

1-ヘキシルカルバモイル-5-  
フルオロウラシルの抗腫瘍  
効果と作用機序に関する  
研究

国立がんセンター研究所

飯郷正明

# 目次

序論	-----	1
第 I 章	1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の抗腫瘍効果	5
第 1 節	1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の L1210 白血病に対する効果	7
第 2 節	L1210 白血病以外の各種マウス腫瘍に対する 1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の効果	17
第 3 節	1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の皮下移植 Lewis 肺癌及び B16 melanoma に対する効果	33
第 II 章	腹水型腫瘍 Sarcoma 180 における 1-Alkylcarbamoyl- 5-fluorouracil 類の抗腫瘍効果と血漿中及び 腹水中濃度との相関	51
第 III 章	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil のマウスにおける 体内分布と代謝産物	61
第 1 節	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil の体内分布	62
第 2 節	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil 及びその代謝 産物の分離定量法	72
第 3 節	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil の代謝産物	79
第 4 節	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil の吸収排泄	95
第 IV 章	1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil の腫瘍組織内 分布と代謝産物	107
第 1 節	腹水型腫瘍 Sarcoma 180 における 1-Hexyl- carbamoyl-5-fluorouracil の分布と代謝産物	108
第 2 節	各種固型腫瘍における 1-Hexylcarbamoyl-5-fluoro- uracil の分布と代謝産物	121
第 V 章	総括	139
参考文献	-----	146

## 序論

抗がん剤によるがんの治療は1940年代に始まり、近年小児の白血病、リンパ腫、ウィルムス腫瘍やコリオカルチノーマのような悪性腫瘍は、化学療法のみで高い治療効果が得られるようになった<sup>1)</sup>。他の腫瘍に於てもかなりの延命が可能となり<sup>2,3)</sup>、外科療法、放射線療法と並び重要な治療法となっている。わが国で認可されている抗がん剤は約40の化合物があるが、その中で临床上よく使用されているものは20の化合物にも満たない。

わが国の死因は、がんが一つに脳卒中を上回り、史上始めて第一位となり、なかでも、消化器系のがんはその約1/3を占めている。胃がんを含む消化器系の腫瘍に有効な抗がん剤には、5-fluorouracil (FU), mitomycin C, doxorubicin などがあるが、その中でFUは、その有効性の発見以来すでに20年以上たった今日でも、依然として多用されている。しかし、その毒性はかなり強いものであり、多くの研究者がFU誘導体の改良を試み、1967年にはFUの“トランスポート型”化合物としてテガフル(FT)が合成された<sup>4)</sup>。この化合物は経口投与時の毒性が低く、かつFUと同程度の抗腫瘍効果があることから、わが国で、医薬品となったもので、<sup>5)</sup> 現在外科療法の補助療法(Adjuvant chemotherapy)に多用されている。<sup>5~7)</sup> この化合物は、肝の薬物代謝酵素によりFUとなり抗腫瘍効果を発現する<sup>8)</sup>ため、肝の酵素的活性化によりその効果が左右される。FTの有効率はFUと大差ないが、骨髄抑制や腸粘膜に対する刺激作用が少ない。<sup>6,7)</sup> 著者は肝の代謝酵素活性に依存せず、腫瘍でFUに変換されるもので、FTと比べ抗腫瘍効果が強く、かつFTと同様骨髄や腸粘膜に対する毒性が弱い化合物を見出すため、FU誘導体の研究を始めた。目的とする化合物は、外科療法の補助薬として用いるため、経口投与で活性のあるものを目標とした。

まずFUの1の位置を種々のアルキル又はアラルキル基で置換した化合物の抗腫瘍活性を調べた。アルキル, アラルキル スルホニル及びカルボニル基のついたFU誘導体はL1210白血病に対して強い活性を示したが, 毒性も強かった。

そこで更に各種のFU誘導体を調べた結果, アルキルカルバモイル誘導体が多くのマウス腫瘍に対し, 幅広い効果があることを見出した。

1次スクリーニング系はL1210白血病を用いたが, 手術後の維持療法は長期間にわたり行なわれるため, 生長の速い腫瘍(L1210白血病, C1498白血病, sarcoma 180腹水型, Ehrlich腹水がん, adenocarcinoma 755, 中原・福岡肉腫)のみならず, 生長速度の違い, いわゆるslow growing tumorと言われる, Lewis肺がん及びB16 melanomaを用い, 長期投与時の抗腫瘍活性とその時の毒性を検討した。

特にLewis肺がんは容易に肺に転移し, 移植部位の腫瘍が約400 mg(移植後約10~14日)になるとすべてのマウスで肺転移がみられるという特徴をもっている<sup>10)</sup>。

このことから, 進行がんのモデルとして, このLewis肺がんを用い, 治療は腫瘍重量が約400 mgになった時点から始めた。これらの腫瘍に対し, FU誘導体の抗腫瘍効果及び毒性を検討した結果, ヘキシルカルバモイル誘導体が進行がんを含むすべての腫瘍に対し強い効果を示し, かつ長期投与可能な化合物であることを見出した。以上のことから1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU)を有力な抗がん剤候補として選別し, その薬理学的性質を検討した。

1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類は, FUと比べSarcoma 180腹水型に対し, より強い抗腫瘍効果を示した。そこで, この担がんマウスを用いて1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の薬力学的検討を行なった。1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil誘導体は, 経口投与後, 速やかにそのままの形

で吸収され、腹水に分布した。そこで血漿及び腹水に於けるFU及びアルキルカルバモイル誘導体の濃度 $\times$ 時間( $C \times t$ 値)又は最高濃度( $C_{max}$ )を測定し、抗腫瘍効果との相関を検討した。その結果、腹水中及び血漿中に於けるFUの $C \times t$ 値及び $C_{max}$ と抗腫瘍効果がよく相関しており、アルキルカルバモイル構造が、血漿中及び腹水中でのFU濃度の維持に重要な役目を果していることが示唆された。

次に、選別されたHCFUの特性を明らかにするため、HCFUの体内動態を調べ、FUと比較した。まず始めに、 $^{14}\text{C}$ -HCFUと $^{14}\text{C}$ -FUを用い、全身オートラジオグラフィ及び各臓器内放射能濃度を比較した。その結果 $^{14}\text{C}$ -HCFUは胃粘膜や血液に高く、 $^{14}\text{C}$ -FUは胃腸粘膜や脾などに高かったが、これらの分布の違いからは、HCFUとFUの抗腫瘍効果及び毒性の差を説明できなかった。そこで、次に $^{14}\text{C}$ -HCFUと $^{14}\text{C}$ -FUの代謝産物の分布の違いを検討した。HCFUの代謝産物として、側鎖のヘキシル基が酸化された1-(5-hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCFU), 1-(5-oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU), 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU)及び1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU)が見出された。マウス血漿中ではHCFUとHHCFUが同程度存在していたが、CPEFUやCPRFUは少なかった。HCFU由来のFUはかなりの量が長時間検出できた。このことは、 $^{14}\text{C}$ -FU投与時の血漿中FUが速やかに消失することと比べると、大きな違いであった。各種臓器に於ても $^{14}\text{C}$ -HCFUと $^{14}\text{C}$ -FUの代謝の差がはっきりしており、HCFU由来のFUが長時間持続していることが見出された。

次に、腹水型腫瘍 sarcoma 180 担がんマウスを用いて $^{14}\text{C}$ -HCFU及び $^{14}\text{C}$ -FUの腫瘍細胞への分布及び代謝産物を

比較した所、HCFU及びFUは容易に腹水に入ったが、腫瘍細胞へのHCFU及びその代謝産物の取込は、少なかった。しかし、腫瘍細胞内FU及び抗腫瘍活性に一番関係が深いと思われるそのヌクレオチド量は、等モル投与時には、HCFUとFUの差はみられず、HCFUの毒性低下による投与量の増加が抗腫瘍効果の上昇に結びつくことが明らかになった。

各種固型がんにおける $^{14}\text{C}$ -HCFUの取込は、腹水腫瘍とは異なり、未変化HCFUがかなり取込まれていた。HCFUに感受性のある腫瘍(Ridgway骨肉腫, adenocarcinoma 755, Lewis肺がん)と低感受性腫瘍(B 16 melanoma, G 26 glioma)とを比較してみると、血漿中濃度とHCFUの代謝産物のパターンでは大きな差はみられず、腫瘍への取込についても2時間までは差がなかった。しかし、投与12時間後には、感受性腫瘍にFUのヌクレオチドが多量に見出され、FUのヌクレオチド濃度が抗腫瘍効果発現に重要な役割を果たしていることを直接証明することができた。

以下、HCFUが選別された過程、HCFUとFUの体内分布、代謝産物の違い、及びFUと比べHCFUの方が治療効果が高い理由などについて記述する。

## 第1章 1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の抗腫瘍効果

化学物質の in vivo 又は in vitro のスクリーニングは薬理的活性物質を発見する重要な方法である。現在臨床で使われている抗がん剤は重要な細胞構成成分(核酸など)の拮抗剤を理論的にデザインすることにより<sup>11~13)</sup>、又、他の合成化合物や天然物の中からスクリーニングすることにより発見されてきた。

がん治療に有力な化学物質の探求は、nitrogen mustard が慢性白血病やリンパ腫に対し効果が見出されたことから始まった<sup>14,15)</sup>。ついで、葉酸拮抗剤の aminopterin が子供の急性白血病に対し効果を示したことから<sup>12)</sup>、Sloan-Kettering Institute や National Cancer Institute などで大規模に行なわれた。スクリーニングに用いられる方法の選択は特に重要なものであり、第一に要求されることは、実験的活性と臨床的活性との間に相関があることである。理想的には実験による活性物質のすべてがヒト腫瘍の治療に有効であることが望まれるが、現実には大変難しい。更に、重要な点は活性及び毒性の定量的比較が可能でなければならぬし、結果に再現性があることも必要である。自然発生腫瘍や化学物質により発がんさせた動物を多数集めることは困難であり、発がんするまでの時間もかかり、多数の化合物をスクリーニングするためには不适当である。そこで、多くの動物が使用可能である移植腫瘍の中から、ヒトでの効果を予測できる系を選択するのが最良である。1955年の Gellhorn や Hirschberg<sup>16)</sup>の報告によれば、腫瘍を用いない系は抗がん剤のスクリーニングには不适当である。しかも、一種類の腫瘍だけでは不充足であり、各種の移植腫瘍による腫瘍スペクトラムを調べるのが臨床効果を予測するためには不可欠であることを強調している。当時、Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC) では3種類のマウス腫瘍(L1210白血病、

sarcoma 180, adenocarcinoma 755)を用いていた。特に L1210 白血病は臨床効果の予測性が高いといわれている<sup>17)</sup>。

sarcoma 180及びadenocarcinoma 755はヒトの腫瘍と組織像が類似しているために選ばれたが、臨床的に使用している薬剤の活性を試験したところ、必ずしもヒト腫瘍での活性と一致しないことがわかってきた。更にWalker 256を用いた時代もあった。現在National Cancer InstituteではP388白血病が、L1210白血病より、抗生物質や植物成分に対して感受性が高いという理由で、よく使われるようになった<sup>18)</sup>。最近では、腫瘍生長速度が遅く、既存の抗がん剤が効きにくいB16 melanomaとLewis肺がんもNational Cancer Instituteの薬効評価の二次スクリーニングとして使われるようになった<sup>19)</sup>。B16 melanomaに対しては、臨床的に使われている多くの薬剤がある程度の効果を示すが、Lewis肺がんに対しては、既存の抗がん剤がほとんど活性を示さないのである<sup>20)</sup>。

著者は、5-fluorouracilなどのフルオロピリミジン誘導体がL1210白血病に対し効果を示すことから、更にP388白血病より結果が早く出るため、L1210白血病を用いて、一連の化合物の活性及び毒性を比較検討したのち、C1498白血病、adenocarcinoma 755、中原・福岡肉腫、sarcoma 180腹水型、Ehrlich腹水がんなどの系で抗腫瘍効果を調べた。更に、L1210白血病に対し治療比(最大耐量/最小有効量)が大きく、6種の腫瘍すべてに強い効果を示した化合物について、B16 melanomaとLewis肺がんを用いて、長期投与を試み、最適な化合物を選別した。



## 第1節 1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類のL1210白血病に対する効果

L1210 白血病は臨床効果の予測性が高いといわれていること<sup>17)</sup>、更にFUがこの腫瘍に活性を示すことから、最初のスクリーニング系として、L1210 白血病を用いた。多くのFU誘導体の抗腫瘍活性を調べた結果<sup>9)</sup>、1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類が経口投与で強い抗腫瘍活性を示すことがわかった。

この節では、一連のFUアルキルカルバモイル誘導体について、L1210 白血病に対する活性及び毒性と化学構造との相関を検討した。

### 材料と方法

実験腫瘍と使用動物 一次スクリーニング系としてL1210白血病(L1210)を用いた。以下この腫瘍について簡単に説明する。

本腫瘍は1948年DBAマウスにmethylcholanthreneの皮膚塗布により、リンパ節、脾臓、胸腺などのリンパ系組織に発生したものである<sup>21)</sup>。その腫瘍細胞はDBA/2, CDF<sub>1</sub> (Balb/c♀×DBA/2♂)及びBDF<sub>1</sub> (C57BL/6♀×DBA/2♂)に皮下、筋肉内、腹腔内に継代移植が可能であり、組織培養も出来る。移植性が高く、数個の細胞でも移植可能であり、10<sup>5</sup>個の細胞を移植すると約8日で死亡する。担がん動物の肝、脾、皮下あるいはリンパ節への高度の浸潤がみられ、移植48時間以内に末梢血に未熟なリンパ細胞がみられる<sup>22-23)</sup>。

L1210の移植及び抗腫瘍活性の判定法 BDF<sub>1</sub>雄マウスの腹腔内に移植した7日目の腫瘍細胞を生理食塩水で100倍希釈し(10<sup>5</sup>個細胞/0.05ml)、BDF<sub>1</sub>マウス1匹当り0.05mlを腹腔内移植した。1群6匹とし、被験化合物を腫瘍

移植 24 時間後から 1 日 / 回 5 日間連続腹腔内又は経口投与し、生存日数を記録、各群の平均生存日数を求めた。次式から生存日数延長率 (Increase in life span over controls, ILS%) を算出した。

$$\text{ILS}(\%) = \frac{\text{実験群の平均生存日数}}{\text{対照群の平均生存日数}} \times 100 - 100$$

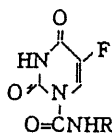
抗腫瘍効果判基準は ILS 9% 以下を -, 10~19% を +, 20~29% を ++, 30% 以上を +++ とした<sup>24)</sup>。更に  $\text{ILS}_{30}$  (生存日数を 30% 延長する投与量: 最小有効量) 及び  $\text{ILS}_{\text{max}}$  (生存日数を最大にする投与量: 最大耐量) を求め、治療比 [therapeutic ratio] ( $\text{ILS}_{\text{max}} / \text{ILS}_{30}$ ) を算出した。この治療比が大きい程、安全性が高いものと考えられる。

## 結果

### 腹腔内投与による FU アルキルカルバモイル誘導体の抗腫瘍効果

Table I-1 に示すように、すべてのアルキルカルバモイル誘導体は、腹腔内投与で L1210 に対し、著しい活性を示した。メチルやフェニル誘導体は著明な活性を示し、 $\text{ILS}_{30}$  は両者とも約 10 mg/kg であった。tert-ブチル誘導体はもっとも少量で効果を示し、その値は  $\text{ILS}_{30}$  が 8.4 mg/kg であった。脂肪族誘導体の炭素鎖を順次増していくと、抗腫瘍効果と宿主動物への毒性は順次減少した (Fig. I-1)。しかし、活性と毒性の減弱の割合は各々異なっていた。その中で、tert-ブチル誘導体が一番大きい治療比 (約 6) を示した。直鎖状脂肪族誘導体の中で、1 又は 6 個以上の炭素数を持った化合物の治療比は 2 個から 5 個までの炭素数を持った化合物のそれより大きかった。芳香族置換体の中では、フェニル誘導体が最高の治療比 (約 4) を示した (Fig. I-2)。腹腔内投与では、これらの誘導体の

Table I-1. Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Derivatives against L1210  
Leukemia by Intraperitoneal Injection



R	Dose (mg/kg/day)	ILS over controls (%)	Antitumor activity	R	Dose (mg/kg/day)	ILS over controls (%)	Antitumor activity
CH <sub>3</sub>	100	0	Toxic	<i>tert</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	10	16	+
	50	65	##		100	4	##
	30	50	##		50	50	##
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	10	21	+	30	40	##	
	100	-10	Toxic	10	34	##	
	50	44	##	3	9	-	
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	30	33	##	cyclo-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub>	300	-10	Toxic
	10	9	-	200	0	-	
	200	-3	Toxic	100	29	##	
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	100	60	##	50	25	##	
	50	29	##	30	16	+	
	30	14	+	100	25	##	
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	200	-11	Toxic	50	53	##	
	100	56	##	30	48	##	
	50	21	##	10	26	##	
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	30	13	+	CH <sub>2</sub> -	100	12	+
	300	-6	Toxic	50	44	##	
	200	18	+	30	25	##	
C <sub>10</sub> H <sub>21</sub>	100	38	##	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> -	300	-19	Toxic
	50	21	##	200	13	+	
	30	13	+	100	57	##	
C <sub>12</sub> H <sub>25</sub>	300	-39	Toxic	50	31	##	
	200	54	##	30	17	+	
	100	44	##	5-Fluorouracil (FU)	30	60	##
C <sub>14</sub> H <sub>29</sub>	30	10	+	20	91	##	
	300	40	##	10	73	##	
	200	48	##	3	38	##	
C <sub>16</sub> H <sub>33</sub>	100	46	##	1	19	+	
	30	9	-	1-(2-Tetrahydrofuryl)-	200	-2	Toxic
	300	-12	Toxic	5-fluorouracil (FT)	100	34	##
iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	200	35	##	70	9	-	
	100	35	##	30	0	-	
	30	13	+				
	200	-11	Toxic				
	100	78	##				
	70	46	##				
	30	20	##				

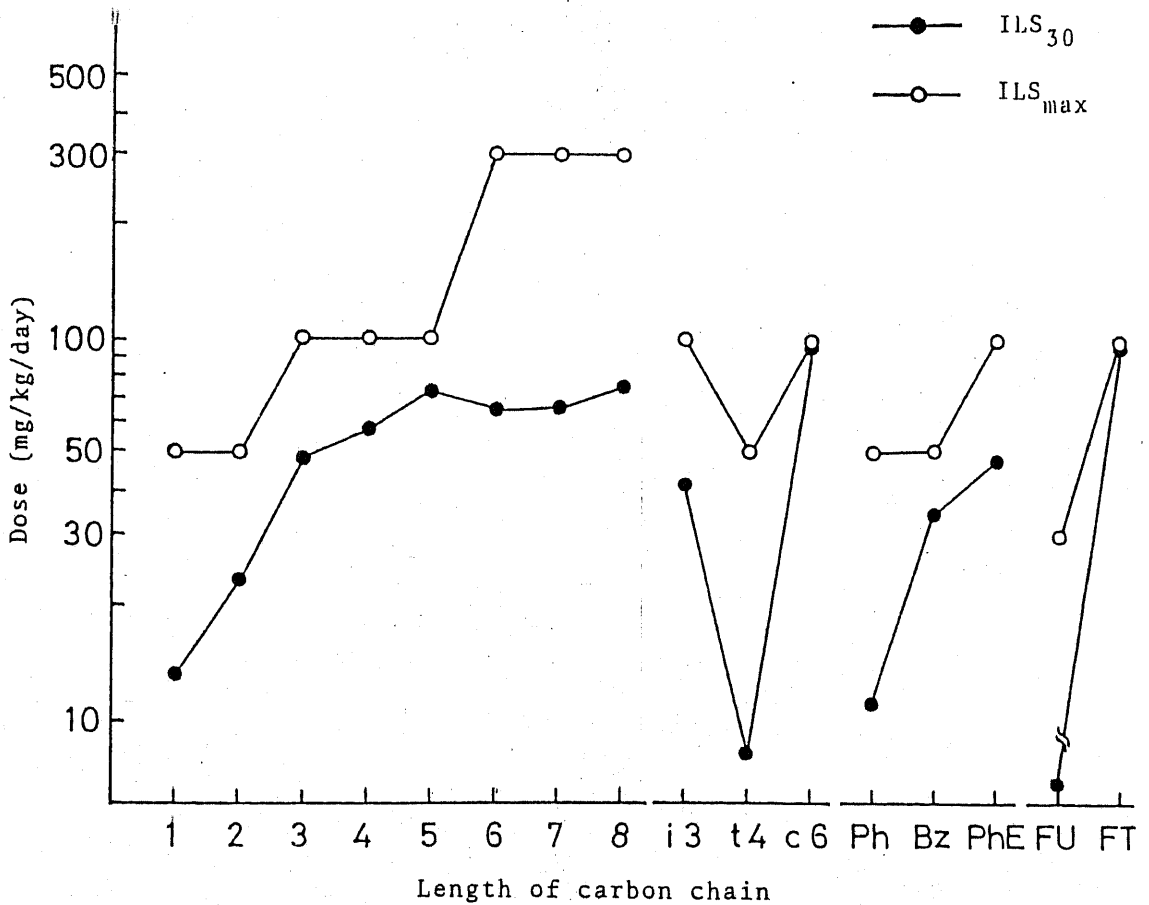


Fig. I-1. Relationship between chemical structure and antitumor activity or toxicity in 5-fluorouracil derivatives by intraperitoneal administration

i:iso, t:tert, c:cyclo, Ph:phenyl, Bz:benzyl, PhE:phenethyl.

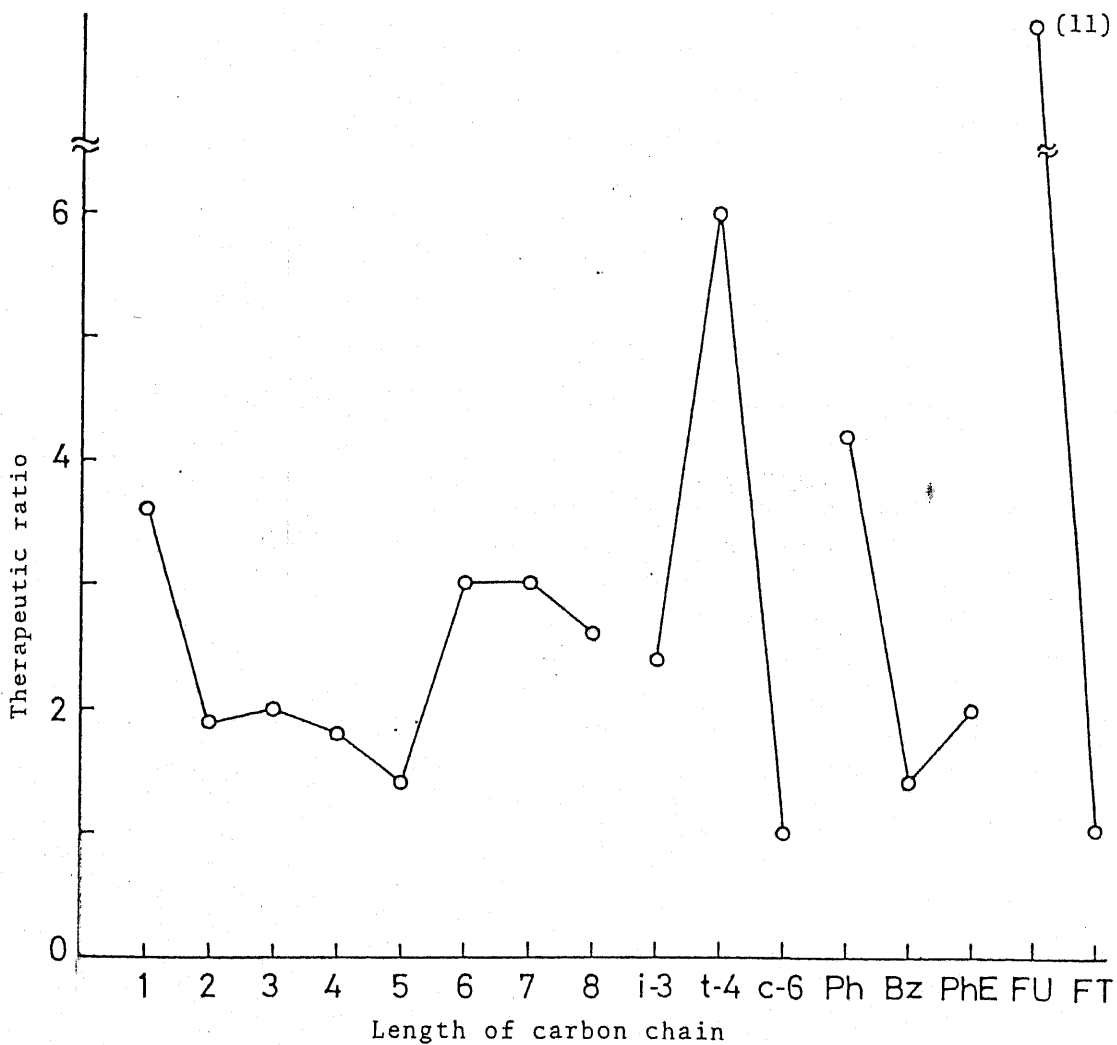


Fig. I-2. Relationship between chemical structure and therapeutic ratio in 5-fluorouracil derivatives by intraperitoneal administration

i:iso, t:tert, c:cyclo, Ph:phenyl, Bz:benzyl, PhE:phenethyl.

$$\text{Therapeutic ratio} = \text{ILS}_{\text{max}} / \text{ILS}_{30}$$

うち *tert*-ブチル誘導体が最高の治療比を示したものの、またFUの治療比(約11)より小さかった。

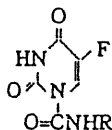
### FU誘導体の経口投与におけるL1210に対する抗腫瘍効果




臨床効果の予測という意味で化合物の活性を評価するために経口投与時の活性を調べた。Table I-2に示すように経口投与でFUのアルキルカルバモイル誘導体は全てL1210に対して著しい活性を示した。本実験では、炭素鎖の延長に従って、抗腫瘍活性、宿主に対する毒性は減少していった(Fig. I-3)が、化合物の治療比は多様に変化した。しかし、側鎖炭素数が偶数である化合物の治療比は、両隣の炭素数が奇数である化合物の値より大きかった(Fig. I-4)。この系統に属する化合物の多くはFUやFTよりも高い治療比を示した。その中でも1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU)が最高の治療比を示し、その値は4.5であった。FUは腹腔内投与では著しい抗腫瘍効果を示したが、経口投与時の治療比は著しく低下した。また、HCFUの治療比は、経口投与時の方が、非経口投与時よりも大きかった。経口投与での値は、6-mercaptopurineやmethotrexateに匹敵するものであった(Table I-3)。

### 考察

1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類のL1210に対する延命効果は経口投与でもみられ、アルキル鎖の延長は宿主への毒性を減少させる効果を示したが、L1210に対する抗腫瘍活性への影響は複雑で炭素数の奇数と偶数とでは腫瘍細胞に対する効果に違いがあった。L1210に対する最大延命率Maximum ILSはすべての誘導体で類似し、約60%であった。安全性を示す治療比でみるとHCFUが一番優れていた。

Table I-2. Antitumor Activity of 5-Fluorouracil Derivatives against L1210 Leukemia by Oral Administration



R	Dose (mg/kg/day)	ILS over controls (%)	Antitumor activity	R	Dose (mg/kg/day)	ILS over controls (%)	Antitumor activity
CH <sub>3</sub>	100	13	+		100	44	##
	50	47	##		70	56	##
	30	33	##		30	29	##
	10	14	+		10	13	+
C <sub>1</sub> H <sub>5</sub>	100	39	##	<i>tert</i> -C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	200	-7	Toxic
	70	62	##	100	54	##	
	30	31	##	70	38	##	
C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	10	13	+	30	25	##	
	200	10	+	10	10	+	
	100	60	##	cyclo-C <sub>4</sub> H <sub>11</sub>	300	15	+
C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	70	38	##	200	59	##	
	30	16	+	100	41	##	
	200	20	##	30	21	##	
C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	100	54	##		100	14	+
	50	38	##	50	31	##	
	30	23	##	30	14	+	
	10	6	-	CH <sub>2</sub> - 	200	23	##
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	300	23	##	100	44	##	
	200	41	##	70	48	##	
	100	22	##	30	29	##	
	30	3	-	10	19	+	
C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	300	23	##	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> - 	500	13	+
	200	53	##	300	33	##	
	100	50	##	200	18	+	
	50	34	##	100	16	+	
C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	30	21	##	5-Fluorouracil (FU)	70	15	+
	300	21	##	50	56	##	
	200	39	##	30	33	##	
	100	26	##	10	9	-	
	30	23	##	1-(2-Tetrahydrofuryl)-	200	16	+
C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	10	6	-	5-fluorouracil (FT)	100	31	##
	700	35	##	70	15	+	
	500	33	##	30	0	-	
	300	31	##				
iso-C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	100	15	+				
	200	10	+				

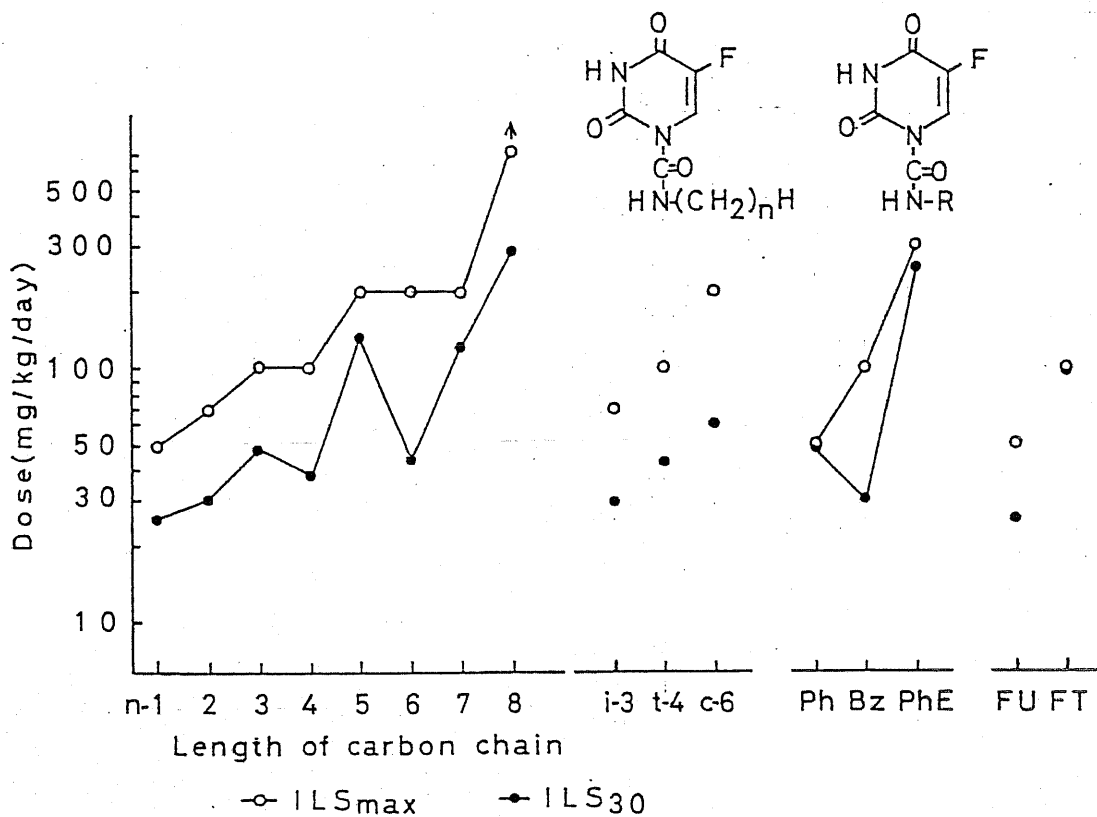


Fig. I-3. Relationship between chemical structure and antitumor activity or toxicity in FU derivatives by oral administration  
 i:iso, t:tert, c:cyclo, Ph:phenyl, Bz:benzyl, PhE:phenethyl.



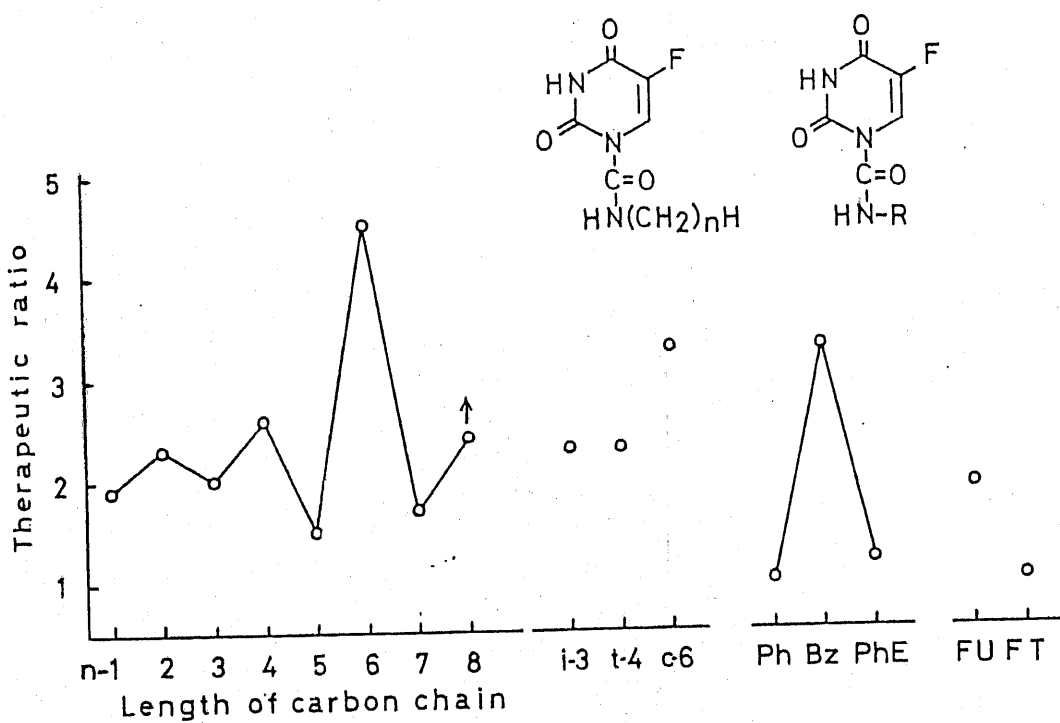


Fig. I-4. Relationship between chemical structure and therapeutic ratio in FU derivatives by oral administration  
 i:iso, t:tert, c:cyclo, Ph:phenyl, Bz:benzyl, PhE:phenethyl.

Table I-3. Therapeutic Evaluation in L-1210 Leukemia System by Oral Administration

Compound	ILS <sub>30</sub> (mg/kg/day)	ILS <sub>max</sub>	Maximum ILS (%)	Therapeutic ratio*
HCFU	44	200	53	4.5
FT	98	100	31	1.0
FU	26	50	56	1.9
Cyclophosphamide	6.4	70	302	11
6-Mercaptopurine	17	70	50	4.1
1-β-D-Arabinofuranosyl- cytosine	25	200	87	8.0
Methotrexate	0.92	5.0	63	5.4
Mitomycin C	5.0	—**	0	—**
Daunorubicin	30	—**	0	—**
Vincristine	0.30	—**	4	—**
Procarbazine	110	300	54	2.7

\* Therapeutic ratio =  $ILS_{max} / ILS_{30}$

\*\* Compound was inactive against the tumor at the dose of ten times higher than that by intraperitoneal injection.

## 第2節 L1210白血病以外の各種マウス腫瘍に対する 1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の効果

第1節で述べたように1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類はL1210に対し経口投与で著しい延命効果を示した。そこで、これらの化合物の中から、臨床使用に期待が持てる化合物を選別するため、L1210以外の各種マウス腫瘍を用いて、抗腫瘍活性を検討した。一連の化合物群の抗腫瘍活性を評価するためには、一つの腫瘍による有効性スクリーニングに加えて、二次スクリーニングとしての抗腫瘍スペクトラムの検討が必要である。本節では、1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の経口投与における各種マウス腫瘍：C1498白血病, sarcoma 180 腹水型, Ehrlich 腹水がん, 中原・福岡肉腫及び adenocarcinoma 755 の計5種に於ける抗腫瘍スペクトラムを検討した。

### 材料と方法

腫瘍及び動物 本研究で用いた腫瘍はC1498 骨髄性白血病, sarcoma 180 腹水型, Ehrlich 腹水がん, 中原・福岡肉腫 及び adenocarcinoma 755 の計5種類の腫瘍である。以下各々の腫瘍について簡単に説明する。

骨髄性白血病C1498 (C1498)<sup>25~27)</sup> 本腫瘍は1941年 C57BL/6 マウスの脾臓に自然発生したものを継代移植したものである。この腫瘍は系特異性が強いので、移植動物として C57BL/6 あるいは BDF<sub>1</sub> のみを用いられている。継代移植は皮下、筋肉内でも可能であり、腫瘍細胞を腹腔内に移植すると容易に腹水性となる。生存日数は腹腔内に移植した場合、ほぼ一定で、 $10^6$  個の腫瘍細胞を移植すると

大体8日である。

Sarcoma-180腹水型(S180A)<sup>28~30)</sup> 本腫瘍はCrocker sarcoma 180とも呼ばれる。原発腫瘍は1941年Crocker研究所でアルビノマウスの右腋窩部に発見されたがん腫で、その原発組織は皮膚、乳腺いずれとも決定できなかった。累代移植を重ねているうちに、組織学的所見が次第に肉腫様になった。初めて腹水化を試みたのはGoldieである。この腫瘍は移植に際して、系特異性はなく、 $10^7$ 個の移植で移植率100%であり、移植動物の生存日数は13~24日程である。担がん動物の組織内浸潤は少なく、血管やリンパ管内に侵入して転移することはほとんどないが、脾臓肥大がみられることが多い。

Ehrlich 腹水がん(EAC)<sup>31,32)</sup> 本腫瘍は1905年 Paul Ehrlich の研究室で、マウスの乳がんから継代移植されたもので諸種の系統マウスに高率に移植できる。生存日数は、 $10^7$ 個の細胞を移植すると、13~18日程である。担がんマウスの組織内浸潤は高度に起こり、脾臓組織の変性がみられる。

中原・福岡肉腫(NFS)<sup>33)</sup> 1948年がん研究所で雌マウス背部皮下組織に自然発生したのから継代移植を重ねたものである。本腫瘍は、生長が速く、腫瘍移植10日目まで29前後に達する。移植後16~35日程で担がん動物は死亡する。この腫瘍の移植はマウスの系特異性が少なく、普通アルビノマウスが用いられている。

Adenocarcinoma 755 (Ca755)<sup>34)</sup> Bagg と Jackson が1936年低発がん系C57BLマウスに自然発生した乳がんをC57BL/6及びBDF<sub>1</sub>などの交雑種に継代移植したものである。

皮下移植 8日目頃から中央部に壊死を作る。腫瘍は普通境界がはっきりしているが、時々横紋筋への浸潤が観察される。生存日数は 16~35日 で ややばらつく。

白血病 C1498 の移植及び抗腫瘍活性の判定法 BDF<sub>1</sub>  
雄マウス移植 7日目の腫瘍細胞を生理食塩水で 10倍希釈 (約  $10^6$  個細胞 /  $0.05\text{ml}$ ) し、BDF<sub>1</sub> マウス / 匹当り  $0.05\text{ml}$  を腹腔内に移植した。1群 6匹とし、被験化合物を腫瘍移植 24時間後から 1日 / 回 5日間経口投与し、生存日数を記録し、各群の平均生存日数を求めた。次式から生存日数延長率 ILS% を算出した。

$$\text{ILS} (\%) = \frac{\text{実験群の平均生存日数}}{\text{対照群の平均生存日数}} \times 100 - 100$$

抗腫瘍効果判定基準は ILS 9% 以下を -, 10~19% を +, 20~29% を ++, 30% 以上を +++ とした。

### 腹水型腫瘍 S180A と EAC の移植及び抗腫瘍活性の判定法

腹水型の S180A 及び EAC の何れも ddN 雌マウス / 匹当り、7日目の腫瘍細胞  $10^7$  個を腹腔内移植した。1群 6匹とし、被験化合物を腫瘍移植 24時間後から、1日 / 回 5日間連続経口投与し、7日目にマウスを殺し、腹水量を測った。その腹水の一部をヘマトクリット管にとり、遠心分離後細胞比 (ascitocrit) を求め、総細胞容積 (Total packed cell volume; TPCV) を算出した。TPCV の算出は Sassenrath の方法<sup>35)</sup> に従い、次式を用いた。

$$\text{TPCV} (\text{ml}) = \text{腹水量} (\text{ml}) \times \text{細胞比}$$

対照群, 実験群, 各々の平均値を求め、対照群の腫瘍生長を 100% として、各実験群の腫瘍生長率 (Growth ratio) を算出する。Growth ratio は次式で求めた。

$$\text{Growth ratio} (\%) = \frac{\text{実験群の平均 TPCV}}{\text{対照群の平均 TPCV}} \times 100$$

抗腫瘍効果の判定基準はS180A及びEACとも、Growth ratio 66%以上を一、65~41%を+、40~11%を++、10%以下を+++とした<sup>36)</sup>。

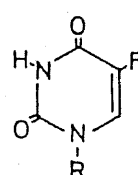

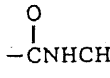
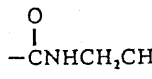
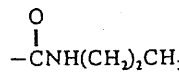
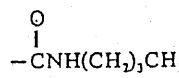
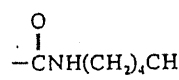
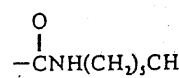
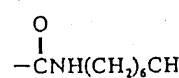
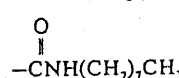
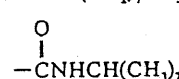

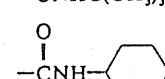
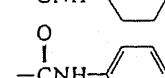
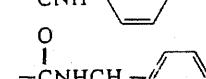
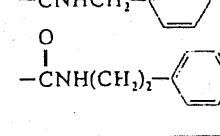
### 固型腫瘍NFSとCa755の移植及び抗腫瘍活性の判定法

固型腫瘍のNFS(移植後10日目)及びCa755(移植後12日目)の腫瘍塊を無菌的に取り出し、鋏で細切後各々20mg(NFS)及び40mg(Ca755)を移植針に詰め、各々ddM(NFS)及びBDF<sub>1</sub>(Ca755)の背部皮下に移植した。1群6匹とし、被験化合物を腫瘍移植24時間後から、1日/回5日間経口投与し、10日目(NFS)あるいは12日目(Ca755)にマウスを殺し、腫瘍重量を測り、各群の平均腫瘍重量を求め、対照群の腫瘍生長を100%としたときの各実験群の腫瘍生長率を算出した<sup>37)</sup>。

抗腫瘍効果はGrowth ratioが71%以上を一、70~51%を+、50~21%を++、及び20%以下を+++とした<sup>37)</sup>。

化合物 被験化合物は三井製薬株式会社より提供されたものを用いた。14種の1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類について試験した。その構造式はTable I-4に示した。化合物は0.5% carboxymethyl cellulose 添加生理食塩水(0.5%CMC)に懸濁し、0.01ml/g体重を経口投与した。

Table I-4. Chemical structures of 5-fluorouracil derivatives

	Compound no.	R
	I	-H
	II	
	III	
	IV	
	V	
	VI	
	VII	
	VIII	
	IX	
	X	
	XI	
	XII	
	XIII	
	XIV	
	XV	
	XVI	

## 結果

C1498に対する抗腫瘍効果 Table I-5はC1498に対する抗腫瘍活性について、FUの1位をアルキルカルバモイル化した場合の構造修飾効果を示す。経口投与で、すべての誘導体は著しい活性を示した。この腫瘍に対する最大延命効果はメチル誘導体(Ⅲ)で得られ、FU(Ⅰ)やFT(Ⅱ)よりも強かった。

S180Aに対する抗腫瘍効果 Table I-6に示すように、この腫瘍に対して、対照化合物のFU(Ⅰ)は弱い効果、FT(Ⅱ)は無効であった。一方、メチル(Ⅲ)、エチル(Ⅳ)、ヘキシル(Ⅷ)、*iso*-プロピル(Ⅺ)及びフェニル(ⅩⅥ)誘導体は強い抗腫瘍効果を示した。特にメチル(Ⅲ)、エチル(Ⅳ)、*iso*-プロピル(Ⅺ)及びフェニル(ⅩⅥ)誘導体は、この腫瘍の生長を完全に抑制した。これらの化合物の用量反応直線を各々としてみるとFig. I-5のようになり、メチル(Ⅲ)、エチル(Ⅳ)及びヘキシル(Ⅷ)誘導体などでは、きれいな用量・反応直線が得られた。しかし、プロピル(Ⅴ)やブチル(Ⅵ)誘導体などではFUと同様高濃度にしても弱い抗腫瘍効果しか示さなかった。また、メチル(Ⅲ)、エチル(Ⅳ)、プロピル(Ⅴ)、ブチル(Ⅵ)及び*iso*-プロピル(Ⅺ)誘導体では強い中枢毒性がみられたが、ヘキシル(Ⅷ)誘導体では全くその傾向はみられなかった。

EACに対する抗腫瘍効果 Table I-7に示すように、至適投与量での最大効果は、メチル(Ⅲ)とエチル(Ⅳ)誘導体で見られ、ほぼ完全に腫瘍の生長を抑制した。次いで*iso*-プロピル(Ⅺ)、ヘキシル(Ⅷ)誘導体であった。プロピル(Ⅴ)、ブチル(Ⅵ)、ヘプタール(Ⅸ)及びオクタール(Ⅹ)誘導体はFUとほぼ同じ効果を示したのに対し、FTは弱い効果しか示さなかった。



Table I-5. Effect of compounds on the growth of leukemia C1498

Compound no.	Dose (mg/kg/day)	ILS (%) <sup>a</sup>	Antitumor activity <sup>b</sup>
I	10	19	+
	20	37	+++
	30	43	+++
	50	49	+++
	70	13	+
II	70	9	-
	100	27	++
	200	40	+++
	300	53	+++
	500	13	+
III	10	30	+++
	30	32	+++
	100	75	+++
	200	6	-
IV	10	22	++
	30	46	+++
	70	63	+++
	100	-11	Toxic <sup>c</sup>
V	50	18	+
	100	46	+++
	300	72	+++
	400	24	++
VI	50	31	+++
	100	58	+++
	200	17	+
VII	200	52	+++
VIII	50	15	+
	70	34	+++
	100	43	+++
	200	59	+++
	300	48	+++
IX	500	24	++
	200	36	+++
	300	6	-
X	300	42	+++
	500	0	-
XI	70	52	+++
	100	52	+++
XII	50	48	+++
	100	-3	Toxic
XIII	100	15	+
	200	57	+++
	300	9	-
XIV	50	53	+++
XV	100	61	+++
	200	19	+
XVI	100	48	+++
	200	19	+

<sup>a</sup> Mean survival time of untreated controls was 9.3 days

<sup>b</sup> Antitumor activity was graded as: -, 0~9; +, 10~19; ++, 20~29; and +++, 30 or more of increase in lifespan (ILS%) over control

<sup>c</sup> Mean survival time in treated group was shorter than that in control group

Table I-6. Effect of compounds on the growth of ascites sarcoma  
180

Compound no.	Dose (mg/kg/day)	Growth ratio* (T/C %)	Mortality (died/used)	Antitumor activity <sup>b</sup>
I	30	70	0/6	—
	50	63	0/6	+
	70	53	0/6	+
	100	—	3/6	Toxic
II	100	100	0/6	—
	200	106	0/6	—
	300	68	0/6	—
	400	—	1/6	Toxic
III	1	41	0/6	+
	3	19	0/6	++
	10	12	0/6	++
	30	7	0/6	+++
	100	0	0/6	+++
	200	0	0/6	+++
	300	—	6/6	Toxic
IV	10	52	0/6	+
	30	29	0/6	++
	70	7	0/6	+++
	100	0	0/6	+++
	200	—	2/6	Toxic
V	30	81	0/6	—
	100	84	0/6	—
	200	69	0/6	—
	300	—	1/6	Toxic
VI	100	64	0/6	+
	200	65	0/6	+
	300	—	2/6	Toxic
VII	100	81	0/6	—
	200	31	0/6	++
	300	19	0/6	++
	400	—	4/6	Toxic
VIII	50	96	0/6	—
	100	54	0/6	+
	200	17	0/6	++
	300	9	0/6	+++
	400	—	2/6	Toxic
IX	100	80	0/6	—
	200	40	0/6	++
	300	26	0/6	++
	400	—	1/6	Toxic
X	500	12	0/6	++
XI	100	80	0/6	—
	200	20	0/6	++
	300	0	0/6	+++
XII	200	27	0/6	++
XIII	100	84	0/6	—
	200	43	0/6	+
	300	26	0/6	++
XIV	100	50	0/6	+
XV	100	38	0/6	++
	300	—	2/6	Toxic
XVI	200	10	0/6	+++
	300	0	0/6	+++

\* Growth ratio (T/C %) was determined on day 7 after implantation of  $10^7$  ascites cells

<sup>b</sup> Antitumor activity was graded as: +++, 0 ~ 10; ++, 11 ~ 40; +, 41 ~ 65; and —, 66 or more of growth ratio (T/C %)

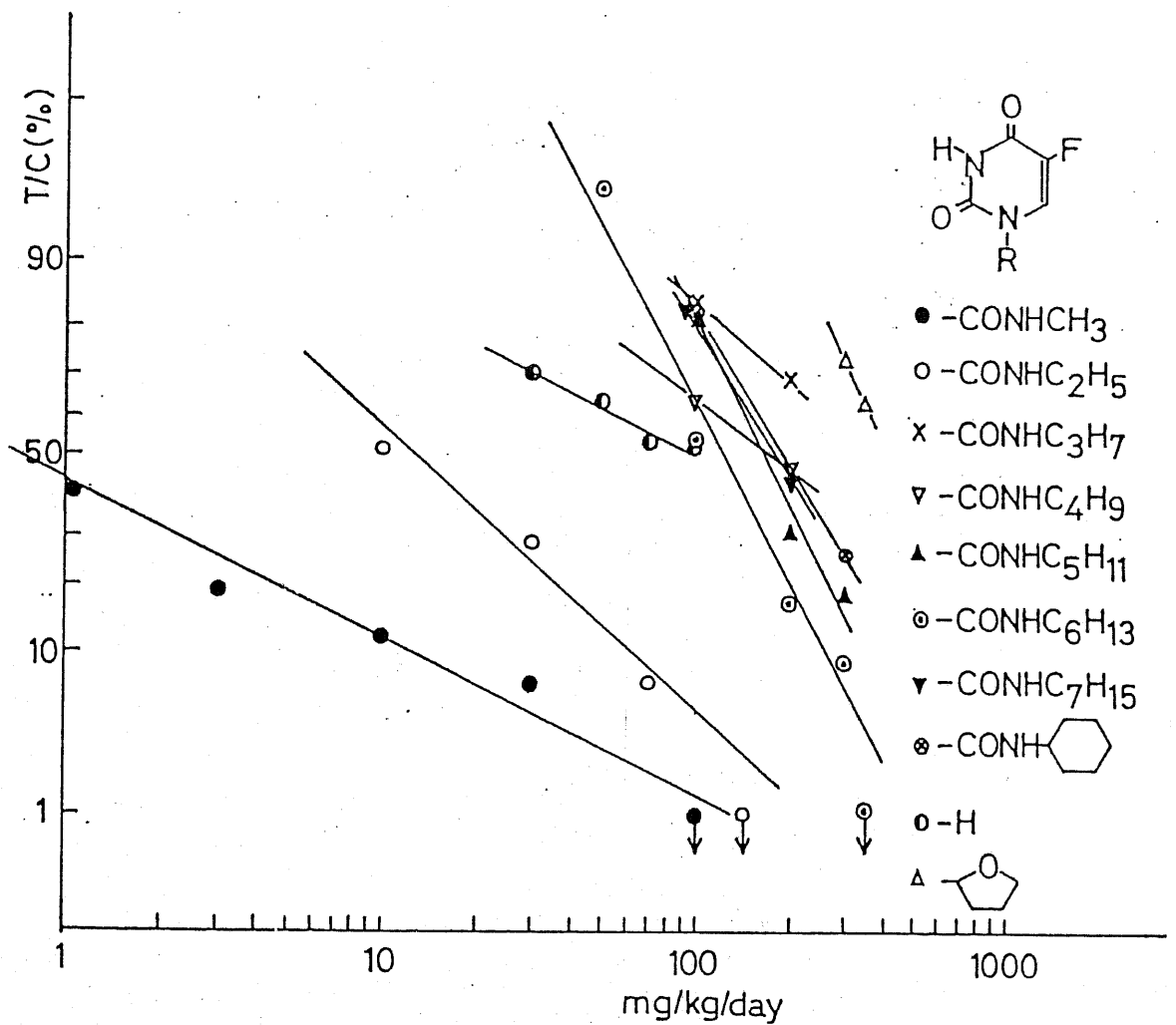


Fig. I-5. Dose-response curve of FU derivatives in ascites sarcoma 180

Table I-7. Effect of compounds on the growth of Ehrlich ascites carcinoma

Compound no.	Dose (mg/kg/day)	Growth ratio (T/C %)	Mortality (died/used)	Antitumor activity <sup>a</sup>
I	50	54	0/6	+
	70	28	0/6	++
	100	—	3/6	Toxic
II	100	85	0/6	—
	200	51	0/6	+
	300	—	2/6	Toxic
III	30	54	0/6	+
	100	1	0/6	+++
	200	—	2/6	Toxic
IV	100	10	0/6	+++
	200	0	0/6	+++
	300	—	3/6	Toxic
V	50	59	0/6	+
	100	20	0/6	++
	200	—	2/6	Toxic
VI	100	55	0/6	+
	200	36	0/6	++
	300	—	1/6	Toxic
VII	100	99	0/6	—
	200	63	0/6	+
	300	—	4/6	Toxic
VIII	70	80	0/6	—
	100	57	0/6	+
	200	13	0/6	++
	300	—	1/6	Toxic
IX	300	40	0/6	++
X	500	36	0/6	++
XI	100	92	0/6	—
	300	12	0/6	++
XII	100	87	0/6	—
	300	—	6/6	Toxic
XIII	100	51	0/6	+
XIV	50	63	0/6	+
XV	100	44	0/6	+
XVI	100	97	0/6	—
	200	42	0/6	+

<sup>a</sup> Criteria are the same as in Table I-6.

### NFS に対する抗腫瘍効果

Table I-8 に示すよう

に、この腫瘍に対しては、*iso*-プロピル(XI)、シクロヘキシル(XIII)及びフェニル(XIV)誘導体を除く、1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類は全て対照化合物と同程度の著しい抗腫瘍効果を示した。中でも 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU, VIII) が最高の治療効果を示した。

### Ca 755 に対する抗腫瘍効果

Table I-9 に示すよう

に、このがん腫に対し至適投与量でメチル(III)、エチル(IV)、ブチル(VI)、ペンチル(VII)、ヘキシル(VIII)、*iso*-プロピル(XI)、*cyclo*-ヘキシル(XIII)、ベンジル(XV)及びフェネチル(XVI)誘導体が著しい活性(++)を示した。FU は無効であり、FT は ++ の活性を示した。この腫瘍に於ても、FU のアルキルカルバモイル誘導体は、FU と比べ、抗腫瘍効果が高められていることが明らかになった。

各種腫瘍に対する 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の至適投与量に於ける最大効果を Table I-10 に要約した。

2 種類の白血病及び NFS に対しては、全誘導体が著しい(+++) または、かなり(++) の効果を示した。しかし、2 種類の腹水腫瘍及び Ca 755 に対するこれら誘導体の効果は一定でなかった。この 3 種類の腫瘍に対しては、被験化合物 14 種のうち 5 種：メチル(III)、エチル(IV)、ヘキシル(VIII)、オクチル(X) 及び *iso*-プロピル(XI)誘導体が著しい(+++) または、かなりの(++) 効果を示した。一方、FU と FT は無効あるいは弱い活性を示したにすぎなかった。

以上の結果、この実験に用いた 6 種の腫瘍に対して、著しいあるいはかなりの活性を示した化合物は、メチル(III)、エチル(IV)、ヘキシル(VIII)、オクチル(X) 及び *iso*-プロピル(XI) 誘導体であり、2 種類の対照化合物の FU 及び FT は 6 種のうち 4 種に対して著しいあるいはかなりの活性を示した。

Table I-8. Effect of compounds on the growth of Nakahara-Fukuoka sarcoma

Compound no.	Dose (mg/kg/day)	Growth ratio <sup>a</sup>	Mortality (died/used)	Antitumor activity <sup>b</sup>
I	30	78	0/6	—
	50	20	0/6	+++
	70	10	0/6	+++
	100	—	3/6	Toxic
II	200	52	0/6	+
	300	10	0/6	+++
	400	—	1/6	Toxic
III	30	17	0/6	+++
	50	6	0/6	+++
	100	—	2/6	Toxic
IV	100	11	0/6	+++
	200	—	2/6	Toxic
V	100	10	0/6	+++
	200	—	1/6	Toxic
VI	100	11	0/6	+++
	200	11	0/6	+++
	300	—	4/6	Toxic
VII	100	91	0/6	—
	200	13	0/6	+++
VIII	30	85	0/6	—
	50	50	0/6	++
	100	14	0/6	+++
	300	0	0/6	+++
	400	—	2/6	Toxic
IX	300	10	0/6	+++
X	500	6	0/6	+++
XI	100	33	0/6	++
XII	100	8	0/6	+++
	200	—	2/6	Toxic
XIII	100	50	0/6	++
	200	39	0/6	++
	300	—	2/6	Toxic
XIV	100	40	0/6	++
XV	100	11	0/6	+++
	200	—	2/6	Toxic
XVI	100	19	0/6	+++
	200	—	3/6	Toxic

<sup>a</sup> Growth ratio (T/C %) was determined on day 12 after implantation of 20 mg tumor fragments

<sup>b</sup> Antitumor activity was graded as: —, 71 ~ 100; +, 51 ~ 70; ++, 21 ~ 50; +++, 0 ~ 20 of T/C %

Table I-9. Effect of compounds on the growth of adenocarcinoma 755

Compound no.	Dose (mg/kg/day)	Growth ratio <sup>a</sup> (T/C %)	Mortality (died/used)	Antitumor activity <sup>b</sup>
I	30	73	0/6	—
	50	—	2/6	Toxic
II	200	44	0/6	++
	300	—	3/6	Toxic
III	30	63	0/6	+
	50	4	0/6	+++
	100	—	3/6	Toxic
IV	30	8	0/6	+++
	50	0	0/6	+++
	100	—	2/6	Toxic
V	50	55	0/6	+
	100	—	1/6	Toxic
VI	200	4	0/6	+++
	300	—	4/6	Toxic
VII	100	67	0/6	+
	200	3	0/6	+++
VIII	30	89	0/6	—
	100	44	0/6	++
	200	5	0/6	+++
	300	—	1/6	Toxic
IX	300	42	0/6	++
X	300	32	0/6	++
	500	—	3/6	Toxic
XI	100	13	0/6	+++
XII	50	50	0/6	++
	100	—	6/6	Toxic
XIII	100	21	0/6	++
	300	0	0/6	+++
	50	70	0/6	+
XIV	100	—	2/6	Toxic
	70	0	0/6	+++
XV	100	—	1/6	Toxic
	100	10	0/6	+++
XVI	100	—	6/6	Toxic
	200	—	6/6	Toxic

<sup>a</sup> Growth ratio (T/C %) was determined on day 14 after implantation of 40 mg tumor fragments

<sup>b</sup> Criteria were the same as in Table I-8.

Table I-10. Maximum Effect of 5-Fluorouracil Derivatives by Oral Administration

Compound No.	Tumor <sup>a)</sup>					
	NFS	Ca755	S180	EAC	C1498	L1210
I	+++	-	+	++	+++	+++
II	+++	++	-	+	+++	+++
III	+++	+++	+++	+++	+++	+++
IV	+++	+++	+++	+++	+++	+++
V	+++	+	+	++	+++	+++
VI	+++	+++	+	++	+++	+++
VII	+++	+++	++	+	+++	+++
VIII	+++	+++	+++	++	+++	+++
IX	+++	++	++	+	+++	+++
X	+++	++	++	++	+++	+++
XI	++	+++	+++	++	+++	+++
XII	+++	++	++	-	+++	+++
XIII	++	+++	++	+	+++	+++
XIV	++	+	+	+	+++	+++
XV	+++	+++	++	+	+++	+++
XVI	+++	+++	+++	+	+++	+++

a) NFS:Nakahara-Fukuoka sarcoma, Ca755:adenocarcinoma 755, S180:ascites sarcoma 180, EAC:Ehrlich ascites carcinoma, C1498:leukemia C1498, L1210:leukemia L1210.



## 考察

FUは各種のマウス腫瘍に対して、静脈内または腹腔内投与時、幅広く、強い抗腫瘍効果を示すが、経口投与時には効果が弱くなる。過去数年間多くのFU誘導体が開発、研究されてきた<sup>9,38,39</sup>が、最近FTが経口投与時、胃腸障害が少なく、しかも、胃がんや乳がんの効果を示す事が見出された<sup>7</sup>。しかし、一般に使用されている実験動物での抗腫瘍活性はそれ程強くなかった。そこで、FTより活性が強く、FUより低毒性のFU誘導体を探索することにした。

第1節で述べたように、1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類は経口投与により、L1210に対して著しい抗腫瘍効果を示した。L1210に対する効果は、臨床効果を予測できるという考えでこの腫瘍系は広く一次スクリーニングに用いられている<sup>17</sup>。更に、著者は一連の化合物を比較検討するためにC1498, S180A, EAC, NFS及びCa755を用いて1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の抗腫瘍効果を調べた。L1210及びC1498には多くの1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類が有効であり、C1498にはメチル(III)が、L1210にはエチル(IV)誘導体が特に強い延命効果を示した。S180AやEACには、FUやFTは弱い生長抑制活性しか示さなかったが、メチル(III)及びエチル(IV)誘導体は特に著しい効果を示した。ヘキシル(VIII)及びiso-プロピル(XI)誘導体は、S180Aには著しい(++)効果を示したが、EACには#の効果であった。フェネチル(XVI)誘導体はS180Aには完全な生長抑制(+++)を示したが、EACには弱い効果(+)しか示さなかった。固型腫瘍の系では、NFSに対して、多くのFU誘導体が著しい効果を示した。特に完全抑制を示した唯一の化合物はヘキシル誘導体(VIII)であった。Ca755にはFU(I)は無効であったが、FT(II)はかなりの効果(++)を示し、多くのカルバモイル誘導体、特にエチル(IV)、シクロヘキシル(XIII)及びベンジル(XV)は完全に生長を抑制した。この腫瘍に対す

るFU(I)の最大効果は腹腔内投与でも++であった。これら6種の腫瘍系での抗腫瘍スペクトラムをみると、メチル(III)、エチル(IV)誘導体が6種の腫瘍すべてに対し著しい(+++)抗腫瘍効果を示し、続いてヘキシル(VIII)、*iso*-プロピル(XI)及びオクチル(X)誘導体の順であった。しかし、2つの活性化合物、メチル(III)とエチル(IV)誘導体は、マウスに対して致死的ではないとは言え、強い毒性を示した。これらの化合物を投与されたマウスの一般状態は正常ではなく、自発運動量の増加がみられ、これは非可逆的であった。*iso*-プロピル(XI)誘導体も同様な毒性があった。結論として、宿主動物により低毒性で、各種腫瘍に強い活性を示す化合物はヘキシル(VIII)とオクチル(X)誘導体であった。

### 第3節 1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の皮下移植 Lewis 肺がん 及び B16 melanoma に対する効果

第I章, 第1, 2節で述べたように1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類の多くは経口投与でL1210や他の腫瘍系に於いて著しい活性を示し, 特にメチル, エチル, ヘキシル, オクタール及びフェネチル誘導体はFUやFTよりも幅広い抗腫瘍スペクトラムを示した。この節では, これら一次スクリーニングで選別された化合物について生長の遅い腫瘍 (Fig. I-6), すなわち Lewis 肺がんや B16 melanoma に対する抗腫瘍活性を長期投与で検討した。

現在化学療法剤が著明な効果を示すヒト腫瘍は100種類以上ある腫瘍のうち約10種類であり, これらの腫瘍は一般に生長の速いものと考えられている。一方, 生長の遅いヒト腫瘍に効果を示す薬を選別するためには, そのような実験動物モデルの選択が重要であると考えられる<sup>40)</sup>。L1210はある種のヒト白血病に似ている<sup>41)</sup>し, ハムスターの plasmacytoma や自然発生 AKR lymphoma はヒトの lymphoma や myeloma に形態や性質が似ている<sup>42~47)</sup>。しかし, これらの腫瘍は一般の固型腫瘍の実験モデルとしては不十分であると考えられる。一方, マウスの固型腫瘍であるB16 melanoma はLewis 肺がんと共に生長が遅く, 比較的長い doubling time とかなり少ない生長部分とをもち, かつ形態学的にヒトの固型がんと似ている<sup>48)</sup>。更に現在, 抗がん剤として使われている薬は B16 melanoma に対して活性を示すものが多い<sup>20)</sup>。また, Lewis 肺がんには cyclophosphamide, bleomycin, methyl-CCNU などが活性を示す以外, ほとんどの抗がん剤は活性を示さないのである<sup>10, 20)</sup>。これら生長の遅い2種類の腫瘍を用いた長期投与実験系は, 手術後の維持療法薬を選別するためのよいスクリーニング系になるものと考えられる。

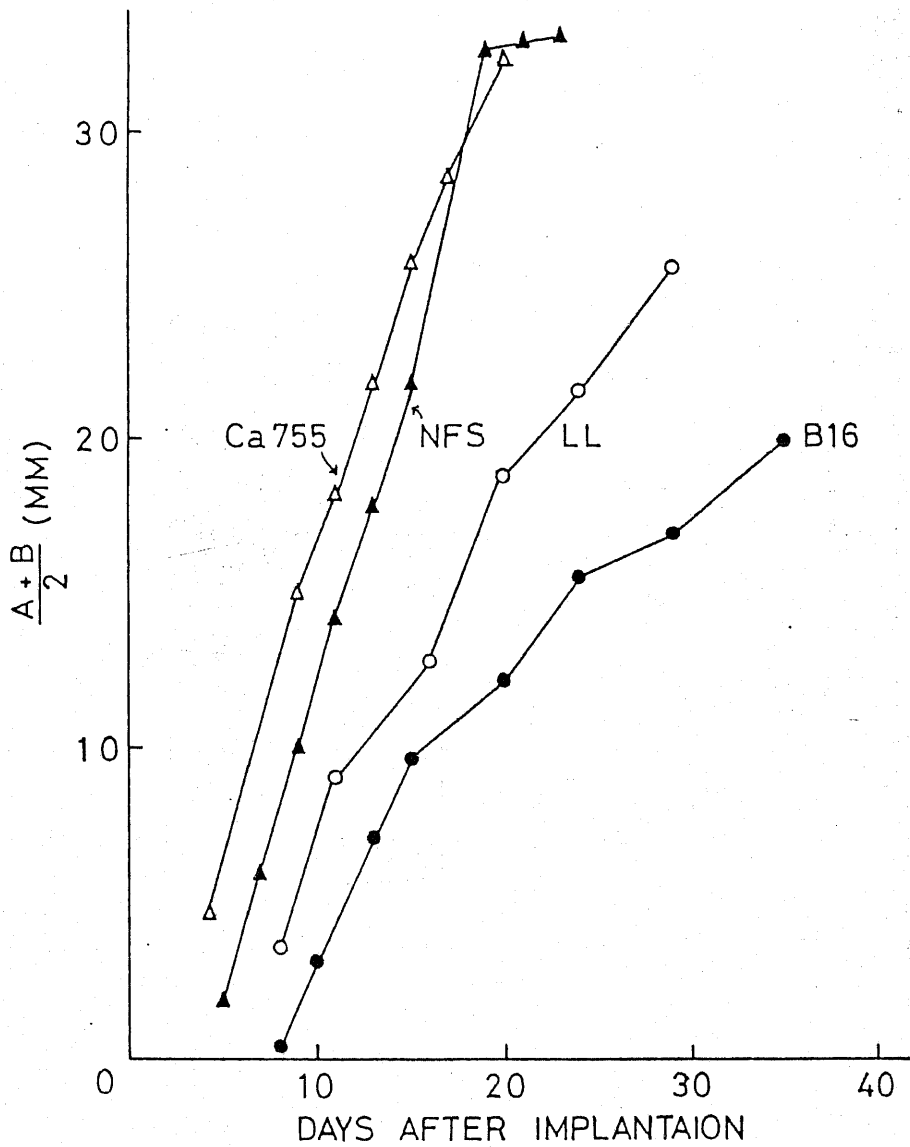


Fig. I-6. Growth rate comparisons of various experimental mouse tumors  
 Ca 755 = adenocarcinoma 755, NFS = Nakahara-Fukuoka sarcoma,  
 LL = Lewis lung carcinoma, B16 = B16 melanoma.

## 材料と方法

### 実験腫瘍と使用動物

動物は体重 20~24g の雄 BDF<sub>1</sub> マウスを用いた。Lewis 肺がん及び B16 melanoma の生長曲線を測定可能になり、た日から長径 (A) と短径 (B) をノギスで測定し、腫瘍重量を  $\frac{1}{2} \times AB^2$  の楕円球として計算した。

以下 Lewis 肺がん及び B16 melanoma について簡単に説明する。

**Lewis 肺がん** Wistar 研究所の M.R. Lewis により C57BL/6 マウスの自然発生肺がんとして、1951 年発見された。本腫瘍は生理食塩水を加え、軽くホモジナイズすることにより、容易に浮遊細胞になる。C57BL/6 又は BDF<sub>1</sub> マウスに約  $10^5$  個背部皮下に移植すると、約 2 週間で 1~2g になる。腫瘍は出血性でなく、大部分がやや堅い均一のかたまりである。しかし、1.5g 以上になると、中心部に多くの壊死を生じ、その周囲に生細胞の外皮をつくる。生存日数の中央値は 26 日である (Fig. I-7)。腫瘍が大きくなるにつれ、分裂細胞の部分は減少し、volume doubling time は長くなる。腫瘍重量が 350~600 mg の時の doubling time は 2.4~2.9 日である<sup>10)</sup>。著者の実験では、この時点から進行がんに対する治療を始めた。皮下移植後、本腫瘍は速やかに肺に転移する<sup>10,49,50)</sup>。皮下移植 2 日目で 50%、6 日目で 100% のマウスに転移がみられる<sup>10)</sup>。

**B16 melanoma (B16)**<sup>40,51)</sup> 1954 年 C57BL/6 マウスの耳の皮膚に自然発生した黒色腫である。この腫瘍は 2 倍量の生理食塩水を加え、軽くホモジナイズすることにより浮遊細胞になる。その 0.05 ml を C57BL/6、または、BDF<sub>1</sub> マウスに腹腔内、または、皮下移植すると、約 2 週間で 1~2g 程になる。生存日数の中央値は 27 日である (Fig. I-8)。

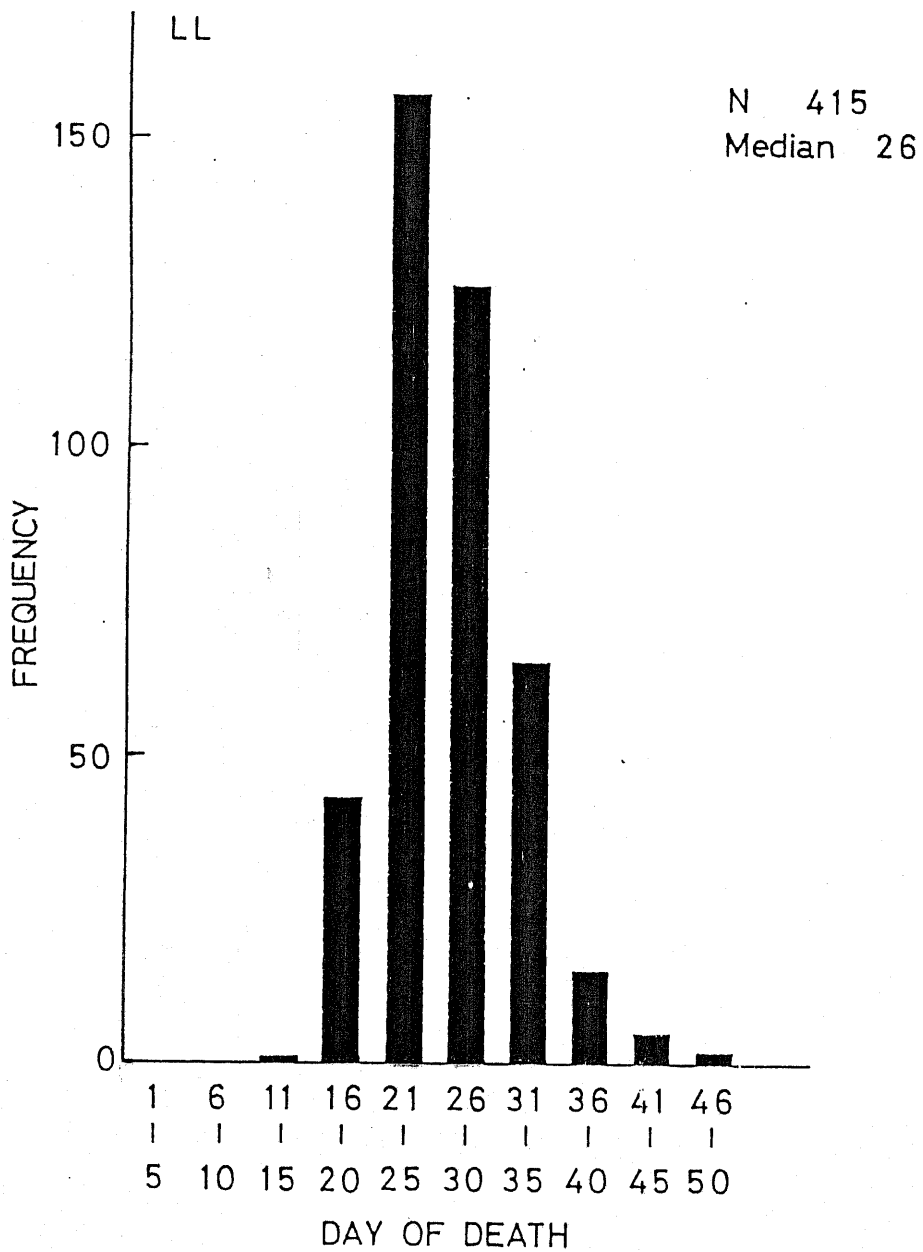


Fig. I-7. Death distribution of BDF<sub>1</sub> mice implanted sc with  $2 \times 10^5$  Lewis lung carcinoma cells

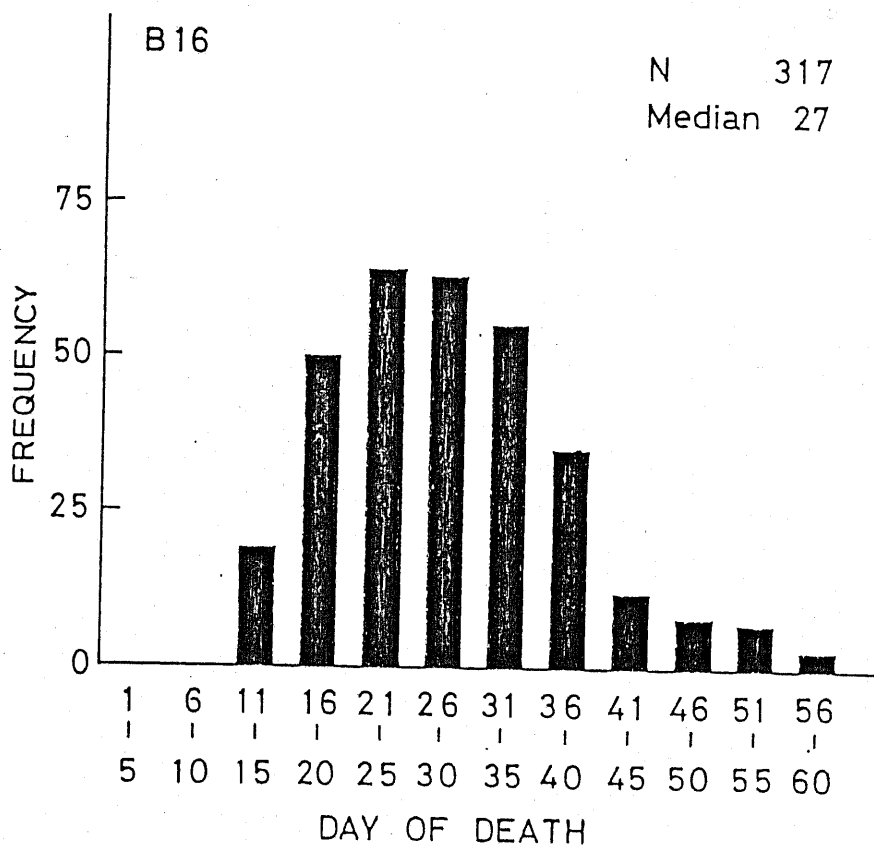


Fig. I-8. Death distribution of BDF<sub>1</sub> mice sc implanted with  $2 \times 10^5$  B16 melanoma cells

化合物 化合物は Table I-11 に示すように、一次スクリーニングで選別されたものである。対照化合物としてFU, FT及びcyclophosphamideを用いた。cyclophosphamideは特にLewis肺がんに対して強い効果を示す化合物である。<sup>52)</sup> Lewis肺がんの進行がんに対する治療実験は、固型がんの治療によく用いられているdoxorubicin及びmitomycin Cを対照薬として加えた。

薬物治療 被験化合物は0.5% CMCで懸濁し、BDF<sub>1</sub>マウスに0.01ml/g体重の割合で経口投与した。化合物はすべて投与直前に調製した。対照化合物であるcyclophosphamide doxorubicin及びmitomycin Cは生理食塩水で溶解した後腹腔内投与した。初期腫瘍の治療実験は、腫瘍移植24時間後から始め、週3回(月,水,金)4週間経口投与し、腫瘍重量(mg)を楕円球容積計算式により、 $\frac{1}{2} \times (\text{長径mm}) \times (\text{短径mm})^2$ で求め、腫瘍の生長を観察した。薬物活性の評価は中央値による生存日数延長率〔(処置群/無処置対照群 - 1) × 100〕による。<sup>53)</sup>

## 結果

初期 Lewis 肺がん及びB16 melanomaに対するFU誘導体の効果 Table I-12 に示すように FU のアルキルカルバモイル誘導体の多くは、初期のLewis肺がんに対して活性(少なくとも25%の生存日数延長)を示した。特にヘキシル(VI)及びフェネチル(IX)誘導体は著しい活性を示した。本実験ではヘキシル(VI)及びフェネチル(IX)誘導体の最大生存日数延長率は週3回200及び100 mg/kg投与で97及び78%であった。両化合物とも活性対照薬として用いたcyclophosphamideと同程度の抗腫瘍効果を示した。しかし、生長の速い腫



Table I-11. Chemical structure of 5-fluorouracil derivatives

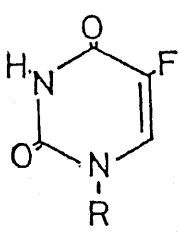



	Compound No.	-R
	I	-H
	II	
	III	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_3$
	IV	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{CH}_3$
	V	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
	VI	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
	VII	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$
	VIII	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{-}$ 
	IX	$\overset{\text{O}}{\parallel}\text{-CNHCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ 

Table I-12. Antitumor activity of 5-fluorouracil derivatives on survival time in BDF<sub>1</sub> mice bearing sc Lewis lung carcinoma

Compound No.	Dose* (mg/kg/day)	Median day of death	Range	Increase in life-span (†)
A Control	-	31.5	23-36	-
I	20	39.0	29-46	24
	30	36.5	33-51	16
II	100	32.0	27-40	2
	200	45.0	35-59	43
	300	36.0	29-64	14
III	30	42.5	21-47	35
	50	43.0	27-73	37
	100	19.0	14-21	-40
IV	30	35.5	27-38	13
	50	44.0	36-64	40
	100	25.5	19-41	-19
V	100	44.0	39-67	40
VI	100	37.0	28-48	17
	200	62.0	46-94	97
	300	20.0	17-21	-37
VII	200	47.0	34-57	49
	300	43.0	33-57	37
VIII	50	43.0	33-69	37
	100	27.0	22-35	-10
IX	50	33.0	20-37	5
	100	56.0	52-64	78
	200	20.0	18-41	-37
Cyclophosphamide	30	60.0	40-62	90
B Control	-	28.0	20-36	-
VI	200	52.5	30-59	88
IX	100	48.0	40-55	71

\* Drugs were administered orally three times a week for 4 weeks beginning on Day 1 after tumor implantation.

瘍系で最も幅広い抗腫瘍スペクトラムを示したメチル(III),及びエチル(IV)誘導体は Lewis 肺がんに対しては,それ程の効果を示さなかった。オクチル(VII)誘導体は FT と同程度であったが, FU は無効であった。メチル(III),エチル(IV)誘導体とも至適投与量は  $50 \text{ mg/kg}$  であり, 5回連続投与時の最大投与量の 100又は  $70 \text{ mg/kg}$  より低くなっており,毒性が増強されていることがわかった。ヘキシル(VI)及びフェネチル(IX)誘導体の場合,至適投与量は各々  $200 \text{ mg/kg}$  であり, 5回連続投与時と同じであり,長期投与でも毒性は増加しないことがわかった。

B16を皮下移植したマウスに延命効果(25%以上の生存日数延長)を示した化合物は,ただ2つであり, FUのヘキシル(VI)誘導体は至適投与量で生存日数を27%延命し, cyclophosphamide は33%延命した。その他の化合物はいずれも活性を示さなかった(Table I-13)。

### 1-Hexyl 及び 1-phenethyl carbamoyl 5-fluorouracil の進行 Lewis 肺がんに対する効果と投与スケジュールの影響

次にこの2つの化合物の治療効果を進行 Lewis 肺がんを用いて検討した。その結果を Table I-14 と Fig. 9~11 に示す。週3回投与のスケジュールではヘキシル(VI)誘導体がフェネチル(IX)誘導体より有効であり,後者による生存日数の延長率はわずか10%であった。肺転移は至適投与量でわずかに抑制された。ヘキシル(VI)及びフェネチル(IX)誘導体の連日投与は隔日投与より有効であった。ヘキシル(VI)誘導体は  $150 \text{ mg/kg}$ , フェネチル(IX)誘導体は  $100 \text{ mg/kg}$  を投与した時,有意な生存日数の延長(各々44%と58%)がみられた。フェネチル(IX)誘導体は至適投与量で移植部位の腫瘍の生長と肺転移を完全に抑制した。ヘキシル(VI)及びフェネチル(IX)誘導体を連日投与した時の個々のマウス腫瘍を測定し記録したのが Fig I-10, 11で

Table I-13. Antitumor activity of 5-fluorouracil derivatives on survival time in BDF<sub>1</sub> mice bearing sc B16 melanoma

Compound No.	Dose* (mg/kg/day)	Median day of death	Range	Increase in life-span (%)
Control	-	30.0	23-41	-
I	20	35.0	21-42	17
	30	31.5	24-37	5
II	200	35.0	27-44	17
	300	33.0	28-53	10
III	30	32.5	29-39	8
	50	23.0	19-33	-23
IV	30	34.0	28-59	13
	50	31.5	28-37	5
VI	200	30.0	22-53	0
	300	38.0	22-51	27
VII	200	30.0	21-37	0
IX	100	31.0	27-47	3
	200	27.0	21-45	-10
Cyclophosphamide	20	31.5	26-38	5
	30	40.0	16-62	33

\* Drugs were administered orally three times a week for 4 weeks beginning on Day 1 after tumor implantation.

Table I-14. Effect of 1-hexyl (VI) and 1-phenethyl (IX) carbamoyl derivatives of FU (delayed treatment) on survival and lung metastases of mice bearing sc Lewis lung carcinoma

Compound No.	Dose (mg/kg/day)	Schedule*	Survival time (days) ILS(‡)			Lung metastases <sup>†</sup>
			Median	Range		
A Control	-	-	29.0	22-36	-	6/6
VI	100	3/W	33.0	25-36	14	5/6
	200	3/W	38.5	29-54	33	4/6
	300	3/W	32.0	25-32	10	1/6
IX	100	3/W	32.0	21-40	10	4/6
	200	3/W	29.5	25-44	2	2/6
Cyclophosphamide	30	3/W	37.0	31-57	28	2/6
B Control	-	-	26.0	21-28	-	6/6
VI	100	daily	34.5	27-46	33	6/6
	150	daily	37.5	29-52	44	6/6
	200	daily	30.0	30-34	15	0/6
IX	50	daily	32.0	32-38	23	6/6
	100	daily	41.0	31-60	58	6/6
	150	daily	30.0	28-34	15	0/6
Cyclophosphamide	10	daily	28.5	26-40	10	6/6
5-Fluorouracil	20	daily	29.0	19-40	12	6/6

\* Drug was administered orally three times a week in A or daily in B, starting on Day 14 after tumor implantation until death.

† Values given were the number of mice with metastases/ number of mice tested.

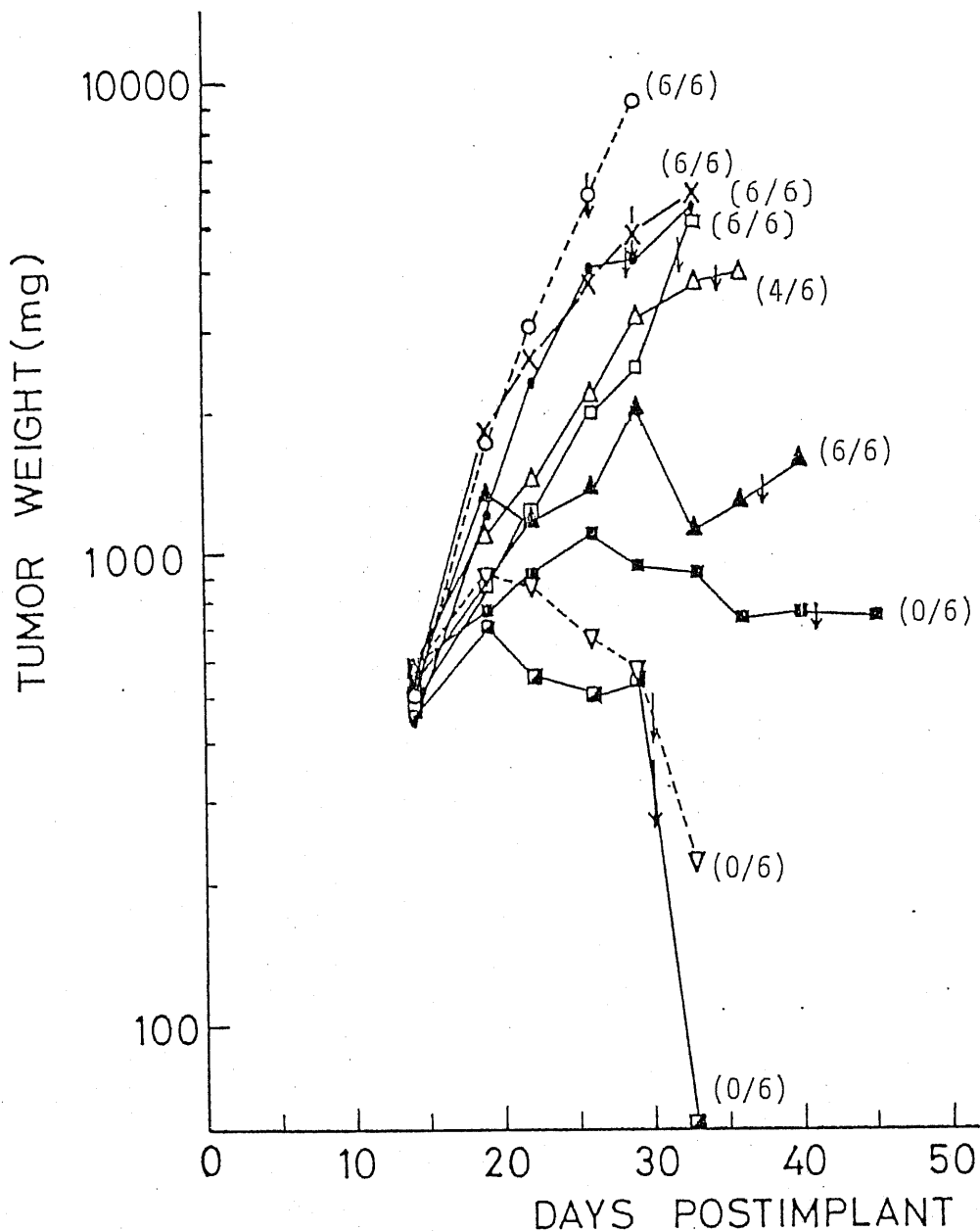


Fig. I-9. Growth rate of advanced Lewis lung carcinoma treated with FU, cyclophosphamide (EX), HCFU and 1-phenethyl carbamoyl-5-fluorouracil (PCFU) by daily administration. Arrows indicate the median day of death. ( ): No of mice with metastases.

--o--	Control	--Δ--	HCFU (100)	--□--	PCFU ( 50)
--x--	FU (20)	--▲--	" (150)	--■--	" (100)
--•--	EX (10)	--▽--	" (200)	--◻--	" (150)

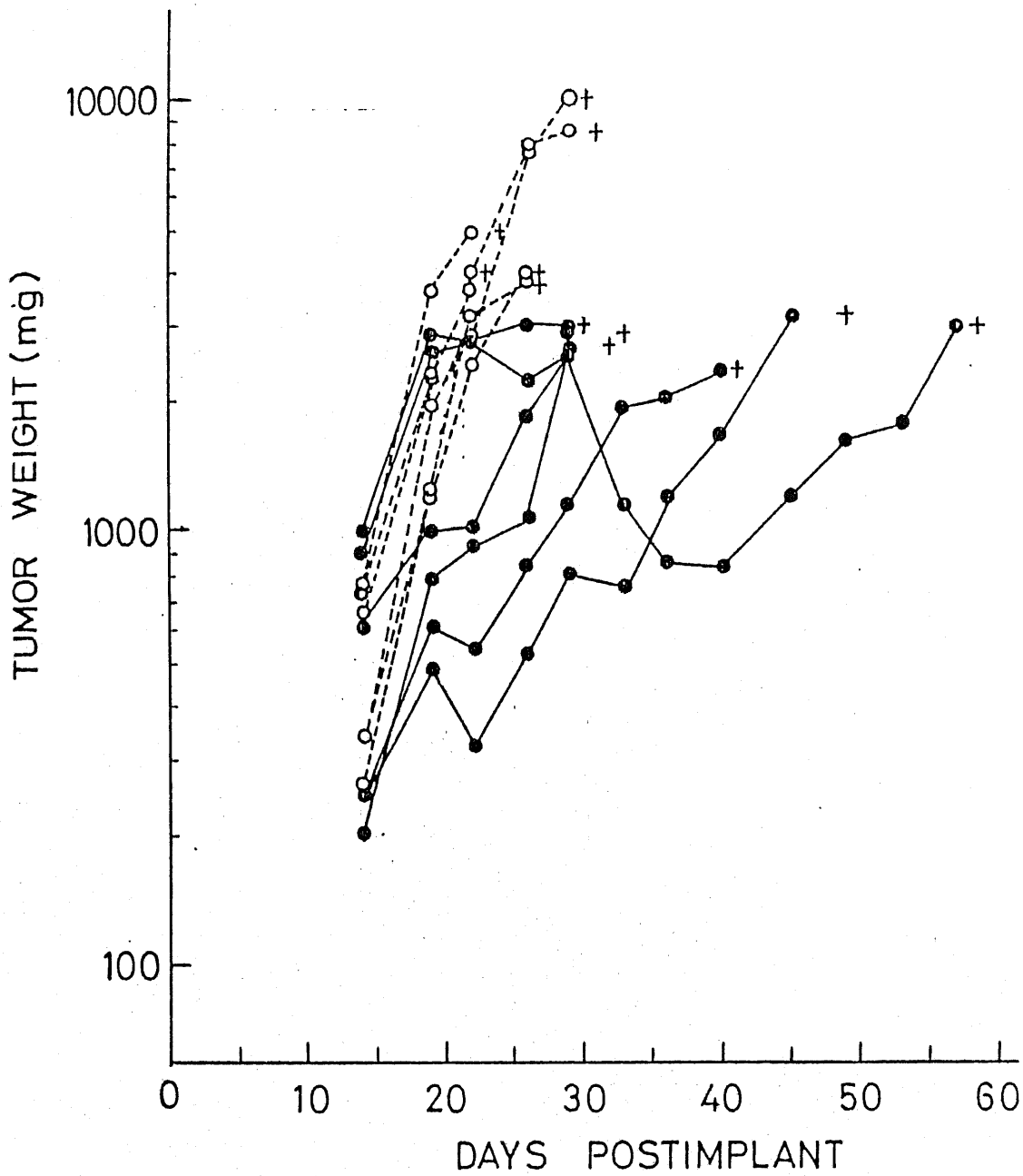


Fig. I-10. Effect of HCFU on Lewis lung carcinoma  
 †: day of death

○--○ Control      ●—● HCFU (150)

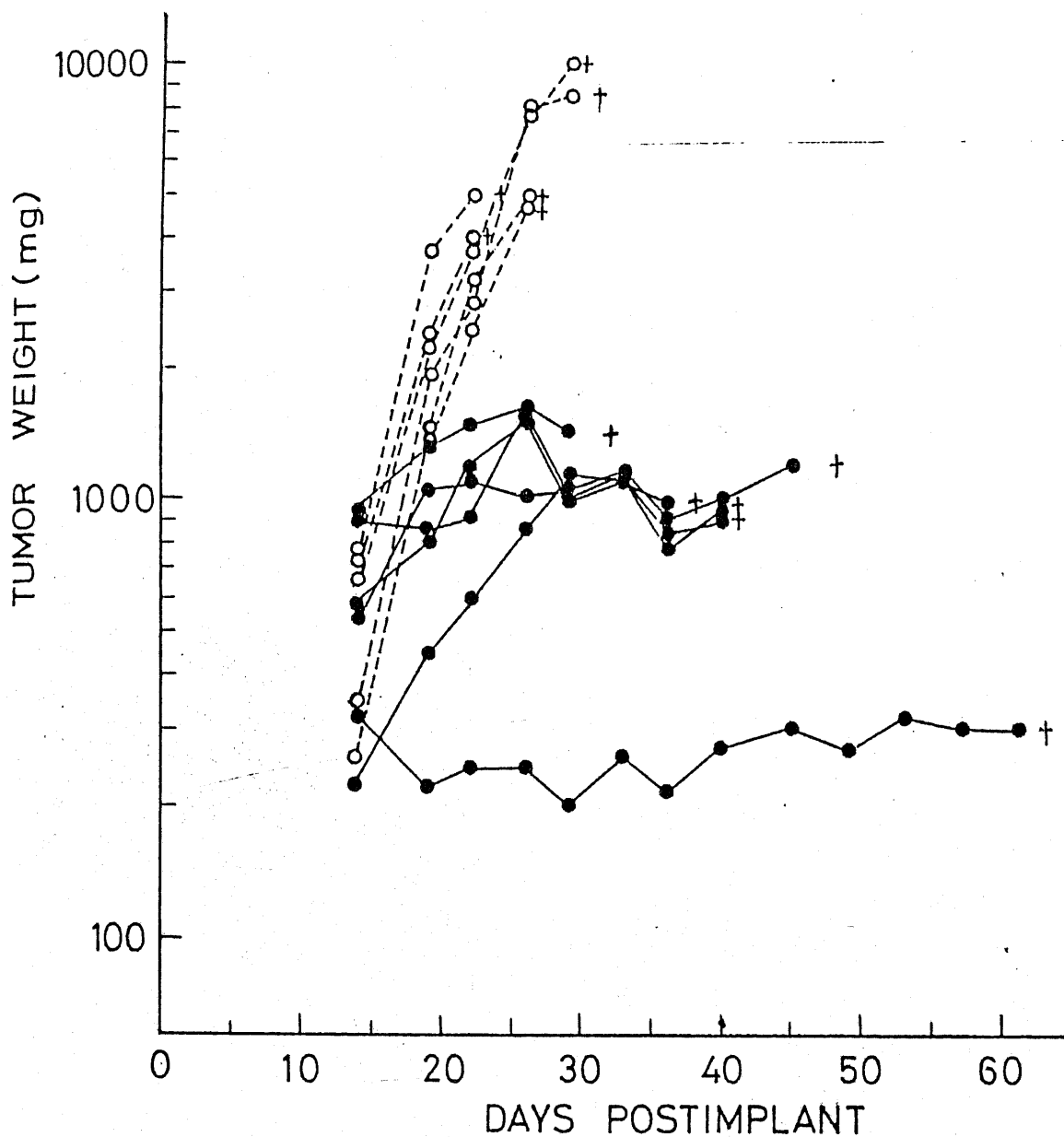


Fig. I-11. Effect of 1-phenethylcarbamoyl-5-fluorouracil (PCFU) on Lewis lung carcinoma  
 +: day of death

o---o Control      ●—● PCFU(100)



ここに2つの化合物の特徴が出ている。ヘキシル誘導体はがんの生長を遅らせているが、フェネチル誘導体は完全にがんの生長を止めている。一方、対照として用いた mitomycin C, doxorubicin と FU は至適投与量の腹腔内投与で (Day 13, 17, 21, 25, 29) で, Lewis 肺がんの進行がんに対して, ほとんど効果を示さなかった (Fig. I-12)。Cyclophosphamide のみ が 200 mg/kg 投与 (Day 13, 27) でがんの生長を抑制した。しかし, 毒性が強く体重減少がはなはだしく, 体重が回復するまで, 次の投与が不可能であり, 結果として, 腫瘍は生長し, 一度生長し始めた腫瘍に対しては, もはや無効であった。

## 考察

Lewis 肺がんの実験系は米国国立がん研究所 (National Cancer Institute) で同系腫瘍の生長の遅い腫瘍系として用いられてきたが, 従来の抗がん剤の多くに耐性を示す。<sup>20)</sup> この腫瘍に最も有効な抗がん剤は cyclophosphamide <sup>52)</sup> と methyl-CCNU <sup>10)</sup> であった。Cyclophosphamide の場合 Lewis 肺がんを皮下移植したマウスに, 初期大量腹腔内投与すると腫瘍は消失するが, 進行がんに対しては, 短期間腫瘍の生長を抑制するだけである。<sup>54)</sup> FU は従来の代謝拮抗剤としては, この腫瘍に対し活性を示すが, 進行がんに対しては, 腹腔内投与でも, 毒性が強いため, 腫瘍生長抑制は弱く, 生存日数の延長はみられない。<sup>54)</sup> 著者の実験に於ても, Lewis 肺がんの進行がんには, cyclophosphamide は一次腫瘍の生長を抑制したが, FU はほとんど腫瘍の生長を抑制しなかった。更に, mitomycin C や doxorubicin もヒト固型がんの治療によく使われているが<sup>55)</sup> この進行がんに対しては FU と同様無効であった。この腫瘍系は薬剤の長期投与における腫瘍生長の抑制及び肺転移の抑制を検

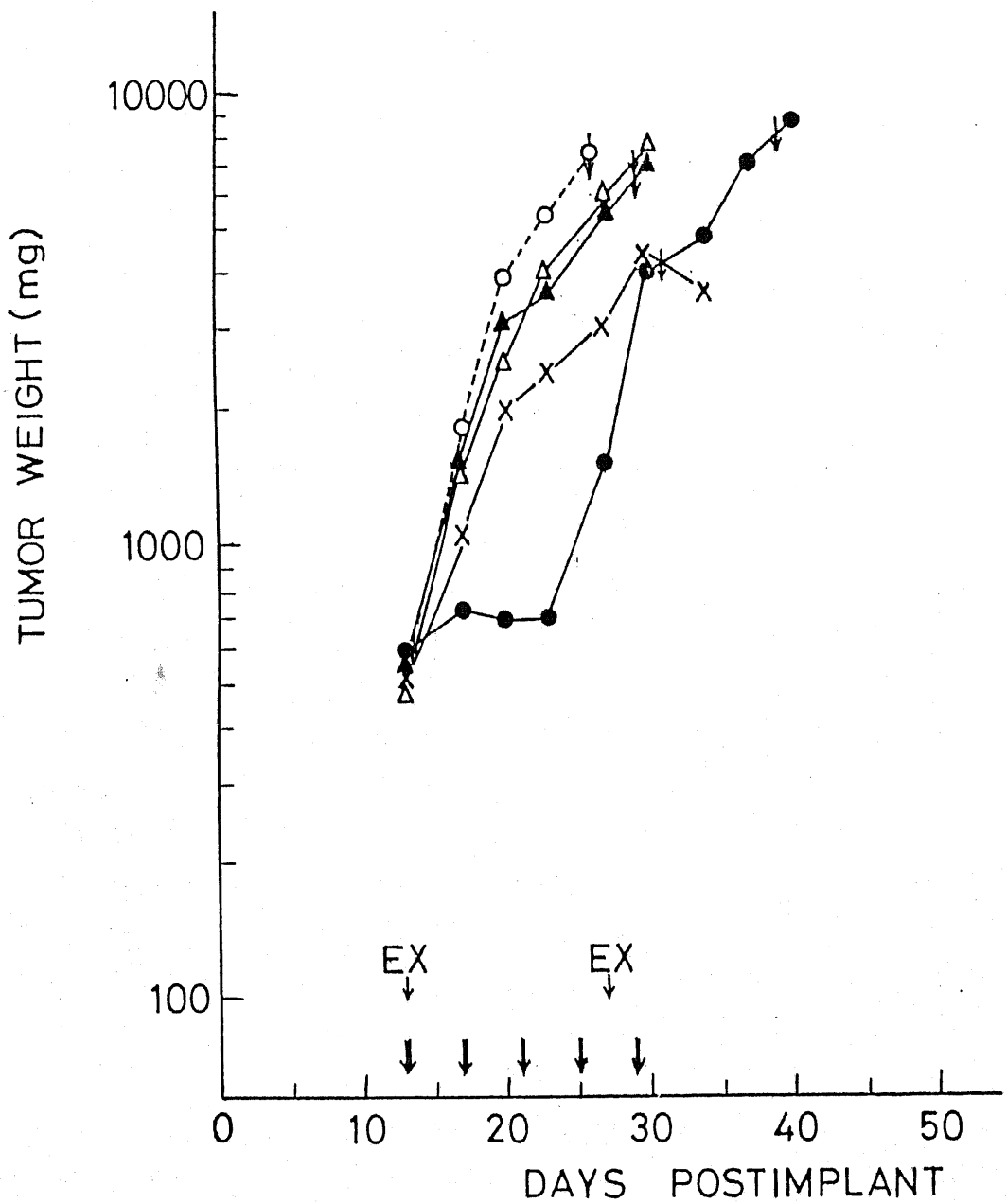


Fig. I-12. Chemotherapeutic response of sc Lewis lung carcinoma to cyclophosphamide (EX), FU, doxorubicin (AM) and mitomycin C (MMC) by intraperitoneal injection

—●— EX(200)      —▲— AM (10)  
 —x— FU(60)      —△— MMC (5)  
 ---○--- Control

討するためには有用だと考えられる。

長期経口投与で FU は弱い活性を示したのに対し、FT はかなりの治療効果を示した。更に、アルキルカルバモイル誘導体は cyclophosphamide 同様、強い治療効果を示し、中でもヘキシル及びフェネチル誘導体は進行がんにも活性を示した。特にフェネチル誘導体はがんの生長をほぼ完全に抑制した。しかし、残念なことに体重減少がなくても急に死するマウスがあり、前節で述べた大量投与時の中枢神経障害と何らかの関係があるものと思われる。この種の化合物で中枢毒性を示さない化合物を見出すことは非常に価値あることと考えられる。メチル及びエチル誘導体は生長の速い腫瘍には著しい活性を示したが、長期投与では毒性が強まり、治療効果は上がらなかった。蓄積毒性を調べる意味からも、長期投与実験系は価値あるものと考えられる。

Lewis 肺がんは皮下移植すると、一週間後にはすべてのマウスで肺転移が見られると報告されているが<sup>49,50</sup>、先に述べた進行がんの肺転移は、フェネチル誘導体によりほぼ完全に抑制されたが、ヘキシル誘導体によっては、あまり抑制されなかった。しかし、ヘキシル誘導体は腫瘍移植24時間後から経口投与を始め、週3回、死するまで投与し続けると、至適投与量で肺転移を完全に抑えるものである (Table I-15)。Cyclophosphamide も強い肺転移抑制を示したが、FU や FT の至適投与量ではほとんど抑制作用はみられなかった。

最近塚越ら<sup>56</sup>は、ヘキシル誘導体の治療効果を結腸がんモデルである Colon 26 及び 38 を用いて、検討した結果、著明な生存日数の延長がみられ、特に Colon 38 では、ヘキシル誘導体を投与したマウス10匹中5匹が完全に治癒したことを報告している。また、自然発生乳がんについて、

Table I-15. Lung Metastases at Autopsy in Lewis Lung Carcinoma

Dose (mg/kg/day)	Treatment				Control
	HCFU	FT	FU	CY <sup>a)</sup>	
500	Toxic <sup>b)</sup>	Toxic <sup>b)</sup>			
300	0/5	2/6			
200	0/6 <sup>c)</sup>	4/5 <sup>c)</sup>			
100	5/6	5/6			
70	4/5		Toxic <sup>b)</sup>		
50			0/6	Toxic <sup>b)</sup>	
30			5/5 <sup>c)</sup>	1/6 <sup>c)</sup>	
20			5/6	3/6	
10			4/6	5/6	
0					38/48 (79%)

a) CY: Cyclophosphamide.

b) Mean survival time of treated group is shorter than that of controls.

c) Optimal dose.

Values given are the ratio of number of mice with metastases/number of mice tested.

徳善ら<sup>57)</sup>は、乳がんを摘出し、腫瘍片(約 $10^6$ 個の細胞)をその摘出箇所に移植する実験系で、ヘキシル誘導体を経口投与すると再発の遅延、生存日数の延長、肺転移抑制があることを報告している。

このようにヘキシル誘導体は、FU誘導体の中で生長の速い系でも、遅い系でも最も強い治療効果を示す化合物であった。

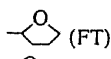
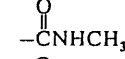
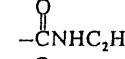
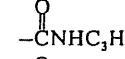
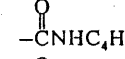
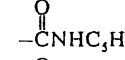
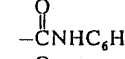
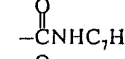
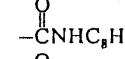
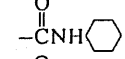

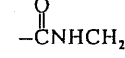

## 第II章 腹水型腫瘍 Sarcoma 180 における 1-Alkyl-carbamoyl-5-fluorouracil 類の抗腫瘍効果と血漿中及び腹水中濃度との相関

第I章で述べた如く、多くの 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil が S180A に対し、FU や FT よりも強い抗腫瘍効果を示した。そこで、これらの化合物の特性を知るために、S180A 担がんマウスを用いて、血漿中及び腹水中のこれら誘導体及び FU の濃度を経時的に測定し、FU や FT と比較した。臨床効果と血漿中 FU 濃度とは相関があり<sup>58-60)</sup> 持続静注により、FU を高濃度に維持すると抗腫瘍効果の増強をもたらすことが報告されている。そこで、経口投与による 1-alkyl-carbamoyl-5-fluorouracil 類の吸収及び腹水中への分布、更にこれら誘導体の血漿中濃度、または、腹水中濃度と抗腫瘍効果との相関を検討した。

## 材料と方法

化合物 10種のアシルカルバモイル誘導体を用いた (Table II-1)。対照化合物として FU と FT を用いた。これらの化合物は 0.5% CMC に懸濁して経口投与した。

Table II-1. Chemical structure of 5-fluorouracil derivatives

Compound no.	-R
I	-H (SFU).
II	 (FT)
III	 -CNHCH <sub>3</sub>
IV	 -CNHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
V	 -CNHC <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
VI	 -CNHC <sub>4</sub> H <sub>9</sub>
VII	 -CNHC <sub>5</sub> H <sub>11</sub>
VIII	 -CNHC <sub>6</sub> H <sub>13</sub>
IX	 -CNHC <sub>7</sub> H <sub>15</sub>
X	 -CNHC <sub>8</sub> H <sub>17</sub>
XI	 -CNH 
XII	 -CNHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> 

## 抗腫瘍効果判定

雌 ddN マウス (20-23g) を使用した。1群6匹とし、1匹当り  $10^7$  個の S180A 細胞を腹腔内移植した。すべての化合物は  $1.5 \text{ nmol/kg}$  を Day 1 に経口投与した。抗腫瘍効果判定は Day 7 に TPCV 比を求めて行った。

1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil と FU の血漿中または腹水中濃度測定 1群10匹とし、 $10^7$ 個の細胞を腹腔内移植し、7日目のマウスに化合物を経口投与した。投与後15, 30, 60, 120, 180, 360及び720分に ether 麻酔下、腋窩動静脈から血液を集めた。2匹から集めた血漿(1ml)は等量の1N塩酸-methanol (1:1)を加え、3000 r.p.m.の遠心で沈澱物を除き、上清を他の試験管に移した。その上清から 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil を抽出するために chloroform を同量加え、2回抽出した。その chloroform 層は別のフラスコに移し、室温で減圧乾固した。水層は3倍量の methanol を加え、沈澱物は遠心し除去した。その上清は40°Cで減圧乾固し、各々一定量の methanol に溶解し、その一定量を TLC プレート (Merck, silica gel 60 F<sub>254</sub>) につけ、前者(アルキルカルバモイル誘導体と FT)は chloroform-methanol (10:1)で、後者(FU)は n-propanol-*g* 酸 (10:1) 更に chloroform-methanol (10:1)で展開した。展開後UV吸収により、標準品と同じ R<sub>f</sub> の吸収帯をかきとり、methanol で抽出した。1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil FU, FT 量を各々の検量線(260 nmの吸収で作製)から算出した。一方、腹水(3ml)についても、血漿と同様な操作で分離定量した。1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類, FU, 及び FT の回収率は、各々70-80, 70及び80%であった。

## 結果

アルキルカルバモイル誘導体と FU の血漿中濃度 血漿中 FU 濃度の消長は FU, FT と各種の 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil により異なった(表 II-2)。FU (I) の経口投与後の最高濃度は15分で  $0.780 \mu\text{mol/ml}$  であった。

Table II-2. Changes in 5-fluorouracil formed in plasma following oral administration of 5-fluorouracil derivatives

Compound no.	Concentration ( $\mu\text{mol/ml}$ )						
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	360 min	720 min
I	$0.780 \pm 0.131$	$0.515 \pm 0.040$	$0.108 \pm 0.034$	$0.038 \pm 0.024$	< 0.02	< 0.02	< 0.02
II	< 0.02	$0.040 \pm 0.014$	$0.026 \pm 0.004$	$0.026 \pm 0.011$	$0.027 \pm 0.017$	$0.026 \pm 0.006$	< 0.02
III	$0.509 \pm 0.083$	$0.413 \pm 0.050$	$0.310 \pm 0.064$	$0.277 \pm 0.064$	$0.174 \pm 0.014$	$0.026 \pm 0.010$	< 0.02
IV	$0.404 \pm 0.038$	$0.441 \pm 0.043$	$0.391 \pm 0.030$	$0.377 \pm 0.054$	$0.131 \pm 0.088$	$0.080 \pm 0.036$	< 0.02
V	$0.600 \pm 0.075$	$0.306 \pm 0.031$	$0.347 \pm 0.092$	$0.132 \pm 0.030$	$0.057 \pm 0.044$	$0.046 \pm 0.036$	< 0.02
VI	$0.472 \pm 0.058$	$0.202 \pm 0.003$	$0.175 \pm 0.026$	$0.158 \pm 0.068$	$0.021 \pm 0.004$	< 0.02	< 0.02
VII	$0.246 \pm 0.104$	$0.201 \pm 0.026$	$0.178 \pm 0.064$	$0.063 \pm 0.051$	$0.021 \pm 0.010$	< 0.02	< 0.02
VIII	$0.152 \pm 0.031$	$0.092 \pm 0.036$	$0.074 \pm 0.026$	$0.041 \pm 0.014$	$0.030 \pm 0.018$	< 0.02	< 0.02
IX	$0.178 \pm 0.017$	$0.211 \pm 0.061$	$0.031 \pm 0.021$	$0.017 \pm 0.017$	< 0.02	< 0.02	< 0.02
X	$0.205 \pm 0.030$	$0.155 \pm 0.021$	$0.064 \pm 0.044$	$0.068 \pm 0.026$	$0.033 \pm 0.021$	< 0.02	< 0.02
XI	$0.297 \pm 0.067$	$0.132 \pm 0.065$	$0.145 \pm 0.036$	$0.104 \pm 0.012$	$0.058 \pm 0.007$	$0.040 \pm 0.014$	< 0.02
XII	$0.320 \pm 0.121$	$0.178 \pm 0.011$	$0.149 \pm 0.046$	$0.145 \pm 0.026$	$0.195 \pm 0.050$	$0.132 \pm 0.026$	$0.065 \pm 0.017$

Each compound was administered orally at 1.5 mmol/kg  
 After each administration, plasma of two mice were pooled and analysed  
 Each value is the mean  $\pm$  SE for five experiments

Table II-3. Changes in intact 5-fluorouracil derivatives in plasma following oral administration of 5-fluorouracil derivatives

Compound no.	Concentration ( $\mu\text{mol/ml}$ )						
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	360 min	720 min
II	$0.548 \pm 0.074$	$0.479 \pm 0.080$	$0.490 \pm 0.081$	$0.346 \pm 0.023$	$0.361 \pm 0.038$	$0.179 \pm 0.060$	$0.074 \pm 0.036$
III	$0.070 \pm 0.014$	$0.172 \pm 0.035$	$0.110 \pm 0.021$	$0.096 \pm 0.017$	$0.063 \pm 0.032$	$0.045 \pm 0.024$	< 0.02
IV	$0.799 \pm 0.061$	$0.416 \pm 0.036$	$0.425 \pm 0.007$	$0.403 \pm 0.053$	$0.199 \pm 0.042$	$0.062 \pm 0.008$	< 0.02
V	$0.282 \pm 0.053$	$0.239 \pm 0.036$	$0.208 \pm 0.060$	$0.097 \pm 0.020$	$0.069 \pm 0.008$	$0.036 \pm 0.010$	< 0.02
VI	$0.330 \pm 0.013$	$0.228 \pm 0.016$	$0.223 \pm 0.039$	$0.173 \pm 0.035$	$0.120 \pm 0.036$	$0.061 \pm 0.018$	< 0.02
VII	$0.427 \pm 0.119$	$0.132 \pm 0.005$	$0.171 \pm 0.049$	$0.147 \pm 0.049$	$0.075 \pm 0.019$	$0.077 \pm 0.049$	< 0.02
VIII	$0.288 \pm 0.050$	$0.162 \pm 0.011$	$0.057 \pm 0.014$	$0.057 \pm 0.006$	$0.052 \pm 0.023$	$0.040 \pm 0.013$	< 0.02
IX	$0.133 \pm 0.019$	$0.181 \pm 0.046$	$0.103 \pm 0.033$	$0.054 \pm 0.004$	$0.063 \pm 0.006$	$0.046 \pm 0.026$	< 0.02
X	$0.208 \pm 0.008$	$0.134 \pm 0.039$	$0.084 \pm 0.024$	$0.063 \pm 0.018$	< 0.02	< 0.02	< 0.02
XI	$0.265 \pm 0.066$	$0.154 \pm 0.086$	$0.125 \pm 0.026$	$0.097 \pm 0.030$	$0.111 \pm 0.029$	$0.046 \pm 0.014$	< 0.02
XII	$0.198 \pm 0.021$	$0.112 \pm 0.012$	$0.123 \pm 0.032$	$0.153 \pm 0.028$	$0.175 \pm 0.041$	$0.179 \pm 0.018$	$0.0147 \pm 0.021$

Each compound was administered orally at 1.5 mmol/kg  
 After each administration, plasma of two mice were pooled and analysed  
 Each value is the mean  $\pm$  SE for five experiments



その後急速に減少し、180分で検出限界以下になった。

FT(II)由来の血漿中FU濃度は低いが、FTは720分まで高濃度であった(Table II-3)。メチル(III)、エチル(IV)やプロピル(V)誘導体由来のFUは高濃度であり、ゆっくり減少し、360分でも検出できた。メチル誘導体(III)はエチル誘導体(IV)より低濃度であった。プロピル誘導体(V)はメチル誘導体(III)と類似していた。炭素数を増していくと、アルキルカルバモイル誘導体とFUの最高濃度は徐々に減少していき、いずれも長時間持続した。フェネチル誘導体(XII)及びそれ由来のFUは720分でも多量に見出された。

これらの結果から、すべての1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類はそのままの形で急速に消化管より吸収され、血液中に長時間持続することが明らかになった。

### アルキルカルバモイル誘導体とFUの腹水中濃度

Table II-4, 5に示すように、カルバモイル誘導体とFUの腹水中濃度は、アルキル鎖の長さで変化した。FU投与後のFUは急速に腹水中に分布し、その後急速に減少した。FT(II)の場合、FTは高濃度で、しかも長時間維持された。FT由来のFUは血漿中の濃度以上存在した。すべてのアルキルカルバモイル誘導体は、そのままの形で長時間腹水中に見出され、その化合物由来のFUは血漿中とほぼ同じであった。このことから、カルバモイル誘導体は、FUに変化せずに、そのままの形で、血液-腹水関門を通過できることがわかった。

### アルキルカルバモイル誘導体のアルキル鎖の炭素数とFU濃度

X時間(C×t値)との関係 血漿中FU濃度×時間(C×t値, mol·hr/ml)と抗腫瘍効果がかなり相関あることから<sup>69)</sup>、S180A担がんマウスの血漿中及び腹水中のC×t値を計算した。血漿中及び腹水中C×t値はア

Table II-4. Changes in 5-fluorouracil formed in ascites following oral administration of 5-fluorouracil derivatives

Compound no.	Concentration ( $\mu\text{mol/ml}$ )						
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	360 min	720 min
I	0.784 $\pm$ 0.067	0.504 $\pm$ 0.074	0.135 $\pm$ 0.031	0.055 $\pm$ 0.026	< 0.01	< 0.01	< 0.01
II	0.054 $\pm$ 0.009	0.074 $\pm$ 0.013	0.112 $\pm$ 0.040	0.033 $\pm$ 0.014	0.036 $\pm$ 0.011	0.032 $\pm$ 0.018	< 0.01
III	0.391 $\pm$ 0.074	0.313 $\pm$ 0.026	0.302 $\pm$ 0.014	0.320 $\pm$ 0.028	0.182 $\pm$ 0.021	0.048 $\pm$ 0.007	< 0.01
IV	0.300 $\pm$ 0.074	0.373 $\pm$ 0.050	0.321 $\pm$ 0.048	0.213 $\pm$ 0.026	0.156 $\pm$ 0.021	0.040 $\pm$ 0.007	< 0.01
V	0.248 $\pm$ 0.037	0.253 $\pm$ 0.073	0.168 $\pm$ 0.030	0.149 $\pm$ 0.054	0.139 $\pm$ 0.016	0.037 $\pm$ 0.016	< 0.01
VI	0.341 $\pm$ 0.103	0.108 $\pm$ 0.007	0.104 $\pm$ 0.006	0.125 $\pm$ 0.017	0.058 $\pm$ 0.011	0.036 $\pm$ 0.004	< 0.01
VII	0.078 $\pm$ 0.011	0.092 $\pm$ 0.001	0.099 $\pm$ 0.020	0.040 $\pm$ 0.026	0.054 $\pm$ 0.007	0.031 $\pm$ 0.007	< 0.01
VIII	0.071 $\pm$ 0.026	0.107 $\pm$ 0.018	0.079 $\pm$ 0.014	0.064 $\pm$ 0.021	0.051 $\pm$ 0.011	0.068 $\pm$ 0.011	< 0.01
IX	0.060 $\pm$ 0.006	0.060 $\pm$ 0.011	0.044 $\pm$ 0.011	0.050 $\pm$ 0.016	0.051 $\pm$ 0.010	0.018 $\pm$ 0.007	< 0.01
X	0.043 $\pm$ 0.007	0.081 $\pm$ 0.031	0.040 $\pm$ 0.007	0.034 $\pm$ 0.007	0.034 $\pm$ 0.016	< 0.01	< 0.01
XI	0.117 $\pm$ 0.026	0.129 $\pm$ 0.030	0.090 $\pm$ 0.014	0.078 $\pm$ 0.030	0.092 $\pm$ 0.028	0.050 $\pm$ 0.011	< 0.01
XII	0.115 $\pm$ 0.043	0.083 $\pm$ 0.018	0.067 $\pm$ 0.009	0.061 $\pm$ 0.017	0.060 $\pm$ 0.007	0.060 $\pm$ 0.017	0.054 $\pm$ 0.017

Each compound was administered orally at 1.5 mmol/kg  
 Each value is the mean  $\pm$  SE for ten mice

Table II-5. Changes in intact 5-fluorouracil derivatives in ascites following oral administration of 5-fluorouracil derivatives

Compound no.	Concentration ( $\mu\text{mol/ml}$ )						
	15 min	30 min	60 min	120 min	180 min	360 min	720 min
II	0.255 $\pm$ 0.003	0.331 $\pm$ 0.009	0.359 $\pm$ 0.055	0.258 $\pm$ 0.049	0.300 $\pm$ 0.051	0.278 $\pm$ 0.034	0.056 $\pm$ 0.006
III	0.125 $\pm$ 0.025	0.097 $\pm$ 0.017	0.083 $\pm$ 0.017	0.063 $\pm$ 0.006	0.035 $\pm$ 0.004	0.024 $\pm$ 0.002	< 0.01
IV	0.384 $\pm$ 0.077	0.239 $\pm$ 0.031	0.292 $\pm$ 0.019	0.136 $\pm$ 0.013	0.109 $\pm$ 0.015	0.039 $\pm$ 0.007	< 0.01
V	0.166 $\pm$ 0.023	0.141 $\pm$ 0.014	0.152 $\pm$ 0.025	0.093 $\pm$ 0.017	0.102 $\pm$ 0.017	0.024 $\pm$ 0.004	< 0.01
VI	0.163 $\pm$ 0.009	0.150 $\pm$ 0.016	0.143 $\pm$ 0.019	0.130 $\pm$ 0.011	0.083 $\pm$ 0.015	0.038 $\pm$ 0.005	< 0.01
VII	0.155 $\pm$ 0.031	0.064 $\pm$ 0.028	0.070 $\pm$ 0.015	0.056 $\pm$ 0.034	0.052 $\pm$ 0.012	0.021 $\pm$ 0.009	< 0.01
VIII	0.119 $\pm$ 0.030	0.047 $\pm$ 0.017	0.052 $\pm$ 0.013	0.039 $\pm$ 0.006	0.020 $\pm$ 0.001	0.021 $\pm$ 0.006	< 0.01
IX	0.042 $\pm$ 0.008	0.030 $\pm$ 0.007	0.028 $\pm$ 0.006	0.025 $\pm$ 0.001	0.023 $\pm$ 0.001	< 0.01	< 0.01
X	0.029 $\pm$ 0.008	0.034 $\pm$ 0.007	0.041 $\pm$ 0.006	0.015 $\pm$ 0.004	0.015 $\pm$ 0.003	< 0.01	< 0.01
XI	0.050 $\pm$ 0.029	0.072 $\pm$ 0.018	0.072 $\pm$ 0.004	0.058 $\pm$ 0.015	0.058 $\pm$ 0.007	0.022 $\pm$ 0.003	< 0.01
XII	0.078 $\pm$ 0.025	0.057 $\pm$ 0.006	0.094 $\pm$ 0.020	0.089 $\pm$ 0.008	0.081 $\pm$ 0.005	0.064 $\pm$ 0.011	0.072 $\pm$ 0.018

Each compound was administered orally at 1.5 mmol/kg  
 Each value is the mean  $\pm$  SE for ten mice

ルキル基の炭素数の増加に従って減少した (Fig. II-1)。

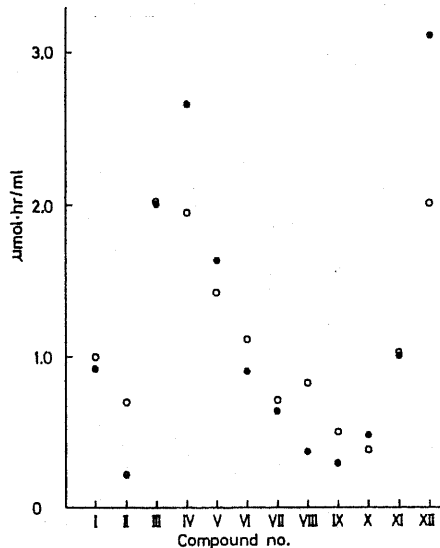


Fig. II-1. C-x-t values of 5-fluorouracil formed after oral administration of 1.5 mmol/kg of 5-fluorouracil derivative: (●) plasma; (○) ascites

フェネチル誘導体 (XII) 由来の FU の C×t 値は、エチル誘導体 (IV) のそれとほぼ同じ高い値を示した。ヘキシル誘導体 (VIII) の腹水中 FU の C×t 値は、血漿中のそれよりかなり高かった。

1-Alkyl carbamoyl-5-fluorouracil 及び FU の腹水中濃度と血漿中濃度の関係  
 腹水腫瘍に対する抗腫瘍効果は、腹水中 FU の C×t 値に依存すると考えられるが、他の要因の関与も考えられるので、活性化化合物の Cmax や C×t 値など各要因間の相関を調べ、アルキルカルバモイル誘導体の分布特性を検討した。腹水中 FU の C×t 値は、腹水中総量の C×t 値、血漿中 FU の C×t 値と最も相関が強く (P<0.001)、他の C×t 値とも相関を示した。最高濃度 Cmax では、腹水中総量しか相関を示さなかった (Table II-6)。

Table II-6.

Correlation coefficients between plasma levels, ascites levels and tumor growth when given by oral administration of 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracils

			Ascites						
			5FU formed		Intact form		Total		
			C-x-t	Cmax	C-x-t	Cmax	C-x-t	Cmax	
Plasma	Total <sup>a</sup>	Cmax <sup>b</sup>	+0.482	+0.723 <sup>f</sup>	+0.485	+0.936 <sup>d</sup>	+0.518	+0.869 <sup>d</sup>	
		C-x-t <sup>c</sup>	+0.810 <sup>e</sup>	+0.301	+0.956 <sup>d</sup>	+0.425	+0.944 <sup>d</sup>	+0.364	
	Intact form	Cmax	+0.229	+0.423	+0.317	+0.937 <sup>d</sup>	+0.292	+0.636 <sup>f</sup>	
		C-x-t	+0.633 <sup>f</sup>	+0.103	+0.943 <sup>d</sup>	+0.331	+0.484	+0.189	
	5 FU formed	Cmax	-0.324	+0.836 <sup>e</sup>	+0.425	+0.482	+0.583	+0.794 <sup>e</sup>	
		C-x-t	+0.940 <sup>d</sup>	+0.171	+0.856 <sup>e</sup>	+0.496	+0.964 <sup>d</sup>	+0.545	
Ascites	Total	Cmax	+0.663 <sup>f</sup>	+0.921 <sup>d</sup>	+0.407	+0.848 <sup>e</sup>	-0.381		
		C-x-t	+0.936 <sup>d</sup>	+0.547	+0.931 <sup>d</sup>	+0.513			
	Intact form	Cmax	+0.496	+0.676 <sup>f</sup>	+0.461				
		C-x-t	+0.742 <sup>f</sup>	+0.332					
	5 FU formed	Cmax	+0.684 <sup>f</sup>						
		C-x-t							
			Plasma						Tumor growth
			5FU formed		Intact form		Total		
			C-x-t	Cmax	C-x-t	Cmax	C-x-t	Cmax	
Plasma	Total <sup>a</sup>	Cmax <sup>b</sup>	+0.492	+0.681 <sup>f</sup>	+0.285	+0.842 <sup>e</sup>	+0.397	-	-0.598
		C-x-t <sup>c</sup>	+0.923 <sup>d</sup>	+0.231	+0.960 <sup>d</sup>	+0.293			-0.577
	Intact form	Cmax	+0.293	+0.194	-0.149				-0.422
		C-x-t	+0.793 <sup>e</sup>	+0.142					-0.399
	5 FU formed	Cmax	+0.558						-0.643 <sup>f</sup>
		C-x-t							-0.738 <sup>f</sup>
Ascites	Total	Cmax							-0.836 <sup>e</sup>
		C-x-t							-0.739 <sup>f</sup>
	Intact form	Cmax							-0.683 <sup>f</sup>
		C-x-t							-0.524
	5 FU formed	Cmax							-0.836 <sup>e</sup>
		C-x-t							-0.851 <sup>e</sup>

<sup>a</sup> Intact form plus 5FU formed<sup>d</sup>  $P < 0.001$ <sup>b</sup> Maximum concentration<sup>e</sup>  $P < 0.01$ <sup>c</sup> Concentration-x-time<sup>f</sup>  $P < 0.05$

腹水中FUUの消長は、血漿中FUU濃度の支配が強いことがわかった。腹水中アルキルカルバモイル誘導体量(未変化体量)のCxt値は、血漿中総量、未変化体量、及び腹水中総量のCxt値と相関を示し、未変化体の血漿中濃度が腹水中未変化体の濃度を支配していることがわかった。各要因間の相関から 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil 類は消化管からそのままの型で血漿に入り、腹水に入ってFUUになるのと、体内でFUUとなり、血漿から腹水に分布する経路とが考えられた。

### S180Aに対する 1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil の抗腫瘍効果

Table II-7に示すように、血漿中及び腹水中濃度と抗腫瘍活性との相関を調べるため、各化合物 1.5mmol/kg の 1 回投与時の活性を調べた。FUUは中程度、メチル誘導体(III)は強い活性を示し(T/C=7%)、次いでエチル誘導体(IV)であった。フロピル(V)、ブチル(VI)、ペンチル(VII)やヘキシル(VIII)誘導体は弱く、ヘプチル(IX)、オクチル(X)、サイクロヘキシル(XI)誘導体やFTは無効であった。

Table II-7.

Antitumor activity of 5-fluorouracil derivatives.

Compound no.	Tumor growth (T/C, %)
I	27
II	89
III	7
IV	15
V	53
VI	49
VII	60
VIII	62
IX	88
X	82
XI	87
XII	44

抗腫瘍効果と各種要因との相関 抗腫瘍効果  
(T/c%)と血漿中、腹水中濃度に関する要因との相関係数を計算した (Table II-6)。腫瘍生長と腹水中の総量またはFU量の  $C_{max}$ 、FU量の  $C_{xt}$  値と強い相関が見られた ( $P < 0.01$ )。しかも、血漿中FUの  $C_{max}$  及び  $C_{xt}$  値と相関があり ( $P < 0.05$ )、抗腫瘍効果が腹水中FUの  $C_{xt}$  値に支配されていることが明らかになった。更に、腹水中の総量がFU濃度維持に重要であること、腹水中アルキルカルバモイル誘導体の  $C_{max}$  が抗腫瘍効果と相関すること ( $P < 0.05$ ) などを見出し、アルキルカルバモイル誘導体の腹水への分布特性を明らかにすることができた。

### 考察

S180A担がんマウスを用いて、1-alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の薬力学的性質を検討し、抗腫瘍効果との相関を調べた。1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracilは消化管より、速やかにそのままの型で血液中に吸収され、更に腹水にも分布した。血漿中及び腹水中に於けるFUの  $C_{xt}$  値はアルキル基の炭素数増加に伴って減少した。これは、宿主への毒性低下と関連づけられる。

抗腫瘍活性は腹水中におけるFUの  $C_{max}$ 、 $C_{xt}$  値、及び総量の  $C_{max}$  と相関しており ( $P < 0.01$ )、更に血漿中FUの  $C_{max}$  または  $C_{xt}$  値とも相関が見られた ( $P < 0.05$ )。このことは、臨床効果と血漿中FUの  $C_{xt}$  値と相関があるという報告<sup>5p)</sup>と一致し、更に未変化体を含む総量がFU濃度に関連があることを示している。

FUにアルキルカルバモイル基をつけることにより、消化管からの急速な吸収、血液-腹水関門の通過、血漿中、腹水中濃度の長時間持続という性質が加わること、腹水中FU濃度の維持は抗腫瘍効果に結びつくことなどが明らかになった。

### 第三章 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilのマウスにおける 体内分布と代謝産物

1-Alkylcarbamoyl-5-fluorouracil類の中で1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil(HCFU)が特に優れた抗腫瘍効果と幅広い抗腫瘍スペクトラムを示したことを第I章で述べてきた。

この章では HCFU と従来使われている FU との体内分布がどのように違うかを、オートラジオグラフと臓器内放射能測定で調べ、更に主要臓器(肝、小腸、肺、腎)並びに血漿、尿中の代謝産物を測定し、その代謝過程を明らかにした。

## 第1節 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilの体内分布

第1章で述べたように 1-hexylcarbamoyl-5-fluoro-uracil (HCFU) は維持療法のため、経口投与で使用することを目的として開発された FU 誘導の一つであり、各種マウス腫瘍に著効を示し、かつ宿主に対する毒性が低い抗腫瘍剤の候補化合物として選ばれたものである。この節では、マウスに経口投与した  $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の全身オートラジオグラフィによる組織内分布の様式と組織内放射能濃度の経時的变化について検討した。

### 材料と方法

化合物 標識化合物 1-hexylcarbamoyl-5-fluoro[6- $^{14}\text{C}$ ]uracil ( $^{14}\text{C}$ -HCFU) と 5-fluoro[6- $^{14}\text{C}$ ]uracil ( $^{14}\text{C}$ -FU) は三井製薬株式会社より提供された。各々の比放射能は 2.47 及び 2.10  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  であり、放射化学的純度は薄層クロマトグラフィで 99% であった。

実験動物 体重 20-22g の ddN 雌マウスを絶食させることなく使用した。動物数はオートラジオグラフィ用には、1群2匹、組織内濃度測定用には、1群4匹とした。

オートラジオグラフィ  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU を 1mg/0.2ml の濃度になるように 0.5% CMC に懸濁し、50 mg/kg (マウス/匹当り  $^{14}\text{C}$ -HCFU は 2.47  $\mu\text{Ci}$ ,  $^{14}\text{C}$ -FU は 2.10  $\mu\text{Ci}$ ) を胃ゾンテを用い経口投与した。投与後 15分、1、3 及び 24 時間にマウスをエーテルで軽く麻酔し、 $-70^{\circ}\text{C}$  のドライアイス・アセトン溶液に浸して凍結した。凍結動物は水性カルボキシメチルセルロース・ゲルで固定し、マイクロームを用い  $-15^{\circ}\text{C}$  で縦断し、40 $\mu$  の切片とし、3日間凍結乾燥した。乾かした切片は 60日間フジ N-150 X 線フィルムに密着し、露



出した。X線フィルムはレンドール-Iで20°C, 5分間現像し, その後レンプックス-Iで10分間定着した。

### 放射能の定量的測定

$^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU は胃ゾンデを用い, 50 mg/kg をマウスに経口投与した。血液試料は  $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU 投与後 5, 15, 30分, 1, 3, 6, 12 及び 24 時間目に ether で軽く麻酔してから腋窩動静脈より採血し, 続いて各臓器を摘出した。血漿はできるだけ迅速に分離した。切除した臓器は生理食塩水で洗浄し, 秤量した。これらの組織 100 mg あるいは全量を 1 ml の Soluene-350 (Packard) に溶解し, その溶液に 9 ml のミニチレーター (PPO, 10g; dimethyl-POPOP, 1g; ethyleneglycol monoethyl ether 800ml 及び toluene 1200ml) を添加した。放射能測定は Tri-carb 液体ミニチレーションスペクトロメーター (Packard Model 3320) を用いた。

### 結果

#### $^{14}\text{C}$ -HCFU と $^{14}\text{C}$ -FU の分布

$^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU の経口投与後のマウスの全身オートラジオグラフィーを各々 Fig. III-1 及び 2 に示した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与 15 分後に最高の取込がみられたのは, 肝, 血液, 胃粘膜, 腎, 骨髄であり, 次いで肺, 心筋, 腸粘膜, 副腎及び皮膚であった。胸腺, 脾, 骨格筋への放射能の取込は低かった。脳では放射能は微量しか検出されなかった (Fig. III-1A)。副腎では皮質と髄質との中間層で放射能が少ない像が得られた (Fig. III-1B)。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与 1 時間後でもかなり大量の放射能がみられたが, 3 時間後には肝, 胃腸粘膜, 腎のみに放射能が残存していた (Fig. III-1C)。組織中放射能は

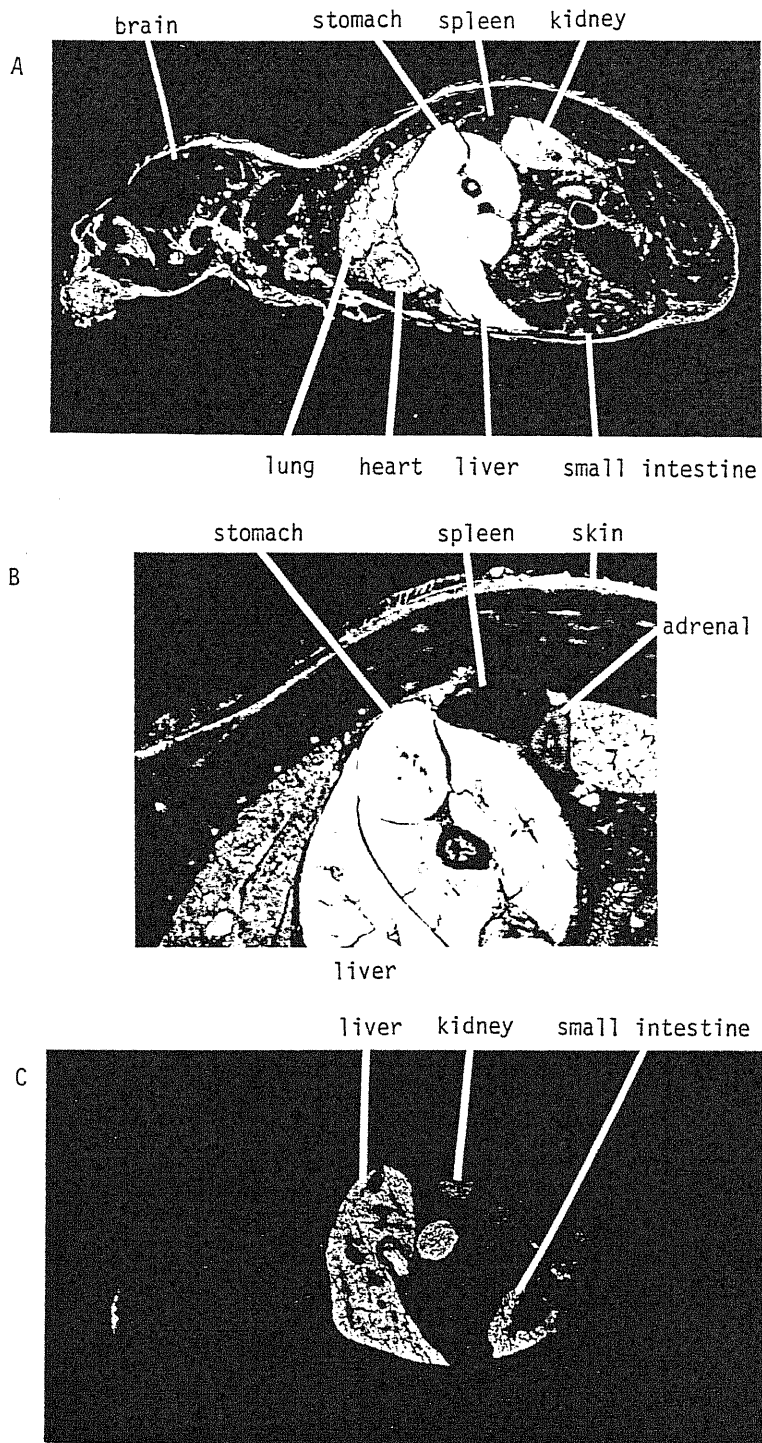


Fig. III - 1. Autoradiograms of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil 15 min (A,B) and 3 hr (C) after oral administration

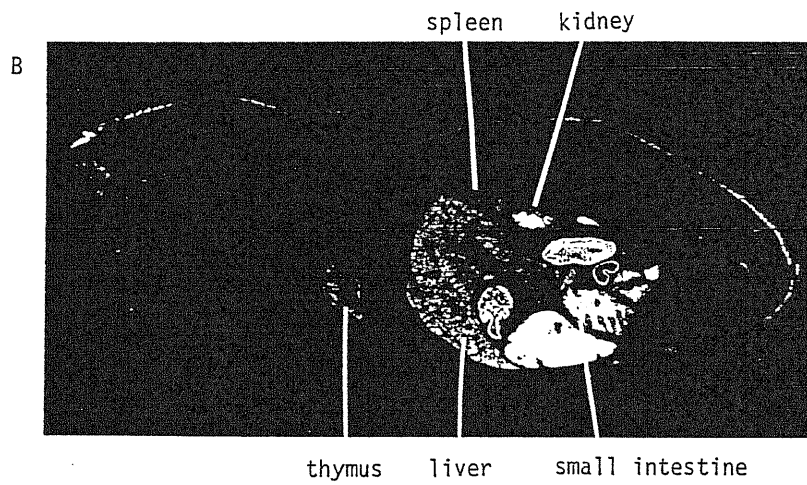
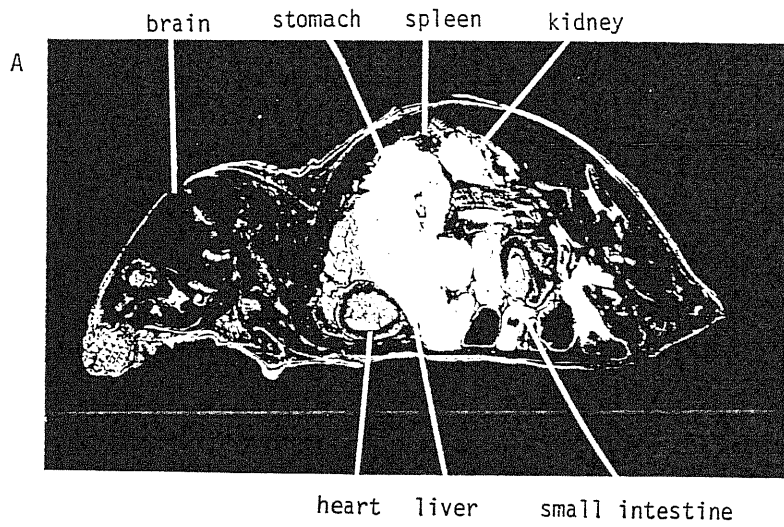


Fig. III - 2. Autoradiograms of 5-fluorouracil 15 min (A) and 3 hr (B) after oral administration

24時間以内に胃腸粘膜を除いてほとんど消失した。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与15分後に高い放射能の取込がみられたのは、肝、胃腸粘膜、膵、腎であり、次いで、リンパ節、胸腺、血液、肺、脾、副腎及び皮膚であった (Fig. III-2A)。

$^{14}\text{C}$ -FU 投与1時間後には、高濃度の放射能は肝、胃腸粘膜、腎にみられ、次いで胸腺、血液、膵、脾、副腎、皮膚にみられた。投与3時間後に放射能が残存していたのは、肝、膵、脾、胃腸粘膜、胸腺、副腎、腎及び皮膚であった (Fig. III-2B)。ほとんどの組織で放射能は24時間以内に消失した。以上の結果を Table III-1 にまとめた。

Table III - 1.

Radioactivity appeared on Autoradiograms

Tissues	15 min		1 hr		3 hr		24 hr	
	HCFU	SFU	HCFU	SFU	HCFU	SFU	HCFU	SFU
Brain	+	±	-	-	-	-	-	-
Lymph node	+	++	+	+	+	+	-	-
Brown fat	+	+	+	+	-	-	-	-
Thymus	+	++	+	++	+	++	±	+
Myocardium	++	+	++	+	+	-	-	-
Heart blood	+++	++	++	+	+	-	-	-
Hepatic blood	+++	+++	+++	+	±	-	-	-
Lung	++	++	++	+	+	-	-	-
Liver	+++	+++	+++	+++	++	++	-	+
Pancreas	+	+++	+	++	+	++	-	±
Spleen	+	++	+	++	+	++	±	±
Gastric mucosa	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±
Small intestinal mucosa	++	+++	++	+++	++	+++	±	+
Large intestinal mucosa	+	++	+	++	+	++	-	-
Adrenal	++	++	++	++	+	++	-	-
Kidney	+++	+++	+++	+++	++	++	±	+
Bone marrow	+++	++	+	+	+	+	±	±
Skeletal muscle	+	+	+	+	+	-	-	-
Skin	++	++	++	++	+	++	-	±

+++ : highest radioactivity, ++ : high activity, + : moderate activity, ± : low activity and - : no activity.

### 血液及び血漿中放射能濃度の変化

Table III-2 及び

3に示すように、 $^{14}\text{C}$ -HCFU、 $^{14}\text{C}$ -FUともに投与15分後に血漿中及び血液中最高濃度が観察された。投与15分後の血漿中濃度は $^{14}\text{C}$ -HCFUでは $47.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$  (HCFUとして)であり、 $^{14}\text{C}$ -FUでは $23.0\ \mu\text{g}/\text{ml}$  (FUとして)であった。その後時間と共に減少し、3時間以内に最高値の約1/10になった。 $^{14}\text{C}$ -HCFU投与12時間後には少量の放射能が検出されたのみであり、 $^{14}\text{C}$ -FUでは検出できなかった。すなわち、両化合物とも消化管から速やかに吸収され、血漿中からは徐々に消失したが、 $^{14}\text{C}$ -HCFUの方がより高濃度長時間持続した。血漿中濃度と全血中濃度との比は、 $^{14}\text{C}$ -HCFUではほぼ1.5、 $^{14}\text{C}$ -FUでは1/1であった。このことは、FUと異なり、HCFUはほとんど赤血球に入らないことを示している。血漿中に存在する $^{14}\text{C}$ -HCFU及び $^{14}\text{C}$ -FU由来の放射能の半減期は各々約75分及び50分であった。

### 組織内分布の変化

Table III-2 及び3に示すよう

に、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 経口投与後の組織内放射能は15分後に最高となり、以後血漿中と同様経時的に減少した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU由来の放射能濃度は、投与15分後では、血漿中よりも肝、腎及び胃壁で高かった。副腎での濃度は血漿中と同様であり、肺、脾及び心筋では比較的低かった。脳や骨格筋の濃度は他の組織よりも低かった。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU由来の放射能濃度は、血漿中よりも肝、心筋、肺、膵、脾、腎、副腎、胃腸壁で高かった。胸腺では血漿と同程度であり、脳や骨格筋では血漿よりも低かった。 $^{14}\text{C}$ -FU投与後の胃壁の放射能は最初の1時間は血漿よりも10倍高く、腸管壁、特に十二指腸で血漿中より高かった。

多くの組織で $^{14}\text{C}$ -HCFUと $^{14}\text{C}$ -FU濃度の経時的变化は、血漿の場合と類似し、特定臓器、あるいは、組織への

Table III - 2.

## Concentration of 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in Tissues after Oral Administration

Tissues	Concentrations in tissues (as HCFU) <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g/ml}$ or wet weight)			
	5 min	15 min	30 min	1 hr
Blood	18.1 $\pm$ 0.8	30.8 $\pm$ 0.4	15.2 $\pm$ 0.1	12.1 $\pm$ 1.1
Plasma	27.2 $\pm$ 1.9	47.5 $\pm$ 2.8	23.4 $\pm$ 0.8	19.7 $\pm$ 1.6
Brain	4.3 $\pm$ 0.7	5.1 $\pm$ 0.3	4.2 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.2
Myocardium	12.3 $\pm$ 1.1	16.9 $\pm$ 0.7	12.0 $\pm$ 0.4	6.8 $\pm$ 0.5
Lung	14.8 $\pm$ 2.3	23.6 $\pm$ 1.6	16.4 $\pm$ 0.7	8.1 $\pm$ 0.5
Liver	61.9 $\pm$ 10.6	98.0 $\pm$ 12.1	74.4 $\pm$ 4.0	52.7 $\pm$ 1.7
Pancreas	27.3 $\pm$ 3.1	14.4 $\pm$ 0.6	13.4 $\pm$ 1.3	15.8 $\pm$ 1.9
Spleen	10.9 $\pm$ 1.0	9.8 $\pm$ 0.9	10.3 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 1.6
Kidney	19.6 $\pm$ 3.5	58.6 $\pm$ 2.0	48.9 $\pm$ 3.8	43.3 $\pm$ 2.0
Skeletal muscle	6.3 $\pm$ 0.4	9.2 $\pm$ 0.1	6.3 $\pm$ 0.3	3.5 $\pm$ 0.2
Adrenal	18.9 $\pm$ 1.0	36.0 $\pm$ 0.1	30.5 $\pm$ 2.8	18.9 $\pm$ 1.1
Thymus	9.3 $\pm$ 1.8	10.1 $\pm$ 1.4	7.7 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.3
Forestomach wall	127.8 $\pm$ 13.3	244.0 $\pm$ 79.1	231.0 $\pm$ 22.7	145.4 $\pm$ 19.7
Glandularstomach wall	121.1 $\pm$ 28.7	230.2 $\pm$ 4.3	126.6 $\pm$ 15.3	165.0 $\pm$ 14.8
Duodenum wall	27.3 $\pm$ 5.5	40.7 $\pm$ 8.3	20.7 $\pm$ 1.9	14.5 $\pm$ 1.7
Jejunum wall	12.3 $\pm$ 0.2	19.0 $\pm$ 0.1	8.6 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 0.5
Ileum wall	13.5 $\pm$ 2.7	13.5 $\pm$ 0.2	11.8 $\pm$ 0.8	11.3 $\pm$ 0.6
Large intestinal wall	10.7 $\pm$ 2.4	20.3 $\pm$ 3.2	13.6 $\pm$ 3.0	6.8 $\pm$ 1.1
Caecum wall	7.4 $\pm$ 0.9	11.6 $\pm$ 2.0	8.3 $\pm$ 0.3	7.2 $\pm$ 0.6

a) Values represent the mean  $\pm$  SE of four mice in a group. The dose of HCFU-6-<sup>14</sup>C was administered orally at 50 mg/kg. Concentration was calculated as HCFU.

	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
Blood	2.6 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.5	0.5 $\pm$ 0.2	<0.1
Plasma	3.7 $\pm$ 0.5	2.3 $\pm$ 0.7	0.7 $\pm$ 0.1	<0.1
Brain	1.4 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.0	0.2 $\pm$ 0.0
Myocardium	3.6 $\pm$ 0.4	2.7 $\pm$ 0.5	1.1 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
Lung	3.9 $\pm$ 0.7	2.6 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0
Liver	11.9 $\pm$ 0.8	7.5 $\pm$ 0.1	4.3 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.4
Pancreas	4.7 $\pm$ 0.7	6.0 $\pm$ 0.6	2.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.2
Spleen	5.3 $\pm$ 0.8	5.0 $\pm$ 0.4	1.8 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1
Kidney	9.2 $\pm$ 0.1	7.9 $\pm$ 2.1	3.1 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.1
Skeletal muscle	1.4 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.2
Adrenal	3.5 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1
Thymus	3.6 $\pm$ 1.6	—	—	—
Forestomach wall	50.1 $\pm$ 3.9	32.2 $\pm$ 4.1	20.4 $\pm$ 2.7	5.0 $\pm$ 0.9
Glandularstomach wall	10.2 $\pm$ 2.7	29.6 $\pm$ 7.1	5.3 $\pm$ 1.0	1.7 $\pm$ 0.2
Duodenum wall	4.4 $\pm$ 0.3	3.4 $\pm$ 0.9	2.0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Jejunum wall	3.1 $\pm$ 0.3	3.3 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.1
Ileum wall	3.6 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0
Large intestinal wall	5.5 $\pm$ 1.7	1.5 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1
Caecum wall	3.3 $\pm$ 0.4	3.2 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.0

Table III - 3.  
Concentration of 5-Fluorouracil in Tissues after Oral Administration

Tissues	Concentration in tissues (as 5FU) <sup>a)</sup> ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ or $\text{g}$ wet weight)			
	5 min	15 min	30 min	1 hr
Blood	17.1 $\pm$ 1.0	18.4 $\pm$ 1.5	14.7 $\pm$ 0.3	9.1 $\pm$ 0.7
Plasma	19.7 $\pm$ 0.7	23.0 $\pm$ 1.4	15.5 $\pm$ 0.7	10.6 $\pm$ 0.8
Brain	6.8 $\pm$ 0.7	5.6 $\pm$ 0.2	3.6 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.2
Myocardium	34.0 $\pm$ 1.6	38.9 $\pm$ 2.0	25.3 $\pm$ 1.0	14.6 $\pm$ 2.1
Lung	37.2 $\pm$ 3.4	53.8 $\pm$ 1.1	32.7 $\pm$ 0.3	12.7 $\pm$ 2.3
Liver	155.2 $\pm$ 10.6	241.0 $\pm$ 6.4	141.5 $\pm$ 4.6	60.7 $\pm$ 4.0
Pancreas	91.6 $\pm$ 7.9	120.1 $\pm$ 8.9	90.6 $\pm$ 6.3	36.4 $\pm$ 4.2
Spleen	37.4 $\pm$ 5.3	71.8 $\pm$ 6.5	84.6 $\pm$ 9.3	20.6 $\pm$ 2.5
Kidney	59.7 $\pm$ 5.4	107.1 $\pm$ 4.0	26.3 $\pm$ 0.3	69.8 $\pm$ 1.2
Skeletal muscle	12.7 $\pm$ 0.4	10.7 $\pm$ 0.6	8.9 $\pm$ 0.3	4.8 $\pm$ 0.3
Adrenal	27.2 $\pm$ 2.0	44.8 $\pm$ 5.8	13.6 $\pm$ 0.2	16.7 $\pm$ 1.0
Thymus	17.7 $\pm$ 1.4	17.1 $\pm$ 1.0	12.6 $\pm$ 0.2	8.4 $\pm$ 0.9
Forestomach wall	167.2 $\pm$ 16.6	211.9 $\pm$ 12.8	132.7 $\pm$ 9.4	79.8 $\pm$ 8.1
Glandularstomach wall	297.7 $\pm$ 7.1	281.7 $\pm$ 12.9	170.5 $\pm$ 7.8	90.9 $\pm$ 5.5
Duodenum wall	89.4 $\pm$ 17.9	40.5 $\pm$ 3.3	17.2 $\pm$ 4.3	7.2 $\pm$ 1.0
Jejunum wall	40.3 $\pm$ 3.7	15.2 $\pm$ 2.3	8.8 $\pm$ 0.7	5.5 $\pm$ 0.6
Ileum wall	9.8 $\pm$ 0.1	11.7 $\pm$ 1.7	8.8 $\pm$ 1.0	5.6 $\pm$ 0.7
Large intestinal wall	23.9 $\pm$ 4.5	15.9 $\pm$ 2.2	6.8 $\pm$ 1.4	6.8 $\pm$ 0.9
Caecum wall	10.9 $\pm$ 0.4	16.2 $\pm$ 3.7	7.8 $\pm$ 0.8	4.1 $\pm$ 0.3

a) Values represent the mean  $\pm$  SE of four mice in a group. The dose of 5FU-6-<sup>14</sup>C was administered orally at 50 mg/kg.  
Concentration was calculated as 5FU.

	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr
Blood	1.5 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.1	<0.1	<0.1
Plasma	1.9 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.1	<0.1	<0.1
Brain	1.1 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.2 $\pm$ 0.0
Myocardium	3.6 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	1.2 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.1
Lung	4.1 $\pm$ 0.3	2.2 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1
Liver	27.3 $\pm$ 2.7	10.2 $\pm$ 1.7	5.4 $\pm$ 0.1	2.7 $\pm$ 0.1
Pancreas	12.5 $\pm$ 0.8	4.8 $\pm$ 1.0	3.5 $\pm$ 0.2	2.1 $\pm$ 0.2
Spleen	5.1 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.2	1.9 $\pm$ 0.0
Kidney	24.1 $\pm$ 2.5	7.1 $\pm$ 0.8	2.8 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1
Skeletal muscle	1.7 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.1	1.0 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1
Adrenal	8.2 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 0.7	3.4 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 0.1
Thymus	3.5 $\pm$ 0.2	2.2 $\pm$ 0.5	—	—
Forestomach wall	51.9 $\pm$ 7.7	10.4 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.4
Glandularstomach wall	41.8 $\pm$ 6.2	6.6 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.4	2.5 $\pm$ 0.2
Duodenum wall	6.5 $\pm$ 0.6	5.7 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.1	2.6 $\pm$ 0.1
Jejunum wall	3.4 $\pm$ 0.1	5.0 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.6	2.8 $\pm$ 0.5
Ileum wall	2.0 $\pm$ 0.3	2.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
Large intestinal wall	4.2 $\pm$ 0.7	3.5 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.1
Caecum wall	2.1 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2

蓄積はみられなかったが、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与後には、脾及び脾で減少速度がかなり遅かった。また、 $^{14}\text{C}$ -HCFU は前胃で、 $^{14}\text{C}$ -FU は小腸壁で長時間見出された。

## 考察

FU 誘導体である HCFU の致死毒性はマウスの経口投与で FU の  $\frac{1}{3}$  である。(ddN 雌マウスに於ける / 回投与での  $\text{LD}_{50}$  は HCFU 1,320 mg/kg, FU 390 mg/kg) しかも、抗腫瘍スペクトラムは FU と比べ幅広いものであった。そこで、HCFU と FU の薬理学的差違を説明するために、体内分布を検討した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU の胃腸からの吸収は速やかであった。 $^{14}\text{C}$ -FU を用いた組織内濃度は、経口投与時に、静脈内投与と比べて、持続時間が長く、特に小腸、胃、肝、脾で高いと報告され<sup>61)</sup>、放射能の残留は、骨髄、胸腺、リンパ腺及び脾で見られた<sup>62)</sup>。著者の実験結果に於ても、FU は脾に高かった。しかし、HCFU ではそのようなことはなかった。FU の毒性は胃腸障害<sup>63)</sup>と骨髄障害<sup>63)</sup>が主であり、ラットに  $^{14}\text{C}$ -FU 投与 長時間経過後のオートラジオグラフィーでも、これらの部位での残存が報告されている<sup>64)</sup>。FU の強い胃腸障害の原因は、小腸壁における FU の長時間残留によると考えられる。著者の実験では  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与 12-24 時間後の小腸壁では、 $^{14}\text{C}$ -FU より濃度が低く、FU よりも腸壁への残存が少ないことを示していた。このことは、HCFU の胃腸障害が弱いことを示唆するものである。

血漿中濃度は  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与の方が、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与より高く長時間持続した。HCFU と FU とでは、水に対する溶解度が全く異なり、HCFU は水に不溶性であり、FU は易溶性であるにもかかわらず、多くの組織で  $^{14}\text{C}$ -HCFU 由来の放射



能の消失は、 $^{14}\text{C}$ -FU の場合と同様であった。大きな違いは  $^{14}\text{C}$ -HCFU が胃壁に、 $^{14}\text{C}$ -FU が腸壁に、より長時間残留していたことである。更に、 $^{14}\text{C}$ -FU は膵と脾に高濃度の分布がみられた。

以上、HCFU 及び FU は胃腸からよく吸収されて、各組織臓器に分布し、24時間以内にほとんど放射能は消失することが明らかになったが、毒性及び活性に於ける、HCFU と FU との差を明らかにするためには、更に HCFU 及び FU の代謝産物の組織内分布を検討する必要がある。

## 第2節 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil及びその代謝産物の分離定量法

前節で述べたごとく、 $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の総放射能による比較では、毒性及び抗腫瘍効果を説明できる程、顕著な差は見られなかった。総放射能による検討は、代謝産物などを含むものであり、速やかに代謝変化を受ける化合物では、総放射能の体内分布を調べるだけでは不十分である。

FU は生体内で肝の dihydrouracil dehydrogenase<sup>65,66)</sup> で速やかに代謝され、5,6-dihydro-5-fluorouracil (DHFU) 続いて  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropionic acid (FUPA)  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -guanidopropionic acid (FGPA) 更に  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alnine (FBAL) まで酸化分解されるものである<sup>67)</sup>。一方、アルキル基を持つ化合物、たとえば n-propylbenzene や n-butylbenzene の代謝産物には、 $\omega$ -、( $\omega$ -1)-、 $\omega$ - 及び  $\beta$ -酸化体が報告されている<sup>68)</sup>。また、hexethal<sup>69)</sup> や pentobarbital<sup>70)</sup> などのバルビタールや phenylbutazone<sup>71)</sup> meprobamate<sup>72)</sup> などにも、これらアルキル基が酸化された ( $\omega$ -1)-、 $\omega$ - 及び  $\beta$ -酸化体が見出されている。HCFU についても同様な代謝産物、( $\omega$ -1)-酸化体の 1-(5-hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCFU)、1-(5-oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU)、 $\omega$ -酸化体の 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU) と更に  $\beta$ -酸化を受けた 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU) などの存在が考えられる。そこで、代謝産物として期待される化合物 HCFU、HHCFU、OHCFU、CPEFU、CPRFU、FU、DHFU、FUPA、FGPA、FBAL などについての分離定量法を検討した。先に渡辺ら<sup>73)</sup> は HCFU、CPEFU、CPRFU と FU を酸性条件でアンバーライト XAD-2 樹脂を用いて分離し、バイオアッセイ法により、また、河野ら<sup>74)</sup> は CPEFU、CPRFU、HHCFU と OHCFU を高速液体クロマトグラフィーにより、分離定量している。しかし、これらの方法では、抗菌活性測定または、紫外線吸収によ

り定量しており、抗菌活性やUV吸収のない代謝産物の確認や定量はできない。そこで、著者はラジオアイソトープを用い、できるだけ速やかに、すべての代謝産物を分離できる方法を検索し、薄層クロマトグラフィー(TLC)を用いて、確認及び定量することに成功した。

## 材料と方法

化合物 HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, 5-fluorouridine(FUR), 2'-deoxy-5-fluorouridine (FUdR), 5-fluorouridine-5'-monophosphate(FUMP), 2'-deoxy-5-fluorouridine-5'-monophosphate(FdUMP), DHFU, FUPA, FGPA及びFBALは三井製薬株式会社から提供された。TLCプレートはメルク製シリカゲル60 F<sub>254</sub>を用いた。展開溶媒に用いた溶液は、すべて試薬特級を用いた。HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, FUR, FUdR, FUMP, FdUMPは紫外線吸収により貯を求めた。DHFUの確認は、1N水酸化ナトリウム溶液をスプレーした後1% p-dimethylaminobenzaldehyde - 塩酸 - ethanol溶媒(Ehrlich試薬)を用い〔黄色〕、FUPAはEhrlich試薬〔黄色〕、FBALはNinhydrin試薬を用い発色〔赤紫色〕させた。また、FGPAは10%  $K_3F(CN)_6$ , 10%  $Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$  及び10%水酸化ナトリウム溶液を1/1/1に加え、acetoneを3倍量、更に30分後、水をその4倍量加えた溶液をスプレーすることにより発色〔赤色〕させた。

放射能の検出はAluka TLC scannerを用いた。また、標準品を代謝産物と同時にスポットし、展開後LKB Ultrofilmで2週間露出、現像、定着したオートラジオグラフィーで、スポットの単一性を確認した。

## 結果

従来 FU とその代謝産物を分離するために使われてきた溶媒は、HCFU を含む代謝産物の分離には適さなかった (Table III-4, A~C)。塩基性溶媒は HCFU 及びその代謝産物 (HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU) が速やかに分解し、FU になってしまったため使用不可能であった。そこで、HCFU, HHCFU, FU, FUDR, CPRFU, FUR, FGPA, FUPA などを分離するため、第一の溶媒として chloroform/phenol/methanol/水 (70:30:30:3) を用いた (Table III-4, E, Fig. III-3)。しかし、OHCFU は HCFU と、CPEFU は FU と、DHFU は FBAL と重なってしまった。そこで第二の溶媒として chloroform/methanol/酢酸 (100:10:1) を用い HCFU, OHCFU, CPRFU, FU を完全に分離した (Table III-4, F, Fig. III-4)。更に第三の溶媒として、n-propanol/酢酸 (10:1) を用いると FBAL, DHFU, FUPA, がよく分離できた (Table III-4, D, Fig. III-5)。この3種類の溶媒を適宜用いることにより、各種代謝産物を確認及び定量可能となった。

## 考察

ほとんどの代謝産物は分離することができたが、ヌクレオチド類は、すべての溶媒で原点から動かなかった。

CPEFU はどの溶媒 (酸性条件) を用いても他の化合物と重なってしまうが、chloroform/phenol/methanol/水 (70:30:30:3) 及び chloroform/methanol/酢酸 (100:10:1) の溶媒を用いて分離した各代謝産物の存在比から算出することができた。なお、酸を用いない溶媒、たとえば、chloroform/methanol (10:1) で展開すると CPEFU は若干 FU に変化するが、分離確認できた。従って、予想されるすべての代謝産物は、この3種類の系を用いた TLC で定量可能である。

Table III - 4. Rf values of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil, its metabolites and reference compounds

Compounds	Rf values in solvent					
	A	B	C	D	E	F
1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU)	0.97	0.98	0.91	0.92	0.99	0.84
1-(5-Hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCFU)	0.96	0.94	0.85	0.73	0.90	0.40
1-(5-Oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU)	0.97	0.97	0.79	0.76	0.98	0.66
1-(5-Carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU)	0.93	0.95	0.86	0.82	0.63	0.44
1-(3-Carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU)	0.88	0.90	0.79	0.72	0.43	0.24
5-Fluorouracil (FU)	0.65	0.71	0.67	0.77	0.59	0.08
5-Fluorouridine (FUR)	0.36	0.51	0.50	0.74	0.35	0.00
5-Fluoro-2'-deoxyuridine (FUdR)	0.49	0.67	0.61	0.78	0.50	0.04
5-Fluorouridine-5'-monophosphate (FUMP)	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
5-Fluoro-2'-deoxyuridine-5'-monophosphate (FdUMP)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5,6-Dihydro-5-fluorouracil (DHFU)	0.16	0.05	0.20	0.23	0.09	0.00
$\alpha$ -Fluoro- $\beta$ -ureidopropionic acid (FUPA)	0.49	0.47	0.55	0.60	0.12	0.05
$\alpha$ -Fluoro- $\beta$ -guanidopropionic acid (FGPA)	0.10	0.04	0.42	0.28	0.19	0.00
$\alpha$ -Fluoro- $\beta$ -alanine (FBAL)	0.01	0.04	0.18	0.06	0.07	0.00

Solvent A, ethyl acetate-formic acid-water (13:1:1, by vol.);  
 B, chloroform-methanol-acetic acid (24:8:1); C, butanol-formic acid-water (77:10:13); D, propanol-formic acid (10:1); E, chloroform-phenol-methanol-water (70:30:30:3); F, chloroform-methanol-acetic acid (100:10:1).

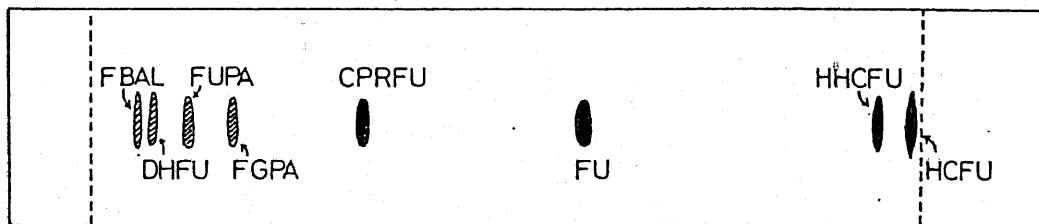
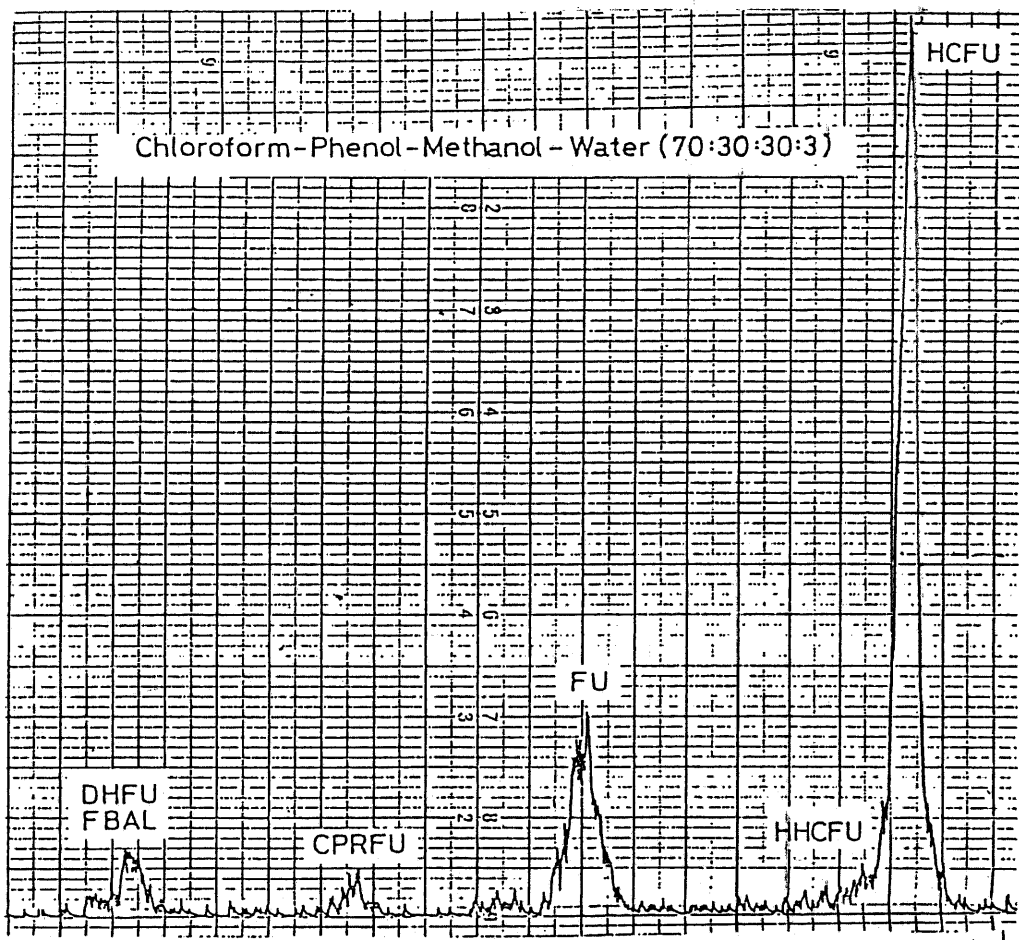


Fig. III-3. Separation of HCFU derivatives by TLC

Solvent system: chloroform:phenol-methanol-water  
(70:30:30:3)

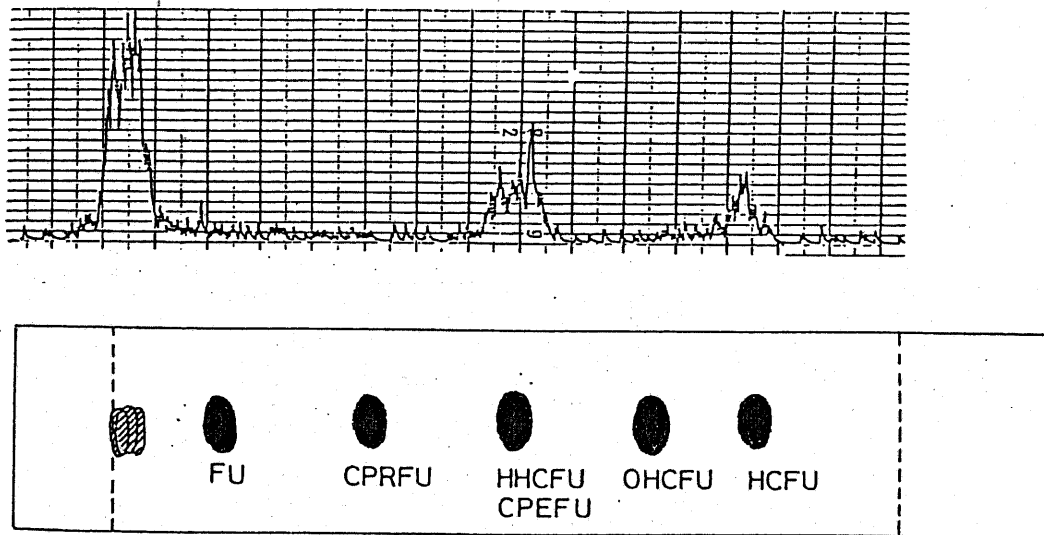


Fig. III-4. Separation of HCFU derivatives by TLC

Solvent system: chloroform-methanol-acetic acid  
(100:10:1)

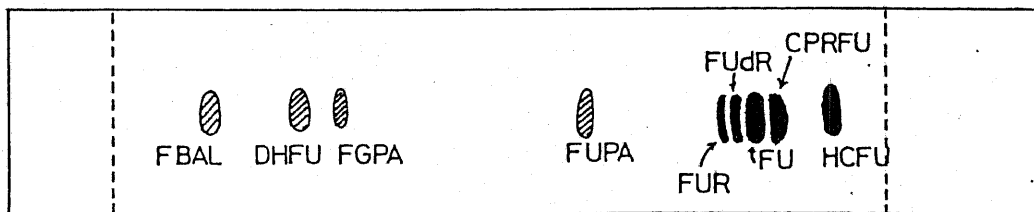
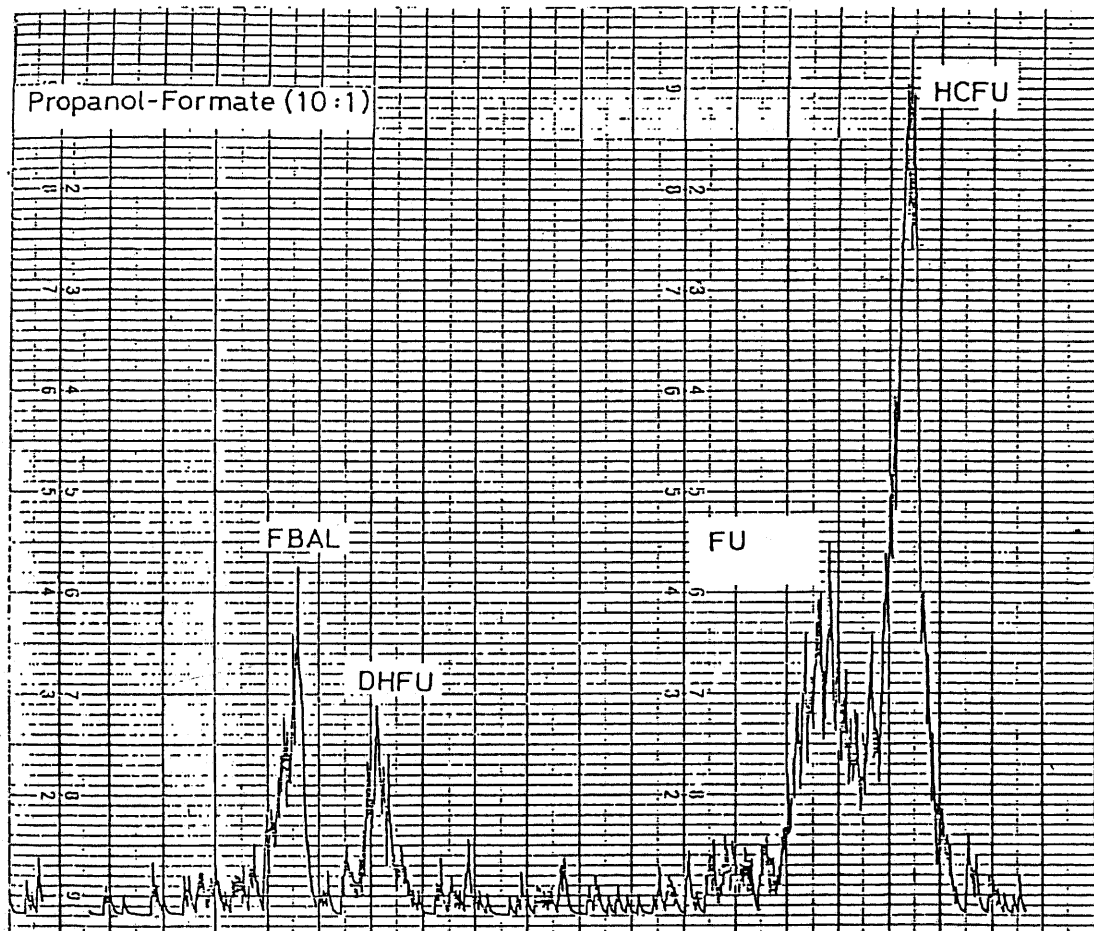


Fig. III-5. Separation of HCFU derivatives by TLC

Solvent system: propanol-formic acid (10:1)



### 第3節 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilの代謝産物

第Ⅲ章, 第2節で述べた分離法を用いて, 第1節で述べた主要臓器について, 代謝産物を抽出し, 分離定量を行なった。抽出は HCFU 及びその関連代謝産物が中性及びアルカリで不安定で, 速やかに FU になるため, 塩酸-methanol (1:100) で抽出することにした。この溶媒で抽出した時の肝, 腎などからの放射能抽出率は, ほぼ100%であった。

ラットを用いた実験では<sup>75)</sup>  $\omega$ -及び $\beta$ -酸化された化合物の CPEFU 及び CPRFU が見出されているが, ( $\omega$ -1)酸化体である HHCFU や OHCFU は見出されていない。また, 河野らの最近の報告によると<sup>74)</sup> HCFU を投与されたヒトの血清中に, 若干の HHCFU と OHCFU が検出されたが, 主たる HCFU の代謝産物は CPEFU と CPRFU であった。

又やウサギでは, 主たる HCFU 代謝産物は HHCFU と OHCFU であった<sup>76)</sup>。そこで, 著者はマウスにおける酸化が,  $\omega$ -酸化と ( $\omega$ -1)酸化のどちらが優先するか検討した。

### 材料と方法

化合物  $^{14}\text{C}$ -HCFU (2.47  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ),  $^{14}\text{C}$ -FU (2.10  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ), HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, FUR, FURdR, FUMP, FdUMP, DHFU, FUPA, FGPA 及び FBAL は三井製薬株式会社から提供された。溶媒その他については試薬特級を用いた。

### 血液及び組織の採取

を各群々匹ずつ使用した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU は 50 mg/kg を経口投与した。

体重 20 g の ddN 雌マウス

投与後, 5, 15, 30, 60,

120, 180分後に殺し, 血液, 肝, 小腸, 肺及び腎を摘出し, 組織は直ちに凍結した。

### 血液中<sup>14</sup>C-HCFU及びその代謝産物の分離と測定

血液試料は<sup>14</sup>C-HCFUあるいは<sup>14</sup>C-FU投与後所定の時間に軽く麻酔し, 腋窩動静脈から採血し, 直ちに血漿を分離した。同量の塩酸-methanol (1:100)を加え, 遠心分離し, 血漿タンパクを除去後, 上清は新しい試験管に移した。沈澱物は再度同量の塩酸-methanol (1:100)で洗い, 遠心分離し, 上清を最初の上清と合せた。上清の一定量を1mlのSoluen 350 (Packard USA)に溶かして, 9mlのシンチレーターを加え, Tri-carb液体シンチレーションスペクトロメーター (Packard, Model 3320)で放射能を測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC)の実験では, 上清の一定量をシリカゲル 60 F<sub>154</sub>の薄層板にスポットし, 主に chloroform/phenol/methanol/水 (70:30:30:3)で展開した。薄層板は Aloka TLC scanner (Model TLC-101)を用いて, 放射能を測定した。各代謝産物は再クロマトグラフィーと LKB-Ultrofilm (LKB, Sweden)を用いたオートラジオグラフィーで単一性を確認した。

### 組織中<sup>14</sup>C-HCFUとその代謝産物の分離と測定

組織試料は, 塩酸-methanol (1:100) 5mlでホモジナイズし抽出した(2度)。遠心分離した上清を30°Cで減圧乾固した。各組織からの放射能の回収は, ほぼ100%であった。試料は150µlのmethanolに溶解し, その50µlを薄層板にスポットした。薄層クロマトグラフィーでの代謝産物の分離は血漿の場合と同様に行なった。

## 結果

血漿中代謝産物  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の血漿中には、放射能のピークが5つあった (Fig. III-6)。最初のピークには、DHFU と FBAL, 2番目と3番目のピークは各々 CPRFU 及び FU と同定された。4番目のピークは HHCFU であり、5番目のピークは HCFU と OHCFU であった。FU のヌクレオシド (FUR, FUDR) やヌクレオチド (FUMP, FDUMP), FUPA 及び FGPA は検出されなかった。投与5分後の血漿中 FBAL, DHFU, CPRFU, FU, HHCFU, OHCFU 及び HCFU は、各々 0, 0, 0, 18, 12, 2 及び 68% であり、主成分は HCFU の未変化体であった。投与30分後では、FBAL, DHFU, FU, HHCFU, OHCFU 及び HCFU が各々 2, 6, 33, 18, 12, 及び 29% であり、HCFU と FU が多く、HHCFU と OHCFU もかなり見出された。HHCFU と OHCFU は時間と共に増加した。CPRFU は15分のみならずに見出された。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の未変化体と FU の最高濃度は 22.8 及び 6.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった (Fig. III-7)。HCFU の代謝産物及び FU は180分後でも検出された。DHFU と FBAL は180分までかなり低濃度であった。

対照として用いた  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物は、 $^{14}\text{C}$ -HCFU の場合の第1番目と第3番目に相当する2本のピークがみられた。すなわち、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与5分後では FBAL, DHFU と FU が各々 2, 46 と 52% であり、それが30分後には各々 12, 26 及び 2% となり、60分後には、FU は検出できなかった。未変化体 FU の最高濃度は5分で 10.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった (Fig. III-7)。FU は急速に代謝分解され DHFU となり、更に徐々に FBAL になった。

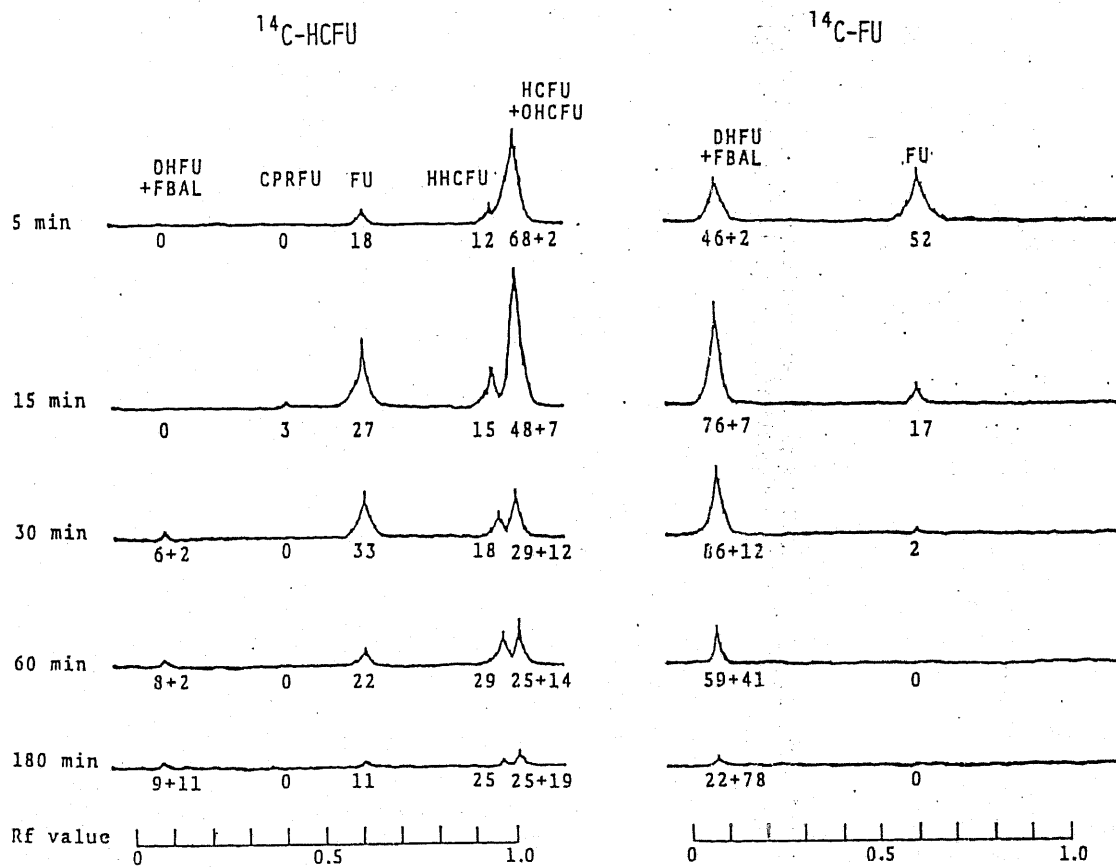


Fig. III-6. Radiochromatograms of metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$  obtained in plasma

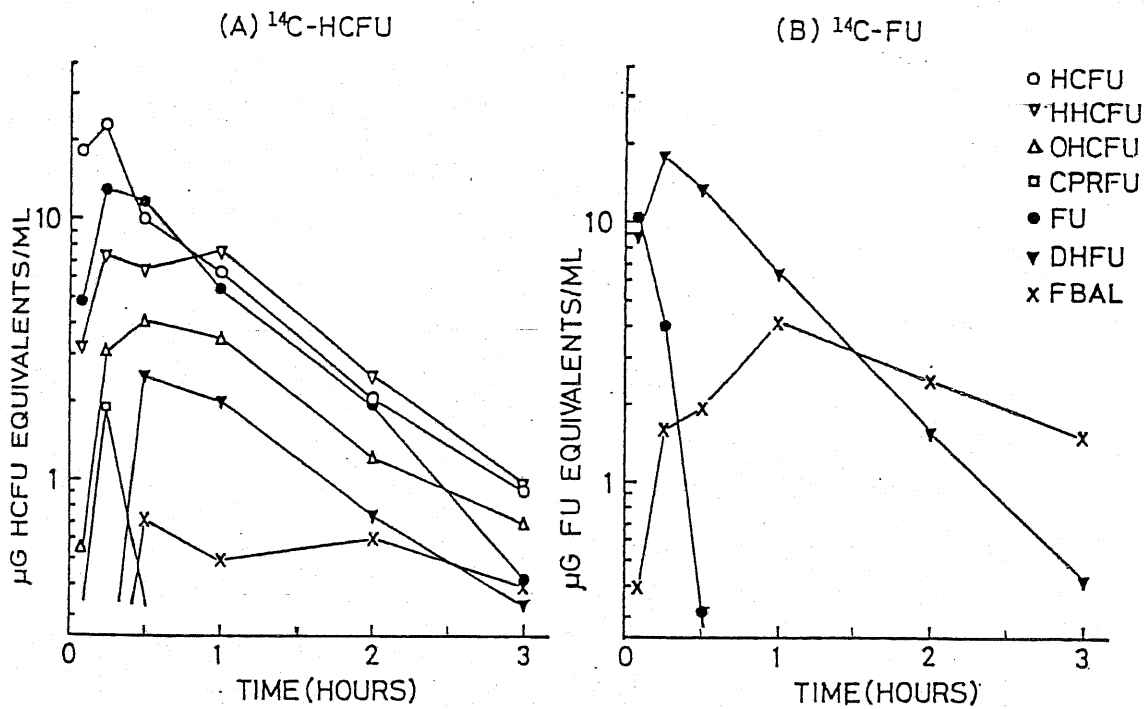


Fig. III-7. Plasma concentration of metabolites in mice after oral administration (A)  $^{14}\text{C}$ -HCFU or (B)  $^{14}\text{C}$ -FU.

### 肝臓中代謝産物

肝は FU の主たる分解臓器である<sup>67)</sup>。  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の肝には、放射能のピークは 6 本あった (Fig. III-8)。 そのうち 3 本のピークは血漿中のピークと異なっていた。 最初のピークは、FU のヌクレオチドと同一であったが、未知物質も含まれていた。 2 番目のピークは FBAL と DHFU であった。 3 番目と 4 番目は各々 FUPA と FU であり、5 番目は HHCFU、6 番目は HCFU と若干の OHCFU であった。 肝抽出物中の FBAL、DHFU 及び FUPA の Rf は各々 0.11、0.15、及び 0.30 であり、これらの値は Table III-4 に示したものと異なっていた。 この Rf 値の変動は共存している未知物質によるものと思われる。 5 分後の HHCFU、OHCFU 及び HCFU は各々 5、0、及び 1% であった。 その時のヌクレオチド画分、FBAL、DHFU、FUPA 及び FU は各々 4、3、1、3、及び 3% であった。 すなわち、5 分後には、主成分は未変化体の HCFU であった。 30 分後には、ヌクレオチド画分、FBAL、DHFU、FUPA、FU、HHCFU、OHCFU 及び HCFU が各々 15、30、2、3、3、19、2 及び 26% であり、主成分は FBAL と HCFU、次いで HHCFU であった。 CPRFU と OHCFU はほとんど検出されなかった。 FBAL は時間と共に増加した。 この代謝産物の様式は 180 分後まで続いた。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物は 4 本のピークがあり、 $^{14}\text{C}$ -HCFU のパターン<sup>67)</sup>の第 1、2、3 及び 4 番目に相当していた。 5 分後には、ヌクレオチド画分、FBAL、DHFU、FUPA 及び FU は各々 21、20、4、44 及び 11% であった。 このパターンは 180 分まで続いたが、FU そのものは 1% 以下になった。 Chaudhuri ら<sup>67)</sup>は、マウス肝ホモジネートに FU を加え、1 時間インキュベートした結果、FUPA が大量 (77%) に検出され、この時 DHFU はわずか 0.8% であることを報告しているが、著者の実験結果とよく一致した。 すなわち、FU は肝に於て、

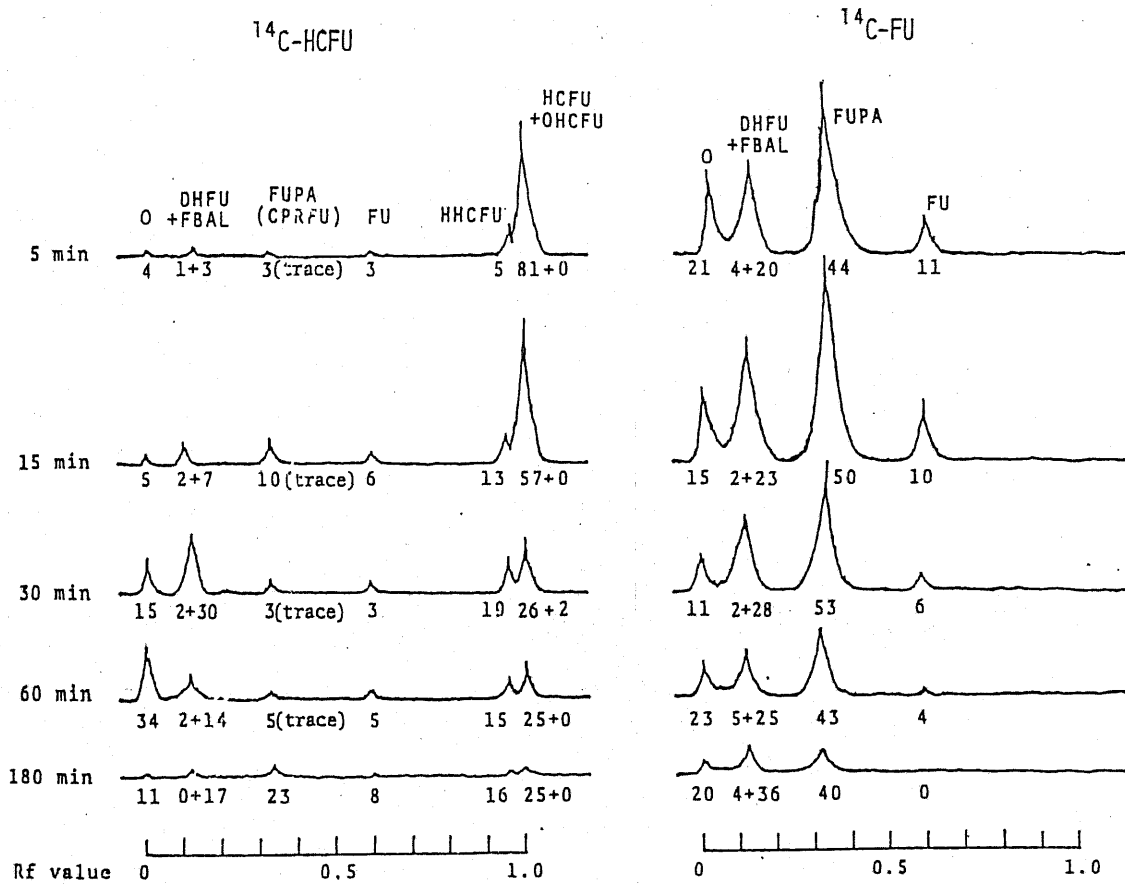


Fig. III-8. Radiochromatograms of metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$  in liver

速やかに DHFU を經由して FUPA まで代謝されるが、FUPA から FBAL への代謝は、かなり遅いことが示された。

### 小腸壁中代謝産物

小腸は FU の特徴ある消化管毒性を示す部位であり、HCFU と FU の分布状態でも若干の差が見られたことを第三章第1節で述べた。更に代謝産物の差を見るために  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の小腸壁抽出物を検討した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与では放射能ピークは3本あり (Fig. III-9), 最初から順番に FBAL と DHFU, FU 及び HCFU であった。HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU 及び FUPA は検出できなかった。投与後60分たっても未変化の HCFU が60%以上残っており, FU は22%であった。

一方,  $^{14}\text{C}$ -FU 投与では、ピークは2本だけであり, FBAL と DHFU 及び FU であった。未変化の FU は、5分後では95%あったが、その後減少して60分後には29%になった。腸での FU の不活性化は遅いことが明らかになった。

### 肺中代謝産物

多くの組織の中の一つとして、肺の代謝産物を調べた。Fig. III-10 に示すように、放射能ピークは5本検出され、最初から順に FBAL と DHFU, FUPA, FU, HHCFU 及び HCFU であった。HCFU は長時間存在し、徐々に FU に変化していった。

一方,  $^{14}\text{C}$ -FU の主代謝産物は FBAL, DHFU, FUPA, 及び FU であり, FBAL や DHFU は、15分後の組織中ですでに FU より多く, FU は60分後には消失していた。FBAL は、時間と共に増加した。FU の代謝産物の一つである FUPA は  $^{14}\text{C}$ -FU 投与60分後でも検出できたが、これは肺と血漿との最も顕著な違いであった。



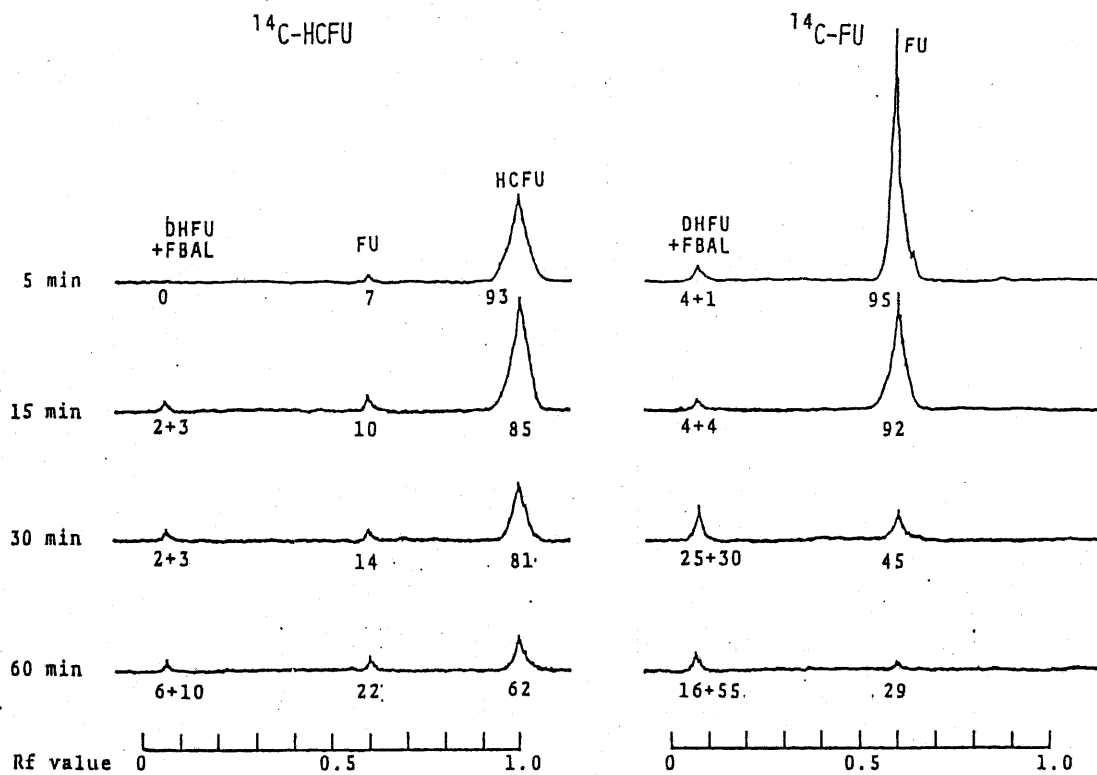


Fig. III-9. Radiochromatograms of metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$  in small intestine

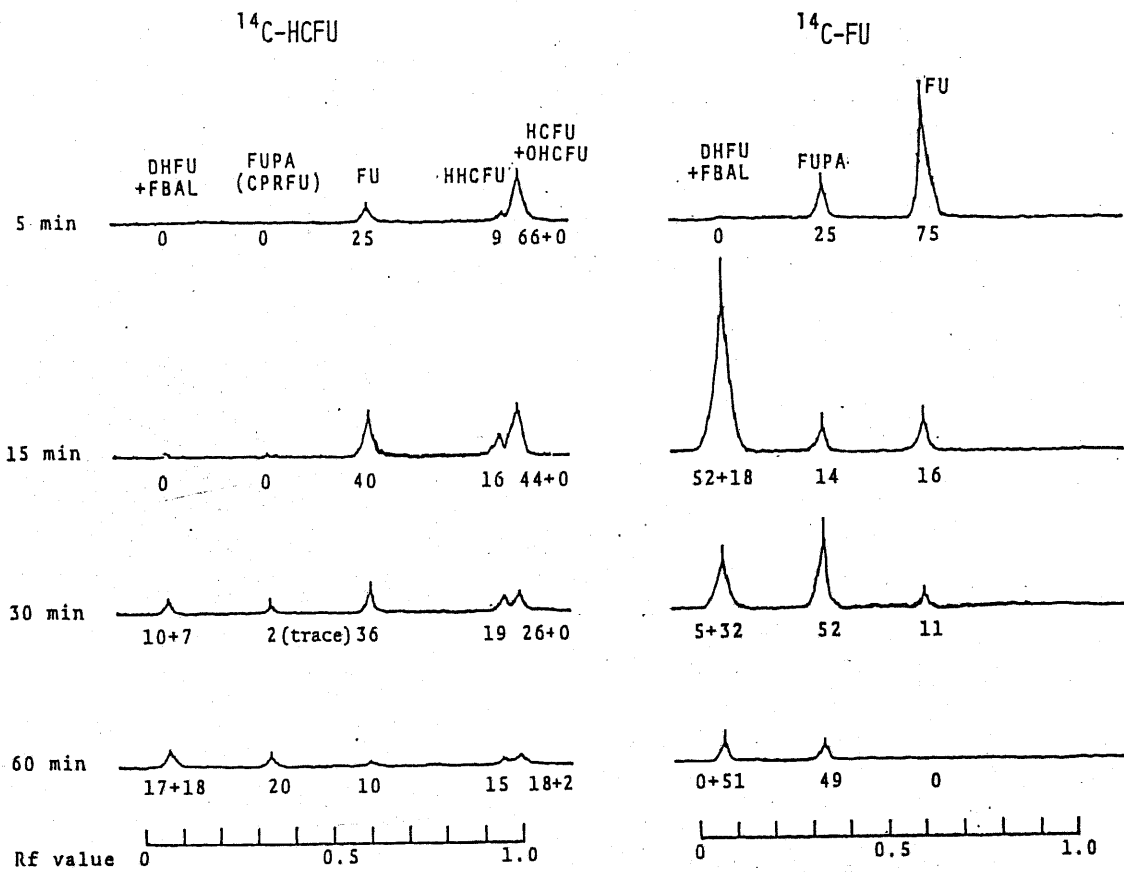


Fig. III-10. Radiochromatograms of metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$  in lung

腎中代謝産物 腎は種々の化合物における尿中排泄の末端臓器である。腎の  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物を Fig. III-11 に示した。  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の放射能ピークは5本あり、原点に近いものから順に FBAL と DHFU、CPRFU と FUPA、FU、HHCFU 及び OHCFU と HCFU であった。15分後では、FBAL と DHFU は検出できなかつたが、30分後には FBAL、DHFU、CPRFU、FUPA、FU、HHCFU、OHCFU 及び HCFU は各々14、10、19、5、26、9、4、及び13% であった。この代謝パターンは180分まで続いた。CPRFU は30分後にかかり見出されたが、他の時間には微量であった。HHCFU 及び OHCFU も少量であった。FUPA、DHFU、FBAL は時間と共に増加した。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の放射能はほとんどがFUの分解産物 (FBAL、DHFU 及び FUPA) であった。未変化体FUは5分後には54% あつたが、30分たつと5% となつた。主成分は FUPA と FBAL であった。

## 考察

$^{14}\text{C}$ -HCFU をマウスに経口投与した場合の組織内分布は、全身オートラジオグラフィーと総放射能の組織内濃度変化を調べたが、これは第III章第1節で述べた。 $^{14}\text{C}$ -HCFU の総放射能は、消化管を通して速やかに吸収され、各組織に分布し、投与24時間後には、ほとんどの組織から消失した。しかし、分布の上で、 $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の差はほとんどなく、抗腫瘍活性や毒性の差を説明することはできなかった。活性と毒性に於ける両化合物の差異を解明するため、著者は HCFU、FU 及びそれらの代謝産物の血漿中及び各組織内分布について検討した。

HCFU は FU の“マスク型”と考えられることから、抗腫

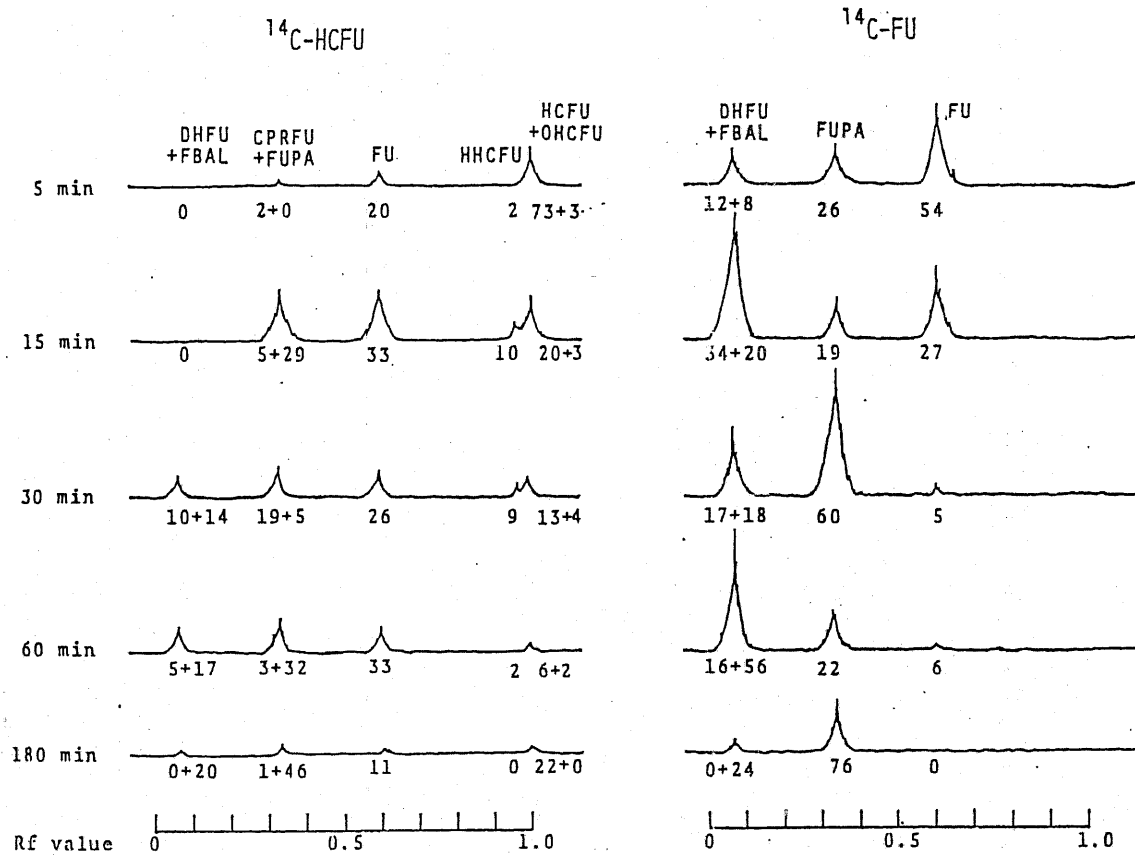


Fig. III-11. Radiochromatograms of metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$  in kidney

瘍活性に関しては、FU の血漿中濃度が最も重要と考えられる。<sup>14</sup>C-HCFU の経口投与後、血漿中 FU 濃度は 180 分以上にわたり高濃度維持し続けたが<sup>14</sup>C-FU 投与後の血漿中 FU 濃度は急速に減少した。Uracil は主に肝の dihydrouracil dehydrogenase により、ピリミジンの 5,6 の二重鎖が還元されて dihydrouracil を生成する<sup>77,78)</sup>。その後 Ureido propionic acid を経て  $\beta$ -alanine までゆくり代謝される。FU の場合も uracil と同様な過程で代謝される<sup>67)</sup> が、FU の方が uracil より若干速く代謝される<sup>66)</sup>。HCFU 投与では FBAL の量が、かなり少なかった。このことは、HCFU が FU の“マスク型”として挙動し、組織内で急速には分解されにくく、徐々に活性体である FU を放出していることを示している。この結果は、小針ら<sup>75)</sup> のラットでの所見とよく一致するものである。先に述べた FT は肝で徐々に FU になり<sup>6)</sup>、しかも、血漿中 FU 濃度が低いいため、毒性が低いと考えられている<sup>79)</sup> が、HCFU の場合も同様な事が考えられる。

HCFU の  $\omega$ -1-酸化生成物である HHCFU と OHCFU はマウス血漿中に相当量見出されたが、CPRFU は微量であった。CPEFU は酸を用いない chloroform/methanol (10:1) 系で検討してみると、微量検出できたが、CPRFU と同量またはそれ以下であった。これら  $\omega$ -酸化生成物の CPEFU と CPRFU はラット血漿中では、HCFU の主な代謝産物であった<sup>75)</sup>。FUPA と FGPA はマウス血漿中では無視できる量であった。FU も少量であったが、DHFU と FBAL は多量に見出された。これらのことは、FU は肝などの臓器で速やかに代謝され、DHFU になり、更に DHFU は臓器内で FUPA、FBAL に代謝されて、血漿中に出るものと思われる。

肝では、HCFU 投与後、180分でも相当量の HCFU 자체가検出された。HCFU の FU 構造を持った中間代謝産物としては HHCFU と若干の OHCFU が検出された。FU とその代謝産物は少量であった。FU をヒトに経口投与した場合は、静脈内投与時と比べ、多くの不活性代謝産物が見出されることが報告されているが<sup>67)</sup>、著者のマウスへの経口投与に於ても、肝内には、多量の FUPA、DHFU、FBAL が見出され、未変化 FU は15分後でもわずか10%であった。このことからヘキシルカルバモイル基は、FU の環開裂を防ぐために価値あるものと思われる。肝に於ては、FU の代謝産物として DHFU と FUPA が長時間存在したが、FUPA は血漿中では見出されなかった。今までの FU 投与時の血漿及び組織中代謝産物の研究では<sup>61,67)</sup>、DHFU の存在は、ほとんど報告されず、FUPA のみが見出されているが、これは過塩素酸で抽出し、イオン交換クロマトグラフィーにより分離する際に、1N 氷酸化カリウムで pH 11 に調整したために、DHFU が FUPA に変化してしまったものと考えられる。塩酸-methanol (1:100) 抽出によれば、FUPA でなく多量の DHFU が検出できた。

HCFU が FU と比べ消化器系への毒性が低いということは、小腸壁の最高 FU 濃度が低いことから説明することができると考えられる。小腸壁では、HCFU のアルキル鎖の酸化による中間代謝産物は検出されず、また、FU も代謝分解されにくく、FBAL 量も少なかった。Cohen<sup>60)</sup> は FT と FU の小腸内取込を検討した結果、FT の場合、HCFU と同様 FU になりにくく、ヌクレオチド量も FU の場合の  $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{4}$  であり、このことにより、FT の毒性が低いことを説明している。

肺には、HCFU、HHCFU 及び FU が存在し、高濃度持続した。このように抗腫瘍効果のある形で存在していることが、HCFU の肺転移抑制作用 (Table I-15) に結びつくも

のと考えられる。

腎では、HCFU 投与後、未変化 HCFU と FU が長時間存在し、FUPA、DHFU 及び FBAL も検出された。HHCFU、OHCFU や CPRFU など FU の構造を持った中間代謝産物も検出された。

以上の結果から、HCFU の代謝経路を予想し、Fig. III-12 に示した。関与している反応は、ヘキシルカルバモイル側鎖の連続的酸化、ピリミジン環と側鎖の分離切断とその後の分解である。HCFU 側鎖のヘキシルカルバモイル鎖は、 $\omega$ - 及び  $(\omega-1)$ -酸化と  $\beta$ -酸化を受ける。マウスでは HCFU の側鎖の代謝変化は、 $\omega$ -酸化と更に続く  $\beta$ -酸化の系よりも、 $(\omega-1)$ -酸化の系の方が主であった。

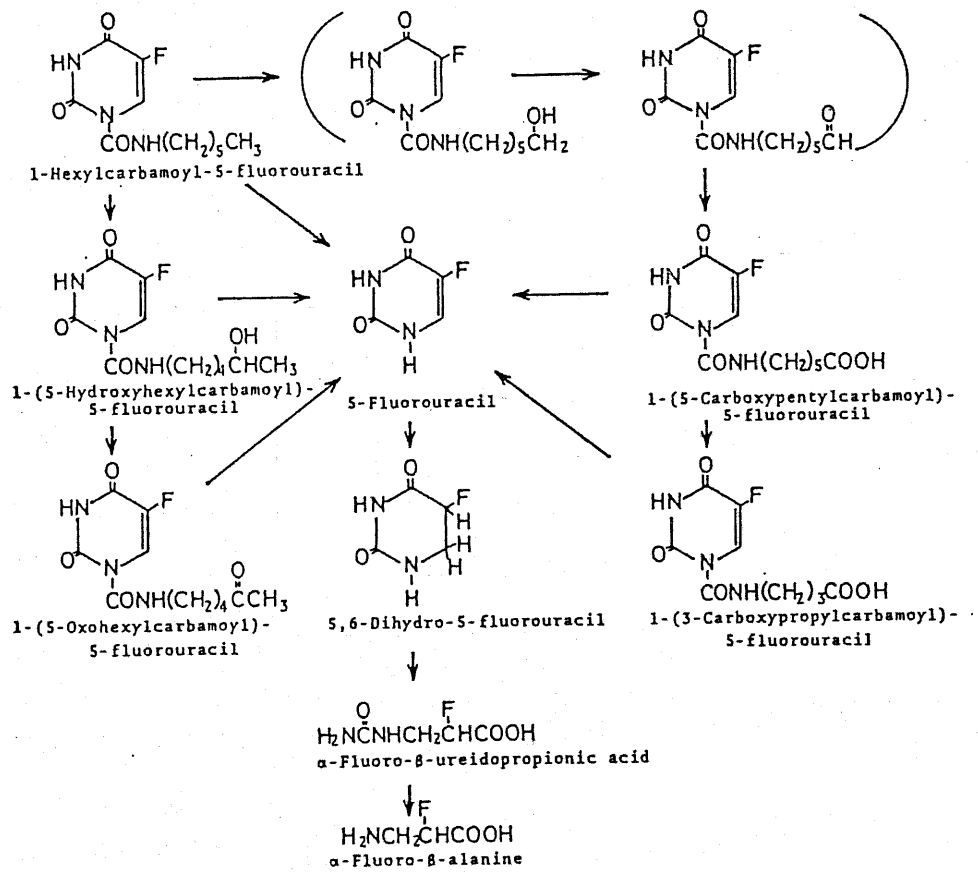


Fig. III - 12. Metabolic pathways of HCFU.



## 第4節 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilの吸収排泄

第3節では、マウス臓器内代謝産物を検討し、HCFUの側鎖の $\omega$ -酸化体(CPEFU)、 $(\omega-1)$ -酸化体(HHCFU及びOHCFU)及び $\beta$ -酸化体(CPRFU)が検出されたことを述べた。この節では、 $^{14}\text{C}$ -HCFUの体外排泄と代謝産物を $^{14}\text{C}$ -FUと比較検討した。

### 材料と方法

化合物  $^{14}\text{C}$ -HCFU,  $^{14}\text{C}$ -FU, HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, DHFU, FUPA 及び FBAL を用いた。

動物 ddN 雌マウスで 20-21g のものを使用した。

### 尿中のHCFU及びその代謝産物の分離定量法

$^{14}\text{C}$ -HCFU 又は  $^{14}\text{C}$ -FU は、0.5% CMC でホモジナイズし、各々 50 mg/kg を経口投与した。1群4匹とし、メタボリズムケージで経口投与後 0~4 時間、4~12 時間、12~24 時間、及び 24~48 時間の間隔で尿と糞を集めた。容器には前もって 1N 塩酸 1ml を加えておいた。更に初期に於ける HCFU の代謝過程を知るために、3匹のマウスを用い、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU 投与後 4 時間にわたり、15分ごとに、強制的に腹部を押し、集尿し、代謝産物を調べた。HCFU, FU 及びその代謝産物の分離は、薄層クロマトグラフィ(TLC)を用いた(シリカゲル 60 F<sub>254</sub>, Merck)。集めた尿は、一定量(10 $\mu$ l)をできるだけ速やかに薄層プレート上にスポットした。展開溶媒系は n-propanol/ 酢酸 (10:1) を用いた。化合物同定のため、二次元展開も用い

たが、この場合、一次元目は n-propanol/ 酢酸 (10:1) で、二次元目は chloroform/methanol/ 酢酸 (100:10:1) を用いて行った (15 cm)。

試料の一定量 (10  $\mu$ l) は Soluene 350 (Packard, USA) 1 ml に溶解し、9 ml のシンチレーターを加え、液体シンチレーションスペクトロメーターで測定した。TLC で分離した代謝産物の定量は Aloka TLC scanner (Model TLC 101) を用いて放射能を測定し、得られた曲線下の面積から、その割合を計算した。各々の放射性代謝産物の単一性は、フジ X 線フィルム (IX-150) を用い、オートラジオグラフィで確認した。

### 経口投与後の $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び $^{14}\text{C}$ -FU の消化管内残存量の測定

$^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU についての消化管吸収の様相を知るために、経口投与後、消化管内容物の総放射能変化を経時的に測定した。区切った部分は、胃、十二指腸、小腸、大腸及び盲腸とした。各々の内容物は、塩酸-methanol (1:100) 5 ml でホモジナイズし、直ちに遠心後、上清の一定量を薄層板上にスポットし n-propanol/ 酢酸 (10:1) の系で展開した。一群 2 匹のマウス (ddM) を使用した。

## 結果

### $^{14}\text{C}$ -HCFU と $^{14}\text{C}$ -FU の排泄

尿は経口投与後 0~4, 4~12, 12~24, 及び 24~48 時間に集めた。HCFU 及び FU とともに 4 時間以内に投与量の約 50% が尿中に見出され、その後、徐々に増加し、48 時間までに投与量の 90% に達した (Fig. III-13)。48 時間内に排泄された糞中の

放射能は投与量の2%以下であった。

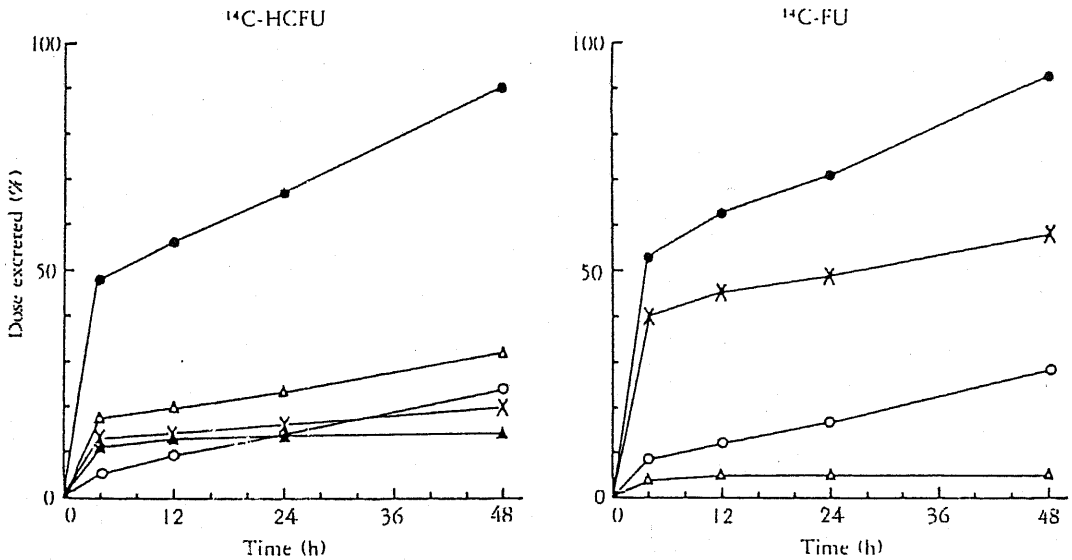


Fig. III-13. Urinary Metabolites of  $^{14}\text{C-HCFU}$  and  $^{14}\text{C-FU}$   
 ●—●, Total; ▲—▲, CPRFU; △—△, FU; ×—×, DHFU; ○—○, FBAL.  
 $^{14}\text{C-HCFU}$  or  $^{14}\text{C-FU}$  was administered orally at 50 mg/kg. Aliquots of urine collected were analysed by TLC.

尿中の  $^{14}\text{C-HCFU}$  の代謝産物

HCFU の代謝産物

物を同定するために、集めた尿は直ちに二次元薄層クロマトグラフィーで検討した (Fig. III-14)。 Fig. III-14A は対照化合物の薄層クロマトグラムである。 Fig. III-14B には、尿中 HCFU の代謝産物の薄層クロマトグラムを示した。主な代謝産物は CPRFU, FU, DHFU 及び FBAL であった。 DHFU は Chaudhuri ら<sup>67)</sup>の方法では、ほとんど見出されなかったが、著者の方法を用いることで、多量に検出することができた。 HCFU, HHCFU, OHCFU や CPEFU は検出されなかった。尿中に見出された4化

合物; CPRFU, FU, DHFU 及び FBAL を n-propanol/ ぎ酸 (10:1) で展開すると, 各々の R<sub>f</sub> は 0.88, 0.79, 0.33 及び 0.09 であり, 一次元で充分分離可能であった。そこで, この方法を用いて, 代謝産物の排泄動態を検討した。

<sup>14</sup>C-HCFU 投与時の主代謝産物は FU であった。HCFU の側鎖の β-酸化体である CPRFU は, <sup>14</sup>C-HCFU 投与 0~4 時間尿で検出されたが, それ以後の試料では検出されなかった (Fig. III-13)。HCFU 由来 FU は 48 時間までかなりの量が排泄された。

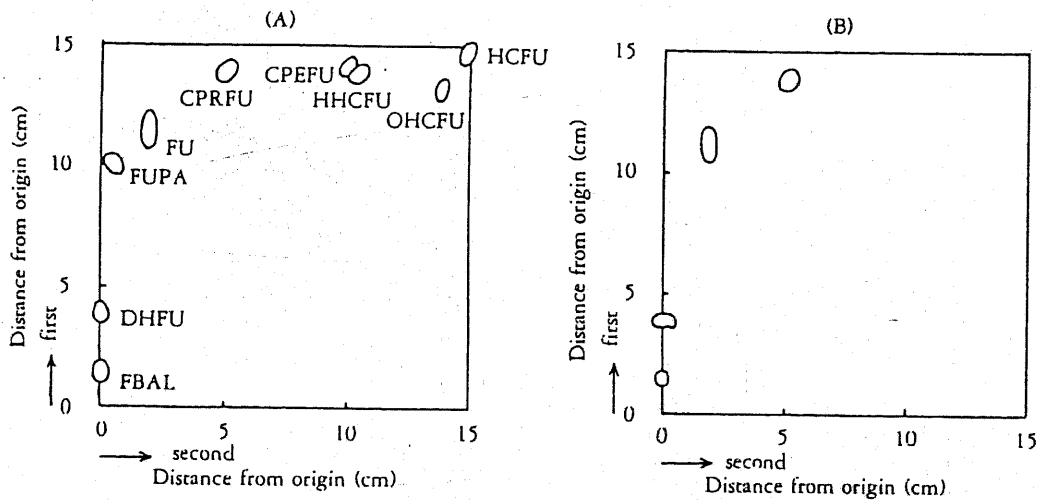


Fig. III-14. Two Dimensional Thin-Layer Chromatograms of Authentic Samples (A) and Metabolites of <sup>14</sup>C-HCFU in Urine (B)

これらの結果から、HCFU の消化管からの吸収は急速であり、4時間以内にほとんど吸収されるものと思われる。

DHFU は徐々に FBAL にまで代謝され、両者とも尿中に長時間見出された。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時には、投与後4時間までに、FU 自体が投与量の約4%排泄され、その後はほとんど検出できなかった (Fig. III-13)。 $^{14}\text{C}$ -FU 投与では、尿中に多量の DHFU が検出され、4時間までに投与量の約40%に達した。FBAL は48時間まで徐々に排泄された。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の尿中総放射能排泄量は  $^{14}\text{C}$ -FU のそれとほぼ同じであったが、不活性代謝産物の量が大きく異なっていた。つまり、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与時には、48時間までに尿中排泄されたものは、投与量の22%が FU、20%が DHFU、24%が FBAL であった。 $^{14}\text{C}$ -FU では5%が FU、58%が DHFU、20%が FBAL であった。このように、HCFU の方が FU として排泄される量が多く、かつ DHFU や FBAL が少ないことから、アルキルカルバモイル側鎖は FU の“マスク型”として FU の環開裂を防いでいることが明らかになった。

### $^{14}\text{C}$ -HCFU の代謝産物の排泄パターン

著者は先に  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU が投与4時間以内に消化管から吸収される可能性を述べたが、更にこの時間を細分し、初期に於ける代謝・排泄パターンの変化を調べた。メタボリズム ケージで自然排尿を待つのでは、初期尿を集めることは不可能であるため、腹部を15分ごとに圧迫し、排尿させる方法をとった。尿量は少ないため、塩化ビニールシート上に集め、マイクロピペットで量を測定した。その結果は、Table III-5 に示すように、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与30分以内の主代謝産物は FU

であり、続いて CPRFU であった。この2化合物はその後4時間まで徐々に割合は少なくなっていた。

DHFU は徐々に増加し、FBAL は30分後から検出された。

$^{14}\text{C}$ -FU 投与15分で FU それ自体が30%、DHFU が60%であり、FU は時間と共にその比率が減少し、1~2時間尿以後では検出できなかつた。一方、FBAL は逆に時間と共にその割合が増していった。DHFU は2時間まで、ほぼ一定でその後徐々にその割合が減っていった。これらの結果は血漿中 FU の変化とよく一致した。また、自然排尿と強制排尿パターンは、HCFU では変わりなかつたが、FU 投与時には強制排尿により4時間までに100%排泄された。

Table III-5. Urinary Metabolites of  $^{14}\text{C}$ -HCFU and  $^{14}\text{C}$ -FU

	Time interval <sup>a)</sup> (h)	Excretion <sup>b)</sup> (% of dose)	Ratio of metabolites (%)			
			FBAL	DHFU	FU	CPRFU
HCFU	0 - 1/4	3.0 ± 0.9	0	6	58	36
	1/4 - 1/2	8.2 ± 4.6	0	11	46	43
	1/2 - 1	11.6 ± 5.0	6	33	37	24
	1 - 2	18.1 ± 3.5	16	40	29	14
	2 - 3	9.4 ± 3.1	37	32	21	10
FU	3 - 4	3.9 ± 0.9	44	30	19	7
	0 - 1/4	8.4 ± 0.3	5	63	32	—
	1/4 - 1/2	25.9 ± 10.6	14	62	24	—
	1/2 - 1	27.4 ± 7.1	38	61	1	—
	1 - 2	24.0 ± 2.1	37	63	0	—
	2 - 3	8.4 ± 4.2	46	54	0	—
	3 - 4	5.9 ± 1.2	55	45	0	—

a) Mice were given p.o. administration of  $^{14}\text{C}$ -HCFU (123.5  $\mu\text{Ci}/50\text{ mg/kg}$ ) or  $^{14}\text{C}$ -FU (105.0  $\mu\text{Ci}/50\text{ mg/kg}$ ) at 0 h. Urine was collected at various intervals and the metabolites were separated by thin-layer chromatography as described in Materials and Methods.

b) Each value represents mean  $\pm$  SD of three mice.

消化管からの<sup>14</sup>C-HCFUまたは<sup>14</sup>C-FUの吸収 消化管  
 からの<sup>14</sup>C-HCFU及び<sup>14</sup>C-FUの吸収を検討するために、消化管を五部分(胃, 十二指腸, 小腸, 大腸及び盲腸)に分け、その各々に残存する内容物に含まれている放射能を測定した。その結果はTable III-6に示す。

<sup>14</sup>C-HCFU又は<sup>14</sup>C-FUは投与後60分以内に約90%吸収された。<sup>14</sup>C-HCFU投与5分後の放射能の大部分は胃にあつた。180分後には、投与量の約5%が残存していた。

一方<sup>14</sup>C-FU投与時には、5分後に十二指腸と胃に放射能の大部分が存在していた。その後急速に消失し、180分後には、消化管全体で投与量の約3%が見出されたにすぎなかった。小腸, 大腸, 盲腸ではほとんど検出されず、小腸上部で、ほとんど吸収されるものと思われる。<sup>14</sup>C-HCFU投与後の消化管内放射能は90%以上がHCFUであり、すぐにFUに変化することはなかった。このことは薄層クロマトグラフィーによって確認した。

Table. III-6. Radioactivity in Contents of Gastrointestinal Tract after Oral Administration of<sup>14</sup>C-HCFU or <sup>14</sup>C-FU

Part	Radioactivity (% of dose)				
	5 min	15 min	30 min	60 min	180 min
HCFU Total	73.5	59.1	20.2	10.8	8.2
Stomach	58.0	49.1	18.2	9.3	7.6
Duodenum	10.7	8.7	0.4	0.5	0.3
Small intestine	4.2	0.7	0.9	0.5	0.1
Large intestine	0.4	0.4	0.4	0.3	0.1
Caecum	0.2	0.2	0.3	0.2	0.1
FU Total	50.1	29.8	18.9	11.3	2.9
Stomach	22.0	23.4	16.1	7.8	1.7
Duodenum	25.6	3.3	1.8	1.6	0.4
Small intestine	1.7	2.7	0.7	1.4	0.5
Large intestine	0.6	0.2	0.2	0.3	0.2
Caecum	0.2	0.2	0.1	0.2	0.1

Mice were given p.o. administration of<sup>14</sup>C-HCFU (123.5  $\mu$  Ci/50 mg/kg) or<sup>14</sup>C-FU (105.0  $\mu$  Ci/50 mg/kg) at 0 h. Each content of the sections was homogenized with 1% HCl-methanol and radioactivities in aliquots were counted. Two mice in each group were used.

## 考察

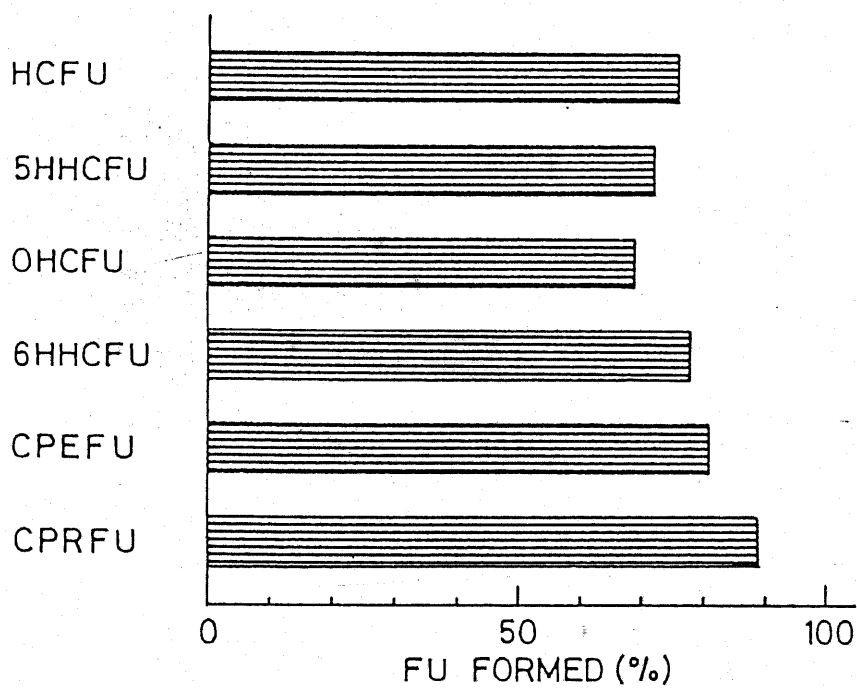
HCFU, FUとも経口投与後, 急速に十二指腸や小腸上部から吸収され, 肝を經由して体内に分布するものと思われる。その際 FU は dihydrouracil dehydrogenase<sup>66)</sup> により不活性物質 DHFU に, 更に FUPA, FGPA 及び FBAL になることが知られている<sup>67)</sup>。FU の静脈内及び経口投与に於ける代謝の違いは, 宍田ら<sup>61)</sup>により報告され, 経口投与時の方が, 不活性代謝産物が多いといわれている。一方, HCFU は経口投与後 HCFU それ自体の形で大部分腸から吸収され, 肝及び腎で側鎖のアルキル基が酸化され, HHCFU, OHCFU, CPEFU<sup>68)</sup> 及び CPRFU となり, 血漿中に入り, 体内に分布し, 長時間どまり, 徐々に活性体としての FU を放出していた。

HCFU 及びその関連代謝産物は pH 7.4 のリン酸緩衝液中 37°C 30 分間でほとんど FU に変換される (約 80%) (Fig. III-15) が, それらに肝ホモジネートを加えると幾分 FU への変換は抑えられた (約 50%) (Fig. III-16)。このことは, FU への変換が酵素的なものではないことを示している。<sup>14</sup>C-HCFU 投与時に FU の排泄が多いが, この一部は腎や尿中で自然に FU になったものと考えられる。FU の尿中代謝産物として FUPA が多量検出されることが報告されているが<sup>67)</sup> これは過塩素酸抽出後, 水酸化カリウム溶液で pH 11 に調整したために, DHFU が FUPA に変化したものと思われる。

肝や腎など臓器内には FUPA が多量に検出されたが, 血漿や尿では検出されなかった (Fig. III-17)。更に, FGPA は全く検出できなかった。

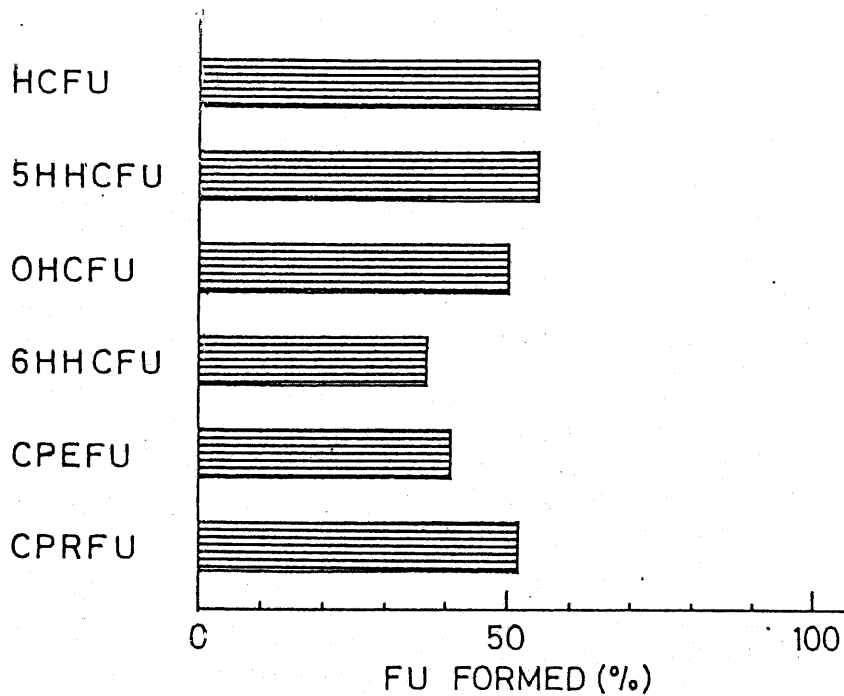
肝で酸化的代謝を受けた HHCFU, OHCFU, CPEFU は, HCFU 同様, 水に難溶であり, 血漿中に存在するにもかかわらず, 尿中へは排泄されなかった。





37°, 30 min, pH 7.4  
5  $\mu$ mol/3 ml (20% DMSO)

Fig. III-15. Decomposition of HCFU derivatives in phosphate buffer solution (pH 7.4)



37° 30 min pH 7.4  
 5 μmol/3 ml (20% DMSO + 20mg Liver)

Fig. III-16. Decomposition of HCFU derivatives in phosphate buffer solution added liver whole homogenate

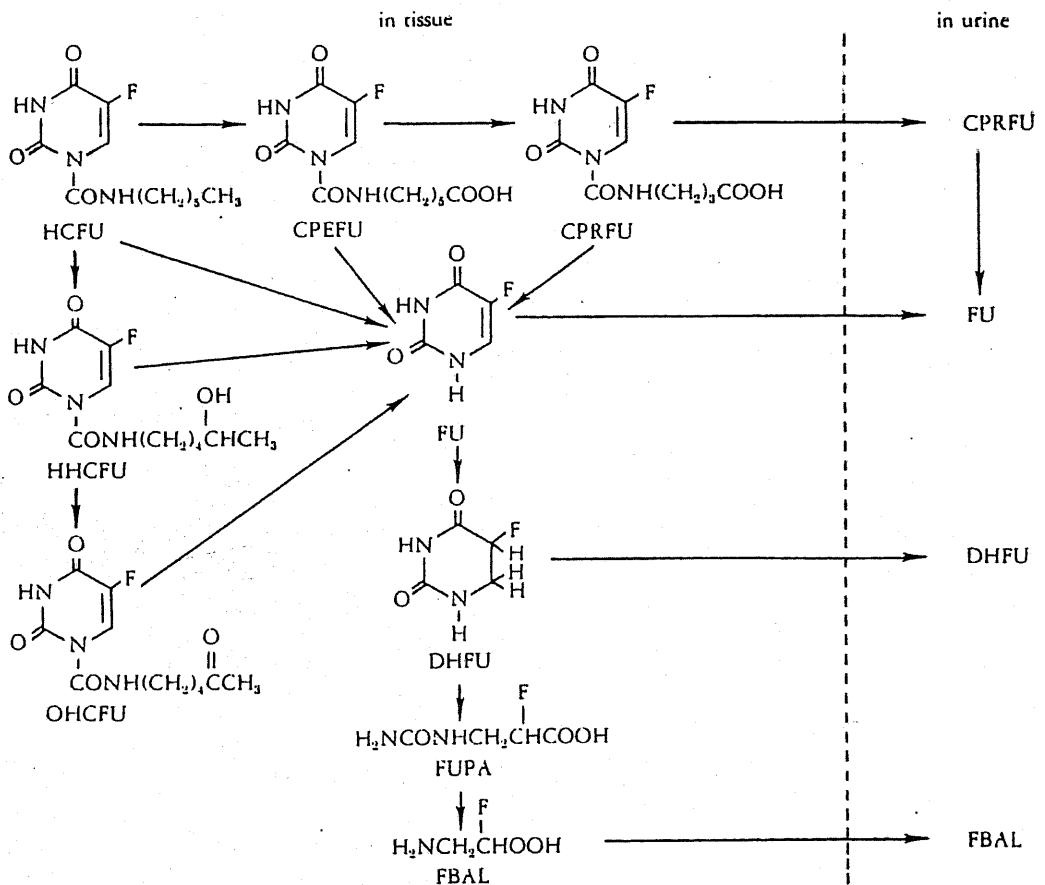


Fig. III-17. Possible Metabolic Pathways of HCFU

しかし、更に $\beta$ -酸化を受けた CPRFU 及び FU は水に可溶性であり、尿中への排泄が認められた。CPRFU が更に $\beta$ -酸化を受けたグリシン体は検出できなかった。ラットの尿中排泄、代謝産物は CPRFU (14%)、CPEFU (9%)、FU (55%) などであり<sup>75)</sup>、( $\omega$ -1)-酸化体である HHCFU や OHCFU は、マウスの尿中と同様、検出されなかった。マウスとラットの尿中代謝産物の大きな違いは CPEFU の存在であった。

## 第IV章 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilの腫瘍組織内分布と代謝産物

第三章で HCFU を投与すると、HCFU、HCFU の中間代謝産物及びそれらから生じた FU が、FU そのものを投与した時と比べ、高濃度、長時間血漿中に存在した。更にラット<sup>75)</sup> やヒト<sup>81,82)</sup> に於ても、HCFU の代謝産物である  $\omega$ -酸化体と  $(\omega-1)$ -酸化体の比率に差はみられたが、同様に FU 濃度の持続がみられた。しかも、肝で、HCFU は代謝されにくく安定であった。また、小腸壁中の FU は、FU 投与時のそれと比べ、かなり少ないことが明らかになった。これらのことが、抗腫瘍効果、及び宿主への毒性に大きく影響しているものと思われる。

この章では、HCFU の抗腫瘍効果を直接証明するため HCFU の腫瘍組織に於ける分布及び代謝産物について検討した。

## 第1節 腹水型腫瘍 Sarcoma 180 における I-Hexyl-carbamoyl-5-fluorouracil の分布と代謝産物

HCFU の正常マウスにおける体内分布と代謝産物は第III章で述べたが、抗腫瘍効果を直接証明するためには担がんマウスでの分布と代謝を知る必要がある。この節では、 $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の sarcoma 180 腫瘍細胞及び腹水への分布と代謝産物について検討した。

### 材料と方法

化合物  $^{14}\text{C}$ -HCFU,  $^{14}\text{C}$ -FU, HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, FUR, FUDR, FUMP, FdUMP, DHFU, FUPA 及び FBAL を用い、試薬は市販特級品を用いた。

動物 ddN 雌マウスの約 20g (日本クレア) を用いた。

$^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物の分析 腹水型 Sarcoma 180 細胞  $1 \times 10^7$  個を腹腔内に移植した 7 日目のマウス (体重は 27~30g) を用いた。  $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU は 0.5% CMC に懸濁し、両者ともに 50 mg/kg (各々 3.7 及び 3.2  $\mu\text{Ci}$ /マウス) を経口投与した。決められた時間に ether 麻醉下、腋窩動静脈から採血し、殺した。血液はヘパリン処理した注射筒内にゆくり吸引し集めた。血漿は遠心分離 (3000 rpm, 10分) した。その血漿の一部を Soluene 350 (Packard, USA) で溶解し、9 ml のシンチレーターを加え、放射能を液体シンチレーション・スペクトロメーターで測定した。残りの血漿は、2倍量の塩酸-methanol (1:100) を加え、生じたタンパクの沈澱物を遠心 (3000 rpm, 10分) で取り除いた。塩酸-methanol (1:100) で抽出された代謝産物

は螢光剤入シリカゲル薄層クロマトグラフィー (TLC) にて分離した。展開溶媒は、主に chloroform/phenol/methanol/水 (70:30:30:3) の溶媒を用いた。各代謝産物のRf値は Table III-4 に示してある。更に DHFU 及び OCHFU を定量するために、n-propanol/ 酢酸 (10:1) 及び chloroform/methanol/ 酢酸 (100:10:1) を、各々用いた。

腹水液は遠心 (3000 r.p.m., 10分) で、腫瘍細胞と分離した。腹水液と腫瘍細胞の一定量は Soluene 350 の /ml に溶解し、液体シンチレーション・スペクトロメーターで総放射能を測定した。残った腹水液に塩酸-methanol (1:100) の2倍量を加えた。その際生じた沈澱物は遠心して除いた。その上清は 30°C で減圧濃縮した。その一部を血漿の場合と同じ方法により TLC で代謝産物を分離した。

腫瘍細胞は、5倍量の塩酸-methanol (1:100) でホモジナイズし、遠心して沈澱物を除いた。沈澱物は更に5倍量の塩酸-methanol (1:100) で、再度、ホモジナイズし、遠心分離した。その上清を合せ、その一部は総放射能を測定するために使った。塩酸-methanol (1:100) で抽出した代謝産物は TLC で、血漿の場合と同様に検討した。更に、塩酸-methanol 不溶物は 0.2M 過塩素酸の5倍量で2回抽出した。抽出した過塩素酸液は合せ、水酸化カリウムで pH 11 に調整した。この抽出液の放射能の大部分が FU のヌクレオチド類によるものであった。ヌクレオチドの分離には Chaudhuri ら<sup>(7)</sup> の段階的溶出法により、Dowex 1 - 酢酸型 アニオン交換樹脂 (0.5 cm x 12 cm) を用いた。調製された試料は、カラムに吸着させ、水、0.05M (FU, FUR), 1.5M (FUPA), 2.5M 酢酸 (FUMP) 及び 0.5M 塩酸 (FUDP, FUTP) の順に各 30 ml で溶出した。各分画の一部を放射能測定のため使用した。

## 結果

担がんマウスに於ける血漿中  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物 HCFU 投与後の担がんマウスでの代謝を検討するため、まず血漿中代謝産物を調べた。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の血漿中代謝産物として、HHCPU, CPRFU, FU, DHFU 及び FBAL が見出されたが、OHCPU は無視できる量であった (Fig. IV-1)。特に  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与30分後の血漿中代謝産物のパターンを、正常マウスのそれと対比して、Fig. IV-2 に示した。正常マウス血漿中と比べ、FU, HHCPU 及び FU の不活性代謝産物である DHFU や FBAL の生成が少なかった。

$^{14}\text{C}$ -HCFU は胃腸から速やかに、そのままの形で吸収され血漿中に長時間持続した (Fig. IV-3)。FU 量は  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU 経口投与後、各々30及び15分で最高に達し、各々の濃度は、 $3.3 \pm 0.8$  (SD) 及び  $22.0 \pm 2.2$  (SD)  $\mu\text{g/ml}$  であった。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の FU の半減期は初期の速い部分では70分、時間がたった遅い部分で5時間であった。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の FU の半減期は6分であった。 $^{14}\text{C}$ -FU は急速に DHFU や FBAL に代謝され、これらの不活性物質は長時間持続した。しかし、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の不活性代謝産物は血漿中には少なかった。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 経口投与後30分で、DHFU と FBAL を除いて、最高濃度に達し、その後、時間と共に徐々に減少した。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の血漿中 FU 濃度は15分で最高となり、その後、減少していた。DHFU と FBAL は長時間血漿中に存在した。



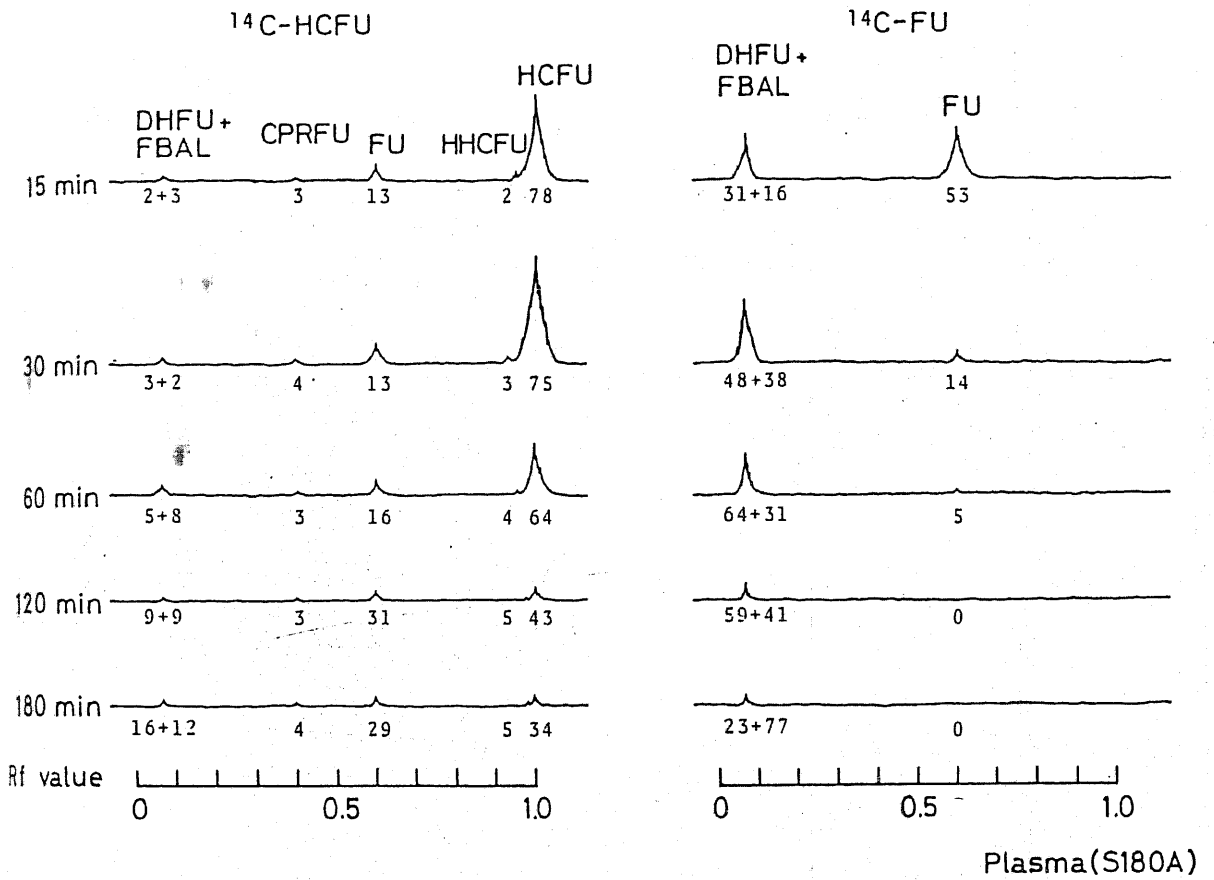


Fig. IV-1. Radiochromatograms of metabolites of <sup>14</sup>C-HCFU and <sup>14</sup>C-FU in plasma of S180A bearing mice

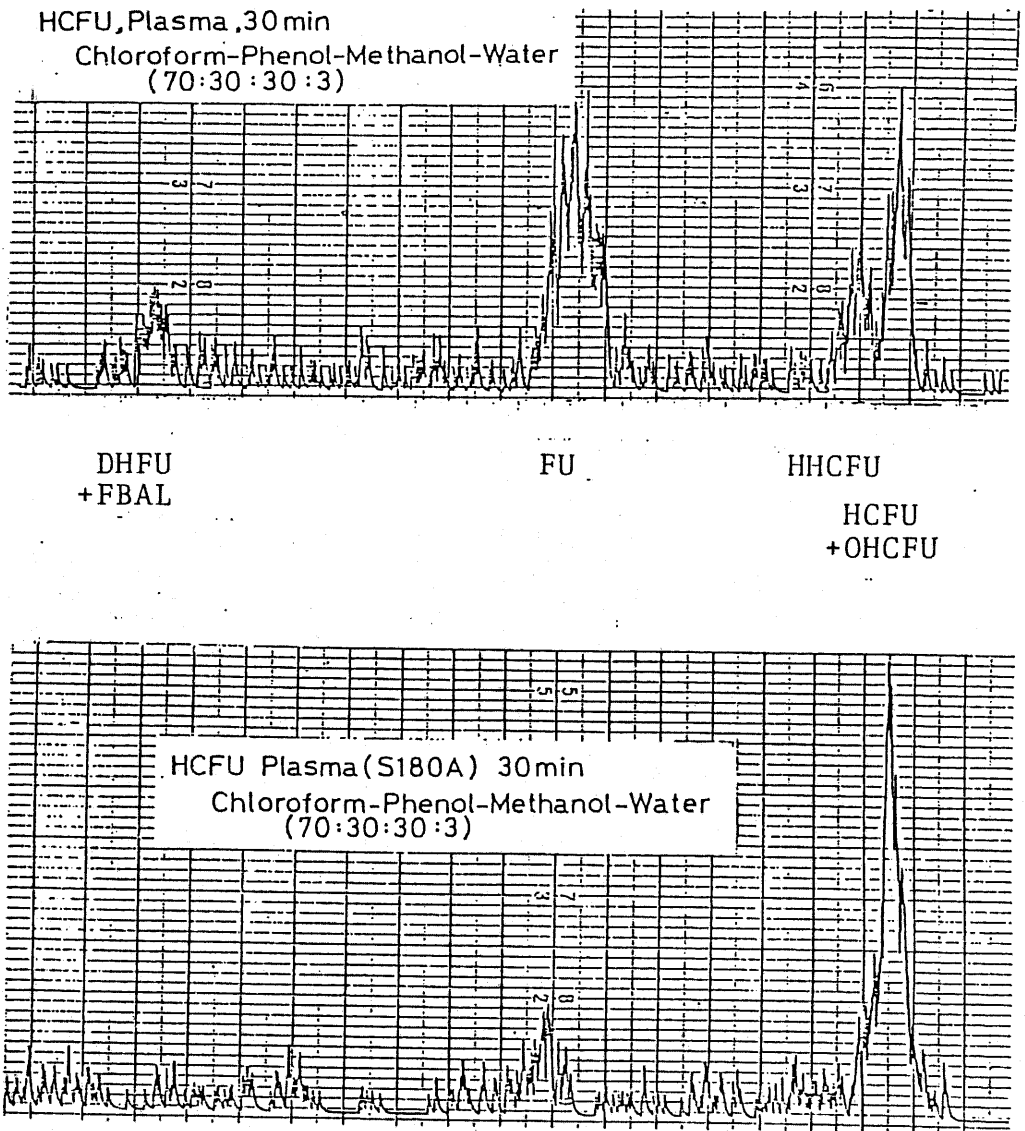


Fig. IV-2. Radiochromatograms of metabolites of HCFU in plasma of normal or tumor bearing mice

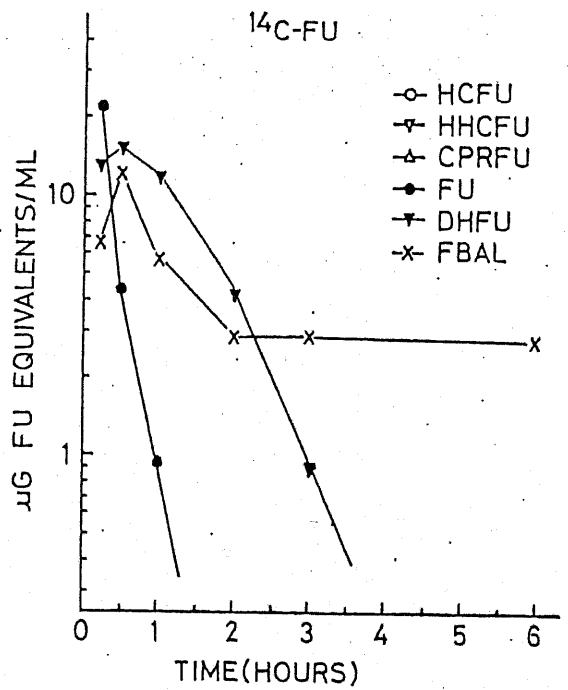
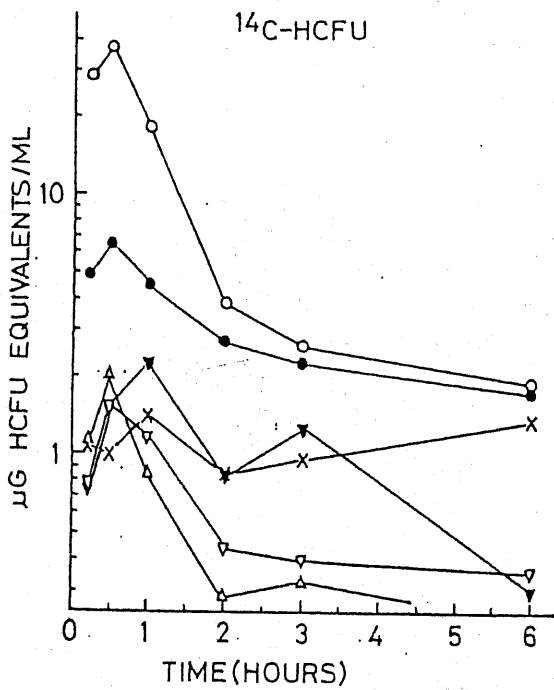


Fig. IV-3. Time course of metabolites in plasma of mice after oral administration of <sup>14</sup>C-HCFU or <sup>14</sup>C-FU

腹水型 Sarcoma 180 の腹水液に於ける  $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物 腹水液中の HCFU 及びその代謝産物を検討した (Fig. IV-4)。HCFU, HHCFU, CPRFU, FU, DHFU 及び FBAL が腹水液中に検出された。OHCFU は微量であった。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の腹水液中の代謝産物のパターンは血漿中のパターンと類似していた。しかし、HHCFU や CPRFU の量は少なかった。CPRFU は、HCFU と同様、30分で最高となり、HCFU 由来 FU 及び DHFU は1時間で最高に達し、HHCFU と FBAL は各々2及び3時間で最高に達した。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の腹水中代謝産物のパターンは血漿中のそれと異なっていた。FU 自体が長時間持続し、投与後6時間でも検出できた。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU 投与後の FU の最高濃度は  $3.9 \pm 1.2$  (SD) と  $16.5 \pm 4.9$  (SD)  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。これらのことは、HCFU や FU が血液-腹水関門を容易に通過できることを示している。

Sarcoma 180 腫瘍細胞中の  $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物 ヌクレオチド類は塩酸-methanol では抽出されず、0.2 M 過塩素酸で抽出できた。Sarcoma 180 腫瘍細胞中の放射能は、塩酸-methanol で約40%、過塩素酸で約50%が抽出された。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の腫瘍細胞中代謝産物のパターンと濃度は血漿中や腹水液中のそれらとは異なっていた (Fig. IV-5)。未変化 HCFU は少量検出されたが、HHCFU は全く検出されなかった。腫瘍細胞中に於ける2時間後の HCFU 濃度は腹水中の約  $1/6$ 、血漿中の  $1/11$  であり、FU 濃度は腹水中の  $1/2$ 、血漿中の  $2/3$  であった。このように HCFU 濃度は腹水中と比べ非常に低く、FU 濃度は腹水中や血漿中濃度に近かった。

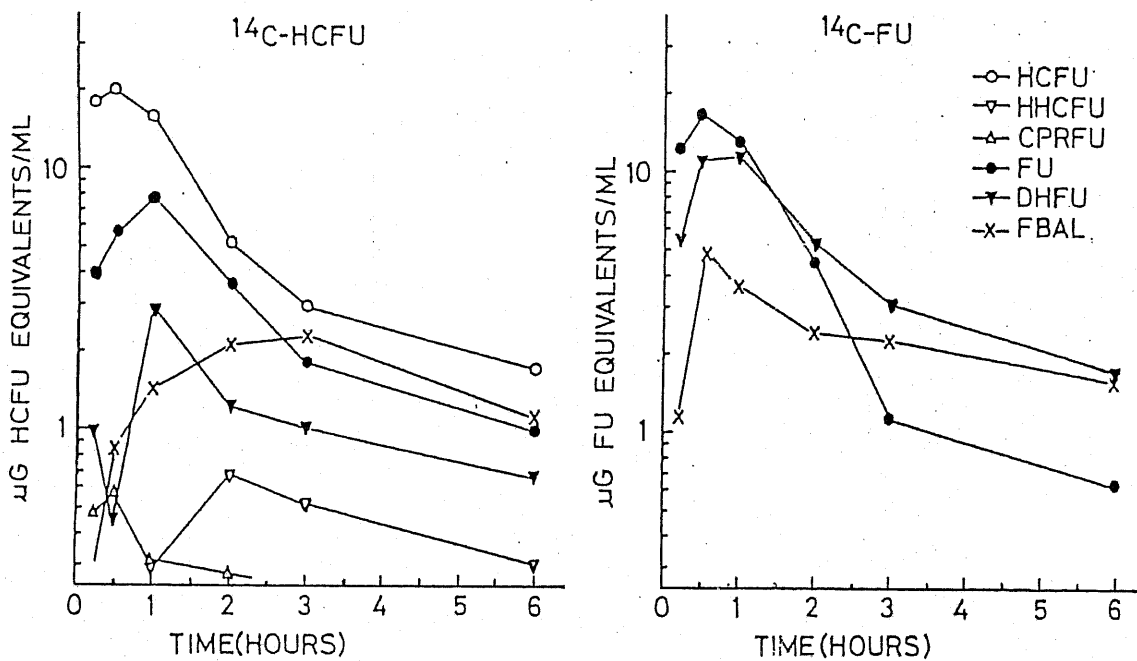


Fig. IV-4. Time course of metabolites in ascitic fluid of mice after oral administration of  $^{14}\text{C-HCFU}$  or  $^{14}\text{C-FU}$

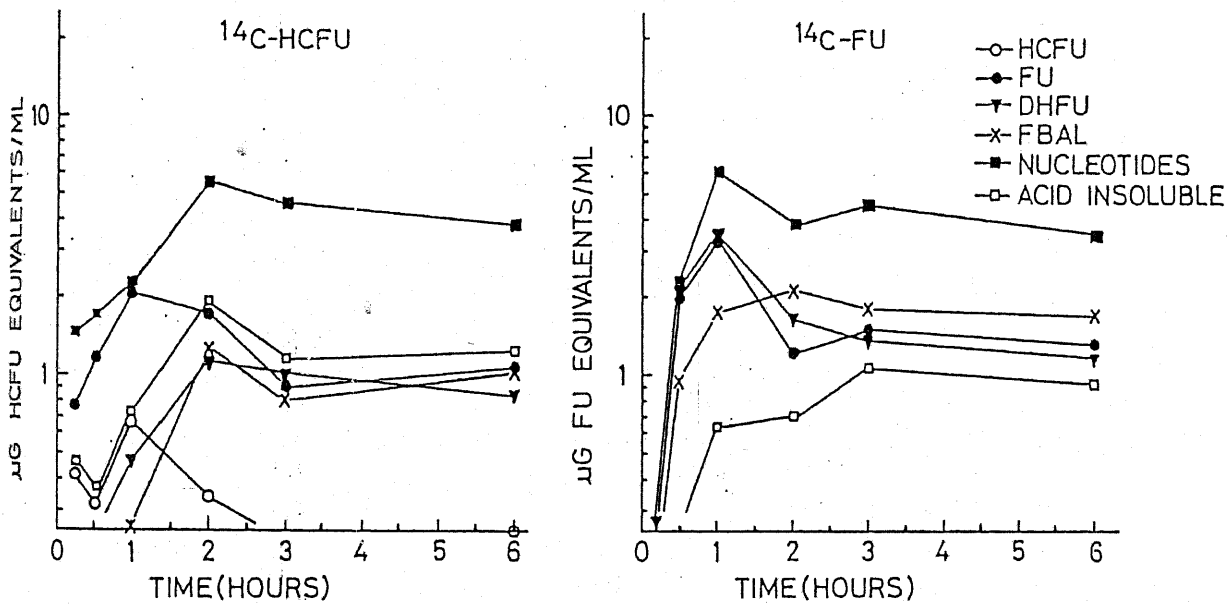


Fig. IV-5. Time course of metabolites in sarcoma 180 cells of mice after oral administration of  $^{14}\text{C}$ -HCFU or  $^{14}\text{C}$ -FU

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与/時間後の FU 濃度は腹水中の  $\frac{3}{5}$ 、  
血漿中のそれの  $\frac{1}{2}$  倍であり、このように FU は腫瘍内に高  
濃度長時間残存していた。腫瘍細胞中の放射化合物で  
最も多いものは、FU のヌクレオチド類であった。これを  
Chaudhuri らの方法<sup>67)</sup>で分画してみると、総ヌクレオチドの 10  
~20% が FUMP で、残りは FUDP 及び FUTP 分画であり、  
 $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU にパターンの差はなかった。

## 考察

腹水型 sarcoma 180 担がんマウスに於ける、HCFU の代  
謝産物とその動態を調べたところ、HCFU や OHCFU などの  
代謝産物が、正常マウスと比べ、有意に減少していること  
を見出した。これら  $\omega$ -1)-酸化体は主に肝ミクロソーム  
分画の薬物代謝酵素が関与し、NADPH から P450 を介し  
て、酸化されることが知られている<sup>68)</sup>。  $\omega$ -酸化も薬物代  
謝酵素によって行なわれるが、 $\omega$ -1)-酸化に関与する酵素  
との違いについては、まだはっきりしていない<sup>64)</sup>。  $\omega$ -酸化  
を受けた化合物はただちに alcohol dehydrogenase 更に  
aldehyde dehydrogenase (いずれも肝可溶性分画)によって  
カルボン酸まで酸化される<sup>63)</sup>。一般に薬物代謝は  
動物の種、系統によって代謝経路<sup>65)</sup>や代謝速度<sup>66,67)</sup>  
が異なることが知られているし、HCFU でも動物種によ  
る中間代謝産物の違いが報告されている<sup>74~76)</sup>。  
担がんマウスで正常マウスより  $\omega$ -1)-酸化体が減少して  
いたことは、肝機能の低下によるものと考えられる。cyclo-  
phosphamide の代謝に於ても、腫瘍移植後の日数と  
共に代謝機能の低下が報告されている<sup>36)</sup>。HCFU の  
代謝産物である CPRFU は、 $\omega$ -酸化されてできた CPEFU が  
更に  $\beta$ -酸化されてきたものであるが、担がん動物で若

干増加しており、このことは ( $\omega$ -1)-酸化酵素と  $\omega$ -酸化酵素が異なることを示唆している。FU の代謝に於ても、担がんマウスの方が、正常マウスに比べ低下しており、FU は正常マウスに比較し、担がんマウスで血漿中に長時間とどまっていた。

$^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の腹水液中にも、HCFU 及び FU の形で存在し、その経時的変化は血漿中のそれらと似ていた。HCFU 由来の FU は長時間にわたり検出された。HCFU は腹水中に多量に分布したが、sarcoma 180 腹水腫瘍細胞には少量しか取込まれていなかった。しかし、腫瘍細胞内 FU 濃度は、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与と同様、高濃度で長時間持続した。

腫瘍内ヌクレオチド濃度は、特に FU の抗腫瘍効果と関係が深いと言われている。<sup>88)</sup> 著者の実験に於て、ヌクレオチド量は  $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU でほぼ同じであった。更に FUUMP と FUUDP + FUTP とに分けてみたが、差は見出されなかった。

$^{14}\text{C}$ -HCFU 投与後の酸不溶分画の放射能は  $^{14}\text{C}$ -FU 投与後のそれより多く、ほとんどが (97%以上) RNA に起因していた。RNA に取込まれた FU 量と抗腫瘍効果との相関も、多くの報告が出されているが、<sup>89~94)</sup> まだ確定したとは言いきれない。

一方、 $^{14}\text{C}$ -formate を用いた実験で<sup>95)</sup>、FU が deoxy-uridine を増加させること、 $^3\text{H}$ deoxyuridine の DNA への取込阻害と  $^3\text{H}$ TdR の DNA への取込増加<sup>96,97)</sup> などから thymidylate synthetase の阻害が考えられている。この酵素阻害に関与する可能性の強いヌクレオチドは FUUMP である<sup>98-100)</sup>。FUUMP は thymidylate synthetase と結合し、(Fig. IV-6,7)<sup>101~107)</sup>、酸不溶分画に取込まれているものと思われるが、この FUUMP は今回の実験に於ては少量で測定できなかった。



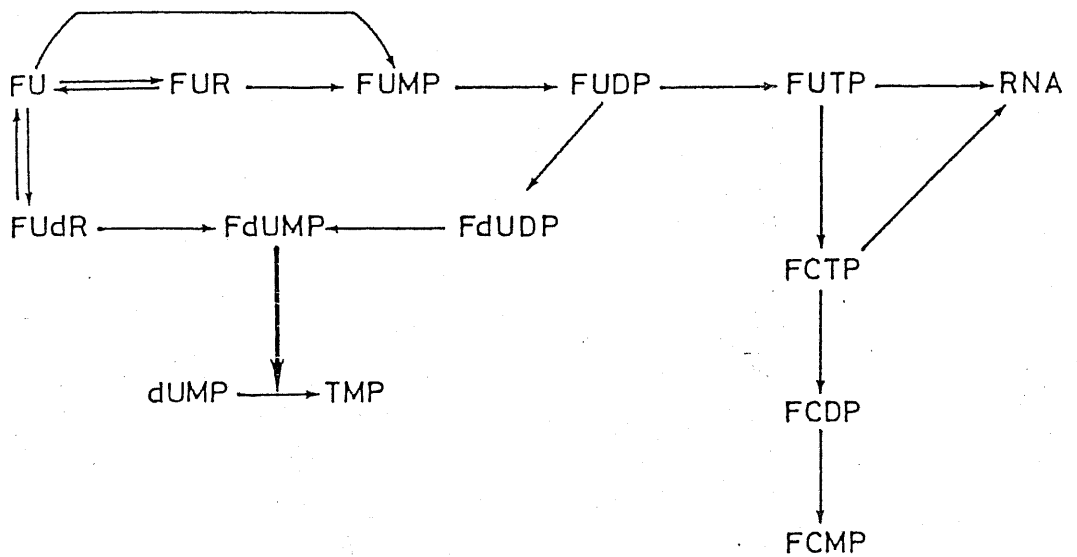


Fig. IV-6.  
Anabolic metabolism of FU

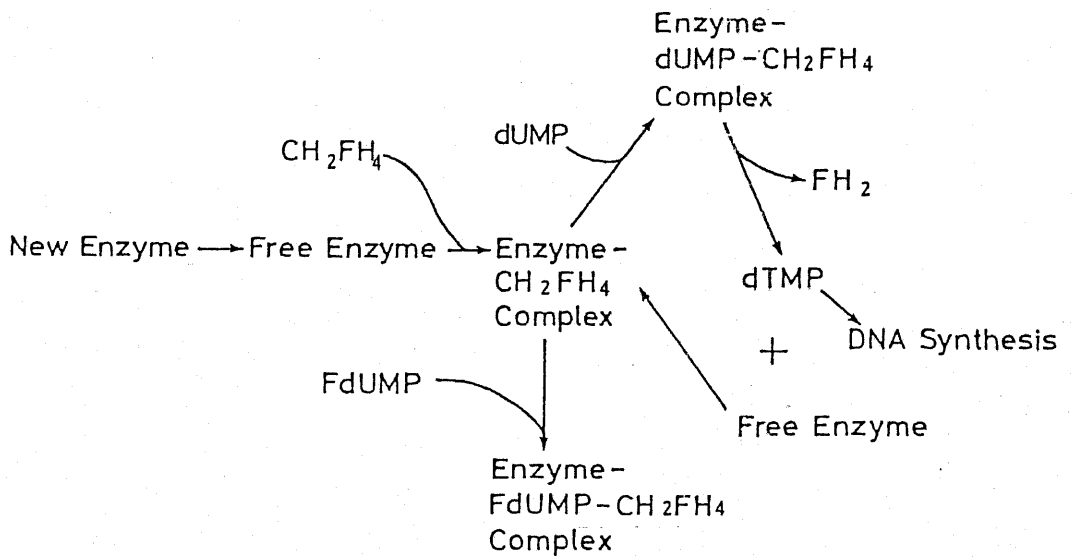


Fig. IV-7.  
Reaction of FdUMP and thymidilate synthetase

抗腫瘍効果を説明する作用点、がFUのヌクレオチドによるRNA阻害と thymidylate synthetase 阻害によるDNA合成阻害のどちらが主であるか、はっきりしないが、それらのもとになるFU 更にFUのヌクレオチド量が重要なことは確実である。FUのヌクレオチドは $^{14}\text{C}$ -HCFUと $^{14}\text{C}$ -FUで同程度生成されている。更にHCFUの方が低毒性であり、治療のためには、FUより多量投与可能なことから、HCFUの方が、より強い抗腫瘍効果を示したものと考えられる。

## 第2節 各種固型腫瘍における1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracilの分布と代謝産物

第1節では腹水腫瘍への $^{14}\text{C}$ -HCFU及び $^{14}\text{C}$ -FUの取込を述べたが、この節では各種固型腫瘍におけるHCFUの分布と代謝産物について述べたい。固型腫瘍の中には、次に述べるごとく、HCFUが非常によく効く腫瘍 Ridgway 骨肉腫 (ROS), ある程度効く腫瘍 adenocarcinoma 755 (Ca755) 及び Lewis 肺がん (LL), 全く効かない腫瘍 B16 melanoma (B16) 及び Glioma 26 (G26) がある。そこで、これらの腫瘍への $^{14}\text{C}$ -HCFUの分布と代謝産物を検討した。対照としてFUが抗腫瘍効果を示さないCa755への $^{14}\text{C}$ -FUの取込及び代謝産物を調べた。

### 材料と方法

化合物  $^{14}\text{C}$ -HCFU (3.1  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ),  $^{14}\text{C}$ -FU (4.7  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ ), HCFU, HHCFU, OHCFU, CPEFU, CPRFU, FU, DHFU, FUPA, FBAL, FUMP 及び FdUMP を用いた。試薬はすべて市販特級品を用いた。

動物 BDF<sub>1</sub>雄マウス(約22g)は静岡実馬兎動物農業協同組合から購入した。AKRは自家繁殖したもの(22g,雄)を用いた。

腫瘍の移植及び抗腫瘍効果の測定 ROS 及び G26 は、腫瘍部分を取り出し、細切し、各々100mg及び50mgを移植針で、Ca755 及び B16 は腫瘍部分を細切した後、2倍量の生理食塩水を加え、軽くホモジナイズし、

その0.1mlを、LLは5倍量の生理食塩水を加え、軽くホモジナイズし、 $1 \times 10^5$ 個/マウスの細胞を背部皮下に移植した。各腫瘍とも約10~18日で500mg程度に生長するが、その時点よりHCFU及びFUの投与を始め、週3回4週間経口投与続けた。腫瘍の生長は週2回ノギスを用いて、腫瘍の長径(A)及び短径(B)を計測し、その重量は楕円球として  $W = A \times B^2 / 2$  より算出した。抗腫瘍効果は、薬物投与群の生存日数の中央値を対照群のそれと比較し、生存日数延長率(ILS%)を求めて判定した。B16, LL, Ca755 についての腫瘍の性質等については、先に第I章で述べたので、G26及びROS について簡単に説明する。

**Glioma 26 (G26)** Methylcholanthrene 処理により、C57BL/6 に誘発した腫瘍で immature glial cell である<sup>108, 109)</sup>。移植可能な脳腫瘍は数種類あるが、中でもよく脳内移植による脳腫瘍モデルとして、化学療法剤の試験に用いられている<sup>110, 111)</sup>。皮下移植で化学療法のスクリーニングをすることもあるが、脳内移植の方がヒト脳腫瘍の状態と類似し<sup>112)</sup>、かつ、感受性も似ているため<sup>113)</sup> この系がよく使われる。

**Ridgway 骨肉腫 (ROS)** 1948年 J.H. Burchenal (Sloan-Kettering Memorial Hospital and Tumor Institute, New York) が AKm 雄マウスの骨幹部に自然発生した腫瘍を発見し<sup>114)</sup>、Karnofsky がその技術者 Lois Ridgway にちなんで名付けたものである。細胞は密に集まり、円形の細胞で、はじめは骨形成中心を持っていたが、数回の継代により、骨構造は消失した。この腫瘍は高いアルカリホスファターゼ活性を保ち続けている<sup>115)</sup>。

現在, AKRマウスを用い, 20-25日目の腫瘍から約100mgの切片を取り出し, 皮下に移植針で移植している。各種の抗がん剤に感受性を示すが, 完治することはほとんどない<sup>16)</sup>。

### 血漿中及び腫瘍内 HCFU 及びその代謝産物の抽出と分析

各種腫瘍は約2gになった時点(移植後2-3週後)で<sup>14</sup>C-HCFU 又は<sup>14</sup>C-FUを投与し, 取込実験を行った。1群羊3~5匹を使った。化合物は0.5% CMCに懸濁し, 50mg/kgを経口投与した。マウスは投与後15分, 2及び12時間に麻酔下, 腋窩動静脈切断により採血し, 殺した。血液は速やかに遠心(3000rpm, 10分)し, 血漿を分離し, 一部を総放射能測定のため使用した。血漿50 $\mu$ lをSolvent 350 (Packard, USA)で溶解後, ACS-II (Amersham, USA)シンチレーター9mlを加え, 液体シンチレーションスペクトロメーター (Packard, Model 3320, USA)で測定した。残った血漿に2倍量の塩酸-methanol (1:100, v/v)を加え, 沈澱物を遠心除去後, 薄層クロマトグラフィー(シリカゲル60F<sub>254</sub>, Merck)により代謝産物を分離した。投与12時間後の血漿中代謝産物は放射能が低く, 使用できなかった。薄層クロマトグラフィー(TLC)では, 主にchloroform/phenol/methanol/水 (70:30:30:3) (Fig. III-3), 及びHCFUの中間代謝産物を分けるためchloroform/methanol/酢酸 (100:10:1) (Fig. III-4)を用いて展開した。各々の化合物のRf値はTable III-4に示した。展開後の代謝産物はAloka TLC scannerを使用して検出した。更に各々の代謝産物は, LKB Ultrofilm (LKB Production AB, Bromma, Sweden)を用いたオートラジオグラフィーで単一性を確認した。

腫瘍組織中の代謝産物は次の方法で検討した。各腫瘍を取り出し, 壊死したところを取り除き, 重量を測定した後, 細切し, 10倍量の塩酸-methanol (1:100)を加え,

ポリトロン超高速ホモジナイザー (Kinematica, Switzerland) でホモジナイズした。その後遠心し、上清をとり、沈澱物は再度塩酸-methanol (1:100) でホモジナイズして、遠心後、その上清を初めの上清と合せ、30°C で減圧乾固した。次に、その乾固試料に0.5 ml の methanol を加え溶解、その上清50 $\mu$ l を総放射能測定のために使用した。残りの methanol 抽出液100 $\mu$ l ずつを2枚のプレートにスポットし chloroform/phenol/methanol/水 及び chloroform/methanol /酢酸の系で分離した。その後は血漿で用いたのと同じ方法で測定した。次に塩酸-methanol で抽出できないヌクレオチド類は、0.2M 過塩素酸 (15 ml) で二度抽出した。過塩素酸抽出分画は水酸化カリウムで pH 11 に調整、遠心後、上清を Dowex 1 イオン交換樹脂弱酸性型カラム (1x20 cm) で分画した。分画方法は Hurlbert ら<sup>17)</sup> の方法を一部変えて用いた。更に 1%-塩酸-methanol と 0.2M 過塩素酸に抽出されなかった部分を酸不溶性分画とした。対照としては、<sup>14</sup>C-FU を Ca755 担がんマウスに経口投与し、<sup>14</sup>C-HCFU の場合と同様にその代謝産物の分布をみた。

## 結果

### 各種腫瘍に対するHCFUとFUの抗腫瘍効果

HCFU と FU の一般的な抗腫瘍効果の違いは第I章で述べた。この章では固型腫瘍に於ける抗腫瘍効果と代謝産物との相関を明らかにするため、進行がんに対する最適投与量すなわち、HCFU 200 mg/kg 及び FU 30 mg/kg を週3回々週間経口投与した時の効果を調べた。ROS は HCFU 投与により、腫瘍が触知できなくなる程縮少するが、投与中止後しばらくすると、生長し始める (Fig. IV-9)。

Ca755 は短期間一定の大きさでとどまっていたが、3週程でゆっくり生長し始めた (Fig. IV-10)。LL では若干腫瘍の生長が抑制されただけであった (Fig. IV-11)。B16 や G26 の生長は、ほとんど影響を受けなかった (Fig. IV-12, 13)。

一方、FU 投与は ROS に若干効果があった以外、他のどの腫瘍に対しても、ほとんど影響しなかった。このように HCFU は FU と比べ強い抗腫瘍効果がみられた。しかし、HCFU の感受性は各腫瘍により異なり、効果と代謝産物との関係を検討するよいモデルであることがわかった。

### 各種担がん動物血漿中の<sup>14</sup>C-HCFU及びその代謝産物

Fig. IV-14 に示すように、血漿中総放射能は<sup>14</sup>C-HCFU 投与15分に ROS, Ca755 及び LL 担がんマウスで、正常マウスより高かったが、12時間後には逆にこの三者は正常マウスより低い値を示した。血漿中 HCFU 及びその代謝産物は、各種担がんマウスで、正常マウスと比べて、ほとんど差がみられなかった (Fig. IV-15)。血漿中放射能の大部分は HCFU とその中間代謝産物及び FU であり、不活性代謝産物 (DHFU や FBAL など) は少なかった。

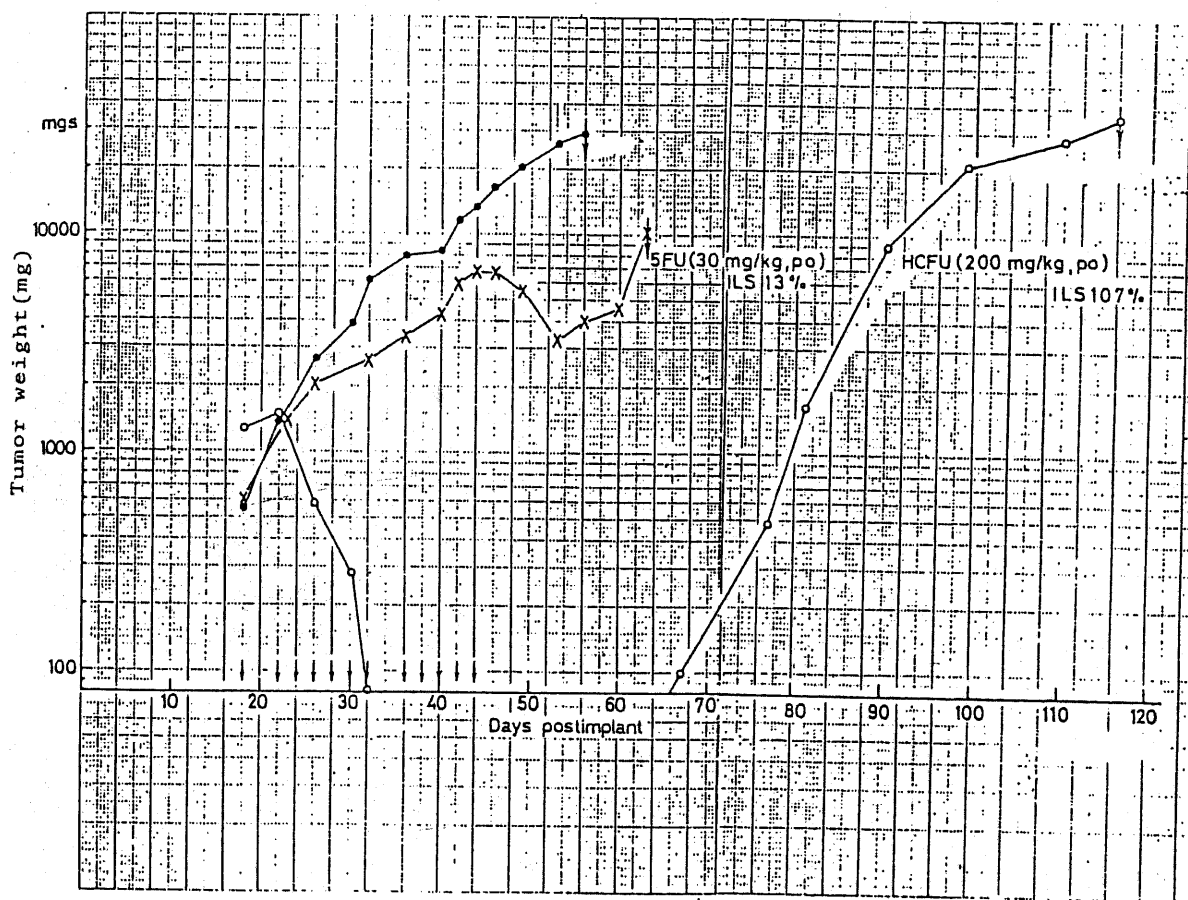


Fig. IV-9. Growth rate of ROS treated with HCFU and FU



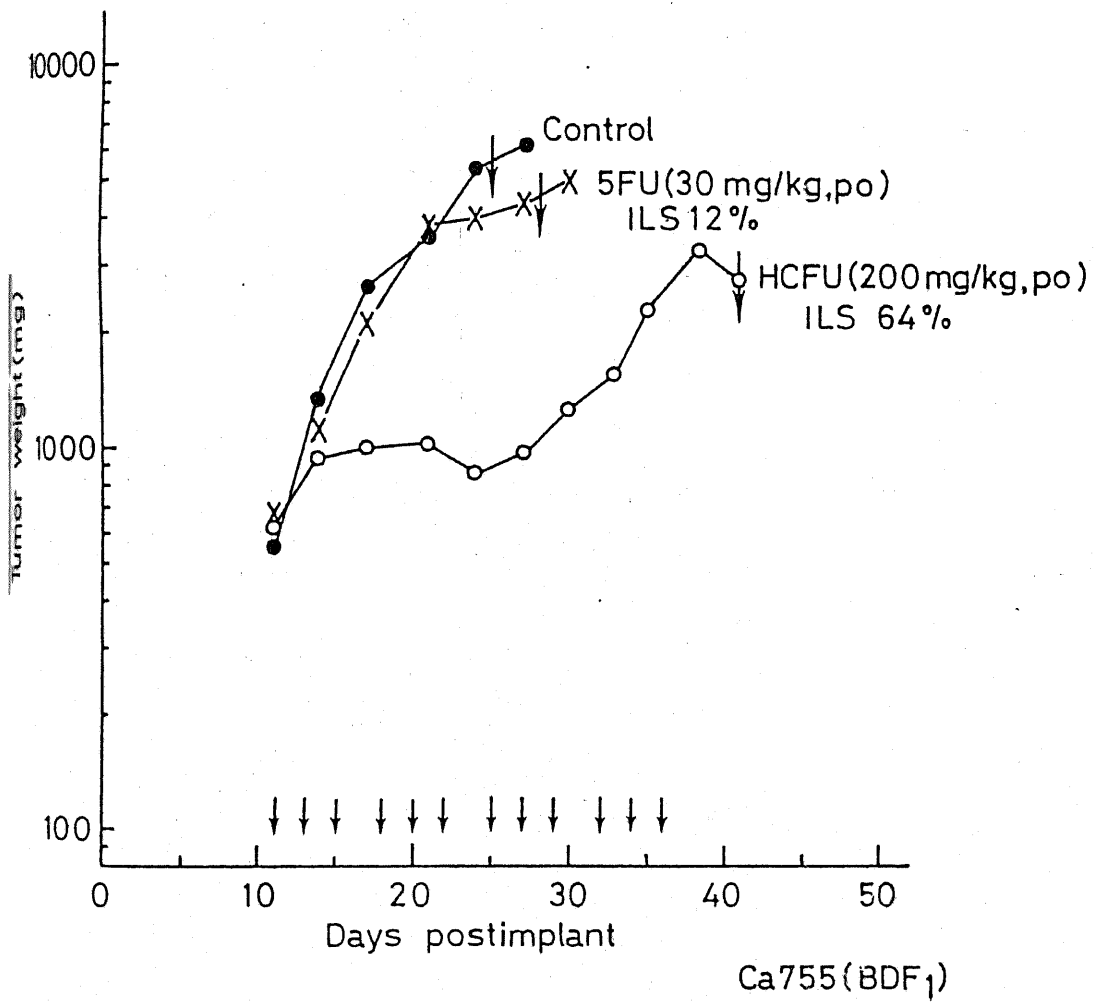


Fig. IV-10. Growth rate of adenocarcinoma 755 treated with HCFU and FU

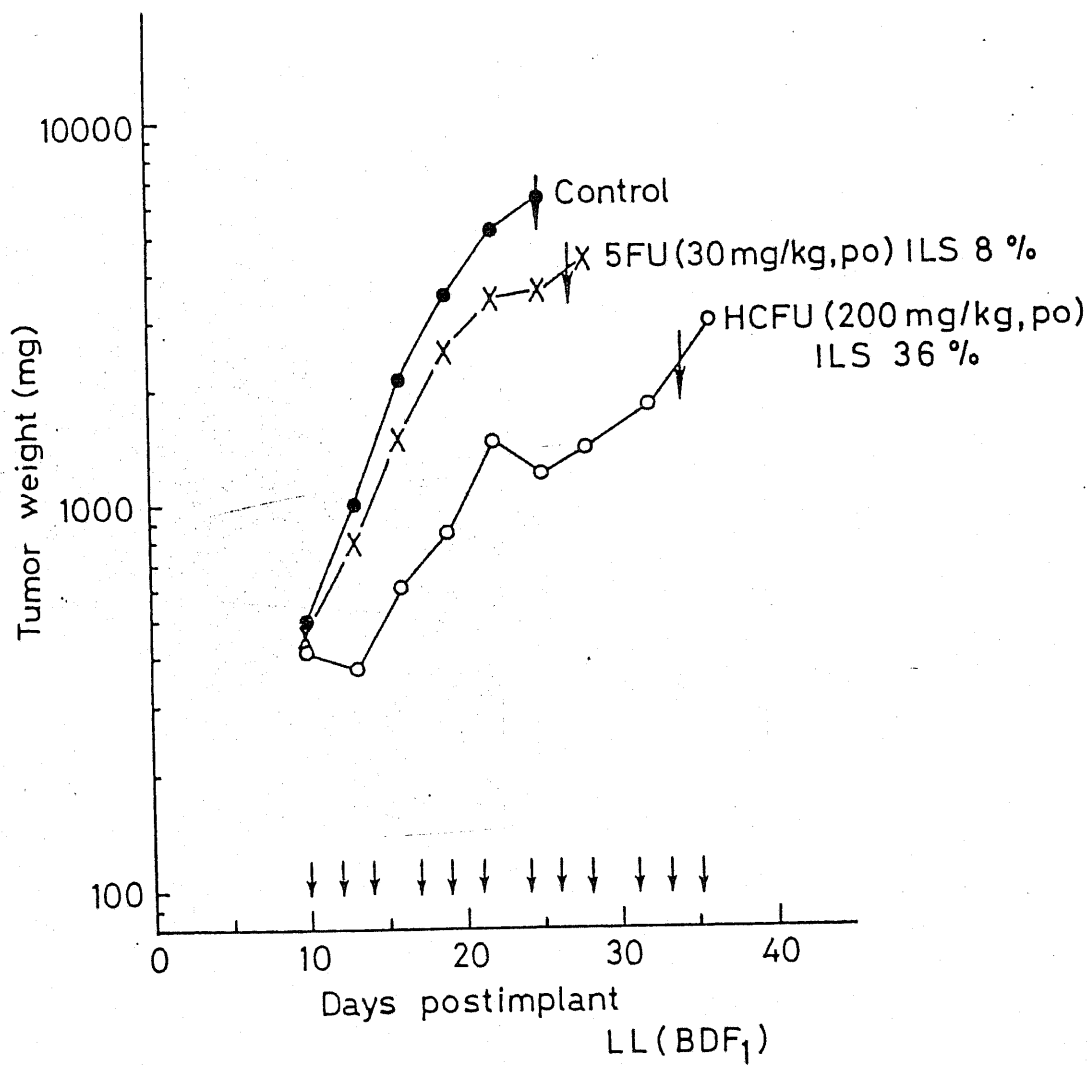


Fig. IV-11. Growth rate of Lewis lung carcinoma treated with HCFU and FU

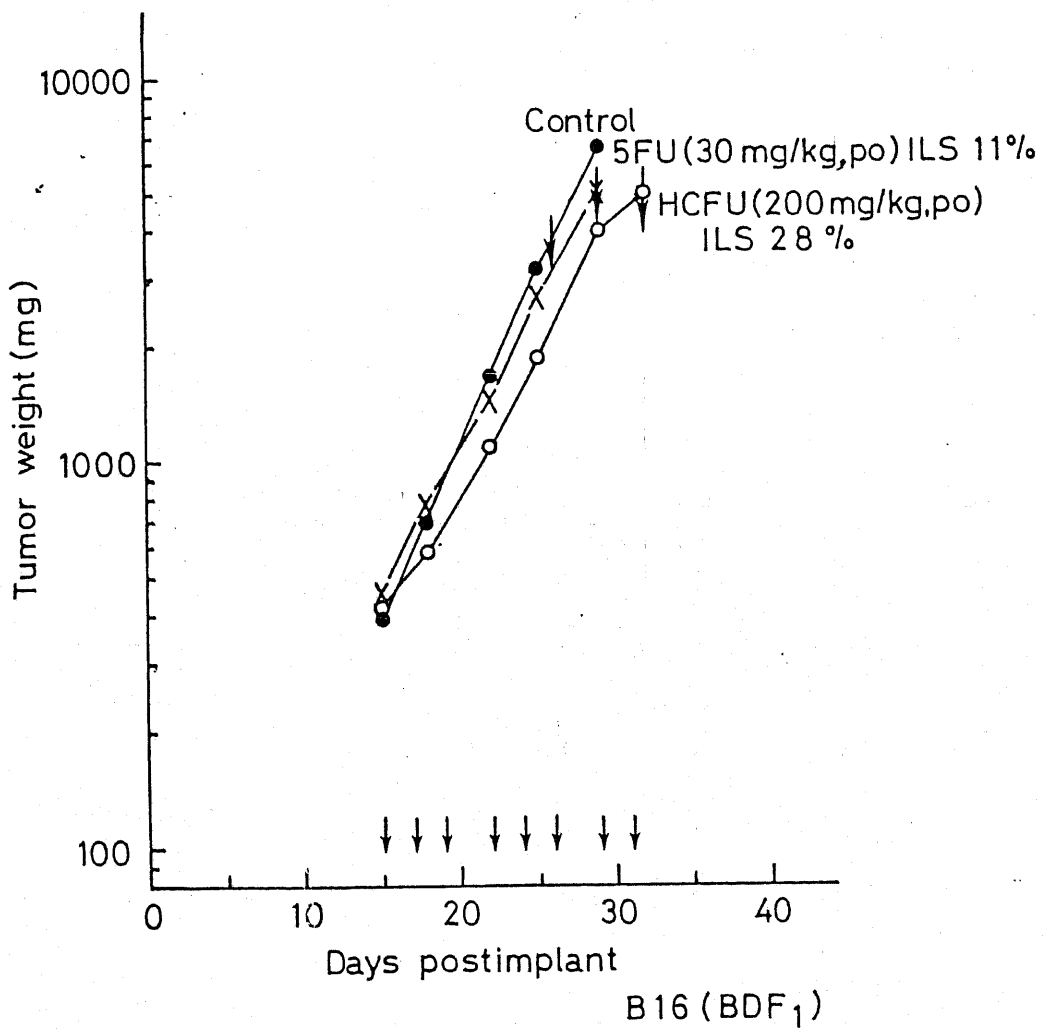


Fig. IV-12. Growth rate of B16 melanoma treated with HCFU and FU

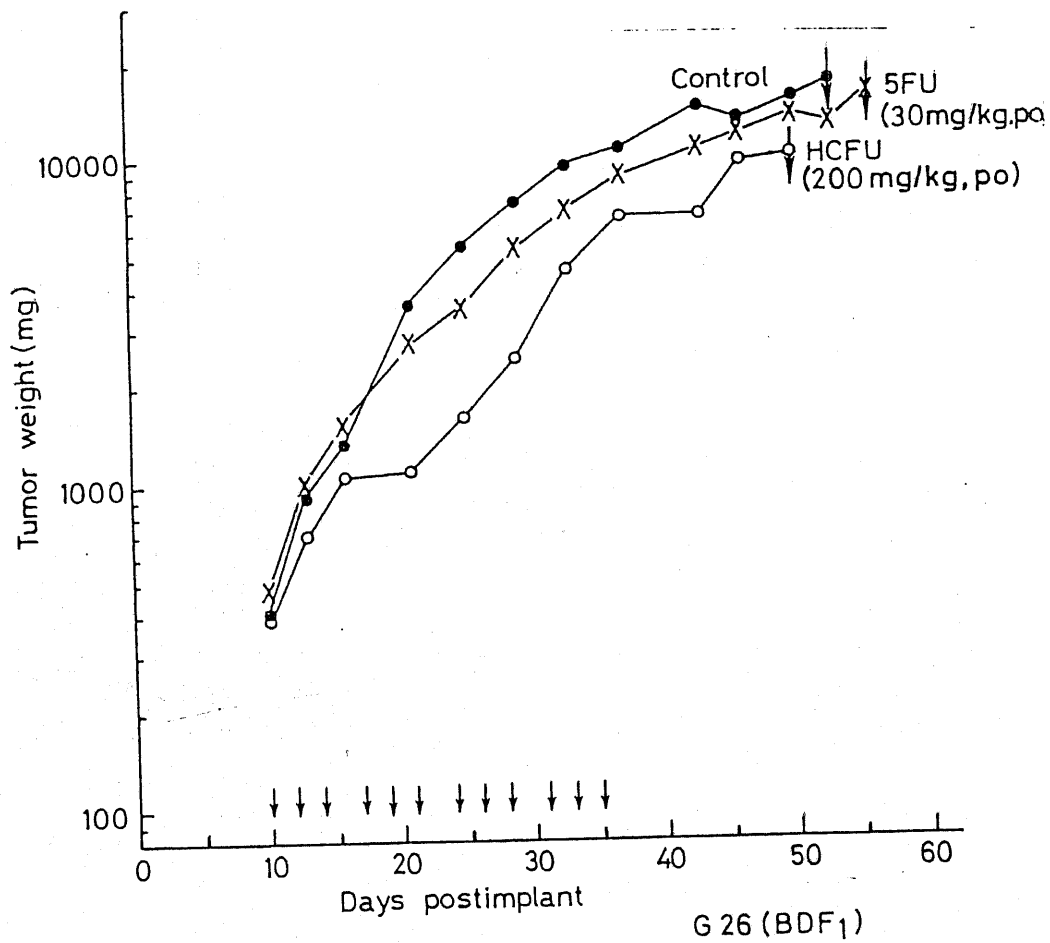


Fig. IV-13. Growth rate of G26 glioma treated with HCFU and FU

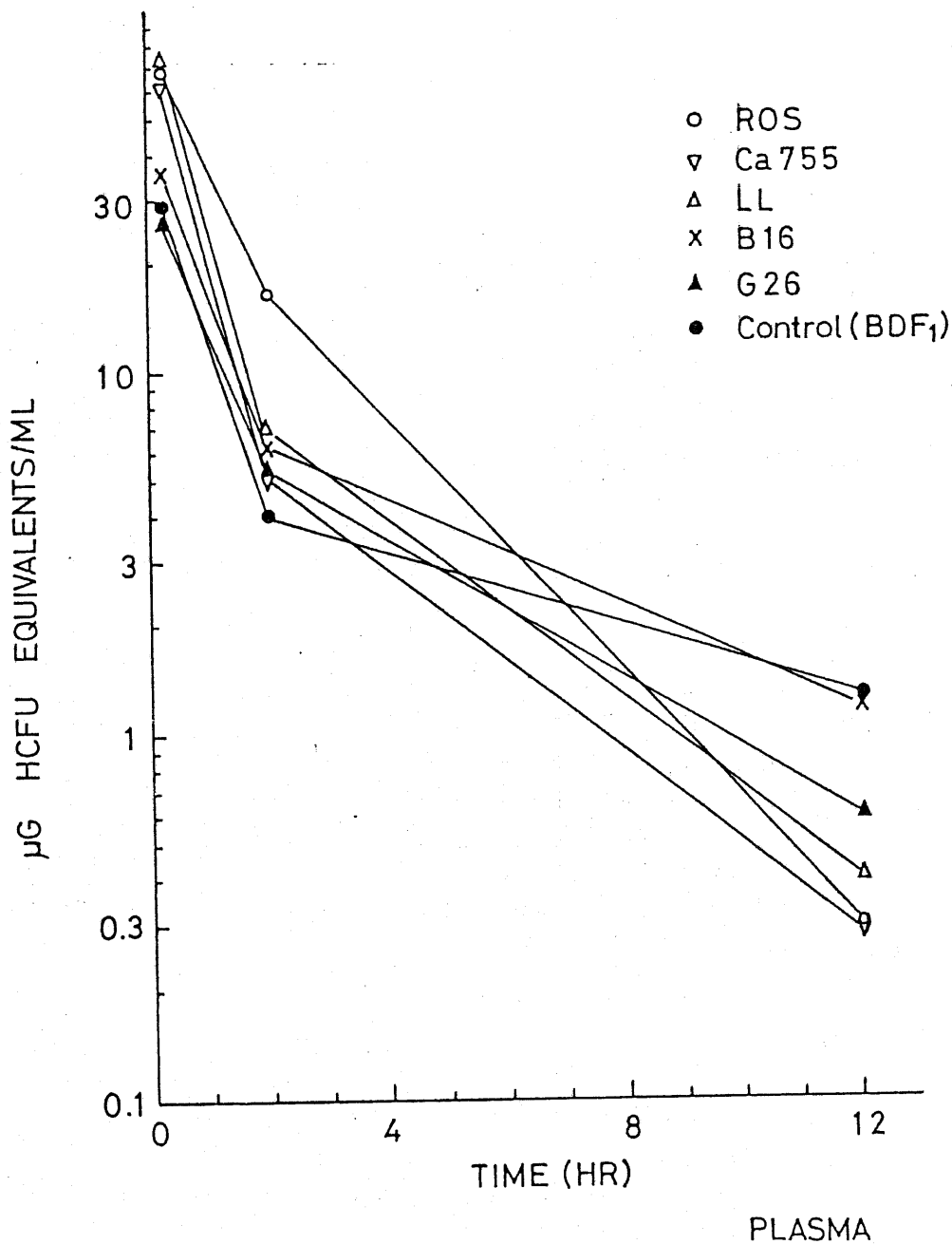


Fig. IV-14. Plasma concentrations in various tumor bearing mice after oral administration of <sup>14</sup>C-HCFU

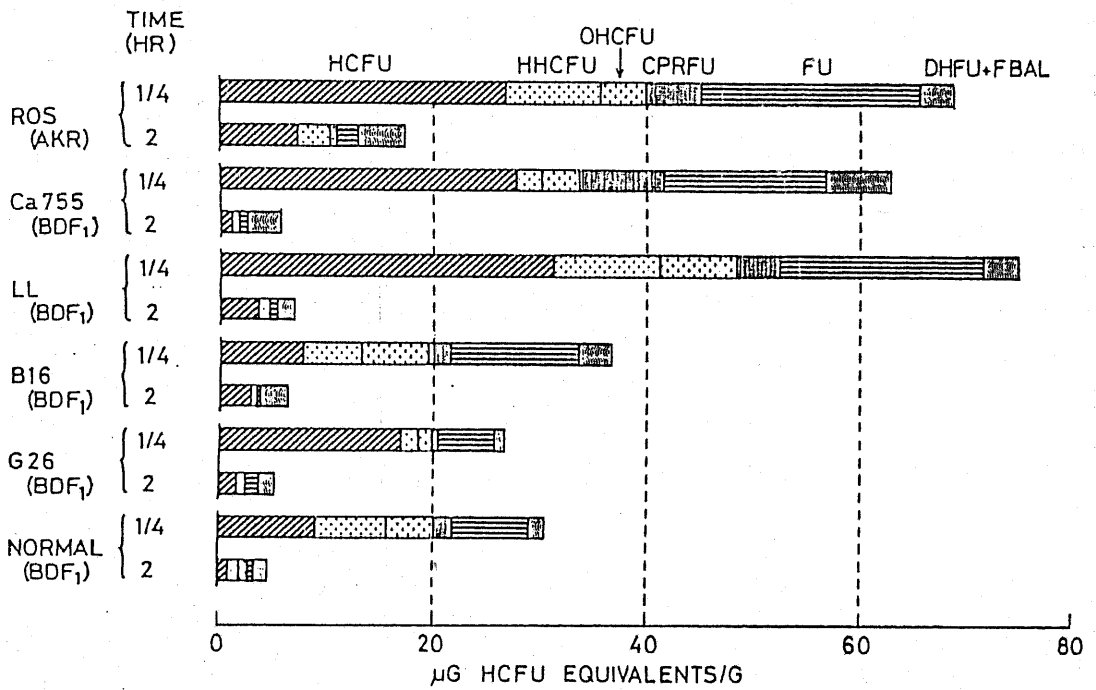


Fig. IV-15. Metabolites of HCFU in plasma

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU の Ca755 担がんマウスの血漿中総放射能は  $^{14}\text{C}$ -HCFU の場合と比べ約  $\frac{1}{3}$  であった (Fig. IV-16)。その放射能の大部分が不活性代謝産物 (DHFU と FBAL) であった (Fig. IV-16)。

### 各種腫瘍細胞に於ける $^{14}\text{C}$ -HCFU 及びその代謝産物

各種腫瘍細胞に於ける  $^{14}\text{C}$ -HCFU の取込は、総放射能でみると ROS, Ca755 及び LL は B16 や G26 と比べやや高かった。 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与15分後の腫瘍内代謝産物の分布をみると、HCFU が約30%、FU が約30%、FUR が約10%であり、不活性代謝産物である DHFU や FBAL は少なかった (Fig. IV-17)。この時のヌクレオチド類は微量であった。投与2時間後には、G26を除いて、HCFU は減少し、FU 及び FUR が増加した。DHFU や FBAL も増加した。投与12時間後には、HCFU は全く存在せず、FU と FUR が大半を占めた。不活性代謝産物は見出されなかった。FU のヌクレオチド類はかなり多量に見出され、特に ROS, Ca755 及び LL で多かった。酸不溶性分画への取込は、ほとんどが RNA に取込まれていたが、特に LL に多かった。

一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時の Ca755 に於ける総放射能は、 $^{14}\text{C}$ -HCFU の場合と比べ、2~3倍多かったが、その代謝産物は、どの時間に於ても、DHFU や FBAL のような不活性代謝産物、FU、酸不溶性分画 及び FUR などであり、ヌクレオチドは1~3%であった (Fig. IV-16)。

ヌクレオチドを更に詳しく分析してみると、投与12時間目のヌクレオチド分画には、かなりの FUMP が見出され、B16 では少なく、G26 では見出されなかった (Fig. IV-18)。

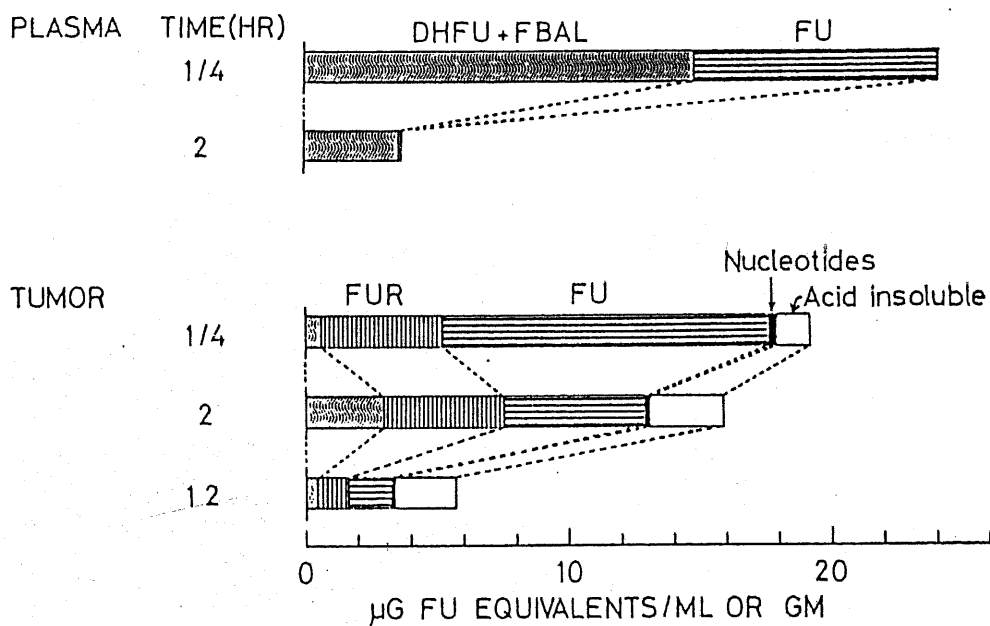


Fig. IV-16.

Metabolites of FU in Adenocarcinoma 755 Tumor bearing Mice  
50 mg/kg, po



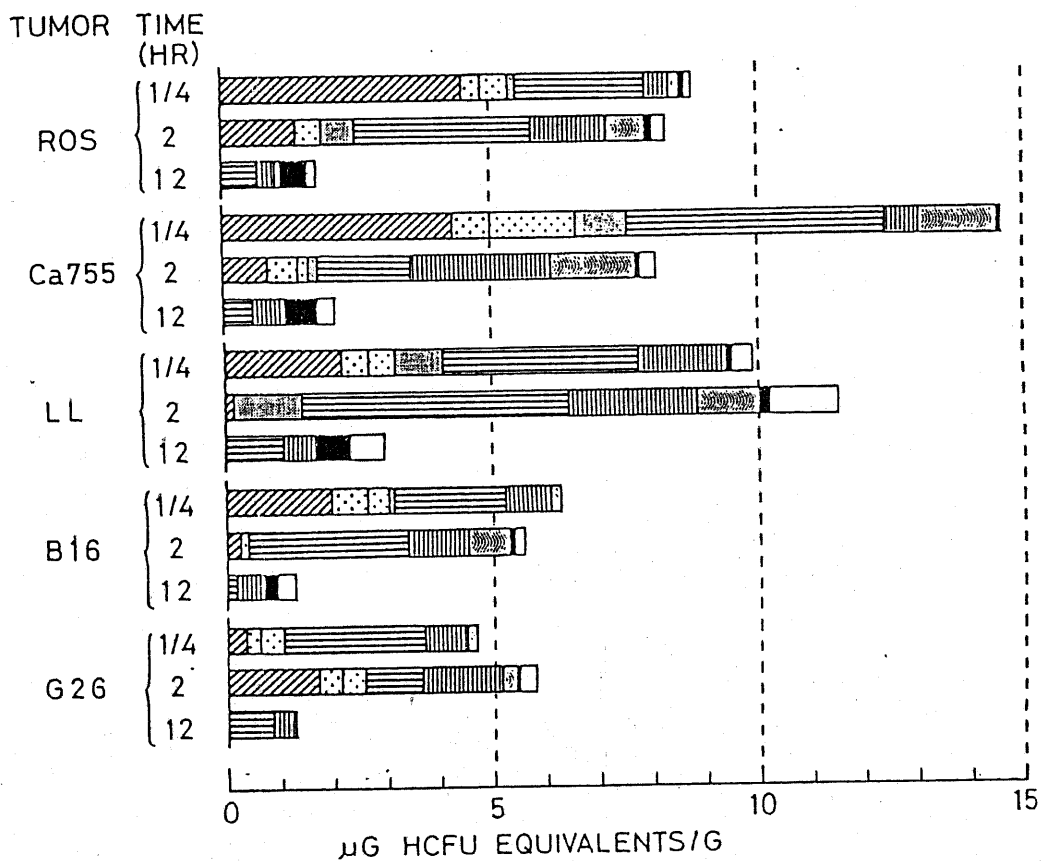
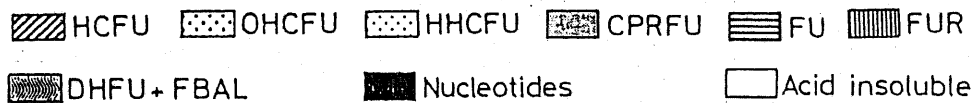


Fig. IV-17. Metabolites of HCFU in tumors



このように HCFU で抗腫瘍効果がみられた腫瘍内には FUMP が大量に存在していた。しかも、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時には、酸不溶性分画には多いが、ヌクレオチドとしては微量であったことから、より強い抗腫瘍効果を得るためには、腫瘍内にフリーのヌクレオチドが長時間存在することが重要であると考えられる。

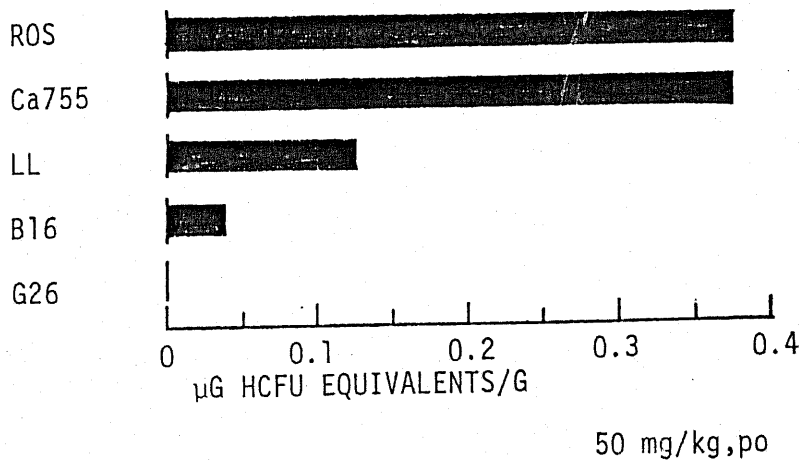


Fig. IV-18. Concentration of FUMP in tumors 12 hr after HCFU administration

## 考察

第IV章第1節で述べたように腹水型腫瘍 Sarcoma 180 細胞における HCFU の取込の特徴は、HCFU が少なく FU、ヌクレオチド及び酸不溶性分画が多いことであった。しかし、腹水液には、かなりの HCFU 及び FU が存在し、長時間持続した。ところが固型腫瘍では、薬物が腹水液を介さず直接血液から腫瘍内に取込まれ、しかも、腫瘍は薬物を代謝し不活性化する能力が弱い<sup>67)</sup>ため、投与直後、腫瘍と血漿中で HCFU の代謝産物パターンは類似していた。HCFU は速やかに多量腫瘍内に取込まれ、時間と共に減少し、12時間後では、腫瘍中に HCFU は検出されなかった。

生化学レベルでの FU のヌクレオチド生成については、第1節で述べたが、同じ動物でも各臓器で、また、動物種によって、その生成速度は著しく異なると言われている。<sup>118~123)</sup> Kesselら<sup>11)</sup>の報告によれば、FU に感受性のある腫瘍では、FU に耐性の腫瘍と比較し、ヌクレオチドが多量長時間存在しているという。著者の実験に於ても、HCFU に感受性が高い腫瘍程、FU のヌクレオチドが多かったこととよく一致している。RNA への FU の取込は、rRNA の成熟を阻害するといわれている<sup>124~127)</sup>が、著者の実験では、感受性の低い B16 や <sup>14</sup>C-FU 投与時の Ca755 にもかなり RNA への取込がみられているので、RNA への取込と抗腫瘍活性との相関は、はっきり証明されなかったが、しかし、フリーのヌクレオチド (FUMP) と抗腫瘍効果とは、よく相関するので、thymidylate synthetase 阻害の可能性が強いように思われる。

以上、FUの生化学レベルでの作用点については、まだ議論が多いが、HCFUのFUにまさる抗腫瘍効果は、HCFUが胃や小腸上部から速やかに吸収され、速やかに腫瘍内に分布し、長時間活性型化合物（HCFU、HHCFU、OHCFU、FUなど）として存在していることにある。

## 第V章 総括

近年、悪性腫瘍のうち、白血病やリンパ腫のような腫瘍については、化学療法のみで高い治療効果が得られている。胃がんや肺がん等日本で高い死亡率を占めているがんについても、延命効果が認められ、外科療法や放射線療法と並び、重要な治療法となっている。特に胃がんは、悪性新生物の1/3を占め、新しい抗がん剤の開発が期待されている。現在使われている胃がんなど消化器系の腫瘍に効果ある抗がん剤として 5-fluorouracil (FU) がある。この薬物は発見以来すでに20年以上たつた今日でも依然として多用されている。しかし、その効果は、まだ限られたものであり、副作用も強い。そこで、多くの研究者により、FUの改良が行われ、1967年にはテガフル(FT)が見出された。この薬物はFUの“トランスポート型”化合物であり、我国で経口投与時に毒性が低いことを見出され、医薬品となったものである。この薬物は肝薬物代謝酵素でFUとなり活性を発現する。FTは特に外科療法の補助療法の薬として多用されているが、その有効率はFUとほとんど同じであった。そこで、著者は、FUより抗腫瘍効果が強く、かつFTのように毒性の低い化合物を見出すため、FU誘導体の研究を始めた。

数多くのFU誘導体を検討した結果、アルキルカルバモイル基で置換した化合物が、L1210に対して強い抗腫瘍効果を示し、特に経口投与で、FUより、治療効果が優れていることを見出した。更に、C1498, S180A, EAC, NFS 及び Ca755 に対し抗腫瘍効果を検討したところ、メチル、エチル、イソプロピル、ヘキシル、オクチル及びフェニルカルバモイル誘導体が、強い抗腫瘍効果と幅広い抗腫瘍スペクトラムを示した。これらの化合物は、FUが経口投与であまり効かないCa755や腹水腫瘍に対しても、経口投与でよく効くことがわかった。次に、生長の遅い腫瘍である、Lewis

肺がんや B16 melanoma を用いて、長期経口投与を試みた。  
その結果、1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) とフェニル誘導体が Lewis 肺がんに対し、そして HCFU は B16 melanoma に対しても抗腫瘍効果を示した。以上の結果、HCFU がすべての腫瘍に対し強い抗腫瘍効果を示した化合物であった。

アルキルカルバモイル誘導体は腹水型腫瘍 S180A に対し、FU より強い抗腫瘍効果を示した。そこで、これらアルキルカルバモイル誘導体の特性を明らかにするため、S180A を用いて、これらの化合物の経口投与時の薬力学的性質を検討した。これらの化合物は消化管より速やかに、そのままの形で吸収され、腹水中に分布した。血漿中及び腹水中に於ける FU の濃度  $\times$  時間 ( $C \times t$  値) は、アルキル基の炭素数の増加に伴い減少した。それぞれの化合物の抗腫瘍活性は、腹水中 FU の最大濃度 ( $C_{max}$ )、FU の  $C \times t$  値及び総量 (そのままの形 + FU) の  $C_{max}$  と相関しており ( $p < 0.01$ )、更に血漿中 FU の  $C_{max}$  及び  $C \times t$  値と相関していた ( $p < 0.05$ )。FU にアルキルカルバモイル基をつけることにより、消化管からの急速な吸収、血液-腹水関門の通過、血漿中及び腹水中のアルキルカルバモイル誘導体と FU の長時間高濃度持続という性質が加わること、腹水中 FU 濃度の持続が抗腫瘍効果に結びつくことが明らかになった。

次に HCFU の生体内動態を明らかにするために、全身オートラジオグラフィー及び組織抽出による放射能の時間的变化を検討した。 $^{14}\text{C}$ -HCFU は経口投与後、速やかに胃腸から吸収され、総血漿中濃度は  $^{14}\text{C}$ -FU と比較し、かなり高かった。肝、腎、胃壁は血漿より高く、次いで肺や副腎で高かった。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU も経口投与後、速やかに吸収され、肝、心、肺、膵、脾、腎、副腎や腸壁で血漿より高い放射能が検出された。全般的に両者の分布は類似し、抗腫瘍効果や毒性について説明

できる程、両者の差は顕著でなかつた。

そこで、更に  $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与時の代謝産物を、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時の代謝産物と比較検討した。代謝産物は薄層クロマトグラフィ（シリカゲル 60 F<sub>254</sub>）で分離した。その結果、マウス血漿中では HCFU 及び FU が長時間にわたり検出された。5,6-dihydro-5-fluorouracil (DHFU) や  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -alanine (FBAL) のような FU の不活性代謝産物も見出されたが、確認できる濃度になるまでに、かなりの時間を要した。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与の場合、速やかに代謝分解され、血漿中 FU は短時間で消失し、ほとんどが DHFU や FBAL であった。HCFU のアルキル鎖の ( $\omega$ -1) 酸化体である 1-(5-hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCFU), と 1-(5-oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU) は血漿中に多量見出されたが、 $\omega$ -酸化体 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU) 及びそれが更に  $\beta$ -酸化された 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU) は微量であった。FU の主たる代謝臓器である肝では、HCFU は多量検出されたが、HHCFU は僅かであり、OHCFU はほとんど検出されなかつた。CPEFU や CPRFU も微量であった。HCFU 由来の FU も見出されたが、FU の代謝産物である  $\alpha$ -fluoro- $\beta$ -ureidopropionic acid (FUPA) や FBAL が多量に見出され、DHFU も少量存在した。一方、 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時には、投与後まもなく FU が消失し FUPA と FBAL が大半を占めた。このように肝に於ては、HCFU は代謝分解されにくく、安定な化合物であった。更に小腸や肺に於ても HCFU は長時間組織中にとどまり、徐々に FU を遊離し、代謝されるパターンを示した。特に  $^{14}\text{C}$ -FU 投与時と比べ、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与時に小腸壁中の FU が少ないことが、HCFU の消化器に対する毒性の低い理由と考えられる。

次に排泄をみてみると、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 及び  $^{14}\text{C}$ -FU 投与時ともに糞には放射能はほとんどなく、尿中には投与量の90%以上が見出され、吸収が良いことが再確認された。HCFU 投与時の尿には HCFU、HHCFU 及び CPEFU は全く検出されず、CPRFU のみが投与後短時間に検出された。FU は長時間にわたり検出できた。一方、FU 投与の場合、大部分が DHFU であった。

HCFU の経口投与は、腹水腫瘍 S180A に対し、FU より強い抗腫瘍効果を示したので、その原因を明らかにするため、S180A 担がんマウス血漿、腹水及び腫瘍細胞について、時間を追って、 $^{14}\text{C}$ -HCFU と  $^{14}\text{C}$ -FU の代謝産物の分離定量を行なった。担がんマウス血漿中の HCFU 及び FU の総放射能は正常より高く、長時間続いた。HHCFU や OHCFU は正常マウス血漿中よりかなり少なく、CPRFU はやや多かった。HCFU 由来の FU は少量であるが、長時間続いた。このことは腫瘍が、肝、腎機能に大きな影響を与えているものと考えられる。腹水中 HCFU と代謝産物のパターンは、血漿中とほぼ同じで、FU の持続がみられた。 $^{14}\text{C}$ -FU 投与時の腹水中 FU は、血漿中と異なり、多量かつ長時間検出できた。腫瘍細胞への取込をみると、 $^{14}\text{C}$ -HCFU 投与の場合、HCFU 及びその関連代謝産物と DHFU や FBAL のような不活性代謝産物は腹水より少なく、FU のヌクレオチドが多量見出され、FU 投与時の腫瘍細胞内と同様なパターンであった。液体クロマトグラフィーで FUMP を分離してみると、両者とも総ヌクレオチドの10~20%で、差がみられなかった。このように HCFU は投与後速やかに腹水に分布し、長時間持続し、徐々に FU となり、腫瘍細胞に取込まれ、ヌクレオチドとなり活性を示すものと思われる。また、血漿中及び小腸壁中 FU の最高濃度は、FU 投与時と比べ、HCFU 投与時の方がかなり低かった。このことが、FU と比べ 消化器系に対する



毒性が低いことと関係あるものと考えられる。その結果、HCFUの方が大量投与できるため、より強い抗腫瘍効果が得られたものと考えられる。

更にHCFUに感受性の高い固型腫瘍 ROS, Ca755, Lewis 肺がん と低感受性腫瘍 B16, G26 について組織内代謝産物の違いを検討した。HCFUは腹水腫瘍とは異なり、すべての腫瘍に多量取込まれていた。抗腫瘍効果との関係からみると、投与12時間後にFUのヌクレオチドが多い程、強い抗腫瘍効果を示した。FUのCa755に対する抗腫瘍効果は弱く、その時の腫瘍内代謝産物をみると、FUが多量に存在し、酸不溶性分画(主にRNA)にも多量取込まれていたが、FUのヌクレオチドは非常に少なかった。Thymidylate synthetaseを阻害するためには、フリーのFUヌクレオチドが腫瘍内に長時間存在することが必要であり、HCFUはこの点でもFUより優れているものと考えられる。

以上の如く、数多くのアルキルカルバモイル誘導体の中から、多くの腫瘍系を用いたスクリーニングをとうし、HCFUを選び出した。更にHCFUがFUより優れていることを裏づけるために、体内分布や代謝などを検討し、抗腫瘍効果の作用機序についても検討した。

以上の結果をまとめてみると、

○6種の生長の速い腫瘍系(L1210, C1498, S180A, EAC, Ca755, NFS) に対して、メチル, エチル, ヘキシル, イソプロピル と オクタールカルバモイル 5-フルオロウラシルがFUやFTより優れた抗腫瘍効果及び抗腫瘍スペクトラムを示した。

○ BIG melanoma や Lewis 肺がんのような生長の遅い腫瘍系を用いた長期投与実験では、ヘキシルとフェニル誘導体が優れた延命効果を示した。しかし、生長の速い系で著しい効果を示したメチル、エチル誘導体は長期投与では毒性が増強され、さほどの延命効果を示さなかった。このことは蓄積毒性を調べる意味からも長期投与実験は価値あると考えられる。

○ 更に進行 Lewis 肺がんは、投与開始の時点で肺転移が起こっており、原発巣並びに転移巣についても、薬物の効果が検討でき、優れたスクリーニング系である。

HCFU はこの進行 Lewis 肺がんにも延命効果を示した。

以上多くのスクリーニングの結果、HCFU が抗腫瘍効果並びに毒性の点で一番優れていた。

○ 次に HCFU と FU の抗腫瘍効果及び毒性についての違いを検討するために、HCFU と FU の代謝産物を調べた。HCFU の血漿中や組織中には、HCFU、HHCFU、OHCFU や FU など抗腫瘍活性をもつ代謝産物が多量長時間見出された。一方、FU 投与時には速やかに不活性代謝産物である DHFU、FUPA、FBAL に代謝された。

○ FU の代謝臓器・肝でも HCFU は安定であった。

○ HCFU 投与時の血漿中及び小腸壁中最高 FU 濃度は、FU 投与時と比べ、低いいため、毒性が低いと考えられる。従って、HCFU の方が大量投与可能であった。

○ HCFU、FU とともに吸収はよく、大部分尿中に排泄された。その代謝産物は CPRFU や FU など抗腫瘍活性をもつ

代謝産物が多かったのに対し、FU投与では DHFU や FBAL など不活性な代謝産物が主であった。このことから、アルキルカルバモイル側鎖が、FU骨格の安定化に寄与していることが明らかになった。

○ HCFU投与後の固型腫瘍には多量かつ長時間にわたり、HCFUやその中間代謝産物が存在し、徐々にFUになっていった。そのFUは又クレオチドとなり、長時間フリーの形で存在した。これらのことが HCFUの抗腫瘍効果の高い理由と考えられることなどが明らかになりました。

### 謝 辞

本研究は国立がんセンター研究所に於いて行なわれたものであります。

本研究に関して、当研究所薬効試験部 星 昭夫部長、大阪府立大学農学部 樽谷和男教授に終始御指導いただきました事を深謝致します。

更に、本論文提出の機会を与えられ、有益な多くの御助言を賜りました千葉大学薬学部 山根靖弘教授に深謝致します。

## REFERENCES

- 1) Zubrod, C.G., *Cancer*, 30, 1474 (1972).
- 2) Carter, S.K., *J. Natl. Cancer Inst.*, 57, 235 (1976).
- 3) Hansen, H.H., Muggia, F.M., Andrews, R., Selawry, O.S., *Cancer*, 30, 315 (1972).
- 4) Hiller, S.A., Zhuk, R.A., Lidak, M., Ziderman, A., Conference on malignant tumors, Riga pp 111 (1968).
- 5) Konda, C., Niitani, H., Sakauchi, N., Suzuki, A., Sakano, T., Shimoyama, M., Kitahara, T., Kimura, K., Kumaoka, S., *Jpn. J. Cancer Clin.*, 19, 495 (1973).
- 6) Blokhina, N.G., Vozny, E.K., Garin, A.M., *Cancer*, 30, 390 (1972).
- 7) Karev, N.I., Blokhina, N.G., Vozny, E.K., Pershin, M.P., *Neoplasma*, 19, 347 (1972).
- 8) Toide, H., Akiyoshi, H., Minato, Y., Okuda, H., Fujii, S., *Gann*, 68, 553 (1977).
- 9) Hoshi, A., Iigo, M., Nakamura, A., Kuretani, K., *Gann*, 65, 463 (1974).
- 10) Mayo, J.G., *Cancer Chemother. Rep.*, Part 2, vol. 3, 325 (1972).
- 11) Clarke, D.A., *Cancer Res.*, 13, 593 (1953).
- 12) Farber, S., *New Engl. J. Med.*, 238, 787 (1948).
- 13) Heidelberger, C., Chaudhuri, N.K., Danneberg, P.B., Mooren, D., Griesbach, L., Duschinsky, R., Schnitzer, R.J., Plevin, E., Schneider, J., *Nature* 179, 663 (1957).
- 14) Gilman, A., *Am. J. Surg.*, 105, 574 (1963).
- 15) Gilman, A., Philips, F.S., *Science*, 103, 409 (1946).
- 16) Gellhorn, A., Hirschberg, E., *Cancer Res.*, suppl., 3, 1 (1955).
- 17) Zubrod, C.G., *Adv. Chemother.*, 1, 9 (1964).
- 18) Venditti, J.M., Abbott, B.J., *Lloydia*, 30, 332 (1967).
- 19) Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher, A.M., Abbott, B.J., *Cancer Chemother. Rep.*, Part 3, vol. 3, 1 (1972).

- 20) Johnson,R.K., Goldin,A., Cancer Treat. Rev., 2, 1 (1975).
- 21) Geenspan,E.M., Leiter,J., Shear,M.J., J. Natl. Cancer Inst., 10, 1295 (1950).
- 22) Law,L.W., Dunn,T.B., Boyle,P.J., Miller,J.H., J.Natl. Cancer Inst., 10, 179 (1949).
- 23) Law,L.W., Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 77, 340 (1951).
- 24) Hoshi,A., Kanzawa,F., Kumagai,K., Kuretani,K., Cancer Chemother. Rep., 53, 165 (1969).
- 25) Dunham,L.J., Stewart,H.L., J.Natl. Cancer Inst., 13, 1299 (1953).
- 26) Bradner,W.T., Pindell,M.H., Cancer Res., 26, 375 (1966).
- 27) Law,L.W., Cancer Res., 4, 257 (1944).
- 28) Wood,F.C., Prime,F., Jr., Ann. Surg., 62, 751 (1915).
- 29) Sigiura,k., Amer. J. Roentgenol., 31, 614 (1934).
- 30) Kline,G., Exptl. Cell Res., 2, 518 (1951)
- 31) Putonoky,J., Ztscher. Krebsforsch., 32, 520 (1930).
- 32) 宮川正澄, 佐藤春郎, 堀良義彦, 実験腫瘍学, 朝倉書店 (1966)
- 33) Fukuoka,F., Nakahara,W., Gann, 42, 55 (1951).
- 34) Bagg,H.J., Jacksen,J., Amer. J. Cancer, 30, 539 (1937).
- 35) Sassenrath,E.N., Ann. N.Y. Acad. Sci., 76, 601 (1968).
- 36) Hoshi,A., Kanzawa,F., Kuretani,K., Chem. Pharm. Bull., 17, 1694 (1969).
- 37) Hoshi,A., Kumagai,K., Kanzawa,F., Kuretani,K., Gann, 60, 115 (1969).
- 38) Bollag,W., Hartman,H.R., Eur. J. Cancer, 16, 427 (1980).
- 39) Arakawa,M., Shimizu,F., Sasagawa,K., Inomata,T., Shinkai,K., Gann, 72, 220 (1981).

- 40) Zubrod, C.G., Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 1042 (1972).
- 41) Skipper, H.E., Schabel, F.M., Jr., Wilcox, W.S.,  
Cancer Chemother. Rep., 35, 1 (1964).
- 42) Griswold, D.P., Jr., Schabel, F.M., Jr., Wilcox, W.S.,  
Cancer Chemother. Rep., 52, 345 (1968).
- 43) Skipper, H.E., Schabel, F.M., Jr., Trader, M.W.,  
Cancer Chemother. Rep., 53, 345 (1969).
- 44) Bruce, W.R., Valeriote, F.A., Meeker, B.E.,  
J. Natl. Cancer Inst., 39, 257 (1967).
- 45) Schabel, F.M., Jr., Skipper, H.E., Trader, M.W.,  
Cancer Chemother. Rep., 53, 329 (1969).
- 46) Goldberg, A.I., Glynn, J.P., Kende, M., Cancer Res.,  
32, 1321 (1972).
- 47) Skipper, H.E., Natl. Cancer Inst., Monogr., 34, 2  
(1971).
- 48) Griswold, D.P., Jr., Cancer Chemother. Rep., Part 2,  
3, 315 (1972).
- 49) Karrer, K., Humphreys, S.R., Cancer Chemother. Rep.,  
51, 439 (1967).
- 50) Mayo, J.G., Laster, W.R., Andrews, C.M., Cancer  
Chemother. Rep., 56, 183 (1972).
- 51) Simpson-Herren, L., Cancer Chemother. Rep., Part 2  
5, 83 (1975).
- 52) Ovejera, A.A., Johnson, R.K., Goldin, A., Cancer  
Chemother. Rep. Part 2, 5, 111 (1975).
- 53) Geran, R.I., Greenberg, N.H., Macdonald, M.M., Cancer  
Chemother. Rep., Part 3, 3, 1 (1972).
- 54) Johnson, R.K., Inoue, T., Goldin, A., Cancer Res.,  
36, 2720 (1976).
- 55) Davis, H.L. Jr., Von Hoff, D.D., Rozencweig, M., Handelsman,  
H., Soper, W.T., Muggia, F.M., Randomized Trials in  
Cancer: A Critical Review by Sites, Raven Press, N.Y.,  
pp 147 (1978)

- 56) Tsuruo, T., Iida, H., Naganuma, K., Tsukagoshi, S., Sakurai, Y., *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 4, 83 (1980).
- 57) Tokuzen, R., Iigo, M., Hoshi, A., Kuretani, K., *Gann*, 71, 724 (1980).
- 58) Spiers, A., Straus, M., Janis, M., Polackwick, R., Mozden, P., *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 18, 292 (1977).
- 59) Hillcoat, B.L., McCulloch, P.B., Figueredo, A.T., Ehsan, M.H., Rosenfeld, J.M., *Br. J. Cancer*, 38, 719 (1978).
- 60) Ansfield, F., Klotz, J., Nealon, T., Ramirez, G., Minton, J., Hill, G., Wilson, W., Davis, H., Cornell, G., *Cancer*, 39, 34 (1977).
- 61) 穴田久雄, 中村信雄, 丸茂博久, *薬学雑誌*, 94, 1131 (1974).
- 62) Appelgren, L.E., Hamberger, B., Theve, N.O., *Front. Gastrointest. Res.*, 5, 62 (1979).
- 63) Heidelberger, C., Ansfield, F.J., *Cancer Res.*, 23, 1226 (1963).
- 64) Liss, R.H., Chadwick, M., *Cancer Chemother. Rep.*, 58, 777 (1974).
- 65) Harber, E., Chaudhuri, N.K., Heidelberger, C., *J. Biol. Chem.*, 234, 1255 (1959).
- 66) Newmark, P., Stephens, J.D., Barrett, H.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 62, 414 (1962).
- 67) Chaudhuri, N.K., Mukherjee, K.L., Heidelberger, C., *Biochem. Pharmacol.*, 1, 328 (1958).
- 68) Masry, A.M., Smith, J.N., Williams, R.T., *Biochem. J.*, 64, 50 (1956).
- 69) Maynert, E.W., *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 150, 476 (1965).
- 70) Titus, E., Weiss, H., *J. Biol. Chem.*, 214, 807 (1955).
- 71) Burns, J.J., Rose, R.K., Goodwin, S., Reichenthal, J., Horning, E., Brodie, B.B., *J. Pharmacol.*, 113, 481 (1955).

- 72) Tsukamoto, H., Chem. Pharmac. Bull., 10, 522 (1962).
- 73) 渡辺周次, 森研二, 御園等, 横山昌鶴, 化学療法, 27, 778 (1979).
- 74) Kono, A., Hara, Y., Eguchi, S., Tanaka, M., Matsushima, Y., J. Chromatogr., 182, 125 (1980).
- 75) Kobari, T., Tan, K., Kumakura, M., Watanabe, S., Shirakawa, I., Kobayashi, H., Ujiie, A., Miyama, Y., Namekawa, H., Yamamoto, H., Xenobiotica, 8, 547 (1978).
- 76) Kobari, T., Iguro, Y., Ujiie, A., Namekawa, H., Current Chemotherapy and Infections Disease, Proceeding of the 11th ICC and 19th ICAAC, pp 1584 (1980).
- 77) Fink, R.M., McGaughey, C., Cline, R.E., Fink, K., J. Biol. Chem., 218, 1 (1956).
- 78) Fink, K., Cline, R.E., Henderson, R.B., Fink, R.M., J. Biol. Chem., 221, 425 (1956).
- 79) Au, J.L., Wu, A.T., Friedman, M.A., Sadée, W., Cancer Treat. Rep., 63, 343 (1979).
- 80) Cohn, A.M., Life Sci., 17, 1363 (1975).
- 81) 小針孝司, 伊黒美樹, 丸家章, 滑川宏, 森研二, 薬理と治療, 2, 1153 (1980).
- 82) 葛西洋一, 中西昌美, 沢田康夫, 橋本伊久雄, 中村孝, 三上二郎, 戸次英一, 平沢貞子, 河部弘, 薬理と治療, 2, 1141 (1980).
- 83) Gillette, J.R., J. Biol. Chem., 243, 139 (1959).
- 84) 中垣正幸, 薬物の生体内移行 pp241, 南江堂 (1969).
- 85) Bicked, M.H., Baggiolini, M., Biochem. Pharmacol., 15, 1155 (1966).
- 86) Brodie, B.B., "Absorption and Distribution of Drugs" T.B. Binns (Edit.) pp 199, E & S Livingstone Ltd., Edinburgh and London (1964).
- 87) Quinn, G.P., Axelrod, J., Brodie, B.B., Biochem. Pharmacol., 1, 152 (1958).
- 88) Kessel, D., Hall, T.C., Wodinsky, I., Science, 154, 911 (1966).



- 89) Kufe, D.W., Major, P.P., J. Biol. Chem., 256, 9802 (1981).
- 90) Wilkinson, D.S., Crumley, J., J. Biol. Chem., 252, 1051 (1977).
- 91) Heidelberger, C., Progr. Nucleic Acids Mol. Biol., 4, 1 (1965).
- 92) Chaudhuri, N.K., Montag, B.J., Heidelberger, C., Cancer Res., 18, 318 (1958).
- 93) Brockman, R.W., Shaddix, S.C., Rose, L.M., Cancer, 40, 2681 (1977).
- 94) Kessel, D., Hall, T.C., Cancer Res., 29, 1749 (1969).
- 95) Danneberg, P.B., Montag, B.J., Heidelberger, C., Cancer Res., 18, 329 (1958).
- 96) Klimek, M., Neoplasma, 12, 465 (1965).
- 97) Danneberg, P.B., Montag, B.J., Heidelberger, C., 18, 329 (1958).
- 98) Danenberg, P.V., Biochim. Biophys. Acta, 473, 73 (1977).
- 99) Reyes, P., Heidelberger, C., Mol. Pharmacol., 1, 14 (1965).
- 100) Washtien, W.L., Santi, D.V., Cancer Res., 39, 3397 (1979).
- 101) Langenbach, R.J., Danenberg, P.V., Heidelberger, C., Biochem. Biophys. Res. Commun., 48, 1565 (1972).
- 102) Cohen, S.S., Flaks, J.G., Barner, H.D., Loeb, M.R., Lichtenstein, J., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 44, 1004 (1958).
- 103) Heidelberger, C., Kaldor, G., Mukherjee, K.L., Danneberg, P.B., Cancer Res., 20, 903 (1960).
- 104) Danenberg, P.V., Langenbach, R.J., Heidelberger, C., Biochemistry, 13, 926 (1974).
- 105) Santi, D.V., McHenry, C.S., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 1855 (1972).

- 106) Santi,D.V., McHenry,C.S., Sommer,H., Biochemistry, 13, 481 (1974).
- 107) Myers,C.E. Young,R.C., Johns,D.G., Chabner,B.A., Cancer Res., 34, 2682 (1974).
- 108) Zimmerman,H.M., Amer. J. Pathol., 31, 1 (1955).
- 109) Sugiura,K., Tumor transplantation, In Methods of Animal Experimentation (Gay,W.I., et al), N.Y., Academic Press, vol 2, pp 171 (1969).
- 110) Shapiro,W.R., Cancer Chemother. Rep., 56, 457 (1972).
- 111) Levin,V.A., Crafts,D., Wilson,C.B., Kabra,P., Hansch, C., Boldrey,E., Enot,J., Neely,M., Cancer Chemother. Rep., 59, 327 (1975).
- 112) Torack,R.M., Arch. Neurol., 5, 416 (1961).
- 113) Shapiro,W.R., Arch. Neurol., 30, 222 (1974).
- 114) Sugiura,K., Stock,C.C., Cancer, 5, 382 (1952).
- 115) Sugiura,K., Stock,C.C. Reilly,H.C., Cancer Res., 18, 66 (1958).
- 116) Laster,W.R.,Jr., Cancer Chemother. Rep., Part 2, 5, 151 (1975).
- 117) Hurlbert,R.B., Schmitz,H., Brumm,A.F., Potter,V.R., J. Biol. Chem., 209, 23 (1954).
- 118) Hopkins,H.A., Wakefield,J.A., Biochem. Pharmacol., 26, 59 (1977).
- 119) Krenitsky,T.A., J. Biol. Chem., 243, 2871 (1968).
- 120) Krenitsky,T.A., Mellors,J.W., Barclay,R.K., J. Biol. Chem., 240, 1281 (1965).
- 121) Zimmerman,M., J. Biol. Chem., 239, 2622 (1964)
- 122) Zimmerman, M ., Seidenberg,J., J. Biol. Chem., 239, 2618 (1964).
- 123) Kessel,D., Hall,T.C., Reyes,P., Mol. Pharmacol., 5, 481 (1969).

- 124) Carrico, C.K., Glazer, R.I., Biochem. Biophys. Res. Commun., 87, 664 (1979).
- 125) Heidelberger, C., In: Sartorelli, A.C., Johns D.G. (eds) Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 38, Part 2, pp 193, N.Y. Springer-Verlag (1975).
- 126) Wilkinson, D.S., Tlsty, T.D., Hanas, R.J. Cancer Res. 35, 3014 (1975).
- 127) Stenram, U., Bengtsson, A., Willen, R., Cytobios., 5, 125 (1972).