

佐藤 峻

(指導教員: 川井 恵一 教授、水谷 明日香 助教)

要旨: 下垂体後葉ホルモンである oxytocin (Oxt) は女性における授乳促進や子宮平滑筋収縮作用が知られている。また、近年では経鼻 Oxt スプレーにより自閉症が改善する例が報告されるなど脳内での作用が指摘されている。Oxt の脳への輸送経路を明らかにするため、本研究では経鼻投与による血液脳関門を介さない脳内取込み経路として考えられている嗅神経輸送と鼻粘膜上皮細胞輸送に着目し、 ^{125}I 標識 Oxt (^{125}I -Oxt) の経鼻投与後の脳内取込み機序を検討した。クロラミン-T を用いた酸化標識法により Oxt を標識したところ、標識率 80 % 以上、放射化学的純度 94 % 以上で ^{125}I -Oxt が得られ、更に保存時の十分な安定性が確認された。また、マウス肝ホモジネートを用いた肝臓中での代謝安定性について検討した結果、 ^{125}I -Oxt の脱ヨウ素化は起きないものの代謝物の生成が観察されたことから、肝初回通過効果を避ける観点において静注や経口ではなく経鼻投与を行う必要があることが確認された。そこで、 ^{125}I -Oxt と既に嗅神経輸送が確認されている $^{201}\text{Tl}^+$ との経鼻投与後のマウス体内分布を比較した結果、 ^{125}I -Oxt では嗅球への移行が確認されなかったことから嗅神経輸送は否定的であると考えられた。また、鼻腔からの吸収速度が速く、血中濃度が早期に上昇した点からも ^{125}I -Oxt の鼻粘膜上皮細胞輸送の可能性が示された。

I. はじめに

下垂体後葉ホルモンである oxytocin (Oxt) は女性における授乳促進や子宮平滑筋収縮作用が知られており、現在、産科領域において子宮収縮の誘発、促進並びに子宮出血の治療の目的で注射剤のみが認可されている。これらの作用に加え、近年では経鼻 Oxt スプレーにより自閉症が改善する例が報告されるなど Oxt の脳内での作用が報告されている¹⁾。

脳には血液脳関門 (BBB) が存在し、その強固なバリアにより血液から脳への物質の流入を防いでいる。そのため、この BBB を透過する条件を満たすためには薬剤の分子量や化学形が制限される。特に、Oxt を含むペプチドや蛋白質などの高分子化合物は BBB 透過性が低いことが知られている。そこで、古くから薬物投与部位として利用されてきた鼻腔が BBB を介さない脳への薬物輸送経路として注目され、様々な研究がなされている。鼻腔内には呼吸部と嗅部が存在し、経鼻投与された薬剤の脳への輸送には嗅部 (Fig. 1) が関与している。そしてその経路としては以下の 2 つの経路が推察されている²⁾。①嗅神経輸送: 鼻腔に存在する嗅細胞は細長い形状をしており、エンドサイトーシスによりこの神経細胞に取込まれた薬物は軸索輸送を介して嗅球へと運ばれる。②鼻粘膜上皮細胞輸送: 受動拡散により嗅上皮の細胞間隙や細胞実質を透過して粘膜固有層に運ばれ、その後、嗅球や脳脊髄液へと達する経路である。この経路では粘膜固有層を経由するが、毛細血管が密に存在することから投与薬剤の血中移行が問題となる。

そこで本研究では、Oxt の脳への輸送経路を明らかにするため、血液脳関門を介さない経鼻投与による脳内取込み経路として推察されている嗅神経輸送と鼻粘膜上皮細胞輸送に着目し、 ^{125}I 標識 Oxt (^{125}I -Oxt) の経鼻投与後の脳内取込み機序を検討した。

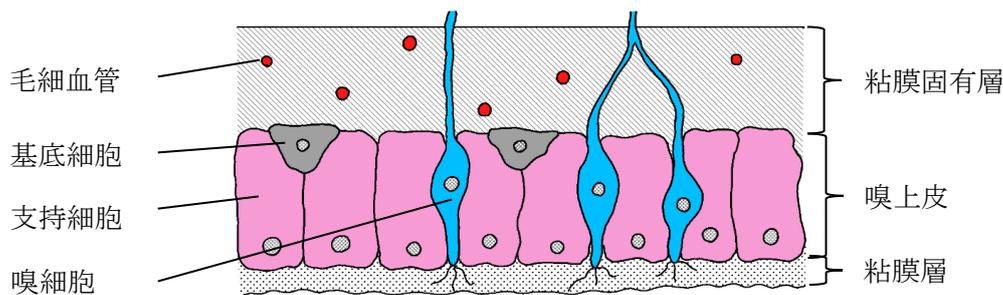


Fig. 1 嗅部の構造

II. ^{125}I -Oxt の標識および精製

(A) 実験方法と材料

Oxt (Fig. 2) の標識は Vecsernyés M らの方法³⁾に従った。標識原料には Oxt を選択し、Oxt の ^{125}I 標識はクロラミン-T を酸化剤として用いる直接標識法を使用した。

^{125}I -NaI (10 MBq) を 7-8 μL の 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した溶液と 2 μg の Oxt (Peptide institute) を 30 μL の 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈した溶液とを混和し、その後 5 μg のクロラミン-T (Nacalai tesque) を 5 μL の 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で溶解した溶液を添加することにより反応を開始した。反応開始から 30 sec 経過後に 900 μL の 1% TFA (Nacalai tesque) を加えることで反応を停止した。

^{125}I -Oxt の標識率はシリカゲル薄層板 (silica gel60 F₂₅₄, Merck) を用いて TLC (thin layer chromatography) 分析し、オートウェル γ カウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka) を用いて評価した。また、展開溶媒にはメタノール (Nacalai tesque) : 酢酸 (Kanto chemical) = 100 : 1 を用いた。

^{125}I -Oxt の分離精製には HPLC (high performance liquid chromatography) を使用し、精製は table 1 に示す条件で行った。そして、分離精製後に上記条件の TLC 分析により放射化学的純度を評価した。

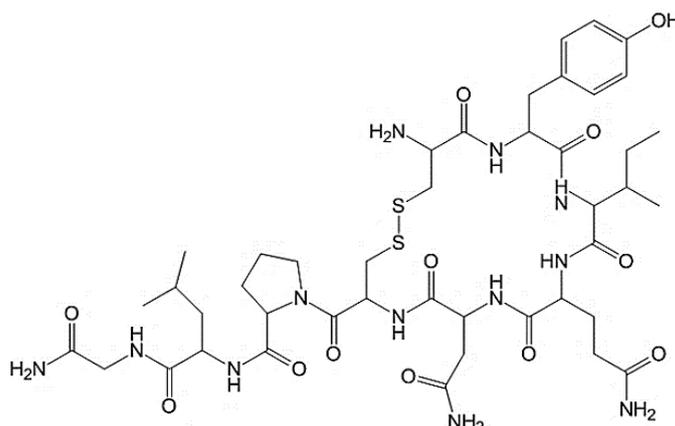


Fig. 2 Oxytocin 構造式

Table 1 HPLC による ^{125}I -Oxt の精製条件⁴⁾

Column	: 5C ₁₈ MS II Packed column (25 cm×4.6 cm)
Solvent system	: 0.01 M リン酸アンモニウム (pH 4.0) : アセトニトリル = 4 : 1
Solvent flow rate	: 2 mL/min
UV	: 254 nm

(B) 結果と考察

^{125}I -Oxt の標識率を TLC 分析により評価した結果、Rf 値は ^{125}I -Oxt: 0.50-0.60, ^{125}I -NaI: 0.75-0.80 であり、標識率は 88.7 % と良好な結果が得られた。Fig. 3 に HPLC 精製時の UV, γ デテクタのクロマトグラムを示す。 ^{125}I -NaI は retention time: 2 min, ^{125}I -Oxt は retention time: 13-14 min で分離された。また、TLC 分析により ^{125}I -Oxt が 94 % 以上の放射化学的純度で得られた。

以上より、クロラミン-T を用いた酸化標識法により良好な標識率で ^{125}I -Oxt が得られた。また、HPLC による分離精製を行った結果、 ^{125}I -Oxt が高い純度で得られた。

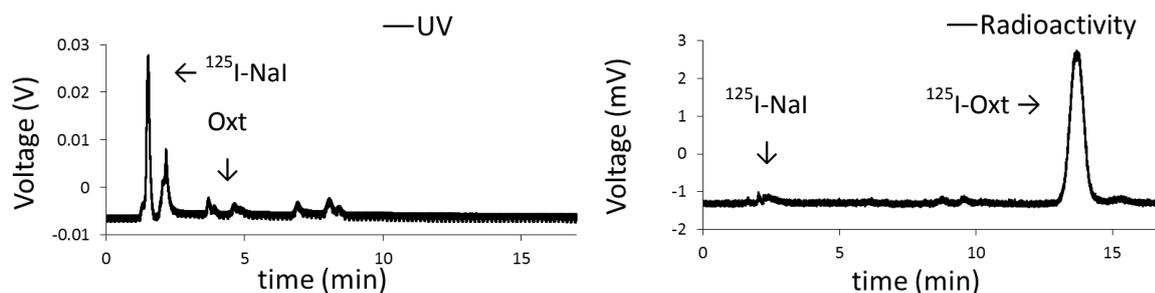


Fig. 3 HPLC による ^{125}I -Oxt のクロマトグラム

III. マウス肝臓中代謝実験

(A) 実験方法と材料

あらかじめ摘出した ddY マウスの肝臓に、Krebs-Ringer phosphate buffer (pH 7.4) をその肝臓の湿重量の 3 倍量加え、ホモジナイザー (Sonifire250, Branson) を用いて組織を破碎し、ホモジネートを得た。このマウス肝ホモジネート 100 μL に ^{125}I -Oxt (1 MBq) を加えることにより反応を開始させ、37 $^{\circ}\text{C}$ の温浴 (T-25J, Thomas) 中で 5 min 振盪させた。その後、100 $^{\circ}\text{C}$ の熱湯中で加熱することにより反応を停止させた。その後、サンプルを高速遠心分離機 (MRX-150, Tomy) を用いて 15000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 5 min で遠心分離し、その上清を TLC 分析した。また、上清中での ^{125}I -Oxt と ^{125}I の Rf 値を確認するため、それぞれをマウス肝ホモジネートの上清と混和させた後に TLC 分析を行った。TLC 分析には展開溶媒としてメタノール: 酢酸 = 100 : 1 を用いた。

(B) 結果と考察

上清中での ^{125}I -Oxt と ^{125}I の Rf 値は ^{125}I -Oxt: 0.60-0.70, ^{125}I -NaI: 0.75-0.80 であった。TLC 分析の結果を table 2 に示す。 ^{125}I -Oxt を加えたマウス肝ホモジネート中では、反応時間 5 min で 12 % の ^{125}I -Oxt の未変化体が確認できた。また、9 % が遊離ヨウ素 ^{125}I 、61 % がその他の画分 (Rf 値: 0.40-0.55) で確認されたことから、 ^{125}I -Oxt は肝臓中で代謝されることが確認された。

以上より、肝初回通過効果による ^{125}I -Oxt の分解代謝を避ける観点において経口投与や経静脈投与ではなく経鼻投与の必要性が確認された。

Table 2 マウス肝臓中での代謝安定性 (%)

^{125}I -Oxt	12.01 \pm 0.85
^{125}I	9.06 \pm 1.01
代謝物	60.56 \pm 2.51

IV. マウス体内分布実験

(A) 実験方法と材料

HPLC 精製後に窒素還流しアセトニトリルを除去した $^{125}\text{I-Oxt}$ と、既に嗅神経輸送が確認されている $^{201}\text{Tl}^+$ の体内分布を比較した⁵⁾。各トレーサーを生理食塩水で希釈し、 $23.1 \text{ kBq}/5 \mu\text{L}$ になるよう調整した。希釈した各トレーサーを、絶食処置を施した ddY マウス (♂、6 週齢、日本 SLC) 3 匹に $23.1 \text{ kBq}/5 \mu\text{L}$ /匹で右の鼻腔内へ投与した。一定時間 (30 min, 1 hour, 3 hour, 6 hour) 経過後にイソフルラン (富士フィルム和光純薬) 麻酔下で心臓採血を行い、頸椎脱臼により屠殺した。その後、速やかに嗅球、鼻を摘出し、それぞれの湿重量を電子天秤 (AUX220, Shimadzu) で測定するとともに、放射能をオートウェル γ カウンタで測定した。また、鼻腔投与とは別に $^{125}\text{I-Oxt}$ を ddY マウス 4 匹に、 $^{125}\text{I-Oxt}$ を $18.5 \text{ kBq}/100 \mu\text{L}$ /匹で尾静脈投与した。一定時間 (15 min, 30 min, 1 hour) 経過後にイソフルラン麻酔下で心臓採血を行い、頸椎脱臼により屠殺した。その後、計測した各臓器の湿重量、放射能から $^{125}\text{I-Oxt}$ と $^{201}\text{Tl}^+$ の組織集積率と重量集積率を以下の式より算出した。

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

$$\text{重量集積率 (\%ID/g)} = \text{\%ID}/\text{組織重量 (g)}$$

(B) 結果と考察

採取した組織の組織集積率と重量集積率をそれぞれ table 3, table 4 に示す。

$^{201}\text{Tl}^+$ は時間経過と共に嗅球への移行が確認できるのに対し、 $^{125}\text{I-Oxt}$ の嗅球への組織集積率は 0.02 \%ID と非常に低いことから、 $^{125}\text{I-Oxt}$ の脳への輸送経路は嗅神経輸送ではないことが推察された。また、 $^{201}\text{Tl}^+$ は時間が経過しても鼻腔内の残存量が多いのに対し、 $^{125}\text{I-Oxt}$ は 30 min の時点で 12.12 \%ID/g と大部分が鼻腔内から消失していた。このことから、 $^{125}\text{I-Oxt}$ は鼻腔内を覆っている鼻粘膜上皮細胞に早期に取込まれたと考えられた。更に、 $^{125}\text{I-Oxt}$ の尾静脈投与では血中濃度は時間経過とともに急速に低下しているのに対し、 $^{125}\text{I-Oxt}$ の鼻腔投与では 60 min に 2.06 \%ID/g でピークを迎えその後緩やかに減少していた。尾静脈投与に比べ血中濃度が低く、かつ鼻腔からの移行速度に対して血中濃度が低いことから、粘膜固有層からの血中移行は僅かであると推察された。以上より、 $^{125}\text{I-Oxt}$ は鼻粘膜上皮細胞輸送によって脳へ取込まれている可能性が示された。

Table 3 $^{125}\text{I-Oxt}$, $^{201}\text{Tl}^+$ 投与マウスの組織集積率 (%ID)

嗅球	30 min	1 hour	3 hour	6 hour
$^{125}\text{I-Oxt}$ (鼻腔投与)	0.03 ± 0.02	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00
$^{201}\text{Tl}^+$	0.04 ± 0.03	0.11 ± 0.04	0.19 ± 0.01	0.36 ± 0.07

Table 4 $^{125}\text{I-Oxt}$, $^{201}\text{Tl}^+$ 投与マウスの重量集積率 (%ID/g)

鼻腔		30 min	1 hour	3 hour	6 hour
$^{125}\text{I-Oxt}$ (鼻腔投与)		12.12 ± 4.51	8.89 ± 0.64	5.23 ± 0.93	2.34 ± 0.41
$^{201}\text{Tl}^+$ (鼻腔投与)		277.78 ± 31.95	273.79 ± 14.02	117.21 ± 5.13	55.89 ± 7.39
血液	15 min	30 min	1 hour	3 hour	6 hour
$^{125}\text{I-Oxt}$ (鼻腔投与)	-	1.55 ± 0.56	2.06 ± 0.31	1.66 ± 0.46	1.26 ± 0.29
$^{201}\text{Tl}^+$ (鼻腔投与)	-	0.20 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01
$^{125}\text{I-Oxt}$ (尾静脈投与)	5.10 ± 0.23	3.67 ± 0.15	2.22 ± 0.11	-	-

V. 結語

Oxt を ^{125}I 標識した結果、標識率は 88.7 % と良好であり、精製後の放射化学的純度は 94 % と純度の高い $^{125}\text{I-Oxt}$ が得られた。また、マウス肝臓では代謝反応が確認されたことから、肝初回通過効果による $^{125}\text{I-Oxt}$ の分解代謝を避けるために Oxt は経口投与や経静脈投与ではなく鼻腔投与である必要性が確認された。加えて、鼻腔投与後のマウス体内分布の結果、Oxt の嗅神経輸送は確認できず、鼻粘膜上皮細胞輸送の可能性が示された。

また、嗅神経輸送であることが既に報告されている $^{201}\text{Tl}^+$ は交通外傷などによる嗅神経断裂の画像診断薬として応用が期待されている薬剤である。嗅覚異常には嗅神経の断裂・圧迫などによる神経系の異常が原因とされるものと、鼻粘膜細胞の器質異常が原因となり嗅細胞に影響をきたすものが存在し、治療方針の決定にはその鑑別が必須である。従って、 $^{125}\text{I-Oxt}$ は $^{201}\text{Tl}^+$ とのダブルトレーサーとして鼻腔投与し、各トレーサーの鼻腔からの取込みを確認することにより嗅覚異常の原因を鑑別する画像診断薬として応用が期待できる。

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、小林正和助教、水谷明日香助教、及びご協力いただきました本研究室の方々に心より御礼申し上げます。

VII. 参考文献

- 1) Yamasue H, Okada T, Munosue T, et al: Effect of intranasal oxytocin on the core social symptoms of autism spectrum disorder: a randomized clinical trial. *Mol Psychiatry*, 2018 (Epub ahead of print).
- 2) 武田真理子: 経鼻薬物送達の現状と将来. *日本薬理学会誌* 150: 148-152, 2017.
- 3) Vecsernyés M, Török A, Jójárt I, et al: Specific radioimmunoassay of oxytocin in rat plasma. *Endocr Regul*, 28: 145-150, 1994.
- 4) Janáky T, Tóth G, Penke B, et al: Iodination of peptide hormones and purification of iodinated peptides. *J Liquid Chromatogr*, 5: 1499-1507, 1982.
- 5) Kanayama Y, Enomoto S, Irie T, et al: Axonal transport of rubidium and thallium in the olfactory nerve of mice. *Nucl Med Biol*, 32: 505-512, 2005.