新制癌剤 5-Fluoro-1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (FD-1)
の生体内運命 (第 1 報) 経口投与による吸収, 分布, 代謝および排泄

川口安郎, 中村芳正, 佐藤俊幸, 武田節夫, 丸中照義,^{1a)} 藤井節郎^{1b)}
大鵬薬品工業株式会社技術研究部,^{1a)} 大阪大学蛋白質研究所^{1b)}

Studies on the Fate of 5-Fluoro-1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione
(FD-1), a New Antitumor Agent. I. Absorption, Distribution, Excretion
and Metabolism of FD-1 administered orally to Rats

YASURO KAWAGUCHI, YOSHIMASA NAKAMURA, TOSHIYUKI SATO, SETSUO TAKEDA,
TERUYOSHI MARUNAKA^{1a)} and SETSUO FUJII^{1b)}

Research Laboratory, Taiho Pharmaceutical Co., Ltd.^{1a)} and Institute
for Protein Research, Osaka University^{1b)}

(Received July 9, 1977)

After oral administration of 5-fluoro-1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (FD-1), the level of 5-fluoro-2,4-pyrimidinedione (5-FU) was 5 to 7 times higher in the plasma and normal tissues and 8 to 12 times in tumor tissue than after administration of 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (FT). Moreover, these levels were maintained longer than after administration of FT. In tumor tissue, the concentration of 5-FU was still as high as 1.42 $\mu\text{g/g}$ 12 hr after administration of FD-1.

FD-1 was degraded to 5-fluoro-3-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (3-FT) by liver microsomal drug-metabolizing enzymes *in vitro* and to FT spontaneously. Subsequently, FT was converted enzymically to the active substance, 5-FU, and 3-FT changed to 5-FU spontaneously. Conversion of FD-1 to 5-FU *via* 3-FT was greater than *via* FT.

It is concluded that a large amount of 5-FU formed after administration of FD-1 is formed *via* 3-FT. γ -Hydroxybutyric acid was found to be formed *in vivo* and *in vitro* from the tetrahydrofuranyl group of FD-1.

Keywords—5-fluoro-1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione; antitumor agent; drug metabolism; microsomal drug-metabolizing enzyme; 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione; γ -hydroxybutyric acid; 5-fluoro-3-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione; gas chromatography-mass spectrometry; thin-layer chromatography

緒 言

5-Fluoro-1,3-bis(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (以下 FD-1 と省略) は 5-fluoro-2,4-pyrimidinedione (以下 5-FU と省略) の新しい誘導体として開発された制癌剤であり, 次の化学構造式を有する.

現在, 癌の化学療法においては 5-FU およびその誘導体が広く用いられているが,²⁾ 5-FU についてはその効果は強いにもかかわらず副作用も少なくない.³⁾ また 5-FU の誘導体である 5-fluoro-1-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (以下 FT と省略) はこれら 5-FU のもつ欠点を改良し, 副作用の少ない長期間連用しうる制癌剤として広く使用されているがしかし, 更に効果の優れた, また副作用の少ない制癌剤の開発が望まれている.

一方, 下山らによれば, 制癌剤はいくつかのタイプに分類され, 5-FU, FT などの代謝拮抗剤は時間依存性の薬剤であり, その効果を有効に発現させるためには一度に高濃度に与えるよ

1) Location; a) Hiraishi Ebisuno, Kawauchi-cho, Tokushima; b) 5311 Yamada, Suita.

2) 古江 尚, 服部隆延, 中尾 功, フェルマシア, 7, 600 (1971).

3) 黒川利雄, 診断と治療, 60, 2042 (1972).

りも、比較的低濃度でも長時間与え続ける方が望ましいと述べている。⁴⁾

これらの点より、FT にくらべてより高濃度の 5-FU を血液中、腫瘍中に長時間持続させる制癌剤として FD-1 が開発された。FD-1 の実験腫瘍に対する効果は FT にくらべより強く、また毒性も FT にくらべ 1/2—1/3 低いと報告されている。⁵⁾

今回我々は FD-1 の生体内動態について FT と比較検討し、併せて FD-1 の 5-FU への活性化機構についても若干の知見を得たので報告する。

実 験 の 部

実験材料 FD-1, FT および 5-fluoro-3-(tetrahydro-2-furanyl)-2,4-pyrimidinedione (以下 3-FT と省略) は、大鵬薬品工業(株)技術研究部にて新たに合成したものをを用いた。⁶⁾ 5-FU は Sigma 社 (USA) より、また γ -hydroxybutyric acid (以下 GHB と省略), γ -butyrolactone (以下 GBL と省略), および 1,4-butanediol (以下 1,4-BD と省略) は和光純薬工業より購入した。4-hydroxybutanal (以下 4-HB と省略) は Paul らの方法⁷⁾ に従って合成した。

実験動物 *In vivo*, *in vitro* 共にドンリュウ系雄性ラット (体重 180 ± 20 g, 日本ラット) を用いた。担癌ラットの作製に関しては AH 130 を左腋窩部皮下に移植し、1 週間後のものを使用した。なお実験開始前 18 時間絶食を行ない、自由摂水のみとした。

投与量および投与方法 投与量は FD-1, FT 共に 1 mmol/kg (それぞれ 270 mg/kg, 200 mg/kg) とし、氷冷下に 5% アラビアゴム水溶液にそれぞれ 5.4%, 4% の割合で懸濁させ、経ロゾンデを用いて胃内に強制投与した。

代謝物の検索 FD-1 経口投与後の各代謝物を調べるために FD-1 投与 2 時間後の血漿 300 ml を用い、塩酸酸性下 (pH 2) クロロホルム 3000 ml にて 2 回抽出した後、クロロホルム層を濃縮乾固し、薄層クロマトグラフィー (TLC, Kieselgel 60 F 254, thickness 0.25 mm, Merck, precoated) により、展開溶媒 (I) クロロホルム-*n*-ブタノール (9:1) を用い R_f 0.60 (FD-1 に相当), R_f 0.38 (FT に相当) および R_f 0.26 (3-FT に相当) の紫外線照射陽性画分をメタノールにて抽出した。展開溶媒 (I) による FD-1 および FT 画分のメタノール抽出物については、更に展開溶媒 (II) クロロホルム-ジオキサン (2:1) にて展開後、標準品の FD-1 および FT と R_f 値の一致する紫外線照射陽性画分をメタノールにて抽出し、窒素気流中にて乾固した後クロロホルムにて抽出精製して質量分析計 (EI-Mass, 日本電子 JMS-01 SG-2 型) にて同定した。

また展開溶媒 (I) による 3-FT 画分のメタノール抽出物については、更に 6 回展開溶媒 (I) にて精製した後、塩酸およびメタノールにて常法に従って処理した Kieselgel HF 254, Type 60 を用いて作製した薄層プレートにより、展開溶媒 (II) を用いて標準品の 3-FT と R_f 値の一致する紫外線照射陽性画分をメタノールにて抽出し、窒素気流中で乾固した後クロロホルムにて抽出精製し、これを濃縮乾固することにより得られた白色針状結晶を用い、核磁気共鳴装置 (NMR, 日立 R-22 型), 質量分析計 (EI-Mass, 日本電子 JMS-01 SG-2 型 および CI-Mass, 島津 GCMS-9000 B 型), 分光光度計 (UV, 日立 124 型) および元素分析計 (柳本 MT-2 型) により同定した。

GHB については FD-1 投与 2 時間後の血漿 1 ml を用い、Giarman らの方法⁸⁾ に従い、氷冷下にて試料溶液に最終濃度が 10% になるようにトリクロル酢酸を加え、攪拌後 $33000 \times g$ で 7 分間遠心した上清を 100° で 15 分間加熱した後、5 倍量のベンゼンで 2 回抽出した有機溶媒層を窒素気流中で濃縮し、ベンゼンにて 50 μ l に調製した。

1,4-BD および 4-HB については、*in vitro* にて FD-1 を肝ホモジネート 1 ml とインキュベートした後、中性にて 5 倍量の酢酸エチルで 2 回抽出した有機溶媒層を窒素気流中で濃縮し、酢酸エチルにて 50 μ l に調製した。GHB, 1,4-BD および 4-HB は共にガスクロマト-質量分析計 (GC-MS, 日本電子 JMS-01 SG-2 型) により同定した。なおガスクロマトグラフィーの条件として、カラムは 10% PEG 20M (80/100 mesh), 3 mm $\times$ 2 m を用い、カラム温度は GHB の場合 130° , 4-HB および 1,4-BD の場合 160° で行ない、キャリアーガスはヘリウム (30 ml/min) を用いた。

FD-1 経口投与後の生体内動態 FD-1 経口投与後の未変化体 FD-1, 代謝物としての FT, 3-FT および活性物質である 5-FU の生体内動態を知るために血漿、尿および腫瘍を含む各組織におけるこれら代謝物の時間的変化を調べ、FT 投与による変化と比較検討した。また FD-1 の tetrahydrofuryl 基の代謝物と考えられる

4) a) 下山正徳, 木村禧代二, 第 29 回日本癌学会総会記事, 大阪, 1970 年, p. 237; b) 下山正徳, 木村禧代二, 第 30 回日本癌学会総会記事, 東京, 1971 年, p. 189.

5) a) 采見憲男, 安本三治, 森田健一, 梶原大義, 戸出英輝, 第 35 回日本癌学会総会記事, 東京, 1976 年, P. 132; b) 采見憲男, 武田節夫, 北里健二, 梶原大義, 藤井節郎, *Chemotherapy*, 受理.

6) M. Yasumoto, I. Yamawaki, T. Marunaka, N. Unemi, S. Hashimoto, T. Suzue, *J. Med. Chem.*, accepted.

7) R. Paul, M. Fluchaire, G. Collardeau, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1950, 668.

8) N.J. Giarman, R.H. Roth, *Science*, **145**, 583 (1964).

Fig. 1. Extraction Procedure of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU

GHB については血漿および脳についてのみ、その時間的変化を検討した。すべて実験は 1 群 6 匹にて行ない、結果はその平均にて示した。

血液および各臓器については、薬物投与後 1/2, 1, 2, 4, 8, 12 および 24 時間にエーテル麻酔下に下大静脈より採血した直後断頭し、下大静脈および門脈より生理食塩水 20 ml ずつにて灌流し、全脳、胸腺、肺、心、肝、脾、膵、胃、小腸、大腸、腎、睪丸、筋肉、大腿骨々髄、副睪丸脂肪組織、腸間膜リンパ節および腫瘍を摘出した。

消化管内容物については、薬物投与後 1/2, 1, 2, 4 および 8 時間にエーテル麻酔下で脱血した後、噴門、幽門および回腸末端部を結紮し、胃および小腸を摘出して採取した。

尿については、薬物投与後糞尿分離式代謝ケージにて飼育し、0—6, 6—12, 12—24 および 24—48 時間の自然排泄尿を採取した。なお 0—6 時間および 6—12 時間の尿については氷冷下にて採取した。

FD-1 およびその代謝物の抽出分離および定量法については、安田らの FT についての報告⁹⁾を参考にして、塩酸々性下に 10 倍量のクロロホルムで 2 回抽出することにより、FD-1, FT および 3-FT はクロロホルム層に、5-FU は水層にそれぞれ定量的に移行することを確認して行なった。すなわち血漿はその 2 ml に生理食塩水 1 ml を加えた 3 ml を、臓器は氷冷下 25% のホモジネートを調製し(骨髄は採取全量に生理食塩水 3.5 ml を加えた)、その遠心上清 (3000 rpm × 15') 3 ml (脂肪組織に関しては最上層の組織破砕物を除いた) を、尿は容量測定後その 3 ml を、また消化管内残存物は胃および小腸のそれぞれについて生理食塩水 4 ml で 2 回洗い出し、更にクロロホルム 5 ml で 2 回洗い出した後、クロロホルムを窒素気流中で乾固し、先の生理食塩水での洗液と混和し正確に 10 ml とした後ホモジナイズしてその 3 ml を、いずれも Fig. 1 に従って抽出した。これらの操作はすべて 0—5° の低温で行なった。

クロロホルム層については TLC (Kieselgel 60 F 254, thickness 0.25 mm, Merck, precoated) により、まずニトロエタンで展開後に FD-1, を、次に代謝物の検索の項で述べた展開溶媒 (II) で二重展開後に FT および 3-FT をそれぞれデンシトメーター (島津二波長クロマトスキャナー, CS-900 型) を用いて同一薄層プレートにて展開した標準品の検量曲線より含量を求めた。デンシトメーターの測定条件は $\lambda_{\text{reference}}$ 380 nm, λ_{sample} 275 nm (FD-1), 270 nm (FT および 3-FT), scan mode は linear にて行なった。また水層については 3N 水酸化ナトリウム溶液にて pH 7 に調整後遠心した上清を、藤田らの *Staphylococcus aureus* 209 p 株を用いた薄層カップ法¹⁰⁾により抗菌活性を測定し 5-FU 含量とした。

FD-1, FT および 3-FT の血漿、臓器ホモジネートおよび尿からの回収率を、添加量 15 $\mu\text{g/ml}$, g (骨髄は 20 $\mu\text{g/g}$, 尿は 150 $\mu\text{g/ml}$) で検討したところ (各値は平均 $\pm$ 標準偏差にて表示した) 血漿ではそれぞれ $90.2 \pm 2.2\%$, $92.0 \pm 4.0\%$, および $87.8 \pm 3.8\%$, 臓器ホモジネートでは $87.2 \pm 6.6\%$, $89.3 \pm 7.5\%$ および $86.3 \pm 6.9\%$, 尿では $87.7 \pm 3.3\%$, $87.4 \pm 5.2\%$ および $88.9 \pm 3.0\%$ であった。また同様に 5-FU の回収率を検討したところ、安田らの報告⁹⁾ とほぼ同じ結果を得た。

GHB については血漿および脳ホモジネートから、代謝物の検索の項に従って抽出し、ガスクロマトグラフィー [以下 GC と省略、島津 GC-5A 型を用い、測定条件はキャリアーガスに窒素 (60 ml/min) を用いた以外はすべて代謝物の検索の項の GC-MS の場合と同じ] により分離定量した。この方法では GHB はすべて GBL として酢酸エチルに抽出されて定量されるが、その添加回収率は 5 $\mu\text{g/ml}$ 添加の場合、血漿で $82.3 \pm 5.6\%$, 脳ホモジネートで $88.3 \pm 6.5\%$ であった。

FD-1 の 5-FU への活性化機構 FD-1 の 5-FU への活性化機構を調べる目的で、基質として FD-1, FT お

9) 安田行寛, 東郷常夫, 采見憲男, 渡辺昭治, 播磨耕介, 鈴江崇志, *Chemotherapy*, **21**, 1171 (1973).

10) 藤田 浩, 癌と化学療法, **1**, 497 (1974).

よび 3-FT を用い、ラット肝のミクロゾームによる酵素的分解および水溶液中での自然分解について検討した。

反応系は我々が以前に FT の活性化の検討に用いた方法¹¹⁾と同様、25% の肝または各組織のホモジネートの 10000×g 上清または 105000×g 上清 0.8 ml, あるいは 1 ml 中に肝 0.25 g 対応量のミクロゾームを含む液 0.8 ml に NADPH 5 μmol/0.1 ml, 各基質 1 μmol/0.1 ml (基質は氷冷下に 1.15% KCl を含む 10 mM の Na/K リン酸緩衝液 pH 7.4 に溶解した) を加え、総量 1 ml とし 37° で振とうしつつ反応させた。また各基質の水溶液中での自然分解を調べるため、上記緩衝液に各基質を溶解し、同様に 37° にてインキュベートした。各時間における反応液中の基質および分解物の定量は、FD-1 経口投与後の生体内動態の項に従った。

FD-1 の Tetrahydrofuranyl 基の代謝 FD-1 の tetrahydrofuranyl 基の代謝経路を調べるため基質として FD-1, 4-HB および 1,4-BD を用い、25% 肝ホモジネートの 10000×g 上清 0.8 ml に各基質 1 μmol/0.1 ml, 必要に応じ NADPH または NADP 5 μmol/0.1 ml を加え、10 mM Na/K リン酸緩衝液 pH 7.4 にて総量 1 ml とし 37° にて振とうしつつ反応させた。また FD-1 の水溶液中での自然分解を調べるため、上記緩衝液を用い、同様に 37° にてインキュベートした。各時間における反応液中の基質および分解物の定量は、代謝物の検索の項に従ってベンゼンおよび酢酸エチルでそれぞれ抽出した後 GC にて行なった。GHB, 1,4-BD および 4-HB の反応液からの回収率は 20 μg/ml 添加の場合それぞれ、84.3±2.9%, 84.0±6.9% および 86.3±2.0% であった。

結 果

代謝物の同定

FD-1 投与後の血漿からの抽出物を TLC にて分離精製した。展開溶媒 (I) による R_f 0.60 および R_f 0.38 の紫外線照射陽性物質は、標準品との R_f 値の比較および EI-Mass の結果 [R_f 0.60; m/e : 270 (M^+), 200, 156, 131, 114, 71, 43. R_f 0.38; m/e : 200 (M^+), 130, 87, 71, 43] よりそれぞれ FD-1 および FT と同定した。

また R_f 0.26 の物質は EI-Mass においてラジカル重合が起きるため、CI-Mass (isobutane, $M+Q$ 201) を確認) も合わせて測定し、分子イオンピークが 200, 組成式が $C_8H_9FN_2O_3$ と推定した。更にジアゾメタンによるメチル化を行ない EI-Mass を測定し [m/e : 214 (M^+), 171, 145, 131, 115, 101, 88, 71, 58, 43], FT のメチル化体の EI-Mass の結果 [m/e : 214 (M^+), 145, 127, 87, 71, 43] と比較して, m/e 101 ($CH_3-N=CH-C(F)=C=O^+$) のイオンから骨格の 1 位 N にメチル化が起きたことを確認した。また NMR からは, F 核と tetrahydrofuran 環の 2 位の H 核との遠隔スピン結合がないという結果を得た。紫外吸収スペクトルにおいては, 中性あるいは酸性における λ_{max} に対してアルカリ性で λ_{max} が高波長側にシフトする結果を得た (Table I)。また元素分析の結果は次の如くであった。Anal. Calcd. $C_8H_9FN_2O_3$: C, 48.00; H, 4.53; N, 13.99. Found: C, 48.20; H, 4.82; N, 13.66. これら種々の分析結果より R_f 0.26 の物質は 3-FT と推定し, 合成した標準品と比較した結果 3-FT と同定した。

Giarman らの方法⁸⁾によるベンゼン抽出物中の代謝物は GC-Mass における保持時間 (t_R 7.4 min) およびそのマススペクトル [m/e : 86 (M^+), 56, 42, 28] が標準品の GBL のそれらと一致し, このことから血漿中の代謝物は GHB と結論された。更に *in vitro* での FD-1 と肝 10000×g 上清との反応液からの酢酸エチル抽出物は, GC-Mass において対照にみられない 2 ピーク (t_R 2.0 min および t_R 5.4 min) を示し, これらのマススペクトルはそれぞれ [m/e : 87 (M^+-1), 71, 57, 42, 31] および [m/e : 89 (M^+-1), 71, 57, 42, 31] であり, 標準品との比

TABLE I. Spectral Data of NMR and UV of the Metabolite showing R_f 0.26 on the Solvent System I of TLC

	NMR ^{b)} (ppm)	UV (λ_{max} nm)
Metabolite (3-FT)	7.47 (1H, d, $J_{H_6-F}=5.0$ Hz, H-6)	268.5 (pH=2)
	6.52 (1H, t, H-2')	300.5 (pH=12)
FT ^{a)}	7.70 (1H, d, $J_{H_6-F}=6.5$ Hz, H-6)	271.0 (pH=2)
	5.94 (1H, m, $J_{H_2'-F}=1.5$ Hz, H-2')	270.0 (pH=12)
FD-1 ^{a)}	7.68 (1H, d, $J_{H_6-F}=6.0$ Hz, H-6)	275.5 (pH=2)
	6.53 (1H, t, H-2')	275.5 (pH=12)
	5.93 (1H, m, $J_{H_2'-F}=1.5$ Hz, H-2)	

a) Standard sample. b) CD_3OD , TMS as internal standard.

11) 戸出英輝, 采見憲男, 川口安郎, 多比良和基, *Chemotherapy*, **25**, 385 (1977).

較からそれぞれ 4-HB および 1,4-BD と同定した。

血中濃度

FD-1 および FT 経口投与後の血中濃度の推移を Fig. 2 に示した。血中 FD-1 は投与後 30 分までにピークに達し、以後減少し 8 時間では検出されなかった。代謝物の FT および 3-FT はそれぞれ 4 および 1—2 時間でピークとなり、その後 FT は 24 時間、3-FT は 8 時間まで認められた。活性物質である 5-FU については投与 2—4 時間にピークを示し、その値は FD-1 投与の方が FT 投与にくらべ約 7 倍高かった (FD-1 投与 2.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$, FT 投与 0.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。この高い 5-FU 濃度は漸時血中

Fig. 2. Plasma Levels of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU after Oral Administration of FD-1 or FT to AH 130-bearing Rats

Dose, 1 mmol/kg; (), levels of 5-FU.

—○—, FD-1; —△—, 3-FT; —○—, FT; ---x---, 5-FU.

Fig. 3-1. Tissue Distribution of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU after Oral Administration of FD-1 to AH 130-bearing Rats

Dose, 1 mmol/kg; (), levels of 5-FU.

—○—, FD-1; —○—, FT; —△—, 3-FT; ---x---, 5-FU.

Fig. 3-2. Tissue Distribution of FT and 5-FU after Oral Administration of FT to AH 130-bearing Rats

Dose, 1 mmol/kg; (), levels of 5-FU; —○—, FT; ---×---, 5-FU.

から消失するが、投与 12 時間後においても FT 投与に比べ高い値を維持していた (FD-1 投与 0.28 $\mu\text{g/ml}$, FT 投与 0.04 $\mu\text{g/ml}$).

また FD-1 投与後の血中 GHB は、投与 1 時間でピークとなり (5.94 $\mu\text{g/ml}$), 8 時間で消失した。

臓器内濃度

FD-1 および FT 投与後の各代謝物の濃度の推移について、特に 5-FU 濃度のパターンよりその代表的な臓器をえらび Fig. 3-1 および Fig. 3-2 に示した。FD-1 投与の各臓器において FD-1, FT, 3-FU および 5-FU 濃度はそれぞれ 1/2, 4, 2 および 2—4 時間にピークを示し、いずれの臓器においてもほぼ血中濃度を反映していた。ただし胃においては (図には示していない) FD-1 および FT が他の臓器にくらべて非常に高い濃度を示した。

特に 5-FU 濃度を各臓器で比較すると、胸腺、脾、肝、腎、小腸、大腸、膵、肺およびリンパ節では一般に低く、脳、睾丸、骨髄、胃および筋肉では高い値が認められたが、腫瘍中においては更に高い濃度が長時間持続していた。またこの 5-FU 濃度を FT 投与とくらべてみると、FD-1 投与の方がいずれの臓器においても高い値を示したが、特に腫瘍中においてはそれぞれのピーク時で約 12 倍の高い濃度が認められ (FD-1 投与 4.50 $\mu\text{g/g}$, FT

TABLE II. Residual Percent of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU in Stomach after Oral Administration of FD-1 or FT to AH 130-bearing Rats

		0.5	1	2	4	8 (hr)
FD-1 Ad.	FD-1	37.5	27.3	13.8	1.1	0.4
	FT	7.8	10.5	12.9	6.0	2.7
	3-FT	0	0	0	0	0
	5-FU	0	0	0.1	0.1	0
FT Ad.	FT	19.7	23.8	13.9	3.0	6.0
	5-FU	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1

Dose; 1 mmol/kg.

TABLE III. Residual Percent of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU in Small Intestine after Oral Administration of FD-1 or FT to AH 130-bearing Rats

		0.5	1	2	4	8 (hr)
FD-1 Ad.	FD-1	0.2	0.2	0.1	0	0
	FT	0.2	0.3	0.4	0.4	0.2
	3-FT	0	0	0	0	0
	5-FU	0	0	0	0	0
FT Ad.	FT	0.6	0.6	0.5	0.4	0.1
	5-FU	0	0	0	0	0

Dose; 1 mmol/kg.

TABLE IV. Urinary Excretion^{a)} of FD-1, FT, 3-FT and 5-FU after Oral Administration of FD-1 or FT to AH 130-bearing Rats

		(hr) 0—6	6—12	12—24	24—48	Total
FD-1 Ad.	FD-1	0.1	0	—	—	0.1
	FT	5.0	3.6	0.8	0.3	9.7
	3-FT	1.8	0.4	—	—	2.2
	5-FU	0.9	0.4	0.2	0	1.5
FT Ad.	FT	6.7	4.2	1.2	0.3	12.4
	5-FU	0.1	0.2	0.1	0	0.4

Dose; 1 mmol/kg. a) Percent of dose.

投与 0.35 $\mu\text{g/g}$), 投与 12 時間後においても FT 投与の場合が検出限界 (0.15 $\mu\text{g/g}$) 以下であるのに対し, 1.42 $\mu\text{g/g}$ と高い値を維持していた。

脳中 GHB については血中と同様なパターンで, 投与後 1 時間にピークを示したがその最高値 (2.45 $\mu\text{g/g}$) は血中のそれよりも低かった。

消化管内残存

FD-1 および FT 投与後の胃および小腸内残存量を Table II および Table III に示した。胃内 FD-1 は投与後 30 分ですでに投与量の 37.5% しか存在せず, また胃内において FT が検出され, 投与 2 時間後に投与量の 12.9% が FT 含量として認められた。小腸内残存量はわずかで, いずれも投与量の 1% 以下であった。また消化管内 5-FU 量は, 胃および小腸共に投与量の 0.1% 以下とわずかであった。

尿中排泄

FD-1 および FT 投与後 48 時間までの尿中排泄量を Table IV に示した。FD-1 投与後の尿中には未変化体

TABLE V. Formation of 5-FU from FD-1 by 10000×g Supernatant Fractions of Various Tissues of Rat

	Released 5-FU (μg/ml)	
	0.5	4 hr
Brain	<0.100	0.614
Lung	<0.100	0.318
Liver	0.138	3.280
Small intestine	<0.100	<0.100
Heart	<0.100	0.680
Kidney	<0.100	0.610
Spleen	<0.100	<0.100
Muscle	<0.100	<0.100
Thymus	<0.100	<0.100
Bone marrow ^{a)}	<0.100	0.306
Tumor ^{b)}	<0.100	<0.100
Serum	<0.100	0.252
Phosphate buffer	<0.100	0.302

a) 10% homogenate. b) AH 130.

TABLE VI. Formation of 5-FU from FD-1 by the Microsomes or 105000×g Supernatant Fraction of Rat Liver

Enzymes	NADPH	O ₂	Released 5-FU (μ mol/ml of the incubation mixture)			
			0.5	1	2	4 hr
Microsomes	(+)	(+)	0.015	0.038	0.104	0.140
Microsomes	(-)	(+)	<0.0010	<0.0010	0.0013	0.0042
Microsomes	(+)	(-) +N ₂	0.0017	0.0022	0.0039	0.0051
(boiled at 100° for 15 min)	(+)	(+)	<0.0010	<0.0010	0.0014	0.0037
105000×g-Sup.	(+)	(+)	<0.0010	<0.0010	0.0011	0.0018

FD-1 はほとんど認められず (0—6 時間尿において 0.1%), FT, 3-FT および 5-FU が確認されたが、そのほとんどは FT であった。5-FU に関しては FD-1 投与の方が高かった。

FD-1 の活性化機構

各組織の 10000×g 上清による FD-1 の 5-FU への活性化を検討したところ (Table V), FD-1 は特に肝で強い活性化を受けることが確認された。そこで FD-1 の肝 10000×g 上清での活性化をミクロゾームと細胞上清とに分けて検討し、Table VI に示した。その結果 FD-1 は肝ミクロゾーム画分と NADPH 存在下での好氣的培養によってのみ多量の 5-FU を生成し、これは FT ですでに明らかにされていると同様に¹¹⁾ 肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系によるものと考えられる。また NADPH 存在下での肝ミクロゾーム画分による活性化を FD-1 と FT とで比較した場合、FD-1 はラットでは FT の約 5 倍の強い活性化を受けて多量の 5-FU を放出した (Fig. 4)。

この FD-1 の活性化の機構を調べるために、FD-1 を NADPH 存在下で肝ミクロゾームとインキュベートし、各分解物を経時的に測定したところ (Fig. 5), FD-1 は急速に減少し (半減期約 20 分), 3-FT および FT が生成してくるが、短時間では 3-FT と FT との比が 1:1.3 であるのに対し、時間と共にその比が大きくなり 4 時間では 1:2.5 となり 3-FT が FT にくらべ代謝が速いことが示された。また FD-1 の分解物の 1 つである 3-FT を同様に肝ミクロゾームとインキュベートすると、3-FT の急速な減少 (半減期約 2 時間) と共にほぼそれに相当

Fig. 4. Formation of 5-FU from FD-1 or FT by Rat Liver Microsomes
○, FD-1; ●, FT.

Fig. 5. Mechanism of Activation of FD-1 to 5-FU

Fig. 6. Change in Amounts of the Metabolites of Tetrahydrofuranlyl Group of FD-1 *in Vitro*

—, GHB; ---, 4-HB; ···, 1,4-BD

する多量の 5-FU の放出が認められた。FD-1 のもう 1 つの分解物である FT についても同様に行なったが、従来より知られているように FT のわずかの減少とそれにとまう若干の 5-FU の放出が認められた。¹¹⁾

FD-1, 3-FT および FT の自然分解について調べてみると、pH 7.4 のリン酸緩衝液中 37° にて FD-1 は急速に減少し (半減期約 60 分であり、ミクロゾーム分解での半減期約 20 分とくらべてかなり緩やかであるが)。そのほとんどは FT への分解であり 3-FT は検出されなかった。3-FT も同様に急速に分解され (ミクロゾーム分解と同様半減期約 2 時間)、減少量に対応した 5-FU の生成が認められた。FT についてはすでに知られているようにその分解はわずかであった。¹¹⁾

FD-1 の Tetrahydrofuranlyl 基の代謝

FD-1 の肝 10000×g 上清との反応液のベンゼン抽出物について分析したところ、*in vivo* と同様に GHB の

Fig. 7. Change in Amounts of the Metabolites of 4-HB *in Vitro*

—, GHB; —, 4-HB; ----, 1,4-BD.

Fig. 8. Change in Amounts of the Metabolites of 1,4-BD *in Vitro*

—, GHB; —, 4-HB; ----, 1,4-BD.

生成が確認された。また同様に酢酸エチル抽出物について分析したところ、2つの分解物が認められそれぞれ 4-HB, 1, 4-BD と同定された。そこであらためてまた FD-1, 4-HB および 1, 4-BD を用い肝 10000 $\times$ g 上清とインキュベートしたところ、FD-1 から多量の GHB の放出と少量の 4-HB および 1, 4-BD の放出が認められた。この系に NADPH を加えると、短時間では GHB の放出と同じく多量の 1, 4-BD が認められたが、この 1, 4-BD は時間と共に低下し、また 4-HB は認められなかった。FD-1 の自然分解について調べた結果、時間と共に多量の 4-HB が生成してきたが、1, 4-BD および GHB は認められなかった (Fig. 6)。

また 4-HB を基質にした場合、急速に GHB へ酸化され、わずかな 1, 4-BD が検出された。この系に NADPH を加えると、反応初期では GHB および 1, 4-BD がほぼ同程度生成するがそれ以降は 1, 4-BD が徐々に減少する一方、GHB は増加した (Fig. 7)。

1, 4-BD を基質にした場合は、ゆるやかな GHB への酸化が認められたが、NADP を加えるとこの反応速度が増加した (Fig. 8)。

考 察

5-FU の新しい誘導体である FD-1 のラット経口投与による生体内動態について調べた。

FD-1 は現在癌の化学療法において最も広く用いられている FT と同様に、生体内で活性化されて 5-FU を放出する、いわゆる masked form であるが、FT にくらべて 5-FU への活性化が極めて強く、血中および組織中、特に腫瘍中の 5-FU 濃度が著しく高い性質をもつ制癌剤であることが判明した。

FD-1 投与後の生体内 5-FU 濃度を FT 投与の場合とくらべてみると、血中および正常組織中では 5—7 倍の濃度が 8 時間まで持続し、特に脳、骨髄および率丸では 12 時間まで持続が認められ、これら組織に対する影響が考えられた。しかしながら腫瘍中濃度では 8—12 倍と更に著しい差を示し、投与 12 時間後でも 1.42 $\mu\text{g/g}$ という高い 5-FU 濃度を維持していたことから、FD-1 の強い抗腫瘍効果が期待される。

また FD-1 投与後の代謝物 FT および 3-FT の動態をみると、FT が比較的長時間持続するのに対し 3-FT は短時間で消失し、代謝速度の異なることがわかる。また *in vitro* にて FD-1 の、中間体 FT および 3-FT を介しての 5-FU への活性化機構を検討したところ (Fig. 5), FD-1 は 3-FT を介して多量の 5-FU を放出することが明らかとなった。

すなわち投与された FD-1 はまず肝臓中に取り込まれ、恐らく肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系により、主として 1 位の脱 tetrahydrofuran が起こり中間体 3-FT になると考えられる。また同時に FD-1 では主として自然分解による 3 位の脱 tetrahydrofuran が起こり FT が生成される。このようにして生成した 2 種の中間代謝物のうち FT はすでに知られているように、¹¹⁾ 肝ミクロゾームの薬物代謝酵素系により徐々に 5-FU へ活性化される。一方 3-FT は自然分解により 5-FU へ強く活性化される。

以上の結果より 3-FT を介する反応は、FT を介する反応にくらべてより多くの 5-FU を生成し、更に時間と共に FT から活性化された 5-FU が徐々に放出され、これら 2 つの経路により高濃度の 5-FU が長時間持続

Fig. 9. The Metabolic Pathway of FD-1 to 5-FU

するものと考えられる (Fig. 9).

このような活性化機構により, FD-1 投与後の血中に高濃度の 5-FU が認められることから, FD-1 と FT を投与量を変えて経口投与し, 2 時間後の血漿中 5-FU 濃度を比較したところ (Fig. 10), FD-1 は FT の約 1/5 の投与量 (mmol/kg) でほぼ同じ 5-FU 濃度を示すことが明らかとなった.

FD-1 投与後の血中および脳中に, 投与 1 時間をピークとして一過性に GHB が認められ, この GHB が FD-1 の tetrahydrofuranyl 基の代謝物と考えられることから, この代謝過程について検討した. FD-1 は自然分解により多量の 4-HB (あるいは 4-HB の互変異性体である 2-hydroxytetrahydrofuran) を放出するが, これは同じく FD-1 の自然分解により生成される FT 量にほぼ等しいことから, 大部分は 3 位の脱 tetrahydrofuran に由来していると考えられる. そしてこの 4-HB は肝 10000×g 上清において急速に酸化されて GHB に変化する. また 4-HB は NADPH あるいは NADP を用いた実験から 1,4-BD に対して可逆的な酸化還元反応の関係にあると考えられるが, 生体内においては 1,4-BD を介さないで GHB に酸化される代謝経路が中心であろう. なお FD-1 の主として酵素的反応による 1 位の脱 tetrahydrofuran の結果生じる代謝物も, 最終的には恐らく GHB であると考えられるがその詳細については現在検討中である. このようにして FD-1 より生成した GHB は生体内代謝系に従い succinate semialdehyde を経て succinate となり分解されてゆくものと考えられる.

FD-1 の代謝物として 5-FU および GHB が確認され, 特に FD-1 が多量の 5-FU を放出すること, また GHB が中枢神経系に影響を及ぼすといわれていること¹²⁾ から, これら代謝物の中枢系への影響が考えられる. また, 一般薬理学的検討の結果でも高用量での 5-FU および GHB の中枢系への影響がみられている.¹³⁾

Fig. 10. Relation between Doses and 5-FU Levels in Plasma 2 Hours after Oral Administration of FD-1 or FT

○, FD-1; ●, FT.

12) 喜多富太郎, “生化学的薬理学”, 吉田 博, 田中正三編, 朝倉書店, 東京, 1971, pp. 99—107.

13) 山本潤二, 伊藤嘉嗣, 滝川勝雄, 応用薬理, 受理.

FD-1 は水溶液中で不安定であり FT に分解されるため、FD-1 経口投与後の消化管内残存を調べたところ FD-1 は投与 30 分後の胃内に投与量の約 40 %, 腸内に 0.2 % の残存が認められ吸収が速やかであることが示唆され、これは投与 30 分後の血中に高濃度の FD-1 が認められたことから裏付けられる。また FD-1 投与後の胃内に FT が認められ FD-1 が胃内にて一部 FT に分解されることが示されたが、投与 2 時間において最高 13 % の FT しか認められなかった (腸内にはほとんど認められない)。以上のことから FD-1 はその大部分が FD-1 として速やかに吸収されるものと考えられる。

このように FD-1 の経口投与は FT にくらべて高濃度の 5-FU を長時間持続させる性質を有し、特に血中および正常組織中にくらべて、腫瘍中においてより高い 5-FU 濃度の持続がみられたことから、今後癌の化学療法剤として期待されるものである。