

99-233 日輝 佳代

(指導教官：川井 恵一教授)

要旨：放射性医薬品による薬物代謝機能診断のためのアッセイ法の確立を目的として、末梢での代謝物の存在が報告されている ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (^{123}I -IMP) を選択し、その代謝物分析法には、オクタノール抽出法の応用を計画した。肝臓ホモジネートを用いて、 ^{125}I -IMP の代謝実験を行ったところ、 ^{125}I -IMP の酸不溶性蛋白への強い吸着が認められた。蛋白への吸着を抑制するためにエタノールを添加したところ、蛋白吸着率は低下したが、同時に ^{125}I -IMP のオクタノール層への分配率も低下した。除蛋白後の上清よりエタノールを溜去した結果、 ^{125}I -IMP の抽出率は若干改善された。TLC 分析の結果、オクタノール層に存在する放射能の 98% 以上は、 ^{125}I -IMP であることが確認された。エタノール無添加の場合、 ^{125}I -IMP の約 90% が蛋白に吸着されたため、上清画分における代謝物の分離測定が容易となった。

I. はじめに

現在、多種多様な薬が臨床使用されているが、薬物代謝機能の差により、思わぬ副作用が発現することがある。そこで、個々の患者に適した投与設計を行うために、既存の放射性診断薬を用いた新規薬物代謝機能測定法の開発を試みた。本研究では、臨床応用性を考慮し、末梢での代謝物の存在が報告されている ^{123}I -*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (^{123}I -IMP)¹⁾ を選択し、その代謝物分析法には、臨床で用いられているオクタノール抽出法^{2, 3)}の応用を計画した。IMP は、まず *p*-iodoamphetamine (PIA) へと代謝される。この両者は、脳や肺に存在し、脂溶性であることが確認されている。律速段階で *N*-脱アルキルにより *p*-iodophenylacetone (PIPA) へと代謝されるが、その後速やかに水溶性である *p*-iodobenzoic acid (PIB) に変化し、さらにグリシン抱合されて *p*-iodohippuric acid (PIH) と代謝が進み、PIH が尿中へ排泄される。PIB と PIH は肝臓での代謝が確認されている水溶性のものである¹⁾。IMP と PIA は脂溶性であり、オクタノール層に分配されるという性質を利用し、薬物代謝に関する主要臓器である肝臓のホモジネートを用いて ^{125}I -IMP の代謝実験を行った。並行して TLC による ^{125}I -IMP の代謝物分析も行った。

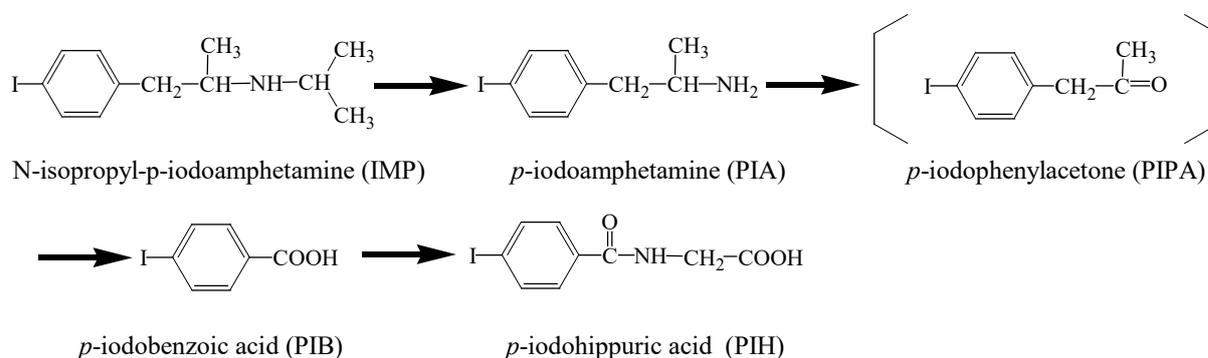


図 1. IMP の代謝過程¹⁾

II. 実験材料と方法

A. オクタノール抽出に対するエタノール濃度依存実験

(a) ラットの肝臓を摘出し、即座に氷冷した。Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.3) (KRPB) を組織湿

重量の等量加えて、4℃下ホモジナイズした。これを、KRPBにより一定倍率に希釈したもの 500 μl に、補酵素 NADPH(nacalai tesque)(100 μM)を 10 μl、¹²⁵I-IMP (日本メジフィジックス)30 μl (80-90kBq)を投与した。2分、10分、30分間 37℃水浴中でインキュベーションを行い、除蛋白のため 100%トリクロロ酢酸(TCA)を 25 μl(最終濃度 5%)添加し、エタノール添加の試料には、最終濃度が 20%、50%となるように加えた。Vortex mixer (VISION : KMC-1300V)で攪拌後、遠心分離機(TOMY : RLX-135)を用いて 3000rpm で 10 分間遠心分離した。それぞれの上清 50 μl をチューブにとり、放射能[T]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。これに対し、TCA 前処理のものは、100% TCA 25 μl をインキュベーション前に添加した。

別に、オクタノール 100 μl 入りガラスチューブに等量の上清を加えて、Vortex mixer で 1 分間攪拌し、遠心後、オクタノール層から 50 μl とり、放射能[O]を測定した。また、除蛋白後の最終濃度 50%エタノール上清より、エタノールを溜去したもののオクタノール抽出も同様に行った。

オクタノール抽出率は以下の式により算出した。

$$\text{オクタノール抽出率(\%)} = [\text{O}] / [\text{T}] \times 100$$

それぞれのエタノール濃度における ¹²⁵I-IMP の酸不溶性蛋白への吸着率を求めるため、バックグラウンド(BK)としてホモジネート 500 μl の代わりに KRPB 500 μl を使用し、種々の最終濃度になるようにエタノールを混入後、この水層から 50 μl とり、放射能[B]を測定した。

¹²⁵I-IMP の酸不溶性蛋白への吸着率は以下の式により算出した。

$$\text{酸不溶性蛋白への吸着率(\%)} = (1 - [\text{T}] / [\text{B}]) \times 100$$

(b) (a)の方法に従い、2 倍に希釈したホモジネート 500 μl に、NADPH(1mM)を 10 μl、¹²⁵I-IMP 30 μl(800-900kBq)を投与した。30分、60分間 37℃水浴中でインキュベーションした後、100% TCA を 25 μl 及びエタノール添加のものは最終濃度で 20%、50%になるように添加した。Vortex mixer で攪拌し、遠心後、上清を 5 μl とり、放射能を測定した。オクタノール抽出は(a)と同様に行った。

B. TLC による ¹²⁵I-IMP の代謝物分析

¹²⁵I-IMP の代謝物分析は、種々エタノール濃度の上清とオクタノール層に関して、以下の条件のシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC, MERCK : Art.5554)を用いて検討した。

TLC 展開溶媒 ; クロロホルム : メタノール : 氷酢酸 = 74 : 25 : 1

R_f 値 ; PIA=0.29、PIH=0.34、IMP=0.49、PIB=0.74

III. 結果と考察

A. オクタノール抽出に対するエタノール濃度依存実験

酸不溶性蛋白への吸着率を図 2 に示す。肝臓のホモジネートを用いて、¹²⁵I-IMP の代謝実験を行ったところ、図 2 に示すように、エタノール無添加の場合、5 倍、2 倍希釈の両者とも、¹²⁵I-IMP の酸不溶性蛋白への 80%以上の強い吸着が見られた。また、2 倍希釈の方が 5 倍希釈よりも吸着率が高かった。これは、ホモジネート濃度が高いほど蛋白量が増加するため、吸着も増加したためと考えられる。蛋白への吸着を低下させるために種々の濃

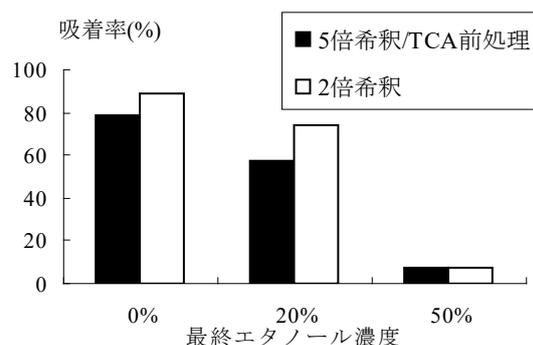


図 2. ¹²⁵I-IMP の酸不溶性蛋白への吸着率

度でエタノールを添加したところ、蛋白吸着率が著しく低下した。最終濃度で 50%のエタノールを加えたものは、約 7%にまで吸着を抑えることができた。

オクタノール抽出率の結果を図 3 に示す。横軸の 50%conc.とは、除蛋白後の最終濃度 50%エタノール上清を濃縮したものである。縦軸は上清に対するオクタノール層の抽出率を示す。グラフに示すように、エタノール添加の影響により ^{125}I -IMP のオクタノール層への抽出率が低下した。そこで、除蛋白後の上清よりエタノールを溜去したところ、 ^{125}I -IMP のオクタノール抽出率は両希釈倍率共に、僅かながら改善した。また、同じ最終エタノール濃度で、5 倍希釈が 2 倍希釈よりオクタノール抽出率が高いのは、希釈されている分、酸不溶性蛋白へ吸着される ^{125}I -IMP が減少した結果、上清の ^{125}I -IMP 濃度が増加したためと考えられる。さらに、両希釈倍率とも、最終濃度 20%エタノールに対し、エタノール無添加のオクタノール抽出率が低下した理由は、蛋白への吸着が大きく影響したためと考えられる。

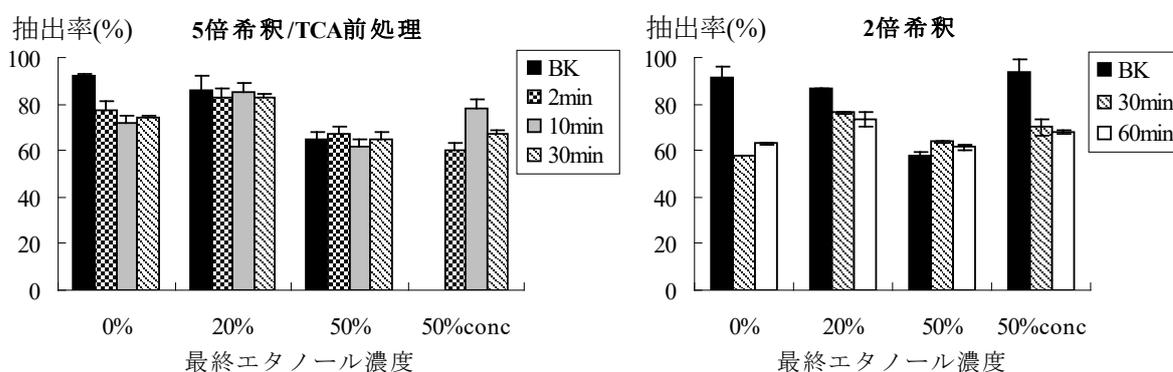


図 3. オクタノール抽出率

B. TLC による ^{125}I -IMP の代謝物分析

図 4 に種々のエタノール濃度における除蛋白上清を TLC 分析した結果から得られた ^{125}I -IMP の上清の存在率を示す。両倍率とも、エタノール濃度を上げるほど ^{125}I -IMP の存在率は 100%に近づいた。バックグラウンド(BK)では一様に ^{125}I -IMP の存在率は 95%以上であった。また、オクタノール層に存在する放射能の 98%以上は ^{125}I -IMP によるものであることが確認された。また、2 倍希釈は、エタノール濃度を高くすると、存在率が急激に増加している。これは、含まれる酸不溶性蛋白が 5 倍希釈よりも多く存在しているため、エタノール無添加の場合、 ^{125}I -IMP がより多く吸着した結果、エタノール添加による吸着抑制効果も大きくなったためと考えられる。

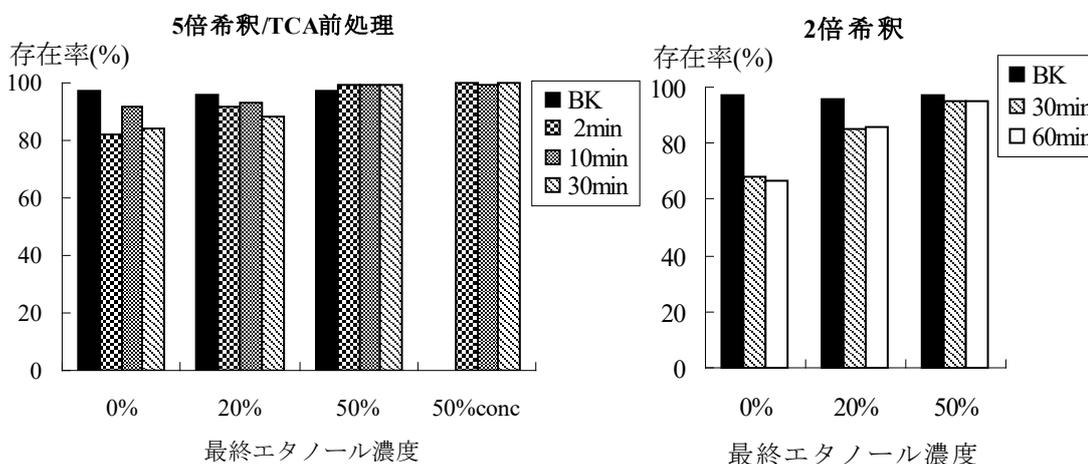


図 4. 上清画分における TLC 分析

図5はホモジネート2倍希釈のTLC分析結果の一例である。Rf値の0.4-0.5付近がIMP標品と一致する画分であることを分析により確認した。エタノール無添加の場合には、IMPよりRf値の小さい画分に存在している代謝物が最終濃度50%エタノールのものよりも検出しやすくなった。Rf値の小さい画分はPIAとPIHと一致するが、オクタノール抽出の結果よりこれらが水溶性であることから、その大部分がPIHであると考えられる。また、エタノール濃度を上げると¹²⁵I-IMPの吸着率は低下したが、図4に示すように、高濃度のエタノール添加のものでも¹²⁵I-IMPの存在率は95%以上であることより、約90%の¹²⁵I-IMPが、代謝されずに酸不溶性蛋白へ吸着されているものと考えられた。

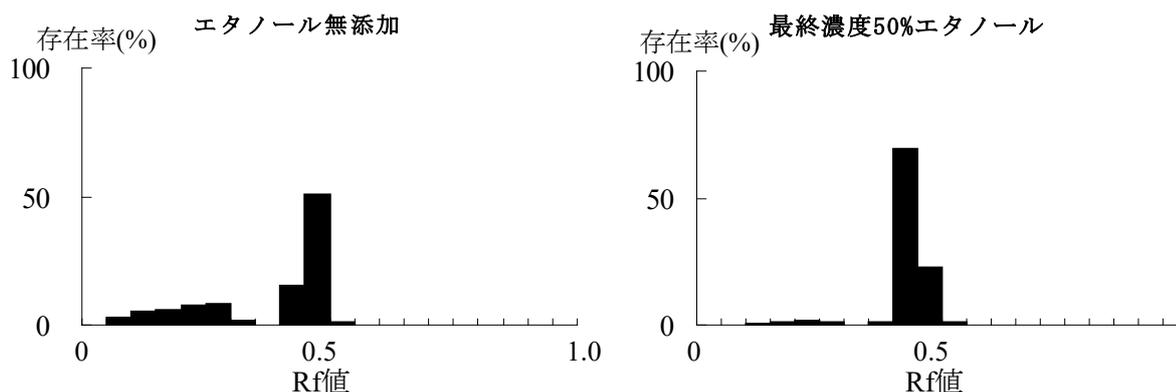


図5. ホモジネート2倍希釈におけるTLC分析

IV. 結語

肝ホモジネートを用いて、¹²⁵I-IMPの代謝実験を行ったところ、予期せぬ酸不溶性蛋白への強い吸着が認められた。オクタノール抽出法による代謝物分析の妨げになる蛋白への吸着を、エタノールの添加により低下させようと試みた。エタノール濃度を上げると蛋白吸着率は低下することが確認されたが、エタノール添加の影響により¹²⁵I-IMPのオクタノール層への分配率も低下した。最終濃度50%エタノール混液の上清より、エタノールを溜去したところ、オクタノール抽出における¹²⁵I-IMPの抽出率は若干改善された。

上清のTLC分析をしたところ、エタノール無添加のものは、¹²⁵I-IMPの約90%が蛋白に吸着されたため、結果として、上清画分における代謝物の分離測定が容易となった。今後オクタノール抽出とTLC分析の相関性を検討し、当アッセイ法を用いた薬物代謝実験を行いたいと考えている。

謝辞

本実験を行うに当たり、ご指導くださった川井恵一教授、¹²⁵I-IMPを提供して頂いた日本メジフィジックス株式会社、実験をお手伝い頂いた同研究室の方々に心から感謝申し上げます。

V. 参考文献

- 1) Ronald M. Baldwin and Jiann-Long Wu. In Vivo Chemistry of Iofetamine HCL Iodine-123 (IMP). J. Nucl. Med., 29: 122-124, 1988.
- 2) David E. Kuhl, Jorge R. Barrio, Sung-Cheng Huang, Carl Selin, Robert F. Ackermann, James L. Lear, J. L. Wu, T. H. Lin, and Michael E. Phelps. Quantifying Local Cerebral Blood Flow by *N*-Isopropyl- *p*-[¹²³I]Iodoamphetamine (IMP) Tomography. J. Nucl. Med., 23: 196-203, 1982.
- 3) Hidehiro Iida, Hiroshi Itoh, Mayumi Nakazawa, Jun hatazawa, Hiromi Nishimura, Yoshihiro Onishi and Kazuo Uemura. Quantitative Mapping of Regional Cerebral Blood Flow Using Iodine-123-IMP and SPECT. J. Nucl. Med., 35: 2019-2030, 1994.