

## 原 著

放射線増感剤RK28システイン抱合体  
- その分離と分取について -江部和勇<sup>1)</sup>, 藤澤桂子<sup>2)</sup>, 永野裕美<sup>2)</sup>, 狩野裕一<sup>1)</sup>, 松永尚文<sup>1)</sup>,  
塚原正人<sup>2)</sup>, 宮田善之<sup>3)</sup>, 辻谷典彦<sup>3)</sup>

- |                                 |                            |
|---------------------------------|----------------------------|
| 1)山口大学医学部構造制御病態学講座<br>(放射線医学講座) | 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)    |
| 2)山口大学医学部保健学科                   | 宇部市南小串1-1-1 (〒755-8505)    |
| 3)ポーラ化成工業株式会社                   | 横浜市神奈川区高島台27-1 (〒221-0833) |

**Key words** : 低酸素細胞, 放射線増感剤, RK28, 代謝物

## はじめに

悪性腫瘍の放射線治療において, その放射線感受性を低下させる因子の一つに, 腫瘍内の低酸素細胞の存在が知られている. そこで低酸素細胞放射線増感剤の開発が, 過去約30年間にわたって, 欧米および本邦の各施設で行われてきた. しかし, 開発された薬品は, 神経毒性を有したために, 臨床応用には至らなかった<sup>1)</sup>. 本邦にて開発された放射線増感剤RK28は<sup>2,3)</sup>, すでに早期第2相臨床試験まで実施された薬剤である<sup>4)</sup>. われわれは, 同薬剤の放射線増感効果を動物実験にて検討してきた. その中で同薬剤の薬物動態を検討した結果, RK28の生体内代謝物の1つであるシステイン抱合体は, 血清内に比し腫瘍内に大量に存在することを見出した<sup>5)</sup>. RK28システイン抱合体は, 生体内に存在する内因性SH剤との化合物であると推測された. 内因性SH剤が外因性疎水物質と抱合体を形成した際には, ATP依存型ポンプ(GS-X ポンプファミリー)によって, その抱合体は能動的に細胞外に排泄され, 臓器によっては, その能力に差があることが報告されている<sup>6)</sup>. 腫瘍内において, RK28のシステイン抱合体が多量に存在したことは, このポンプが関与していた可能

性もあるように思われた. また, RK28システイン抱合体の薬効として, *in vitro*において低酸素細胞放射線増感効果がすでに報告されている<sup>8)</sup>. *In vivo*においては, RK28未変化体の血中内濃度や腫瘍内濃度は, ミソニダゾール(MISO)等の他の放射線増感剤に比して低いにもかかわらず, その増感効果は同程度であったことから<sup>9)</sup>, RK28の各種SH抱合体は放射線増感剤として作用していたとも考えられた. そこでわれわれは, RK28システイン抱合体は, 腫瘍親和性を有する放射線増感剤かもしれないという仮説を立てた. RK28システイン抱合体は市販化されていないため, 本仮説を証明するためには, 同物質を, まずは独自に大量に精製しなければならなかった. そこで今回われわれは, 動物尿よりRK28システイン抱合体を分離, 精製することを試みたので, その結果を報告する.

## 材料および方法

【放射線増感剤】低酸素細胞放射線増感剤RK28 (1-(4'-hydroxy-2'-butenoxy)methyl-2-nitroimidazole, a 2-nitroimidazole substituted with an acyclic sugar at the N-1 position, molecular weight: 213.19, 黄色結晶)およびその生体内代謝物をFig. 1に示す. 代謝物については,  $\alpha$ -hydroxy butanoic acid derivativeを(a-1),

平成12年9月6日受理

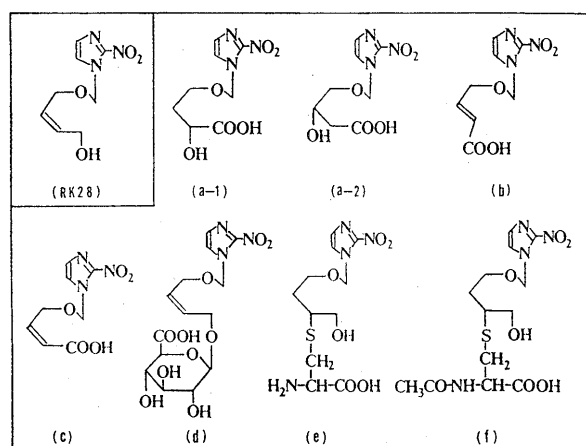


Fig.1 Chemical structures of RK28 and its metabolites (a-f) (ref. 6). (e) : RK28システイン抱合体

$\beta$ -hydroxy butanoic acid derivativeを(a-2), trans-butenoic acid derivativeを (b), cis-butenoic acid derivativeを (c),  $\beta$ -glucuronated RK28を(d), cysteine conjugateを(e), N-acetylcysteine conjugateを (f)とした。

動物投与に際しては, RK28は生食にて溶解され, 溶液濃度は50 mg/ml 生食とされた。ミロポアフィルター (0.45  $\mu$ m) にて濾過滅菌後, 耳静脈より速度約0.5 ml/sec にて静注された。動物投与量は, 80 mg/kg体重とされた。

【実験動物】日本白色家兎(雄, 体重2.5 kg, clean, 静岡動物センター) が購入され, 山口大学医学部附属動物実験施設において飼育された。研究は, 同施設における動物実験にかかわる倫理規定に従って実施された。実験は全身麻酔下に行われた。麻酔薬として, ketamine hydrochloride (ケタラルール, 20 mg/kg 体重, 筋注) + xylazine (セラクタール, 3.2 mg/kg 体重, 筋注)が投与された。使用された動物個体数は, 合計2羽 (尿分析実験に1羽, 尿分取実験に1羽) であった。

#### 【採尿】

経尿道的にカテーテル(外径3 mm, 内径2 mm)が, 膀胱内に留置された。RK28静注後1時間以内に貯留した膀胱内全尿が採取された(全1時間尿)。手技は, 動物全身麻酔下に行われた。

分析用尿サンプル: 全1時間尿を攪拌後, 尿サンプルが採取された。尿サンプル容量1に対して, 除蛋白のため4倍量の液クロ用メタノールが加えられて攪拌された。遠沈 (3000 rpm, 10分間) 後, 上清が採取された。上清容量1に対して, 同量の5mM

TBAP (tetrabutylammonium phosphate buffered solution, 高速液体クロマトグラフィー用, Wako社) 溶液が加えられ, 攪拌された。その後, 溶液10  $\mu$ l が高速液体クロマトグラフィーに充填された。

分取用尿サンプル: 全1時間尿が $-80^{\circ}\text{C}$ にて約24時間凍結乾燥された。この濃縮尿は, 80%メタノールで溶解された。溶解液は2種類のオープンカラムにかけられた。オープンカラム(1); 担体: Sephadex-LH20 (Amersham Pharmacia Biotech), 移動相: 80%メタノール, 流速0.5ml/分, オープンカラム(2); 担体: Sephadex-G10 (Amersham Pharmacia Biotech), 移動相: 80%メタノール, 流速0.5ml/分,  $5-10^{\circ}\text{C}$  (低温室)。各オープンカラムを通過した溶液は, 1mlずつフラクションコレクターによって集められた。各フラクション溶液は, 薬剤検出のため320 nmのUVを用いて吸光度が測定された。反応の認められたフラクションが集められ, 高速液体クロマトグラフィーに充填された。

#### 【高速液体クロマトグラフィー (HPLC)】

RK28システイン抱合体を分析, 分取するためにHPLC装置 (L6200 infusion pump, L4200 UV detector, D2500 データ処理装置, いずれも日立社製) が用いられた。移動相の流速は1.0 ml/min, 薬剤検出のための吸光度測定には, 320 nmのUVが用いられた。

分析用カラム: ODS 80TS, TSKゲル, 長さ15cm, 直径4.6mm, 東ソー, 移動相: 15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) + 5 mM TBAP + 10% アセトニトリル。

分取用カラム: ODS 80TS, TSKゲル, 長さ15cm, 直径4.6mm, 東ソー, 移動相: 15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) + 0 mM TBAP + 0-50% アセトニトリル。分取に際して, 各ピークの十分な retention time (RT) を得るため, アセトニトリルに, 次のような, 時間的濃度勾配がつけられた。開始時 [15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) 100%, アセトニトリル 0%], 10分後 [15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) 90%, アセトニトリル 10%], 20分後 [15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) 50%, アセトニトリル 50%], 40分後 [15 mM 酢酸アンモニウムバッファー(pH 7.0) 100%, アセトニトリル 0%]。

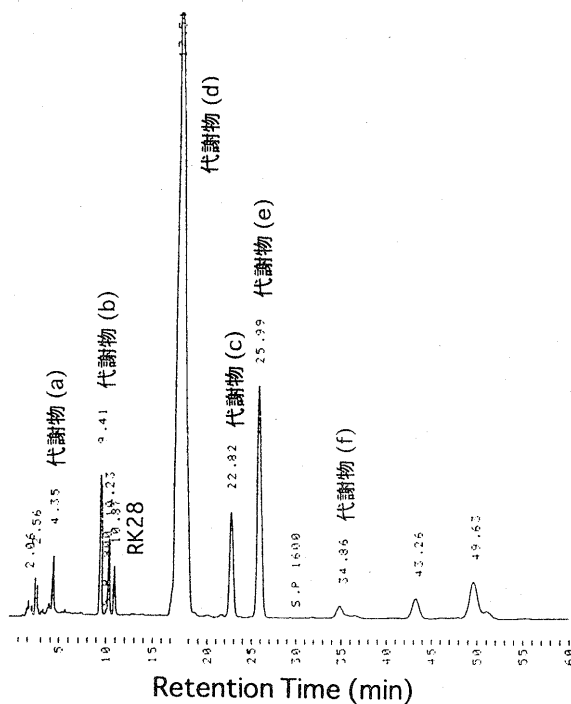


Fig.2 HPLCクロマトグラム (家兎全1時間尿, TBAPあり)

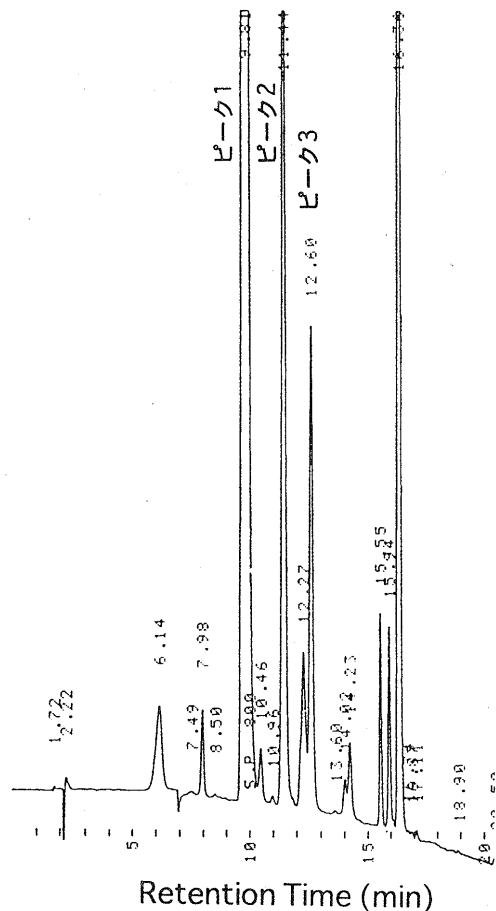


Fig.3 HPLCクロマトグラム (家兎全1時間尿, TBAPなし)

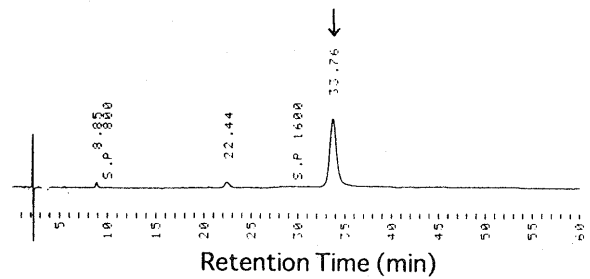


Fig.4 HPLCクロマトグラム (尿LH20→G10後, TBAPあり)

## 結果

### 家兎尿におけるHPLC分析結果

Fig.2 にHPLCクロマトグラム (TBAPあり) を示す。われわれの過去のデータ<sup>9)</sup>と比較した結果, おおのこのピークを下記のごとく同定した。

Retention time (RT) : 4.35分→代謝物 (a), 9.41分→代謝物 (b), 10.87分→RK28, 17.54分→代謝物 (d), 22.82分→代謝物 (c), 25.99分→代謝物 (e), 34.86分→代謝物 (f)。尿中に最も多量に認められた物質は, 代謝物 (d)であった。次に, 既知量のRK28のHPLCクロマトグラムにおけるピーク面積を1として, 上記7種の物質のピーク面積の比を求めた後, 家兎全1時間尿に含まれるnitroimidazoleを計算にて求めた (data not shown)。その結果, RK28家兎静注投与量1に対して, 1.02と計算された。従って, RK28は家兎に静注された後, 生体内で代謝され, RK28原体を含めて1時間以内にそのほとんどが尿中に排泄されたものと考えられた。

### 家兎尿におけるHPLC分取結果

Fig.3 に, Sephadex-LH20→Sephadex-G10にて分取された尿溶液の HPLCクロマトグラム (TBAPなし) を示す。約12のピークが認められた。その内, Fig.3 に示したピーク1, ピーク2, ピーク3がおおのこの分取され, 各ピークはHPLC (TBAPあり) にて分析された。

Fig.4 に, 分取系で得られたピーク2の分析系HPLCクロマトグラム (TBAPあり) を示す。RT : 33.76分に大きなピーク (Fig.4 矢印) が認められた。ピーク2の物質を同定するために, 家兎全1時間尿サンプルとピーク2サンプルが混合された後, mixed sample が分析された (TBAPあり)。Fig.5 に, その結果を示す。家兎全1時間尿サンプルに比し, mixed

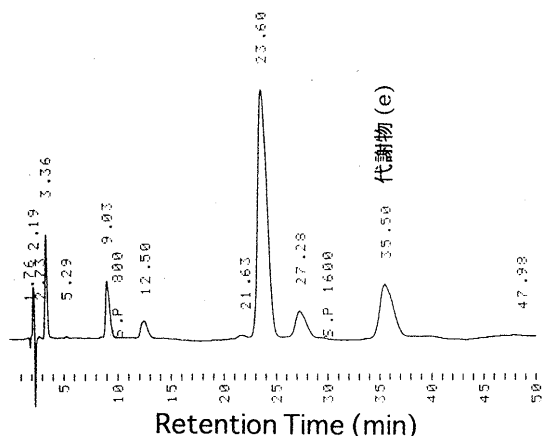


Fig. 5 HPLCクロマトグラム [mixed sample : (全1時間尿) + (尿LH20→G10後), TBAPあり]. 代謝物 (e) の増加 (本文参照)

sample では、RT : 35.50分のピークのみが増大が認められた。このRT : 35.50分にピークを示す物質は、クロマトグラムのパターンより、代謝物 (e) と考えられた (Fig.2のクロマトグラム参照)。なお、このピーク面積の増加を比較検討した結果、ピーク2の加えられたmixed sample では、コントロールに比しその面積は約70%増であった。従って、分取系で得られたピーク2は、代謝物 (e) を含む物質群であると推測された。最終的に分取されたピーク2は、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結乾燥された。得られた白色調粉末全重量は、6.2 mgであった。次に粉末6.2 mg中における代謝物 (e) の占める割合 (純度) を、分析系HPLCを用いて求めた。代謝物 (e) の分子量を333.34 daltonsとして、既知量のRK28のHPLCクロマトグラムにおけるピーク面積を1として、代謝物 (e) の面積の比を求め、代謝物 (e) の重量を求めた。その結果、 $211\mu\text{g}$ と計算された。粉末6.2 mgを100%とすると、代謝物 (e) の重量 (純度) は3.4% [=  $(0.211/6.2) \times 100$ ] であった。

## 考 察

1. 家兔尿について ; RK28全代謝物を採取するには、全1時間尿で充分であることがわかった。
2. tetrabutylammonium phosphate buffered solution (TBAP) ; TBAPは、4級アンモニウム塩であり、カチオン界面活性剤である。この試薬は、陰イオン性化合物の分離向上のためのペアードイオン試薬とし

て市販されている。移動相にTBAPが含まれた場合 (分析系, Fig 2), それが含まれない場合 (分取系, Fig 3) に比し、あきらかに各代謝物の分離が良好であった。その理由は、RK28とその代謝物に含まれるカルボキシル基と4級アンモニウム塩 (TBAP) との間で複合塩が形成され、その結果、極性が低下し、十分なretention timeが得られたため、分離が良好であったと思われる。又、この様なretention timeの変化は、目的物質がカルボキシル基の様な陰イオン性基を有していることの証明にもなった。

3. 分取系 ; われわれの最終目標は、RK28システイン抱合体を精製し、同物質をin vitroおよびin vivoの基礎研究に供することであった。分析用条件 (TBAPあり) にて分取した場合、分取液 (RK28システイン抱合体・TBAP複合体) からTBAPを除くことは困難であると思われた。TBAPが混在した状態の分取液を生体に投与すると、界面活性剤TBAPも生体内に投与されることになり、その毒性 (溶血) のため致命的となる。そこでTBAPを含まない分取系が必要となった。LH20は、分配カラム (極性の高い物質を分離) であり、尿中に含まれる他の生体内代謝物とRK28代謝物を分離することを目的とした。G10は、ゲル濾過カラム (分子量で分離) であり、尿中に含まれる塩類とRK28代謝物を分離することを目的とした。次に、RK28システイン抱合体のみを分離するため、HPLCが用いられた。アセトニトリル溶液に時間的濃度勾配を付加しなかった場合、各ピークの十分なretention timeが得られず、分取不可能であった。そこで時間的濃度勾配が付加された (Fig. 3)。

4. 得られたRK28システイン抱合体 ; 純度は3.4%であった。残りの96.6%におよぶ物質の同定については、今後の検討課題とした。

## 結 語

われわれの目標は、RK28システイン抱合体 [=代謝物 (e)] を大量に精製し、同物質をin vitroおよびin vivoの基礎研究に供することであった。家兔にRK28を静注した後、尿中よりRK28システイン抱合体を分離することはできたが、その純度は3.4%にとどまった。大量に分離・精製するためには、今後の検討が必要と思われた。

本研究は, 日本学術振興会科学研究費補助金により援助された.

Conference on Chemical Modifiers of Cancer Treatment. *Florida*, 1991, p.149-150.

## 文 献

- 1) Brown JM. Hypoxic cell radiosensitizers: The end of an era? Regarding Lee et al., *IJROBP* 32:567-576; 1995. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1995; **32**:883-885.
- 2) Sakaguchi M, Larroquette CA, Agrawal KC. Potential radiosensitizing agents. 6.2-nitroimidazole nucleosides: Arabinofuranosyl and hexopyranosyl analogues. *J Med Chem* 1983; **26**:20-24.
- 3) Shibamoto Y, Nishimoto S, Mi F, Sasai K, Kagiya T, Abe M. Evaluation of various types of new hypoxic cell sensitizers using the EMT6 single cell-spheroid-solid tumor system. *Int J Radiat Biol* 1987; **52**:347-357.
- 4) Murayama C, Tanaka N, Miyamoto Y, Sakaguchi M, Mori T. In vitro and in vivo radiosensitizing effects of 2-nitroimidazole derivatives with sugar component. *Strahlentherapie und Onkologie* 1987; **163**:385-390.
- 5) 江部和勇, 長岡 栄, 有田 剛, 須田博喜, 本間 穰, 丁子 卓, 副島京子, 河村光俊, 岡田守久, 狩野 裕一, 中田太志, 中西 敬. 放射線増感剤RK28前期第II相試験結果—山口大学医学部附属病院および下関市立中央病院における集計—. *山口医学* 1992; **41**:29-36.
- 6) Ebe K, Suda H, Kuramitsu T, Honma Y, Nakanishi T, Miyata Y, Sakaguchi M, Matsunaga N. Evaluation of the radiosensitizing effects of RK28 intravenous, intraarterial, and intratumoral injections on the rabbit VX2 tumor system. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1996; **36**:1107-1116
- 7) 石川智久. GS-X ポンプファミリー—ATP依存型有機アニオントランスポーター—. *蛋白質 核酸 酵素* 1997; **42**: 1285-1294.
- 8) Sakaguchi M, Motoki Y, Miyata Y, Suzuki T, Suzuki A, Harada K, Yoshino M, Nishio A, Sato C, Tanabe Y, Murayama C, Mori T. Pharmacokinetic and metabolic studies of hypoxic cell radiosensitizer RK-28. In: Wasserman TH, ed. *Proceeding 7th*

## Hypoxic Cell Radiosensitizer RK28 Cysteine Conjugate -Its Isolation and Collection-

Kazuyu EBE<sup>1)</sup>, Keiko FUJISAWA<sup>2)</sup>, Hiromi NAGANO<sup>2)</sup>, Yuichi KARINO<sup>1)</sup>,  
Naofumi MATSUNAGA<sup>1)</sup>, Masato TSUKAHARA<sup>2)</sup>,  
Yoshiyuki MIYATA<sup>3)</sup>, Michihiko TSUJITANI<sup>3)</sup>

*1) Department of Radiology, Yamaguchi University School of Medicine*

*1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.*

*2) The School of Allied Health Sciences Yamaguchi University*

*1-1-1 Minami Kogushi, Ube, Yamaguchi 755-8505, Japan.*

*3) POLA Chemical Industries, 27-1 Takashimadai, Yokohama, Kanagawa 221-0833, Japan.*

### SUMMARY

We have reported that RK28 cysteine conjugate (metabolite e) might be a novel hypoxic cell radiosensitizer as its concentration in tumor was higher than in serum on the rabbit VX2 tumor system.

In this study, we report the results of its isolation and collection from rabbit urine after RK28 intravenous injection. RK28 and major metabolites were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) with tetrabutylammonium phosphate solution (TBAP). RK28 cysteine conjugate was isolated using a LH20 column, a G10 column, and an ODS column without TBAP. A total amount of 211  $\mu$ g was collected but not enough for further studies.