

98-273 水上 典子

(指導教官：川井 恵一教授，清水 幸三助手)

要旨：本研究では血清蛋白への結合が高く、現在核医学領域において脳血流診断薬として用いられている  $^{123}\text{I}$ -IMP の脳集積の向上を目指して、臨床応用可能な結合置換薬を探索した。まず、 $^{123}\text{I}$ -IMP がヒト血清アルブミン (HSA) と共に  $\alpha_1$ -酸性糖蛋白 (AGP) にも結合していることから、AGP の置換薬として静注製剤である erythromycin が有効であることを見出した。また、HSA の置換薬に関して、より安全性の高い栄養素の利用を考え、アミノ酸輸液の応用を検討した。種々の血清を用いて *in vitro* 実験を行ったところ、数種のアミノ酸輸液が血中遊離率を増加させ、十分な置換効果を示した。実際、これらの置換薬を負荷することで、 $^{123}\text{I}$ -IMP のサル脳への集積率がそれぞれ 1.4~1.6 倍に増加した。以上より、臨床応用可能な  $^{123}\text{I}$ -IMP の新たな置換薬として、erythromycin 及びアミノ酸輸液の静注製剤としての応用が期待される。

## I. はじめに

一般に人体に投与された医薬品の多くは血清蛋白と結合しており、そのために標的組織への効率的移行が妨げられている。そこで、血清蛋白上の特異的結合部位において競合置換を示す、高い蛋白結合親和性を持った薬剤を併用し、放射性医薬品の組織移行性の決定因子である血中遊離濃度を制御することにより、標的組織への集積率を向上することができる<sup>1,4)</sup>。この動態制御法を用いることにより、放射性医薬品の投与量の低減、検査時間の短縮及びより鮮明な診断画像の提供が可能となる。腎血漿流量診断薬  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> は HSA の site I に結合することから、その置換薬として安全性の高い経口製剤である bucolome を用いることにより  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG<sub>3</sub> の血中遊離率は 1.29 倍に増加し、尿中排泄が促進することが確認されている<sup>1,4)</sup>。

そこで本研究では、脳血流診断薬  $^{123}\text{I}$ -IMP における蛋白結合置換薬の検討を行った。 $^{123}\text{I}$ -IMP は血中において投与量のおよそ 70% が血清蛋白に結合する。今までに主な結合部位である HSA site II の置換薬として、経口製剤の 6-methoxy-2-naphthylacetic acid (6MNA) が有効であることが見出されている<sup>2,4)</sup>。今回、 $^{123}\text{I}$ -IMP が HSA 以外の血清蛋白である AGP にも結合していることが新たに確認されたため、安全性が高く、臨床応用可能な AGP に対する置換薬の探索を行うとともに HSA への結合に関しては、より安全性の高い静注製剤である栄養素の置換薬としての応用について検討した。

## II. 実験材料と方法

### A. AGP 置換薬の探索

#### (a) $^{123}\text{I}$ -IMP の結合蛋白種の同定

$^{123}\text{I}$ -IMP の結合蛋白を調べるため、結合蛋白種の同定を行った。ヒト血清及び HSA、AGP、IgG (Sigma Chemical) の 3 種の精製蛋白溶液を用いて  $^{123}\text{I}$ -IMP (日本メジフィジックス) の結合率を検討した。精製蛋白は正常血清濃度を想定して、HSA 740 $\mu\text{M}$ 、AGP 17 $\mu\text{M}$ 、IgG 62 $\mu\text{M}$  の濃度に 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4) を用いて調整した。血清及び蛋白溶液 500 $\mu\text{l}$  に  $^{123}\text{I}$ -IMP を 20 $\mu\text{l}$  加えて混和し、その 20 $\mu\text{l}$  をチューブに取り、放射能[S]を測定した。この溶液 450 $\mu\text{l}$  を限外濾過器 (トソー：Ultracent 10) に移し、遠心分離機 (TOMY: RLX-135) を用いて 3000rpm で 10 分間遠心分離した。遠

心後濾液から 20 $\mu$ l とり、放射能[F]を測定した。放射能の測定にはオートウェルガンマカウンタ (ALOKA: ARC-380)を使用した。

血中遊離率、蛋白結合率及び血中遊離画分の増加率は以下の式により算出した。

$$\text{血中遊離率} = [S] / [F]$$

$$\text{蛋白結合率} = 1 - \text{血中遊離率}$$

$$\text{血中遊離画分の増加率} = \text{任意 sample の血中遊離率} / \text{control の血中遊離率}$$

### (b)AGP 置換薬の探索

血清蛋白を 1/15M リン酸緩衝液 (pH7.4)を用いて HSA 濃度が 500 $\mu$ M になるように調整した。置換薬を蒸留水または最少量の methanol で溶解し、血清に添加した。置換薬として HSA site II に関しては 6MNA (SmithKline Beecham)、AGP に関しては verapamil (VPM, Sigma Chemical)及び erythromycin (ETC, ダイナボット)を使用した。また VPM 負荷実験ではヒト、ETC 負荷実験においてはヒト、サル、ラットの血清を用いた。

以降、(a)と同様の限外濾過法により、血中遊離画分の増加率から置換の有無を評価した。

### B. アミノ酸輸液の応用

A.(b)と同様に実験をした。血清はヒト及びサルを用い、それぞれの血中遊離率及びその control に対する増加率を算出した。アミノ酸輸液には、Proteamine12X (PTA, 田辺製薬)、Kidomin、Aminoleban、Amiparen、Aminotripta、Trifluid (以上大塚製薬)、Aminic (ヘキスト・マリオン・セル)を使用した。

### C. 画像化による置換薬の評価

A 及び B 実験の結果良好な成果を示した ETC、PTA を用いて、<sup>123</sup>I-IMP のサル脳への集積に対する影響を評価した。日本サル (雌性：体重 4.5~4.6kg)を pentbarbital で腹腔内麻酔し、<sup>123</sup>I-IMP (37MBq) を含んだ生理食塩水 1ml を前腕静注より投与した。投与後 2 検出器型シンチレーションカメラ (Picker: Prism 2000)を使用して全身プラナー像を 1 分ごとに 60 分間経時的に撮像した。その後引き続き 3 検出器型シンチカメラ (Picker: Prism 3000)にて 30 分間撮像し、断層像を得た。投与 10 分後に対側前腕より採血し、限外濾過法により血中遊離率を測定した。置換薬は、同一のサルに負荷して影響を検討した。ETC は生理食塩水に溶解し、IMP と同時に投与した。PTA は IMP 投与直前に 5mL を静注し、その後 30 分間 0.5mL/min の速度で点滴した。

## III. 結果と考察

### A. AGP 置換薬の探索

種々の蛋白溶液中における <sup>123</sup>I-IMP の結合率を Fig.1 に示す。これらより、<sup>123</sup>I-IMP は HSA だけでなく AGP にも多く結合していることが確認できた。

そこで、AGP の置換薬として VPM を負荷したところ、<sup>123</sup>I-IMP のヒト血清中の遊離率が顕著に増加した (Fig.2)。しかし、VPM は狭心症などの患者に用いる薬効性の高い薬であるため、置換薬として臨床的に用いることができない。そこで人体に対して安全性が高

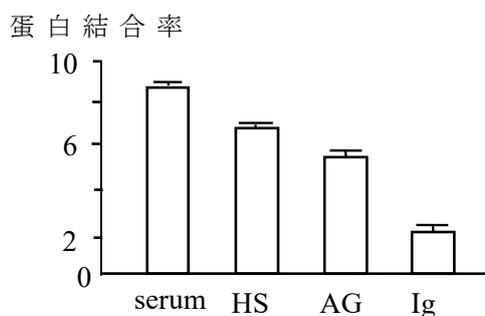


Fig.1 <sup>123</sup>I-IMPの蛋白結合率

く臨床応用可能な置換薬として ETC の利用を考えた。ETC は静注製剤として使用でき、安全性も高いことから、臨床的に使用することが可能であると考えられる。そこで、ETC を置換剤として負荷した時の血中遊離率を検討したところ、VPM 負荷時と同様な置換効果が得られ、いずれの血清においても増加がみられた (Fig.3)。

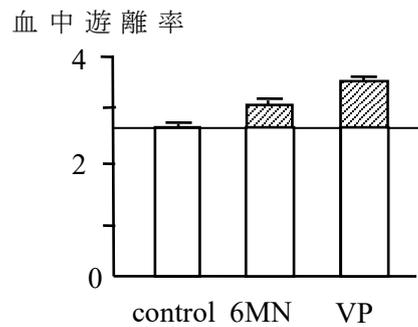


Fig.2 Verapamil負荷時の<sup>123</sup>I-IMPの血中遊離率

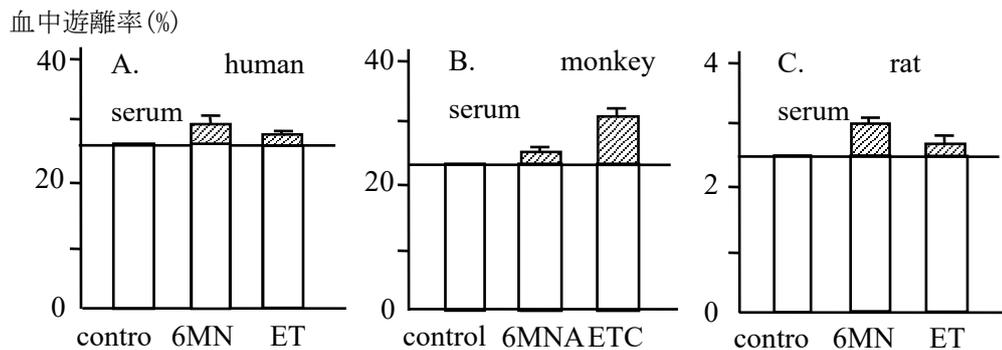


Fig.3 Erythromycin負荷時の<sup>123</sup>I-IMPの血中遊離率

#### B. アミノ酸輸液の応用

Fig.4 に示すように今回検討を行った7種のアミノ酸輸液の中で、PTA、Aminoleban、Kidomin、Aminic において置換効果が認められた。特に PTA においては HSA 置換薬である 6MNA と同等の 1.28 倍の増加を示した。アミノ酸は栄養素であり、その輸液は注射剤として用いることができる。よって <sup>123</sup>I-IMP と同時に投与することにより、血中遊離濃度を制御することが可能であることから、今後臨床応用が期待できると考えられた。

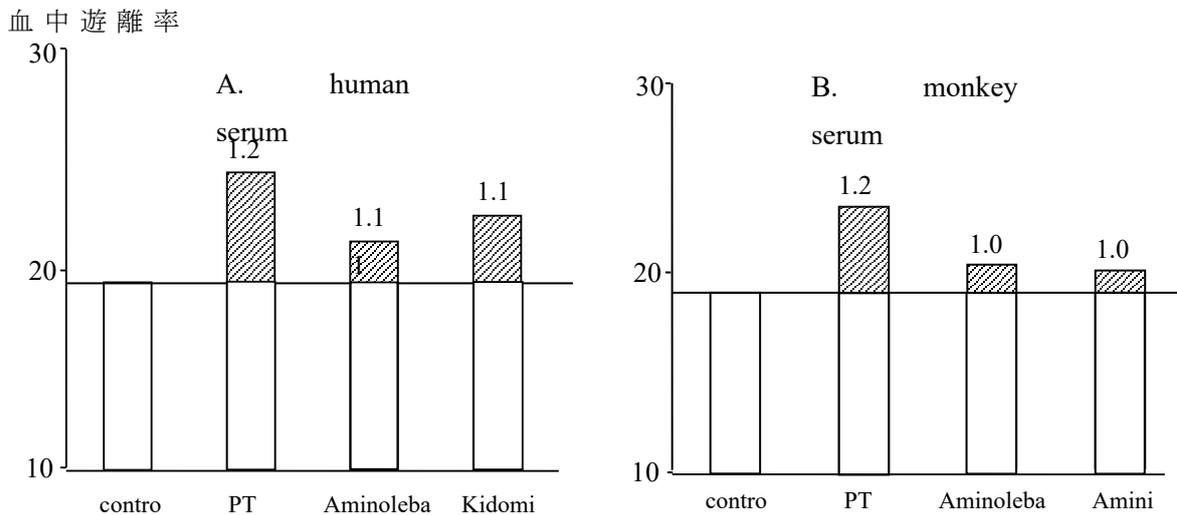


Fig.4 アミノ酸輸液負荷時の<sup>123</sup>I-IMPの血中遊離率

#### C. 画像化による置換薬の評価

Fig.5 のように同一のサルに ETC あるいは PTA を負荷したところ、無負荷時 (control) と比較して 1.4~1.6 倍という顕著な脳集積の増加が認められた。一方、SPECT 像では、両者の脳内局在に変化が認められなかった。また、投与後 10 分の血中遊離率は、ETC 負荷時において 1.31~1.39

倍、PTA 負荷時において 1.27~1.47 倍と顕著に増加していたことから、この集積の向上は血清蛋白結合置換によるものと考えられた。集積の向上は 6MNA 負荷時の増加率 1.3 倍と比較して同等か上回っており、両薬剤の置換薬としての有用性が *in vivo* における  $^{123}\text{I}$ -IMP の生体内動態としても確認された。

count (cpm / pixel)

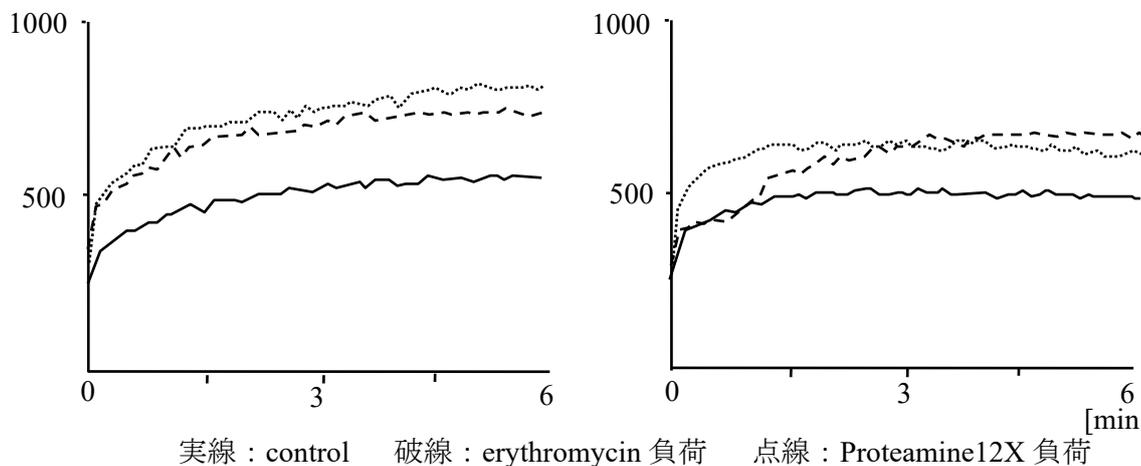


Fig.5  $^{123}\text{I}$ -IMPのサル脳への経時的集積曲線

以上の結果より、今後  $^{123}\text{I}$ -IMP の臨床応用可能な置換薬として、安全性が高く静注製剤として使用できる erythromycin 及び PTA などのアミノ酸輸液の利用が期待できる。

#### 謝辞

本実験を行うに当たり、御指導下さった川井恵一教授、清水幸三助手、置換薬の提供及び有益なご教示を頂きました宮崎医科大学附属病院高村副薬剤部長、サルの画像化実験をお手伝い頂いた宮崎医科大学附属病院放射線科・放射線部の先生方、 $^{123}\text{I}$ -IMP を提供して下さいました日本メジフィジックス社に厚く御礼申し上げます。

#### IV.参考文献

1. Kawai K., Nishii R., Takamura N., Jinnouchi S., Nagamachi S. and Tamura S.  
Competitive displacement of  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3 serum protein binding in *in-vitro* and *in-vivo*.  
*J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 42,: S584-586, 1999.
2. Kawai K., Nishii R., Takamura N., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M.  
Regulation of  $^{123}\text{I}$ -IMP cerebral accumulation by competitive displacement of serum protein binding.  
*J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 44,: S462-464, 2001.
3. Takamura N., Kawai K., Nishii R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M.  
Potentialization mechanism of domino displacement on  $^{123}\text{I}$ -IMP serum protein binding.  
*J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 44,: S465-467, 2001.
4. Kawai K., Takamura H., Nishii R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M.  
Competitive displacement of serum protein binding to regulate pharmacokinetics. In *Proceedings of International Symposium on Serum Albumin and  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein from Basic Sciences to Clinical Applications*: Eds. Otagiri M., Sugiyama Y., Testa B., Tillement J.P., pp181-192, 2001.