

5-Fluorocytosine (5-FC) に Cytosine deaminase (CDase) を併用した化学療法における生体内の 5-FC と転換 5-Fluorouracil (5-FU) の Bioassay 法による定量法

山本典巳・西山直志*・伊藤富由・谷村英紀・大山昭夫

関西医科大学微生物学教室, 脳神経外科学教室*

(昭和 57 年 3 月 27 日受付)

5-FC と CDase 併用による新しい局所的な化学療法では、腫瘍内に 5-FC と転換された 5-FU が共存するため、それぞれの組織内濃度を把握することが治療のうえからも重要である。

5-FC, 5-FU 共存下での Bioassay による測定法を検討した結果、指示菌として *Micrococcus luteus* ATCC 10240 株を用いた場合、両者の共存下でも 5-FC の影響を受けず 5-FU の濃度のみの値として求められた。また指示菌として *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 株を用いた場合は 5-FC と 5-FU の総和として求められた。

故に両者共存下での 5-FU 量は、*M. luteus* で測定し、5-FC 量は *S. cerevisiae* で測定しその測定値より 5-FU 量を減じて求めることができた。

実験的にラット皮下に形成させた腫瘍に CDase capsule を留置し、1週間後に 5-FC 150 mg/kg 腹腔内投与後、経時的に採取した腫瘍組織および血液を Bioassay 法を用いて 5-FC と転換 5-FU の定量を行なったところ感度、再現性に関して物理化学的定量法と比較し優れた成績を得ることができた。

5-FC は 1956 年に DUSHINSKY ら¹⁾により開発されたピリミジンのクロール置換体で、同族体の 5-FU とは異なり抗腫瘍作用は認められない²⁾が、抗真菌剤³⁻⁵⁾として繁用されている薬剤である。しかしながら、この抗真菌作用⁶⁾の作用機作は真菌類が菌体酵素として保有する CDase により 5-FC から 5-FU に転換され DNA 合成阻害作用を発揮することが知られている⁷⁻⁹⁾。

われわれは、この事実に基づき腫瘍床に CDase capsule を留置した後、人体には殆んど副作用の認められない⁴⁾ 5-FC を連続的に全身投与した場合、5-FC は腫瘍局所で CDase により 5-FU に転換され、抗腫瘍効果を発揮し、5-FU による副作用を抑制する化学療法を期待して基礎実験を実施した。

この場合、生体内、特に腫瘍内の 5-FC ならびに転換 5-FU 量を正確に把握することは、5-FC の投与法の合理化、投与効果の増強の判定のためにも、また副作用をコントロールするためにも重要である。

一方、Bioassay 法による 5-FC あるいは 5-FU 単独投与における組織内濃度の測定法については既に種々の報告¹⁰⁻¹⁵⁾があるが、5-FC と 5-FU が共存する試料についてのそれぞれの濃度の assay に関する報告はほとんど見当たらない¹⁶⁾。

われわれが目的とする 5-FC と CDase 併用による化学療法では、腫瘍内に全身投与された 5-FC と局所で CDase により転換された 5-FU が共存するものと考えられる。故に本実験では 5-FC と 5-FU 共存下でそれぞれの濃度を把握するための Bioassay 法について種々検討を加えたので、以下その測定法並びに測定結果について報告する。

I. 材料と方法

1. 実験材料

5-FC: 日本ロッジ株式会社より分与された精製原末 (Lot No. 329278) を使用した。

5-FU: 協和醗酵工業株式会社より分与された精製原末 (Lot No. 90323-00) を使用した。

CDase: 大阪府立大学農学部醗酵化学教室坂井拓夫博士より分離、精製された CDase (10 I. U./ml) を使用した。

2. 実験方法

1) 最小阻止濃度 (MIC) 測定

Bioassay 法を行なうに際し指示菌を選択する目的で教室保存の細菌 20 株、CDase 産生細菌 12 株、真菌 20 株の MIC を日本化学療法学会 MIC 測定法^{21,22)}に準じ、薬剤希釈寒天平板法により測定した。培地としては

細菌には Heart Infusion Agar (Difco), 真菌には Yeast Morphology Agar (YMA; Difco) を用いた。

2) Bioassay 法

上記菌株の内から 5-FC および 5-FU に最も高い感受性を示した菌株を指示菌として使用し, Penicillin 測定 Thin layer cup 法¹⁰⁾に従い 5-FC ならびに 5-FU に対する標準曲線を作製し, さらに *in vivo* 実験では生体内に 5-FC が共存するものと考えられることから, 対照の意味を含めて 5-FC と 5-FU を 1:1 に混合した溶液などで阻止円直径に及ぼす影響の有無を検討した。

3) 組織内血液内濃度測定法

健常な Fisher 系雄性ラット (体重約 150 g) 1 群 5 匹の皮下に名古屋大学脳神経外科 吉田純博士より分与を受けたラット由来腫瘍細胞 EA-285 glioma 細胞を大約 5×10^6 cells/rat 接種して腫瘍を形成させ, 接種約 30 日以後に腫瘍の直径が約 40 mm に成長した後, 5-FC 単独投与群には腹腔内に 5-FC 150 mg/kg 投与した後, 経時的に腫瘍および血液を採取した。

一方, capsule 留置群の場合, 腫瘍の直径が 40 mm に達した後, cellulose tube (Visking company) を滅菌し, 清潔操作で tube の一端を堅く結紮した後 CDase

0.1 ml (1 I. U.)/capsule を注入し, 同様に残りの端を結紮して CDase capsule とした。この capsule を腫瘍床に外科的に留置し, 1 週間後に 5-FC 150 mg/kg を腹腔内に投与, 経時的に腫瘍ならびに血液を採取しそれぞれの薬剤濃度を測定した。

腫瘍組織はいずれも PBS を用いて 25% 乳剤とし, 5-FC, 5-FU は熱に安定であるので血液は血清に分離, 非働化した後, Thin layer cup 法に従い 5-FC および 5-FU の腫瘍ならびに血中濃度を測定した。

II. 成績

1) 5-FC および 5-FU に対する感受性

Bioassay を行なうに際し, 指示菌を選択する目的で教室保存の細菌 20 株, CDase 産生細菌 12 株, 真菌 20 株についての MIC を薬剤希釈寒天平板法を用いて測定した結果, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 株が細菌 20 株中 5-FU に最も感受性が高く, MIC は 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった (Table 1)。

CDase 産生細菌 12 株について同様に感受性を調べた結果, ほとんどの菌株が 5-FC に対し $>100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の MIC を示した。一方, 5-FU に関しては先の結果と比較して一様に高い感受性を示したが, *M. luteus* の MIC

Table 1 Susceptibility of various test strains of bacteria to 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-Fluorouracil (5-FU)

Test organisms	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)*	
	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	6.3	0.025
<i>Staphylococcus epidermidis</i> S 623	>100	100
<i>Staphylococcus epidermidis</i> S 624	>100	100
<i>Staphylococcus aureus</i> FDA 209-P	>100	50
<i>Staphylococcus aureus</i> S 615	>100	100
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 1	>100	100
<i>Bacillus subtilis</i> PCI 219	>100	100
<i>Bacillus subtilis</i> S 550	>100	100
<i>Escherichia coli</i> NIHJ JC-2	>100	100
<i>Escherichia coli</i> S 12	>100	50
<i>Enterobacter aerogenes</i> S 553	>100	100
<i>Klebsiella pneumoniae</i> S 626	>100	>100
<i>Proteus inconstans</i> S 553	>100	>100
<i>Proteus morganii</i> S 554	>100	100
<i>Serratia marcescens</i> ATCC 13886	>100	100
<i>Aeromonas hydrophila</i> KM 1453	>100	100
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NC-5	>100	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> KM 274	>100	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> NY 001	>100	>100
<i>Pseudomonas cepacia</i> KM 1597	>100	>100

* Heart Infusion Agar (Difco) was used.

Table 2 Susceptibility of various test strains of bacteria known as cytosine deaminase producers to 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-Fluorouracil (5-FU).

Test organisms	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)*	
	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil
<i>Escherichia coli</i> K 12, AKU 0005	>100	12.5
<i>Enterobacter cloacae</i> AKU 0025	>100	1.6
<i>Enterobacter aerogenes</i> AKU 0031	50	≤ 0.012
<i>Serratia marcescens</i> AKU 0061	>100	>100
<i>Serratia polymunthicum</i> AKU 0062	>100	50
<i>Proteus vulgaris</i> AKU 0080	>100	12.5
<i>Achromobacter polymorpha</i> AKU 0122	>100	0.4
<i>Bacillus subtilis</i> AKU 0210	>100	50
<i>Agrobacterium radiobacter</i> AKU 0301	>100	1.6
<i>Micrococcus flavus</i> AKU 0502	>100	1.6
<i>Pseudomonas fragi</i> AKU 0802	>100	12.5
<i>Xanthomonas campestris</i> AKU 0852	>100	>100

* Heart Infusion Agar (Difco) was used.

Table 3 Susceptibility of various test strains of fungi to 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-Fluorouracil (5-FU).

Test organisms	Minimum inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)*	
	5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil
<i>Candida albicans</i> NY 002	0.1	100
<i>Candida guilliermondii</i> NY 008	12.5	>100
<i>Candida krusei</i> NY 003	25	>100
<i>Candida parakrusei</i> NY 004	0.8	>100
<i>Candida pseudotropicalis</i> AKU 4592	1.6	12.5
<i>Candida stellatoidea</i> NY 005	12.5	100
<i>Candida tropicalis</i> NY 006	0.1	>100
<i>Cryptococcus neoformans</i> NY 007	1.6	12.5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AKU 4100	0.4	0.4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AKU 4111	0.8	3.2
<i>Saccharomyces rouxii</i> AKU 4117	0.8	6.3
<i>Aspergillus fumigatus</i> IFO 8867	>100	50
<i>Aspergillus niger</i> IFO 8541	0.8	>100
<i>Penicillium notatum</i> IFO 4640	100	100
<i>Epidermophyton floccosum</i> IFO 9045	50	6.3
<i>Microsporium audonini</i> IFO 8147	50	0.4
<i>Microsporium canis</i> IFO 7864	50	6.3
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> IFO 5812	6.3	12.5
<i>Trichophyton rubrum</i> IFO 9185	50	6.3
<i>Sporotrichum schenkii</i> NY 009	6.3	100

* Yeast Morphology Agar (Difco) was used.

に相当する菌株は見当たらなかった (Table 2)。

真菌類、特に酵母様真菌類は、5-FC に対して高い感受性を示すことが報告されている^{11,16,17)}。教室保存株について 5-FC ならびに 5-FU に対する MIC を測定した結果、5-FC に対しては *Candida albicans*, *Candida tropicalis* は 0.1 $\mu\text{g/ml}$, *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 は 0.4 $\mu\text{g/ml}$ と感受性を示した。

一方、5-FU に対する MIC が *Candida* 属の菌株では $>100 \mu\text{g/ml}$ であったが、*S. cerevisiae* AKU 4100 では 0.4 $\mu\text{g/ml}$ と 5-FC と全く同様の感受性であった (Table 3)。

以上の結果より 5-FC、5-FU に対する感受性が高い点、培養の容易な点を考慮し、Bioassay を行なうに際し *M. luteus* ATCC 10240 株を 5-FU の *S. cerevisiae* AKU 4100 株を 5-FC の指示菌として以下の実験を行なった。

2) Bioassay

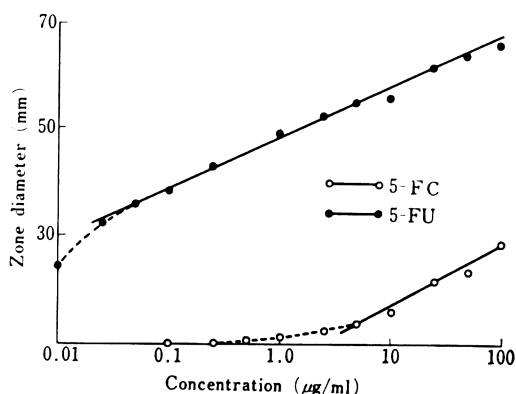
a) 標準曲線の検討

5-FC、5-FU の各標準液を 0.01~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で作製し、薬剤の濃度 ($\mu\text{g/ml}$) の対数値を横軸に、阻止円直径の平均値 (mm) を縦軸にとり、濃度と阻止円直径の関係を検討した。

M. luteus の場合、5-FU に対して高い鋭敏度を示し 0.01 $\mu\text{g/ml}$ でも阻止円を形成し、直線関係は 0.025~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で成立した。

一方、5-FC では 5~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲でしか直線関係を認めず、かつ 100 $\mu\text{g/ml}$ でも阻止円直径は 30 mm に満たなかった。5-FC に対する本株の標準曲線は鋭敏度が低く、5-FU のそれとは対照的であった (Fig. 1)。

Fig. 1 Comparison of zone diameters of 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-Fluorouracil (5-FU) on *Micrococcus luteus* ATCC 10240 by the thin layer cup method.



一方、*S. cerevisiae* AKU 4100 株の場合 5-FC と 5-FU の標準曲線は全く同一のパターンを示した (Fig. 2)。

b) 5-FC、5-FU 共存下での Bioassay

5-FC、5-FU 共存状態の試料で阻止円に及ぼす影響を検討する目的で等濃度の 5-FC、5-FU を 1:1 に混合した各種濃度の溶液を調製して Bioassay を行なった。

得られた曲線と 5-FC、5-FU 単独のそれぞれの標準曲線とを比較すると、*M. luteus* の場合、混合液を用いて得た曲線と 5-FU 単独の標準曲線との間に差は認められなかった。即ち、5-FC、5-FU 共存下で *M. luteus* は 5-FC 濃度には影響を受けず 5-FU 単独の阻止円直径に一致することが判明した (Fig. 3)。

一方、*S. cerevisiae* AKU 4100 株の場合、混合液で得た曲線と 5-FU 単独の標準曲線の傾きは全く同様であったが、阻止円直径に関して混合液を用いた方が増大していることが示された。換言すれば混合液を用いて得たパターンは 2 倍濃度の 5-FU のパターンと一致した。

一例を挙げると、1 ml 当り 5-FC 5 μg 、5-FU 5 μg 含む混合液を用いて得た阻止円直径は 2 倍濃度の 5-FU 10 $\mu\text{g/ml}$ の阻止円直径と全く同様であった (Fig. 4)。

さらにこの関係を明確にさせるために、5-FC と 5-FU の和が 50 $\mu\text{g/ml}$ となるような種々の組み合わせの混合液を用いて *M. luteus* と *S. cerevisiae* の阻止円直径の実測値と混合液中の 5-FC と 5-FU の濃度との関係について検討すると、*M. luteus* では先の結果同様 5-FC の影響を全く受けないことがわかり、CDase を産生する *S. cerevisiae* では 5-FC が 5-FU に転換されるために

Fig. 2 Comparison of zone diameters of 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-Fluorouracil (5-FU) on *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 by the thin layer cup method.

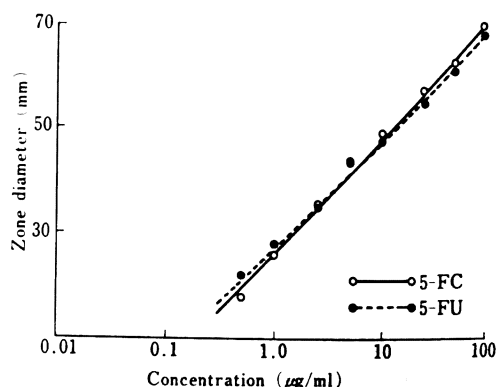
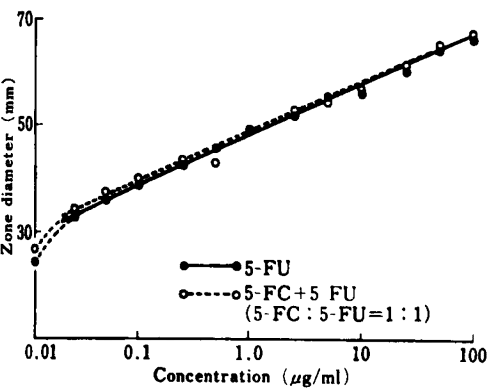


Fig.3 Comparison of zone diameters with *Micrococcus luteus* ATCC 10240 between 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-FC+5-Fluorouracil (5-FU) by the thin layer cup method.



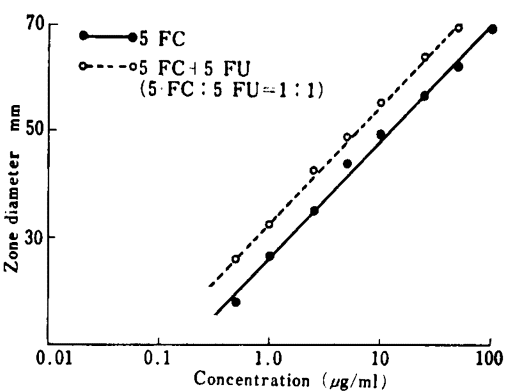
常に一定の阻止円直径、即ち 5-FU 50 $\mu\text{g/ml}$ の時の阻止円直径と同様の直径を示すことが判明した (Table 4)。

c) Competitive inhibition と 5-FC 耐性

5-FC などフッ化ピリミジン系核酸 (DNA) 合成阻害剤は、プリン、ピリミジンを含むナチュラルアナログの共存状態下では共に真菌細胞内に取り込まれ、核酸合成阻害の効果が半減すること^{11,23)}が知られている。われわれは YMA 培地を用い *S.cerevisiae* の 5-FC に対する MIC を測定して 0.4 $\mu\text{g/ml}$ と SHADOMY¹¹⁾ と同じ成績を得た。

また cup 内に非働化済み血清および加熱処理済みラット肝臓エマルジョンに 5-FC、5-FU を加えたものを入れて阻止円直径に影響を及ぼすか否かを検討したが、

Fig.4 Comparison of zone diameters with *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 between 5-Fluorocytosine (5-FC) and 5-FC+5-Fluorouracil(5-FU) by the thin layer cup method.



その影響は認められなかった。
なお、現在までのところ指示菌から耐性菌の出現は認めていない。

以上の結果から 5-FC、5-FU 共存状態での 5-FU の定量には *M.luteus* を用いて測定し、5-FC 量は *S.cerevisiae* の測定値より 5-FU 量を減じて求められることが明らかにされた。

3) 組織内血液内濃度

以上の結果を考慮して、腫瘍内および血中の 5-FC ならびに転換 5-FU 量を測定した。

i. 5-FC 単独投与群

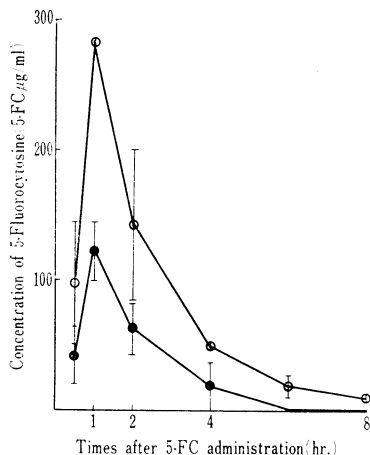
ラット腹腔内に 5-FC 150 mg/kg 投与 1 時間後に 5-FC 量はピークに達し、腫瘍内 100~144 $\mu\text{g/g}$ 、血中 200~284 $\mu\text{g/ml}$ を示した。投与 2~4 時間後には腫瘍内レ

Table 4 Relationships between mixed solution and patterns of diameter of inhibitory zone.

Mixed solution ($\mu\text{g/ml}$)		Zone diameter (mm)	
5-Fluorocytosine	5-Fluorouracil	With <i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	With <i>Saccharomyces cerevisiae</i> AKU 4100
0	50	64.5	61.0
5	45	64.0	61.5
10	40	63.5	62.5
15	35	63.0	62.0
20	30	62.5	61.5
25	25	62.0	63.0
30	20	61.0	61.5
35	15	59.5	62.5
40	10	56.0	61.5
45	5	55.0	61.0
50	0	23.5	62.5

Fig. 5 Concentration of 5-Fluorocytosine (5-FC) in the serum and the tumor tissue.

5-FC concentration in the serum ○-○, in the tumor tissue ●-●
Dose: 5-FC 150 mg/kg/rat *ip* challenge



ベルは約 1/3 に低下し、血中レベルは約 1/5 に低下し、その後漸次減少の傾向を示した (Fig. 5)。

ii. CDase capsule 留置群

一方、CDase capsule 留置群の 5-FC 量は、5-FC 単独投与群と同様、腫瘍内、血中共に 5-FC 150 mg/kg ラット腹腔内投与 1 時間後に最高値を示し、腫瘍内 85 µg/g、血中 96 µg/ml を示した。その後漸次減少したが 8 時間後でも 5-FC 単独投与群同様双方とも約 10 µg/ml のレベルを維持していた。

転換 5-FU 量は、投与 2 時間後に腫瘍内 8 µg/g、血中 0.2 µg/ml と最高値を示した。その後 5-FC 同様徐々に減少したが、8 時間後でも腫瘍内で 0.6 µg/g のレベルを維持していることがわかったが、血中では 0.02 µg/ml と *M. luteus* を用いた場合の検出可能限界まで低下することが判明した (Fig. 6)。

III. 考 察

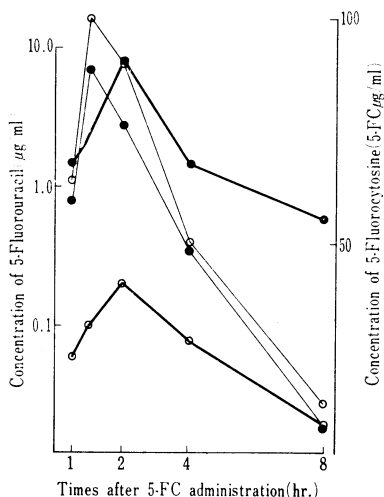
In vivo の 5-FC および 5-FU の組織内濃度測定に関する研究は、小田切ら¹⁸⁾が患者血漿中の 5-FC と 5-FU の同時測定を高速液体クロマトグラフィーを用いて行なった報告のみである。一方、Bioassay 法による測定では、5-FC もしくは 5-FU の単独測定法に関する報告¹⁰⁻¹⁵⁾のみである。

逸見ら¹⁵⁾は 5-FU の Bioassay に用いた指示菌 *M. luteus* ATCC 10240 株が MIC 0.002 µg/ml と高い感受性を示し、Agar well 法を用いて 5-FU の定量を行ない 0.004 µg/ml まで測定が可能であると報告した。

われわれも教室保存菌株の中で 5-FU に最も感受性の

Fig. 6 Concentration of 5-Fluorocytosine (5-FC) and converted 5-Fluorouracil (5-FU) in the serum and the tumor tissue. Implanting cytosine deaminase capsule (1 I. U./capsule) a week after to assay

5-FC concentration in the serum ○-○, in the tumor ●-●, converted 5-FU concentration in the serum ○-○, in the tumor tissue ●-●



高かった *M. luteus* ATCC 10240 株を Bioassay の指示菌として Thin layer cup 法に従って標準曲線を作製した。その結果、測定可能な限界は 0.02 µg/ml と若干感度は鈍かったが小田切ら¹⁸⁾ならびに DIASIO ら¹⁹⁾の高速液体クロマトグラフィーの検出限界 20 µg/ml と比較しても遜色がないと考えられた。

また、*M. luteus* を用い 5-FC の標準曲線を作製し 5-FU の標準曲線と比較した結果、5-FU の標準曲線に比べ 5-FC の標準曲線の感度は著しく低く、5-FC と 5-FU を含む混合液を用いた場合、5-FC 共存下でも 5-FU の阻止円にマスクされ 5-FC 50 µg/ml まで影響を認めなかった。

この結果より、*M. luteus* を指示菌とすれば 5-FU 量が容易に測定できることが明らかとなった。

一方、5-FC の *in vitro* の抗菌活性とりわけ抗真菌活性に関する報告^{11,16,17,23)}は少なくないし、また 5-FC の定量、特に Bioassay に関する研究も数多く報告¹¹⁾されている。SHADOMY¹¹⁾は 5-FC の Competitive inhibition の問題についても触れ Yeast Nitrogen Base (YNB) 培地の使用で 5-FC に対する感受性が高くなることを報告し、さらに 5-FC に最も感受性の高かった *S. cerevisiae* を用い、Bioassay で患者血清中の 5-FC 量を測定し測定限界が 0.4 µg/ml であったと報告した。

また、岩田ら¹⁷⁾は YNB 培地に L-asparagine と dextrose を添加した YMA 培地を用いて SHADOMY と同様の MIC を得ている。われわれも同様の結果を得たが、*S. cerevisiae* は 5-FU にも同じ 0.4 $\mu\text{g/ml}$ の MIC を示し、さらに 5-FC と 5-FU の標準液を用いて阻止円直径と薬剤濃度の関係をみたところ 5-FC と 5-FU の標準曲線が一致する結果を得た。

この理由として、JUND ら⁸⁾が指摘したように *S. cerevisiae* において 5-FC が cytosine permease により細胞内に移入し細胞内 CDase により 5-FU になるためと考えられ、CDase 産生細菌の感受性が他の細菌と同様低かったのは、この cytosine permease を欠如し、細胞質内に移入されないためと考えられた。

担癌ラット腫瘍床に CDase capsule を留置し 5-FC を投与した治療実験での組織内、血中の 5-FC ならびに転換 5-FU 量を 5-FC 値 = (*S. cerevisiae* により示された値) - (*M. luteus* により示された値、即ち 5-FU 量) の関係式に従い求めると、5-FC は投与 1 時間後にピークに達し腫瘍内 85 $\mu\text{g/g}$ 、血中 96 $\mu\text{g/ml}$ を示した後漸次減少した。量的には 5-FC 単独投与群では腫瘍内、血中共に最高値は capsule 留置群の約 2 倍量の値を示したが 5-FC 投与 1 時間後にピークを有する同様のパターンを示した。小田切ら²⁰⁾は、¹⁴C で標識された 5-FC 100 $\mu\text{g/kg}$ をラットに経口投与した後、放射活性の血中濃度推移について報告し、この中で 5-FC は投与 1~2 時間でピークに達し約 30 $\mu\text{g/ml}$ で、その後減少傾向を辿ったと述べているが、われわれの *in vivo* 実験で得た値は、それと比較して 5-FC 単独投与群で約 10 倍、capsule 留置群では約 3 倍高かったが 5-FC の増減のパターンについては同様であった。

一方、転換 5-FU 量は腫瘍内、血中共に 5-FC 投与 2 時間後にピークに達し 5-FC のピークの出現より 1 時間遅れることがわかった。5-FU [²⁻¹⁴C] をラットに経口投与および静脈内注射した後、5-FU の生体内推移をみた穴田ら¹³⁾の報告では、5-FU は血中に速やかに出現すると報告していることから、5-FC の deamination に時間を要するため転換された 5-FU のピークが 5-FC のピーク出現から 1 時間遅れたと考えた。

<謝辞> 終りに貴重な精製 CDase を分与して頂いた大阪府立大学農学部醸酵化学教室坂井拓夫博士に深甚なる謝意を表すると同時に、5-FC の分与を受けた日本ロッシュ(株)、5-FU の分与を受けた協和醸酵工業(株)に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) DUSHINSKY, R.; E. PLEVEN & C. HEIDELBERGER: The synthesis of 5 fluoropyrimidines. J. Amer. Chem. Soc., 79: 4559~4560, 1957
- 2) HEIDELBERGER, C.; L. GIESBACH, B. J. MONTAG, D. MOOREN, O. CRUZ, F. J. SCHNITZER & M. GRUNBERG: Studies on fluorinated pyrimidines II. Effect on transplanted tumors. Cancer Res. 18: 305~317, 1958
- 3) BURNELL, R. H.: Systemic candidiasis in an infant treated with 5-fluorocytosine. Med. J. Australia 2: 859~860, 1971
- 4) UTZ, J. P.; B. S. TYNES, H. J. SHADOMY, R. J. DUMA, M. M. KANNAN & K. N. MASON: 5-Fluorocytosine in human cryptococcosis. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1968, 344~346, 1969
- 5) WEBB, A. J.; D. C. E. SPELLER & K. G. BUCKLER: Torulopsis glabrata septicaemia treated with 5-fluorocytosine. Lancet 1: 839~840, 1970
- 6) GRUNBERG, E.; E. TITSWORTH & M. BENNETT: Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. Antimicrob. Agents & Chemoth. 1963, 566~568, 1964
- 7) KOECHLIN, B. A.; F. RUBIO, S. PALMER, T. GABRIEL & R. DUSCHINSKY: The metabolism of 5-fluorocytosine-2¹⁴C and of cytosine-1⁴C in the rat disposition of 5-fluorocytosine-2¹⁴C in man. Biochem. Pharmacol. 15: 435~446, 1966
- 8) JUND, R. & F. LACROUTE: Genetic and physiological aspects of resistance to 5-fluoropyrimidines in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 102: 607~615, 1970
- 9) POLAK, A. & H. T. SCHOLER: Mode of action of 5-fluorocytosine and mechanisms of resistance. Chemotherapy (Basel) 21: 113~130, 1975
- 10) 藤田 浩, 向島 達, 中山 昇, 沢部孝昭, 土田 裕子, 青本光子: 抗癌剤の Bioassay について。メディアサークル 92: 259~270, 1967
- 11) SHADOMY, S.: *In vitro* studies with 5-fluorocytosine. Appl. Microbiol. 17: 871~877, 1969
- 12) 久保完治, 田村 潤, 宇佐美久良, 船橋富次雄, 二宮 英, 磯部吉郎: 5-Fluorouracil 投与後生体内に証明される 3 種類の抗菌活性物質。医学と生物学 82: 93~96, 1971
- 13) 穴田久雄, 戸沢 忠, 中村信雄: 5-Fluorouracil の経口投与による抗腫瘍効果。Chemotherapy 22: 1074~1079, 1974
- 14) 田村 升, 小山隆三, 福田守道: 血中および組織内濃度からみた経口性抗癌剤 5-FU Dry Syrup の使用試験。癌と化学療法 2: 297~303, 1975
- 15) 逸見昭二, 前田憲一, 春野 剛: *Micrococcus*

- luteus* ATCC 10240 を試験菌とする (tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil (TF) および 5-fluorouracil の濃度測定。基礎と臨床 13 : 50~54, 1979
- 16) 三上 襄, 新井 正 : 抗真菌化学療法剤 5-fluorocytosine の作用機序, とくに *Candida albicans* に対する選択毒性に関する研究。真菌誌 16 : 41~49, 1975
 - 17) 岩田和夫, 山口英世, 内田勝久, 平谷民雄, 山本容正 : 5-Fluorocytosine の抗真菌活性に関する研究, 第 1 報 試験管内抗菌活性に及ぼす諸因子の影響。真菌誌 17 : 156~163, 1976
 - 18) 小田切 脩, 田中真智子, 清水宏俊 : 5-Fluorocytosine で治療中の真菌症患者における血漿中 5-Fluorocytosine および 5-Fluorouracil 濃度の高速液体クロマトグラフィーによる定量。薬理と治療 5 : 19~23, 1977
 - 19) DIASIO, R. B.; W. E. MARIA, S. SHADOMY & A. E. INGROFF: Rapid determination of serum 5-fluorocytosine levels by highperformance liquid chromatography. Antimicrob. Agents & Chemoth. 13 : 500~504, 1978
 - 20) 小田切 脩, 長谷川恒行, 深沢英雄, 市下浩子, 溝上由美子, 清水宏俊 : ラットおよびマウスにおける 5-Fluorocytosine の吸収, 分布, 代謝, 排泄に関する研究。薬理と治療 3 : 2045~2063, 1975
 - 21) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法。Chemotherapy 16 : 98~99, 1968
 - 22) 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法の改訂について。Chemotherapy 22 : 1126~1128, 1974
 - 23) 山口英世, 岩田和夫 : 5-Fluorocytosine の抗真菌作用に関する研究, 第 1 報 *Candida albicans* における核酸代謝に及ぼす影響。真菌誌 17 : 201~211, 1977

FUNDAMENTAL STUDY ON THE MICROBIOLOGICAL ASSAY FOR THE DIFFERENTIAL QUANTITATION OF 5-FLUOROCYTOSINE (5-FC) AND 5-FLUOROURACIL (5-FU) AND ITS APPLICATION.

NORIMI YAMAMOTO, TADASHI NISHIYAMA*, TOMIYOSHI ITO,

EIKI TANIMURA and AKIO OHYAMA

Department of Microbiology and Department of Neurosurgery*,
Kansai Medical University

We have already reported the newly developed local chemotherapy of cancer, in which intratumoral conversion of 5-FC to 5-FU by extrinsic cytosine deaminase (CDase) implanted to the tumor is expected to induce antineoplastic activity at a local site with minimal systemic toxicities. Determination of the tissue concentration of both 5-FC and converted 5-FU is, therefore, very important for evaluating the antineoplastic effects of this local chemotherapy. In this report, we discussed the usefulness of the microbiological assay (Thin layer cup method) using 2 test organisms for the differential quantitation of the drugs in the same material and investigated the tissue concentrations of the drugs in the tumor and the serum.

In vitro studies; The standard curves for 5-FC and 5-FU were obtained by measurement of the zones of inhibition using standard solutions of the drugs. In the used bacteria and the fungi, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 was found to be the most sensitive organism to 5-FU (MIC=0.025 µg/ml). On the other hand, *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 was sensitive to 5-FC (MIC=0.4 µg/ml), but had the same sensitivity to 5-FU. The standard curve of *M. luteus* was affected only by the concentration of 5-FU under the various combinations with 5-FC and 5-FU. On the contrary, the standard curve of *S. cerevisiae* was affected by the concentration of the sum of both drugs. The concentration of 5-FC (C) in the sample mixed with 5-FC and 5-FU, therefore, could be determined by the difference between the value (A) obtained by *S. cerevisiae* and that (B) obtained by *M. luteus* (C=A-B), although the concentration of 5-FU was calculated as (B).

In vivo studies; based on these results, we have made the differential quantitation of the drugs in the practical experiments. 5-FC were administered intraperitoneally to the rats bearing subcutaneous tumors which were previously implanted with the CDase containing capsule at the tumor bed. The pattern of 5-FC concentration curves of the serum and the tumor tissue showed a close similarity. At 1 hour after the administration, 5-FC attained to maximum and were estimated to be 96 µg/ml in the serum and 85 µg/g in the tumor. The converted 5-FU attained to maximum at 2 hours and were estimated to be 8 µg/ml. 5-FU passed into the blood stream was only 2.5% of that in the tumor.