論上の濃度変化が再現されることを検証するために、薬剤の代わりにメチレンブルーを用いてチャンバーに流れる灌流液の濃度の測定を行った。灌流開始後3分、10分、20分、40分、90分にチャンバーから灌流液を採取し、吸光度を測定した。それを薬剤濃度に換算した。灌流装置での薬剤濃度はシミュレートした理論上の薬剤の濃度とほぼ同様に推移した (Fig. 2)。

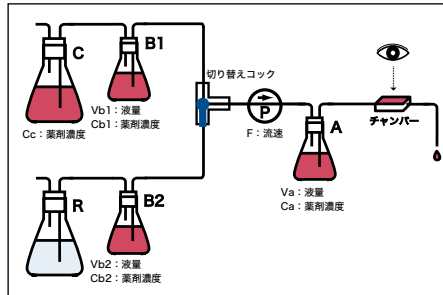


Fig.1 灌流装置の模式図
 フラスコAで薬剤の血中濃度の推移を再現した。フラスコAの直後に横0.5cm、長さ2cm、高さ0.2cmのチャンバーを置き、その中で細胞を培養した。一定の流量が得られるようにペリスタポンプを使い、装置全体は37°Cに維持した。各フラスコの薬液濃度、液量、流速はヒトの血中濃度分析から得た薬物動態パラメータを代入することによって計算した。

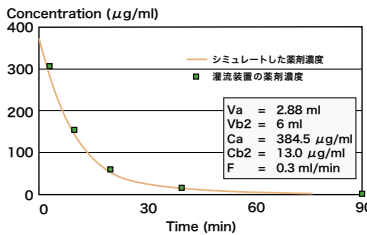


Fig.2 灌流装置における薬剤濃度の測定
 実線はbolus投与1回の血中濃度推移をシミュレートした曲線を示す (AUC 3.96 mg/ml・min)。灌流装置でこの濃度推移を再現するためのフラスコの液量と初期の薬剤濃度、灌流速度を体内の数値に示す。
 5-FUの代わりにメチレンブルーを用いて、灌流開始から3分後、10分後、20分後、40分後、90分後にチャンバーから灌流液を採取して吸光度を測定し、薬剤の濃度に換算した。この薬剤濃度を●で示す。灌流装置での薬剤濃度はシミュレートした理論上の薬剤の濃度とほぼ同様に推移した。

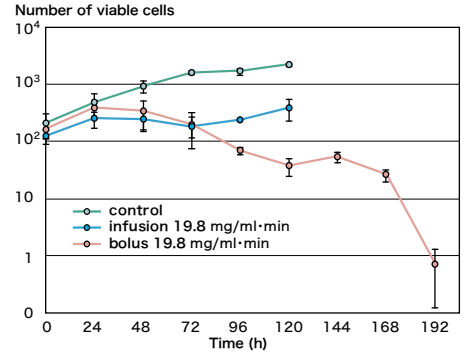


Fig.4 5-FUを作用させた時の細胞数の変化
 デジタルカメラで24時間おきに細胞を撮影した。塗り付いて広がっている細胞を生細胞として、1視野内に見られる生細胞数をカウントした。3視野の平均値と標準偏差を示す。

結果

5-FUを加えない培養液を灌流したコントロールでは、細胞は増殖し続けた (Fig. 3, Fig. 4)。

infusion

5-FUによって細胞の増殖は抑えられた。しかし、5-FU投与終了後細胞の増殖が見られた。

bolus

5-FUによって細胞の増殖は抑えられた。5-FU投与終了後も細胞の増殖は見られなかった。

結論

5-FUは、同じ薬剤量でも投与方法の違いによって細胞に対する増殖抑制に差があることがin vitroで示された。

この灌流装置はin vitroで薬剤の体内動態を再現でき、細胞に対する影響を調べることができる系である。

薬物動態学/薬理学に基づいて抗癌剤の効果や安全性をin vitroで調べることが、投与方法や薬剤の選択、感受性試験等に有用な情報になると考えられる。

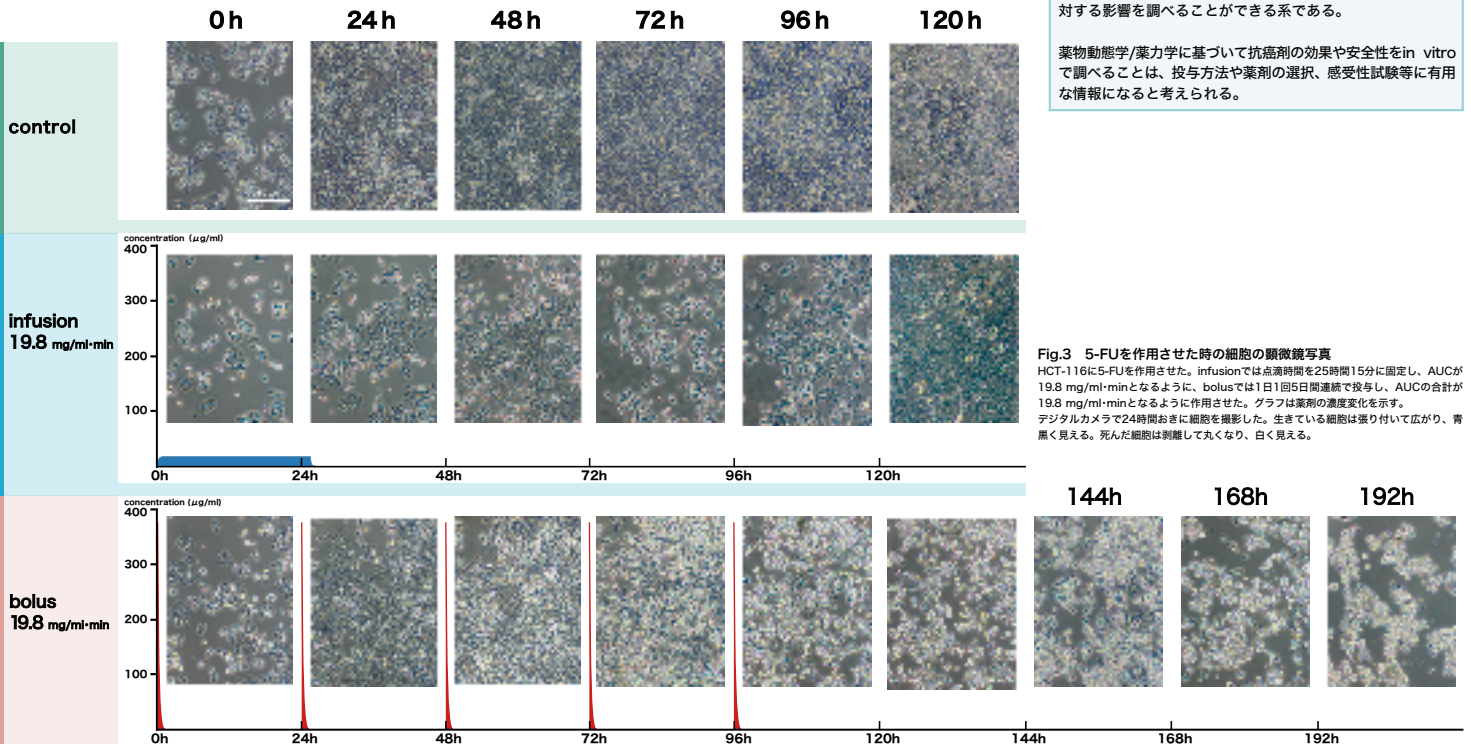


Fig.3 5-FUを作用させた時の細胞の顕微鏡写真
 HCT-116に5-FUを作用させた。infusionでは点滴時間を25時間15分に固定し、AUCが19.8 mg/ml・minとなるように、bolusでは1日1回5日間連続で投与し、AUCの合計が19.8 mg/ml・minとなるように作用させた。グラフは薬剤の濃度変化を示す。デジタルカメラで24時間おきに細胞を撮影した。生きている細胞は張り付いて広がり、青黒く見える。死んだ細胞は剥離して丸くなり、白く見える。