

0321 酵素阻害剤を母体とする脳内神経伝達機能診断薬の開発

00-104 石田 恭子

(指導教官：川井 恵一教授 吉本 光喜助手)

要旨：本研究室では、脳内神経伝達機能診断薬の開発において、脳内神経終末に取り込まれたアミノ酸を、神経伝達物質に変換する際の最終酵素である芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)に注目してきた。中枢性の AADC 阻害剤である 3-hydroxybenzylhydrazine (NSD-1015)を標識母体化合物に選択し、そのヨウ素標識体(^{125}I -HBH)の評価を試みてきたが、 ^{125}I -HBH の安定性の低さが最大の課題であった。本研究では、クロラミン T 法によるヨウ素標識において、85%以上の標識率が得られ、HPLC にて精製した結果、高純度の ^{125}I -HBH を得た。精製後の ^{125}I -HBH の安定性は、これまでの標識・精製法に比べて顕著に改善した。次に、ヒト・ラット・マウスの血清を用いて、蛋白結合率を検討したところ、どの血清でも結合率は低かった。また、分配係数の測定の結果、 ^{125}I -HBH の脳移行に対する適度な脂溶性も確認できた。マウス体内分布実験を行った結果、投与初期の脳に高い集積が見られ、その中でもドーパミン作働性神経系の多い線条体への集積が高かった。加えて、AADC 阻害剤負荷マウスでは、線条体の集積が顕著に低下した。よって ^{125}I -HBH は脳内神経伝達物質生合成機能の診断薬として、高い可能性を有するものと考えられた。

I. はじめに

近年、精神疾患や痴呆と脳内物質代謝との関連が注目されている。中でもアミノ酸は、血液脳関門を特異的に透過し、能動輸送機構により脳細胞内に積極的に取り込まれ、脳内神経伝達物質の生合成原料となる点で重要である。本研究室では、脳内神経伝達機能診断薬の開発において、脳内神経終末に取り込まれたアミノ酸を、神経伝達物質に変換する際の最終酵素である芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)に注目してきた¹⁻⁴⁾。中枢性の AADC 阻害剤である 3-hydroxybenzylhydrazine⁵⁾ (NSD-1015, Aldrich、標識原料としては以下 HBH)を標識母体化合物に選択し、そのヨウ素標識体(^{125}I -HBH)の評価を試みてきたが、 ^{125}I -HBH の安定性の低さが最大の課題であった。そこで本研究では ^{125}I -HBH の安定性を獲得すること、またマウスでの体内挙動の検討を行い、脳内神経伝達機能診断薬としての ^{125}I -HBH の可能性を模索することを目的とした。

II. 実験材料と方法

A. ^{125}I -HBH の標識・精製と安定性評価

HBH をメタノール(Nacalai tesque)に溶かし(1.0×10^{-8} mol/20 μ l)、 Na^{125}I (Amersham, 113 μ Ci)、クロラミン T (Nacalai tesque, 2.0×10^{-8} mol/3 μ l)メタノール溶液を加えることで標識を開始した。反応開始 30 分後にピロ亜硫酸ナトリウム(Wako, 2.0×10^{-8} mol/2 μ l)水溶液を加え、反応を停止した。

精製は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)にて行った。以下の条件で HPLC により標識体と free I⁻、非放射性夾雑物の分離と精製を同時に行った。

カラム：5C18-MS(4.6 \times 250mm ; Nacalai tesque)

溶 媒：超純水：エタノール=55：45

流 速：1.0ml/min

検 出： γ 線、UV(274nm)

^{125}I -HBH の標識率、放射化学的純度は、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)を用いて確認した。また、安定性を評価するため、純度検定を 1 週間行った。

アセトン：ヘキサン=1：1 (Rf 値 HBH=0.3~0.4 ^{125}I =origin)

B. 分配係数、蛋白結合率の測定

(a) 分配係数の測定⁶⁾

油層に n-octanol(Nacalai tesque)、水層に 0.1M リン酸緩衝液を 2.0ml ずつ用いて ¹²⁵I-HBH の分配係数を測定した。その際、水層を脳や脾臓等の組織内 pH が低い組織、および、血液の指標としてそれぞれ pH7.0、pH7.4 とした。予め、油層と水層を 1 分間ずつ 2 回、室温で激しく vortex mixer (Vision:KMC-1300V)にて攪拌した。HPLC 精製後、液体窒素にて溶媒よりエタノールを留去した ¹²⁵I-HBH 水溶液を 20μl 加え、さらに 1 分間ずつ 2 回室温で激しく攪拌した後、遠心分離機(Tomy: RLX-135)を用いて、3000rpm で 10 分間遠心分離した。その後、各層をチューブに取り、オートウェルガンマカウンタ(Aloka:ARC-380)にて放射能を測定した。分配係数は以下の式により算出した。

$$\text{Log}(n\text{-octanol}/0.1\text{M phosphate buffer})$$

(b) ヒト・ラット・マウス血清における蛋白結合率の測定

ヒト血清(Cosmo Bio:Lot 13809)を 1/15M リン酸緩衝液(pH7.4)を用いて、アルブミン濃度の分析値より、アルブミン濃度 500μM に希釈した。ラット、マウスの血清は、希釈せずに使用した。HPLC 精製後、液体窒素にて溶媒よりエタノールを留去した ¹²⁵I-HBH 水溶液 16μl を各血清 200μl に加えて混和し、そこから 20μl を [S]として分取した。残りの溶液から 200μl を限外濾過器 (Tosoh:Minicent-10)に入れ、遠心分離機を用いて、3000rpm で 10 分間遠心分離した。この濾液から [F]として 20μl を分取した。[S]と [F]の放射能をオートウェルガンマカウンタにて計測し、以下の式から蛋白結合率を算出した。

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

$$\text{蛋白結合率}[\%] = 100 - \text{血中遊離率}[\%]$$

C. マウス体内挙動の検討

(a) 正常マウス体内分布

¹²⁵I-HBH(37kBq/100μl)生理食塩溶液をマウス(ddY 雄 6 週齢)に尾静脈注射し、一定時間(2、5、10、15、30 分)後に心臓採血して屠殺した。その後臓器を摘出し、湿重量を秤量した後、血液及び各臓器の放射能をオートウェルガンマカウンタにて測定した。体内分布の検討には、以下の式を用いて算出した組織集積率、および重量集積率を用いた。

$$\text{組織集積率}[\%ID/\text{organ}] = \text{組織放射能}[\text{cpm}] / \text{投与放射能}[\text{cpm}] \times 100$$

$$\text{重量集積率}[\%ID/\text{g}] = \text{組織集積率}[\%ID/\text{organ}] / \text{組織重量}[\text{g}]$$

(b) 阻害剤負荷マウス体内分布

¹²⁵I-HBH の脳への集積機序を検討するため、中枢性の AADC 阻害剤として NSD-1015 および α-difluoromethyl dopa(DFMD)をマウス(ddY 雄 6 週齢)に 50mg/kg 前処置し、30 分後に ¹²⁵I-HBH (37kBq/100μl)生理食塩溶液を尾静脈注射した⁴⁾。2 分後に心臓採血して屠殺し、その後臓器を摘出、湿重量を秤量した後、血液及び各臓器の放射能をオートウェルガンマカウンタにて測定した。体内分布の検討には、上記の式を用いて算出した組織集積率、および重量集積率を用いた。

III. 結果と考察

A. ¹²⁵I-HBH の標識・精製と安定性評価

Chloramine-T 法により標識した結果、標識率 85%以上の高い標識率で ¹²⁵I-HBH を得た。HPLC 分離により、リテンションタイム 1~3 分に未反応の遊離のヨウ素が約 13%、11~13 分に ¹²⁵I-HBH が約 87%の割合で生成した。¹²⁵I-HBH のピークを分取した結果、未反応の遊離のヨウ素との分離以外に、標識原料、Chloramine-T といった非放射性夾雑物との分離が確認され、純度 98%以上と高い放射化学的純度の ¹²⁵I-HBH を得ることができた。

安定性の評価のために行った純度検定の結果を Fig.1 に示す。精製直後の状態で保存したものを

エタノール中保存、精製直後に液体窒素にて、溶媒よりエタノールを留去した状態で保存したものを超純水中保存と表示した。本研究室でのこれまでの結果と比較するために、標識直後の状態で保存したものをメタノール中保存、標識後に溶媒よりメタノールを留去したものを生理食塩水中保存として表示した。HPLC 精製によって、安定性が顕著に改善されていることがわかる。また、HPLC の移動相にエタノールを用いたことにより、分取後溶媒交換せずに保存しても、標識後3日間は90%以上の放射化学的純度を保つことができた。

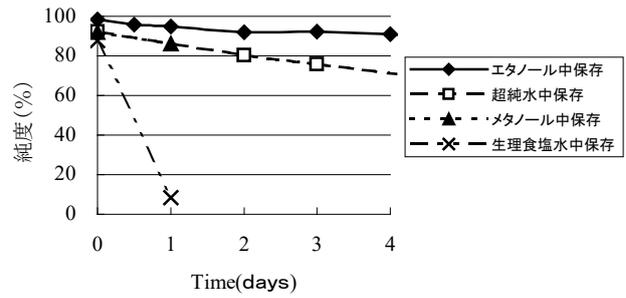


Fig.1 ¹²⁵I-HBH の安定性評価

B. 分配係数、蛋白結合率の測定

(a) 分配係数の測定

¹²⁵I-HBH の分配係数を Table.1 に示す。¹²⁵I-HBH には、脂溶性の脳指向性脳機能診断薬である ¹²³I-IMP に匹敵する、高い脂溶性があることがわかった。また、pH7.0 と pH7.4 で、¹²³I-IMP に見られるような分配係数の違いは観察されなかった。

(b) ヒト・ラット・マウス血清における蛋白結合率の測定

¹²⁵I-HBH のヒト、ラット、マウス血清における蛋白結合率を Table.2 に示す。血中の蛋白結合率が70%程度を超えると、臓器への集積に影響を及ぼすことが経験的に分かっているが、¹²⁵I-HBH の蛋白結合率は、どの血清においてもそれ以下であり、臓器への集積に影響を及ぼさない程度の低い蛋白結合率であることが確認された。

Table.1 ¹²⁵I-HBH の分配係数

	pH7.0	pH7.4
¹²⁵ I-HBH	0.63±0.10	0.57±0.09
¹²³ I-IMP	0.72±0.03	0.94±0.01

Table.2 ¹²⁵I-HBH の血清蛋白結合率

	結合率
ヒト	54.7±1.82
ラット	5.81±0.46
マウス	4.83±0.62

C. マウス体内挙動の検討

(a) 正常マウス体内分布

Fig.2 に ¹²⁵I-HBH の体内分布、Fig.3 に脳内分布を示す。

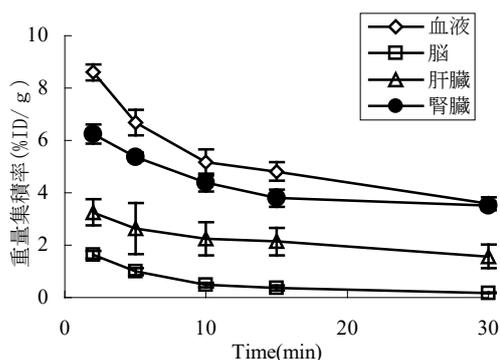


Fig.2 ¹²⁵I-HBH の体内分布

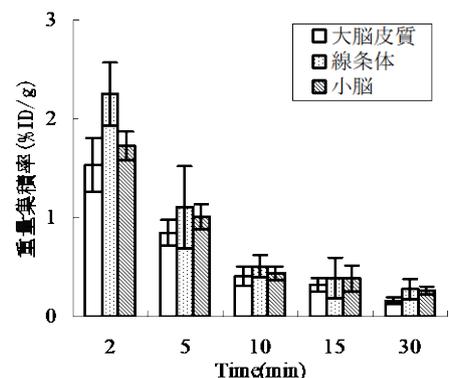


Fig.3 ¹²⁵I-HBH の脳内分布

どの臓器においても投与後早期に高い集積を示し、その後速やかに排泄された。脳内分布では、大脳皮質や小脳への集積に比べ、投与初期に全脳ドーパミン量の 80%にあたるドーパミンが含まれている線条体⁷⁾への集積が高いことが示された。

(b) 阻害剤負荷マウス体内分布

今回は、正常マウス体内分布において脳への集積が高かった 2 分でのみ検討を行った。Fig.4 に正常マウスの重量集積率をコントロールとして、各阻害剤負荷マウスの重量集積率との比を示す。いずれの阻害剤においても、大脳皮質、小脳に比べ、線条体への集積の低下が大きく、線条体の集積低下はコントロール群に対して有意($p < 0.05$)であった。脳の中でも特にドーパミン作働性神経系の多い線条体への集積が、中枢性の AADC 阻害剤の負荷によって低下したことから、¹²⁵I-HBH の脳への集積が AADC 活性の指標になると考えられた。

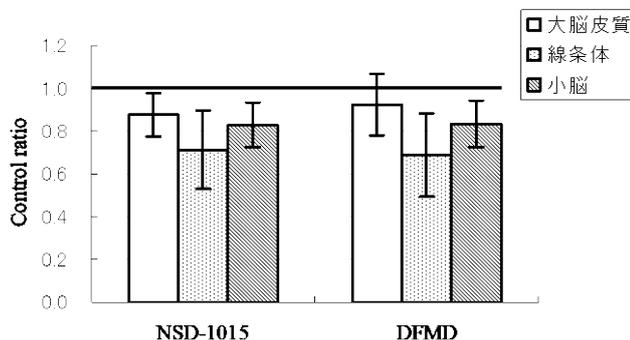


Fig.4 阻害剤負荷マウス ¹²⁵I-HBH の脳内分布

以上より、¹²⁵I-HBH は脳内神経伝達機能診断薬として高い可能性を有する薬剤であると考えられる。

IV. 結語

HPLC 精製によって、標識後 3 日間は放射化学的純度 90%以上を保つことができ、実用に支障の無い程度の期間 ¹²⁵I-HBH の安定性を獲得することができた。マウス体内分布において、¹²⁵I-HBH が脳、特に線条体に高く集積し、その集積が AADC 阻害剤負荷によって有意に低下したことから、¹²⁵I-HBH の集積が、中枢性の AADC 活性の指標になると考えられた。以上より、¹²⁵I-HBH は脳内神経伝達機能診断薬として高い可能性を有する薬剤であると考えられる。

謝辞

本研究を終えるにあたり、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致します。

V. 参考文献

- 1) K. Kawai, H. Kodama, Y. Fujibayashi, A. Kubodera, H. Saji and A. Yokoyama. "Evaluation of 3-iodo- α -(difluoromethyl)tyrosine as an amino acid decarboxylase marker in the brain." *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1997; **40**: 698-700.
- 2) K. Kawai, H. Kodama, Y. Fujibayashi, A. Kubodera, H. Saji and A. Yokoyama. "Is 3-iodo-DFMT useful as an amino acid decarboxylase marker in the brain ?" *Recent Advances in Biomedical Imaging*: Eds. Y. Ishii, Y. Yonekura, Y. Fujibayashi and N. Sadato, 1997; pp209-216.
- 3) K. Kawai, H. Kodama, S. Jinnouchi, S. Nagamachi, A. Kubodera and K. Watanabe. "3-[¹²³I]Iodo- α -(difluoromethyl)tyrosine methyl ester, a new radiopharmaceutical for amino acid decarboxylase measurement." *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1997; **40**: 701-703.
- 4) L.G. Flores II, K. Kawai, M. Nakagawa, N. Shikano, S. Jinnouchi, S. Tamura, K. Watanabe and A. Kubodera. "A new radiopharmaceutical for the cerebral dopaminergic presynaptic function: 6-radiiodinated L-*meta*-tyrosine." *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2000; **20**: 207-212.
- 5) Y.L. Slow and K. Dakshinamurti. "Neuronal dopa decarboxylase." *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1990; **585**: 173-188.
- 6) K. Kawai, L.G. Flores II, M. Nakagawa, N. Shikano, S. Jinnouchi, S. Tamura and A. Kubodera. "Brain uptake of iodinated L-*meta*-tyrosine, a metabolically stable amino acid derivative." *Nuclear Medicine Communications*, 1999; **20**: 153-157.
- 7) 栗山欣弥, 北川晴雄 編集 "生化学的観点からみた薬理学" 理工学社, 1981; pp.204-225.