

1210 ¹²³I-IMP 代謝物分析による薬物代謝酵素の生体内活性変動の評価

水谷 明日香

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教)

要旨：近年，個人の情報に基づいて治療や処方を行うオーダーメイド医療に注目が集まっている．薬に対する感受性は個人によって異なるため，副作用を最小限に抑え，最大限の薬効を得るために個人に適した処方が求められており，投薬の新たな指標の確立は重要である．本研究では，生体に投与した ¹²³I-*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (¹²³I-IMP) 由来の放射性代謝物を分析し，薬物代謝酵素(CYP) 阻害剤負荷による CYP 活性の生体内変動を検出することを目的とした．正常マウスにおける ¹²³I-IMP の体内分布実験を行った結果，control 群と CYP 阻害剤負荷群で重量集積率はほぼ同様の経時変化を示した．¹²³I-IMP 未変化体および ¹²³I-IMP 代謝物を検出するため，¹²³I-IMP の集積が平衡に達した投与後 15 分に control 群と CYP 阻害剤負荷群の肝臓と腎臓をそれぞれ摘出し，ホモジナイズ・除タンパク後の上清を高速液体クロマトグラフィで分析した．その結果，control 群では未変化の ¹²³I-IMP と ¹²³I-IMP 代謝物の両方が検出されたが，CYP 阻害剤負荷群では ¹²³I-IMP 代謝物は消失し，未変化の ¹²³I-IMP のみが検出された．以上の結果から，CYP 阻害剤負荷による CYP の生体内活性変動が検出可能であり，¹²³I-IMP 代謝物量の変化は CYP の生体内活性変動を反映していることが示された．したがって ¹²³I-IMP 代謝物量は CYP で代謝される薬の適切な投与量を決定する指標になると考えられた．

I. はじめに

体内に摂取された薬物は，その大部分が Cytochrome P-450 (CYP) に代表される薬物代謝酵素によって代謝される．この薬物代謝酵素の活性には個人差があることが知られており，活性が高い人には適切な薬の処方量であっても，活性が低い人では代謝されにくく効き過ぎてしまうばかりでなく副作用の発現率が高くなることがあるため，処方量を減らす必要がある．つまり，薬物代謝酵素活性の個人差を定量することができれば，最小限の副作用で最大限の薬効を得るための個人に合わせた処方薬の投与量を決定する新たな指標とすることができると思われる．

また，代謝物量と薬物代謝酵素の活性には相関関係があり，代謝物量を定量することで薬物代謝酵素活性の個人差を知ることができると考えられる．このことから，代謝物量の定量は個人に最適な治療方法を計画する evidence に基づいたオーダーメイド医療へ応用できると期待される．

これらの背景を踏まえ，本研究では ¹²³I-*N*-isopropyl-*p*-iodoamphetamine (¹²³I-IMP) 由来の放射性代謝物を分析することにより，マウスの生体内における CYP の活性および代謝機能変動を検出することを目的とした．

II. CYP 阻害剤負荷による ¹²³I-IMP の体内分布変動確認

CYP 阻害剤を負荷しない control 群と，CYP 阻害剤負荷により擬似的に CYP 活性低下状態とした群（以下，inhibition 群とする）の各臓器に集積した放射能を測定・比較し，¹²³I-IMP の体内分布変動の有無を確認した．

A-1) ¹²³I-IMP のマウス体内分布実験

マウス (ddY, ♂, 6 週齢) に 5μM の CYP 阻害剤である SKF-525A^{1), 2)} 生理食塩溶液または生理食塩水各 100μL を尾静脈注射し，その後 ¹²³I-IMP(日本メジフィジックス) を 1 匹あたり 7.4MBq/100μL ずつ投与した．一定時間(2, 5, 10, 15, 20 分) 経過後，エーテル麻酔下にて心臓から 500μL 採血し，脳，肺，心臓，肝，膵，脾，胃，腎，腸，筋を摘出し，重量測定した．オートウェル γ カウンタ(AccuFLEXγ 7000, Aloka) で血液および各臓器の放射能を計測し，重量集積率を次式にて算出した．

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

B-1) 結果と考察

Control 群および CYP 阻害剤を負荷した inhibition 群それぞれのマウス体内分布実験における各臓器の重量集積率を図 1 および図 2 に示す。

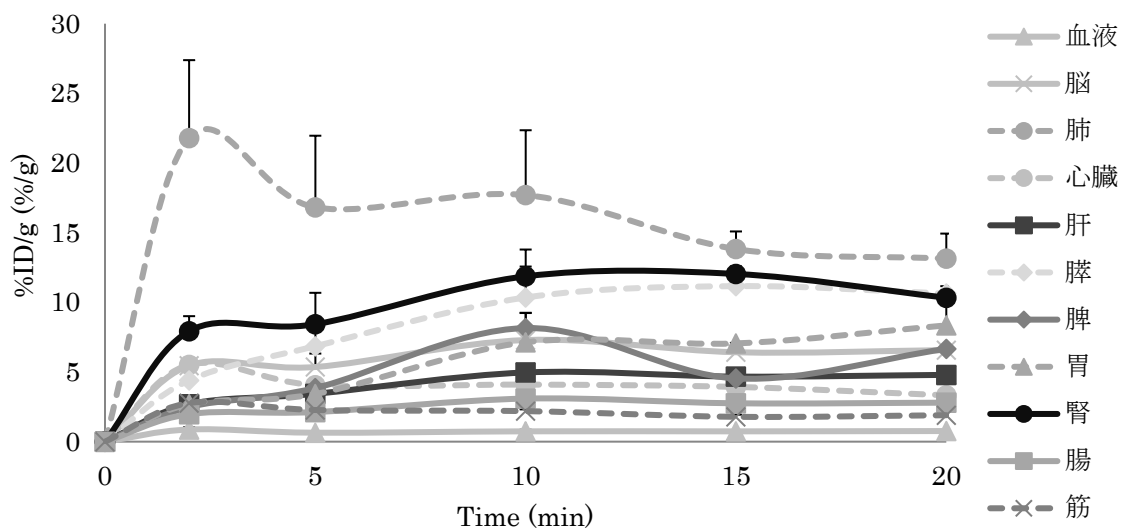


図 1 Control 群マウス体内分布における各臓器重量集積率

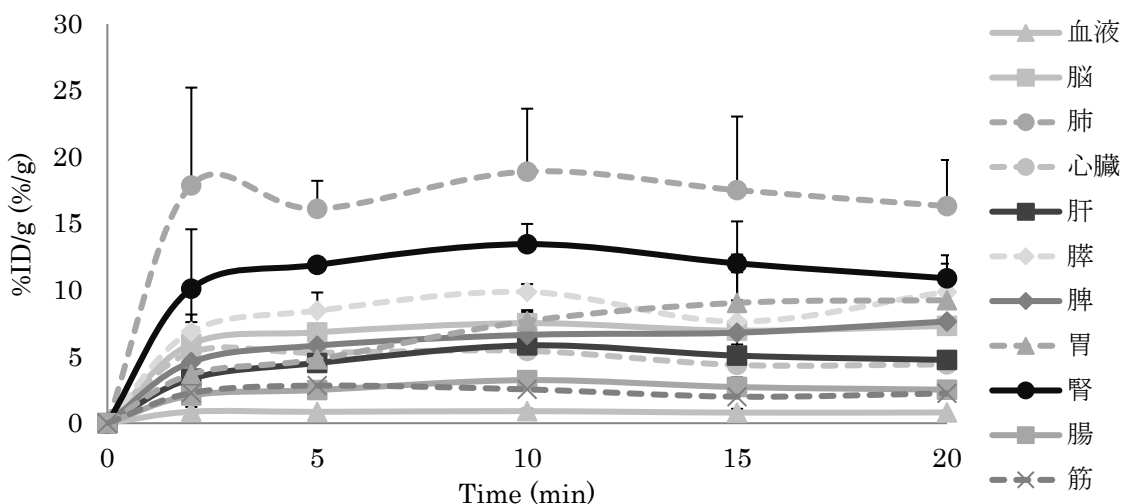


図 2 Inhibition 群マウス体内分布における各臓器の重量集積率

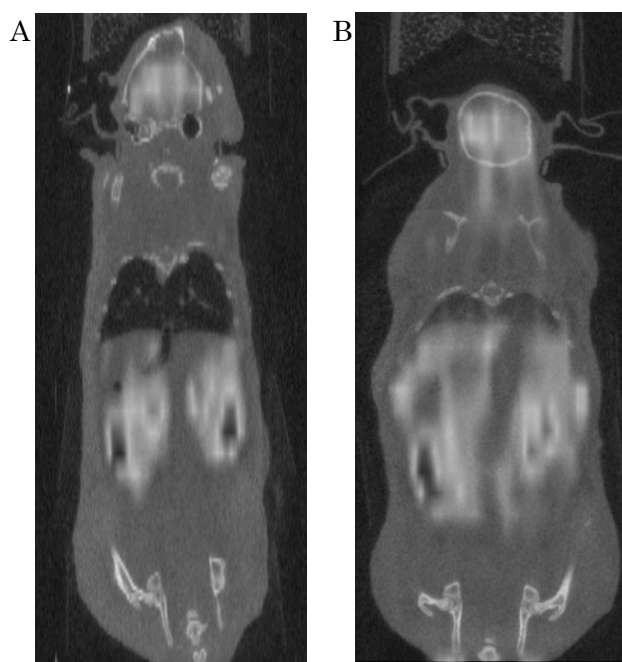
CYP 阻害剤を負荷した inhibition 群では、排泄が若干速くなる傾向が見られたものの、control 群と比較して全ての臓器で CYP 阻害剤負荷による有意な差は確認されなかった。

A-2) ^{123}I -IMP のマウス全身 imaging

マウスに $5\mu\text{M}$ の SKF-525A 生理食塩溶液または生理食塩水各 $100\mu\text{L}$ を尾静脈注射し、その後 ^{123}I -IMP を 1 匹あたり 45MBq ずつ投与した。5 分後、小動物用 SPECT/CT 装置 (eXplore speCZT CT120, GE) を使用し、全身の CT および SPECT 撮像を行った。CT は管電圧 70.0kV 、管電流 32.0mA で撮像し、SPECT は step-and-shoot mode で 45step ($12\text{sec}/\text{step}$) 撮像した。画像再構成には分解能補正組込型 ordered subset expectation maximization method (OSEM) を使用し、得られた画像を、画像処理ソフトウェア OsiriX (Kanteron) を使用して解析を行った。なお、SPECT は ^{123}I -IMP 投与後 5 分から 15 分までの合算画像を用いた。

B-2) 結果と考察

図3に腎臓における¹²³I-IMPの集積がほぼ等しくなる断面を表示したSPECT/CT画像を示した。



Control, inhibitionマウスのどちらも脳、肝臓、腎臓への集積が見られ、imagingにおいても、CYP阻害剤負荷による大きな差は確認することができなかった。ここに示す以外の全ての断面でも同様であった。

重量集積率、imagingそれぞれの比較より、CYP阻害剤を負荷したことによる¹²³I-IMPの体内分布変動は無いと断定できた。このことから、¹²³I-IMP代謝物量の変動要因は、体内分布の変動ではなく、CYPの活性変動であると考えられた。

図3 マウス全身SPECT/CT画像

A: control

B: inhibition

III. CYP阻害剤負荷による¹²³I-IMP代謝物量変動の検出

IIの結果を踏まえ、図1, 2において代謝の主要臓器である肝臓と排泄の主要臓器である腎臓、それぞれの重量集積率が平衡となった投与後15分に着目し、CYPの活性変動による¹²³I-IMP代謝物量の変動の検出を試みた。

A) 実験材料と方法

マウスに5 μ MのSKF-525A生理食塩溶液100 μ Lを尾静脈注射後、¹²³I-IMPを1匹あたり7.4MBq/100 μ Lずつ投与した。15分経過後、肝臓、腎臓を摘出し、肝臓はおよそ1gになるように秤量した。組織重量の3倍量のKrebs-Ringer Buffer (pH7.4)を添加し、ホモジナイズしたものを15000rpmで遠心分離した。上清250 μ Lを分取し、エタノール200 μ Lと除蛋白のための過塩素酸50 μ Lを加えよく攪拌し、再び15000rpmで5分間遠心分離した。得られた上清100 μ Lを高速液体クロマトグラフィ(high-performance liquid chromatography : HPLC)にて分析した。検出機器には、UV-VIS検出器(SPD-10A, Shimadzu), RI検出器;ラジオアナライザー(RLC-701, Aloka)を使用した。分析条件は、カラム;5C₁₈AR-II(Nacalai tesque), 移動相;20mMリン酸カリウム Buffer (pH3.0):アセトニトリル=60:40, 流速;1.0mL/min, UV;232nm, RI;159keV \pm 10%である³⁾。得られた分析結果はクロマトグラムデータ解析装置(Power Chrom, eDAQ)を用いて解析した。

B) 結果と考察

肝臓、腎臓それぞれのcontrolとinhibitionにおけるHPLCのRI分析結果を図4, 5に示す。

Controlでは肝臓、腎臓ともに未変化体の¹²³I-IMPと¹²³I-IMP代謝物である¹²³I-PIAを検出することができたが、inhibitionでは¹²³I-IMP以外にノイズと有意差のあるピークは検出されなかった。これらの結果から¹²³I-IMPと体内で生成した代謝物が分離・検出可能であり、CYP阻害剤負荷により¹²³I-IMP代謝物が消失することが確認され、生体内においてもCYPを競合阻害することで¹²³I-IMPの代謝物量が減少することが示された。また、CYP活性と阻害剤濃度の関係から未知のCYP活性を定量するin vitro CYP活性定量法を応用することで、in vivoにおいても同様にCYP活性の定量が可能であると思われる。

さらに、本研究では肝臓と腎臓を対象としているが、血液や尿など採取に侵襲性の低いものを用いることができれば臨床応用も可能と考えられる。

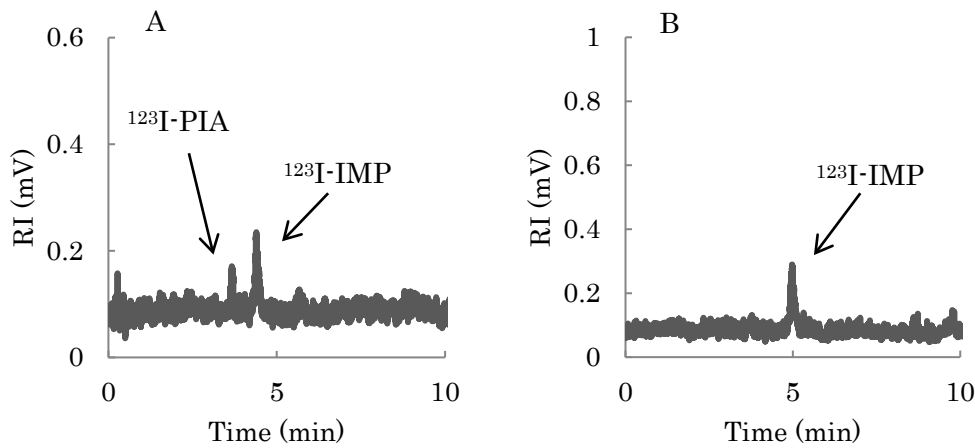


図 4 肝臓の HPLC-RI 分析 A: control, B: inhibition

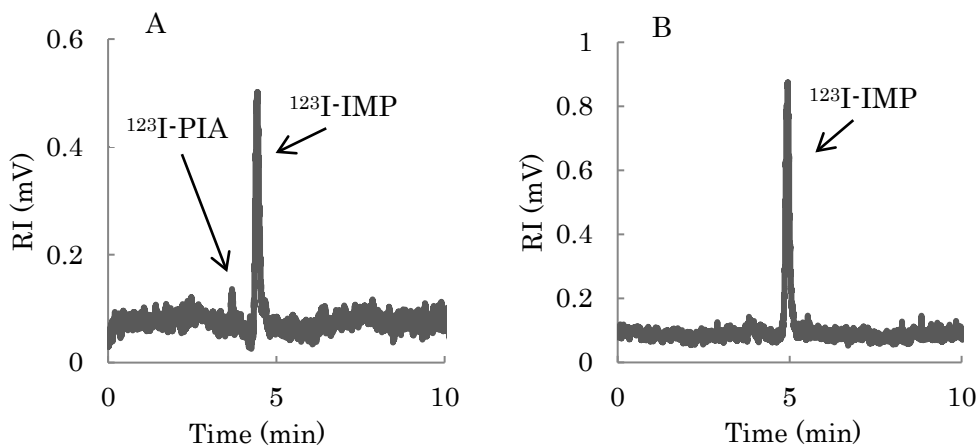


図 5 腎臓の HPLC-RI 分析 A: control, B: inhibition

IV. 結語

$^{123}\text{I-IMP}$ と競合する CYP 阻害剤を負荷し、擬似的な CYP 活性低下状態とすることにより、CYP の活性変動による代謝機能の生体内変動を検出することができた。この各個人の $^{123}\text{I-IMP}$ 代謝物量測定に基づく酵素活性測定法を応用することにより、薬剤の適切な投与量決定の指標にできると考えられる。

V. 謝辞

本研究を終えるにあたり、ご指導いただいた川井恵一教授、小林正和助教、西弘大修士、ご協力いただいた本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VI. 参考文献

- 1) Galeotti T, Eboli ML, Palombini G, van Rossum GD, Kapoor SC. Inhibition of mitochondrial oxidative metabolism by SKF-525A in intact cells and isolated mitochondria. *Biochem Pharmacol*, 1983; 32(22): 3285-3295.
- 2) Nunoya K, Yokoi Y, Kimura K, Kodama T, Funayama M, Inoue K, Nagashima K, Funae Y, Shimada N, Green C, Kamataki T. (+)-*cis*-3,5-Dimethyl-2-(3-pyridyl) thiazolidin-4-one hydrochloride (SM-12502) as a novel substrate for cytochrome P450 2A6 in human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996; 277(2): 768-774.
- 3) Fujita K, Sugiyama M, Akiyama Y, Hioki K, Kunishima M, Nishi K, Kobayashi M, Kawai K, Sasaki Y. *N*-Isopropyl-*p*-iodoamphetamine hydrochloride is predominantly metabolized by CYP2C19. *Drug Metab Dispos*, 2012; 40(5): 843-846.