

鈴木 信夫

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：放射性薬剤が肝臓から胆道系を経て腸管まで移行する際の分布状態の時間的推移を画像化し，肝胆道系疾患を診断することを目的として，本邦では  $^{99m}\text{Tc}$  標識 *N*-pyridoxyl-5-methyltryptophan ( $^{99m}\text{Tc}$ -PMT)が臨床利用されている。しかし， $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓における集積と胆汁排泄の機序は未だ解明されておらず，その機序を把握することは重要である。本研究では， $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓における集積と胆汁排泄機序の解明を目的とした。取り込みに関与する集積型薬物トランスポーターに関して，ラットの正常肝細胞を用いて検討した結果， $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)の関与の可能性が示された。さらに，トランスポーター強制発現細胞である human embryonic kidney cell (HEK 細胞)を用いて検討した結果，organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)，organic cation transporter 1 (OCT1)の関与が示唆された。一方，胆汁排泄機序に関して，薬剤の胆汁排泄に関与すると予想された 4 種類の排泄型薬物トランスポーターをそれぞれ単一に発現させたベシクルを用いて検討した結果，multiple drug resistance 1 (MDR1)，multidrug resistance-associated protein 2(MRP2)による輸送が明らかになった。したがって， $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓における集積および胆汁排泄に関与する主要な集積型および排泄型薬物トランスポーターが解明できた。

## I. はじめに

肝胆道系疾患の診断を目的として，臨床核医学検査では肝胆道シンチグラフィーが行われている。その放射性医薬品として， $^{99m}\text{Tc}$ -iminodiacetic acid (IDA)グループと  $^{99m}\text{Tc}$  標識 pyridoxylaminates グループに分けられ<sup>1)</sup>，前者の代表的な医薬品である  $^{99m}\text{Tc}$  標識 diisopropyl phenylcarbamoyl IDA (disofenin)や  $^{99m}\text{Tc}$  標識 3-bromo-2,4,6-trimethyl IDA (mebrofenin)が欧米で使用されている一方，後者のグループの中で，最良のものとして，本邦では  $^{99m}\text{Tc}$  標識 *N*-pyridoxyl-5-methyltryptophan ( $^{99m}\text{Tc}$ -PMT)<sup>2)</sup>が用いられている。これらの医薬品は，血液内から肝細胞に集積した後に肝内胆管へと胆汁排泄され，その後，胆嚢，総胆管を経て十二指腸へ排泄される。この動態のうち，肝臓集積と胆汁排泄においては，薬物トランスポーターが関与していると予想されたが，この薬物トランスポーターは特定されていない。本研究では， $^{99m}\text{Tc}$ -PMT における肝臓集積に関わる集積型薬物トランスポーターと胆汁排泄に関わる排泄型薬物トランスポーター<sup>3)</sup>の解明を目的とし，検討した。集積型トランスポーターについては，organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)，OATP2B1，organic anion transporter 2 (OAT2)，organic cation transporter 1 (OCT1)および  $\text{Na}^+$ -taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)の 5 種類を選択し，これらが発現しているラットの正常肝細胞と NTCP を除く各薬物トランスポーターを強制発現させた human embryonic kidney cell (HEK 細胞)を用いた。さらに，排泄型トランスポーターについては，multiple drug resistance 1 (MDR1)，multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2)，bile salt export pump (BSEP)および breast cancer resistance protein (BCRP)が関係していると予想され，これらを単一に発現させたベシクルを用いた。

## II. $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓集積に関わる集積型薬物トランスポーターの検討

### A) ラットの正常肝細胞を用いた実験

#### a) 実験材料と方法

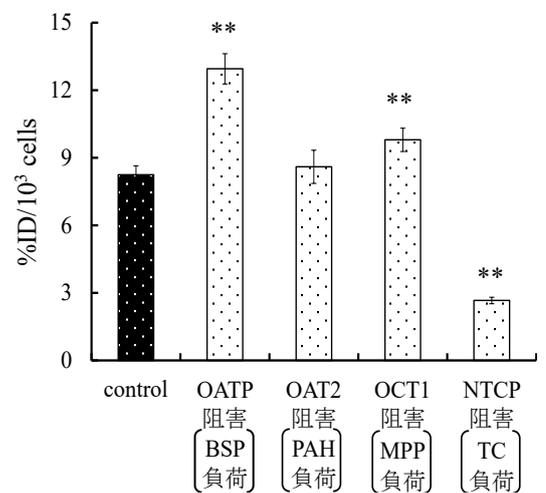
集積型薬物トランスポーターの阻害剤として、OATP 阻害剤 bromosulflein (BSP, Sigma), OAT 阻害剤 *p*-aminohippuric acid (PAH, Sigma), OCT 阻害剤 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP, Sigma), NTCP 阻害剤 taurocholate hydrate (TC, Sigma) を選択した。また、放射性薬剤の  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT は日本メジフィジックスから購入したものを使用した。集積型薬物トランスポーター 5 種類 (OATP1B1, OATP2B1, OAT2, OCT1 および NTCP) の発現が確認されているラットの正常肝細胞を  $37^{\circ}\text{C}$ ,  $5\%\text{CO}_2$  条件下で培養した。この正常肝細胞を 24 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート (Falcon) に 1 ウェル辺り  $4.0 \times 10^5$  cells/ml 播き、約 24 時間培養した後に実験を行った。培養用培地を除去した後、測定用培地(modified hanks' balanced salt solution)を加えて約 10 分間プレインキュベーションした。その後、阻害剤無負荷の場合を control として、約 37 kBq の  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT のみを投与し、一方では阻害剤の効果を確かめるために  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT と各阻害剤を同時投与して、それぞれ 5 分間インキュベーションした。 $^{99m}\text{Tc}$  製剤を含んだ測定用培地を取り除き、新しい測定用培地で細胞を 2 回洗浄した。500  $\mu\text{l}$  の 0.1N NaOH で細胞を溶解し、そのうちの 400  $\mu\text{l}$  をオートウェルガンマカウンタ(Aloka)で測定した。集積率は、細胞内の集積放射能を投与放射能で割り、百分率で表した % injected dose (%ID) で表示した。

その後、阻害剤無負荷時の細胞集積率を control とし、各阻害剤を負荷した場合の集積率と比較した。

#### b) 結果と考察

阻害剤無負荷時の control と、各阻害剤を負荷した場合の  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の集積率を Figure 1 に示す。

Control に比べ、NTCP の阻害剤である TC を負荷した場合に、 $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の集積率が有意に低下した。したがって、NTCP が  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓への集積に関与していると思われた。一方、OATP 阻害剤である BSP, OAT2 阻害剤である PAH, OCT1 阻害剤である MPP を負荷した場合は、control に比べて集積率が増加した。この原因としては、ラットの正常肝細胞には集積型および排泄型薬物トランスポーターの両者ともが発現しており、各阻害剤が集積型だけでなく排泄型トランスポーターをも阻害し<sup>4)</sup>、排泄型に対する阻害効果が集積型に対する効果より大きくなったことで、 $^{99m}\text{Tc}$ -PMT が肝細胞から排泄されずに細胞内に残存してしまったことが考えられる。したがって、正常肝細胞を用いた検討では NTCP 以外の集積型薬物トランスポーターの関与が解明できなかったため、各集積型薬物トランスポーターを個々に強制発現させた HEK 細胞を用いて実験を行った。



\*\* :  $p < 0.01$  compared with control

Fig. 1 正常肝細胞における  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の集積率

## B) HEK 細胞を用いた実験

### a) 実験材料と方法

OATP1B1, OATP2B1, OAT2 および OCT1 をそれぞれ強制的に高発現させた HEK 細胞を 37°C, 5%CO<sub>2</sub> で培養した. この細胞をコラーゲンコーティングさせた 12 ウェル細胞培養用マルチウェルプレート(Iwaki)に 1 ウェル辺り 4.0×10<sup>5</sup> cells/ml 播き, 約 48 時間培養した後に実験を行った. また, 実験方法は II-A-a とほぼ同様であるが, 阻害剤を用いた検討は行わなかった.

### b) 結果と考察

各 HEK 細胞における <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率を Figure 2 に示す. 集積型薬物トランスポーターを強制発現させていない HEK 細胞を control とした場合, それと比べて, OATP1B1 と OCT1 を強制発現させた HEK 細胞において, <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率が有意に増加した. HEK 細胞を用いた検討では, <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率が增加する場合に, その集積型薬物トランスポーターが <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積機序に関与していると考えられるため, 有意な集積増加が認められた OATP1B1 と OCT1 は <sup>99m</sup>Tc-PMT の肝臓への集積に関与していると思われる.

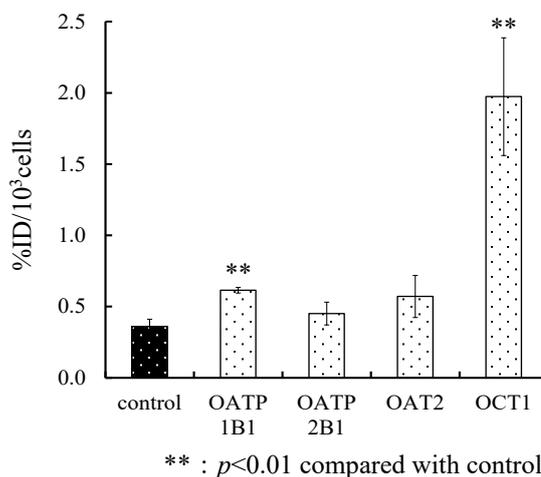


Fig. 2 HEK 細胞における <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率

## III. <sup>99m</sup>Tc-PMT の胆汁排泄に関わる排泄型薬物トランスポーターの検討

### A) 実験材料と方法

実験材料として, 4 種類の ABC トランスポーターベシクル(MDR1, MRP2, BSEP および BCRP) およびベシクル専用試薬キットは GenoMembrane 社から購入したものを使用した. また, ベシクルに投与する薬液の調整方法はキット内に同封されていたマニュアルを, 実験手順はベシクルの容器内に同封されていたマニュアルを参考にして実験を行った. なお最終的な解析結果は, 1 mg の蛋白量あたりに含まれた薬液量の物質質量で表した.

### B) 結果と考察

4 種類のベシクルにおける <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率を Figure 3 に示す. 排泄型薬物トランスポーターの物質輸送には adenosine triphosphate (ATP) がエネルギーとして利用されるのに対し, adenosine monophosphate (AMP) はエネルギーとはならないため, AMP 存在下ではこのような特異的輸送による集積は観察されない. したがって, ATP 存在下でのベシクル内への <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率が, AMP 存在下での集積率に比べて有意に増加した場合に, その排泄型薬物トランスポーターは胆汁排泄に関与していることが確認できる.

MDR1 と MRP2 のベシクルでは, 全てのインキュベーション時間において, ATP を添加した場合の <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率は AMP 添加の場合に比べて有意に増加した. 一方, BSEP, BCRP のベシクルでは, ATP を添加した場合の <sup>99m</sup>Tc-PMT の集積率は AMP を添加した場合に比べて有意な変化が見られなかった. したがって, <sup>99m</sup>Tc-PMT の胆汁排泄には MDR1 と MRP2 が関与しており, 一方, BSEP と BCRP は関与していないことが明らかになった.

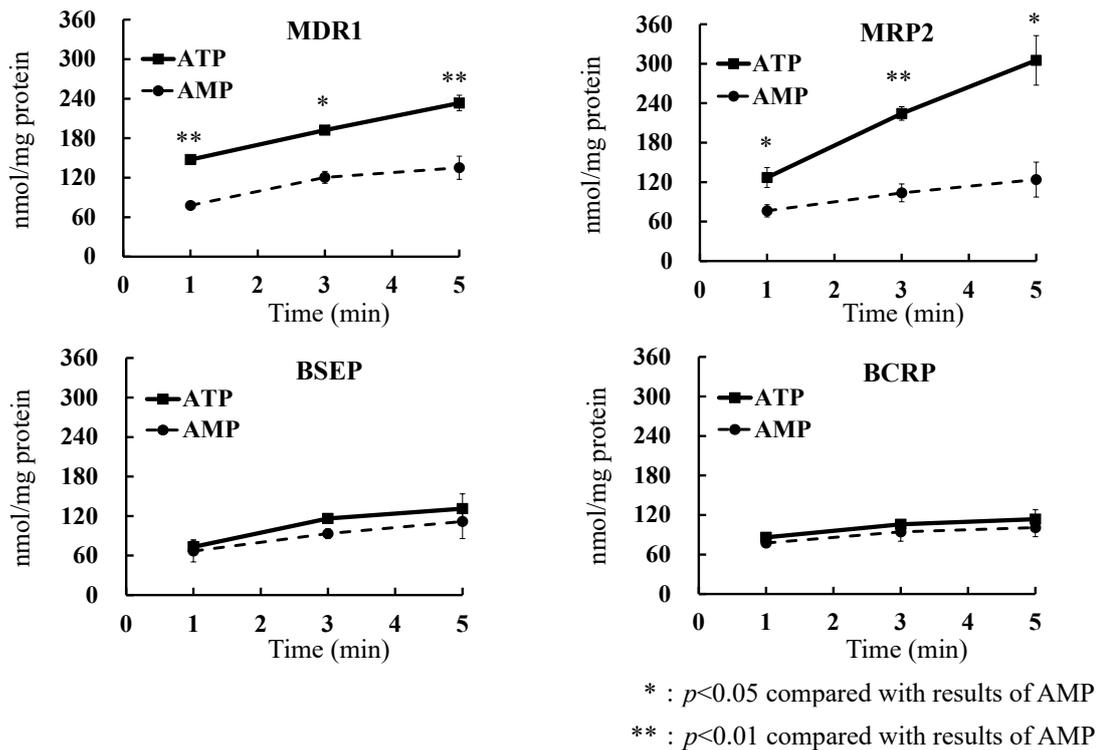


Fig. 3 各薬物トランスポーター発現ベシクルにおける  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT 集積率

#### IV. 結語

$^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓集積には OATP1B1, OCT1 および NTCP の関与が示唆され, 胆汁排泄には MDR1, MRP2 が関与していた. したがって,  $^{99m}\text{Tc}$ -PMT の肝臓集積および胆汁排泄に関する主要な集積型ならびに排泄型薬物トランスポーターを解明できた.

#### V. 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, 小林正和助教, 大江和代博士およびご協力いただいた本研究室の方々に心より感謝申し上げます.

#### VI. 参考文献

- 1 Tulchinsky M, Ciak BW, Delbeke D, Hilson A, Holes-Lewis KA, Stabin MG, Ziessman HA. SNM practice guideline for hepatobiliary scintigraphy 4.0. *J Nucl Med Technol.* 2010; **38**(4): 210-218.
- 2 Kuwabara Y, Oshiumi Y, Ichiya Y, Wada M, Shiozaki H, Hirata N, Matsuura K. Clinical evaluation of the hepatobiliary scintigraphy using  $^{99m}\text{Tc}$ -*N*-pyridoxyl-5-methyltryptophan ( $^{99m}\text{Tc}$ -PMT). *Radioisotopes.* 1983; **32**(1): 26-29.
- 3 You G, Morris ME. Drug transporters. John Wiley & Sons. 2007, pp.359-410
- 4 Jäger W, Winter O, Halper B, Salamon A, Sartori M, Gajdzik L, Hamilton G, Theyer G, Graf J, Thalhammer T. Modulation of liver canalicular transport processes by the tyrosine-kinase inhibitor genistein: implications of genistein metabolism in the rat. *Hepatology.* 1997; **26**(6): 1467-1476.