

要旨：現在、脳血流診断薬として使用されている ^{123}I -*N*-Isopropyl-*p*-iodo-amphetamine(IMP)は、血中で血清蛋白に結合しており、そのために脳への移行が妨げられている。そこで蛋白結合置換薬の併用により、血中遊離体が増加し、脳集積の向上や排泄促進などの効果が期待できる。本研究では、 ^{123}I -IMPが血中でヒト血清アルブミン(HSA)site IIのみならず、 α_1 -酸性糖蛋白(AGP)にも結合していることに着目し、安全性が高く臨床応用可能なAGP置換薬の探索を目的とした。ヒト血清を用いて、数種の置換薬における結合置換効果を検討したところ、roxithromycin及びerythromycinにおいて顕著な結合置換効果が確認され、臨床応用が期待された。しかし、体内分布実験を前提としてマウス血清を用いて評価したところ、種差により両置換薬とも十分な結合置換効果は認められなかった。

また、今回初めての試みとして血清蛋白結合促進効果についても検証を行った。薬効の少なく安全性の高い負荷剤として、種々のアミノ酸及びビタミンをスクリーニングした結果、5種類の有効な結合促進剤を見出した。*In vitro* 負荷実験による ^{125}I -IMPの結合率の変動から、特にvitamin Cにおいて顕著な結合促進効果がみられた。さらに、*in vivo*血清において、L-alanine負荷マウスでは無負荷時に比べ、投与後早期に結合促進効果が確認されたが、それ以外の主要臓器では目立った変化は認められず、今後、負荷条件の最適化が必要であると考えられた。

I. はじめに

一般に、体内に投与された医薬品の多くは血清蛋白に結合しているため、標的組織への効率的移行や体外排泄が妨げられている。そこで、高い蛋白結合性をもち、血清蛋白上の特異的結合部位において医薬品と競合置換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、標的組織への移行性向上をはかることができる¹⁻³⁾。本研究室ではこれまでに、ヒト血清アルブミン(HSA)に対する蛋白結合置換効果の検証を行ってきたが、 α_1 -酸性糖蛋白(AGP)の血中濃度が55~140mg/100mLとHSA血中濃度3500~5500mg/100mLに比べ、はるかに低い⁴⁾ことに着目し、少ない負荷量でより大きな置換効果が期待できると考え、AGP置換薬に注目した。一方、脳血流診断薬 ^{123}I -IMPは、ヒト血中においておよそ70%が血清蛋白に結合し、その特異的結合部位としてHSA site II及びAGP basic drug binding site(basic site)の2サイトが確認されている¹⁻³⁾。本研究室ではすでに、 ^{123}I -IMPのAGP置換薬としてverapamilが有効であることを見出しているが、verapamilは狭心症などの患者に用いる薬効性の高い薬剤であるため、置換薬として臨床的に用いることができない。そこで本研究では、安全性が高く臨床応用可能な ^{123}I -IMPのAGP置換薬の探索を目的として、蛋白結合置換効果を検討した。

また、今回初めての試みとして蛋白結合促進効果についても検証を行った。本研究では、特定の化合物を併用することにより血清蛋白結合を促進させることができれば、徐放性医薬品、すなわち、内容成分が徐々に放出され、効果が持続する薬剤において持続性を増大させることができるのではないかと考えた。そこで一般医薬品への適用を念頭に、安全性の観点より種々の栄養素の中から蛋白結合促進効果を引き起こす負荷剤を探索するとともに、放射性医薬品に対する結合動態を検証した。

II. ^{123}I -IMPのAGP置換薬の探索

A. Roxithromycin及びerythromycinの結合部位の検討

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 μM になるように、1/15M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、site IIに関してはそれぞれ ^{14}C -warfarin(WRF)、 ^{14}C -diazepam(DZP)(Amersham Pharmacia Biotech)、AGPに関しては

³H-propranolol(PPL, Perkin Elmer Life Sciences)、³H-verapamil(VPM, American Radiolabeled Chemicals)を用いた。置換薬には臨床応用性を考慮し、薬効が少なく安全性の高い roxithromycin(ROX)及び erythromycin(ERM, 大日本製薬)を用いた。血清 200 μ L に結合サイトマーカー8 μ L と置換薬8 μ L を加えて攪拌し、最終濃度を 400 μ M とした混液から 10 μ L 分取して[S]とした。残りの溶液から190 μ L を限外濾過器(Tosoh : Minicent)に入れ、遠心分離機(Tomy : RLX-135)を用いて、室温、3000rpm で 10 分間遠心分離した。遠心後、得られた濾液から 10 μ L 分取して[F]とした。[S]及び[F]の放射能を液体シンチレーションカウンタ(Aloka : LSC-5100)で測定し、以下の式により、遊離率及び変化率を算出した。

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

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

b)結果と考察

Fig.1 にヒト血清における変化率を示す。Control は置換薬の代わりに生理食塩水を加えたものである。ROX、ERM とともに、AGP 結合サイトマーカーである PPL 及び VPM に対する変化率が高いことから、両置換薬が AGP に多く結合することが認められた。特に、AGP basic site に結合性を有する PPL での変化率が ROX で 2.8、ERM で 1.6 と著しく高かった。また、WRF についても、これらの置換薬で変化率が有意に増加していることから、両置換薬が HSA site I に対しても結合することが確認された。

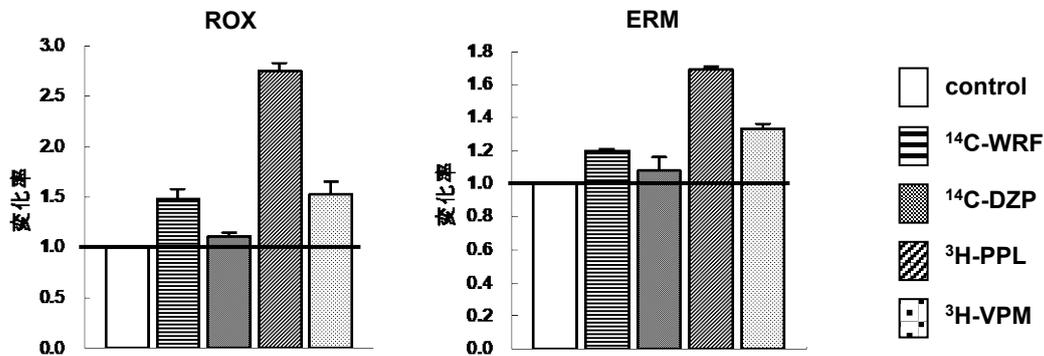


Fig.1 ROX 及び ERM における結合サイトマーカーに対する変化率

B. ヒト及びマウス血清における蛋白結合置換効果の検討

a)実験材料と方法

マウス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。また、ヒト血清については A.a)と同様に希釈したものを用いた。置換薬には ROX、ERM のほか、比較として HSA site II の結合置換薬である 6-methoxy-2-naphthylacetic acid(6MNA, Smith Kline Beechem)、N-acetyl-L-tryptophan (NAT, Nacalai Tesque)及び ibuprofen(IBP, 科研製薬)を用いた。なお、比較検討のため ¹²³I-iomazenil(IMZ)とのダブルトレーサ法とするため、¹²⁵I-IMP を用いた。それぞれの血清 200 μ L に ¹²³I-IMZ、¹²⁵I-IMP(日本メジフィジックス)の生理食塩水 8 μ L と置換薬8 μ L を加えて攪拌し、最終濃度を400 μ M に調製した。[S]及び[F]の放射能はオートウェルガンマカウンタ(Aloka : ARC-380, ARC-1000M)で測定し、A.a)と同様の方法で遊離率及び変化率を算出した。

b)結果と考察

Fig.2、3 にヒト及びマウスの *in vitro* 血清における変化率を示す。Control には置換薬の代わりに生理食塩水を加えた。ヒト血清では ¹²³I-IMZ で ROX、ERM による結合置換効果はみられなかったが、¹²⁵I-IMP では ROX 及び ERM による顕著な結合置換効果が認められ、臨床応用性が示唆された。しかし動物実験を前提としたマウス血清での検討では、変化率が ROX で 1.06、ERM で 1.08 と動態変化を引き起こすのに十分な値は得られなかった。血清蛋白結合には種差が報告されており³⁾、本結果においてもヒト血清に対してマウス血清での ¹²⁵I-IMP 蛋白結合率が低下していたため、蛋白結合置換が起こりにくかったものと推測された。

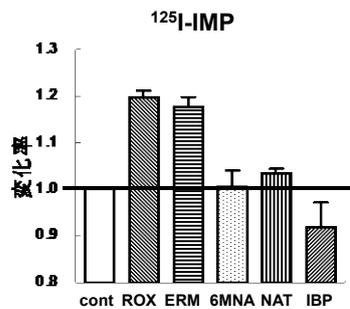


Fig.2 *In vitro* ヒト血清における変化率

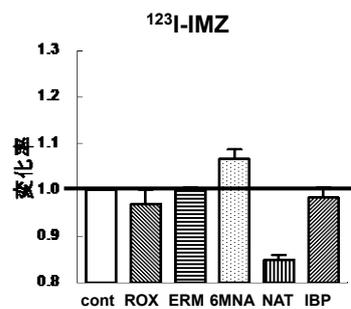
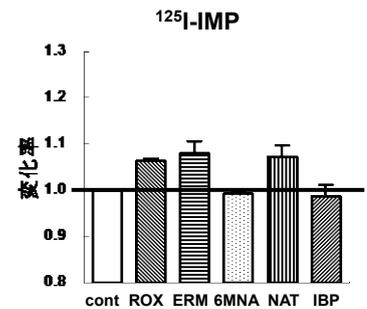


Fig.3 *In vitro* マウス血清における変化率



III. ¹²⁵I-IMP を用いた蛋白結合促進剤の探索

a) 実験材料と方法

ヒトプール血清(Cosmo Bio : Lot 13768)は1/15Mリン酸緩衝液(pH7.4)で HSA 濃度を500 μ Mに調製した。また、マウス血清はII .B.a)と同様の操作により得た。安全性の高い負荷剤として、種々のアミノ酸及びビタミンをスクリーニングした結果、L-alanine(協和醗酵工業)、vitamin B₅、vitamin B₆、vitamin B₁₂、vitamin C(以上 Sigma Chemical)の5種類を有効な結合促進剤の候補として見出し、今回の検討に用いた。トレーサとして¹⁴C-DZP、³H-PPL、¹²⁵I-IMP を用い、遊離率及び変化率をII .A.a)と同様、限外濾過法により算出した。

b) 結果と考察

Fig.4に HSA site II の結合サイトマーカーである DZP 及び AGP basic site の結合サイトマーカーである PPL と負荷剤を併用したときの遊離率、Fig.5 にはヒト及びマウスの *in vitro* 血清における ¹²⁵I-IMP の遊離率を示す。負荷剤の代わりに生理食塩水を加えたものを control とした。全ての負荷剤において、control と比較して遊離率の低下が見られ、両結合サイトにおける結合促進効果が確認された。これは、負荷剤と血清蛋白との相互作用の結果生じる血清蛋白上の構造の変化が関与していると考えられた。

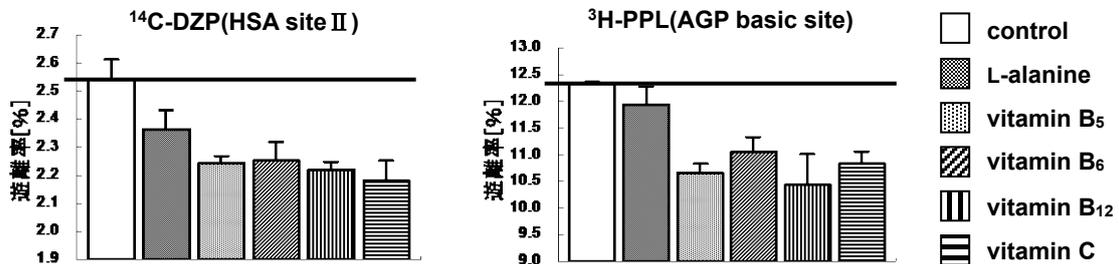


Fig.4 *In vitro* ヒト血清における遊離率

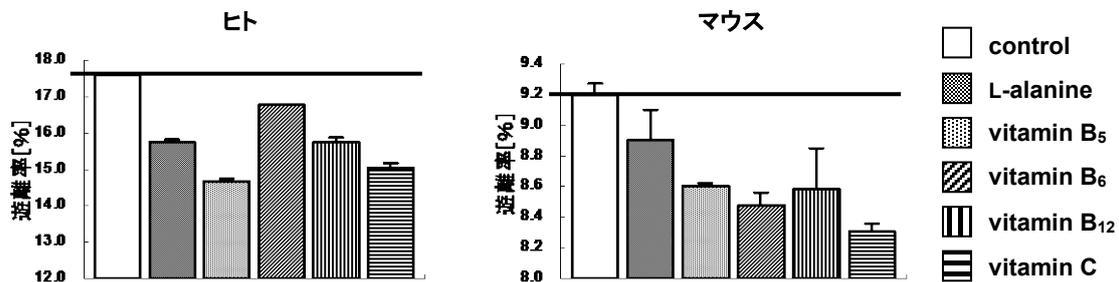


Fig.5 ¹²⁵I-IMP の *in vitro* 血清における遊離率

IV. L-Alanine、vitamin C を結合促進剤としたマウス体内分布実験

a) 実験材料と方法

III.の検討より、マウスでの変化が特に顕著だった vitamin C と、アミノ酸の中でも効果の大きかった L-alanine の2種類を、より有効な促進剤の候補としてマウスを用いた体内分布実験を行った。¹²⁵I-IMP の生理食塩水 50 μ L と各負荷剤 50 μ L(10mg/kg body weight)を併せたもの(計100 μ L)をそれぞれマウス(ddY, 雄, 6週齢, 体重約25g)(n=4)に尾静脈注射した。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400 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、組織集積率及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、III.a)と同様の方法で、*in vivo* 血清における遊離率及び変化率を算出した。

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

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

b) 結果と考察

Fig.6 に *in vivo* マウス血清における遊離率を示す。Control は負荷剤の代わりに生理食塩水を加えたものである。*In vivo* 血清での control の遊離率は *in vitro* 血清での control の遊離率より増加した。これは、マウス生体内において ^{125}I -IMP が速やかに代謝され、結合率が低下したためだと考えられた。

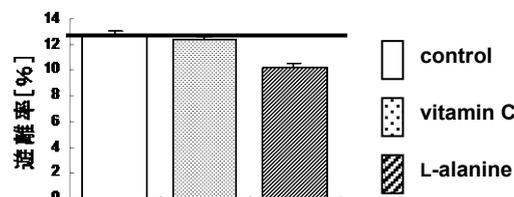


Fig.6 *In vivo* マウス血清における遊離率

L-alanine 負荷では遊離率の低下がみられ、control に対する変化率が 0.81 と *in vivo* 血清でも結合促進効果が確認された。しかし vitamin C 負荷では、*in vitro* 血清でみられた結合促進効果は認められなかった。これは vitamin C が代謝に利用される時間が早く、投与後 5 分では vitamin C の血中濃度がすでに低下していたためだと推測された。

Fig.7 に ^{125}I -IMP の脳、肺及び腎臓における重量集積率を示す。これら主要臓器で顕著な変化は認められなかった。*In vivo* 血清の場合と同様、L-alanine、vitamin C は栄養素であることから、これらの負荷剤が代謝利用され、投与後早期に血中濃度が低下したことが要因だと考えられた。

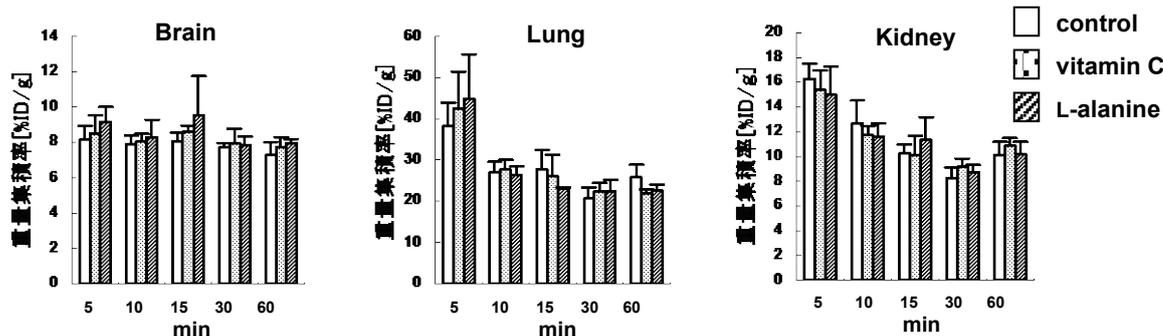


Fig.7 ^{125}I -IMP の重量集積率

V. 結語

安全性の高い製剤である ROX 及び ERM において AGP に対する顕著な蛋白結合置換効果が確認され、臨床応用が期待された。また、AGP 結合置換薬による置換効果は、HSA 置換に比べ、同じ負荷量でより大きな効果として得られた。一方、蛋白結合促進効果の検討では、*in vitro* 血清において顕著な結合促進効果が確認されたが、マウス体内分布実験では主要臓器の集積率に目立った変化は認められなかった。今後、点滴等を用いた持続静注や代謝利用率を考慮した負荷剤の選択など、負荷条件の最適化が必要であると考えられた。

VI. 謝辞

本稿を終えるにあたり、ご指導くだ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。

VII. 参考文献

- 1) Kawai K., Takamura H., Nishii R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M. Regulation of ^{125}I -IMP cerebral accumulation by competitive displacement of serum protein binding. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 44: S462-464, 2001.
- 2) Takamura H., Kawai K., Nishii R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M. Potentialization mechanism of domino displacement on ^{125}I -IMP serum protein binding. *J. Labelled Compd. Radiopharm.*, 44: S465-467, 2001.
- 3) Kawai K., Takamura H., Nishii R., Jinnouchi S., Nagamachi S., Tamura S., Arimori K. and Otagiri M. Competitive displacement of serum protein binding to regulate pharmacokinetics. In *Proceedings of International Symposium on Serum Albumin and α 1-Acid Glycoprotein from Basic Sciences to Clinical Applications*. Eds. Otagiri M., Sugiyama Y., Testa B., Tillement J.P., pp181-192, 2001.
- 4) 日本生化学会編集：生化学データブック 1, 東京化学同人, 1979.