

新抗腫瘍性化合物 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の体内濃度測定法

渡辺周次・森 研二・御園 等・横山昌鶴
三井製薬工業株式会社生物科学研究所

(昭和 54 年 1 月 12 日受付)

新抗腫瘍性化合物, 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の体内濃度測定法の検討を行った。

HCFU 投与後の血中, 尿中およびその他体液内の HCFU およびその代謝物の濃度測定は, 酸性条件下で, アンバーライト XAD-2 樹脂に対する吸着性を利用して, 5-FU と HCFU および主抗菌性代謝物, 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU) と 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU) に分別し定量することが出来る。

また, HCFU, CPEFU および CPRFU 濃度は分別後の分画を, さらに, 薄層クロマトグラフィで分離後, 測定可能である。

この方法での各薬剤の最少検出濃度は 5-FU 相当量として, 0.01 $\mu\text{g/ml}$ である。

緒 言

1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (以下 HCFU と略す)(I)は 1975 年尾崎ら¹⁾により合成されたいわゆるマスク型の 5-FU 誘導体のひとつであり, 星, 樽谷らによって, マウス実験腫瘍に対するすぐれた抗腫瘍活性と広いスペクトラムを示すことが報告されている²⁾³⁾⁴⁾。

HCFU のすぐれた制癌性は生体内での代謝の結果生じた 5-FU に由来するものと考えられているが, ラットにおける代謝研究から 5-FU 以外の主要な抗菌性代謝物として 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 CPEFU と略す)(II) および 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 CPRFU と略す)(III)が単離同定されている⁵⁾。これらの中間代謝物 CPEFU(II) および CPRFU(III)は HCFU を投与したイヌ, ウサギおよびヒトの血清, 尿, リンパ液あるいは脳脊髄液中にも認められている⁶⁾。

HCFU の制癌活性は上述のようにこれから遊離されてくる 5-FU に由来するものであるが, 5-FU の遊離の経路としては HCFU から直接, あるいは中間代謝物を経ての双方が考えられる。従って HCFU 投与後の血中などにおけるこれら主要代謝物の濃度の追跡は HCFU の制癌活性との関連においてきわめて重要となる。一方, HCFU, CPEFU および CPRFU は 5-FU よりは弱い抗菌活性を有し, 5-FU からさらに生じる分解産物は抗菌活性を有しない。

また, 5-FUR あるいは 5-FUdR 等の代謝物は抗菌活性を有するがその存在割合は微々たるものである。

そこで我々はバイオアッセイ法によるこれら代謝物定量法を含めた体内濃度測定法について検討を行ったので報告する。

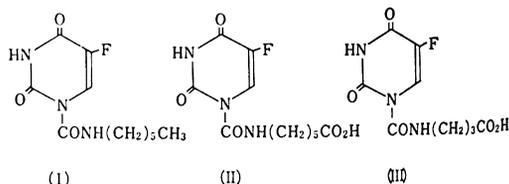
実験材料および方法

1. 標準物質および標識化合物

本研究に用いた 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) は三井東圧化学株式会社中央研究所で, 1-(5-carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU) および 1-(3-carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU) は三井製薬工業株式会社生物科学研究所で合成したものを, 5-fluorouracil (5-FU) は PCR 社(米国)から購入したものを使用した。

また標識化合物 1-hexylcarbamoyl-6-¹⁴C-5-fluorouracil (以下 6-¹⁴C HCFU と略す) は三井製薬工業株式会社生物科学研究所で合成したものを, 6-¹⁴C-fluorouracil (以下 6-¹⁴C-5-FU と略す) は New England Nuclear 社(米国)から購入したものを使用した。

Fig. 1 Chemical structures of HCFU (I), CPEFU (II) and CPRFU (III)



2. 実験動物および試料の採取

分析法の検討には正常ラット、イスおよびヒト血清と尿を用いた。また HCFU 投与後の血中濃度および代謝物濃度の測定はビーグル種雄性健常犬(体重 10~12 kg)(1群 5頭)を1夜絶食したのち、HCFU 錠剤を 10 mg/kg の割合で経口投与し、投与後 1, 2 および 3 時間に前脚部静脈から採血し、3,000 rpm で 10 分間遠心して得られた血清について行った。

3. 薬剤濃度測定

3.1 検定菌株および測定用培地

菌株は日本化学療法学会標準法により測定した最少発育阻止濃度(MIC)から、最も強い感受性を示した、*Staphylococcus aureus* 209 P 株を用い、検定培地として、ミュラーヒントン寒天培地(栄研)を用いた。

3.2 測定方法

検定菌を 10^8 コ/ml の濃度に混釈した培地 5 ml を直径 90 mm のプラスチックシャーレ(テルモ)に流し、水平台上で固化させたのち、ペーパーディスク法で薬剤濃度を測定した。ディスクは東洋沓紙社製の thin, 直径 8 mm のものを用い、ディスクに被験液 20 μ l または 40 μ l を浸み込ませたのち、30°C で 2 時間乾燥させ、測定用培地に貼付し、4°C で 3 時間予備拡散させたのち、37 で 1 夜培養後生じた阻止円直径を測定し、別に作成した 5-FU 検査線から各検体の濃度を求めた。

4. 放射能測定

血清および尿の分別試料は、その一定量に水溶性シンチレーター(DPO 4.0g, ジメチル POPOP 0.1g, トリトン X-100 333 ml, トルエン 667 ml) 10 ml を加え、また除タンパク操作後の残渣はその一定量を自動燃焼装置(Packard Model 306)を用い燃焼させ、液体シンチレーションカウンター(Nuclear Chicago Mark II)で放射能を測定した。

実験成績

1. 分別抽出法の検討

上述したとおり HCFU は経口投与後生体内で代謝を受け、CPEFU, CPRFU および 5-FU となり、5-FU がさらに α -fluoro- β -alanine にまで代謝されることがすでに知られている⁵⁾。

しかし、これら代謝物 CPEFU, CPRFU と 5-FU は、いずれも抗菌活性を有し、かつ HCFU, CPEFU および CPRFU はその物理化学的性状が類似していることが、バイオアッセイ法による分別定量を困難なものとしている。すなわち、HCFU は水に不溶であるが、クロロホルムに易溶であるのに反し、5-FU は水に易溶であり、クロロホルムには殆んど溶解しない。このことから、HCFU と 5-FU の混合物をクロロホルム抽出すること

Table 1 Distribution rate of HCFU, CPEFU, CPRFU and 5-FU between water and CHCl_3 layer

| | 5-FU | HCFU | CPEFU | CPRFU |
|---------------------------|------|------|-------|-------|
| Water layer (%) | 99 | 0.2 | 68.3 | 91.3 |
| CHCl_3 layer (%) | 1 | 99.8 | 31.7 | 8.7 |
| Total (%) | 100 | 100 | 100 | 100 |

Each value represents the mean from three experiments.

により、5-FU を水層に、HCFU をクロロホルム層に分別することが可能であるが、Table 1 に示すように、CPEFU と CPRFU は水およびクロロホルムに分配することがわかった。

このため種々分別法を検討した結果、アンバーライト XAD-2 樹脂を用いると、低 pH 域で 5-FU は樹脂に吸着されず、これに反し、HCFU, CPEFU と CPRFU が樹脂に吸着され、さらにアセトンで容易に樹脂から溶離することがわかったので、この方法による分別法を以下のように検討した。

1.1 アンバーライト XAD-2 樹脂に対する HCFU, CPEFU, CPRFU と 5-FU の挙動

予め塩酸を加えて酸性としたイス希釈血清に一定量の HCFU, CPEFU, CPRFU および 5-FU をそれぞれ添加し、アンバーライト XAD-2 カラムを通した。溶出液はそのまま、樹脂吸着物をアセトンで溶出し、濃縮後、5-N-水酸化ナトリウムで pH 11 とし、50°C の水浴中で 10 分間加水分解を行い、5-FU に転換させ、アンバーライト XAD-2 に対する吸着性および回収率を求め、成績を Table 2 に示した。

この結果、酸性条件下では HCFU, CPEFU および CPRFU はアンバーライト XAD-2 に定量的に吸着され、アセトンで容易に溶離されるが、5-FU はアンバーライト XAD-2 に吸着されずに溶出することがわかった。しかし、アンバーライト XAD-2 に吸着された HCFU, CPEFU および CPRFU を個別に分離することは、これらの物理化学的性状の類似性から困難であることがわか

Table 2 Behavior of HCFU, CPEFU, CPRFU and 5-FU on XAD-2 resin

| Compound | 5-FU | HCFU | CPEFU | CPRFU |
|--------------------|--------------|---------------|--------------|--------------|
| Non-adsorbed (%) | 95 | 1 | N. D | 1 |
| Adsorbed (%) | N. D | 104 | 98 | 96 |
| Total recovery (%) | 95 \pm 2.1 | 105 \pm 4.5 | 98 \pm 1.8 | 97 \pm 1.8 |

Each value represents the mean from three experiments.

Table 3 Time course of hydrolysis of HCFU, CPEFU and CPRFU to 5-FU

| | Time period for hydrolysis (min.) of | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-------|-------|-----|-----|-------|-----|-----|------|-----|
| | HCFU | | | | | | CPEFU | | | CPRFU | | | 5-FU | |
| | 0 | 0.5 | 3 | 5 | 10 | 15 | 0 | 5 | 10 | 0 | 5 | 10 | 0 | 10 |
| Parent compound (%) | 104 | 41 | 6 | 3 | 1 | N. D. | 98 | 1 | 1 | 96 | 1 | 1 | 95 | 96 |
| Released 5-FU (%) | 1 | 57 | 94 | 96 | 97 | 98 | N. D. | 95 | 94 | 1 | 103 | 92 | — | — |
| Total recovery (%) | 105 | 98 | 100 | 99 | 99 | 98 | 9.8 | 96 | 95 | 97 | 104 | 93 | 95 | 96 |
| ±S. E. | 4.5 | 3.2 | 2.3 | 1.8 | 2.0 | 1.8 | 1.8 | 1.9 | 1.9 | 1.8 | 5.0 | 2.3 | 2.1 | 2.3 |

Hydrolysis was performed at 50°C and pH 11.

Each value represents the mean from three experiments.

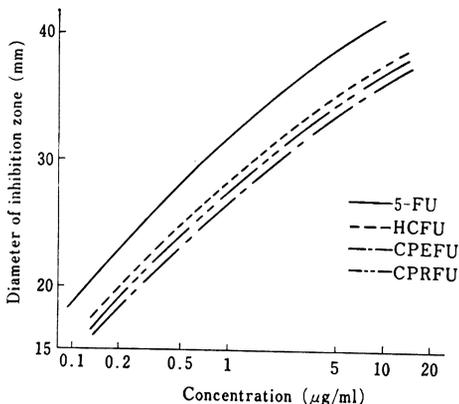
だったので、以後 HCFU とその代謝物を HCFU, CPEFU および CPRFU (以下 HCFU 画分と略す) と 5-FU に分別して測定することとした。

1.2 HCFU, CPEFU および CPRFU の加水分解

アンバーライト XAD-2 に対する吸着性を利用して生体試料中の HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別が可能となったが、Fig. 2 に示すとおり HCFU, CPEFU および CPRFU の抗菌活性が異なり、かつ HCFU 画分中の代謝物組成比が不明であることから、HCFU 画分を加水分解して 5-FU に転換させ、相当 5-FU 量として測定可能かどうか、これらの加水分解条件の検討を行った。すなわち、イヌ希釈血清に HCFU, CPEFU および CPRFU の一定量を添加し、5N-水酸化ナトリウムで pH 11 とし、50°C の水浴中で一定時間加水分解したのち、5N-塩酸で pH 2 とし、アンバーライト XAD-2 処理を行い、加水分解により生じた 5-FU と残存する HCFU, CPEFU および CPRFU を分離した。残存する HCFU, CPEFU および CPRFU はさらに加水分解して完全に 5-FU に転換させ、加水分解率および回収率を求めた。成績を Table 3 に示した。

この結果、HCFU, CPEFU および CPRFU は pH 11,

Fig. 2 Standard curves of 5-FU, HCFU, CPEFU and CPRFU by disc method: *Staph. aureus* 209 P



50°C で 5~10 分間加水分解することにより、定量的に 5-FU に転換されることがわかった。また、この加水分解条件では 5-FU の分解は認められなかったため、アンバーライト XAD-2 で分別した HCFU 画分は加水分解後相当 5-FU 量として測定することとした。

1.3 ペンバーディスク法における検出感度の向上

ディスク法にて得られた 5-FU の検量線を Fig. 2 に示した。検出感度は 0.1 μg/ml でカップ法に比べ約 1/10 であったが、0.1~25 μg/ml の濃度範囲で測定可能であることから高濃度試料の測定に適している。しか

Table 4 Effect of concentration rate of sample on detection of 5-FU

| Concentration of 5-FU added (μg/ml) | Detected concentration of 5-FU (μg/ml) | | |
|-------------------------------------|--|-------|------|
| | Concentration rate (fold) | | |
| | 1 | 2 | 4 |
| 0.025 | N. D. | N. D. | 0.10 |
| 0.05 | N. D. | 0.10 | 0.21 |
| 0.10 | 0.10 | 0.21 | 0.41 |
| 0.20 | 0.21 | 0.40 | 0.84 |

Each value is that as 20 μl of a sample was applied per disc.

The lower limit of detection was 0.1 μg/ml.

Table 5 Effect of the sample volume spotted per disc on detection of 5-FU

| Concentration of 5-FU added (μg/ml) | Detected concn. of 5-FU (μg/ml) | |
|-------------------------------------|-------------------------------------|------|
| | Sample volume spotted per disc (μl) | |
| | 20 | 40 |
| 0.05 | N. D. | 0.10 |
| 0.10 | 0.10 | 0.21 |
| 0.20 | 0.20 | 0.40 |

The lower limit of detection in samples was 0.1 μg/ml when 20 μl of a sample was spotted per disc.

Table 6 Recovery of HCFU fraction and 5-FU from various animal sera

| Animal | Fraction | | Total recovery(%) |
|-------------|----------|---------|-------------------|
| | 5-FU(%) | HCFU(%) | |
| Rat (n=3) | 99±8 | 105±1 | 102±3 |
| Dog (n=4) | 108±3 | 107±6 | 107±4 |
| Human (n=4) | 115±3 | 93±2 | 99±3 |

Each value represents the mean±S.E. from three or four experiments.

Table 7 Effects of drug concentration in dog serum on recovery rate after fractionation

| Concentration of compounds added | Recovery of fractions (%) | | Total recovery(%) |
|----------------------------------|---------------------------|---------|-------------------|
| | 5-FU(%) | HCFU(%) | |
| I (n=4) | 108±3 | 107±6 | 107±4 |
| II (n=4) | 104±3 | 89±3 | 91±3 |
| III (n=3) | 107±3 | 93±4 | 99±2 |

Each value represents the mean±S.E.

Compounds were added to 2 ml of dog serum as below :

- I, 5-FU 0.2 μg, HCFU, CPEFU and CPRFU 0.3 μg each
 II, 5-FU 1.0 μg, HCFU, CPEFU and CPRFU 2.0 μg each
 III, 5-FU 5.0 μg, HCFU, CPEFU and CPRFU 10.0 μg each

Table 8 Comparison of recovery rates of HCFU and 5-FU by means of bioassay and radioisotope method

| Compound | 5-FU | | HCFU | |
|--------------|----------|--------------|----------|--------------|
| | Bioassay | Radioisotope | Bioassay | Radioisotope |
| Single soln. | 106±0.5 | 93±0.3 | 88±3 | 87±3 |
| Mixed soln. | 105±1.8 | 95±1.2 | 92±2 | 90±2 |

Each value represents and mean±S.E. from three experiments.

し、低濃度試料については検出感度を向上させるため、試料の濃縮およびペーパーディスクに浸み込ませる試料量についての検討を行い、成績を Table 4 および 5 に示した。この結果、低濃度試料については試料を濃縮し、かつペーパーディスクに浸み込ませる量を増量することにより、カップ法と同等の検出感度 (0.01 μg/ml) まで測定可能となった。

1.4 各種血清中の HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別抽出

Table 9 Recovery of HCFU fraction and 5-FU from various animal urines

| Animal | Concentration of compound added | Recovery of fractions (%) | | Total recovery (%) |
|--------|---------------------------------|---------------------------|-------|--------------------|
| | | 5-FU | HCFU | |
| Rat | I (n=3) | 125±2 | 100±2 | 102±2 |
| | II (n=3) | 107±1 | 89±2 | 94±2 |
| Dog | I (n=3) | 113±4 | 97±8 | 102±5 |
| | II (n=3) | 108±2 | 87±2 | 94±2 |
| Human | III (n=3) | 118±2 | 83±1 | 89±1 |

Each value represents the mean±S.E.

Compounds were added to 2 ml of urine as below:

- I, 5-FU 0.2 μg, CPEFU and CPRFU 0.5 μg each
 II, 5-FU 5.0 μg, CPEFU and CPRFU 15 μg each
 III, 5-FU 4.0 μg, CPEFU and CPRFU 20 μg each

上記の結果にもとづき、イヌ、ラットおよびヒト正常血清に一定量の HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU を添加して、HCFU 画分と 5-FU の分別を行い回収率を求め成績を Table 6 および 7 に示した。この結果、HCFU 画分と 5-FU の分別は、動物種差および薬剤濃度に関係なく、満足すべきものであった。

さらに 6-¹⁴C-5-FU と 6-¹⁴C-HCFU を用いて本法の追試を行ったところ、Table 8 に示すようにバイオアッセイ法の測定結果とよく一致した。

1.5 尿中 CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別抽出

HCFU 経口投与後のラット⁵⁾、イヌ⁶⁾およびヒト⁶⁾尿中には血中と同様に CPEFU および CPRFU と 5-FU が存在することが知られている。

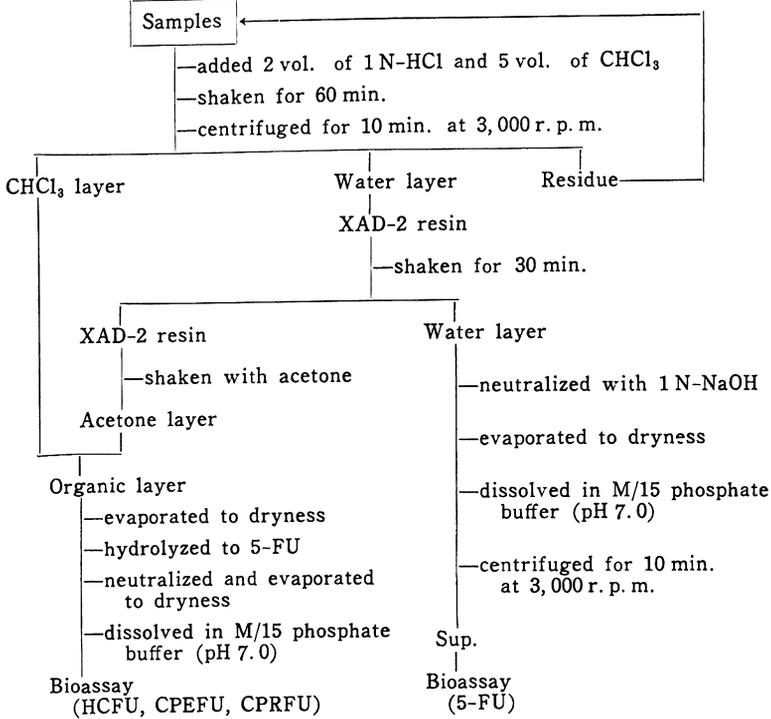
尿中 CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別を血中と同様操作を行い検討した。すなわち、各種動物の正常尿に一定量の CPEFU および CPRFU と 5-FU を添加し、アンバーライト XAD-2 樹脂処理を行って、HCFU 画分と 5-FU に分画したのち、各濃度を測定した。成績を Table 9 に示したが、尿中の CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別は、除蛋白操作が不要であることから、きわめて容易であることがわかった。

体液中 HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別定量法

上記の結果にもとづき、HCFU 経口投与後の体液中分別抽出法を以下のように定めた。

すなわち、血清あるいはリンパ液 2 ml に 2 倍量の N-塩酸および 5 倍量のクロロホルムを添加して 60 分間振盪後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して、クロロホルム層および水層を分取する。この水層に 2 ml のアンバーライト XAD-2 樹脂を添加し、30 分間振盪後、樹脂と水層を分取し、樹脂を 5 ml の水でよく洗滌し、洗液を先に分取した水層に加えた後、N-水酸化ナトリウムで

Fig. 3 Fractionation procedure for HCFU and its metabolites



中和し、減圧下 40°C 以下で濃縮乾固する (5-FU 画分)。次いで樹脂を 10 ml のアセトンと 30 分間振盪した後、アセトン層を沭取し、樹脂を 5 ml のアセトンでよく洗滌する。アセトン沭液および洗液を先に分取したクロロホルム層に加え、減圧下 40°C 以下で濃縮した後、N-水酸化ナトリウムで pH 11 とし、水浴中 50°C で 10 分間加水分解する。加水分解液を N-塩酸で中和し、減圧下 40°C 以下で濃縮乾固する。(HCFU 画分) HCFU 画分および 5-FU 画分を一定量の 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させたのち、その 20 μ l あるいは 40 μ l をペーパーディスクに浸み込ませ、バイオアッセイ法で濃度測定を行う。

また尿、腹水および脳脊髄液の場合には塩酸-クロロ

ホルム抽出を行わず、試料を直接アンバーライト XAD-2 樹脂による分別を行った後、HCFU 画分と 5-FU 濃度の測定を行う。

以上の標準操作法を Fig. 3 に示した。

2. HCFU 経口投与後のイヌ血中濃度

HCFU 錠剤を 10 mg/kg の割合で経口投与したイヌ血中濃度の経時的推移を、上述した分別定量法を用いて測定し、成績を Table 10 および Fig. 4 に示した。この結果、HCFU 経口投与後のイヌ血中における HCFU 画分および 5-FU 濃度は、投与後すみやかにピークに達するが、血中からの消退は極めて早く、両画分の消退パターンは互いに相似したものであった。

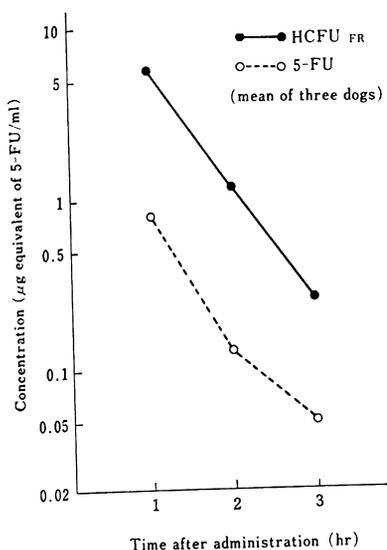
3. HCFU とその代謝物の分離定量

Table 10 Serum levels of 5-FU and HCFU fraction after oral administration of HCFU (10 mg/kg) to dogs

| Dog No. | Time after administration (hr) | | | | | |
|------------------|--------------------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| | 1 | | 2 | | 3 | |
| | 5-FU (μ g/ml) | HCFU fr. (μ g/ml) | 5-FU (μ g/ml) | HCFU fr. (μ g/ml) | 5-FU (μ g/ml) | HCFU fr. (μ g/ml) |
| 1 | 1.03 | 7.20 | 0.16 | 1.10 | 0.06 | 0.32 |
| 2 | 0.81 | 6.30 | 0.22 | 1.82 | 0.06 | 0.35 |
| 3 | 0.57 | 3.22 | 0.04 | 0.57 | 0.02 | 0.10 |
| Mean \pm S. E. | 0.80 \pm 0.13 | 5.57 \pm 1.21 | 0.13 \pm 0.06 | 1.16 \pm 0.36 | 0.05 \pm 0.01 | 0.26 \pm 0.08 |

Each value was represented as μ g equivalent of 5-FU per ml serum.

Fig. 4 Serum levels of 5-FU and HCFU fraction after oral administration of HCFU (10 mg/kg) to dogs



アンバーライト XAD-2 樹脂を用いる分別抽出法は、HCFU およびその代謝物を、HCFU 画分と 5-FU に 2 分して測定するため、体液中の HCFU, CPEFU および CPRFU のそれぞれの濃度の知見は得られない。

そこで、HCFU 画分中の各成分濃度を測定するため、種々分離法の検討を行ったが、薄層クロマトグラフィーで分離したのち、各成分を定量する方法が最もよいことがわかったので、以下この方法について検討を行った。

3.1 薄層クロマトグラフィーによる HCFU, CPEFU および CPRFU の分離定量法

各種濃度の HCFU, CPEFU および CPRFU の一定量を、それぞれ薄層(Kieselgel₆₀F₂₅₄, 5×20cm, Merck)上にスポットし、クロロホルム-メタノール-酢酸 (18:2:1 v/v) 溶媒で展開後、標品に相当する R_f 値部位をかきとり、HCFU はクロロホルム-アセトン (9:1 v/v) 10 ml, CPEFU および CPRFU はメタノール-アセトン (3:1 v/v) 10 ml, その他の部位はメタノール-アセトン (9:1 v/v) 10 ml でそれぞれ抽出し、濃縮後加水分解して相当する 5-FU に転換させ、バイオアッセイ法で薬剤濃度を測定した。Fig. 5 に各薬剤のクロマトグラムを、また Table 11 に薄層からの各薬剤の回収率を示した。

この結果、HCFU, CPEFU および CPRFU の薄層からの回収が満足すべきものであったので、これら薬剤をそれぞれ 5 µg ずつ含有する混液を薄層クロマトグラフィーで分離し、抽出、加水分解後、各成分の定量を行ってその成績を併せて Table 11 に示した。

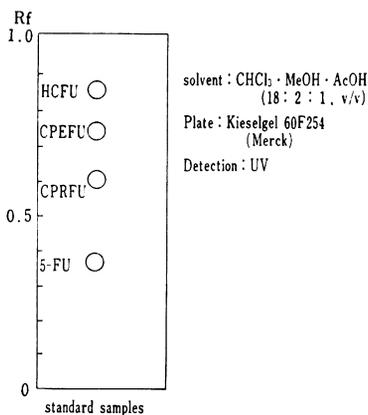
以上の結果から、HCFU 画分中の HCFU, CPEFU および CPRFU 濃度は、薄層クロマトグラフィーとバイ

Table 11 Recoveries of HCFU, CPEFU and CPRFU with thin layer chromatography

| Compound | Applied (µg) | Recovery of (%) | | | |
|------------------|--------------|-----------------|--------|--------|--------|
| | | HCFU | CPEFU | CPRFU | Total |
| HCFU (n=3) | 1 | 101 ± 5 | | | |
| | 5 | 97 ± 3 | | | |
| | 10 | 99 ± 8 | | | |
| CPEFU (n=3) | 1 | | 92 ± 3 | | |
| | 5 | | 98 ± 4 | | |
| | 10 | | 87 ± 5 | | |
| CPRFU (n=3) | 1 | | | 89 ± 3 | |
| | 5 | | | 88 ± 3 | |
| | 10 | | | 86 ± 3 | |
| Mixture of (n=3) | HCFU | 5 | 98 ± 2 | | 92 ± 2 |
| | CPEFU | 5 | | 97 ± 2 | |
| | CPRFU | 5 | | 81 ± 2 | |

Each value represents the mean ± S.E.

Fig. 5 A thin layer chromatogram of HCFU and its metabolites



オアッセイ法を併用することにより測定可能であることが判明した。

3.2 HCFU 経口投与後のイヌ血中代謝物濃度

HCFU 経口投与後のイヌ血清を上述した分別抽出法を用いて、HCFU 画分と 5-FU に分画し、HCFU 画分をさらに薄層クロマトグラフィーで分離後、各代謝物濃度を測定し、成績を Table 12 および Fig. 6 に示した。

血中においては HCFU と CPEFU がほぼ同じ濃度水準を示し、次いで CPRFU, 5-FU の順であった。

HCFU およびその代謝物濃度の経時的推移パターンは、いずれもほぼ平行関係にあり、比較的短時間に血中から消退するのが認められた。

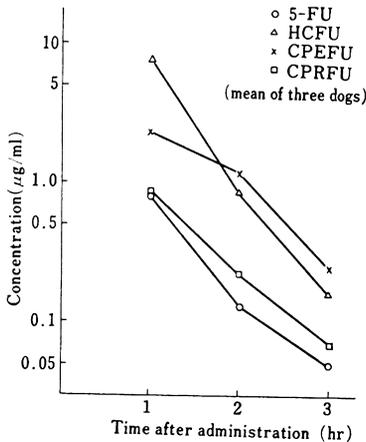
考察および結論

HCFU は生体内において、抗菌活性の異なる代謝物、5-FU, CPEFU および CPRFU に代謝され排泄される

Table 12 Serum levels of HCFU, CPEFU and CPRFU after oral administration of HCFU (10 mg/kg) to dogs

| Time after administration (hr) | Compound | Concentration ($\mu\text{g/ml}$) | | | | Mean \pm S. E |
|--------------------------------|----------|------------------------------------|-------|------|-----------------|-----------------|
| | | Dog No. | | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | | |
| 1 | HCFU | 8.21 | 11.10 | 3.83 | 7.72 \pm 2.1 | |
| | CPEFU | 4.82 | 0.99 | 1.13 | 2.31 \pm 1.3 | |
| | CPRFU | 1.18 | 0.23 | 1.10 | 0.84 \pm 0.3 | |
| 2 | HCFU | 1.10 | 1.02 | 0.40 | 0.84 \pm 0.2 | |
| | CPEFU | 1.05 | 1.79 | 0.63 | 1.16 \pm 0.4 | |
| | CPRFU | 0.07 | 0.52 | 0.08 | 0.22 \pm 0.2 | |
| 3 | HCFU | 0.13 | 0.28 | 0.06 | 0.16 \pm 0.1 | |
| | CPEFU | 0.33 | 0.31 | 0.08 | 0.24 \pm 0.1 | |
| | CPRFU | 0.13 | 0.04 | 0.04 | 0.07 \pm 0.03 | |

Fig. 6 Serum levels of HCFU and its metabolites after oral administration of HCFU (10 mg/kg) to dogs



ことがすでに知られている⁵⁾。

本来、薬剤の体内濃度を測定する場合、各代謝物濃度をそれぞれ測定するのが最も望ましいが、バイオアッセイ法での分別定量は種々な制約により困難な場合が多い。

しかし、種々検討の結果、酸性条件下でアンバーライト XAD-2 樹脂に対する吸着性を利用することにより、HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU の分別が可能となり、抗菌活性の異なる HCFU, CPEFU および CPRFU は加水分解後 5-FU 相当量として測定することが出

来た。しかし、アンバーライト XAD-2 樹脂による分別抽出法では HCFU, CPEFU および CPRFU を一括して測定するため、体液中のこれら薬剤濃度についての知見は得られず、さらに分別法と薄層クロマトグラフィーを併用して、各代謝物濃度を測定する方法について検討した結果、体液中に存在する不純物の影響をうけずに各代謝物濃度の測定が可能であることがわかった。

以上の結果から、HCFU 経口投与後の体内濃度測定に関し、以下の結論を得た。

1. 体液中の HCFU およびその代謝物はアンバーライト XAD-2 樹脂を用いて、HCFU, CPEFU および CPRFU と 5-FU に分別抽出したのち、HCFU 画分を加水分解して 5-FU に転換させ、相当する 5-FU 量として測定することが出来る。この場合の測定限界は血清 2.5 ml を用いた場合、HCFU 0.02 $\mu\text{g/ml}$ および 5-FU 0.01 $\mu\text{g/ml}$ である。

2. 体液中の HCFU, CPEFU および CPRFU 濃度は分別抽出後、薄層クロマトグラフィーで分離定量することが出来る。

謝 辞

本研究に御協力いただいた三十尾正枝氏に深謝いたします。

文 献

- OZAKI, S.; Y. IKE, H. MIZUNO, K. ISHIKAWA & H. MORI: The synthesis of 1-carbamoyl-5-fluorouracil. Bull. Chem. Soc. Jap. 50(9): 2406, 1977
- 飯郷正明, 星 昭夫, 中村朝子, 樽谷和男: 1-フルキルカルバモイル-5-フルオルウラシル誘導体の化学構造と抗癌活性の関係。日本癌学会第35回総会, 1976
- HOSHI, A.; M. IIGO, A. NAKAMURA, M. INOMATA & K. KURETANI: Antitumor activity of 1-alkylcarbamoyl derivatives of 5-fluorouracil against L 1210 leukemia. Chem. Pharm. Bull. 26(1): 161, 1978
- 星 昭夫, 飯郷正明, 中村朝子, 樽谷和男: 1-ヘキシルカルバモイル-5-フルオルウラシルの Lewis 肺癌, B-16 メラノーマに対する抗腫瘍効果。日本癌学会第36回総会, 1977
- KOBARI, T.; K. TAN, M. KUMAKURA, S. WATANABE, I. SHIRAKAWA, H. KOBAYASHI, A. UZUHE, Y. MIYAMA, H. NAMEKAWA & H. YAMAMOTO: Metabolic fate of 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in rats. Xenobiotica 8(9): 547, 1978
- 未発表

PROCEDURE FOR DETERMINATION OF HCFU AND ITS METABOLITES IN BODY FLUIDS

SHUJI WATANABE, KENJI MORI, HITOSHI MISONO and YOSHITSURU YOKOYAMA
Institute of Biological Science, Mitsui Pharmaceuticals Inc.

Studies on the assay procedure for HCFU and its metabolites concentration in body fluids were carried out using *Staphylococcus aureus* 209 P as the indicator organism, and the following results were obtained.

1) 5-FU was extracted from body fluids with dil-HCl and then separated from HCFU, CPEFU and CPRFU using Amberlite XAD-2.

The fraction containing HCFU, CPEFU and CPRFU was subjected to hydrolysis so that these compounds were converted to 5-FU.

HCFU, CPEFU and CPRFU were determined as a whole on a calculation curve for 5-FU.

The lower limit of detection was 0.01 $\mu\text{g/ml}$.

2) By combination of fractionation technic with Amberlite XAD-2 resin and thin layer chromatography, HCFU, CPEFU and CPRFU in body fluids could be determined separately.