

山口 桃子

(指導教官：川井 恵一教授，吉本 光喜助手)

要旨：神経伝達物質であるセロトニンの生合成前駆体、5-hydroxy-L-tryptophan (HTP)の放射性ヨウ素標識化合物を用いることにより、脳内セロトニン生合成代謝機能を反映した核医学診断画像が得られると期待される。本研究では酸化されやすい HTP に直接酸化剤を接触させることなく標識させるため、フィルターカップ付のナノセップを用いた。その結果、クロラミン-T法では基質が着色し HTP の変性が示唆されたが、本法では基質の着色は認められなかった。さらに TLC 分析を行ったところ、原料と異なる Rf 値にピークを認める溶媒組成を見出し、標識体と free I 分離の可能性を得た。一方、tryptophan (Trp)誘導体は血清蛋白への結合が強く、脳集積が損なわれると予想されるため、蛋白結合置換の可能性を検討した。ヒト血清において、Trp は90%が血清蛋白と結合しており、HSA site II の阻害剤による置換効果が顕著であった。マウス、ラット血清における結合率はヒト血清に比べ低く、他の阻害剤にも置換効果が認められるなど、血清蛋白結合量及び結合部位に種差が確認されたものの、共通した置換効果が認められたことから、マウス・ラットを用いた結合置換効果の検討が可能であると考えられた。

I. はじめに

脳機能を診断するためには、脳における様々な代謝機能を画像化し、定量的に解析する必要がある。神経伝達物質であるセロトニンの生合成前駆体、5-hydroxy-L-tryptophan (HTP)の放射性ヨウ素標識化合物を用いることにより、セロトニン生合成代謝機能を反映した核医学診断画像が得られると期待される。HTP などのインドール環を有するアミノ酸は一般に酸化されやすい¹⁾ことから、そのヨウ素標識には一般的なクロラミン-T法やヨードゲン法のような直接酸化法を用いることはできない。これまでに、folmyl 化した HTP の標識は直接酸化法で可能であることを確認している。しかし、folmyl 化・脱 folmyl 化の作業に時間や手間がかかるため、本研究では酸化剤を HTP に直接接触させない方法である transfer 法を新たに考案し、HTP を誘導化せずに 1 step で放射性ヨウ素標識することを試みた。

一方、tryptophan (Trp)誘導体は血清蛋白への結合が強く²⁾、脳集積が損なわれると予想されるため、蛋白結合置換の可能性を検討した。

II. 実験方法

1. HTP の ¹²⁵I 標識

Fig.1 のようなナノセップを用い、Na¹²⁵I と水に不溶な酸化剤を固体のままフィルターカップに入れ、一定時間酸化させた。その後、ナノセップを遠心分離し、酸化された ¹²⁵I だけをチューブへ移行させることで、予めチューブに加えておいた基質と反応させた。この時、酸化剤は水に不溶であるためフィルターカップに残っている。このように酸化剤と基質が直接接触することなく標識する方法を本研究では transfer 法とした。

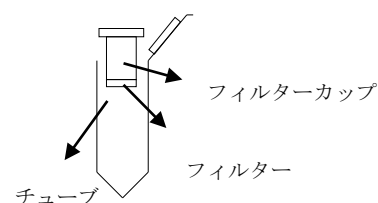


Fig.1 ナノセップ

Iodo-gen (ピアスケミカル)2mg と 0.05M リン酸緩衝液(PB, pH6.5)40 μ l をナノセップ(Genetics)のフィルターカップに入れて攪拌し、遠心分離機(Tomy: RLX-135)を用いて 2000rpm で 1 分間遠心分離して洗液をフィルターカップより除去した。0.4M PB (pH6.5)に HTP (Nacalai tesque) 2.56mg (5mM) を溶かした基質溶液 10 μ l を予め入れたチューブに交換すると共に、フィルターカップには Na¹²⁵I (7.98MBq, Amersham:IMS30)を含む 0.4M PB (pH6.5) 40 μ l を加えて攪拌し、遠心分離機を用いて 5000rpm で 5 分間遠心分離した。さらに、フィルターに残っている ¹²⁵I を洗うため、0.4M PB (pH6.5) 40 μ l を加え、同様の操作を行なった。10 分後に 0.4M PB (pH6.5)に飽和させたピロ亜硫酸ナトリウム溶液 10 μ l で反応を停止させた。

比較のためクロラミン-T 法も行なった。Transfer 法と同様に調製した基質溶液 20 μ l に 0.4M PB (pH6.5)で希釈した Na¹²⁵I (3.12MBq, Amersham: IMS30) 10 μ l と、クロラミン-T (Nacalai tesque) 2.82mg (5mM)を 0.4M PB (pH6.5)に溶解した溶液 20 μ l を加えて攪拌し、10 分間反応させた。その後、ピロ亜硫酸ナトリウム飽和溶液 10 μ l を加えて反応を停止させた。

精製は Sep-pak C-18 カートリッジ(Waters)で行なった。予め、コンディショニングを行なったカートリッジに反応液を加え、リン酸緩衝生理液(pH7.4)を充分に通水して未標識 HTP と NaI を洗浄した。その後、20%エタノールにて標識体を溶出した。この標識体の評価には以下の溶媒系によるシリカゲル薄層クロマトグラフィー(TLC, Merck: Art.5554)を用いた。

メタノール：10%酢酸アンモニウム=10：1 (Rf 値 HTP=0.50~0.55、¹²⁵I⁻=0.80)

クロロホルム：メタノール：酢酸=75：25：1 (Rf 値 HTP=0、¹²⁵I⁻=0.30~0.35)

ブタノール：酢酸：水=4：1：1 (Rf 値 HTP=0.35~0.40、¹²⁵I⁻=0.70~0.75)

2. 蛋白結合置換の検討

個人血清を HSA 濃度が 500 μ M になるように 1/15M PB (pH7.4)を用いて希釈した。置換薬として HSA site I に関しては furosemide (FSD, Sigma) 7.14mg、HSA site II に関しては ibuprofen (IPF, 科研製薬) 4.46mg、AGP に関しては propranolol (PPL, Nacalai tesque) 6.39mg、erythromycin (ERC, ダイナボット) 23.59mg を生理食塩水で溶解し、最終濃度が 400 μ M になるように添加した。置換薬負荷実験にはマウス・ラット・ヒト血清の 3 種類を用いた。それぞれの血清 200 μ l に置換薬各々を 8 μ l、[3-¹⁴C]-L-tryptophan (室町薬品:ARC-254)及び[4-³H]-L-propranolol (NEN Life Science Products: NET-515)を 4 μ l ずつ加えて攪拌し、その混液から 20 μ l をチューブに取り、放射能 [S] を測定した。この混液を限外濾過器(Tosoh: ULTRACENT-10)に移し、遠心分離機を用いて 3000rpm で 10 分間遠心分離した。遠心後濾液から 20 μ l 取り、放射能 [F] を測定した。放射能の測定には液体シンチレーションカウンタ(Aloka: LSC-5100)、シンチレータとして ACS II (Amersham)を使用した。

遊離率、置換率は以下の式により算出した。

$$\text{遊離率} = [F] / [S] \times 100 (\%)$$

$$\text{置換率} = \text{置換薬負荷時の遊離率} / \text{無負荷時(control)の遊離率}$$

これらの結果より、それぞれの血清における血清蛋白結合量及び結合部位を確認した。

III. 結果と考察

1. HTP の ^{125}I 標識

クロラミン-T 法の反応過程では基質が着色し HTP の変性が示唆されたが、transfer 法では基質の着色は認められなかった。このことは本法の特徴である酸化剤と基質を直接接触させないという点が有効であったと考えられる。

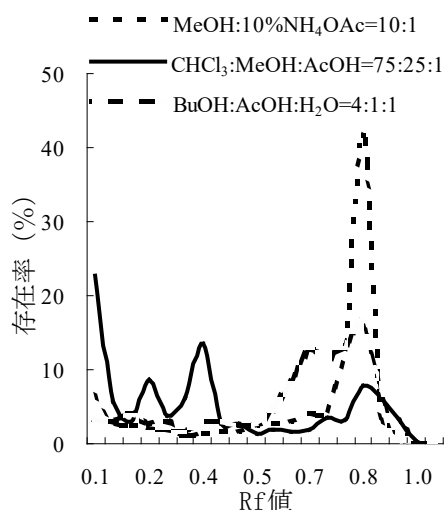


Fig.2 TLC プロファイル (free I)

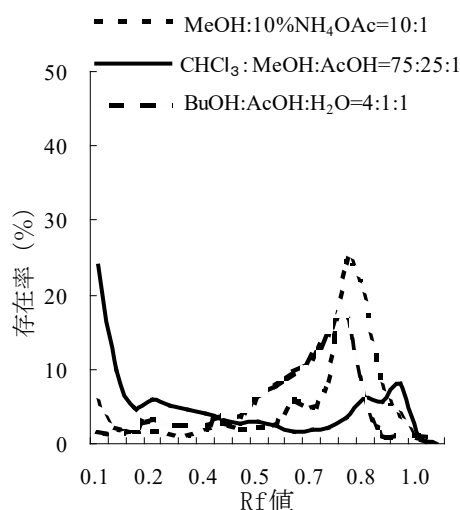


Fig.3 TLC プロファイル (精製後)

TLC 評価の結果は Fig.2 に free I について、Fig.3 に標識後 20%エタノールで精製したものについて示した。メタノール：10%酢酸アンモニウム=10：1 では標識体と free I の Rf 値が重なっており、分離することはできなかった。クロロホルム：メタノール：酢酸=75：25：1 では原点吸着が起こり、ピークのテーリングが大きかったため、分析に適さなかった。ブタノール：酢酸：水=4：1：1 である組成では原料とやや異なる Rf 値にピークが認められ、標識体と free I 分離の可能性が得られた。今後、さらに展開溶媒の検討を進め、transfer 法及び Sep-pak 精製に関して定量的に評価する必要がある。

2. 蛋白結合置換の検討

Table.1 に今回用いた置換薬の血清蛋白結合部位を示した。

Table.1 置換薬の血清蛋白結合部位

結合部位	HSA site I	HSA site II	AGP
置換薬	FSD	IPF	PPL ERC

Fig.4、Fig.5 に示したものはマウス・ラット・ヒト血清について、用いた置換薬に対する標識体の遊離率である。 ^{14}C -Trp・ ^3H -PPL ともヒト血清 control での遊離率は 10%未満すなわち結合率 90%以上で、非常に強く血清蛋白に結合していることが判明した。それに対し、マウス・ラット血清では ^{14}C -Trp において 40%近くの遊離率があり、ヒトに比べて結合が弱いことが確認された。 ^{14}C -Trp に関しては、control に限らず置換薬負荷時の遊離率にもヒトとマウス・ラットとの間に大きな差があり、血清蛋白結合量に種差が認められた。

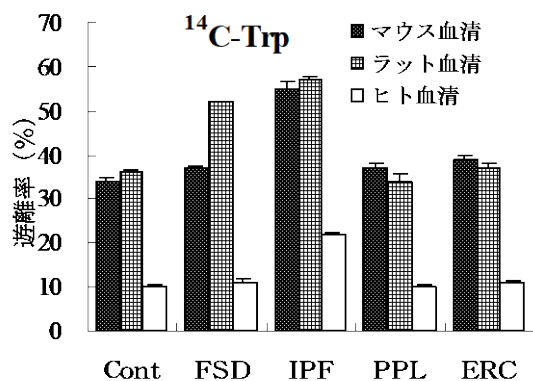


Fig.4 標識体 ¹⁴C-Trp に対する遊離率

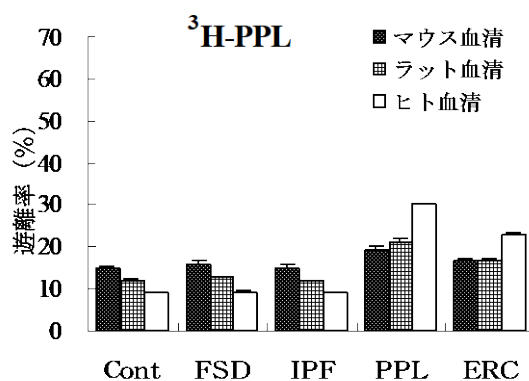


Fig.5 標識体 ³H-PPL に対する遊離率

マウス・ラット・ヒト血清について、各置換薬に対する標識体の置換率を Fig.6、Fig.7 に示した。ヒト血清において AGP に結合する ³H-PPL に関して、置換効果が認められた置換薬は同じ結合部位を持つ PPL と ERS であった。これはヒト血清で置換効果が特に大きく、マウス・ラット血清と差があった。¹⁴C-Trp に関しては、置換効果があったのは結合部位 HSA site II の IPF であった。このことはマウス・ラット・ヒト血清に共通して確認された。IPF による置換率はヒト血清で 2.27 ± 0.06 倍と顕著であるが、マウス血清において 1.46 ± 0.04 倍、ラット血清でも 1.60 ± 0.02 倍であり、マウス・ラット血清についても十分な置換効果が得られた。ラット血清では結合部位が HSA site I の FSD にも有意な置換効果が観察され、結合部位についても種差が認められた。

以上の結果から、血清蛋白に種差が認められるものの、¹⁴C-Trp に関しては IPF で共通して十分な置換効果が認められ、マウス・ラットを用いた結合置換効果の検討が可能であると考えられた。

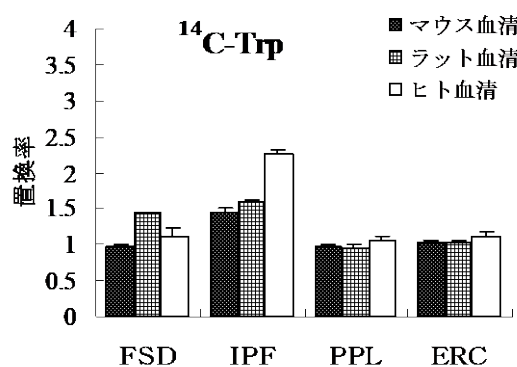


Fig.6 標識体 ¹⁴C-Trp に対する置換率

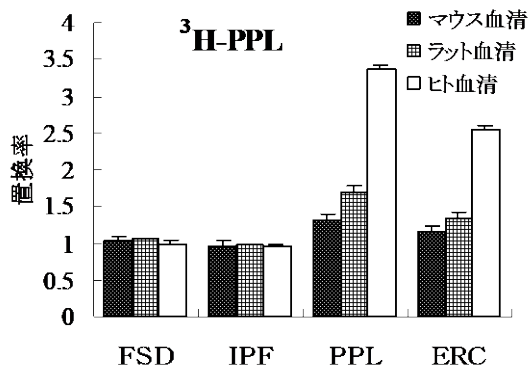


Fig.7 標識体 ³H-PPL に対する置換率

謝辞

本実験を行なうに当たり、ご指導下さいました川井恵一教授、吉本光喜助手、ご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝いたします。

IV. 参考文献

- 1) Hunt S. Dedradation of Amino Acids Accompanying in vitro Protein Hydrolysis. In *Chemistry and Biochemistry of the Amino Asids*. Ed.Barrett G.C., pp.383-388, 1985.
- 2) Stewart K.K., Doherty R.F. Resolution of DL-Tryptophan by Affinity Chromatography on Bovine-Serum Albumin-Agarose Columns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 70(10): 2850-2852, 1973.