

# 1701 イメージングによる薬物代謝酵素活性定量に向けた 代謝機能診断薬の開発

丸山 みち香

(指導教員:川井 恵一 教授)

要旨:生体に投与された医薬品は cytochrome P450 (CYP) をはじめとする薬物代謝酵素によって代謝されるが、薬物代謝酵素の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、薬物代謝酵素の中でも多くの医薬品の代謝に関与する CYP に着目し、イメージングによる生体内 CYP 活性定量法の確立を目指してきた。本研究では、抗ヒスタミン剤であり、CYP2D6 の基質である mequitazine の  $^{125}\text{I}$  標識体である  $^{125}\text{I}$ -mequitazine ( $^{125}\text{I}$ -IMQ) を用いてマウス体内分布及び放射性代謝物分析を行った。 $^{125}\text{I}$ -IMQ マウス体内分布の結果、投与早期で肝臓に集積し、その後速やかに胆嚢に移行していることが確認された。次に  $^{125}\text{I}$ -IMQ を投与したマウスから胆嚢を摘出し、組織中の放射性物質を TLC で分析した結果、胆汁内の放射性物質のうち 90%以上が  $^{125}\text{I}$ -IMQ の代謝物であることが確認された。また、マウス肝マイクロゾームにおける代謝物を分析した結果、 $^{125}\text{I}$ -IMQ が CYP2D6 で代謝されることを確認した。以上より、 $^{125}\text{I}$ -IMQ は薬物代謝酵素活性の画像診断薬としての条件を満たしており、胆汁排泄された放射性代謝物の放射能を経時的に画像化することで肝臓での CYP2D6 の活性を定量評価できる可能性が示された。

## I. はじめに

生体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、その薬物代謝酵素の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。したがって、薬物代謝酵素活性を定量評価することで薬物治療において個別化医療が実現できると考えられ、すでに既存の SPECT 製剤  $^{123}\text{I}$ -iodoamphetamine を用いた CYP2C19 のアッセイ法が確立されている<sup>1,2)</sup>。

当研究室では、多くの医薬品の代謝に関与する cytochrome P450 (CYP) と呼ばれる薬物代謝酵素に着目し、新規放射性薬剤を用いたイメージングによる CYP 活性定量法の確立を目指してきた<sup>3)</sup>。

本研究では、

- (1) 肝臓などの代謝系組織に速やかに高集積し
- (2) 肝臓中の特定の CYP によって代謝され
- (3) 未変化体は組織から排出されず
- (4) 生じた放射性代謝物が速やかに胆汁排泄される

という 4 条件を満たす診断薬があれば、イメージングによって薬物代謝酵素活性を定量的に評価できると考え、それらの条件を満たす薬物代謝酵素画像診断薬を用いたイメージングによる生体内 CYP 活性定量法の確立を目的とした。

## II. Mequitazine の $^{125}\text{I}$ 標識、精製

Mequitazine (MQ) は CYP2D6 の特異的な基質であることが報告されている抗ヒスタミン剤である<sup>4)</sup>。この MQ に  $^{125}\text{I}$  標識を行い、放射性薬剤  $^{125}\text{I}$ -mequitazine ( $^{125}\text{I}$ -IMQ) を得た。

### A) 方法と結果

4-(Tributylstannyl) benzyl bromide (過剰量) のジクロロメタン溶液 0.25 mL に、酢酸 0.02 mL と少量の  $^{125}\text{I}$ -NaI、濃度 70% の t-BuOOH 水溶液 33  $\mu\text{L}$  (0.24 mmol) を加え、最後に硫酸ナトリウム適量を加えて 5 分間攪拌した。クロロホルム:ヘキサン=1:9 を展開溶媒とする薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography: TLC) にて分析し、オートウェルγカウンター (Accuflex  $\gamma$  7000, Alola) で放射能を測定して Rf 値 0.4 前後に生成物が生じていることを確認した。飽和チオ硫酸ナトリウム水溶液を加え、クロロホルム 5 mL で 3 回抽出後、窒素置換により有機相を取り除いた。4-Iodobenzyl bromide のアセトニトリル溶液 0.5 mL に、0.1 mmol の MQ32 mg (住友化学株式会社より供与) を加えて 5 分間攪拌した。メタノール:酢酸=100:1 を展開溶媒とする TLC にて分析し、放射能を測定して Rf 値 0.5 に生成物が生じていることを確認した。濃縮後、高速液体クロマトグラフィ (high-performance liquid chromatography: HPLC) で MQ と生成物が分離されていることを確認した。HPLC の分析条件は Table.1 に示すとおりである。

標識、精製の結果、標識率約 80%、放射化学的純度約 92%の  $^{125}\text{I}$ -IMQ を得た。

Table.1 HPLC 分析条件

|     |   |    |                 |
|-----|---|----|-----------------|
| カラム | 5C <sub>18</sub> -AR- II (Nacalai tesque)                         | 流速 | 1.0 mL/min      |
| 移動相 | 35% acetonitrile: 65% 20 mM phosphate buffer (pH 2.3), 0-2 min    | UV | 256 nm          |
|     | 50% acetonitrile: 50% 20 mM phosphate buffer (pH 2.3), 2-9.5 min  | RI | 27 keV $\pm$ 5% |
|     | 80% acetonitrile: 20% 20 mM phosphate buffer (pH 2.3), 9.5-16 min |    |                 |

## III. $^{125}\text{I}$ -IMQ のマウス体内分布実験

II の実験で得られた  $^{125}\text{I}$ -IMQ の組織集積性を確認するために、マウスの体内分布を検討した。

### A) 方法

マウス (ddY、雄、6 週齢) に  $^{125}\text{I}$ -IMQ を 1 匹あたり 18.5 kBq/100  $\mu\text{L}$  ずつ尾静脈より投与した。一定時間 (2、10、30 分) 経過後、イソフルラン麻酔下にて心臓から採血した後、心臓、胃、肝臓、胆嚢、腸、腎臓、甲状腺、尿を摘出した。オートウェルγカウンターで血液及び各臓器の放射能を測定し、組織重量集積率を算出した。

## B) 結果と考察

実験結果を Fig.1 に示す。投与後 2 分には肝臓に速やかに集積し、投与後 10 分以降には胆嚢の集積が多くなっていることから、投与後速やかに代謝系組織に高集積する、という薬物代謝酵素画像診断薬の条件 (1) を  $^{125}\text{I-IMQ}$  が満たすことが明らかになった。また、肝臓から何らかの放射性物質が胆汁排泄されていることが示された。

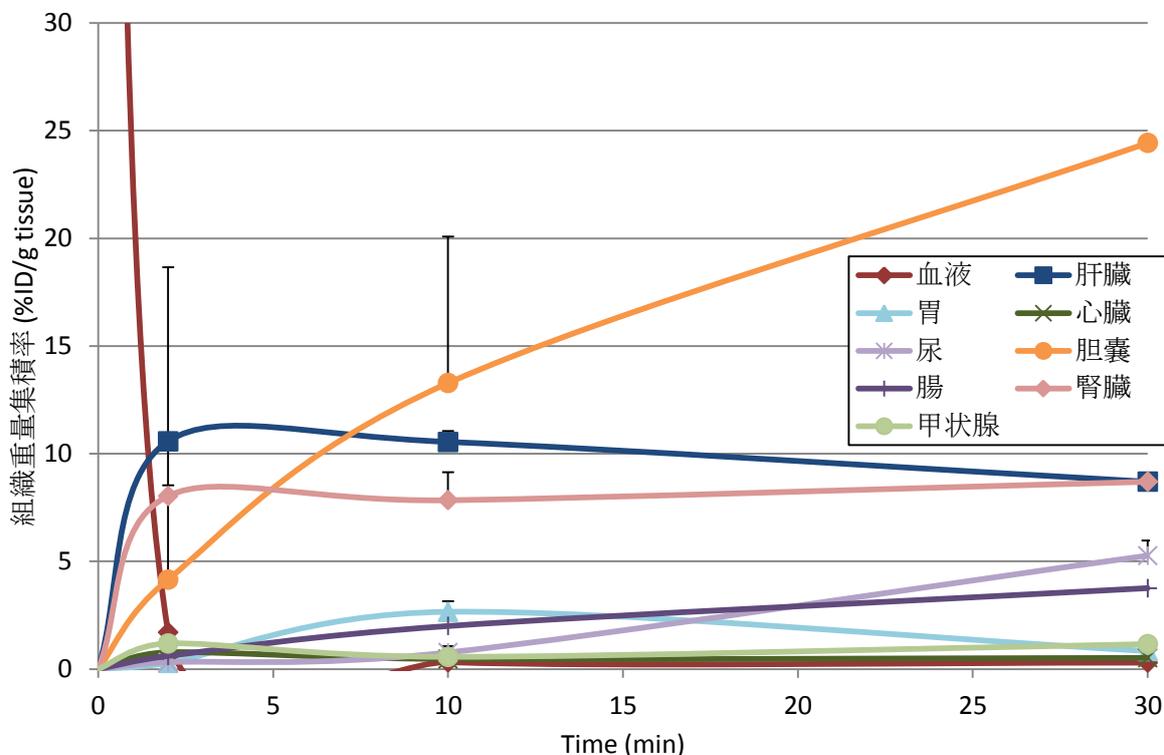


Fig.1  $^{125}\text{I-IMQ}$  のマウス体内分布実験結果

## IV. $^{125}\text{I-IMQ}$ の胆汁中代謝物分析

Ⅲの実験で確認された肝臓から胆汁排泄される放射性物質が代謝物であることを確認するため、胆汁中の放射性物質を分析した。

### A) 方法

マウス (ddY、雄、6 週齢) に  $^{125}\text{I-IMQ}$  を 1 匹あたり 2 MBq/200  $\mu\text{L}$  ずつ尾静脈より投与した。30 分経過後、胆嚢を摘出し、胆汁をクロロホルム:メタノール:酢酸=60:40:1 を展開溶媒とする TLC にて分析した。コントロールとして、 $^{125}\text{I-IMQ}$  を投与していないマウスの胆汁に  $^{125}\text{I-NaI}$  と  $^{125}\text{I-IMQ}$  を加えたものをそれぞれ用意し、同様に TLC 分析を行った。

## B) 結果と考察

$^{125}\text{I}$ -IMQ の胆汁中における放射性代謝物の TLC 分析結果を Fig.2 に示す。コントロールの結果から、 $^{125}\text{I}$  の Rf 値は 0.65-0.75、 $^{125}\text{I}$ -IMQ の Rf 値は 0.50 前後であることが確認された。したがって、 $^{125}\text{I}$ -IMQ を投与したマウス胆汁の中に見出された Rf 値 0.05-0.30 の放射能は  $^{125}\text{I}$ -IMQ 代謝物であると考えられる。

解析の結果、 $^{125}\text{I}$ -IMQ を投与した胆汁の分析結果において、全体の放射能の 90% 以上が  $^{125}\text{I}$ -IMQ 代謝物であり、未変化体はほとんど胆汁へ移行していないため、未変化体は組織から排出されず、生じた放射線代謝物が速やかに胆汁排泄を満たすという画像診断薬の条件 (3) と (4) を  $^{125}\text{I}$ -IMQ が満たすことが明らかになった。

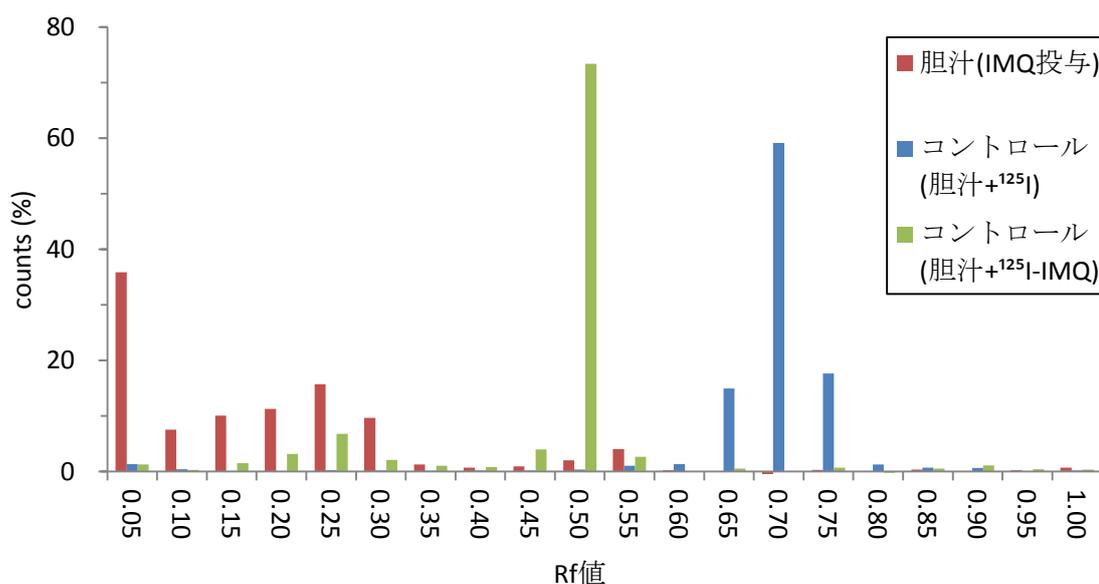


Fig.2  $^{125}\text{I}$ -IMQ の胆汁中代謝物分析結果

## V. $^{125}\text{I}$ -IMQ のマウス肝マイクロゾームにおける代謝物分析

III、IVの実験から、 $^{125}\text{I}$ -IMQ は肝臓で代謝された後、代謝物が速やかに胆汁排泄されることが明らかとなった。そこで、 $^{125}\text{I}$ -IMQ の代謝に関する酵素を特定するためにマウス肝マイクロゾームを用いて代謝物を分析した。

### A) 実験材料と方法

マウス (ddY、雄、6 週齢) をイソフルラン麻酔下で頸椎脱臼して屠殺し、肝臓を採取したのち速やかに湿重量を測定した。採取した肝臓に Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) を肝臓の湿重量の 3 倍量加え、ホモジナイザーを用いて組織を破壊しホモジネートを得た。ホモジネートの作成は氷冷下で行い、同様に 3 匹分のマウス肝ホモジネートを作成し、合わせて混和した。混和後、超遠心機にて 7200 rpm (9000 × g), 20 min で上清を分取し、さらに 24700 rpm (10500 × g), 60 min で遠心かけた。遠心によって得られた沈殿物に Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) を 4.5 mL 添加し、懸濁後再度 24700 rpm (10500 × g), 60 min で沈殿物であるマイクロゾームを分取して、Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) を 4.0 mL 添加した。作成したマイクロゾームは -80°C で保存した。

マウス肝マイクロゾームに 100 mMリン酸緩衝液 (pH7.4) 37.5  $\mu$ L、薬物代謝酵素 CYP のエネルギー源を作り出す NADPH 生成系 25.0  $\mu$ L を混合した。NADPH を必要とする CYP によって  $^{125}$ I-IMQ が代謝されるのかを確認するため、NADPH 生成系を同量の精製水に置き換えたサンプルを用意した。また、 $^{125}$ I-IMQ が標識原料の MQ と同様に CYP2D6 で代謝されるのかを確認するため、CYP2D6 の特異的な基質として MQ を加えたサンプルと CYP2D6 阻害剤としてキニジンを加えたサンプルをそれぞれ用意した。すべてのサンプルが同じ量になるように精製水を加え、各サンプルに  $^{125}$ I-IMQ を 37.5 kBq 添加後、37°C で 15 分間インキュベーションした。その後、エタノール 200  $\mu$ L を添加して反応を停止させ、15000 rpm で 5 分間遠心分離を行った。上清を採取し、メタノール:酢酸=100:1 を展開溶媒とする TLC にて放射能を分析した。

## B) 結果と考察

$^{125}$ I-IMQ の肝マイクロゾームにおける代謝物の TLC 分析結果を Fig.3 に示す。NADPH 生成系を加えない NADPH (-) は NADPH 生成系を加えた NADPH (+) と比べて明らかに  $^{125}$ I-IMQ の代謝が抑制されていることから、NADPH をエネルギーとして用いる CYP による代謝だと考えられる。また、MQ 負荷時、CYP2D6 阻害剤であるキニジン負荷時には NADPH (-) と同程度の阻害が見られたことから、 $^{125}$ I-IMQ の代謝の大部分が CYP2D6 によるものであり、 $^{125}$ I-IMQ は肝臓中の特定の CYP によって代謝される、という画像診断薬の条件を満たすことが確認できた。

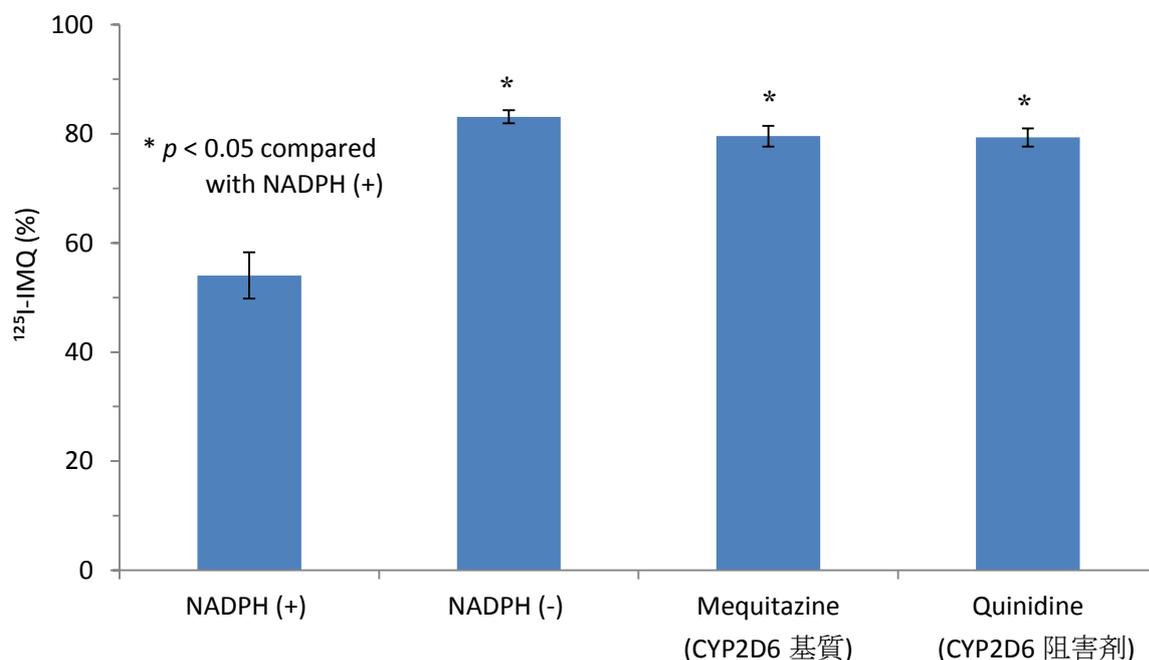


Fig.3  $^{125}$ I-IMQ の肝マイクロゾームにおける代謝物の TLC 分析結果

## VI. 結語

以上の検討から、 $^{125}$ I-IMQ は (1) 肝臓などの代謝系組織に速やかに高集積し、(2) 肝臓中の特定の CYP によって代謝され、(3) 未変化体は組織から排出されず、(4) 生じた放射性代謝物が速やかに胆汁排泄される、という薬物代謝酵素活性の新規画像診断薬の条件をすべて満たしており、 $^{125}$ I-IMQ を用いたイメージング検査を行うことによって、CYP2D6 の活性を経時的に定量評価できる可能性が示された。

## VII. 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、高須啓彰さんをはじめとする本研究室の方々に心よりお礼申し上げます。また、研究資料としてMQをご提供いただきました住友化学株式会社に感謝いたします。

## VIII. 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) Fujita K., Sugiyama M., Akiyama Y., et al., N-Isopropyl-p-iodoamphetamine hydrochloride Is predominantly metabolized by CYP2C19. *Drug Metab Dispos*, 2012; 40: 843-846.
- 3) 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.
- 4) 医薬品医療機器総合機構: ニポラジン<sup>®</sup>、医薬品インタビューホーム、2016