

## 抗腫瘍剤に関する研究 II

N, N'-diethylene-N''-(5-methyl 1, 3, 4--thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) の生体内分布

斎藤千春・稲葉茂穂

住友化学工業株式会社医薬事業部研究部

(昭和 42 年 10 月 18 日受付)

## はじめに

N, N'-diethylene-N''-(5-methyl 1, 3, 4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) が実験腫瘍に対して N, N', N''-triethylenephosphoramidate (TESPA) にまさる顕著な抑制効果を示し、強力な殺細胞作用を有することは前報<sup>1)</sup>で明らかにした。本報では S 261 の生体内における吸収、排泄ならびに組織内分布を明らかにすることを目的として実験を行なったのでその結果について報告する。

## 実験材料および実験方法

供試薬物は S 261 結晶および対照として TEPA (N, N', N''-triethylenephosphoramidate) ならびに TESPA 結晶を用い、いずれも用時生理食塩水に溶解して使用した。

実験動物は体重 200 g 前後のウイスター系雄性ラットおよび体重 1.5~2.5 kg の雄性家兎を使用した。

## 1. 薬物の血清中、組織内および尿中濃度の測定

S 261, TEPA および TESPA の測定には NBP 法<sup>2)</sup>を用いることとし、われわれの改良法<sup>3)</sup>に従った。すなわち、血清の場合は 0.1 ml をとり蒸留水 0.9 ml を添加して 1 ml としたものを使用、尿は 1 ml を、また各種臓器はクレプスリンゲル磷酸緩衝液で 20% ホモジネートを作成し、その 1 ml を使用し、これに 10% 硫酸亜鉛溶液 1 ml と飽和水酸化バリウム液 1 ml およびメタノール 0.4 ml を加え、よく振盪して 3,000 rpm 5 分間の遠沈を行なう。上澄液を試験管に移し、pH 4.6 の 0.2 M 酢酸緩衝液 1 ml および NBP 試薬(γ-(4-nitrobenzyl) pyridine の 5% アセトン溶液) を 0.4 ml 加えて、100°C 20 分間加熱、のち氷冷してアセトン 1 ml, 1,2-dichloroethane 3 ml および N-NaOH 1 ml を加えてよく振盪し、下層を分取し、これを 3,000 rpm 2 分間の遠沈により十分に水分を分離してのち波長 540 mμ で吸光度を測定した。なお、標準線はあらかじめこれら薬物の蒸留水溶液を用いて同様操作を行ない作成した。

## 2. ラットによる実験

ラットを 3 匹 1 群となし、1 群づつ採尿ケージに入れ、

S 261 は 100 mg/kg, TEPA, TESPA は 50 mg/kg を腹腔内へ投与し、各ラットにつき 0.5, 1, 2, 5 および 8 時間後に心臓から採血して血清を分離した。また、1 群の全尿を 3, 5, 8 および 24 時間後に採取し、これら材料中の薬物濃度を測定した。

## 3. 家兎による実験

家兎を 2 羽 1 群とし、大腿部筋肉内へブラウン・ピアス腫瘍を移植し、移植後約 2 週間を経過して腫瘍がピンポン球大に増殖した担癌家兎を実験動物として使用した。

薬物は S 261 および TESPA を使用し、いずれも 50 mg/kg を静脈内へ投与して 1 時間後と 5 時間後に瀉血により殺し、すみやかに各臓器を取り出し、組織内濃度を測定した。組織は脳、肝、腎、脾、睪丸、腫瘍を用い、同時に血清および尿中濃度も測定した。

## 4. 尿のクロマトグラフィ

ラット尿について以下の条件でクロマトグラフィを行なった。

濾紙クロマトグラフィは大城<sup>4)</sup>に準じて展開溶媒として dioxane-N-butylalcohol-2 N-ammonia(1:4:5)を用い、また薄層クロマトグラフィの場合は chloroform-ethanol(7:3)を用いた。なお、薄層はシリカゲル G(メルク製)を 0.25 mm の層で使用し、確認は NBP 試薬の噴霧、加熱、アルカリ処理によった。

## 実験成績

## 1. S 261, TEPA および TESPA の血中ならびに尿中濃度の推移

Fig. 1 および Fig. 2 にみられるように、ラット腹腔内へ投与された S 261 は比較的すみやかに血中へ移行し、1 時間後には peak に達し、5 時間後にはほとんど消失した。TEPA は血中への移行が最もすみやかで peak は投与後 30 分以内にあると考えられ、5 時間後にはほとんど消失した。TESPA は血中への移行および消失がいずれも比較的緩慢であり、peak は 2 時間後に見られ、9 時間後には検出不能であつた。

いっぽう、尿中排泄は S 261 が最もすみやかで大量が短時間内に排泄され、3 時間以内に投与総量の約 60%

Fig. 1 Serum levels of S261, TESPA and TEPA in rats

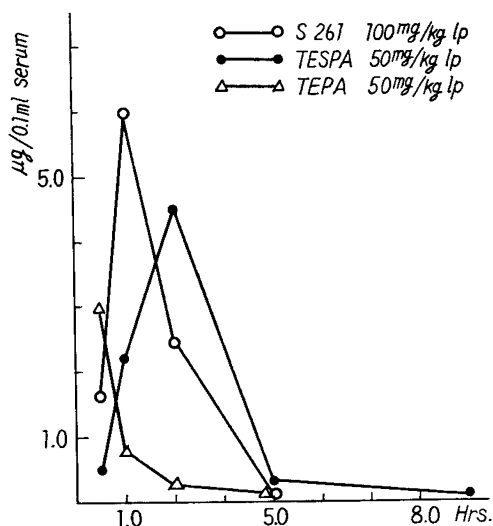
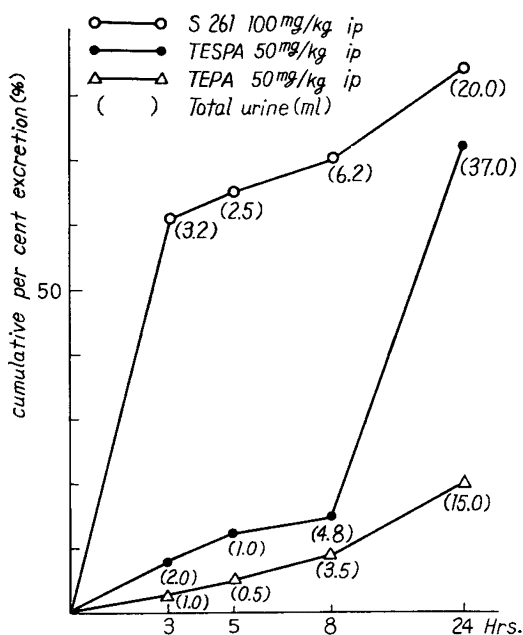


Fig. 2 Urinary excretion of S261, TESPA and TEPA in rats



が排泄された。しかしその後は比較的緩慢な排泄経過をとり、24時間後には投与総量の約80%の排泄となった。TEPAおよびTESPAは共に8時間以内には投与総量の約1/5~1/10程度が排泄されたに過ぎず、とくにTEPAの場合は24時間後でも総排泄量が投与総量の約20%にとどまった。TESPAの場合は8時間から24時間後までに大量が排泄され、24時間後の総排泄量は投

Table 1 Tissue distribution of S261 and TESPA in rabbits bearing Brown-Pearce carcinoma (50 mg/kg iv)

Tissue	1 hr		2 hrs.	
	S 261	TESPA	S 261	TESPA
	(mcg/g or ml)		(mcg/g or ml)	
Brain	—	3.5	—	—
Testis	3.5	7.75	—	—
Spleen	—	15.0	—	9.75
Kidney	34.5	49.0	—	32.5
Liver	6.0	12.25	—	—
Tumor	12.25	—	—	—
Serum	8.6	14.6	—	—
Urine	946*	495**	990***	595****

Total urine

\* 26 ml, \*\* 24 ml, \*\*\* 108 ml, \*\*\*\* 56 ml

与総量の約70%となつた。

なお、これら実験群ラットの尿量はS261実験群に概して多く、TEPA群では比較的少量であつた。

## 2. 組織内分布

家兎におけるS261およびTESPAの組織内分布はTable 1にみられるようである。

薬物投与1時間後の組織内分布はS261では腎>腫瘍>血清>肝>睪丸の順で脳、脾では検出できず、TESPAの場合は腎>脾>血清>肝>睪丸>脳の順で腫瘍では検出できなかった。また、5時間後ではS261は各組織に全く検出できず、TESPAの場合は腎、脾になお高濃度に検出された。

1時間後の腎への分布が最も高いことは両薬物に共通していたが、この時間にS261投与では脾への分布がなく腫瘍への分布がみられ、TESPA投与では逆に腫瘍への分布がなく脾で検出されたこと、また5時間後ではS261投与家兎の主要臓器にはもはや薬物の存在が認められないがTESPAの場合はなお高濃度に検出される臓器の認められること等が両薬物の大きな相違点であつた。

## 3. S261, TEPA および TESPA 投与ラット尿のクロマトグラフィー

S261, TEPA および TESPA の濾紙ならびに薄層クロマトグラフィーによる $R_f$ はそれぞれ0.37~0.40, 0.65~0.69, 0.86~0.91ならびに0.65~0.75, 0.8~0.82, 0.92~0.96であるが、薬物投与ラット尿のクロマトグラフィーの結果、S261投与尿ではS261の $R_f$ に単一のスポットを認めるのみであり、薄層クロマトグラフィーにより分離したスポットをNBP法で定量した結果、尿を直接測定した場合と高度の再現性が得られた。いつば

う、TESPA 投与尿ではすべて TEPA として排泄されることを確認した。

### 考 按

S 261 のラット血中への移行および尿中への排泄は TESPA に比較してすみやかであった。また、担癌家兎における主要組織からの薬物の消失も TESPA よりすみやかなところから、S 261 は生体内滞留時間の短い薬物であることが明らかとなった。

TESPA については、ラットで大部分尿中へ TEPA として排泄され<sup>5,6)</sup>、イヌでは経口投与で血中濃度のピークが2時間後にみられる<sup>7)</sup>といわれており、著者らの実験成績もこれらの知見を裏付けるような結果を得た。

S 261 は生体からの消失がすみやかであるとともに、家兎主要組織への分布状態からみて TESPA より腫瘍親和性が大であると思われる。

以上の知見はまた今後の治療係数の大なるアルキル化剤探究に希望をあたえるものといえよう。

### 結 論

N, N'-diethylene-N''-(5-methyl 1,3,4-thiadiazole-2-yl)-phosphoramidate (S 261) の組織内分布ならびに排泄を Triethylenephosphoramidate (TEPA), Triethylenethiophosphoramidate (TESPA) を対照として比較検討した。

1. S 261 のラット腹腔内投与による血中への移行は TEPA と TESPA の中間で比較的是やく、血中濃度の peak は1時間後に存在し、8時間後はほとんど消失した。

2. ラットへ投与された S 261 の尿中への排泄は TEPA, TESPA よりすみやかで、3時間後には投与総量の約 60%、24 時間後には 80% 以上が代謝されることなく排泄された。

3. S 261 をブラウン・ピアス担癌家兎へ静脈内投与した場合の組織内分布は1時間後に主として腎、腫瘍へ移行し、5時間後にはすみやかに主要組織中から消失した。

4. S 261 の生体内分布の動態は TESPA とかなり異なつたものがあり、TESPA に比較して、より腫瘍親和性の大きな化合物であることを示した。

終りに本研究について御指導、御校閲を賜つた住友化学工業株式会社医薬事業部、山岡静三郎博士に深謝します。また、本研究に協力された村上文子氏に感謝します。

### 文 献

- 1) 斎藤千春、稲葉茂穂：抗腫瘍剤に関する研究。1. 新規エチレンイミン系化合物の抗腫瘍作用。Chemotherapy 16 (5) : 717~725, 1968
- 2) EPSTEIN, J., ROSENTHAL, R. W. & ESS, R. J.: Use of r(4-nitrobenzyl) pyridine as analytical reagent for ethylenimines and alkylating agents. Anal. Chem. 27 : 1435~1439, 1955
- 3) 山岡静三郎、斎藤千春：抗癌剤の定量法—とくにアルキル化剤を中心として—。癌・化学療法 p. 66~72, 医歯薬出版社 1966
- 4) 大城勲：抗癌剤投与経路に関する研究。Chemotherapy 10 : 223~230, 1962
- 5) CRAIG, A. W., FOX, B. W. & JACKSON, H.: Metabolic studies of <sup>32</sup>P-labelled triethylenethiophosphoramidate. Biochem. Pharmacol. 3 : 43~50, 1959
- 6) CRAIG, A. W., FOX, B. W. & JACKSON, H.: Tracer studies of the metabolism of the tumour inhibitor triethylenethiophosphoramidate. Biochem. J. 69 : 169, 1958
- 7) MELLETT, L. B. & WOODS, L. A.: The comparative physiological disposition of Thio-TEPA and TEPA in the dog. Cancer Research 20 : 524~532, 1960

## STUDIES ON ANTI-TUMOR AGENTS. II

The Physiological Disposition of N-N'-diethylene-N''-(5-methyl 1,3,4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) in Experimental Animals

CHI HARU SAITO & SHIGEO INABA

Research Department, Pharmaceuticals Division, Sumitomo Chemical Co., Ltd.

Serum level, tissue distribution and urinary excretion of N, N'-diethylene-N''-(5-methyl 1,3,4-thiadiazole-2-yl) phosphoramidate (S 261) were investigated. When S 261 was administered intraperitoneally in doses of 100 mg/kg on rats, peak serum levels one hour after administration were 60 µg/ml, and in the first three hours about 60% of the total amounts of S 261 administered were excreted in urine with unchanged form, indicating the rapid absorption and the subsequent excretion.

In rabbits bearing Brown-Pearce carcinoma received 50 mg/kg of S 261 intravenously, the drug concentrations in both the kidney and tumor after one hour exceeded serum levels. These drug levels in blood and tissues of rabbits disappeared completely without any positive reaction with NBP test five hours after drug administration. It was suggested that S 261 had a remarkable tumor affinity.