

1901 ¹²³I 標識 SPECT 薬剤を用いたイメージングによる 薬物代謝酵素活性定量法

相部 陸

(指導教員：川井 恵一 教授，水谷 明日香 助教)

要旨：生体に投与された医薬品の多くは cytochromeP450 (CYP) に代表される薬物代謝酵素によって代謝されるが，そ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．本研究室では個人の生体内 CYP 活性評価が投薬処方 of 重要な指標になると考え，核医学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．先行研究では CYP2D6 の基質となることが報告されている臨床薬剤 mequitazine (MQ) を ¹²⁵I 標識した ¹²⁵I-IMQ が投与後早期に肝臓へ集積した後，CYP によって特異的に代謝を受け，生成した放射性代謝物のみが選択的に胆汁排泄されることを明らかにしている．そこで本研究では，¹²³I-IMQ を特異的に代謝する CYP 分子種を阻害した CYP 活性低下モデルマウスを用いて，イメージングにより酵素活性変動を定量することを目的とした．マウス肝ホモジネートを用いた解析の結果，¹²⁵I-IMQ は CYP2D6 および 3A4 により特異的に代謝を受けることを確認した．さらに，SPECT 用核種 ¹²³I で標識した ¹²³I-IMQ を調整して正常マウスと CYP2D6 活性低下モデルマウスの消化管における時間放射能曲線から放射性代謝物の排泄量を定量し，CYP2D6 の活性評価を試みた．正常マウスと比較して CYP2D6 活性低下モデルマウスでは，¹²³I-IMQ 投与後早期における肝臓での集積が上昇し，消化管では集積低下が確認された．これは CYP2D6 活性が低下したことで，肝臓中における代謝物の生成が遅延し，胆汁中へ移行する放射性代謝物量が減少したためと考えられる．以上より，¹²³I-IMQ を用いた肝胆道系排泄の SPECT イメージングによって CYP2D6 の代謝活性を定量できる可能性が示された．

I. はじめに

CytochromeP450 (CYP) と呼ばれる薬物代謝酵素群はヒトに投与された医薬品の代謝に関して重要な役割を担うが，その活性には個体差があり，薬効や副作用発現の個体差要因となっている．現在，CYP活性評価に用いられている遺伝子検査はあくまで先天的な個人差のみを評価しており，生活習慣や多剤併用が原因となる環境的要因を含めたCYP活性は評価することができない．よって当研究室では，遺伝的要因および環境的要因の双方を反映したCYP活性を定量するために，核医学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り．

従来の核医学画像診断において，投与した放射性医薬品と体内で生じた放射性代謝物が同一臓器内に混在している状態ではそれらを鑑別できないため，放射性医薬品は標的臓器以外では代謝変化を受けないことを前提としてきた．しかし，代謝変化を受けて生じた放射性代謝物のみが特定排泄経路で排泄される場合には，放射性医薬品と放射性代謝物が分離された画像が得られる．このため，排泄を受けた臓器を経時的に撮像することで放射性代謝物の生成量を定量可能であり，その経時的生成量からCYP活性を評価できると考えた．つまり，下記に示す4条件を満たした診断薬であれば，薬物代謝酵素の機能をイメージングで捉えることができ，核医学画像診断を生かした新たな薬物代謝酵素活性画像診断薬になり得ると考えられる．

- (1) 放射性医薬品が代謝臓器に集積する
- (2) 特定の薬物代謝酵素によって代謝され、放射性代謝物が生成される
- (3) 生じた放射性代謝物のみが排泄臓器へと移行する
- (4) 排泄臓器への集積が可視化され定量可能である

CYP2D6は、多数あるCYP分子種の中でも医薬品の代謝に関わる割合が高く、多剤併用が問題となりやすい精神科薬剤を多く代謝するという2つの観点から、薬物療法の個別化において重要な酵素である²⁾。先行研究において、CYP2D6の基質である抗ヒスタミン剤mequitazine (MQ) を¹²⁵I標識した¹²⁵I-IMQは、薬物代謝酵素活性画像診断薬に求める4条件の内3つを満たすことを確認している。

- (1) 投与後速やかに肝臓へ集積する
- (2) CYPによって代謝され、放射性代謝物が生成される
- (3) 生じた放射性代謝物のみが肝臓から胆汁排泄される

本研究では、「条件(4) 排泄臓器への集積が可視化され定量可能である」ことを確認するために、¹²³I-IMQを用いた核医学イメージングによるCYP活性定量評価の可能性を検討した。また、¹²³I-IMQ代謝酵素の活性変動をイメージングによって評価するには、¹²³I-IMQの代謝酵素を特異的に阻害したCYP活性低下モデルマウスを作成する必要があることから、初めにin vitro阻害実験によって¹²³I-IMQを特異的に代謝するCYP分子種の同定を試みた。

II. In vitro CYP阻害実験

(A) 実験方法

本実験では、多数あるCYP分子種のうち現在臨床で使用されている医薬品の8割以上の代謝に関わる7種類のCYP分子種³⁾を評価の対象とした。それぞれのCYP分子種に対する特異的阻害剤をtable 1に示す。各阻害剤は1 mM (dimethyl sulfoxide 0.8 % v/v final concentration) にそれぞれ調整した。Glucose-6-phosphate (Nacalai tesque) およびβ-NADP⁺ (Nacalai tesque) をそれぞれ133.3 mM, 12.2 mMとなるよう精製水に溶解し、MgCl₂ (Nacalai tesque) を1.0 Mに調整した。Glucose-6-phosphate水溶液 268 μL, β-NADP⁺水溶液 241.2 μLを混合し、1.0 M MgCl₂ 26.8 μLおよびglucose-6-phosphate dehydrogenase (Nacalai tesque) 5.36 μLを添加した。これをCYP代謝のエネルギー源であるNADPH生成系とし、混和後は使用まで氷冷した。Phosphate buffer (pH 7.4), マウス肝ホモジネート, NADPH生成系, 精製水, 阻害剤溶液をtable 2に示した組成に調整してよく混和し、¹²⁵I-IMQを添加した後、37 °Cで加温して反応させた。

Table 1 In vitro CYP阻害実験に用いた阻害剤

CYP分子種	阻害剤
CYP1A1/1A2	α-Naphthoflavone (Apolo Scientific)
CYP2C9	Sulfaphenazole (Santa Cruz biotechnology)
CYP2C19	Fluconazole (和光純薬工業)
CYP2D6	Paroxetine (和光純薬工業)
CYP2E1	4-Methylpyrazol (東京化成工業)
CYP3A4	Ketoconazole (和光純薬工業)

Table 2 各サンプルの組成

	NADPH (+)	阻害実験
NADPH生成系	18.75	18.75
phosphate buffer (pH7.4)	28.13	28.13
マウス肝ホモジネート	7.500	7.500
精製水	24.38	15.00
¹²⁵ I-IMQ	15.00	15.00
阻害剤各種	—	9.378
total	93.76	93.76

反応時間は15, 60分としてそれぞれの時間が経過した後, 40 μL ずつ取り出し, ethanol 100 μL を加えて反応を停止させた. 各サンプルを15,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ で5分間遠心分離し, その上清を CHCl_3 : CH_3OH : CH_3COOH =55: 45: 1を展開溶媒としたシリカゲル薄層板 (silica gel60 F₂₅₄, Merck) による薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography; TLC) にて分析し, 各阻害剤を負荷したサンプルと無負荷のサンプルを比較した未変化体の変化量から阻害率を算出した.

(B) 結果と考察

^{125}I -IMQの代謝に対するCYP分子種特異的阻害剤負荷による阻害率をFig. 1に示す. CYP2D6および3A4阻害剤負荷において反応時間15分での阻害率がそれぞれ24.5 %, 29.5 %, 60分での阻害率が36.4 %, 30.1%であったため, ^{125}I -IMQはマウス肝ホモジネートにおいてCYP2D6および3A4により特異的に阻害を受けることが確認された.

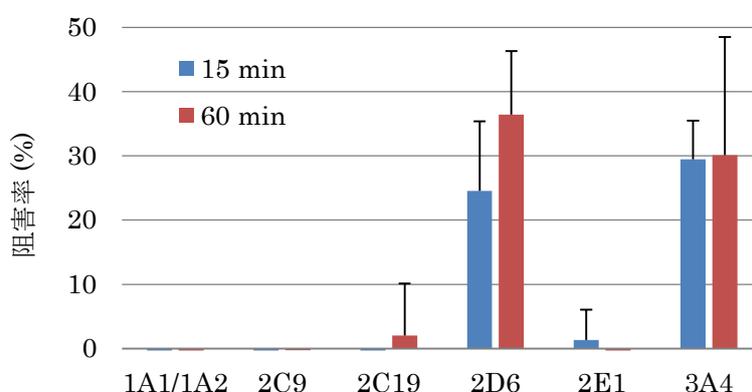


Fig. 1 マウス肝ホモジネート中の CYP 分子種特異的阻害剤による ^{125}I -IMQ の阻害率

III. ^{123}I -IMQを用いたマウスSPECTイメージング

(A) 実験方法

本研究では多数あるCYP分子種の中でも医薬品の代謝に関わる割合が高く, 薬物療法の個別化に重要な酵素であるCYP2D6に着目し, その活性変動をSPECTイメージングによって評価するためにCYP2D6活性低下モデルを作成した. イメージング装置は, 本学アイソトープ総合研究施設所有の小動物用SPECT/PET/CT装置 (Vector⁺/CT, Milabs) を使用した. 6時間絶食したddYマウス2匹 (オス, 6週齢, 日本SLC) に ^{125}I -IMQと同様に標識した ^{123}I -IMQを14.5 MBq尾静脈より投与した. 撮像モードはリストモードとし, イソフルラン麻酔下にて, ^{123}I -IMQ投与5分後より120分間撮像を行い, これをCYP2D6活性正常モデル (control) とした. また, CYP2D6活性低下モデル (inhibition) としてcontrolと同条件のマウス2匹にCYP2D6特異的阻害剤であるparoxetineを30 mg/kgずつ腹腔投与し⁴⁾, その60分後に ^{123}I -IMQを投与して同様に120分間撮像を行った. 画像再構成にはフィルタ逆投影法を使用し, 10分ごとの12 framesの画像データを作成した. 解析ソフトウェアにはPMOD (ver. 3.7) を使用し, 平滑化処理にはgaussian smooth 3D フィルタ (FWHM 1.2 \times 1.2 \times 1.2 mm) を適用した. また, 120分間の画像データから肝臓, 腎臓, 消化管 (十二指腸, 小腸, 大腸) に関心領域 (volume of interest; VOI) を設定し, 時間放射能曲線を作成した. 集積率 (%ID) は下の式により算出した.

$$\text{集積率 } [\%ID] = (\text{臓器 VOI 中の放射能 } [\text{counts}] / \text{全身 VOI 中の放射能 } [\text{counts}]) \times 100$$

(B) 結果と考察

Fig. 2にcontrolマウスの ^{123}I -IMQ投与5-15分後 (frame1) におけるcoronal画像例を示す. 画像左が肝臓および消化管の断面, 右が腎臓の断面でのSPECT画像である.

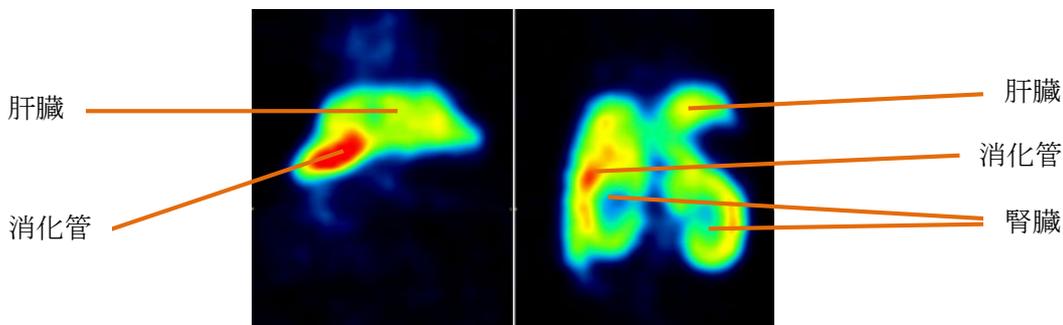
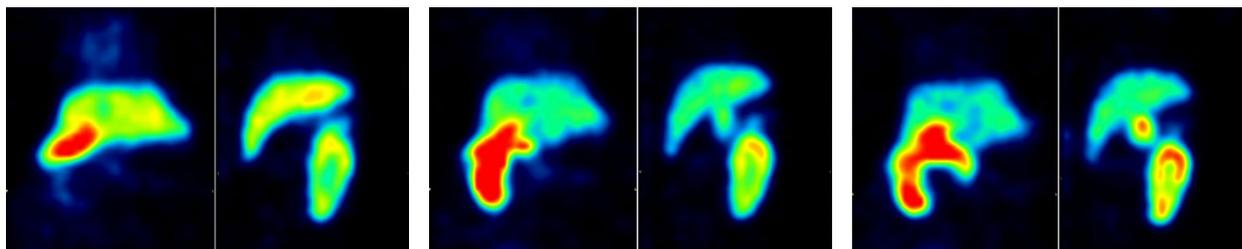


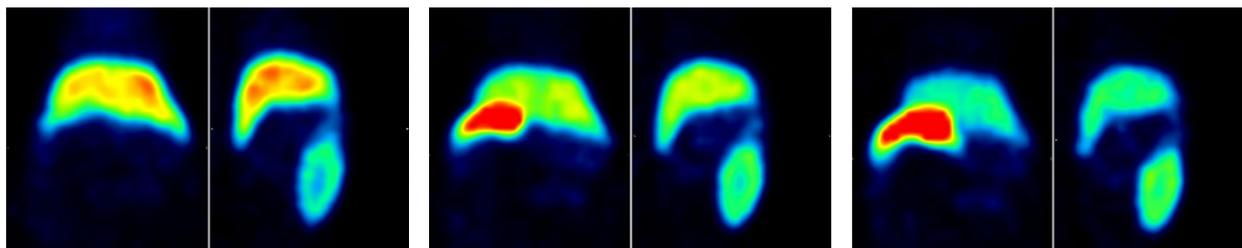
Fig. 2 Control マウス, 投与後 5-15 min (frame1) の SPECT 画像例

Fig. 3にcontrolおよびinhibitionマウスのSPECT画像を ^{123}I -IMQ投与5分後からの時間経過に沿って示す. 各時間の左がcoronal画像, 右がsagittal画像である. Controlマウスと比較してinhibitionマウスでは, 投与後早期において消化管が高集積であることを画像から判断できた.

CYP2D6 活性正常モデル (control)



CYP2D6 活性低下モデル (inhibition)



早期 (投与後 5-15 min)

中期 (投与後 55-65 min)

後期 (投与後 115-125 min)

Fig. 3 時間経過に沿ったマウス全身 SPECT 画像

Fig. 4にcontrolおよびinhibitionマウスにおける各臓器の時間放射能曲線を示す. 本検討では胆嚢からの胆汁排泄速度の個体差が激しかったため, 胆汁の排泄先である十二指腸以下の消化管集積を胆汁排泄量とみなし, 消化管の放射能集積を評価した. Controlマウスに比べてinhibitionマウスでは, 肝臓において集積増加, 消化管および腎臓において集積の低下が確認された. 肝臓および消化管では特に投与後早期でその変化が顕著であった. 先行研究において, ^{125}I -IMQは未変化体では胆汁排泄されず, 排泄される放射性物質の大部分が放射性代謝物であることを確認している. よって, 肝臓中のCYP2D6を阻害したinhibitionマウスでは, 投与後早期における ^{123}I -IMQの代謝が

遅延したことで未変化体が増加し、肝臓に滞留する放射能が増加するとともに、放射性代謝物の生成量が減少したため消化管への排泄が減少したと考えられる。以上より、CYP2D6の活性変動を肝胆道系排泄のSPECTイメージングによって評価できると考えられた。

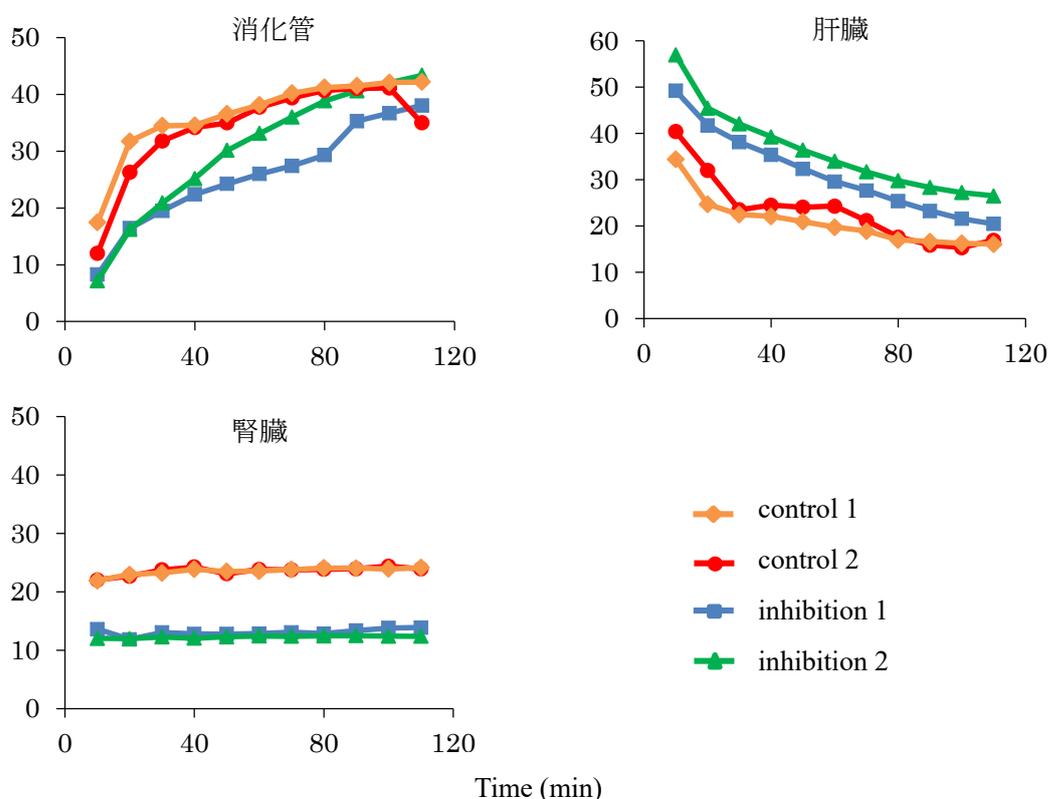


Fig. 4 Control, inhibition の各臓器における時間放射能曲線

IV. 結語

^{123}I -IMQ投与後の肝胆道系排泄をSPECTイメージングすることでその時間放射能曲線からCYP2D6活性を定量評価できる可能性が示された。

V. 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、小林正和准教授、水谷明日香助教、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。

VI. 参考文献

- 1) Mizutani A, Kobayashi M, Fujita K, *et al.* ^{123}I -iomazenil whole-body imaging to detect hepatic carboxylesterase drug-metabolizing enzyme activity. *Nucl Med Commun.* 2018; 39(9): 825-833.
- 2) Loovers HM, van der Weide J. Implementation of CYP2D6 genotyping in psychiatry. *Experts Opin Drug Metab Toxicol.* 2009; 5(9): 1065-1077.
- 3) Williams JA, Hyland R, Jones BC, *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUCi/AUC) ratios. *Drug Metabol Dispos.* 2004; 32(11): 1201-1208.
- 4) Katoh M, Sawada T, Soeno Y, *et al.* In vivo drug metabolism model for human cytochrome P450 enzyme using chimeric mice with humanized liver. *J Pharm Sci.* 2007; 96(2): 428-437.