脳腫瘍に対する 5-Fluorocytosine と cytosine deaminase との併用による局所化学療法 (第2報)

西山 直志・河村 悌夫・河本 圭司・松村 浩・山本 典己*
伊藤 富由*・大山 昭夫*・桂樹 徹**・坂井 拓夫**

Antineoplastic Effect of 5-Fluorocytosine and Cytosine Deaminase on Brain Tumor

Tadashi NISHIYAMA, Yasuo KAWAMURA, Keiji KAWAMOTO, Hiroshi MATSUMURA, Norimi YAMAMOTO*, Tomiyoshi ITO*, Akio OHYAMA*, Toru KATSURAGI** and Takuo SAKAI**

Departments of Neurosurgery and *Microbiology, Kansai Medical University, Osaka; **Department of Agriculture, Osaka Prefectural University, Osaka

Abstract

The antifungal drug, 5-Fluorocytosine (5-FC) which is a derivative of 5-Fluorouracil (5-FU), lacks antineoplastic activity in human subjects because of the absence of cytosine deaminase (CDase) in mammalian cells. Therefore, intratumoral conversion of 5-FC to 5-FU by extrinsic CDase could be expected to induce antineoplastic effects at a local site with minimal systemic toxicity. The effects of combined administration of 5-FC and CDase *in vitro* and *in vivo* were investigated. CDase was extracted from the E-Coli K-12 strain and purified.

In vitro studies resulted in a significant inhibition of cell proliferation on cultured glioma cells (EA-285 cells) with 5-FC concentration over 10 $\mu\text{g/ml}$. Fluorocytographic studies of the tumor cell cycle progression showed synchronization in the early S phase at lower concentrations and complete blocking at the G1 and the early S phase with over 25 $\mu\text{g/ml}$. In *in vivo* studies, tissue concentrations of 5-FC and converted 5-FU were serially measured by a bioassay method after simultaneous intratumoral injection of CDase and systemic administration of 150 mg/kg of 5-FC to brain tumor bearing rats. The maximum concentrations of the drugs in the tumor tissue were 85 $\mu\text{g/g}$ 5-FC at 1 hour and 9.6 $\mu\text{g/g}$ 5-FU at 2 hours, which were sufficient to kill tumor cells. They were kept at higher levels in the tumor tissue than in the normal brain. In comparison, the maximum 5-FU concentration in the serum was only 0.4 $\mu\text{g/ml}$. The survival times and histological examinations of the experimental brain tumor models by this combined therapy were evaluated. The median survival time of the treated group was significantly prolonged (38.3 days) when compared with that of the control group (28.2 days). No side effects were recognized. Histological studies of the animal brains 2 weeks after the therapy revealed necrosis in the treated tumor. This combined treatment of 5-FC and CDase could be an ideal therapy for brain tumor in the future.

Key words: 5-Fluorocytosine, cytosine deaminase, local chemotherapy, brain tumor, tissue concentration

関西医科大学脳神経外科 *同微生物学教室 **大阪府立大学農学部

Request reprints to: Y. Kawamura, M. D., Department of Neurosurgery, Kansai Medical University, 1 Fumizono-cho, Moriguchi 570.

受稿 1981年11月27日 受理 1982年2月17日

I はじめに

悪性脳腫瘍の治療目標は従来より主として外科的摘出にあるが、腫瘍が深在性であったり、対側半球に浸潤を示す場合、あるいは優位半球内に存在する場合には全摘出はほとんど不可能と考えられる。このような症例に対し、現在放射線療法²⁹⁾、化学療法ならびに免疫学的療法³⁵⁾等の補助療法が、単独または種々併用されている。一方、近年の合成化学の発達に伴い、もっとも効果の確実な方法への探求から、多くの抗腫瘍化学物質が開発され、臨床に供されてきた^{10, 13, 33, 37, 39, 40)}。しかし化学療法剤の多くが選択毒性を持たぬために全身投与による弊害が生じ、投与量、期間を制限せざるをえないこと、さらには多くの薬剤が血液・脳関門を通過しにくい点²⁴⁾等、人体における影響因子が多岐にわたるため、*in vitro*あるいは動物実験と同様の効果を得るにはほど遠いのが現状である。これらの欠点に加えて、代謝拮抗剤は阻害様式が一過性で、ひとたび必須代謝物質が十分合成されれば、薬剤は代謝排泄されるため、腫瘍組織内にその必要有効濃度が一定期間維持されがたいと思われる。この点を考慮し、薬剤の必要有効濃度を腫瘍組織内に維持させる手段として、種々の局所化学療法の試みがなされている^{7, 13, 25, 33, 39)}。

我々は、抗腫瘍作用を持たぬ薬剤を全身投与により腫瘍内に到達させ、腫瘍内で特異的に抗腫瘍性物質に転換させることができれば、全身的毒性を最小に止め、抗腫瘍効果をもっとも有効に発揮できるものと仮説し、このマスク化合物に5-Fluorocytosine (5-FC) を選んだ。

抗真菌作用を有する5-FCは、5-Fluorouracil (5-FU) の誘導体であるが、5-FUへの転換酵素 cytosine deaminase (CDase) を持たぬ人体内では抗腫瘍作用はなく、大部分が代謝変換されず体外に排泄される^{3, 16)}。全身投与された5-FCが腫瘍内に取り込まれるならば、局所にCDaseを留置することにより腫瘍内で5-FUに転換され、全身的に副作用を与えることなく直接抗腫瘍効果が期待できる。本研究ではこのような作用機序を持つ局所化学療法の開発を目指し、基礎実験¹⁹⁾を進展させ、株化脳腫瘍細胞を用い、5-FCおよび精製CDase併用投与による殺細胞効果ならびに細胞周期動態への影響を調べ、実験脳腫瘍モデルにおいては、5-FC全身投与後にCDaseの局所注入を行い、腫瘍内5-FCおよび転換5-FU濃度の測定とともに、本療法の延命効果を検討して報告する。

II 実験方法

1. *In vitro* の実験

1) 薬剤ならびに酵素活性の測定方法

5-Fluorocytosine (Lot No. A 322744, 日本ロッシュ(株)製)は、使用に際し燐酸緩衝液(PBS)で倍数希釈調整を行い培養液に添加した。使用したCDaseは、*Escherichia coli* (E. Coli) K-12株菌体内より抽出、精製した²⁸⁾。CDase活性の測定には、5-FC (3 mM) を基質として酵素を添加し、pH 7.0, 37°Cで反応を行い、経時的に反応液の一部を採り、49倍量の0.1 N HClを加えて反応を停止させたのち、日立340型 Spectrophotometer を用いて260 nmにおける吸光度(A₂₆₀)を測定した。CDaseの活性はA₂₆₀の増加速度より算出し、1 I. U. 国際単位は1分間に1 μmolのcytosineをuracilに転換しうる酵素活性で表した。

2) 培養細胞ならびに殺細胞効果判定方法

Ethylnitrosoureaにより誘発されたCDFラット glioma から株化されたEA-285 glioma 細胞⁴²⁾を用い、10%胎児牛血清を含むEagle MEM培地に、2 × 10⁵ cells/mlの濃度としてFalcon plastic flaskに4 ml分注し、24時間静置培養を行った。単層培養確認後、無処置群、5-FC単独投与群(200 μg/ml)、酵素単独投与群(0.4 I. U.)、および各々1, 5, 10, 25, 50 μg/ml濃度の5-FCとCDase (0.2 I. U.)併用群に分け、24時間薬剤接触させたのち、新鮮培地と交換し、薬剤除去直後、48時間および96時間後 trypsin 処理し、細胞浮遊液としたのち、trypan blueによるdye exclusion法¹⁷⁾にて生細胞数の算定を行い、増殖曲線を求め検討した。

3) 細胞周期動態の観察方法

細胞周期動態に及ぼす薬剤の効果を観察するため、前述の培養細胞の殺細胞効果判定と同様の手順で処置し、trypsin 処理後PBSにて洗滌し、遠沈後上澄液を除去し、0.1% sodium citrate 液に propidium iodide (0.05 mg/dl)の混合液で細胞を染色し、約1 × 10⁵ cells/mlの濃度となるように調整した。検体は4°Cで保存し、数時間以内にFluorocytograph (Ortho-Instrument System 50)を用いてDNA histogramを求め検討した。

2. *In vivo* の実験

1) 実験動物と実験脳腫瘍モデルの作製

Fisher系ラットS 344F DUCRJ, 雄, 生後4週齢のものを使用した。実験脳腫瘍の作製には、単層培養で継代維持されているEA-285 glioma細胞を用いた。ラットをエーテル吸入麻酔ののち、腫瘍細胞浮遊液0.02 ml (2 × 10⁶ cells/rat)を30ゲージ針を用いて経時的に右頭頂葉内に刺入し接種した。

2) 5-FC, 5-FU 組織内濃度の測定方法

腫瘍細胞接種後、体重減少や神経症状がみられる25日前後のラット腹腔内に5-FC 150 mg/kgを投与し、同時に

Fig. 1 Estimation of cytosine deaminase (CDase) activity studied by ultra violet absorption spectrum.

CDase 0.1 I. U. (0.02 ml) を腫瘍内に注入した。薬剤投与後、経時的にラットを屠殺し、脳腫瘍、対側正常脳および血液を採取し、酵素活性を停止させる目的で、試料を100°C 5分間加熱処理した。

組織内濃度の測定には生物学的測定法(thin layer cup 法⁶⁾)を行った。試験菌株として、5-FC の測定には *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 株^{*}、転換 5-FU の測定には *Micrococcus* ATCC 10240 株¹²⁾ を用い、25%組織乳剤について測定した。

3) 実験脳腫瘍の治療

脳腫瘍細胞移植ラット10匹を1群として、薬剤非投与群、腫瘍細胞移植1日のちより連続5日間 5-FC 150 mg/kg を腹腔内に、同時に CDase 0.1 I. U. を腫瘍細胞移植部位に注入した治療群、および PBS を腹腔内に、CDase を局所に投与した群の3群に分け、神経症状の観察とともに生存日数を検討した。また、別に各群と同様の処置を施した数匹のラットを作り、組織学的検索のため治療開始後2週間目に屠殺し、摘出脳をホルマリン固定し、標本作製した。

III 結 果

1. *In vitro* の実験

1) CDase の活性

5-FC ならびに 5-FU はそれぞれ pH 7.0 で、284 nm および 265 nm に吸光極大を持つ吸光曲線を示す。酵素反応により 5-FC が 5-FU に転換されるにつれて吸光極大の波長は 284 nm より 265 nm に移動し、反応液は最終的には 265 nm に吸光極大を持つ吸光曲線を示した (Fig. 1)。

2) 5-FC と CDase の併用による細胞増殖抑制効果

* 大阪府立大学農学部保存

Fig. 2 Growth curves of cultured EA-285 glioma cells treated with 5-Fluorocytosine (5-FC) and CDase.

Fig. 3 Growth curves of cultured EA-285 glioma cells treated with 5-FC or CDase.

5-FC と CDase の併用投与により、1 μg/ml 濃度の 5-FC でも顕著な増殖抑制効果を示した。また 1 ~ 5 μg/ml の濃度で投与した場合には、薬剤除去後徐々に細胞数の増加がみられるのに対し、10 μg/ml 以上の濃度では細胞数は減少し、顕著な殺細胞効果が認められた (Fig. 2)。一方、5-FC (200 μg/ml) ならびに CDase (0.4 I. U.) の各々単独投与においては対照と同様の細胞増殖を示し、増殖抑制効果は認められなかった (Fig. 3)。

3) 薬剤の細胞周期動態に及ぼす影響

蛍光物質により DNA 保有核を染色し、Fluorocytograph を用い、薬剤投与後の細胞集団の相対的 DNA 量を histogram として表現したものを Fig. 4 に示した。

横軸は相対的 DNA 量を、縦軸は細胞数を示す。対照群

Fig. 4 DNA histograms on fluorocytographic studies of EA-285 glioma cells treated with 5-FC and CDase.

のEA-285 glioma 細胞は2C (diploid) すなわちG₀G₁ 期に dominant なピークを有するパターンを示すが、薬剤除去直後では、ピークは2Cより3C (triploid) 移行部に移動し、S 初期に細胞集団の集積がみられ、また4C (tetraploid) すなわちG₂M期細胞群の増加が認められた。5-FC を増量し、25 μg/ml 以上の濃度にするるとS 初期の細胞群の増加がみられ、G₂M期細胞群の減少を認めた。96時間後には、1, 5 μg/ml の低濃度では DNA histogram のパターンは対照群のそれに回復するが、10 μg/ml 以上の濃度ではG₁ならびにS 初期に細胞の著明な蓄積を認め、細胞数の著しい減少を示した。

2. In vivo の実験

1) 5-FC, 5-FU の組織内濃度

生物学的測定法については標準薬剤液により予備実験を行い、5-FC では0.5~100 μg/ml、5-FUについては0.025~100 μg/ml の範囲で各々微量測定が可能であった。また再現性についても十分であることを確かめたのち、組織内濃度測定を行った。5-FC に対する *Micrococcus luteus* の感受性は低く、両者混合薬剤液を用いた標準曲線は5-FU のそれと同じであり、100 μg/ml 以下の濃度においては5-FU のみの測定が可能であった (Fig. 5)。一方、*Saccharomyces cerevisiae* は5-FC, 5-FU に対し同じ感受性を示した。両者同濃度の薬剤混合液を用いた阻止円直径は、5-FC のそれに比べ2倍の直径を持つ阻止円が認められた (Fig. 6)。したがって、5-FC と CDase 併用投与群の同一試料にお

Fig. 5 Comparison of inhibitory zone diameters by *micrococcus luteus* ATCC 10240 between 5-FC and 5-FC+5-FU.

Fig. 6 Comparison of inhibitory zone diameters by *saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 between 5-FC and 5-FC+5-FU.

る5-FC, 5-FU 濃度は、両菌を用いて得られた値より換算して求めることが可能であった。5-FC 150 mg/kg を腹腔内、CDase 局所投与併用後の組織内濃度を検討したところ、5-FC 濃度はいずれの組織においても投与30分後より増加を認め、1時間後には最高値となり、血中96 μg/ml、腫瘍内85 μg/g、正常対側脳46 μg/g の濃度を示した。その後4時間後まで急速に減少し、以後緩徐な減少を示し、8時間後には血中11 μg/ml、腫瘍内6 μg/g となった (Fig. 7)。

一方、転換5-FU 濃度 (Fig. 8) は30分後においてすでに上昇が認められ、1時間後腫瘍内3 μg/g、対側脳1.1 μg/g、血中約0.2 μg/ml であった。2時間後最高値を示し、腫瘍内9.6 μg/g に達し、腫瘍内5-FC 濃度の約12% であった。一方血中に移行した5-FU は約0.4 μg/ml となり、腫瘍内5-FU 濃度の約4.2% であった。以後腫瘍内5-FU は漸次減少し、4時間後4 μg/g、8時間後1 μg/g を示した。

Table 1 Effect of 5-FU and CDase on the survival time of rats bearing tumors treated with 5-FU and CDase

Group & Drug	Number	MST**	% Control of MST**	Significance by <i>t</i> -test	Survivors over 30 days
Control	10	28.2 ± 2.3			2 (20%)
PBS* + CDase	10	26.0 ± 3.2	92	N.S	1 (10%)
5-FU + CDase	10	38.3 ± 4.0	136	P < 0.001	10 (100%)

*: phosphated buffered saline **; mean survival time (days)

Fig. 7 Tissue concentration of 5-FU in brain tumor bearing rat treated with 5-FU and CDase.

Fig. 8 Tissue concentration of 5-FU in brain tumor bearing rat treated with 5-FU and CDase.

血中 5-FU は 4 時間後より 0.1 μg/ml 以下の低値であった。

2) 実験脳腫瘍モデルに対する治療効果

本モデルは腫瘍定着率100%で、各群における死亡ラットは、剖検によりすべて腫瘍死であることを確認した。対照群ラットは、腫瘍細胞接種後20日頃より著明な体重減少と衰弱をきたし、頭蓋内圧亢進により死亡した。平均生存日数は28.2日であった。

Fig. 9 Survival rate of rats bearing brain tumors treated with 5-FU and CDase. PBS: phosphated buffered saline.

PBS と CDase 併用投与群では対照群とほぼ同じ頃より症状発現を認め、平均生存日数は26.0日であり、両群の間には有意の差を認めなかった (Table 1)。一方、5-FU と CDase 併用投与群においては30日前後より症状発現を認め、ほかの2群が32日目までにすべて死亡するのに対し、33日目より死亡例を認め、最長生存日数は45日であった。平均生存日数は38.3日であり、ほかの2群に比べ有意の延命効果を認めた (Fig. 9)。

治療開始後14日目の剖検脳における組織学的検索では、PBS と CDase 投与群ならびに対照群は、大脳半球内に約3mm大の腫瘍がみられ、周囲に浸潤している像が認められた (Fig. 10 A)。5-FU と CDase 併用例では、腫瘍の存在する部位は壊死像が認められ、腫瘍細胞は著減していた (Fig. 10 B)。しかし周辺部には、腫瘍細胞の増殖が認められた。

IV 考 察

抗腫瘍化学療法剤の多くが腫瘍に対し選択毒性を持たず、宿主に有害な全身副作用を与えることは周知の事実であり、また全身投与により、腫瘍組織に有効必要量を導入維持しがたいことも現実であり、これらが薬剤の投与量、投与方法を規制している。いかに人体に安全で有効な抗腫瘍剤を使用するかが肝要であり、このため現在まで多くの局所投与法が開発されている^{7,13,25,33,39)}。最近では抗腫瘍

Fig. 10 Histology of brain tumors in rats sacrificed 14 days after implantation of EA-285 glioma cells. A: Control (no treatment). Infiltration of the tumor cells surrounding the brain tissue is seen. B: Treatment with 5-FU and CDase for 5 days. Number of tumor cells was remarkably decreased at the necrotic area. HE stain $\times 700$

剤の局所徐放性ペレットが考案され、*in vivo* の研究、あるいは人脳腫瘍に試みられている^{22,23,30,31}。

我々は、人体無害のマスク化合物を腫瘍内で抗腫瘍剤に転換させることができれば、局所で抗腫瘍効果を有効に発揮させ、忌むような全身副作用を最小にしようと考え、5-FU に着眼した。これを転換酵素により局所内で 5-FU に転換させるというアプローチは、我々の知りうるかぎりではまったく新しい抗腫瘍化学療法と思われる。5-FU は現在抗真菌剤として臨床に用いられており^{1,5,8,24,38}、その構造が 5-FU に類似しているけれども、脱アミノ化されないかぎり人体内では無害である。経口投与されると大部分が腸管より吸収され、そのままの形で腎より早期に排泄される。

5-FU の真菌に対する作用機序は十分解明されているとはいえないが、Koechlin ら¹⁶ は、5-FU- ^{14}C 添加培地で *Candida albicans* を培養し、5-FU- ^{14}C の活性追跡を行ったところ、RNA 分画中に認められたことより、真菌細胞内で 5-FU は CDase により脱アミノ化され、5-FU に転換され、核酸合成を阻害して抗真菌作用を発揮すると考えている。5-FU が人体内に投与されても、人細胞内には CDase が存在しないため 5-FU に転換されることはない。脳腫瘍培養細胞に 5-FU を単独投与しても、我々の結果の

示すごとく、 $200 \mu g/ml$ 以下の濃度では増殖抑制は生じない。

CDase は、1925年 Hahn と Schäfer⁹ によって酵母と *E. Coli* の菌体内に初めて見いだされて以来、多くの微生物の細胞に見いだされている^{11,15,26,27,28}。CDase は、pyrimidine nucleotide の生合成の salvage 合成に重要な役割を持つ酵素と考えられ、cytosine を特異的に脱アミノ化し uracil に転換する。Sakai ら²⁶ は、1975年に *Serratia marcescens* の菌体内より 900倍に精製し、均一な蛋白標品として酵素を単離しているが、本実験では *E. Coli* K-12 株菌体内より抽出、精製したものをを用いた²⁸。本酵素は分子量約 21万で、 $pH 7.0 \sim 9.0$ においてもとても安定で、 $30^\circ \sim 50^\circ C$ では少なくとも 3 週間は失活しない。培養脳腫瘍細胞に CDase を単独投与しても増殖抑制は認められず、HeLa 細胞を用いた基礎実験の結果¹⁰ からも、CDase 自身には細胞毒性はないと考えられる。しかし 5-FU と CDase を併用すれば、我々の推論したごとく、5-FU は 5-FU に転換され、*in vitro* においては低濃度の 5-FU ($1 \mu g/ml$) でも増殖抑制効果を示し、 $10 \mu g/ml$ 以上の濃度では顕著な殺細胞効果が認められた。この実験と同一の実験系で、本法を 5-FU の単独投与の場合と比較したが、両者ともに同程度の効果が認められた。*In vivo* の実験においては、両者併用投与後比較

的速やかに腫瘍内の 5-FU の濃度が上昇し、2 時間で最高値に達した。以上のごとく、*in vitro* ならびに *in vivo* において、5-FC の CDase による 5-FU への転換が十分行われることが示された。

最近開発された fluorocytograph は蛍光物質により DNA を標識し、細胞 1 個当たりの相対的 DNA 量を迅速に測定することが可能で、細胞集団の DNA 量の分散分布を histogram として抽出でき、これより細胞周期全体の分析が可能である。我々はこの装置を用い、5-FC と CDase の効果を細胞周期動態の面より検討した。このような試みは最近報告が増加しつつある^{14,41)}。一般に増殖期にある細胞集団では、2 C (diploid) は G0 G1 期、4 C (tetraploid) は G2 M 期、そしてこの移行部の 3 C (triploid) は、S 期細胞群を示すと考えられている。両者併用投与により、薬剤除去直後では、培養細胞が 5-FC の各濃度において S 初期に同調される。低濃度 (1 ~ 5 $\mu\text{g/ml}$) では、96 時間後には再び対照群と類似した 2 C に主ピークを有するパターンを示し、細胞周期が回復したことが示唆される。一方高濃度 (25 $\mu\text{g/ml}$ 以上) では、96 時間後でも G1 および S 初期に細胞蓄積がみられ、増殖曲線上細胞数の減少とも一致する。すなわち細胞周期進行は停止したものと考えられる。高本ら³⁶⁾は同様の検討を行い、5-FU 等の代謝拮抗剤は一般に S-specific drug とされているが、濃度による相違を指摘し、低濃度では S 期延長を示し、高濃度では G1 および G1-S 移行部に蓄積すると報告し、我々の所見と一致する。

5-FC、5-FU の体液内あるいは組織内濃度測定には生物学的測定法^{2,12,18,32,33)}や直接蛍光測定法²⁰⁾があるが、いずれも同一検体中の両者の分別定量は困難である。最近では高速液体クロマトグラフィーを用いた方法²¹⁾が試みられているけれども、我々は 2 つの菌の感受性の差を利用し、生物学的測定法により、同一検体より 5-FC、5-FU の同時定量に成功した。すなわち、5-FU に感受性が高く 5-FC に低い *Micrococcus luteus* ATCC 1024 株と、5-FC に感受性を示す *Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100 株を用い、薬剤による増殖阻止円直径より定量化した。担脳腫瘍ラットに 5-FC と CDase の併用投与後経時的に組織内濃度を測定したところ、5-FC の抽出腫瘍内濃度は血中濃度とほぼ平行し、投与後 1 時間で最高値に達し、各々 85 $\mu\text{g/g}$ 、96 $\mu\text{g/ml}$ を示し、以後 4 時間まで急減したのち漸減した。対側正常脳内濃度は腫瘍内濃度の約 54% と低く、腫瘍内がより高濃度なのは、腫瘍部位の血液・脳関門の破綻の存在を示唆していると思われる。小田切ら²⁰⁾は、5-FC-²¹⁴C 100 mg/kg をラットに経口投与したのち 5-FC の生体内動態を追跡した結果、血中濃度は 1 ~ 2 時間後に最高値 (約 30

$\mu\text{g/ml}$) に達し、直線的減少ののち漸減すると述べている。一方脳内濃度は 1 時間より 4 時間の間漸増し、血中濃度の約 17% に達したと報告している点を除いては、その分布経過において我々のデータと一致する点が多い。さて、転換 5-FU は投与後 30 分よりただちに腫瘍内に認められ、2 時間後最高値 9.6 $\mu\text{g/g}$ に達し、4 時間後 4.0 $\mu\text{g/g}$ と漸減し、8 時間にも 1 $\mu\text{g/g}$ を維持している。この点が身体他組織内濃度が 4 時間で急減するところと異なる。腫瘍内 5-FU 濃度の最高値が血中より 1 時間ずれて認められるのは、CDase による 5-FC の脱アミノ化に要する時間のためであろう。対側脳内に認められた 5-FU は、大部分が注入 CDase のクモ膜下腔を介する拡散の結果、5-FC より転換されたものと考えられ、併用投与後の血中 5-FU は、腫瘍内 5-FU の移行によると推測される。この血中濃度は、2 時間後最高値で腫瘍内濃度の約 4.2% であり、この後は 0.1 $\mu\text{g/ml}$ という低値であった。

抗腫瘍効果を発揮させるための 5-FU の必要有効濃度は確定されていないが、癌組織内に 0.05 $\mu\text{g/g}$ 以上、血清値で 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 以上を長期間維持することが望ましいという報告もある¹⁸⁾。5-FU の効果発現に必要な有効濃度から考慮しても、本法は腫瘍内濃度を十分かつ比較的長期間保ちうることを証明され、血中へ移行する 5-FU が微量な点も臨床応用に有利と思われる。

我々が作製した実験脳腫瘍モデルでは、腫瘍生着率 100% で、動物はすべて腫瘍死したが、腫瘍細胞接種 1 日後より併用療法を 5 日間続けたところ、対照群に比べ有意の延命効果を得た。治療開始 2 週間後に標本を作製し病理組織を検討した結果、治療群では壊死巣が観察され、周辺部にのみ腫瘍細胞が残存していた。悪性腫瘍の通常として中心壊死の問題が考慮されねばならないが、動物の屠殺時期の選択と対照群との厳密な比較を行った結果、明らかに有意な変化といえよう。なお実験動物に副作用は認められなかった。

抗腫瘍剤を臨床応用する際、選択毒性や局所有効濃度を考慮するほかに、薬剤自体が腫瘍細胞の周期といかなるかわかり合いを持つか、換言すれば薬剤の作用機序の上にたって使用法を立案せねばならない。我々は、本療法の腫瘍細胞周期への影響を DNA histogram より検討し、有用な情報を得ることができた。5-FU は cell cycle specific であり、十分な抗腫瘍効果を期待するためには、一定濃度を一定期間局所に保つことが必要と考えられる。本法の酵素反応は基質依存性であるため、血中より 5-FC が絶えず供給されれば酵素活性が消失するまで進行する。幸い CDase は予備実験において、生体内留置カプセル内で数ヵ月後においても失活しないことが判っている。現在我々は、腫瘍内に

CDase 封入カプセルを留置し動物実験を重ねている。この結果は次報に譲るが、カプセルの概要は高分子の CDase は外に出さず、5-FC が自由にカプセル内に入り5-FU に転換され、十分量が放出され、抗腫瘍効果を得るものであり、異種蛋白による免疫反応も考慮して作られたものである。今後各種素材を検討することにより多数の治療法が期待される。

V ま と め

1. 宿主に無害で、脳腫瘍に抗腫瘍作用を持つ局所化学療法の開発を目的として、5-FC-CDase 併用療法の基礎実験を *in vitro*, *in vivo* で行った。

2. 吸光度測定より、5-FC は CDase により5-FU に転換されることが確認され、EA-285 glioma 培養細胞の増殖曲線の検討より殺細胞効果が示された。

3. Fluorocytograph を用い、薬剤の腫瘍細胞周期動態に及ぼす影響を検討した結果、glioma 細胞は薬剤除去直後 S 初期に同調され、高濃度では G 1, S 初期に蓄積されたままとなり、細胞周期の停止が示唆され、細胞増殖動態と対応することがわかった。

4. 感受性の異なる 2 菌を用いた生物学的測定法により、組織内 5-FC, 5-FU の同時測定に成功した。担脳腫瘍ラットに本療法を行い、腫瘍内に有効必要濃度以上の転換 5-FU を認め、組織学的検討により腫瘍内壊死巣の発現を認めた。

5. 実験脳腫瘍モデルにおいて本治療法による延命効果の検討を行った結果、治療群を有意に延命させることが明らかとなった。

6. 局所に 5-FU 有効濃度が維持され、血中に移行した 5-FU は微量であることが確認され、全身副作用の少ないことが示唆された。さらに CDase, CDase 封入カプセルの概要について述べた。

本論文の要旨の一部は第39回日本脳神経外科学会総会(1980年10月、金沢)で発表した。また本研究は文部省科学研究費補助金 No. 167188 (1976年), No. 557336 (1980年)により遂行された。EA-285 glioma 細胞を分与して頂いた名古屋大学脳神経外科 吉田純博士、ならびに Fluorocytograph の使用に当たり、国立療養所宇多野病院 西谷 裕副院長の御好意に感謝致します。また cytosine deaminase の供給に関し、チッソ株式会社 開発室 藤井正弘、森田 裕両氏に負うところが大きく、実験遂行には吉城 豊子嬢、栗田泰子嬢の助力を得たことを感謝致します。

文 献

1) Alexander GV, Arthur AM, Joseph EJ: 5-Fluorocytosine in the treatment of mycotic infections. *Ann Intern Med*

77: 43-51, 1972

2) Block ER, Bennet JE: Pharmacological studies with 5-Fluorocytosine. *Antimicrob Agent Chemother* 1: 476-482, 1972

3) Diasio RB, Bennet JE, Myers CE: Mode of action of 5-Fluorocytosine. *Biochem Pharmacol* 27: 703-707, 1978

4) Duschinsky R, Plevin E, Heiderberger C: The synthesis of 5-Fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* 79: 4559-4560, 1957

5) Fass RJ, Perkins RL: 5-Fluorocytosine in the treatment of cryptococcal and candida mycoses. *Ann Intern Med* 74: 535-539, 1971

6) 藤田 浩, 向島 達, 中山 昇, 沢部孝昭, 土田裕子, 青木光子: 抗癌剤の bioassay について. *メディヤサークル* 12: 259, 1967

7) Garfield J, Chir M, Dayan AD: Postoperative intracavitary chemotherapy of malignant gliomas. A preliminary study using methotrexate. *J Neurosurg* 33: 315-322, 1973

8) Grunberg E, Titsworth E, Bennet M: Chemotherapeutic activity of 5-Fluorocytosine, in Sylvester JC (ed): *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Ann Arbor, American society for Microbiology, 1963, 566 pp

9) Hahn A, Schäfer L: Uebers Verhalten von Pyrimidin der Ivaten in dem Organismen. *Z Biol (München)* 83: 551, 1925

10) Hansen HH, Muggia FM: Treatment of malignant brain tumors with nitrosourea. *Cancer Chemother Rep* 55: 99-100, 1971

11) Hayashi O, Kornberg A: Metabolism of cytosine, thymine, uracil, and babituric acid by bacterial enzymes. *J Biol Chem* 197: 717-732, 1952

12) 逸見昭二, 前田憲一, 春野 鋼: Micrococcus luteus ATCC 10240 を試験菌とする (tetrahydro-2-furanyl)-5-fluorouracil (TF) および 5-Fluorouracil (5-FU) の濃度測定法. *基礎と臨床* 13: 49-54, 1979

13) 平山章彦, 青木達之, 高久 晃, 鈴木二郎, 和田徳男: BLM の内頸動脈内持続注入療法を行った神経膠腫 3 例. *ブレオマイシン研究会脳腫瘍部会誌* 4: 43-49, 1972

14) Holm DM, Gram LS: An improved flow micro-fluorometer for rapid measurement of cell fluorescence. *Exp Cell Res* 8: 105-108, 1973

15) Ipata PL, Marmocch F, Magn G, Feliciol R, Polidoro G: Baker's yeast cytosine deaminase. Some enzymic properties and allosteric inhibition by nucleosides and nucleotides. *Biochemistry* 10: 4270-4276, 1971

16) Koechlin BA, Rubio F, Palmer S, Gabriel T, Duschinsky R: The metabolism of 5-Fluorocytosine- ^{214}C and of cytosine- ^{14}C in the rat and the disposition of 5-Fluorocytosine- ^{214}C in man. *Biochem Pharmacol* 15: 435-446, 1966

17) Mclimans WF, Davis EV, Glover FL: The submerged culture of mammalian cells: The spinner culture. *J Immunol* 79: 428-433, 1957

- 18) 中村 孝, 橋本伊久雄, 沢田康夫, 三上二郎, 戸次英一, 平沢貞子, 阿部 弘, 葛西洋一, 中西昌美: 癌患者における 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil の組織内濃度について. *Chemotherapy* 28: 55-62, 1980
- 19) 西山直志, 河村梯夫, 河本圭司, 松村 浩, 伊藤富由, 大山昭夫, 桂樹 徹, 坂井拓夫: Cytosine deaminase (CDase) との併用による 5-Fluorocytosine (5-FC) の抗腫瘍効果について. *日化療会誌* 29: 492-493, 1981
- 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) 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血 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
- 22) 織田祥史, 内田泰史, 徳力康彦, 半田 肇, 明石 遼, 村上七美, 門脇奉則, 木下大学, Kieler J: 長期持続局所投与方法による癌の治療(II) 5-FU-silastic pellet に付加した urokinase の効果. *癌と化学療法* 5: 1293-1300, 1978
- 23) 織田祥史, 内田泰史, 村田高德, 森 惟明, 半田 肇, 三宅英則, 端 和夫, 小林 旭, 奥村禎三, 寺浦哲明, 津田永明: 徐放性抗癌剤ペレット 3 年間, 83 例の臨床成績より一. 第40回日本脳神経外科学会プログラム 1981, 12 pp
- 24) Rall DP: Experimental studies of the blood brain barrier. *Cancer Res* 25: 1572-1579, 1965
- 25) Ringkjøb R: Treatment of intracranial gliomas and metastatic carcinomas by local application of cytostatic agents. *Acta Neurol Scand* 44: 318-322, 1968
- 26) Sakai T, Yu Tae-Shick, Tabe H, Omata S: Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr Biol Chem* 39: 1623-1629, 1975
- 27) Sakai T, Yu Tae-Shick, Taniguchi K, Omata S: Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr Biol Chem* 39: 2015-2020, 1975
- 28) Sakai T, Katsuragi T, Nishiyama T, Kawamura Y: 5-Fluorocytosine deaminating activity in *Escherichia coli*; Its production and application to cancer treatment in combination with 5-Fluorocytosine. *FEBS Letters* (In preparation)
- 29) 佐野圭司: 脳腫瘍の化学, 放射線療法. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 16: 379-386, 1976
- 30) 佐藤 寛, 飯塚紀文, 平田克治, 未舛恵一, 行徳素道: 食道癌の腹部リンパ節廓清に対する補助手段としての固型プレオマイシンによる局所化学療法. *癌と化学療法* 3: 485-494, 1976
- 31) 佐藤靖雄, 森田 守, 宮川晃一, 井上憲文, 鮎戸栄一郎, 土井清一郎: 頭頸部再発癌に対する固型プレオマイシン刺入療法. *癌臨床* 21: 1159-1166, 1975
- 32) Schönebeck J, Polak A, Fernex M, Scholer HJ: Pharmacokinetic studies on the oral antimycotic agent 5-Fluorocytosine in individuals with normal and impaired kidney function. *Chemotherapy* 18: 321, 1973
- 33) 柴田尚武, 森 和夫: Craniopharyngioma に対する Bleomycin の局所投与-Bioassay による嚢胞内容液濃度. *臨床外科* 28: 873-875, 1973
- 34) Steer PL, Marks MI, Klite PD, Eickhoff TC: 5-Fluorocytosine: An oral antifungal compound. A report on clinical and laboratory experience. *Ann Intern Med* 76: 15, 1972
- 35) 高倉公朋: 悪性脳腫瘍の免疫療法. *神経進歩* 22: 158-164, 1978
- 36) 高本 滋, 太田和雄: F. M. F. による細胞回転と癌化学療法. *癌と化学療法* 5: 727-736, 1978
- 37) Takeuchi J, Nakao S, Handa H: Treatment of brain tumors with CCNU. *Arch Jap Chir* 42: 184-189, 1973
- 38) Tassel D, Madoff MA: Treatment of candida sepsis and cryptococcosis meningitis with 5-Fluorocytosine. *JAMA* 206: 830-832, 1968
- 39) Wilson CB, Norrel H: Brain tumor chemotherapy with intrathecal methotrexate. *Cancer* 23: 1038-1045, 1969
- 40) Wilson CB, Boldrey ER, Enot KJ: 1-3-Bis (2-Chloroethyl)-1-Nitrosourea (NSC 409962) in the treatment of brain tumors. *Cancer Chemother Rep* 54: 273-281, 1970
- 41) Yatsganis X, Clarkson BD: Flow microfluorometric analysis of cell killing with cytosine drugs. *J Histochem Cytochem* 22: 651-659, 1974
- 42) Yoshida J, Cravioto H: Nitrosourea induced brain tumors: An in vivo and in vitro tumor model system. *J Natl Cancer Inst* 61: 365-374, 1978

[別刷請求先: 〒570 大阪府守口市文園町 1, 関西医科大学 脳神経外科, 河村梯夫]