

Bleomycin の血中, 尿中, 組織内濃度

藤 田 浩

国立がんセンター臨床検査部

(昭和 43 年 7 月 10 日受付)

緒 言

Bleomycin は 1962 年梅沢等により *Streptomyces verticillus* より分離された抗腫瘍性抗生物質で、分子量の大きい、水溶性、塩基性のペプチドである。本剤はこれより前、同じく梅沢らにより発見された Phleomycin と類似しているが区別される物質で、Phleomycin のような不可逆性の腎障害を生じない。

Bleomycin はマウスの Ehrlich carcinoma や Sarcoma 180 に高い治療係数を示し、急性毒性に比し亜急性毒性が遙かに小さい特徴を有し、臨床的には、陰茎癌、外陰癌、皮膚癌等の扁平上皮癌にすぐれた効果を治めている。

本剤は抗腫瘍性を有するのみならず、グラム陽性菌や陰性菌に抗菌性を有している。すなわち、黄色ブドウ球菌、四連球菌、枯草菌、大腸菌、チフス菌、赤痢菌、肺炎杆菌、結核菌等に中等度あるいは高度の抗菌性を示すことが認められている。したがって、この細菌に対する発育抑制効果を逆に利用して、本剤投与時の生体内の濃度を定量することができる。

われわれは以前より抗菌性を有する抗癌剤について、細菌を試験生物とした Bioassay 法により、抗癌剤の微量定量を行なっている。すなわち、Mitomycin C, 5-Fluorouracil, Chromomycin A 3, Actinomycin D 等につき行なってきた。

今回は Bleomycin の微量定量を *Bacillus subtilis* の芽胞を試験菌とする Bioassay 法により施行し、多数の癌患者および実験動物の血液、尿、組織、腫瘍内濃度を測定したので、以下その測定法および測定結果について述べる。

実験方法

Bacillus subtilis ATCC 6633 株の芽胞を試験菌とした薄層カップ法により Bleomycin の濃度を測定する。詳細は下記のとおりである。

(1) 試験菌

B. subtilis ATCC 6633 株を Heart Infusion Agar 上に 37°C, 7 日間培養し芽胞を作らせる。これを 2 白金耳/ml となるように滅菌蒸溜水中に浮遊させ、60°C, 30 分加熱後、滅菌蒸溜水で 3 回遠沈洗滌し、原容量に再浮遊して、さらに同様に 60°C, 30 分加熱し調製する。本芽胞液は数カ月間保存しても安定で、感受性の変化を

来さない。

(2) 薄層寒天平板作成

培地は第 1 表に示すような、カザミノ酸、澱粉、寒天末より成る簡単なる培地、すなわち MÜLLER-HINTON 変法培地を考案し使用している。

普通寒天培地や HI 寒天培地に含まれるペプトンや肉エキスは Bleomycin や 5-FU の抗菌性を抑制する作用があるため、これらを含まない培地を使用したのである。

本培地を加温溶解して、中試験管に 5 ml ずつ分注し、56°C に保つ。これに芽胞液を 2 滴 (約 0.1 ml) 加え、充分混釈後、直径 9 cm のペトリシャーレに流し込み、水平台上で固化させ、薄層平板を作る。この培地上に滅菌ステンレス製円筒を 3~4 コ立て、この中に試料あるいは薬剤対照液を満たす。

(3) Incubation と判定

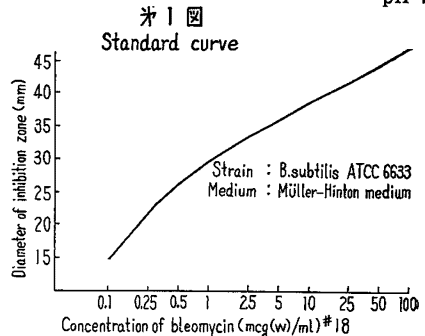
上記の平板の円筒中に液を満たした後、シャーレはただちに 4~5°C の冷蔵庫に納入し、正確に 24 時間静置して、薬剤を透過させる。ついで 37°C の孵卵器に移し、約 18 時間培養する。培養後、Bleomycin の濃度に応じて、円筒周囲に円形の発育阻止帯を生ずる。この直径

第 1 表

Culture medium for the bioassay of bleomycin using *B. subtilis* (ATCC 6633) spores

Casamino acid (Eiken)	8.75
Starch (Merck)	0.75
Bacto agar (Difco)	15.0
Aq. des.	1,000

pH 7.4



を計測し、薬剤対照より作成された標準曲線と比較し、Bleomycin 量を算定する。標準曲線は第1図に示すように、片対数グラフを用い、縦軸に阻止円の直径を常数目盛にとり、横軸に薬剤濃度を対数目盛にとり作製する。本法により作成された Bleomycin の標準曲線の特徴を示す。

① 最低測定可能濃度は 0.1 mcg/ml である。この値は人間の血中濃度や、動物実験で大量投与時の血中および組織内濃度を測るには充分であるが、人間の組織内、腫瘍内濃度を測るには未だ不充分で、さらに1桁くらい鋭敏な試験菌の出現が期待される。

② 標準曲線は直線とならない。

③ 広範囲の濃度、すなわち 0.1~100 mcg/ml が同一標準曲線上に集まる。理由は本剤が高分子のペプチドで、寒天中の透過速度が遅いためである。

この現象は広範囲の濃度の測定が稀釈なしに行ない得る便利さはあるが、いっぽうでは測定誤差の範囲が大きくなるという欠点を有する。

結 果

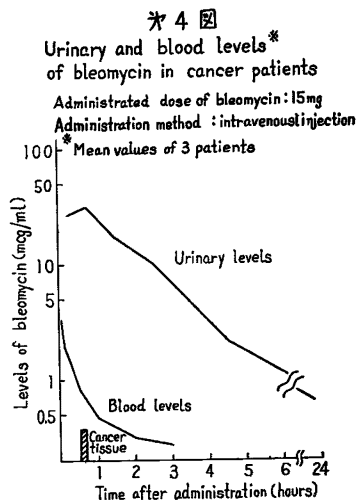
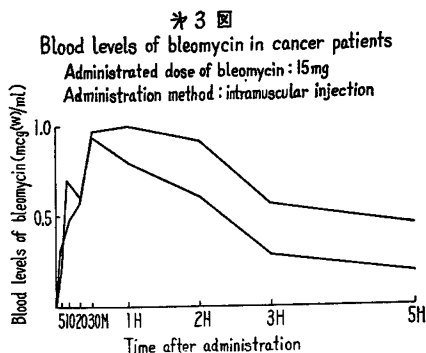
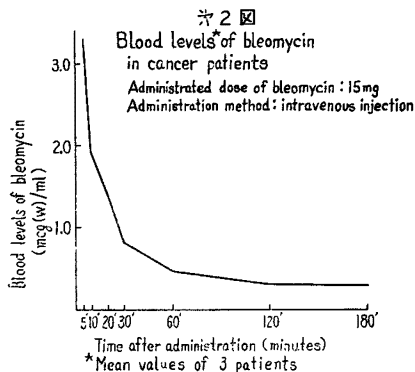
(1) 血中濃度

第2図は陰茎癌患者3名に 15 mg の Bleomycin を静注し、投与後各時期 (5分, 10分, 20分, 30分, 60分, 120分, 180分) における血清中の薬剤濃度の平均値をあらわしたものである。

最高血中濃度は5分で平均 3.3 mcg/ml, half life は 14分, 1/10 life は 110分であつた。すなわち、投与後30分くらいまでは比較的急峻なカーブで減少するが、その後ゆるやかに下降する。

他の抗癌剤 (Mitomycin C, 5FU) の血中濃度に比し、Bleomycin は最高血中濃度が高く、またとくに1時間以後の薬剤の血中よりの減少は緩徐で、長時間血中に存在する傾向を有することが観察される。

第3図は陰茎癌患者2名に同量の薬剤を筋肉内に投与した場合の血中濃度の消長を示している。筋注に於ける血中濃度は投与後30分から1時間に最高値、すなわち



平均で 0.97 mcg/ml を示し、その後きわめてゆるやかな曲線を描いて、数時間に亘り徐々に下降する。すなわち筋注に於いては静注に比し、薬剤の最高濃度は 1/3 以下であるが、中等度の濃度が長時間持続することが観察された。

(2) 尿中濃度、尿中排泄量

第4図は陰茎癌患者3名に Bleomycin 15 mg を投与した際の尿中濃度、血中濃度、腫瘍内濃度の平均値を示したものである。本図では濃度を対数目盛に、時間を常数目盛であらわした。その結果、尿中濃度は血中濃度より1桁高値を示し、Bleomycin 投与後30分から1時間までの間に採取した尿に於いて、最高値: 30.7 mcg/ml を示した。その後、6時間までは半対数目盛でゆるやかにほぼ直線的に下降し、排泄は遅く、長時間にわたり高濃度の薬剤が検出された。

第2表は Bleomycin の尿中排泄量を示したもので、静注の場合、24時間までに投与量の 33.3% および 43.4% が尿へ排泄された。筋注では6時間までの測定で、投与量の 19.2% が排泄された。他の抗癌剤、たとえば Mitomycin C, 5FU が 10% 以下であるのに比して、

第2表
Urinary recovery of bleomycin in cancer patients (Administered dose of bleomycin : 15 mg)

Patient	A(i. v.)		B(i. v.)		C(i. m.)	
	Level (mcg/ml)	Quantity (ml)	Level (mcg/ml)	Quantity (ml)	Level (mcg/ml)	Quantity (ml)
Time after Administration (hours)	0 ~ 0.5	17 × 37	8.9 × 165	7.1 × 50		
	0.5 ~ 1	27 × 39	10.7 × 70	11.4 × 20		
	1 ~ 2	5.9 × 276	6.6 × 115	7.3 × 85		
	2 ~ 3	2.3 × 316	6.3 × 175	7.9 × 60		
	3 ~ 4	2.9 × 42	9.6 × 35	11.3 × 50		
	4 ~ 5	2.2 × 90	3.7 × 215	5.1 × 85		
	5 ~ 6	1.5 × 130	1.3 × 235	4.0 × 50		
6 ~ 24	0.67 × 750	0.66 × 1,500				
Total urinary excretion (mcg)		5,063	6,506	2,876		
Recovery (%)		33.3	43.4	19.2		

Bleomycin の Recovery rate はひじょうに高い。すなわち尿からの排泄は本剤の体内よりの消失に重要な役割を演じていると考えられる。また、同量の Bleomycin でも投与方法の違いにより Recovery の差を生じ、一般に筋注は静注に比してその率は低い傾向を有した。

(3) 組織内濃度

組織内濃度の系統的な追求は人体では不可能であるので、主としてマウスを用いて行なつた。第5図は dd 系マウスに大量 (50 mg/kg) の Bleomycin を尾静脈内に投与し、30 分後に於ける薬剤の臓器、組織内分布を示したもので、薬剤は腎に最も高濃度に、肺、肝、皮膚、脾に中等度に、辜丸、横紋筋、胃、小腸、心筋組織に微量が検出された。腎は排泄の臓器として高濃度検出は当然と考えられるが、肺および皮膚にかかる比較的大量の分布をみることは他の抗癌剤にみられない特徴である。

第3表はこれらの動物実験を総括したもので、Bleomycin 10 mg/kg 投与、30 分後成績も同様の傾向を示した。また、同量の薬剤を連続7日間静脈内に投与し、投与終了後1, 2, 3日後に組織を剔出し、薬剤の残

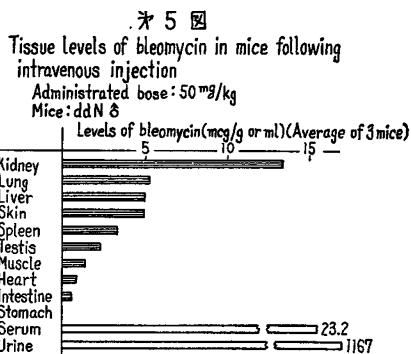
第3表

Tissue levels* of bleomycin in mice following intravenous injection

Mice : ddN ♂

Administered dose	50 mg/kg	10 mg/kg	10 mg/kg/day (7 successive doses)			Ehr. As. C. bearing mice (Swiss) 10 mg/kg
	30 min.	30 min.	24h.	48h.	72h.	
Heart	0.95	—	—	—	—	0.51
Lung	5.3	2.6	1.0	0.85	0.67	2.0
Liver	5.0	2.1	2.5	—	—	5.7
Spleen	3.3	1.8	0.47	0.65	0.70	1.9
Kidney	13.4	2.3	2.5	0.77	—	4.6
Stomach	—	—	—	—	—	—
Intestine	0.6	—	0.37	—	—	—
Testis	2.3	—	—	—	—	—
Muscle	1.4	—	—	—	—	0.49
Skin	5.0	1.7	0.60	—	—	—
Serum	23.7	5.4	7.3	0.10	—	9.7
Urine	1167	—	—	—	—	—
Ehr. Asc. cells	—	—	—	—	—	12.2

* Mean values of 3 mice in each group



存を検するに、本剤は微量ながら長時間後にも、肺、腎、脾、皮膚に蓄積していることが証明された。

(4) 腫瘍内濃度

第4表は臨床的に陰茎癌および子宮頸癌患者、計8名の腫瘍およびその周辺正常組織の濃度測定の結果であつて、Bleomycin は 15 mg 投与後 30 分にこれらの癌組織中に 0.5~0.08 mcg/ml の比較的高値に分布するこ

第4表
Concentrations of bleomycin in tumor tissues from cancer patients
(Administered dose of bleomycin : 15 mg, i. v.)

Patients suffering from	Time after administration of bleomycin	Concentrations of bleomycin in		
		Tumor (mcg/ml)	Normal tissue	Blood
Penis cancer	37 min.	0.49		0.69
Penis cancer	37 min.	0.25		0.06
Penis cancer*	30 min.	0.08		0.94
Penis cancer	24 h.		— (Pretuce)	
Uterus cancer	30 min.	0.50	— (Cervix of uterus)	
Uterus cancer	60 min.	0.08	— "	
Uterus cancer	120 min.	0.09	— "	0.19
Uterus cancer	120 min.	—	— "	

* Bleomycin was injected intramuscularly in this case.

とが判明した。投与後 1~2 時間経過すると、腫瘍内濃度はかなり低下する。いずれの患者群においても、隣接の正常組織中には薬剤は証明できなかつた。

第5表は動物実験の成績で、SR-61, Sarcoma 180, EHRlich Carcinoma の腹水型胆癌マウスに於いて、薬剤はこれらの腹水中に最高値あるいは最高値に次ぐ高濃度に証明された。しかし、遠沈して洗滌後、乳剤化した

第5表

Tissue levels of bleomycin in tumor bearing mice at 30 minutes after intravenous injection
(Mice : ddN ♂
Administered dose of bleomycin : 10 mg/kg)

	SR-61 bearing (Ascitic T.)	Sarcoma 180 bearing (Ascitic T.)	Ehrlich ascites carz. bearing (Ascitic T.)	NF-sarcoma bearing (Subcutaneous T.)
Heart	—	—	—	—
Lung	5.4*	1.7	4.9	5.8
Liver	—	2.9	5.9	5.4
Spleen	—	—	0.55	—
Kidney	4.5	4.4	7.1	8.4
Stomach	1.8	2.0	—	1.9
Intestine	—	—	0.85	—
Muscle	—	—	0.75	—
Skin	1.3	1.1	1.1	3.8
Testis	—	—	—	—
Serum	2.8	2.2	3.4	4.1
Blood cells	n. d.	n. d.	0.75	—
Ascites	5.1	5.4	5.4	
Tumor cells	—	—	0.90	1.35

* mcg/g, Average of 3 mice

腫瘍細胞中には予期に反して、微量あるいは測定不可能であつた。また、皮下の固形腫瘍である NF-Sarcoma 中には中等量の薬剤の存在が観察された。

(5) 組織乳剤による Bleomycin の不活性化実験

一般に投与された薬剤は一部組織に蓄積される場合もあるが、大部分は排泄されるか、あるいは体内で代謝され不活性化されて消失していく。Bleomycin は他の抗癌剤に比し排泄の率が高いことが判明したが、次に本剤の不活性化について検討した。すなわちマウスの各種臓器乳剤と薬剤を接触せしめ、37°C, 60 分

間 incubate して、薬剤の吸着および不活性化作用による力価の減少を測定した。

その結果は第6表に示した。一般的に、本剤はマウスの各種乳剤と混合し incubate しても、ほとんど力価の減少を来さない。すなわち吸着や不活性化の率が非常に低いことが判明した。しかし、各種の臓器乳剤の中でも、脾乳剤に吸着現象が、小腸乳剤に不活性化作用が軽度で認められた。後者に関しては小腸中の消化液や腸内細菌の作用の加わることを考慮しなければならない。

以前、われわれは Mitomycin C に於いて、肝、脾、腎乳剤による不活性化作用が嫌気的環境で促進されるこ

第6表

Inactivation of bleomycin by mouse tissue homogenates
(Bleomycin 2.5 mcg/ml, Homogenates 10% (final c.))

Tissue homogenates from	Inactivation rate* (%)			
	Incubated at 37°C for			
	0	15 min.	30 min.	60 min.
Heart	0		8	4
Lung	0	0	8	12
Liver	0	0	12	0
Spleen	32	24	50	38
Kidney	0	0	12	0
Testis	0	0	0	8
Stmach	0	0	12	20
Intestine	12	28	48	75
Muscle	0	0	6	12
Skin	12		12	12
Serum	0	12	0	0

* $(1 - \frac{\text{Bleo. concent. after incubation}}{2.5}) \times 100$

とを観察しているので、Bleomycin に於いても、嫌氣的すなわち N_2 ガス中で、ウサギ肝乳剤を使つて接触実験を行なつてみたが、この実験に於いて本剤の不活性化はほとんど認められなかつた。

結 論

Bleomycin の微量定量を Bioassay 法により施行し、癌患者および実験動物について、血中、組織内、腫瘍内濃度、排泄と不活性化等を検討した。

(1) 測定法は *Bacillus subtilis* ATCC 663 株を試験菌とする薄層カップ法を用いた。

(2) 患者に Bleomycin 15 mg 静注時の最高血中濃度は 3.3 mcg/ml で、比較的高く、始めは急速に血中より減少するが、1 時間以後の減退はゆるやかである。筋注では最高濃度は前者の 1/3 であるが長時間中等度濃度の薬剤が血中に留る。

(3) マウス組織内の本剤の分布は高いほうから、腎、肺、肝、皮膚、脾の順であつた。肺と皮膚の比較的高い薬剤分布は本剤の特徴である。

(4) 患者の腫瘍組織には隣接正常組織に比し高値に薬剤が分布した。胆癌マウスの腹水中や固型腫瘍中に高値あるいは中等度量の薬剤が検出された。しかし腹水腫瘍細胞中には低値あるいは陰性であつた。

(5) 患者に本剤 15 mg 静注後、尿中へ投与量の

38.4% が 24 時間内に排泄された。この Recovery rate は他の抗癌剤に比し高率であり、尿からの排泄は本剤の体内よりの消失に重要な役割を演じている。

(6) 本剤とマウス組織乳剤との接触実験で、脾乳剤に吸着が、小腸乳剤に不活性化が、軽度に観察される外は、組織乳剤による本剤の吸着、不活性化は他の抗癌剤に比し軽度であつた。

本論文の要旨は第 16 回日本化学療法学会総会 (昭和 43 年 5 月、東京) で発表された。

文 献

- 1) UMEZAWA, H., *et al.*: New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiotics, Ser. A* 19, 200, 1966
- 2) MAEDA, K., *et al.*: A new antibiotic, phleomycin. *J. Antibiotics, Ser. A* 9, 82, 1956
- 3) 藤田 浩, ほか: 抗癌剤の Bioassay について. *メディヤサークル* 92, 259, 1967
- 4) 藤田 浩, ほか: Mitomycin C の血中組織内濃度. *癌・化学療法*, p.80, 医歯薬出版, 1966
- 5) 武田勝男: 癌の化学療法. 医歯薬出版, 1957
- 6) 梅沢純夫: 抗菌性物質. 培風館, 1963
- 7) 住木諭介: 抗生物質(上). 東京大学出版会, 1961
- 8) 宮村定男, ほか: Mitomycin C の体液中濃度測定. *J. Antibiotics, Ser. B* 14, 251, 1961
- 9) 田坂定幸, ほか: Mitomycin C の生体内動態. *最新医学* 14, 1845, 1959

STUDIES ON CONCENTRATION OF BLEOMYCIN IN BLOOD, URINE AND TISSUES

HIROSHI FUJITA

Department of Clinical Laboratory, National Cancer Center Hospital

Summary

1) Concentration of bleomycin in the blood, urine, and tissues from cancer patients or experimental animals was estimated by means of bioassay method (thin plate-cup method using *Bacillus subtilis*, ATCC 6633 spores as the test organisms).

2) The maximum blood level was 3.3 mcg/ml in the patients received intravenously 15 mg of the drug, and was 0.97 mcg/ml in those received intramuscularly.

3) Relative high level of bleomycin was detected in the kidney, lung, liver, skin and spleen in animal experiments (mice).

4) The drug level in the tumor was higher than that in the adjacent normal tissues of cancer patients. In tumor bearing mice, relative high or moderate level was obtained in the ascitic fluid and the solid tumor tissues, but very low in the ascitic tumor cells.

5) The drug was recovered at the ratio of 38.4% within 24 hours in the urine of the patients received intravenously 15 mg of the drug.

6) The effect of inactivation or adsorption of the drug by various tissue homogenates from mice was very slight as comparing with other anti-cancer drugs.