

1606 経口標識アミノ酸薬剤を用いた消化管吸収機能の 選択的測定法の検討

二口 翔太

(指導教員：川井 恵一 教授)

要旨：小腸の消化管吸収機能が低下している場合には、経口薬が消化管から体内に十分に吸収されず、その効果を十分に発揮できない。現在、血液分析により消化管吸収機能の評価を行うことは可能であるが、この分析は経口薬が全身に分布し代謝されるなど、様々な影響を受けた結果であり、消化管吸収機能のみを選択的に測定する方法を確立することが重要である。本研究では、アミノ酸の L-tyrosine (L-Tyr) に着目し、消化管吸収機能の選択的な測定法の開発を目的とした。放射性ヨウ素標識 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ とその光学異性体の $^{125}\text{I-D-Tyr}$ および脱ヨウ素化の指標として $^{125}\text{I-NaI}$ をマウスに経口投与して体内分布実験を行った。その結果、 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ 投与時には、 $^{125}\text{I-NaI}$ に特徴的な分布動態である甲状腺への高い集積と胃への集積が認められたことから、 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ は脱ヨウ素化されたと考えられる。一方、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ の経口投与時には、脾臓・腎臓に投与後早期に集積し、その後、速やかに排泄されるなど静脈投与した場合と類似した組織集積が観察され、アミノ酸の特徴的な動態を反映していた。以上より、 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ が消化管吸収後に脱ヨウ素化され、生じた ^{125}I の甲状腺への特異的集積を利用して消化管吸収機能を測定できる可能性が見出された。また、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ は代謝の影響を受けず、アミノ酸の動態を反映しているため、脾臓・腎臓への集積を測定することで消化管吸収機能の選択的な測定の可能性が示唆された。

I. はじめに

経口薬は、投与が簡便で苦痛を伴わないという利点を有しており、薬物療法において重要な役割を果たしてきている¹⁾。経口薬を服用すると、その成分は胃から小腸に移行し小腸から血管内に吸収され、全身に供給される。しかし、様々な要因で小腸の消化管吸収機能が低下している場合には、経口薬が消化管から体内に十分に吸収されず、その効果を十分に発揮できない。また、消化管吸収機能には個人差があり、各人の消化管吸収機能を把握することで、各人により適した投与量を決定することが可能となる。現在、血液分析を用いた消化管吸収機能の評価を行うことは可能であるが、この分析は経口薬が全身に分布し、代謝を含む様々な影響を受けて得られた結果を反映している。また、血液分析では採血を行う必要があり被検者に侵襲的である。以上より、消化管吸収機能のみを選択的に測定する方法を確立することが重要である。本研究では消化管吸収機能測定法開発の基礎検討における経口薬のモデルとして①安価で入手できる、②chloramine-T法により容易に大量の無担体ヨウ素標識体を得ることができる、③先行研究によるマウス静脈注射のデータと比較できる等の理由で、アミノ酸の L-Tyr を使用し、消化管吸収機能の選択的な測定法の開発を目指した。

II. ^{125}I -L-tyrosine、 ^{125}I -D-tyrosine の調製

A) 実験材料と方法

^{125}I -L-Tyr、 ^{125}I -D-Tyr は L-Tyr 及び D-Tyr (Nacalai) を原料として chloramine-T 法により無担体条件下でそれぞれ作成した。 ^{125}I -NaI (American Radiolabeled Chemicals) を 3.7 MBq 分取したエッペンドルフチューブに、0.4 M リン酸緩衝溶液 (pH6.2) で 1.0×10^{-7} mol/100 μL (1.0×10^{-9} μM) に調整した各 Tyr 溶液 100 μL と 0.05 M リン酸緩衝溶液 (pH 6.2) で 1.0×10^{-8} mol/25 μL (4.0×10^{-10} μM) に調整した chloramine-T (Nacalai) 溶液 25 μL を加えて反応を開始した。反応開始後 15 分で、ピロ亜硫酸ナトリウム飽和溶液を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.2) で 10 倍に希釈した溶液 25 μL を加えて反応を停止した²⁾。

^{125}I -L-Tyr 及び ^{125}I -D-Tyr の標識率は、展開溶媒にメタノール：酢酸=100：1 を用いたシリカゲル薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography : TLC, Silica Gel 60 F254, Merck) で分析し、オートウェル γ カウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) で評価した。

また、高速液体クロマトグラフィー (High-performance liquid chromatography : HPLC, Hitachi) を用いて、以下の条件で精製を行った。HPLC の分離条件は、流速を 1.0 mL/min、UV 吸光波長を 254 nm を設定し、移動相に citric acid buffer (pH 7.0) : acetonitrile=30 : 70 を用いた。順相カラムには、親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography, COSMOSIL HILIC, Nacalai) を使用した。約 6~7 分の溶出時間で検出される ^{125}I -L-Tyr 及び ^{125}I -D-Tyr を分取し、窒素還流下で液量を減容した後に上記 TLC を用いて放射化学的純度検定を行った。

B) 結果と考察

^{125}I -L-Tyr 及び ^{125}I -D-Tyr は 65~70% の標識率で得られた。また、精製した結果、放射化学的純度 95% 以上の ^{125}I -L-Tyr 及び ^{125}I -D-Tyr を無担体状態で得られた。

III. マウス体内分布実験

A) 実験方法と材料

II. で得られた ^{125}I -L-Tyr 及び ^{125}I -D-Tyr と購入した ^{125}I -NaI を 74 kBq/200 μL となるように超純水で希釈した。

各溶液を経口ゾンデ (Fuchigami) を用いてマウス (ddY、雄、6~10 週齢) に 1 匹当たり 74 kBq/200 μL を経口投与として胃内投与した。投与後 10 min, 30 min, 1 hour, 2 hour, 6 hour, 24 hour で心臓採血を行い、甲状腺、胃、脾臓及び腎臓を摘出した (n=4)。臓器摘出後、重量を測定し、オートウェル γ カウンタで放射能を測定した。

B) 結果と考察

経口投与による甲状腺の組織集積率 (Fig.1) を示した。その結果、 ^{125}I -L-Tyr が ^{125}I -NaI と類似した集積をしていたのに対し、 ^{125}I -D-Tyr の集積は僅かであった。甲状腺は血中の無機ヨウ素 I を選択的に取り込む³⁾。そのため ^{125}I -L-Tyr と ^{125}I -NaI の集積が類似しているのは、 ^{125}I -L-Tyr が脱ヨウ素化され、生じた ^{125}I の動態を反映していることが示唆された。一方、 ^{125}I -D-Tyr は脱ヨウ素化を受けていないと考えられた。

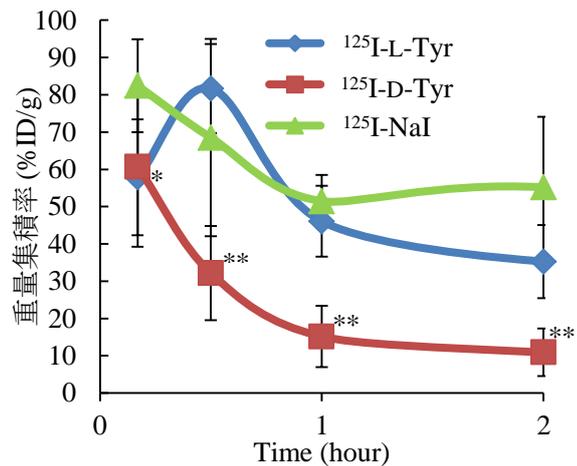
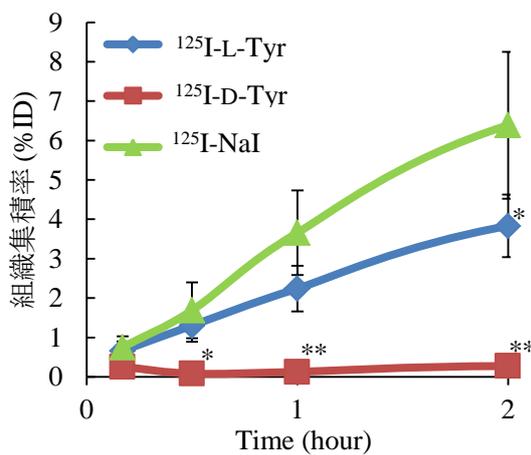


Fig.1 経口投与による甲状腺の組織集積率

Fig.2 経口投与による胃の重量集積率

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared with ¹²⁵I-NaI

経口投与による胃の重量集積率 (Fig.2) を示した。投与後 30 min 以降で ¹²⁵I-D-Tyr と ¹²⁵I-NaI の集積において有意差が見られた。脱ヨウ素化後の放射能は甲状腺へ集積するほか、胃にもよく集まる⁴⁾。¹²⁵I-D-Tyr と ¹²⁵I-NaI の集積差は、¹²⁵I-D-Tyr は胃からの排泄だけを反映しているのに対し、¹²⁵I-NaI では胃からの排泄と吸収後の胃への分泌の双方から影響を受けているためと考えられる。一方で、¹²⁵I-L-Tyr の集積が ¹²⁵I-NaI の集積のように一定量ある理由は、¹²⁵I-L-Tyr が脱ヨウ素化され、生じた ¹²⁵I が胃に分泌したためと考えられる。したがって、¹²⁵I-L-Tyr の脱ヨウ素化が胃の結果からも裏付けられた。

経口投与による膵臓 (Fig.3) と静脈投与による膵臓の重量集積率 (Fig.4) を示した。Fig.3 において、経口投与された ¹²⁵I-D-Tyr は膵臓に対して早期に集積し、迅速に排泄された。この分布動態は Fig.4 の静脈投与後の高い集積と、5分をピークとした速やかな排泄といった分布動態と類似していた。また、経口投与における ¹²⁵I-L-Tyr と ¹²⁵I-NaI の分布動態は類似していた。

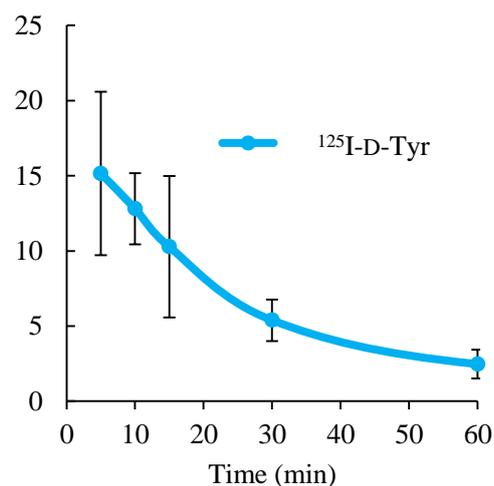
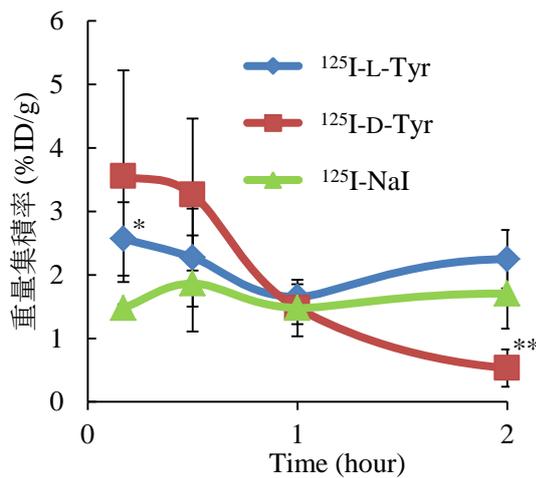


Fig.3 経口投与による膵臓の重量集積率

Fig.4 静脈投与による膵臓の重量集積率

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ compared with ¹²⁵I-NaI

経口投与による腎臓 (Fig.5) と静脈投与による腎臓の重量集積率 (Fig.6) を示した。経口投与による腎臓への $^{125}\text{I-D-Tyr}$ の集積は、投与後早期から高く、投与後 1 hour で最大になり、迅速に排泄されているのに対して、静脈投与による $^{125}\text{I-D-Tyr}$ の腎臓に対する集積は、投与後早期に最大になり、その後迅速に排泄されていた。したがって、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ を経口・静脈投与した場合の分布動態は、消化管吸収過程による時間差はあるものの、その経時的動態パターンは類似していると思われた。一方、腎臓でも経口投与における $^{125}\text{I-L-Tyr}$ と $^{125}\text{I-NaI}$ の分布動態は類似していた。

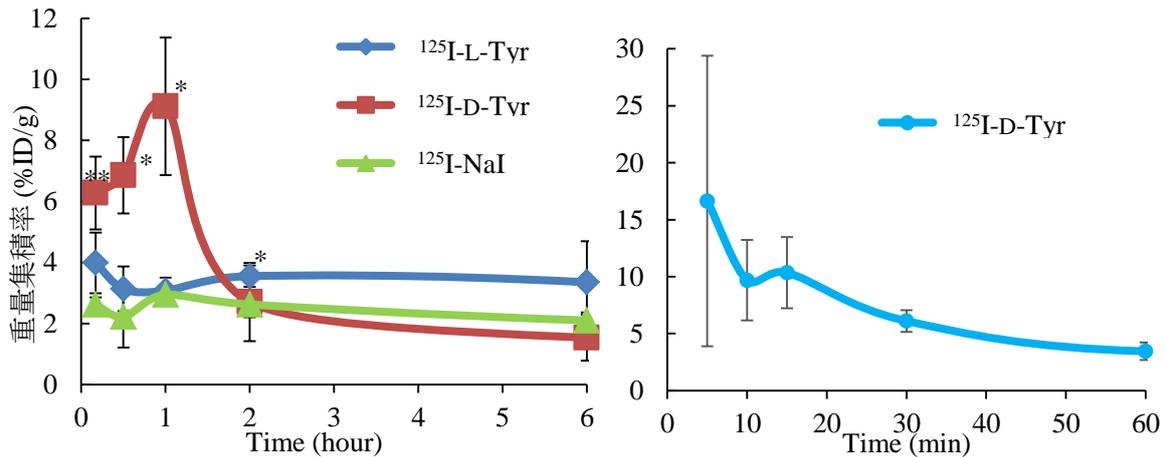


Fig.5 経口投与による腎臓の重量集積率

Fig.6 静脈投与による腎臓の重量集積率

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ compared with $^{125}\text{I-NaI}$

$^{125}\text{I-L-Tyr}$ を経口投与した場合に、 $^{125}\text{I-NaI}$ と類似した動態が甲状腺と胃の集積で確認されたため、 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ は脱ヨウ素化されたと考えられる。脱ヨウ素化により生じた ^{125}I は甲状腺に特異的に集積するため、未変化の $^{125}\text{I-L-Tyr}$ が消化管から吸収された後に体内で脱ヨウ素化を受けると仮定した場合、甲状腺への集積を測定することで消化管吸収機能を測定できる可能性が見出された (Fig.1, 2)。また、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ は経口投与後早期に脾臓と腎臓に集積し、その後、速やかに排泄された (Fig.3, 5)。 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ を静脈注射した場合と類似した組織集積が観察され、アミノ酸の特徴的な動態を反映しており、脱ヨウ素化も含めて代謝の影響を受けないことが示唆された。したがって、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ は脾臓と腎臓へ特異的な集積を経時的に測定することで、消化管吸収機能を測定できる可能性が見出された。

IV. L-tyrosine の同時投与実験

L-Tyr の同時投与による消化管吸収競合障害を指標として $^{125}\text{I-L-Tyr}$ が消化管内で脱ヨウ素化されていないことを確認するために、予備検討として L-Tyr 溶液同時投与時の $^{125}\text{I-L-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-NaI}$ のマウス体内分布実験を行い、無負荷時の動態と比較した。

A) 実験方法と材料

$^{125}\text{I-L-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-NaI}$ を 74 kBq/200 μL となるように L-Tyr 溶液 (1mM) で希釈し、L-Tyr 負荷溶液を作成した。また、III. で用いた $^{125}\text{I-L-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ 、 $^{125}\text{I-NaI}$ 希釈溶液を control 用として用いた。各溶液を経口ゾンデを用いてマウス (ddY、雄、6週齢) に 1匹当たり 74 kBq/200 μL

を経口投与した。投与後 30 min で心臓採血を行い、甲状腺、膵臓を摘出した (n=4)。臓器摘出後、重量を測定し、オートウェルγカウンタで放射能を測定した。

B) 結果と考察

Fig.7 に経口投与による甲状腺の組織集積率 (%ID)、Fig.8 に経口投与による膵臓の重量集積率 (%ID/g) を control と L-Tyr 負荷時を比較して示す。 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ の甲状腺への集積は ^{125}I の特異的集積と類似していた (Fig.7)。また、 $^{125}\text{I-L-Tyr}$ の甲状腺への集積で control と L-Tyr 負荷時で検定を行ったところ、有意差がなく L-Tyr による競合阻害を確認できなかったため、経口投与後 30 分の時点では $^{125}\text{I-L-Tyr}$ は消化管内で脱ヨウ素化されている可能性が示唆された。ただし、消化管内で $^{125}\text{I-L-Tyr}$ がどの程度脱ヨウ素化されているかを確認することは今後の課題である。一方、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ は甲状腺への集積が僅かで (Fig.7)、膵臓に特異的に集積していることから (Fig.8)、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ の集積はアミノ酸の分布動態を反映し、脱ヨウ素化をはじめとする代謝の影響をほとんど受けていないことが確認された。

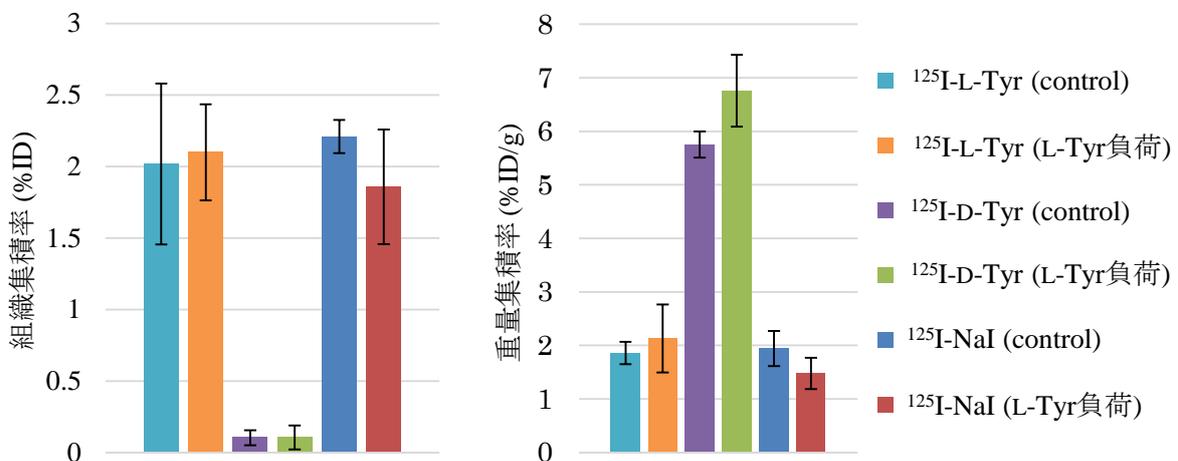


Fig.7 経口投与による甲状腺の組織集積率

Fig.8 経口投与による膵臓の重量集積率

V. 結語

$^{125}\text{I-L-Tyr}$ は生体内に吸収される前に脱ヨウ素化されている可能性が示唆された。しかし、経口投与時早期の $^{125}\text{I-L-Tyr}$ と $^{125}\text{I-NaI}$ の分布の差を考慮すると、全ての $^{125}\text{I-L-Tyr}$ が消化管内で脱ヨウ素化されているとは考えにくく、脱ヨウ素化を受けず消化管吸収される $^{125}\text{I-L-Tyr}$ が存在する場合、甲状腺に特異的に集積する ^{125}I を利用して消化管吸収機能を測定できる可能性が見出された。また、 $^{125}\text{I-D-Tyr}$ は消化管吸収後の体内分布で脱ヨウ素化も含めた代謝の影響をほとんど受けず、アミノ酸の動態を反映しているため、膵臓・腎臓の集積を経時的に測定することで選択的な消化管吸収機能を測定できる可能性が示された。

VI. 謝辞

本研究を終えるにあたり、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、本研究室大学院生井原正明さん、ご協力いただきました本研究室の方々に心より感謝申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) 湯浅博昭：経口薬物吸収に関わる生理学的要因の定量的評価：薬物の胃腸管内動態の速度論的解析. *薬物動態*, 11(4) : 421-426 (1996).
- 2) Kawai K, Fujibayashi Y, Saji H, Konishi J, Kubodera A, Yokoyama A : 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).
- 3) 大塚満州雄：慢性甲状腺の研究 第 2 編 甲状腺内ヨウ素代謝. *信州医学雑誌*, 16 (4) : 626-635(1967).
- 4) 石倉始, 五島廉輔, 為政脩：腓スキャンニング剤の開発的基礎研究. *Radioisotopes*, 28 (3) : 151-156 (1979).