

1501 ¹²³I-Iomazenil を用いた薬物代謝酵素活性定量法の確立

高須 啓彰

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：ヒトに投与された医薬品は薬物代謝酵素によって代謝されるが、その酵素活性には個人差があり、薬効や副作用発現の個体差要因となっている。当研究室では、この薬物代謝酵素活性を非侵襲的に定量評価することで個人に最適な投薬が可能であると考え、肝臓で生じた放射性代謝物が直接排泄される胆嚢中放射能の経時的画像化による薬物代謝酵素活性定量法を提唱してきた。本研究では、てんかん焦点の核医学検査に用いられており、投与後速やかに肝臓で代謝を受けて放射性代謝物を生成すると報告されている ¹²³I-Iomazenil (¹²³I-IMZ) の ¹²⁵I 標識体を用いて放射性代謝物を分析することで薬物代謝酵素活性定量法への応用を検討した。マウス肝ホモジネートに添加した ¹²⁵I-IMZ の放射性代謝物分析を行った。薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography ; TLC) 分析の結果、¹²⁵I-IMZ の減少に伴い、複数の放射性代謝物の生成が確認された。次に、¹²⁵I-IMZ のマウス体内分布実験を行った結果、胆汁排泄と尿中排泄の2つの排泄経路が確認されたことから、¹²⁵I-IMZ を投与したマウスの肝臓、胆嚢、膀胱を経時的に摘出し、組織中の放射性代謝物を TLC 分析した。その結果、代謝が行われる肝臓では未変化体と放射性代謝物が混在しているのに対し、排泄先である胆汁中、尿中では放射性物質の90%以上が ¹²⁵I-IMZ の放射性代謝物であった。以上より、¹²³I-IMZ 投与後の胆嚢と膀胱中放射能の経時的画像化により、薬物代謝酵素活性を定量できる可能性が示された。

I. はじめに

ヒトに投与された医薬品は薬物代謝酵素によって代謝されるが、その酵素活性には個人差があり、薬効や副作用発現の個体差要因となっている。特に、薬物代謝酵素活性が低いと薬物代謝が活発に行われないため、体内に薬物が多く残り、副作用のリスクが高くなることから、この薬物代謝酵素の活性を測定することで、個人に最適な処方薬の投与量をオーダーメイドで決定することが副作用の回避には重要であると考えられる。また、薬物代謝酵素活性の測定を基にして医薬品の投与量を決定することは、薬物療法の個別化における昨今重要視されている根拠に基づいた医療 (evidence-based medicine ; EBM) の観点からも、非常に有用である。

当研究室ではこれまで、核医学画像診断薬から生じる放射性代謝物の生成量から薬物代謝酵素活性を評価するため、既に脳血流製剤として臨床利用されている ¹²³I-N-isopropyl-p-iodoamphetamine (¹²³I-IMP) を用いて、主に肝臓に存在しており多くの薬物を代謝基質とする cytochrome P450 (CYP) と呼ばれる薬物代謝酵素の活性を評価する¹⁾一方、この CYP の活性評価から肝臓で生じた放射性代謝物が直接排泄される胆嚢の画像化による薬物代謝酵素活性定量法を提唱してきた²⁾。

本研究では、臨床核医学検査で神経レセプタイマーゼンジン剤としててんかん焦点の診断に使用されている ¹²³I-Iomazenil (Ethyl-5,6-dihydro-7-¹²³I-iodo-5-methyl-6-oxo-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzodiazepine-3-carboxylate ; ¹²³I-IMZ) が生体内で放射性代謝物に変化するという報告^{3,4)}に着目した。¹²³I-IMZ の放射性代謝物には ¹²³I-IMZ の水酸化物、脱エステル体、脱エステル体のグルク

ロン酸抱合体とあり，それぞれ水酸化酵素，エステラーゼ，グルクロン酸抱合酵素 (UDP-glucuronosyltransferase ; UGT)と呼ばれる薬物代謝酵素によって代謝される (Fig.1).

そこで $^{123}\text{I-IMZ}$ の ^{125}I 標識体である $^{125}\text{I-IMZ}$ を用いて放射性代謝物を分析することで薬物代謝酵素活性定量法への応用を検討した.

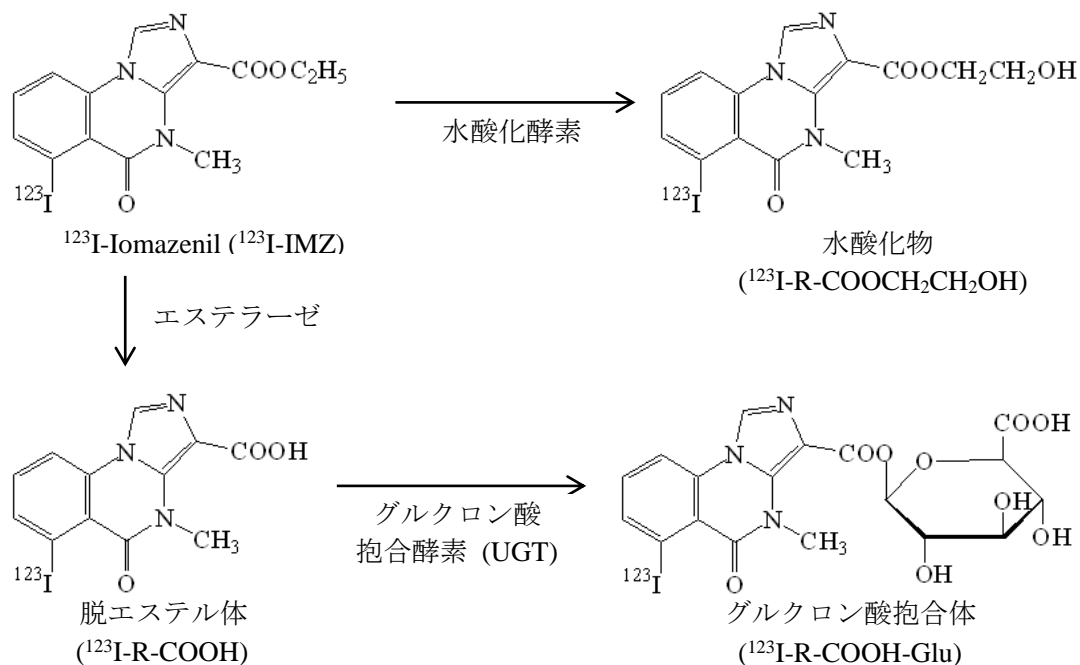


Fig.1 $^{123}\text{I-IMZ}$ の主な代謝経路のフローチャート

II. $^{125}\text{I-IMZ}$ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物分析

$^{125}\text{I-IMZ}$ が肝臓で代謝されることを確認するために， $^{125}\text{I-IMZ}$ をマウス肝ホモジネートに添加後生成する放射性代謝物分析を行った.

A) 実験材料と方法

マウス肝ホモジネート 20 μL に 100 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) 70 μL ，薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 (0.5 mM $\beta\text{-NADP}^+$ 4.5 mg, 5.0 mM glucose-6-phosphate 18.2 mg, 1.0 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase 10.72 μL , 5.0 mM MgCl_2 53.6 μL を用時混和した溶液) 25 μL ，370 kBq の $^{125}\text{I-IMZ}$ 25 μL を混合し，反応溶液が 250 μL になるように精製水を加えた. 活性の発現に NADPH が必要な薬物代謝酵素 CYP により $^{125}\text{I-IMZ}$ が代謝を受けるか否かを確認するため，NADPH 生成系を精製水に置き換えたサンプルを用意した. $^{125}\text{I-IMZ}$ は日本メジフィジックスより供与されたものを用いた. 各サンプルに $^{125}\text{I-IMZ}$ を添加後，37 度で一定時間 (5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 分) インキュベーションした. その後，反応を停止させるためにエタノール 50 μL を添加し，15000 rpm で 5 分間遠心分離した. 遠心分離後，上清を分取し，クロロホルム：酢酸：精製水 = 65:35:5 を展開溶媒とするシリカゲル薄層板 (Merck) による薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography ; TLC) にて分析した. $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物である水酸化物，脱エステル体，グルクロン酸抱合体の同定には日本メジフィジックス株式会社中央研究所の Yoshimura らの先行研究の Rf 値を参考にした.

B) 結果と考察

^{125}I -IMZ の肝ホモジネートにおける放射性代謝物の TLC 分析結果を Fig.2 に示す. マウス肝臓内において, NADPH 生成系の有無に関わらず, ^{125}I -IMZ がエステラーゼによって経時的に代謝され脱エステル体が生成されることが確認できた. また, ^{125}I -IMZ の水酸化物の生成は NADPH 存在下のみで確認されたことから, 水酸化には CYP が関与していることが確認できた.

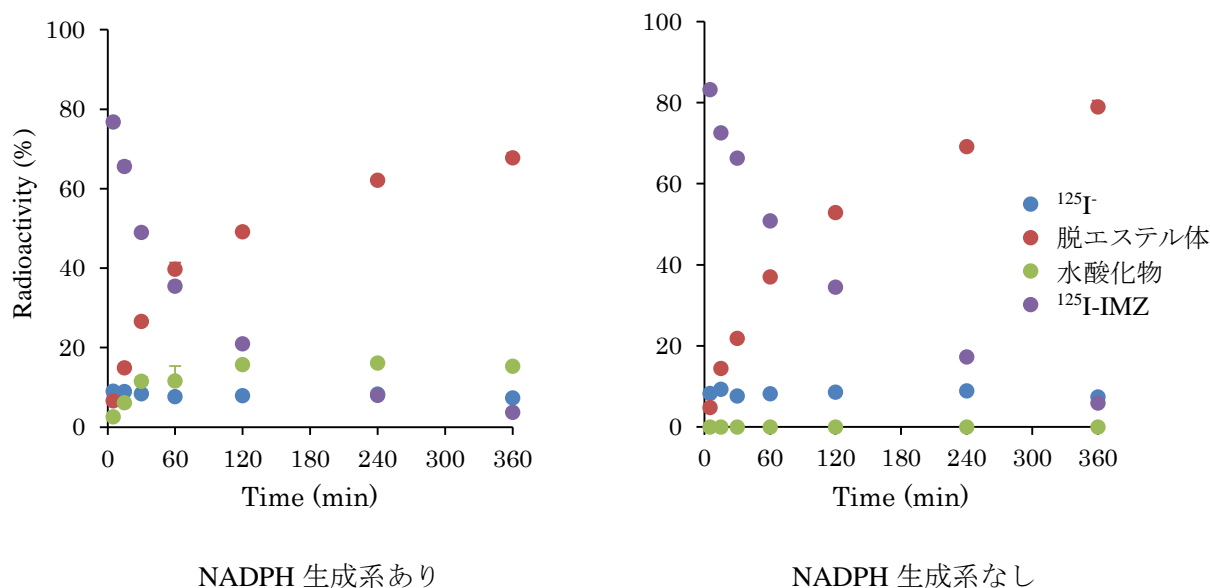


Fig.2 肝ホモジネートにおける ^{125}I -IMZ の放射性代謝物の経時変化

III. ^{125}I -IMZ のマウス体内分布実験

II の実験において ^{125}I -IMZ が肝臓において代謝されていることが確認されたため, ^{125}I -IMZ の放射性代謝物の排泄経路を確認するためにマウス体内分布実験を行った.

A) 実験材料と方法

マウス (ddY, 雄, 6 週齢) に ^{125}I -IMZ を 1 匹あたり 18.5 kBq/100 μL ずつ尾静脈投与した. 一定時間 (2, 5, 10, 30, 60, 120 分) 経過後, イソフルラン麻酔下にて心臓から 200 μL 採血した後, 脳, 甲状腺, 肺, 心臓, 胃, 肝臓, 胆嚢, 脾臓, 膵臓, 小腸, 大腸, 腎, 膀胱を摘出した. オートウェル γ カウンター (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で血液および各臓器の放射能を計測し, 集積率を次式にて算出した. なお血液の集積率は, マウスの体重から総血液量が約 2 mL であると仮定して計算した.

$$\text{集積率 [\%injected dose (\%ID)]} = (\text{組織放射能 [cpm]} / (\text{投与放射能 [cpm]})) \times 100$$

B) 結果と考察

摘出組織のうち、早期に高集積を示した肝臓、腎臓それぞれの排泄経路に関連する組織への集積率を Fig.3 に示す。肝臓、腎臓に早期に集積した後、それぞれ肝臓からは胆嚢、小腸、大腸へ、腎臓からは膀胱へ放射能の大部分が速やかに排泄されていることが確認できた。

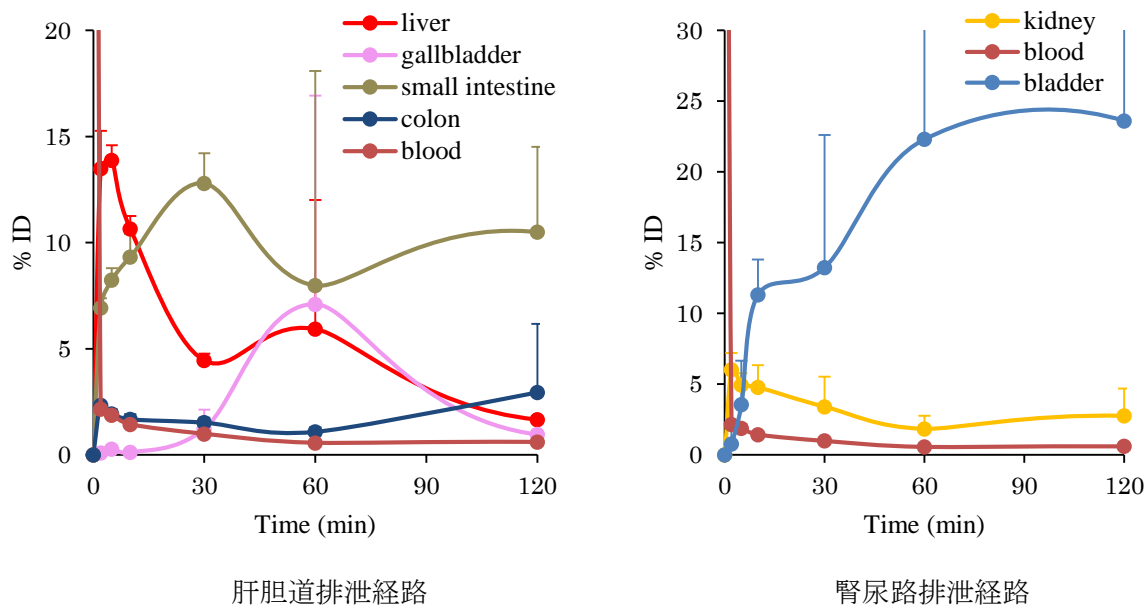


Fig.3 $^{125}\text{I-IMZ}$ 投与マウスの各排泄経路における集積率の経時変化

IV. $^{125}\text{I-IMZ}$ 投与マウスの肝臓中、胆汁中、尿中における放射性代謝物分析

III の体内分布実験から、 $^{125}\text{I-IMZ}$ は主に胆嚢、膀胱へ排泄されていることが確認された。そこで、胆汁中、尿中に排泄される放射能は代謝を受けていない未変化体か、または $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物であるのかを検討するため、マウスの肝臓、胆嚢、膀胱に存在する放射性化合物を TLC 分析した。

A) 実験材料と方法

マウスに $^{125}\text{I-IMZ}$ を 1 匹あたり 3.0 MBq ずつ尾静脈投与した。一定時間 (10, 30, 60 分) 経過後、肝臓、胆嚢、膀胱を摘出し、肝臓は除タンパクのためのエタノールを加えてよく攪拌し、15000 rpm で 5 分間遠心分離した上清を、胆嚢、膀胱から採取した胆汁、尿はそのままの状態をクロロホルム：酢酸：精製水 = 65 : 35 : 5 の展開溶媒で TLC 分析した。

B) 結果と考察

肝臓中での放射性化合物組成の経時変化を Fig.4 に、胆汁中、尿中での放射化合物組成の経時変化を Fig.5 に示す。グラフは集積率及びその集積における $^{125}\text{I-IMZ}$ の未変化体と各放射性代謝物の割合を示す。投与後 10 分の早期の肝臓においては、 $^{125}\text{I-IMZ}$ の未変化体と代謝物が混在していたが、投与後 30 分以降は代謝物のみが確認された。また、全ての時間において胆汁中、尿中に含まれる未変化体は 1% 以下と極僅かであり、集積した放射能の 90% 以上が放射性代謝物であった。特に胆汁中のみならず尿中でも未変化体が確認されなかったことより、尿中放射性代謝物が新たな薬物代謝酵素活性定量法の指標となる可能性が見出された。また、肝臓中ではグルクロン酸抱合

体が 1.5%以下であったのに対し、胆汁中、尿中では 10%前後存在したことから肝臓で代謝されたグルクロン酸抱合体が肝臓から速やかに胆汁中、尿中へ排泄されたと考えられる。

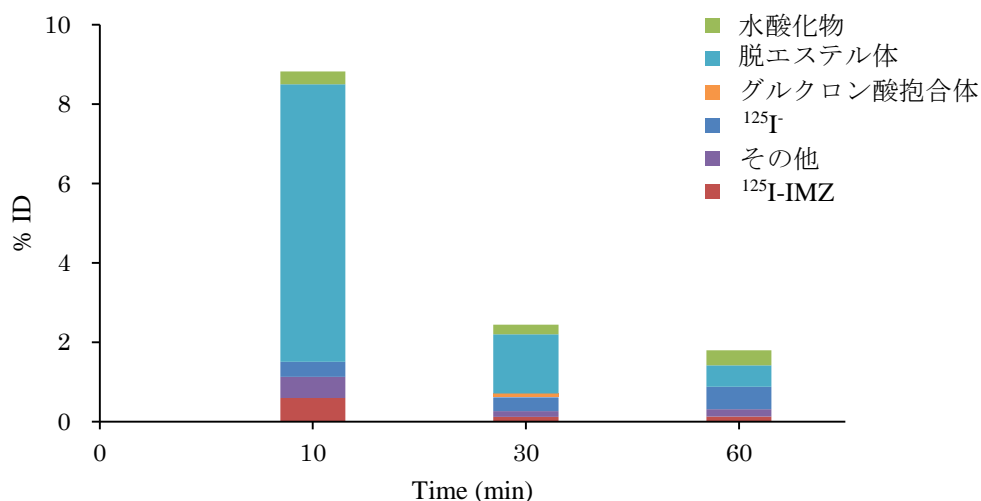


Fig.4 肝臓中各組成の経時変化

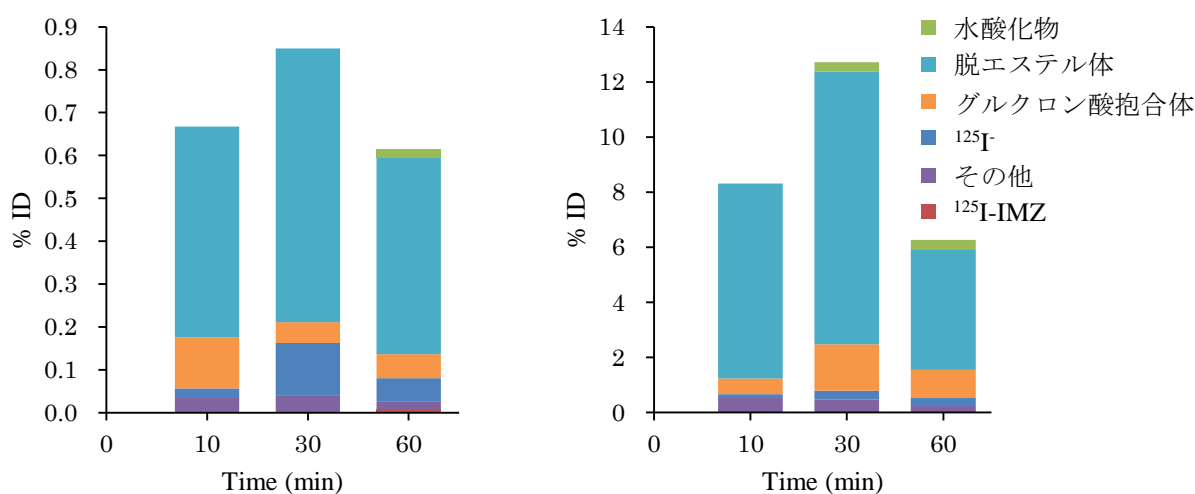


Fig.5 胆汁中、尿中各組成の経時変化 (左図：胆汁, 右図：尿)

V. 結語

本研究より、以下の 2 点が確認された。

- (1) $^{125}\text{I-IMZ}$ は肝臓で経時的に代謝を受け、放射性代謝物を生成した。生じた放射性代謝物のうち $^{125}\text{I-IMZ}$ の水酸化物の生成には CYP が関与していることを確認できた。
- (2) $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物の排泄は肝胆道系と腎尿路系の 2 つの排泄経路があり、排泄先である胆汁中、尿中における放射性化合物の大部分が $^{125}\text{I-IMZ}$ の放射性代謝物であった。

以上より、胆汁中、尿中へは肝臓で生成された放射性代謝物が優先的に排泄されていると推定でき、 $^{125}\text{I-IMZ}$ を投与した際の胆嚢、膀胱への集積をダイナミックイメージングで捉えることにより、その経時的集積曲線から CYP や UGT などの薬物代謝酵素の活性を非侵襲的に定量できる可能性が示された。

VI. 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導くださいました川井恵一教授、健康増進科学センター小林正和助教、ご協力いただいた水谷明日香さん、高橋浩太郎さんをはじめとする本研究室の方々に心より御礼申し上げます。また、研究試料として $^{125}\text{I-IMZ}$ をご提供いただきました日本メジフィジックス株式会社に感謝いたします。

VII. 参考文献

- 1) Nishi K, Mizutani A, Shikano N, Fujita K, Kobayashi M, Ono M, Nishii R, Sasaki Y, Kinuya S, Kawai K : In vivo radioactive metabolite analysis for individualized medicine , a basic study of a new method of CYP activity assay using $^{123}\text{I-IMP}$. Nucl Med Biol, 2015; 42: 171-176.
- 2) 水谷 明日香, 高橋 浩太郎, 外間 つづみ, 小林 正和, 北村 正典, 国嶋 宗隆, 川井 恵一, 福地 一樹 : イメージングによる肝臓の薬物代謝酵素 CYP 活性測定を可能にするヨウ素標識診断薬の開発. 第 55 回日本核医学会学術総会抄録集. 核医学. 2015; 52(3): 290.
- 3) 吉村 弘一, 柳井 明良, 松本 博樹, 井田 圭子, 倉見 美規, 米倉 義晴, 鳥塚 莞爾 : イオマゼニル (^{123}I) の薬物動態に関する検討. 核医学. 1995; 32: 1037-1043.
- 4) 日本メジフィジックス株式会社 : ベンゾタイン[®]注, 医薬品インタビューフォーム. 2013.