

要旨：脳神経機能診断薬である ^{123}I -iomazenil(IMZ)は中枢性ベンゾジアゼピン受容体(BZR)に特異的に結合する性質をもつため、受容体に結合していない遊離体の脳からのクリアランスの促進が、検査時間短縮につながると期待される。本研究では ^{123}I -IMZ の排泄を促進させることで遊離体の脳からのクリアランスも促進させることを目的とし、血清蛋白結合置換を試みた。まずヒト血清で ^{123}I -IMZ の蛋白結合性と結合部位を検討したところ、高い結合率を示し、ヒト血清アルブミン(HSA) site II に結合していることが認められた。そこで、HSA site II への結合性が確認されている臨床薬のうちで、薬効が少なく安全性が高いものを置換薬として、マウス血清における結合置換効果を検討した結果、6-methoxy-2-naphthylacetic acid(6MNA)による十分な置換効果が得られた。さらに、マウス体内分布において、6MNA 負荷マウスでは無負荷時に比べ、採血した血清中でも置換効果が認められ、脳を含む主要臓器で集積の低下がみられた。腎臓での顕著な集積低下からも排泄が促進した結果によると考えられた。特に脳からのクリアランスが促進したことから、より短時間で中枢性 BZR を反映した画像が得られる可能性が示唆された。

I. はじめに

本研究では血清蛋白結合置換による排泄促進を目的として、2004年6月に上市され、臨床で使用されている ^{123}I -iomazenil(IMZ)の検討を行うとともに、新規脳神経機能診断薬として以前から研究を進めている 5-hydroxy-L-tryptophan(HTP)の放射性ヨウ素標識化合物に関して、蛋白結合置換への応用を計画し、そのヨウ素標識法を検討した。

^{123}I -IMZ は中枢性ベンゾジアゼピン受容体(BZR)に特異的に結合する性質をもち、てんかん焦点のイメージング剤として使用されている。しかし、投与後早期には局所脳血流に従って脳内に分布するため、その放射能分布が中枢性 BZR への特異的結合を反映するのに約3時間かかる²⁾。一般に体内に投与された医薬品は、血清蛋白に結合しているために組織への移行性及び体外排泄性が妨げられている。そのため、高い蛋白結合性をもち血清蛋白の特異的部位で医薬品と競合して置換作用を示す薬剤を併用することにより、血清蛋白と結合していない遊離画分を増加させ、目的組織への移行性の向上をはかることができる。また、腎臓への移行性が向上すると排泄が促進し、その結果、血中遊離濃度が低下するため、組織にいったん移行した医薬品でも、結合などの特異的滞留機序をもたないものは血液中に再び移行する。つまり、 ^{123}I -IMZ の排泄を促進させることが、中枢性 BZR に結合していない ^{123}I -IMZ の脳からのクリアランスの促進、すなわち検査時間の短縮にもつながると考え、蛋白結合置換を試みた。

HTP は神経伝達物質であるセロトニンの生合成前駆体であり、放射性ヨウ素で標識することによりセロトニンの生合成代謝機能を反映した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ことから、そのヨウ素標識には直接酸化法を用いることができず、酸化方法の検討がなされてきた。一方、tryptophan 誘導体は血清蛋白への結合が強く、脳への移行性が妨げられる可能性が高い。そこで血清蛋白結合置換の応用を計画し、HTP を直接酸化剤に接触させない transfer 法による ^{125}I 標識の HTP の再評価を行うとともに、HTP のヨウ素標識法と高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による分離・精製法を検討した。

II. ^{123}I -IMZ の蛋白結合置換の検討

A. ヒト血清における結合性と結合部位の検討

a) 実験材料と方法

ヒトプール血清(Cosmo Bio : Lot 13809)を HSA 濃度が $500\mu\text{M}$ になるように $1/15\text{M}$ リン酸緩衝液(pH7.4)を用いて希釈した。結合サイトマーカーには、HSA site I に関しては warfarin、HSA site II に関しては diazepam、AGP に関しては propranolol、verapamil を用いた。血清 $750\mu\text{l}$ に ^{123}I -IMZ(日本メジフィジックス)の生理食塩水 $10\mu\text{l}$ と置換薬 $6\mu\text{l}$ (最終濃度 $400\mu\text{M}$)を加えて攪拌した。その混液から $10\mu\text{l}$ 分取して[S]とし、残りの血清 $150\mu\text{l}$ を限外濾過器(Tosoh : Ultracent-10)

に入れ、遠心分離機(Tomy : RLX135)を用い、室温、3000rpm で 10 分間遠心分離した。得られた濾液から 10 μ l 分取して[F]とした。[S]及び[F]の放射能をオートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-380)で測定し、以下に示す式から、遊離率および置換率を算出した。

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

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

b)結果と考察

Fig. 1 にヒト血清における遊離率を示す。control は置換薬の代わりに生理食塩水を加えたものである。control における遊離率から $^{123}\text{I-IMZ}$ が蛋白結合置換を引き起こすのに十分な結合率を示すことが認められた。また、HSA site II の結合サイトマーカーである diazepam を置換薬としたときの遊離率の増加が特に高いことから、 $^{123}\text{I-IMZ}$ が HSA site II に特異的に結合することが確認された。また diazepam の置換率も 1.18 と動態変化を引き起こすのに十分な値であった。

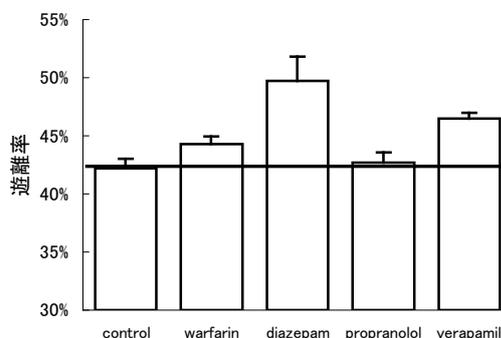


Fig.1 ヒト血清における $^{123}\text{I-IMZ}$ の遊離率

B. マウス及びラット血清における蛋白結合置換の検討

a)実験材料と方法

マウス及びラットから採血した血液を真空採血管(Sekisui Medical : SI-0402S)に入れ、遠心分離機を用い、室温、3000rpm で 10 分間遠心分離し、血清を得た。置換薬には臨床応用性を考慮し、HSA site II への結合性が確認されている臨床薬の中でも、薬効が少なく安全性が高い 6-methoxy-2-naphthylacetic acid(6MNA, SmithKline Beechem)、N-acetyl-L-tryptophan(NAT, Nacalai Tesque)及びより安全性の高い栄養素であるアミノ酸輸液 Proteamine12X(AAF, 田辺製薬)を用いた。それぞれの血清 500 μ l に $^{123}\text{I-IMZ}$ 、 $^{125}\text{I-IMP}$ (日本メジフィジックス)の生理食塩水 20 μ l と置換薬 20 μ l(最終濃度 400 μ M)を加えて攪拌した。その混液から 10 μ l 分取して[S]とし、残りの血清 150 μ l を限外濾過器に入れ、遠心分離した。得られた濾液から 10 μ l 分取して[F]とした。[S]及び[F]の放射能をオートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-380, ARC-1000M)で測定し、A. a)と同様に *in vitro* 血清における遊離率および置換率を算出した。

b)結果と考察

Fig.2, 3 に *in vitro* 血清における遊離率を示す。control は置換薬の代わりに生理食塩水を加えたものである。マウス及びラットいずれにおいても 6MNA を置換薬としたときの $^{123}\text{I-IMZ}$ の遊離率が高く、特にマウスにおいては置換率が 1.11 と十分な置換効果が認められた。また、 $^{125}\text{I-IMP}$ では 6MNA による置換効果はみられなかった。

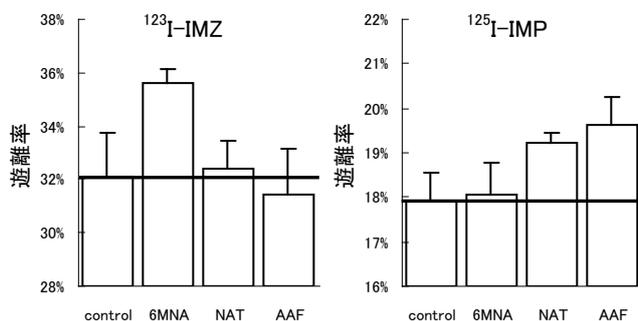


Fig.2 *In vitro* 血清(マウス)における遊離率

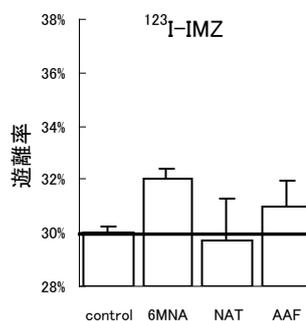


Fig.3 *In vitro* 血清(ラット)における遊離率

III. 6MNA を置換薬とした $^{123}\text{I-IMZ}$ マウス体内分布実験

a)実験材料と方法

マウス(ddY, 雄, 6 週齢)に $^{123}\text{I-IMZ}$ 、 $^{125}\text{I-IMP}$ とともに 6MNA 100 μ l (10mg/kg body weight) を尾静脈注射した。一定時間(5, 10, 15, 30, 60 分)後、エーテル麻酔下にヘパリン処理済み注射器で 300 μ l 心臓採血した。主要臓器を摘出し、湿重量を秤量した後、オートウェルガンマカウンタで血液とともに放射能を測定した。以下の式から、組織集積率および重量集積率を算出した。同時に、5 分後にヘパリン未処理注射器で採血した血液を用いて、II. B a)と同様にして、*in vivo*

血清における遊離率及び置換率を算出した。

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

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

b) 結果と考察

Fig.4に *in vivo* 血清における遊離率を示す。controlは置換薬の代わりに生理食塩水を負荷したものである。controlの遊離率は *in vitro* 血清に比べ増加し、結合率は低下していた。静脈内に投与された ^{123}I -IMZはヒト及びラットでは速やかに代謝されるため³⁾、マウスにおいても代謝が起こり結合率が低下したと考えられる。しかし6MNAを負荷したことにより遊離率が *in vivo* 血清で *in vitro* 血清の2倍近く増加したため、*in vitro* 血清と同程度の置換率が得られ、*in vivo* 血清でも結合置換が起こっていることが確認された。一方、 ^{125}I -IMPでは *in vivo* 血清においても、6MNA負荷による置換作用はみられなかった。

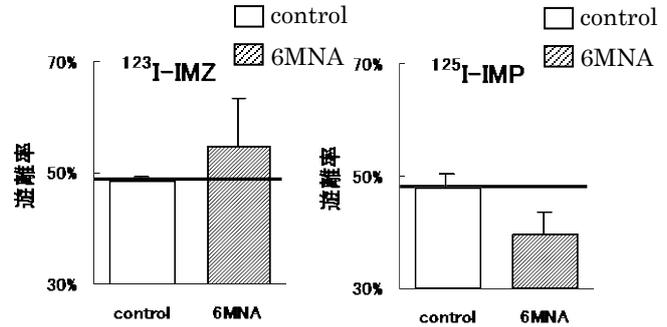


Fig.4 *In vivo* 血清における遊離率

Fig.5に ^{123}I -IMZの脳と腎臓における重量集積率を示す。脳、腎臓などの主要臓器で、controlに比べて6MNA負荷で集積率低下の傾向が認められた。特に腎臓での集積低下が顕著であり、これらは排泄が促進した結果であると考えられる。また脳への集積低下は、レセプターに特異的に結合していない ^{123}I -IMZのクリアランスによると考えられる。

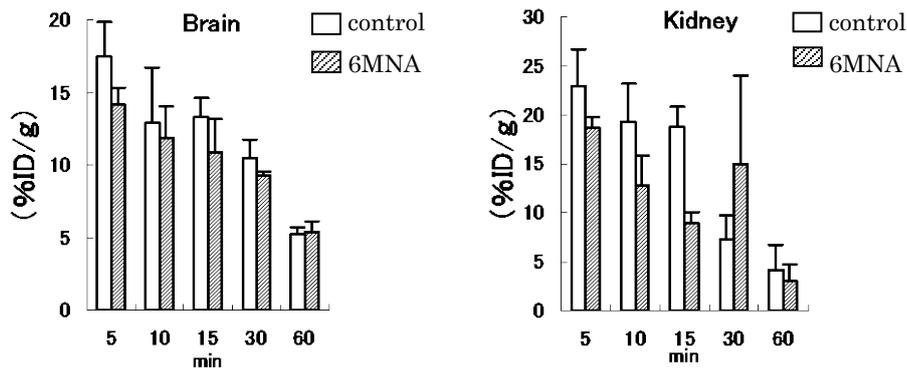


Fig.5 ^{123}I -IMZの重量集積率

Fig.6に各臓器のcontrolに対する6MNA負荷の重量集積率比を示す。 ^{123}I -IMZに比べ ^{125}I -IMPは1に近い値をとり、時間の経過にもなっても大きな変化を示さない傾向にあった。これは、6MNAを負荷したことにより、 ^{125}I -IMPの動態にあまり変化が認められなかったことを表す。このことから、 ^{123}I -IMZの動態変化は6MNAを負荷したことによる蛋白結合置換によるものと推測される。

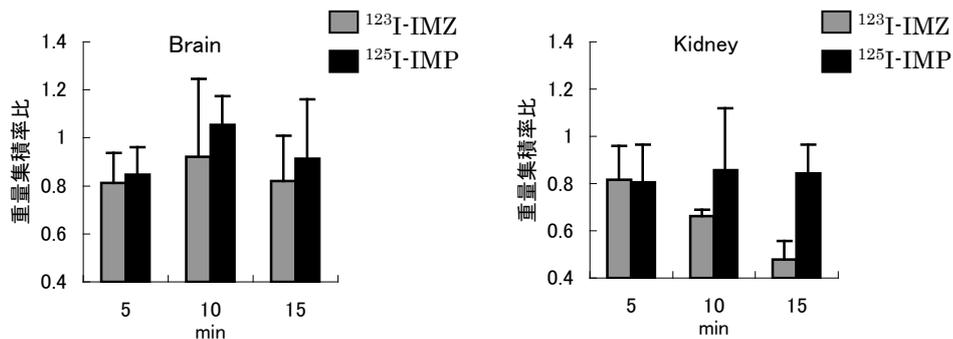


Fig.6 controlに対する6MNA負荷の ^{123}I -IMZの重量集積率比

Fig.7 に血液に対する脳の重量集積率の比を示す。6MNA を負荷したことによる大きな変化は認められなかった。ラットでは ^{123}I -IMZ の代謝物は脳へ移行せず、未変化体の ^{123}I -IMZ のみが血液-脳関門を通過し脳へ移行するとされている³⁾ことから、置換薬を負荷したことにより遊離率が増加しても代謝が進んでしまうため大きな変化がみられなかったと考えられる。

また ^{123}I -IMZ が中枢性 BZR の分布を反映するまでヒトでは約 3 時間かかることから、60 分以降の重量集積率の変化もさらに検討する必要がある。

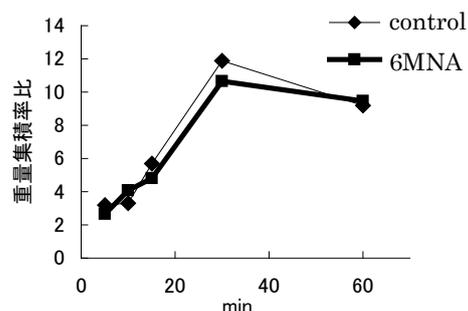


Fig.7 血液に対する脳の重量集積率比

IV. HTP の ^{125}I 標識の評価

a) 実験材料と方法

ナノセップ(Pall : ODM45C33)を用いた transfer 法により HTP を標識した。まず、Iodo-gen(Pierce Chemical)2mg と 0.05M リン酸緩衝液(PB, pH6.5)40 μl をナノセップのフィルターカップに入れて攪拌し、遠心分離機(Tomy : RLX135)を用いて室温、2000rpm で 1 分間遠心分離し、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)を溶かした基質溶液(5mM)10 μl を予め入れたナノセップのチューブに交換するとともに、フィルターカップには Na^{125}I (Amersham)を含む 0.4M PB(pH6.5) 40 μl を加えて攪拌し、遠心分離機を用いて室温、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 ^{125}I を洗うため 0.4M PB(pH6.5) 40 μl を加え、同様の操作を行った。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 μl で反応を停止させた。

標識体の評価は HPLC にて以下の条件で行った。

カラム : 5C₁₈-MS-II (4.6 \times 250mm, Nacalai Tesque)
 溶離液 : CH₃OH:50mM HCO₂NH₄=0:100(0 分)~20:80(20 分)
 流速 : 1.0ml/min
 検出 : γ 線、UV(278nm)

b) 結果と考察

HPLC 分離により、free I⁻ はリテンションタイム約 3 分に検出されたが、標識体のピークは認められなかった。標識原料は約 15 分に検出された。また、標識に用いたフィルターカップに ^{125}I がかなり残っていた。これらのことから、HTP の標識方法について再検討の必要性が示唆された。

V. 結語

^{123}I -IMZ の血清蛋白結合置換による排泄促進が可能であることが認められた。また、 ^{123}I -IMZ の脳でのクリアランスが促進したことから、より短時間で中枢性 BZR を反映した画像が得られる可能性が示唆された。臨床でも 6MNA のプロドラッグである nabumetone が経口薬剤として使用されているため、 ^{123}I -IMZ の置換薬としての応用により、検査時間の短縮が期待できると考えられる。

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。

VI. 参考文献

- Holl K, Deisenhammer E, Dauth J, Carmann H, Schubiger PA. Imaging benzodiazepine receptors in the human brain by single photon emission computed tomography (SPECT). Nucl Med Biol 16 : 759-763, 1989
- 米倉義晴, 西澤貞彦, 田中富美子, 石津浩一, 岡沢秀彦, 藤田透, 小西淳二, 鳥塚莞爾. 中枢性ベンゾジアゼピン受容体イメージング剤 ^{123}I -イオマゼニルの第 1 相臨床試験. 核医学 32:87-97, 1995
- 吉村弘一, 柳井明良, 松本博樹, 井田圭子, 倉見美規, 米倉義晴, 鳥塚莞爾. イオマゼニル(^{123}I)の薬物動態に関する検討. 核医学 32 : 1037-1043, 1995