

1305 薬物代謝酵素活性測定を目指した

¹²⁵I-2-iodoacetaminophen の代謝分析

高橋 浩太郎

(指導教員：川井 恵一教授，小林 正和助教，西 弘大助教)

要旨：ヒトに投与された薬剤は薬物代謝酵素によって代謝されるが，薬物代謝酵素活性には個人差があり，薬効や副作用の発現の個体差要因となっている．生体内薬物代謝酵素活性を個別に測定することで，薬剤の投与量をオーダーメイドで処方し必要な薬効を得ながら副作用を最小限に抑えることができる．本研究では肝の薬物代謝酵素活性を測定する放射性薬剤開発を目的に，解熱鎮痛剤として用いられている acetaminophen のヨウ素標識体 ¹²⁵I-2-iodoacetaminophen (¹²⁵I-IAP)の体内分布を検討し，放射性代謝物を分析した．Acetaminophen の ¹²⁵I 標識は chloramine-T 法で行い，高速液体クロマトグラフィで標識体 ¹²⁵I-IAP を分離精製した．¹²⁵I-IAP のマウス体内分布実験の結果，肝への集積は少なく，対して胆汁中への排泄が多いことが確認された．薄層クロマトグラフィ分析の結果，胆汁中の放射性物質は ¹²⁵I-IAP と異なっていたため，肝で生じた ¹²⁵I-IAP の代謝物が胆汁排出されたものであると推測された．また，胆汁中の放射性代謝物の推定のため，脱ヨウ素化酵素の基質である ¹²⁵I-3-iodo-L-tyrosine (¹²⁵I-L-MIT)の体内分布と比較した結果，¹²⁵I-L-MIT では放射能の胆汁移行量が少ないことから，脱ヨウ素化によって生じた free ¹²⁵I は胆汁排泄されないものと推測された．よって ¹²⁵I-IAP は脱ヨウ素化酵素の影響を受けにくく，肝の薬物代謝酵素によって生じた放射性代謝物は，胆汁排泄されたと考えられた．したがって，¹²⁵I-IAP の胆汁排泄をダイナミック撮像することによって，肝での薬物代謝酵素活性を測定することができる可能性が示された．

I. はじめに

薬物は体内に摂取された後，大部分が薬物代謝酵素によって別の化合物に代謝される．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，活性の高低によって代謝物の量に変化する．そのため，薬剤の投与量が同じであっても，薬効や副作用の発現には個体差が生じる．この薬物代謝酵素活性の個人差を測定することで，必要な薬効を得るとともに副作用を最小限に抑える個人に合わせた薬剤の投与量を決定することができると考えられる．また薬物代謝酵素活性の測定を基にして投与量を決定することは，昨今重要視されている根拠に基づいた医療 (EBM: evidence-based medicine) の観点からも，非常に有効であると思われる．

以上の背景から，本研究では薬物代謝酵素活性をダイナミック撮像により判定できる放射性薬剤の開発を目的とした．薬物代謝酵素による代謝経路が報告されている解熱鎮痛剤 acetaminophen ¹⁾をヨウ素標識し，体内分布の検討と放射性代謝物の分析を行った．

II. Acetaminophen の ¹²⁵I 標識

A) 標識法

Chloramine-T 法で acetaminophen の ¹²⁵I 標識を行った。 ¹²⁵I-NaI (1.5 MBq) を phosphate buffered saline (pH 7.4) を用いて 10 μL に希釈し、 10 mM acetaminophen の ethanol 溶液 100 μL 及び 4 mM chloramine-T 水溶液 (塩酸で pH 5.6 に調整した milli Q に溶解) 25 μL を加えて十分に攪拌し、 25 °C で 30 分反応させたのち、ピロ亜硫酸ナトリウムの 1/10 飽和溶液 25 μL を加え、反応を停止した。反応液を窒素気流下で濃縮し、高速液体クロマトグラフィ (high-performance liquid chromatography: HPLC) を用いて分離精製した。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、Table 1 の分析条件で行った。条件を最適化した結果、標識率は 75-85 %、放射化学的純度は 98 % 以上で ¹²⁵I-2-iodoacetaminophen (¹²⁵I-IAP) が得られた。

Table 1 HPLC 分析条件

| | | | |
|-----|--|----|------------|
| カラム | 5C ₁₈ -MS- II (Nacalai tesque) | 流速 | 1.0 mL/min |
| 移動相 | 20 % methanol : 80 % 50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 4.7), 0-10 min | UV | 225 nm |
| | 50 % methanol : 50 % 50 mM KH ₂ PO ₄ (pH 4.7), 10-18 min | RI | 27 keV±5 % |

III. ¹²⁵I-IAP の正常マウス体内分布

A) 実験材料と方法

予め 24 時間絶食しておいたマウス (ddY, ♂, 6 週齢) に ¹²⁵I-IAP を 1 匹あたり 18.5 kBq/100 μL ずつ尾静脈より投与した。一定時間 (2, 5, 10, 15, 20, 60, 120, 360 分) 経過後、エーテル麻酔下にて心臓採血を行い、脳、肺、心、脾、脾、肝、胆嚢、胃、腎、小腸、大腸、骨、筋を摘出し、重量を測定した。オートウェルγカウンタ (AccuFLEXγ 7000, Aloka) で血液及び各組織の放射能を計測し、重量集積率を次式にて算出した。

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

B) 結果と考察

摘出組織のうち血液、肝、胆嚢、胃の重量集積率を Fig. 1 に示す。その他組織は 2, 5 分の腎でおよそ 20 % ID/g の集積がある以外は 10 % ID/g 以上の集積が認められず、時間の経過に伴い集積は減少し 120 分時には小腸で 4.62 % ID/g、その他組織は 2 % ID/g 以下となった。胆嚢は他の組織と異なり、早期に集積が上昇し 120 分にピークが見られた。このことから、投与された ¹²⁵I-IAP の大部分は最終的に胆汁排泄されると推測された。また、胆嚢に比べ肝の集積が低いことから、¹²⁵I-IAP は肝には留まらず、速やかに胆汁中に排泄されていると推測された。

IV. ¹²⁵I-IAP 投与マウスの胆汁中放射性代謝物の分析

体内分布において多くの放射性物質が胆汁排泄されていることが確認された。この胆汁排泄物が ¹²⁵I-IAP であるのかを検討するため、シリカゲル薄層クロマトグラフィ (thin layer chromatography: TLC) 分析を行い、オートウェルγカウンタを用いて確認した。

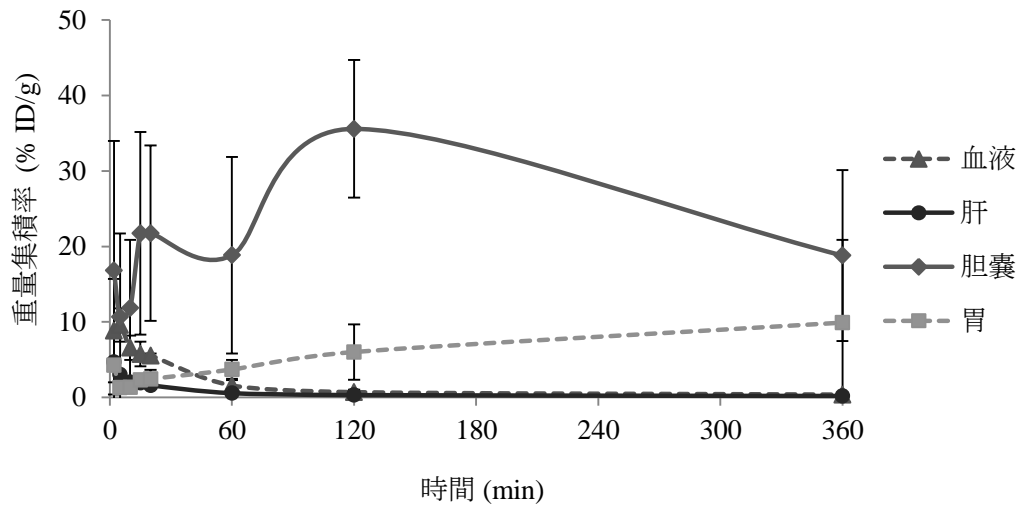


Fig. 1 ^{125}I -IAP 投与マウスの各重量集積率の経時変化

A) 実験材料と方法

予め 24 時間絶食しておいたマウス (ddY, ♂, 6 週齢) に, ^{125}I -IAP を 1 匹あたり 40.0 kBq/100 μL ずつ尾静脈より投与した. 正常マウス体内分布実験において, 胆嚢の重量集積率のピークがみられた 120 分後に胆嚢を摘出した. ヘキサン:酢酸エチル:ジエチルエーテル=1:4:1 の展開溶媒で胆汁をシリカゲル薄層板 (Art.5554, Merck) に展開し, ^{125}I -IAP の展開結果と比較した.

B) 結果と考察

胆汁と ^{125}I -IAP の TLC 分析の結果をそれぞれ Fig. 2, 3 に示す. ^{125}I -IAP の Rf 値は 0.25-0.30 であるのに対し, 胆汁中の放射能の Rf 値は原点から移動しておらず, free I の Rf 値と一致した. よって, 胆汁内の放射性物質は ^{125}I -IAP ではない別の物質であり, ^{125}I -IAP の代謝物であると考えられる.

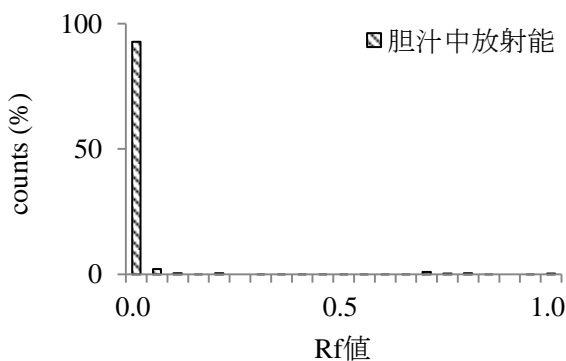


Fig. 2 胆汁中放射能 TLC 分析

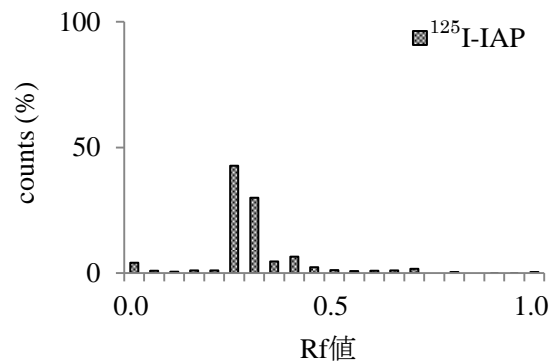


Fig. 3 ^{125}I -IAP TLC 分析

V. ^{125}I -3-iodo-L-tyrosine (^{125}I -L-MIT) と ^{125}I -IAP の体内分布比較

IV. において胆汁中にみられた放射性代謝物が, 脱ヨウ素化酵素によって生じた free ^{125}I であるのかを検討するために, 脱ヨウ素化酵素の基質である ^{125}I -3-iodo-L-tyrosine (^{125}I -L-MIT) との体内分布の比較を行った. Free ^{125}I が生じると集積の上昇が見られる胃の早期の重量集積率 (2-15 分) と, 胆嚢を撮像するために重要となる胆嚢・肝間の重量集積率の比の二点を比較した.

A) 実験材料と方法

予め 24 時間絶食しておいたマウス (ddY, ♂, 6 週齢) に ^{125}I -L-MIT を 1 匹あたり 40.0 kBq/100 μL を尾静脈より投与した. 5 分後に胆嚢を摘出して, 重量測定しオートウェル γ カウンタで放射能

を測定した。その他データは文献より引用した²⁾。

B) 結果と考察

¹²⁵I-IAP と ¹²⁵I-L-MIT における胃の重量集積率のグラフを Fig. 4 に、投与 5 分後における肝、胆嚢の重量集積率及び胆/肝比を Table 2 に示す。¹²⁵I-L-MIT の集積は時間経過に伴って著しく上昇しているのに対して、¹²⁵I-IAP ではその傾向は見られない。また、胆/肝比は ¹²⁵I-L-MIT では 0.01 と極めて低いのに対して、¹²⁵I-IAP では 3.52 と高く胆嚢の撮像に十分な値であった。この値は時間経過に伴い上昇し 120 分では 111.82 と極めて高い値を示した。脱ヨウ素化酵素の基質である ¹²⁵I-L-MIT を投与したマウスにおいて、胆嚢の集積は見られなかった。そのため、脱ヨウ素化酵素によって生じた free ¹²⁵I は胆汁排泄されないと考えられた。また、¹²⁵I-IAP 投与マウスは胆嚢に集積がみられ、投与後早期に胃の重量集積率が上昇しなかった。これらの傾向は ¹²⁵I-L-MIT とは明らかに異なっているため、¹²⁵I-IAP への脱ヨウ素化酵素の影響は極めて小さいと考えられた。従って、¹²⁵I-IAP 投与マウスの胆汁内の放射性代謝物は free ¹²⁵I ではなく、他の薬物代謝酵素による代謝物であると推測された。

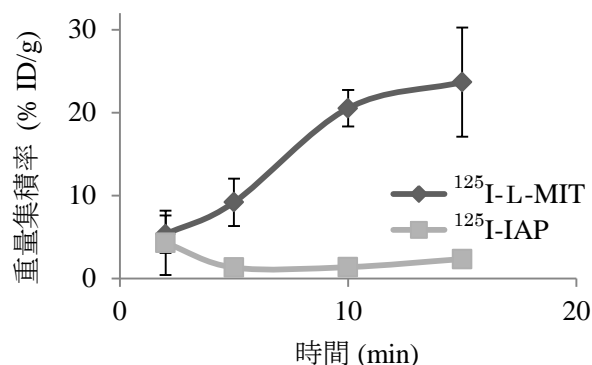


Fig. 4 胃の重量集積率経時変化

Table 2 肝、胆嚢の重量集積率

| | ¹²⁵ I-L-MIT | ¹²⁵ I-IAP |
|-------------|------------------------|----------------------|
| 胆嚢 (% ID/g) | 0.02 | 10.70 |
| 肝 (% ID/g) | 3.21 | 3.04 |
| 胆/肝比 | 0.01 | 3.52 |

VI. 結語

今回新規に標識した ¹²⁵I-IAP の投与マウスにおいて、胆汁中に ¹²⁵I-IAP の代謝物が排泄されていると推測された。またこの排泄量が肝の集積に対して多いため、¹²⁵I-IAP は速やかに肝で代謝され、その後胆汁に排泄されたと考えられた。また、体内分布において胆/肝比が投与後早期より極めて高く、胆汁中の代謝物の撮像が可能であることが確認できた。これらの結果より、胆汁排泄のダイナミック撮像による肝での薬物代謝酵素活性測定の可能性が示された。

VII. 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 弘大助教、並びにご協力いただいた水谷明日香さんをはじめとする本研究室の方々にご心より御礼申し上げます。

VIII. 参考文献

- 1) Lee SS, Joroen JT, Thierry P, et al: Role of CYP2E1 in the hepatotoxicity of acetaminophen. J. Biol. Chem. 271: 12063-12067, 1996
- 2) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, et al: Monoiodo-D-tyrosine, an artificial amino acid radiopharmaceutical for selective measurement of membrane amino acid transport in the pancreas. Nucl. Med. Biol. 17: 369-376, 1990