

新抗腫瘍性化合物 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil

(HCFU) の臓器内濃度測定法

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化学研究所

(昭和 55 年 3 月 8 日受付)

1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (以下, HCFU と略す) 投与後の臓器内濃度測定を, *Staphylococcus aureus* 209 P 株を検定菌とするバイオアッセイで行なった場合, ある特定臓器(肝臓, 胃および小腸など)では, 5-FU 画分の阻止円がきわめて不明瞭となり, また実際の濃度に相当する阻止円直径よりも小さな径の阻止円となるため, 正確な濃度測定が出来ないことがわかった。

そこで我々はこの現象の解決方法についての検討を行ない, HCFU 投与後の臓器ホモジネートを, アンバーライト XAD-2 樹脂を用いて分画したのち, 5-FU 画分(水層)をさらにプロペノールエーテル混液中に抽出し, 5-FU を溶媒層に移行させたのち, バイオアッセイを行なうことにより, 阻止円の不明瞭化および縮小の影響をうけずに, これら臓器内 5-FU を $0.05 \mu\text{g/g}$ まで測定出来る方法を確認した。

緒 言

先に我々は, HCFU の体液内濃度測定法の研究を行ない, HCFU および 5-FU を含む代謝物を, アンバーライト XAD-2 樹脂を用いて分別定量する方法について報告した¹⁾。

HCFU 投与後の吸収, 分布および排泄をバイオアッセイ法で検討するにあたり, 臓器内濃度を測定する必要性が生じたが, 既報¹⁾の体液内濃度測定法を適用した場合に, ある特定臓器(たとえば肝臓, 胃および小腸など)においては, 5-FU 濃度が低い場合, バイオアッセイ時において阻止円の不明瞭化あるいは阻止円直径の縮小などの現象が認められ, 正確な濃度測定が出来ないことがわかった。

この現象は 1-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (以下, FT-207 あるいは FH) 投与後のラット臓器内濃度測定時²⁾あるいはヒト臓器内濃度測定時³⁾にも認められており, 我々も HCFU あるいは FH 投与後のヒトあるいは実験動物の臓器内濃度測定時にしばしば経験している。

¹⁴C-HCFU を用いたラットにおける吸収, 代謝および排泄の研究⁴⁾から, 臓器によって 5-FU 濃度が低値を示す場合があることが予測された。

そこで上記現象の影響をうけずに, 低濃度の 5-FU を測定する方法について検討を行ない, 満足すべき結果を得た。

さらに, その後の HCFU の代謝の研究から^{5,6)}, 1-(5-Hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下, HHCPU と略す) および 1-(5-Oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (以下 OHCFU と略す) が新たに同定されたが, 我々の測定法では, これら化合物はいずれも HCFU 画分中に定量的に移行することを確認した。

また, この方法を用いて HCFU 投与後のラット肝臓, 胃および小腸中の薬剤濃度を経時的に測定したので, 併せて報告する。

I. 臓器内 5-FU 濃度測定方法の検討および新代謝物 HHCPU と OHCFU の挙動

HCFU 投与後の臓器内濃度測定時に派生する阻止円の不明瞭化あるいは縮小の原因解明と 5-FU 濃度測定方法の確立を目的とし, さらに新代謝物, HHCPU および OHCFU の挙動について, 以下の実験を行った。

実験材料および方法

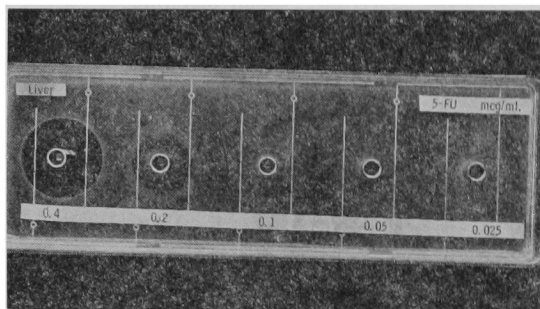
1. 使用薬剤

1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) は, 三井東圧化学株式会社中央研究所で, 1-(5-Hydroxyhexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (HHCPU) および 1-(5-Oxohexylcarbamoyl)-5-fluorouracil (OHCFU) は三井製薬工業株式会社生物化学研究所で合成したものをを用いた。

また 5-Fluorouracil (以下, 5-FU と略す) は PCR 社(米国)から購入したものをを使用した。

Fig.1 Correlation of 5-FU concentration and inhibition zone in organ homogenates

a) liver



b) small intestine

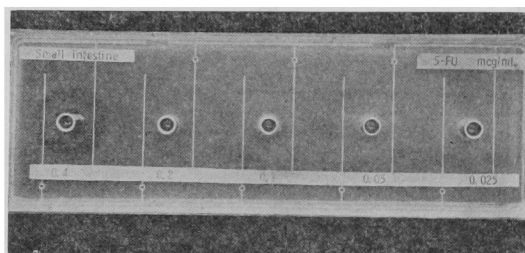
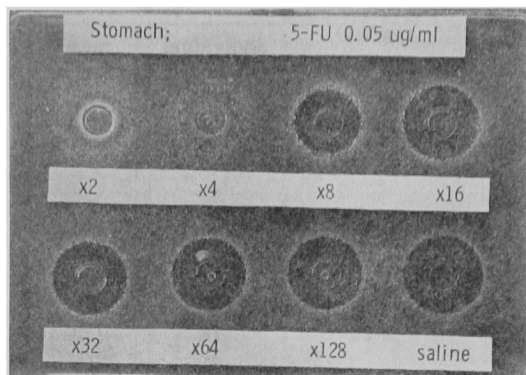
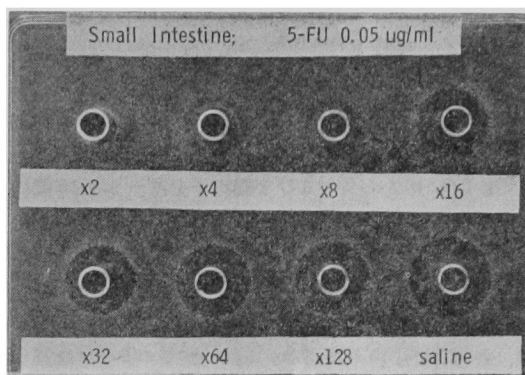


Fig.2 Correlation of dilution of organ homogenates and inhibition zone

a) stomach



b) small intestine



2. 実験動物および試料の採取

7週令の S.D 系雄性ラットを1週間予備飼育し(体重 160~180 g), 1夜絶食後, 頸部静脈を切断して放血させ, 胃, 小腸および肝臓を摘出したのち, 生理食塩水で充分洗浄したのち実験に使用した。

3. 臓器ホモジネートの調製

摘出臓器に数滴の 1 N-塩酸を加えて細切し, 少量の海砂とともに乳鉢でよく磨砕したのち, 臓器重量と同量の 1 N-塩酸および3倍量のクロロホルムを添加して, 1時間振盪した。3,000 rpm で10分間遠心分離して, 水層を分離した。この水層を臓器 1 g あたり 1 ml となるように調製して, 以下の臓器内濃度測定方法の検討に用いた。

4. 5-FU 濃度測定方法

5-FU 濃度の測定は *Staphylococcus aureus* 209 P 株を検定菌とする薄層平板ディスク法により行った。

すなわち, 検定菌を 10^8 /ml に混釈したミューラーヒントン寒天培地(栄研) 5 ml を直径 90 mm のプラスチックシャーレ(テルモ)に流し込み, 水平台上で固化させて薄層平板を作成した。

ペーパーディスク(東洋汙紙, thin, 直径 8 mm)に被験液 20 μ l または 40 μ l を浸み込ませたのち, 30℃ で乾燥させ, 薄層平板上に貼布し, 4℃ 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 標準検量線から各検体の濃度を算出した。

実験成績

1. 5-FU 測定値に及ぼす臓器ホモジネートの影響

ラット肝臓および小腸ホモジネートに一定量の 5-FU を添加したのち, バイオアッセイを行ない, 5-FU 濃度と阻止円の関係を調べた。

この成績を Fig.1-a, b に示したが, いずれの場合においても, 5-FU 濃度が 0.4 μ g/g では明瞭な阻止円を与え, かつ添加 5-FU 濃度に相当する阻止円直径を示したのに反し, これ以下の濃度では阻止円が不明瞭となり, かつ添加 5-FU に相当する阻止円より小さな直径を示すことがわかった。

そこでこの現象が臓器ホモジネートに由来するものかどうかを確認するために, 胃および小腸ホモジネートを生理食塩水で2倍から128倍まで希釈したのち, 5-FU

Table 1 Recoveries of 5-FU from organ homogenates

Concentration of 5-FU added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery rate (%)					
	Liver		Stomach		Small intestine	
	individual	mean	individual	mean	individual	mean
0.05	N. D*		N. D		N. D	
	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D	N. D
	N. D		N. D		N. D	
0.10	36		24		21	
	36	35	20	20	18	20
	33		22		21	
0.20	70		60		58	
	78	73	69	64	58	57
	71		63		55	
0.40	93		91		95	
	98	94	97	95	99	98
	90		97		100	

* Not Detected

を 0.05 $\mu\text{g/ml}$ となるように添加し、生理食塩水を対照として、阻止円の明瞭性と直径を比較した。この成績を Fig. 2-a, b に示した。

Fig. 2-a, b から胃および小腸ホモジネートを 16 倍以上に希釈すると、阻止円直径の著明な縮少は起こらず、鮮明な阻止円を与えるが、これ以下の希釈では阻止円が不明瞭となり、かつ阻止円直径の縮少が認められた。

そこで上記現象を数値として表わすため、ラット肝臓、胃および小腸ホモジネートに一定量の 5-FU を添加して、添加 5-FU 濃度と検出 5-FU 濃度測定値の関係を調べた。この成績を Table 1 に示したが、5-FU 濃度が 0.05 $\mu\text{g/g}$ では、いずれの臓器においても阻止円は全く検出されず、5-FU 濃度が高くなるに従って測定値が計算値に近づく傾向が認められ、5-FU 濃度が 0.4 $\mu\text{g/g}$ で初めて鮮明な阻止円を与え、かつ測定値と計算値が一致した。

上記の結果から、肝臓、胃および小腸ホモジネート中には、明らかにバイオアッセイで 5-FU 濃度を測定する際に、阻止円の不明瞭化および縮少に関与する物質が存在することが推察された。ちなみに上記現象は他の臓器（たとえば肺臓、心臓、大脳および生殖器など）では認められなかった。

2. 臓器ホモジネートから 5-FU の溶媒抽出条件の検討

低濃度の臓器内 5-FU を測定するためには、臓器ホモジネートから 5-FU を選択的に抽出分離する必要がある。このためには種々の方法が考えられるが、我々は

J. L. COHEN ら¹⁾および D. S. SITA ら²⁾が 5-FU の理化学的測定に用いた抽出方法を参考にして、臓器ホモジネート中の 5-FU を選択的に溶媒抽出する方法について検討を行なった。

2.1 臓器ホモジネートの pH と抽出溶媒

ラット肝臓ホモジネート 2 ml (肝臓 2 g 相当量) に

Table 2 Effect of pH on recovery of 5-FU from liver homogenate with two solvent systems

State (pH)	Recovery rate (%)			
	Solvent system			
	A*		B**	
	individual	mean	individual	mean
Acidic (2)	85		69	
	85	84	69	71
	83		73	
Neutral (7)	83		80	
	85	84	79	78
	83		75	
Basic (11)	4			
	5	5	N. T***	N. T
	5			

* propanol-ether (16 : 84 v/v)

** isopropanol-chloroform (25 : 75 v/v)

20 ml of each solvent system were used.

*** Not tested

1 μg の 5-FU を添加し、抽出溶媒として、

a) プロパノール-エーテル混液 (16:84 v/v)¹⁾

b) イソプロパノール-クロロホルム混液 (25:27 v/v)²⁾

の 2 種類の溶媒系を用い、さらに溶媒抽出時の肝臓ホモジネートの pH をかえ、溶媒層に抽出される 5-FU 量の関与を調べた。この成績を Table 2 に示したが、上記の 2 種類の溶媒ではイソプロパノール-クロロホルム混液より、プロパノール-エーテル混液のほうが肝臓ホモジネート中の 5-FU の抽出には適しており、肝臓ホモジネートを中性ないし酸性として抽出するのが好ましいことがわかった。

この方法で肝臓ホモジネートから抽出した 5-FU 濃度をバイオアッセイ法で測定すると、従来認められた阻止円の不明瞭化は著しく軽減することができ、5-FU の抽出率は約 85% と良好であることがわかったので、以後の実験はすべて、臓器ホモジネートの pH を中性とし、抽出溶媒としてプロパノール-エーテル混液を用いることとした。

2.2 臓器ホモジネートの希釈効果

ラット小腸ホモジネート 1 ml (小腸 1 g 相当量) に 0.1 μg の 5-FU を添加し、減圧下濃縮乾燥したのち、残渣を 1, 2, 4 および 6 ml の 0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) にけん濁させ、20 ml のプロパノール-エーテル混液で 5-FU を抽出し、溶媒層に抽出される 5-FU 量を求めた。この成績を Table 3 に示したが、プロパノール-エーテル混液 20 ml を用いた場合、酢酸緩衝液を増量するに従い、溶媒層に抽出される 5-FU 量が減少することがわかった。このためプロパノール-エーテル混液抽出に供する臓器ホモジネートの液量を臓器 1 g 当り 1 ml とするのが適当であることがわかった。

2.3 硫酸ナトリウム添加量

J. L. COHEN ら⁷⁾ は血清中の 5-FU 無水硫酸ナトリウム共存下で抽出しているが、これは塩析効果により、溶媒層への 5-FU の移行を容易とするためと考えられる。

そこで臓器ホモジネートに添加する無水硫酸ナトリウム量と溶媒層に抽出される 5-FU の関係を調べるため、

Table 3 Dilution effect of organ homogenate on the recovery of 5-FU

Dilution rate (fold)	Recovery rate (%)	
	individual	mean
1	80, 75, 76, 79, 80	78
2	72, 78, 75, 74, 76	75
4	45, 45, 46, 44, 40	44
6	27, 33, 35, 35, 35	33

Table 4 Effects of Na_2SO_4 or $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the recovery of 5-FU added to the small intestine homogenate

Salts	(g)	Recovery rate (%)	
		individual	mean
None	—	65	62
		62	
		60	
Na_2SO_4	0.5	74	74
		70	
		78	
	1.0	80	83
		85	
		85	
	2.0	86	84
		83	
		83	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1.0	58	62
		63	
		65	
	2.0	57	60
		59	
		64	

小腸ホモジネート 1 ml (小腸 1 g 相当量) に 0.1 μg の 5-FU を添加したのち、無水硫酸ナトリウムをそれぞれ 0.5 g, 1.0 および 2.0 g ずつ添加したのち、プロパノール-エーテル混液 20 ml で 5-FU を抽出し、添加無水硫酸ナトリウム量と 5-FU 抽出率の関係をみた。この成績を Table 4 に示したが、無添加の場合にくらべて、無水硫酸ナトリウムを 1 g 以上添加することにより、明らかに 5-FU の抽出率が向上することがわかった。

また無水硫酸ナトリウムの代りに、硫酸アンモニウムを用いた場合には、無添加の場合とほとんど差はなかった。

2.4 溶媒組成比

臓器ホモジネート中の 5-FU をプロパノール-エーテル混液で抽出する場合でも、5-FU 濃度が 0.05 $\mu\text{g/g}$ 以下の濃度では、阻止円が不明瞭となり正確な濃度測定が出来ないことがある。

そこでプロパノール-エーテル混合中のプロパノール含量の変化と 5-FU 抽出率および阻止円の明瞭性について検討した。この成績を Table 5 に示した。

この結果、プロパノール-エーテル混液中のプロパノール

Table 5 Effect of propanol-ether ratio on the recovery of 5-FU added to small intestine homogenates

Concentration of 5-FU added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery rate (%)							
	Propanol-ether ratio (v/v)							
	10 : 90		15 : 85 (16 : 84)*				20 : 80	
	individual	mean	individual	mean	individual	mean	individual	mean
0.05	54		84		(84)		55	
	54	55	83	83	(83)	(84)	59	60
	57		83		(84)		65	
0.10	55		84		(81)		57	
	57	55	85	84	(82)	(82)	57	58
	53		84		(82)		59	

* Ratio reported by J. L. COHEN

Table 6 Recovery of 5-FU added to some organ homogenates by means of propanol-ether extraction method

Concentration of 5-FU added ($\mu\text{g/ml}$)	Recovery rate (%)					
	Liver		Stomach		Small intestine	
	individual	mean	individual	mean	individual	mean
0.05	75		110		95	
	79	78	110	113	94	93
	80		118		91	
0.10	78		99		99	
	78	78	105	103	92	97
	79		105		100	
0.20	76		95		75	
	75	75	98	97	79	78
	75		99		80	

ル含量を減少させると、阻止円は鮮明となるが阻止円直径は計算値より小さくなる。これは溶媒層への5-FU抽出率の低下に起因するものと考えられた。

これに反して、プロパノール含量を増加させると阻止円の不明瞭化が起り、正確な濃度測定が困難となる傾向が認められることから、バイオアッセイ時に阻止円の不明瞭化および縮小に関与すると考えられる物質はプロパノールに可溶性であると推察され、本実験の結果からはプロパノールとエーテルの比率は15:85が最も効果的であると判断された。

2.5 臓器内5-FU濃度の測定

上記実験成績から、臓器ホモジネート中の5-FU濃度の測定は、アンバーライト XAD-2 樹脂で分画後の5-FU画分(水層)をプロパノールエーテル混液で抽出したのち測定することにより、従来、阻止の不明瞭化あるいは縮小等により測定出来なかった臓器(肝臓、胃および

小腸など)でも、5-FU濃度として0.05 $\mu\text{g/g}$ まで測定可能であることがわかった。

そこでラット肝臓、胃および小腸ホモジネートに種々濃度の5-FUを添加し、後述した臓器内濃度測定法に準拠して、添加5-FU量に対する検出5-FU量を求め、この成績をTable 6に示した。

この結果、従来、正確な濃度測定が出来なかった、肝臓、胃および小腸などの臓器内5-FU濃度が0.05 $\mu\text{g/g}$ まで測定可能となり、Table 1に示したとおり、プロパノールエーテル混液による抽出を行わず、臓器ホモジネートを直接測定した場合に比べて、きわめて良好な成績を得た。

3. 新代謝物 HHCFU および OHCFU の挙動

前述したとおり、その後のHCFUの代謝研究から^{5,6)}、従来、HCFUの中間代謝物として知られている1-(5-Carboxypentylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPEFU)

および1-(3-Carboxypropylcarbamoyl)-5-fluorouracil (CPRFU) の他に HHCPU および OHCPU が単離同定された。

そこでこれら2種の新代謝物が、先に報告した体液内濃度測定法を適用した場合、HCFU 画分 (HCFU, CPEFU および CPRFU) と 5-FU 画分のいずれに分画されるかを検討した。

すなわち、ラット正常血清に HHCPU および OHCPU をそれぞれ $0.2 \mu\text{g/ml}$ と $1.0 \mu\text{g/ml}$ になるように添加し、体液内濃度測定法に準拠して、HCFU 画分および 5-FU 画分に分画し、バイオアッセイで両画分の薬剤濃度を測定した。

この結果、3連実験の平均値として、HHCPU は $0.2 \mu\text{g/ml}$ で 97%, $1.0 \mu\text{g/ml}$ で 95% が HCFU 画分中に検出され、5-FU 画分中にはほとんど検出されなかった。同様に、OHCPU は $0.2 \mu\text{g/ml}$ で 97%, $1.0 \mu\text{g/ml}$ で 98% あ HCFU 画分中に検出された。

またこれら中間代謝物は、もとに pH 11, 50°C で 10 分間加熱することにより、定量的に 5-FU に転換された。

以上の結果から、HHCPU および OHCPU は体液内

濃度測定法を適用した場合、いずれも、定量的に HCFU 画分中に分画されることがわかった。

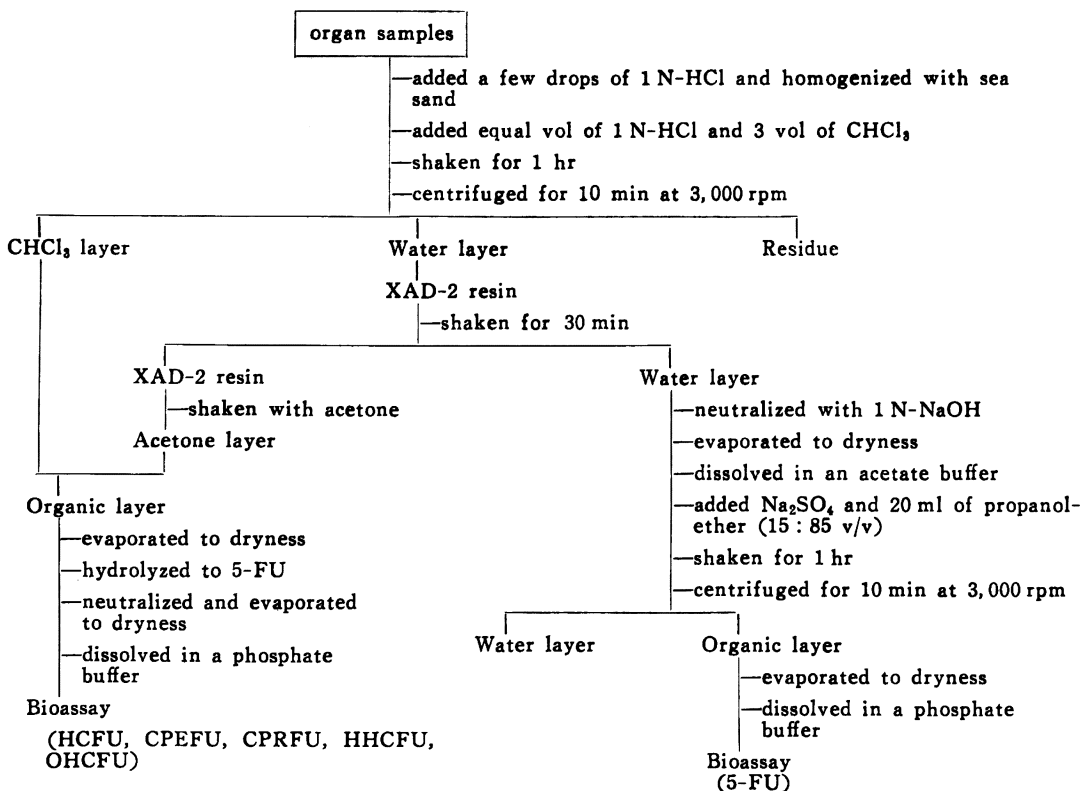
臓器内濃度測定法

HCFU の体液内濃度測定法と上記実験成績を組み合わせ、HCFU およびその代謝物 (CPEFU, CPRFU, HHCPU および OHCPU) と 5-FU の臓器内濃度測定法を以下のように定めた。

すなわち、一定量の臓器に数滴の 1 N-塩酸を加えて細切し、少量の海砂とともに乳鉢中でよく磨砕したのち、臓器重量と同量の 1 N-塩酸および3倍量のクロロホルムを加え、1時間振盪抽出を行う。抽出後、3,000 rpm で 10 分間遠心分離して、水層およびクロロホルム層を分取する。分取した水層およびクロロホルム層は体液内濃度測定法に準拠して処理し、HCFU 画分と 5-FU 画分に分画する。HCFU 画分濃度は体液内濃度測定法記載の方法で測定する。

5-FU 画分は濃縮後、0.2 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解させ、さらに 20 ml のプロパノールエーテル混液 (15:85 v/v) および 1 g の無水硫酸ナトリウムを加えたのち、1時間振盪抽出を行なう。3,000 rpm で 10 分間遠心分離して、溶媒層を分取し、 30°C 以下で減圧

Fig. 3 Fractionation procedure of HCFU and its metabolites in organs



下濃縮乾固する。

残渣を一定量の M/15 リン酸緩衝液 (pH 7.0) に溶解させたのち、薄層平板ディスク法でバイオアッセイを行い、別に作成した標準 5-FU 検量線から 5-FU 濃度を求める。

この操作図を Fig. 3 に示した。

II. HCFU 投与ラットの臓器および血清中薬剤濃度の測定

実験材料および方法

1. 使用薬剤

HCFU および 5-FU は分析法の検討に用いたものと同一品を使用した。

2. 実験動物

7 週令の S. D 系雄性ラットを 1 週間予備飼育したのち、1 夜絶食後、実験に使用した (1 群 5 頭、体重 160 ~ 180 g)。

3. 薬剤投与方法および試料の採取

HCFU を 0.5% メチルセルローズ (酢酸緩衝液, pH 4.0 に溶解) にけん濁させたのち、50 mg/kg を経口投与した。投与後 1, 2, 4, 6 および 12 時間目に頸部動脈を切断して採血を行ない、さらに充分放血したのち、肝臓、胃および小腸を摘出した。摘出臓器は生理食塩水で充分洗浄した後、薬剤濃度の測定に供した。

4. 薬剤濃度測定方法

臓器内 HCFU 画分濃度は *Staphylococcus aureus* 209 P 株を検定菌とする前報¹⁾記載の方法で測定し、5-FU 画分濃度はプロパノールエーテル混液を用いる前項の臓器内濃度測定法で測定した。

また血中 5-FU 画分濃度の測定は前報¹⁾に記載した方

法に一部改良を加え、以下のように行った。

すなわち、アンバーライト XAD-2 樹脂を用いて分離した 5-FU 画分 (水層, 酸性) を中和せずにそのまま、30℃ で減圧下乾固したのち、一定量の M/15 リン酸緩衝液に溶解させ、その一定量をバイオアッセイに供した。

Fig. 4 Organ and serum levels of 5-FU and HCFU fraction after oral administration of HCFU (50 mg/kg) in rats

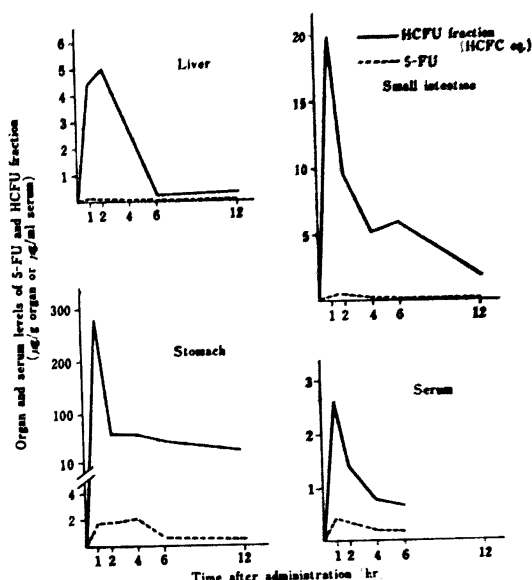


Table 7 Organ and serum levels of 5-FU and HCFU fraction after oral administration of HCFU (50 mg/kg) in rats ($\mu\text{g}/\text{organ}$ or $\mu\text{g}/\text{ml}$ serum)

Organs	Fraction	Time after administration (hr)				
		1	2	4	6	12
Liver	5-FU	0.10 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.004	0.01 $\pm$ 0.003
	HCFU**	4.40 $\pm$ 1.20	5.00 $\pm$ 1.52	2.50 $\pm$ 1.50	0.16 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.10
Stomach	5-FU	1.65 $\pm$ 0.20	1.68 $\pm$ 0.25	2.00 $\pm$ 0.30	0.61 $\pm$ 0.18	0.39 $\pm$ 0.13
	HCFU	275.40 $\pm$ 45.00	61.20 $\pm$ 20.00	58.00 $\pm$ 18.00	49.20 $\pm$ 5.30	27.00 $\pm$ 3.40
Small intestine	5-FU	0.34 $\pm$ 0.06	0.50 $\pm$ 0.06	0.19 $\pm$ 0.05	0.08 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.01
	HCFU	19.80 $\pm$ 4.00	9.40 $\pm$ 2.00	5.16 $\pm$ 1.40	5.80 $\pm$ 2.08	1.86 $\pm$ 0.40
Serum	5-FU	0.40 $\pm$ 0.10	0.36 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.05	0.16 $\pm$ 0.04	N. T*
	HCFU	2.63 $\pm$ 0.48	1.37 $\pm$ 0.30	0.75 $\pm$ 0.20	0.64 $\pm$ 0.20	N. T

* Not tested

** HCFU equivalent

Each value represents the mean $\pm$ S.D from five rats.

実験成績

ラットに HCFU を経口投与 (50 mg/kg) した後、肝臓、胃、小腸および血清中の HCFU 画分濃度、および 5-FU 濃度を経時的に測定した。

成績を Table 7 および Fig. 4 に示したが、肝臓、胃および小腸にあいては、従来測定困難であった $0.1 \mu\text{g/g}$ 以下の 5-FU 濃度の測定が可能であった。

考察および結論

薬剤の臓器内濃度の測定は、血中濃度との関連、正常部位と疾患部位の薬剤濃度の比較、標的臓器への薬剤の到達性および臓器内薬剤濃度の経時的推移等を知るために重要な意義をもっている。

5-FU および 5-FU のマスク型化合物である FT-207 のバイオアッセイ法による臓器内濃度測定は、従来、体液内濃度測定法に準じて行なわれているが、実験成績からも明らかのように、胃、小腸、肝臓あるいは脾臓などの特定臓器では、とくに 5-FU 濃度が低い場合、阻止円が不明瞭となり、濃度測定が出来ないことがある。

この現象は安田ら⁹⁾ および葛西ら⁸⁾ も報告しており、我々も 5-FU、FH あるいは HCFU 投与後の臓器内 5-FU 濃度測定時にしばしば経験している。

この原因については、現在のところ、これら特定臓器中に存在する水溶性物質に起因するものと推察されるが、その本態については依然として不明である。

しかし、HCFU の臨床応用時においては、ヒトでの薬用量との関係から、標的臓器中の 5-FU 濃度は極めて低値を示す場合があることが予測され、このため低濃度の 5-FU が測定可能な方法を確立する必要があった。

このため我々は、種々の方法について検討を行なった結果、J. L. COHEN らが血清中 5-FU 濃度の測定に用いた溶媒抽出法をバイオアッセイに応用することにより、臓器内 5-FU を低濃度域まで測定出来る方法を確立した。

この方法を用いることにより、阻止円の不明瞭化の強く現われる臓器 (肝臓、胃および小腸など) では、5-FU 濃度として $0.05 \mu\text{g/g}$ 以下でも測定可能であることがわかった。

また、その他臓器では、 $0.01 \mu\text{g/g}$ の測定が可能であり、新代謝物 HHCFU および OHCFU は HCFU 画

分中に分画され、HCFU、CPEFU、CPRFU とともに、HCFU 画分濃度として定量されていることが判明した。

謝 辞

本研究に御協力いただいた小林 昶氏ならびに三十尾正枝氏に感謝いたします。

文 献

- 1) 渡辺周次, 森 研二, 御園 等, 横山昌鶴: 新抗腫瘍性化合物 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の体液内濃度測定法. *Chemotherapy* 27(5): 778~785, 1979
- 2) 安田行寛, 東郷常夫, 采見憲男, 渡辺昭治, 播磨耕介, 鈴江崇志: Bioassay 法による制癌剤 N_1 -(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FT 207) の体内分布, 排泄, 代謝. *Chemotherapy* 21: 1171~1177, 1973
- 3) 葛西洋一, 中西昌美, 沢田廣夫, 中村 孝, 橋本伊久雄, 三上二郎, 譚 健栄, 太田公威, 安部速郎, 宿井英雄, 小林 昶: 癌患者における 1-(2-Tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil (FH カプセル, 細粒「三井」) の血中ならびに組織内濃度の検討. *診療と新薬* 15(2): 253~260, 1978
- 4) KOBARI, T.; K. TAN, M. KUMAKURA, S. WATANABE, I. SHIRAKAWA, H. KOBAYASHI, A. UZIE, Y. MIYAMA, H. NAMEKAWA & H. YAMAMOTO: Metabolic fate of 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil in rats. *Xenobiotica* 8: 547~556, 1978
- 5) KOBARI, T.; Y. IGURO, A. UZIE & H. NAMEKAWA: Metabolism of 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU), a new antitumor agent, in rats, rabbits and dogs. 第 11 回国際化学療法学会 (1979, ポストン)
- 6) 小針孝司, 伊黒美樹, 氏家 章, 滑川 宏, 森 研二: 1-Hexylcarbamoyl-5-fluorouracil (HCFU) の癌患者における代謝および代謝物濃度測定法. 薬理と治療: 投稿中
- 7) COHEN, J. L. & P. B. BRENNAN: GCL assay for 5-fluorouracil in biological fluids. *J. Pharm. Sci.* 62: 572~575, 1973
- 8) SITAR, D. S.; D. H. SHAW, M. P. THIRIWELL, Jr. & J. R. RVEDY: Disposition of 5-fluorouracil after intravenous bolus dose of a commercial formulation to cancer patients. *Cancer Res.* 37: 3981~3984, 1977

PROCEDURE FOR DETERMINATION OF HCFU AND ITS METABOLITES IN ORGANS

SHUJI WATANABE, KENJI MORI, HITOSHI MISONO
and YOSHITSURU YOKOYAMA

Institute of Biological Science, Mitsui Pharmaceuticals Inc.

Studies on the assay procedure for the concentration of HCFU and its metabolites in organs were carried out using *Staphylococcus aureus* 209 P as the test organism.

Concentrations of HCFU and its metabolites in organs can be determined essentially by the procedure described previously. With several organs, such as stomach, small intestine and liver, however, it had been difficult to determine 5-FU concentration below 0.4 $\mu\text{g/g}$ organ microbiologically because of an inhibitory effect of some organ-specific factor (factors) on formation of inhibition zone by 5-FU on the lawn of indicator bacteria.

This undesirable effect was eliminated by reextracting the aqueous phase containing 5-FU, with a mixture of propanol and ether.

Thus, we could determine 5-FU concentration in those organs with a lower limit of 0.05 $\mu\text{g/g}$ organ.