

## 0517 腎アミノ酸トランスポーターによる競合作用を利用した放射性医薬品の体内動態制御

02-112 石澤 昌典

(指導教員：川井恵一 教授 吉本光喜 助手)

要旨：放射性医薬品の目的臓器への集積率は、医薬品の血中濃度に依存するが、腎排泄性の高い薬剤負荷により腎尿細管トランスポーターで競合阻害作用を誘発させ、腎排泄を一過性に抑制することで、血中濃度低下を遅延させることができる。本研究では、L-tyrosine 負荷により  $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin(TF)の心筋集積率の向上を見出した。本研究では、負荷に際しより制限の少ないアミノ酸を応用し、腎アミノ酸トランスポーターの競合作用を利用して  $^{99m}\text{Tc}$ -TF の目的臓器への集積率向上を試みた。

腎臓には様々なアミノ酸輸送系が存在するため、安全性の高い負荷剤としてアミノ酸を利用し、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF 及び  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -methyl-L-tyrosine(AMT)の動態変化をマウス体内分布実験により検証した。 $^{99m}\text{Tc}$ -TF は中性アミノ酸トランスポーター system L に親和性を有するアミノ酸負荷により、目的臓器である心筋集積率を効率よく向上させることができた。 $^{125}\text{I}$ -AMT においては、目的臓器のトランスポーターでも競合するため、集積率の向上はほとんどみられなかった。さらに、腎尿細管輸送機構の詳細な情報を得るため、ブタ近位尿細管株化細胞 LLC-PK<sub>1</sub> の単層膜を透過膜上に形成させ、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF の経細胞輸送に対する阻害実験を行った。その結果、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF の尿細管分泌には system L の寄与が大きいことが示され、本動態制御法の妥当性が裏付けられた。

### I. はじめに

放射性医薬品の目的臓器への集積率は、血中濃度に依存する。しかし、放射性医薬品は、投与後、腎臓より速やかに排泄されることにより血中濃度も低下する。一方、腎排泄性の高い薬剤負荷により腎尿細管トランスポーターで競合阻害作用を誘発させ、腎排泄を一過性に抑制することで、血中濃度低下を遅延させることができる。これまでの研究より、L-tyrosine(Tyr)負荷により、 $^{99m}\text{Tc}$ -tetrofosmin(TF)の心筋集積率向上を達成し得ることを報告した。よって、本研究では、溶解性や投与量に制限のあった Tyr に代わるより安全性の高いアミノ酸に着目し、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF の集積向上を図った。腎臓に多く発現している中性アミノ酸トランスポーターには system L や system A など複数存在するため、各々の輸送系に親和性を有するアミノ酸を負荷剤として利用し、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF 及びアミノ酸トランスポーターに高い親和性を示す  $^{125}\text{I}$ - $\alpha$ -methyl-L-tyrosine(AMT)の動態変化をマウス体内分布実験により検証した。さらに、腎尿細管輸送機構に関する詳細な情報を得る目的で、透過膜上に形成させたブタ近位尿細管株化細胞 LLC-PK<sub>1</sub> の単層膜を用いた経細胞輸送に対する阻害実験を行い、 $^{99m}\text{Tc}$ -TF の腎尿細管分泌に関与しているトランスポーターの解明を試みた。

### II. $^{99m}\text{Tc}$ -TF 及び $^{125}\text{I}$ -AMT の腎アミノ酸トランスポーター競合負荷剤による体内動態制御

種々の天然アミノ酸と  $^{99m}\text{Tc}$ -TF、 $^{125}\text{I}$ -AMT をマウスに同時投与し、腎尿細管における競合作用による  $^{99m}\text{Tc}$ -TF 及び  $^{125}\text{I}$ -AMT の動態変化をマウス体内分布実験により検証した。

#### (A) 実験材料と方法

中性アミノ酸トランスポーター system L に親和性を有する天然アミノ酸として L-tyrosine(Tyr、ペプチド研究所)、L-phenylalanine(Phe)及び L-leucine(Leu)、system A 親和性アミノ酸には L-alanine(Ala)及び glycine(Gly、以上協和醗酵工業)、また、アミノ酸輸液(AAF) (proteamin 12X 注射液; 田辺製薬)を負荷剤として選択した。

各負荷剤 (1.38 $\mu\text{mol}/\text{mouse}$ : Tyr 10.0mg/kg 相当量)と  $^{99m}\text{Tc}$ -TF (185kBq、日本メジフィジックス)、 $^{125}\text{I}$ -AMT(37kBq、Kawai らの方法<sup>1,2</sup>)にて標識を混合した生理食塩水溶液 100 $\mu\text{l}$  を、マウス(ddY 雄 6 週齢 体重約 25g)(n=4)に尾静脈より急速投与し、ダブルトレーサー法により検討した。負荷剤の

代わりに生理食塩水を負荷したものを control 群とした。10 分後、エーテル麻酔下、ヘパリン処理済注射器を用いて 300 $\mu$ l 心臓採血した。その後、臓器を摘出し、湿重量を秤量した。オートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-380)で測定エネルギーウインドウを  $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{125}\text{I}$  に設定し、血液及び臓器の放射能を測定した。測定終了後試料を冷凍保存し、数日後  $^{99m}\text{Tc}$  の減衰を待ってから  $^{125}\text{I}$ -AMT の放射能を再び測定した。また、system L に親和性を有する Tyr、Phe 及び Leu 負荷において、屠殺時間を 5、10、15、30 分とし、投与後の経時的变化も検討した。さらに、その中で有意な集積向上がみられた負荷剤において、負荷剤濃度の変化による投与条件の検討を行った。Phe、Leu 及び Ala について濃度を 4 ポイント(2.5、5.0、10.0、50.0mg/kg body weight)設定し、実験方法は上記と同様に行った。

各測定値より、次式に従い、重量集積率を算出した。また、control 群の重量集積率に対する負荷剤同時投与時の重量集積率の割合を、変化率として算出した。

$$\text{重量集積率}[\%ID/g] = \text{組織放射能}[\text{cpm}] / \text{投与放射能}[\text{cpm}] / \text{組織重量}[\text{g}] \times 100$$

$$\text{変化率} = \text{負荷剤同時投与時の重量集積率}[\%ID/g] / \text{control 群の重量集積率}[\%ID/g]$$

(B) 結果と考察

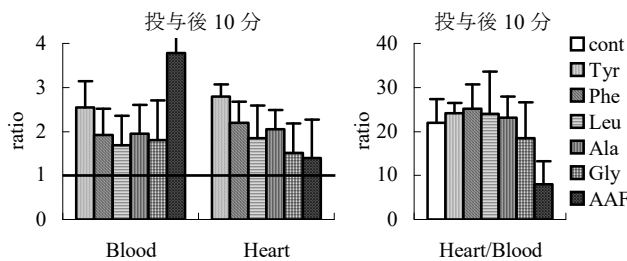


Fig.1  $^{99m}\text{Tc}$ -TF の control 群に対する変化率及び心臓対血液比

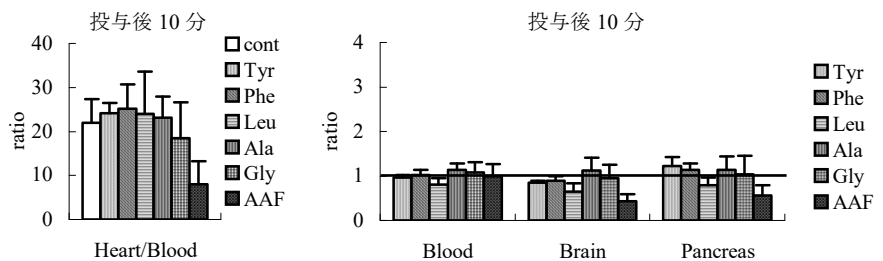


Fig.2  $^{125}\text{I}$ -AMT の control 群に対する変化率

Fig.1 に  $^{99m}\text{Tc}$ -TF と負荷剤同時投与後 10 分の control 群に対する変化率及び心臓対血液比を示した。血中濃度の上昇は AAF において最も顕著であったが、種々のアミノ酸が多量に含まれていることにより、心筋集積に対しフィードバックがかかったため、集積向上にはつながらなかったと推測される。その他のアミノ酸においては、血液、心臓ともに集積率向上がみられ、特に system L に親和性を有するアミノ酸及び Ala 負荷で心筋集積率が顕著に向上した。血中濃度は、control 群に対し Tyr 負荷で 2.5 倍、その他においてもおよそ 2 倍の向上がみられ、心臓でも 2~3 倍の向上が確認された。心臓対血液比においては、Gly 及び AAF を除くアミノ酸で上昇傾向が認められた。Fig.2 に  $^{125}\text{I}$ -AMT と負荷剤同時投与後 10 分の変化率を示した。膵臓で僅かな集積向上がみられるが、どれも有意な結果ではなく、目的臓器である脳や膵臓でも競合作用を起こした結果であると考えられる。他に有意な結果はみられなかったため、以後、 $^{125}\text{I}$ -AMT の結果は省略した。

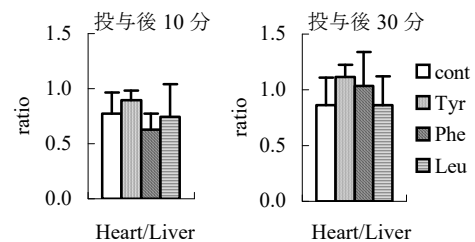
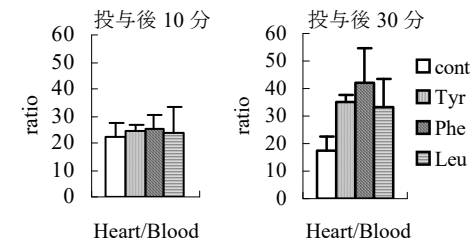
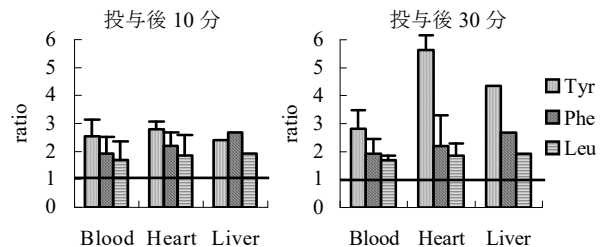


Fig.3  $^{99m}\text{Tc}$ -TF 投与後 10 分及び 30 分における変化率と心臓対血液比及び心臓対肝臓比

Fig.3 には  $^{99m}\text{Tc}$ -TF と負荷剤同時投与後 10 分及び 30 分の変化率と心臓対血液比及び心臓対肝臓比を示した。投与後 10 分における高い心筋集積率の上昇に対し、30 分ではさらに高い集積率を示し、Tyr 負荷では control 群に対し、5 倍以上に上昇した。

画像診断上問題となる対周辺組織比に関しては、心臓対血液比において投与後 10 分に比べ 30 分では大きく向上し、心臓対肝臓比においても投与後 10 分に比べ 30 分では Tyr 及び Phe 負荷で上昇がみられたことから、バックグラウンドの少ない、より鮮明な心筋画像の取得が可能となることが示された。

以上より、 $^{99m}\text{Tc-TF}$  は system L に親和性を有する Tyr、Leu、Phe、及び system A に親和性を有する Ala の併用で投与後早期から顕著に心筋集積率が向上した。また、system L に親和性を有するアミノ酸負荷では、投与後 30 分においても高い心筋集積率が保持され、その結果、対周辺組織比が一層向上した。一方、 $^{125}\text{I-AMT}$  は目的臓器においても競合作用を起こすことにより、腎排泄制御による脳や脾臓の集積率向上は認められなかった。これらより、負荷剤が目的臓器の心筋集積に影響を与えない腎尿細管トランスポーターを競合阻害することにより、 $^{99m}\text{Tc-TF}$  の心筋集積率向上を達成し得たものと考えられた。

Fig.4 は負荷剤濃度を変化させたときの血液及び心臓における変化率である。選択した濃度範囲内では集積率との間に相関性はみられず、より低濃度負荷でも十分な集積率向上が確認された。この検討において心筋集積率

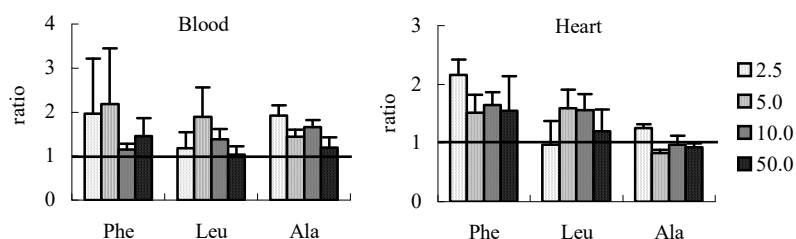


Fig.4  $^{99m}\text{Tc-TF}$  投与後 10 分における負荷剤濃度変化に対する変化率

が顕著に向上した Phe 負荷では、最も低濃度である 2.5mg/kg でおよそ 2 倍の向上となった。一方、Ala 負荷では血中濃度は上昇したものの、心筋集積率の向上は観察されなかった。

以上より、本研究の投与条件では、system L に親和性を有する Phe 及び Leu において低濃度負荷でもこれまでと同程度の効果が得られたことから、より少量の負荷で十分な集積率向上が可能となることが示された。

### III. ブタ近位尿細管株化細胞 LLC-PK<sub>1</sub> による $^{99m}\text{Tc-TF}$ の経細胞輸送阻害実験

$^{99m}\text{Tc-TF}$  の腎尿細管トランスポーターによる輸送機構のより詳細な情報を得るため、ブタ近位尿細管株化細胞 LLC-PK<sub>1</sub> の単層膜を透過膜上に形成させ、 $^{99m}\text{Tc-TF}$  の経細胞輸送に対する阻害実験を行い、各輸送系の寄与について検証を行った。

#### (A) 実験材料と方法

LLC-PK<sub>1</sub> の細胞培養及び実験方法は Shikano らの方法<sup>3)</sup>を一部改変して行った。

中性アミノ酸輸送系 system L の阻害剤として 2-amino-2-norbornane-carboxylic acid(BCH, Sigma)、L-Leu(協和醗酵工業)及び D-Leu(Nacalai tesque)、中性アミノ酸輸送系 system A の阻害剤として  $\alpha$ -(methylamino)isobutyric acid(MeAIB, Sigma)、L-Ala(協和醗酵工業)及び D-Ala(Nacalai tesque)、有機酸輸送系(OAT : organic anion transporter)阻害剤として probenecid(PBC, Sigma)、有機塩基輸送系(OCT : organic cation transporter)阻害剤として tetraethylammonium bromide(TEA, Nacalai tesque)を選択した。

透過膜上に LLC-PK<sub>1</sub> 単層膜を形成させ、細胞播種 4 日後に実験を行った。取り込み溶液は 137mM NaCl、3mM KCl、8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1mM CaCl<sub>2</sub> 及び 0.5mM MgCl<sub>2</sub> を含む Dulbecco's phosphate-buffered saline(pH7.4)を使用した。単層膜の両側の培養液を除いた後、2.0ml の取り込み溶液を両側に入れ、37°C、10 分間プレインキュベートした。次に  $^{99m}\text{Tc-TF}$ (185kBq)と各阻害剤を最終濃度が 1.0mM になるように基底膜側または刷子縁膜側に添加し、37°C、90 分間インキュベートした。トレーサー添加側の反対側より取り込み溶液を 50 $\mu$ l 採取し、オートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-380)で放射能を測定した。

## (B) 結果と考察

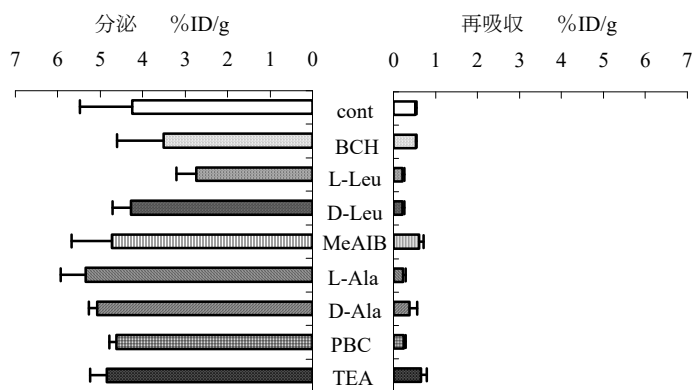


Fig.5 阻害剤負荷時における LLC-PK<sub>1</sub> 単層膜による経細胞輸送

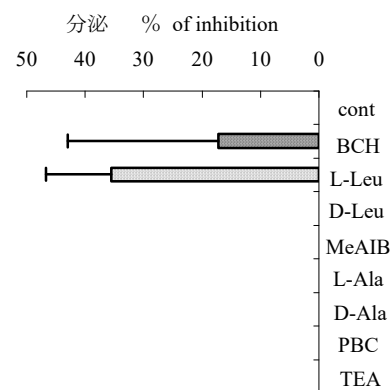


Fig.6 分泌における阻害率

Fig.5 に腎尿細管 LLC-PK<sub>1</sub> 単層膜における <sup>99m</sup>Tc-TF の経細胞輸送を示した。基底膜側から刷子縁膜側への輸送を分泌、刷子縁膜側から基底膜側への輸送を再吸収とした。これより、<sup>99m</sup>Tc-TF は分泌に比べ再吸収される割合は極僅かであることが確認された。Fig.6 に示した <sup>99m</sup>Tc-TF の腎尿細管分泌における阻害率より、system L に親和性を有する BCH 及び L-Leu のみで阻害されていることから、system L による寄与が大きいことが示された。また、system L に親和性を有するアミノ酸の PBC 感受性トランスポーターによる分泌が報告されている<sup>4)</sup>が、<sup>99m</sup>Tc-TF の腎尿細管分泌においては PBC による阻害が見出されないことから、これらのアミノ酸負荷による腎排泄抑制効果は、アミノ酸トランスポーター system L の競合作用によることが確認された。

## IV. 結語

マウス体内分布実験により、<sup>99m</sup>Tc-TF の心筋集積率向上にはアミノ酸トランスポーター system L に親和性を有する Tyr に加え、Phe や Leu の併用が効果的であることが示された。また、低濃度負荷によっても顕著な集積率向上が見出され、より安全な投与が可能となった。さらに、LLC-PK<sub>1</sub> 単層膜による経細胞輸送に対する阻害実験からも <sup>99m</sup>Tc-TF の腎尿細管分泌には system L の関与が確認され、上記動態制御法の妥当性を裏付ける結果が示された。

## V. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導下さいました川井恵一教授、吉本光喜助手、茨城県立医療大学鹿野直人先生、ご協力いただいた小野口昌久助教授、本研究室の方々に心より感謝いたします。

## VI. 参考文献

- 1) Kawai K., Fujibayashi Y., Saji H., Yonekura Y., Konishi J., Kubodera A., Yokoyama A. Strategy for the study of cerebral amino acid transport using <sup>123</sup>I-labeled amino acid radiopharmaceutical: 3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine. *J.Nucl.Med.* 32: 819-824, 1991.
- 2) Kawai K., Fujibayashi Y., Yonekura Y., Konishi J., Kubodera A., Yokoyama A. An artificial amino acid radiopharmaceutical for single photon emission computed tomographic study of pancreatic amino acid transports: <sup>123</sup>I-3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine. *Ann.Nucl.Med.* 6: 169-175, 1992.
- 3) Shikano N., Kawai K., Nakajima S., Kubodera A., Kubota N., Ishikawa N., Saji H. Transcellular transport of radioiodinated 3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine across monolayers kidney epithelial cell line LLC-PK<sub>1</sub>. *Ann.Nucl.Med.* 18: 227-234, 2004.
- 4) Shikano N., Kawai K., Nakajima S., Nishii R., Flores I.L.G., Kubodera A., Kubota N., Ishikawa N., Saji H. Renal accumulation and excretion of radioiodinated 3-iodo- $\alpha$ -methyl-L-tyrosine. *Ann.Nucl.Med.* 18: 263-270, 2004.