

## 2-Thio-6-methyluracil のラットにおける代謝について

加野軒作, 植竹厚子, 清水栄, 新田啓一, 山本 譲  
金沢大学薬学部<sup>1)</sup>

## Studies on the Metabolism of 2-Thio-6-methyluracil in Rats

KENSAKU KANO, ATSUKO UETAKE, SAKAE SHIMIZU,  
KEIICHI NITTA, and YUZURU YAMAMOTO

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University<sup>1)</sup>

(Received August 13, 1973)

Metabolism of 6-methyl-2-thiouracil was studied in rats by using  $^{14}\text{C}$ -labeled compound. Following the oral administration of 6-methyl-2-thiouracil [ $2\text{-}^{14}\text{C}$ ] (490 mg/kg), the about 68% of the administered radioactivity was excreted in urine, 27% in feces, and 1.2% in respiratory  $\text{CO}_2$  within 72 hr. After oral ingestion of the radioactive compound, radioactive substances excreted in urine after 48 hr were 6-methyl-2-thiouracil, 6-methyluracil, 6-methyl-2-methylthiouracil, 6-methyl-4-oxo-pyrimidine, 2-amino-6-methyl-4-oxo-pyrimidine, and urea which were present in about 46.2, 9.1, 1.6, 1.8, 0.2, and 0.8% of total radioactivity in the urine, respectively. In *in vitro* tests using rat liver slices, radioactivity was also detected in 5,6-dihydro-6-methyluracil along with the above metabolites.

2-Thio-6-methyluracil (以下 TMU) は甲状腺において体内の無機ヨウ素を酸化する酵素を抑制し、甲状腺ホルモンの生合成を阻害する作用を有するので現在抗甲状腺物質として甲状腺機能亢進症の治療薬として用いられている。TMU などチオウラシル系薬物については薬理作用および核酸生合成への影響に関して多数の研究がなされているのに対しそれらの代謝に関するものはチオウラシルについて少数の報告<sup>2-4)</sup>があるに過ぎない。

そこで著者らは代謝産物および代謝経路の解明を主目的として2位の炭素を $^{14}\text{C}$ で標識したTMUをラットに経口投与し(490 mg/kg), 尿中代謝物を検索した。また標識TMUをラット肝スライスとインキュベーションし(5 mg/12 g 肝スライス), その代謝物について検討し新代謝物を同定したので代謝経路を含めてここに報告する。

### 実験の部

**実験材料** 2-Thio-6-methyluracil- $2\text{-}^{14}\text{C}$  (以下 TMU- $2\text{-}^{14}\text{C}$ ) は Foster らの方法,<sup>5)</sup> チオ尿素を原料とした TMU の合成法に準じ $^{14}\text{C}$ -チオ尿素(第一化学)を原料として合成した。比放射能は  $1.3 \mu\text{Ci}/\text{mg}$  であった。

実験動物は Wistar 系雄ラット, 体重約 250 g のものを用い, 尿および糞への排泄実験には 10 匹, 呼吸への排泄実験には 2 匹, 尿中代謝物を検討する実験では 20 匹, 肝スライスとのインキュベーション実験では 3 匹の動物を使用した。

**試料の採取** 薬物投与は TMU- $2\text{-}^{14}\text{C}$  を TMU で適当に希釈し, 1% カルボキシメチルセルロース (以下 CMC) 溶液に懸濁させ経口投与液とした。投与量は 490 mg/kg, 約  $3 \mu\text{Ci}/1$  匹であり経口投与針を用い一夜絶食したラットに強制投与した。投与後実験中は飲水および飼料は自由に与えた。尿は投与後 6, 12, 24, 48, 72 時間目に採取, 糞は投与後 24, 48, 72 時間目に採取した。呼吸中 $^{14}\text{CO}_2$  は 1N NaOH 水溶液に吸収させ 6, 12, 24, 48, 72 時間目に採取した。

肝スライスを用いた *in vitro* 実験では常法により 1 匹分の新鮮な肝スライス (約 12 g) を TMU- $2\text{-}^{14}\text{C}$  5 mg

1) Location: Takaramachi, Kanazawa, 920, Japan.

2) E. Spector, F.E. Shieldman, *Biochem. Pharmacol.*, **2**, 182 (1959).

3) E. Sarcoine, J.E. Sokal, *J. Biol. Chem.*, **231**, 605 (1958).

4) P.D. Parapetrou, B. Marchant, H. Gavras, W.D. Alexander, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 363 (1972).

5) H.M. Foster, H.R. Snyder, "Organic Synthesis," Vol. 35, ed. by W.S. Johnson, John Wiley and Sons, Inc., New York, 1954, p. 80.

と Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (pH 7.0) 100 ml とともに 37°, 5 時間インキュベーションしたものにつき代謝物を合成品による逆希釈分析法で検討した。

**放射能の測定** 尿はジオキサン系シンチレーター (ナフタリン 100 g, PPO 7 g, ジメチル POPOP 0.3 g をジオキサン 1 liter にとかしたもの) 10 ml に溶解し液体シンチレーションカウンター (Packard 社製 Tri-Carb liquid scintillation spectrometer Model 3320) で測定し外部線源法でクエンチングを補正した。代謝物の放射能は分離・精製後直接または水に溶解後同様に測定した。糞は乾燥後乳鉢で粉末とし、一部を 1N NaOH 溶液にて一夜攪拌抽出しその抽出液を水で 5 倍に希釈しその 0.5 ml を上記方法により測定した。呼気  $^{14}\text{C}$  吸収液は 1N  $\text{BaCl}_2$  溶液にて  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  の沈殿として乾燥後ガスフローカウンター (神戸工業社製 GCS-I 型  $2\pi$  ガスフローカウンター) で測定し標準  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$  の比較測定の結果から dpm に換算した。薄層クロマトグラフィーのスキヤニングは Aloka TLC スキャナー Model TRM-1B を使用した。

**クロマトグラフィー** カラムは Dowex 50 W $\times$ 8 (100—200 メッシュ) [ $\text{H}^+$  型] とカラムクロマトグラフ用シリカゲル (100—200 メッシュ) (関東化学) を用いて調製した。分取薄層クロマトグラフィー (以下分取 TLC) は Kieselgel PF<sub>254</sub> を用い 20 $\times$ 20 $\times$ 0.05 cm の薄層を調製した。薄層クロマトグラフィー用展開溶媒には A) *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O (12:3:5), B)  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (4:1), C)  $\text{CHCl}_3$ -acetone (4:1), D)  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (9:1) の 4 種を用い、検出方法としては紫外線照射、ナフトレゾルシン試薬 (0.2% ナフトレゾルシンアセトン溶液 5 容と 3N リン酸 1 容の混液)、*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬 (1 g の *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドを 100 ml のエタノールおよび 10 ml の濃塩酸にとかしたもの) の 3 種類を用いた。

## 結 果

### 放射能の尿、糞および呼気への排泄

一夜絶食後の 10 匹のラットを用い TMU-2- $^{14}\text{C}$  の 1% CMC 懸濁液を経口投与し (490 mg/kg, 約 3  $\mu\text{Ci}$ /1 匹), 経時的に尿および糞への放射能の排泄を調べた。またラット 2 匹を用い標識化合物投与後の経時的な呼気への放射能排泄を検討した。Fig. 1 に示すように経口投与後 72 時間目までに尿中に約 68%, 糞中に約 27%, 呼気中に約 1.2% の放射能が排泄された。

### 尿中代謝物の分離・精製

一夜絶食後のラット 20 匹を用いて TMU-2- $^{14}\text{C}$  を上記排泄実験と同様の投与条件で経口投与し 48 時間までの尿を用いて Fig. 2 に示した方法で尿中代謝物の分離・精製を行なった。なお尿中放射能は投与放射能の 64.3% であった。

まず尿を濾過し *n*-ブタノール 500 ml ずつで 3 回抽出し水層部と *n*-ブタノール層部に向けた。水層部は 40° 以下で減圧濃縮し 10% 塩酸で pH 2.0 に生じた沈殿は 3000 rpm, 10 分間遠心分離した後水で再結晶すると Comp. I (mp 300° 以上) が得られる。遠心上澄液は Dowex 50W $\times$ 8 ( $\text{H}^+$  型) カラム (3 $\times$ 35 cm) に吸着後水 2 liter, 0 から 1N までのアンモニア水のグラジエント溶出 4 liter, 1N アンモニア水 1 liter にて順次溶出し 15 g ずつ分取した。この操作によりフラクション No. 5—80 の Fr. A とフラクション No. 370—390 の Fr. B に分離する。

まず Fr. A を減圧濃縮後約 10 g のシリカゲルに吸着乾固しそれをクロロホルムで調製したシリカゲルカラム (3 $\times$ 35 cm) に静かに積層しクロロホルム-アセトン (4:1), クロロホルム-メタノール (9:1), クロロホルム-メタノール (4:1) の混合溶媒で順次溶出し 20 g ずつ分取した。この操作により Fig. 3 に示すようにさらに Fr. A-1—A-4 の 4 つの放射能ピークに分離する。ここで得られた Fr. A-1 を実験の部記載の溶媒系 C を用い分取 TLC, さらに水からの再結晶により単一の Comp. I が得られた。また Fr. A-2 は濃縮後溶媒系 B で分取 TLC を行ないメタノールで再結晶すると Comp. II (mp 300° 以上) が得られ, その他にナフトレゾルシン試薬に陽性を示すグルクロン酸抱合体も得られた。Fr. A-3 にも前者同様グルクロン酸抱合体が存在した。Fr. A-4 には

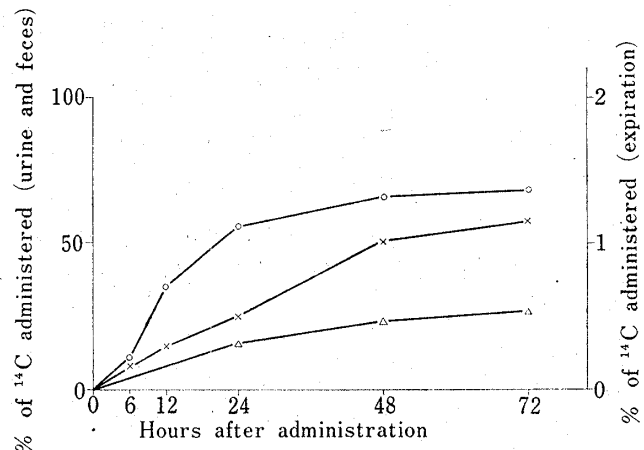


Fig. 1. Cumulative Excretion of Radioactivity in the Urine, Expiration and Feces of Rats after Oral Administration of TMU-2- $^{14}\text{C}$

○—○: urine; ×—×: expiration; △—△: feces.

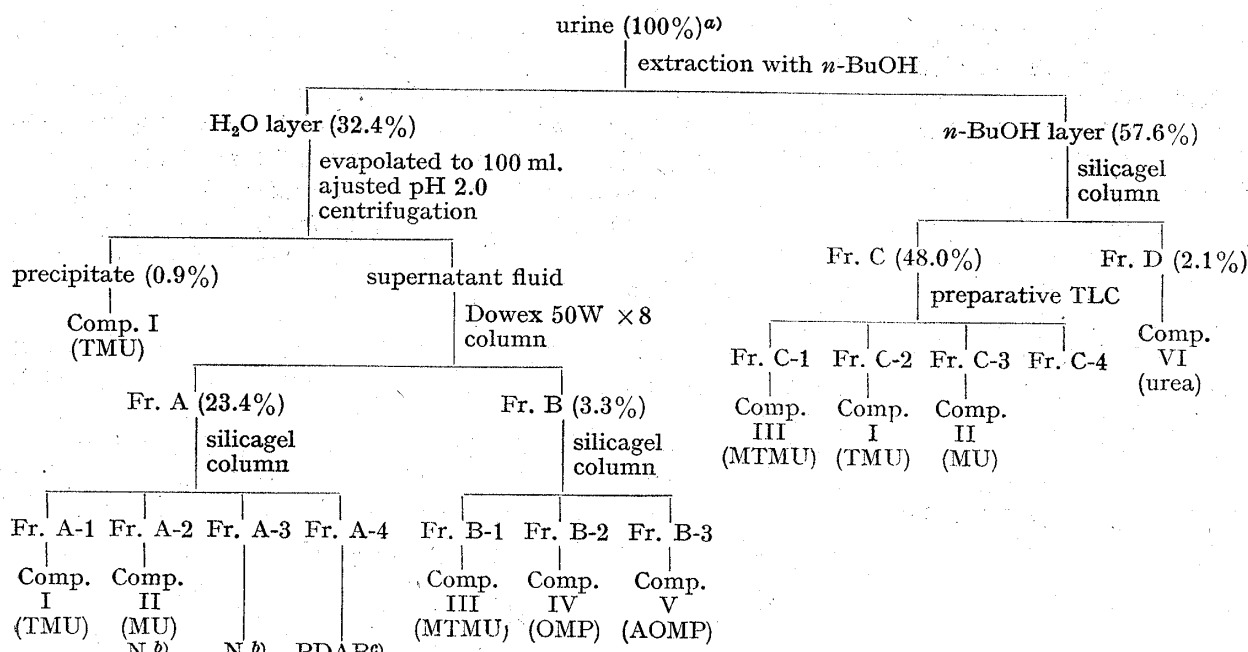


Fig. 2. Scheme for Fractionation and Isolation of the Urinary Metabolites

a) numbers in parentheses show % distribution of radioactivity

b) naphthoresorcin colored fraction

c) *p*-dimethylaminobenzaldehyde colored fraction; TMU: 2-thio-6-methyluracil; MU: 6-methyluracil; MTMU: 2-methylthio-6-methyluracil; OMP: 4-oxo-6-methylpyrimidine; AOMP: 2-amino-4-oxo-6-methylpyrimidine

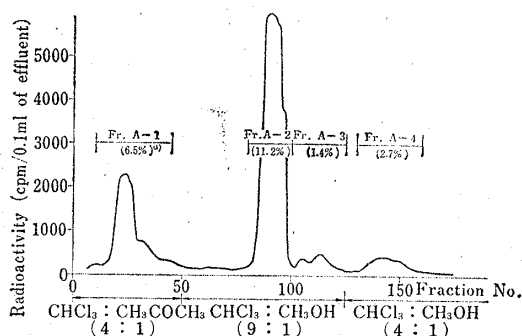


Fig. 3. Fractionation of Fr. A Using Silicagel Column Chromatography.

Each fraction contains 20 g of effluent.

a) numbers in parentheses show % of total urinal radioactivity

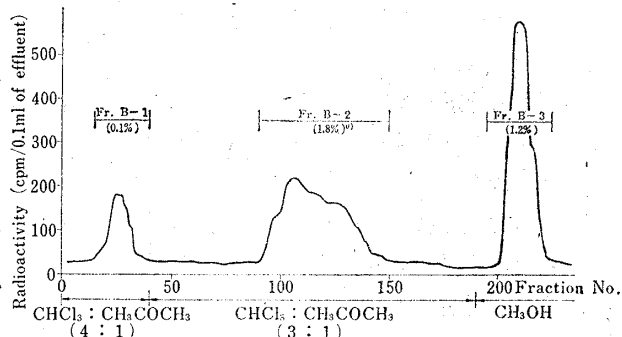


Fig. 4. Fractionation of Fr. B Using Silicagel Column Chromatography

Each fraction contains 20 g of effluent.

a) numbers in parentheses show % of total urinal radioactivity

*p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬に陽性を示すウレイド構造を含むと思われる化合物が存在した。しかし上記グルクロン酸抱合体およびウレイド構造化合物はいずれも単離、結晶化する事はできなかった。

次に Fr. B 中の代謝物についても検討した。Fr. A と同様な操作によりシリカゲルカラム (3×35 cm) に積層しクロロホルム-アセトン (4:1)、クロロホルム-アセトン (3:1)、メタノールで順次溶出し 20 g ずつ分取した。この操作により Fig. 4 に示すようにさらに Fr. B-1—B-3 の 3 つの放射能ピークに分離する。

Fr. B-1 より Comp. III (mp 225—228°), Fr. B-2 より Comp. IV (mp 185—187°) がそれぞれ得られる。Fr. B-3 より溶媒系 B を用い分取 TLC を行なうと Comp. V が得られる。

次に *n*-ブタノール抽出液中の代謝物について検討した。尿の *n*-ブタノール抽出液を減圧乾固し残渣をメタノール 200 ml で抽出し不溶部の Comp. I を除き可溶部はシリカゲル 20 g に吸着乾固しシリカゲルカラム

(3×35 cm) に積層しクロロホルム-メタノール (9:1) で溶出してくる部分を Fr. C とし, クロロホルム-メタノール (4:1) で溶出してくる部分を Fr. D とする. 溶媒系 B を用い Fr. C は分取 TLC を行ないさらに 4 つの放射能ピーク Fr. C-1 (尿中放射能の 1.5%), Fr. C-2 (41.4%), Fr. C-3 (1.8%), Fr. C-4 (0.2%) に分離し, Fr. C-1 からは Comp. III, Fr. C-2 からは Comp. I, Fr. C-3 からは Comp. II をそれぞれ単離したが Fr. C-4 からは物質を単離できなかった. Fr. D は減圧乾固しメタノールから再結晶すると Comp. VI (mp 130°) が得られた.

#### 代謝物の同定

Comp. I は ultraviolet spectrum (UV), infrared spectrum (IR), mass spectrum (MS) および元素分析の結果未変化 TMU と同定した.

Comp. II は元素分析および MS の結果より分子式  $C_5H_6O_2N_2$  が得られ TMU の脱硫反応により生じたと思われる 6-methyluracil (以下 MU) と推定し比較同定した.

Comp. III は同様にして分子式  $C_6H_8ON_2S$  が得られ TMU のメチル基置換体であると推定された. Sarcoine らの報告<sup>3)</sup> は 2-thiouracil をラットに皮下投与すると尿中に投与量の 8.2% が 2-methylthiouracil として排泄されることを明らかにしているので Comp. III は 2-methylthio-6-methyluracil (以下 MTMU) であると推定し TMU を水酸化ナトリウム溶液中でジメチル硫酸と反応させメタノールから再結晶して得られる標品と比較して同定した.

Comp. IV はミリマスの測定値より分子式  $C_5H_6ON_2$  が与えられ MTMU の脱  $CH_3S$  基された 4-oxo-6-methylpyrimidine (以下 OMP) と推定し, Gabriel らの方法<sup>6)</sup> に準じ MU を原料として合成した標品と比較同定した.

Comp. V は微量であったが MS の  $M^+$  が 125 であったことより OMP の 2 位のアミノ基置換体である 2-amino-4-oxo-6-methylpyrimidine (以下 AOMP) と推定し Jaeger の方法<sup>7)</sup> に従い合成した標品と MS のフラグメンテーション・パターンを比較し, さらに逆希釈分析を行ない同定した.

Comp. VI は元素分析より  $CH_4ON_2$  が得られ混融, IR などより尿素と同定した.

グルクロン酸抱合体については次のように検討した. Fr. A-2 および Fr. A-3 で得られたナフトレゾルシン反応陽性物質を 10% 塩酸による加水分解を行ない TLC による aglycon の定性的検索を行なった. 加水分解後の TLC スキャンナーによる検討の結果 aglycon として TMU, MU および OMP の存在が確認された.

また Fr. A-4 に存在する *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒド試薬に陽性の物質は pyrimidine 環が  $N_3-C_4$

TABLE I. Excretion Percentages of the Urinary Metabolites

Fractions	Percent of radioactivity	
Urine total	64.3 <sup>a)</sup>	100 <sup>b)</sup>
TMU	29.1	46.2
MU	5.5	9.1
MTMU	1.0	1.6
OMP	1.1	1.8
AOMP	0.1	0.2
Urea	0.5	0.8
PDAB colored	2.0	3.2
Naphthoresorcin colored	1.1	1.8
Unknown	5.2	8.3
Total recovery	45.6	73.0

a) % of  $^{14}C$  administered

b) % of total radioactivity in the urine; TMU: 2-thio-6-methyluracil; MU: 6-methyluracil; MTMU: 2-methylthio-6-methyluracil; OMP: 4-oxo-6-methylpyrimidine; AOMP: 2-amino-4-oxo-6-methylpyrimidine; PDAB: *p*-dimethylaminobenzaldehyde

6) S. Gabriel, J. Colman, *Chem. Ber.*, **32**, 2930 (1899).

7) J. Jaeger, *Ann. Chem.*, **262**, 365 (1891).

位で開裂して生じるウレイド構造を含む化合物であると推定したが少量のため構造決定までにはいたらなかった。各代謝物への放射能の移行率は逆希釈分析法による定量の結果 Table I に示すごとくであった。

#### ラット肝スライスによる代謝

実験の部記載の条件でインキュベーションした後ガラス製ホモジナイザーでホモジナイズし 10000 rpm, 20 分間遠心し上澄液を 10% 塩酸で pH 2.0 に調整, 生じた沈殿を 3000 rpm, 10 分間の遠心で除き, Dowex 50W × 8(H<sup>+</sup> 型) カラム (1.8 × 24 cm) に吸着させ水 1 liter, 1N アンモニア水 1 liter で順次溶出し 10 g ずつ分取した。この操作により 2 つの放射能ピーク (フラクション No. 1—40 およびフラクション No. 101—140) に分離した。フラクション No. 1—40 の分画は実験の部記載の溶媒系 D を用い分取 TLC にかけるとさらに 3 つの放射能ピークにわけられた。以上 4 つの分画を減圧濃縮後尿中から分離, 精製および同定された 5 種の代謝物および 5,6-dihydro-6-methyluracil (以下 DHMU), 5-hydroxy-6-methyluracil (以下 HMU),  $\beta$ -ureidobutyric acid (以下 UBA) の計 8 種の化合物につき逆希釈分析法で検討した。

DHMU は Kwang-Yuen らの方法<sup>8)</sup> により, HMU は Dohmori らの方法<sup>9)</sup> によりそれぞれ合成し, UBA は Fink らの方法<sup>10)</sup> による  $\beta$ -ureidopropionic acid の合成法に準じ  $\beta$ -aminobutyric acid と KCNO とから合成した。

Table II に示すように尿中に認められた MU, OMP, AOMP に放射能が移行するとともに尿中には検出できなかった DHMU に 3 回の実験を通じ常に放射能の移行が認められた (それぞれ 2.8%, 3.1%, 2.4%)。このことから DHMU が TMU の代謝物として存在することが明らかとなった。

TABLE II. Conversion Percentage of Metabolites *in Vitro*.

	MU	MTMU	OMP	AOMP	Urea	DHMU	HMU	UBA
Exp. 1	2.7 <sup>a)</sup>	—	0.1	0.2	—	2.8	—	—
Exp. 2	6.4	0	0.1	0.04	0	3.1	0	0
Exp. 3	6.2	0	—	—	0	2.4	0	0

a) % of <sup>14</sup>C administered; MU: 6-methyluracil; MTMU: 2-methylthio-6-methyluracil; OMP: 4-oxo-6-methylpyrimidine; AOMP: 2-amino-4-oxo-6-methylpyrimidine; DHMU: 5,6-dihydro-6-methyluracil; HMU: 5-hydroxy-6-methyluracil; UBA:  $\beta$ -ureidobutyric acid

#### 考 察

TMU-2-<sup>14</sup>C をラットに経口投与したところ投与後 72 時間に尿中に投与放射能の約 68%, 糞中に約 27%, 呼気中に約 1.2% の放射能が排泄された。したがって投与放射能の約 96.2% が投与後 72 時間で体外に排泄されることになり TMU は生体内蓄積による副作用発現のおそれの少ない薬物であると考えられる。

TMU-2-<sup>14</sup>C を経口投与した場合の尿中放射性代謝物として尿中放射能の約 46.2% が未変化 TMU, 約 9.1% が MU, 約 1.6% が MTMU, 約 1.8% が OMP, 約 0.2% が AOMP, 約 0.8% が尿素として排泄されることを確認した (Table I)。このことより体内に吸収された TMU-2-<sup>14</sup>C は Fig. 5 に示す代謝様式で代謝され尿中に排泄されることが考えられる。

従来 thiouracil の代謝については Spector ら<sup>2)</sup> は脱硫反応により uracil になりさらに還元的経路により  $\beta$ -alanine に代謝されることを報告し, また Sarcoine ら<sup>3)</sup> は S-メチル化による 2-methylthiouracil の生成を, Parapetrou ら<sup>4)</sup> はグルクロン酸抱合体の存在を報告している。今回の実験では未変化 TMU, MU, OMP を aglycon とするグルクロン酸抱合体の存在が確認され TMU は thiouracil と類似の代謝を受けることが判明した。さらに AOMP, ウレイド構造物質, 二酸化炭素, 尿素および DHMU 等の多様な代謝物が得られた。この結果は以下に述べるようにピリミジン環の開裂に関し興味ある示唆を与えた。

Uracil や thymine などのピリミジン類の環開裂機構には二つの経路が考えられている。第一は酸化的経路で

8) Kwang-Yuen, Zee-Cheng, R.K. Robins, C.C. Cheng, *J. Org. Chem.*, **26**, 1877 (1961).

9) R. Dohmori, R. Yoshida, S. Kitahara, Y. Tanaka, T. Naito, *Chem. Pharm. Bull.*, **18**, 1908 (1970).

10) R.M. Fink, C. McGaughey, R.E. Cline, K. Fink, *J. Biol. Chem.*, **218**, 1 (1956).

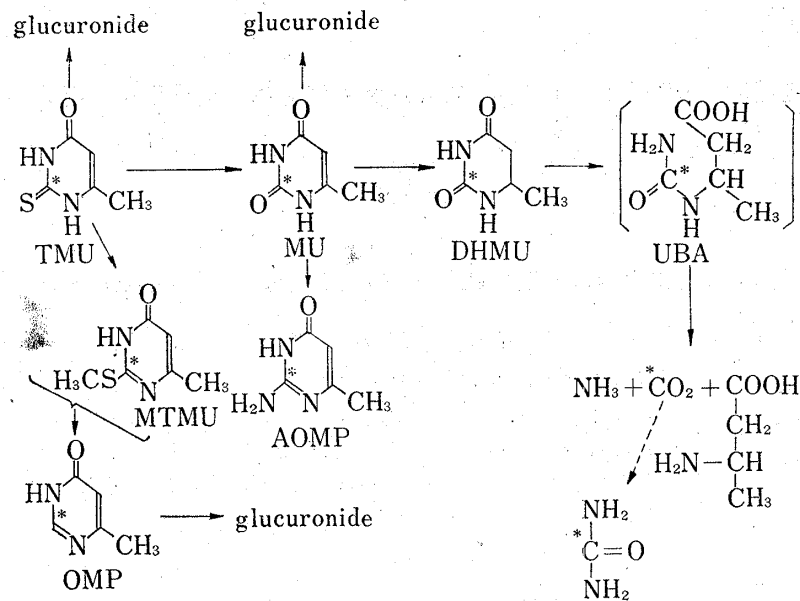


Fig. 5. The Metabolic Pathways of 2-Thio-6-methyluracil in Rat

TMU: 2-thio-6-methyluracil; MU: 6-methyluracil; MTMU: 2-methylthio-6-methyluracil; OMP: 4-oxo-6-methylpyrimidine; AOMP: 2-amino-4-oxo-6-methylpyrimidine; DHMU: 5,6-dihydro-6-methyluracil; UBA: β-ureidobutyric acid

あり、第二は還元的経路である。Uracil の場合前者の経路によると 6 位の水酸化を受け barbiturate<sup>11)</sup> となり、または 5 位の水酸化を受け isobarbiturate<sup>12)</sup> となりウレイド構造化合物を経て最終代謝物の尿素となる。後者の経路によるとまず 5,6 位の還元を受け 5,6-dihydrouracil を生成し次に N<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> 位で環開裂を受け β-ureidopropionate となりさらに代謝されアンモニアと二酸化炭素と β-alanine を最終代謝物とする。<sup>13)</sup> 5-Fluorouracil についても同様の還元的経路による代謝を受けるという報告<sup>14)</sup> もされている。

今回呼気中二酸化炭素に放射能がみつめられたこと、尿中尿素の放射能は放射性二酸化炭素が尿素サイクルを経て尿素に再合成される可能性もあること、肝スライスによる *in vitro* 実験において DHMU に放射能移行が認められ HMU にそれがなかったことなどを考え、本薬物は 6 位にメチル基をもつため水酸化にはじまる酸化経路をふむ代謝を受けにくく主として還元的経路により環開裂の代謝を受けると考えられる。

**謝辞** 本研究にあたり元素分析、マススペクトル測定を行なっていただきました板谷芳京氏、辻多恵子嬢に厚く感謝します。

11) T.P.Wang, J.O. Lampen, *J. Biol. Chem.*, **194**, 775 (1952).

12) L.R. Cerecedo, *J. Biol. Chem.*, **93**, 269 (1931).

13) P. Fritzon, *J. Biol. Chem.*, **226**, 223 (1957).

14) T. Oishi, H. Shiraki, K. Mineura, H. Takahira, *Yakugaku Zasshi*, **93**, 749 (1973).