

1902 IBZM を用いた脳内 D2 レセプター結合率の新規評価法の検討

大内 誠

(指導教員：川井 恵一 教授，水谷 明日香 助教)

要旨：精神疾患の一つである統合失調症は，脳内ドパミン量の異常が要因と考えられており，その治療には D2 レセプター (D2R) 遮断薬が用いられている．D2R 遮断薬は脳内にあるドパミン受容体の 1 種である D2R へ選択的に結合してドパミンの D2R 結合を遮断することを作用機序としているため，D2R 遮断薬においては脳内 D2R との結合性を評価することが重要となる．そこで，中枢性 D2R リガンドである放射性ヨウ素標識 (S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrroldinyl)-methyl]benzamide (IBZM) を用いて，D2R が高発現している線条体への結合率の変化をイメージングすることで，D2R 遮断薬そのものを標識することなくそれらの中枢性 D2R への結合率を間接的に定量する新たな評価法を検討した．IBZM の標識条件の最適化を試みた結果，標識率 90%，放射化学的純度 95%以上で ^{125}I -IBZM が得られ，マウス体内分布実験では線条体への特異的高集積が認められたことから， ^{125}I -IBZM の D2R リガンドとしての有用性が確認できた．各種 D2R 遮断薬を用いた *in vitro* 結合阻害実験においては，D2R 遮断薬が負荷濃度に依存して ^{125}I -IBZM の結合率が低下することを確認した．また，各種 D2R 遮断薬を用いて *in vivo* 結合阻害実験を行った結果，D2R への親和性の高い domperidone において ^{125}I -IBZM の D2R 結合率が低下した．以上より，D2R 遮断薬を投与後の IBZM の線条体 D2R 結合率変化をイメージングにより評価することで，D2R 遮断薬の脳内 D2R 結合率を中枢移行性および受容体親和性を包括した定量値として間接的に評価できる可能性が示された．

I. はじめに

中枢神経系の神経伝達物質であるドパミンが作用する受容体には D1 レセプター (D1R), D2R, D3R, D4R, D5R の 5 種類のサブタイプが存在し，脳および末梢神経に広く分布している．特に運動調節や認知など様々な機能を司る線条体には D1R, D2R の 2 種類の発現が確認されており，脳内ドパミン量の異常が統合失調症や parkinson 病の発症要因と考えられていることから，線条体のドパミン量を測定，調整することは治療を行う上で非常に重要となっている．

統合失調症の治療には，脳内 D2R へ選択的に結合することでドパミンの D2R 結合を遮断する D2R 遮断薬等が用いられるため，D2R リガンド構造類似体の薬剤の需要は高く，新たな薬剤開発が期待されている．D2R 遮断薬の開発では，D2R との結合性を評価することが重要であり，薬物動態学的因子や生理的因子の影響を考慮した生体内 D2R への結合率を評価するためには，一般に D2R 遮断薬そのものを標識する必要がある．しかし，D2R 遮断薬本来の構造を変化させずに標識を行うことは困難であり，受容体結合率の評価は容易でない．そこで，D2R 遮断薬を投与後の中枢性 D2R リガンドである放射性ヨウ素標識(S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrroldinyl)-methyl]benzamide (IBZM) の D2R への結合率変化をイメージングにより評価することで，D2R 遮断薬を標識することなく脳内 D2R 結合率を間接的に定量できるのではないかと考えた．

II. ^{125}I -IBZM の標識および精製

(A) 実験方法と材料

^{125}I -IBZM (Fig. 1) の標識は Kung らの方法^{2,4)}を参考に行った。標識原料には IBZM の Sn 体である (S)-(-)-3-trimethylstannyl-2-hydroxy-6-methoxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-benzamide (TBZM, Fig. 2, Nard) を使用し、TBZM の放射性ヨウ素標識はクロラミン-T (Nacalai tesque) を酸化剤として用いる直接標識法で行った。

^{125}I -NaI (2 MBq) を 100 μL の 0.5 M 酢酸アンモニウム (Nacalai tesque) で希釈した溶液と TBZM を 9.1 nmol を含むエタノール溶液 1.6 μL を 18.4 μL の無水エタノール (富士フィルム和光純薬) で希釈した溶液とを混和し、その後 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ のクロラミン-T を 25 μL 添加することで反応を開始した。反応開始から 5 分経過後に 1/10 飽和ピロ亜硫酸ナトリウム (富士フィルム和光純薬) を 25 μL 加えることで反応を停止し、反応停止後に 1/2 飽和重炭酸ナトリウム (Nacalai tesque) 700 μL を加えて液性の調整を行った。

^{125}I -IBZM の精製および標識率の分析には high performance liquid chromatography (HPLC) を使用し、分離精製は table 1 に示す条件で行った。放射化学的純度の検定はシリカゲル薄層板 (silica gel60 F254, Merck) を使用し、メタノール : 酢酸 = 100 : 1 を展開溶媒とする thin-layer chromatography (TLC) で分析した。

以降の実験では、分離精製後に窒素還流してアセトニトリルを除去した ^{125}I -IBZM を使用し、放射能はオートウェル γ カウンタ (AccuFLEX γ 7000, Aloka medical) で測定した。

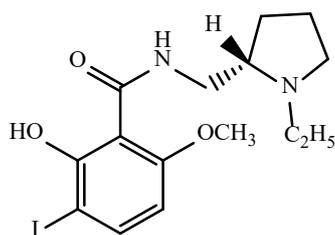


Fig. 1 IBZM 構造式

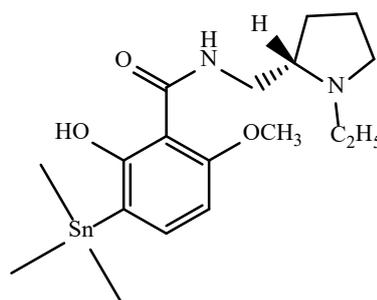


Fig. 2 TBZM 構造式

Table 1 HPLC による ^{125}I -IBZM の精製条件

Column	: 5C ₁₈ MS II Packed column (25 cm×4.6 cm)
Guard column	: MS II (1 cm×4.6cm)
Solvent system	: 4 mM リン酸アンモニウム (pH 7.0) : アセトニトリル = 1 : 9
Solvent flow rate	: 1 mL/min
UV	: 254 nm

(B) 結果と考察

Fig. 3 に HPLC 精製時の γ デテクタのクロマトグラムを示す。 ^{125}I -NaI は retention time: 3~4 分、 ^{125}I -IBZM は retention time: 7~8 分であり、それぞれ明瞭に分離された。このクロマトグラムのピーク面積の割合より ^{125}I -IBZM の標識率を求めた結果、標識率 90.0 % と良好な結果が得られた。また、HPLC 分取後の放射化学的純度を TLC 分析により評価した結果、Rf 値は ^{125}I -IBZM: 0.00-0.15, ^{125}I -NaI: 0.70-0.80 であり、 ^{125}I -IBZM の放射化学的純度は 95 % 以上で得られた。

以上より、クロラミン-T を用いた酸化標識法により高い標識率と放射化学的純度で ^{125}I -IBZM が得られた。

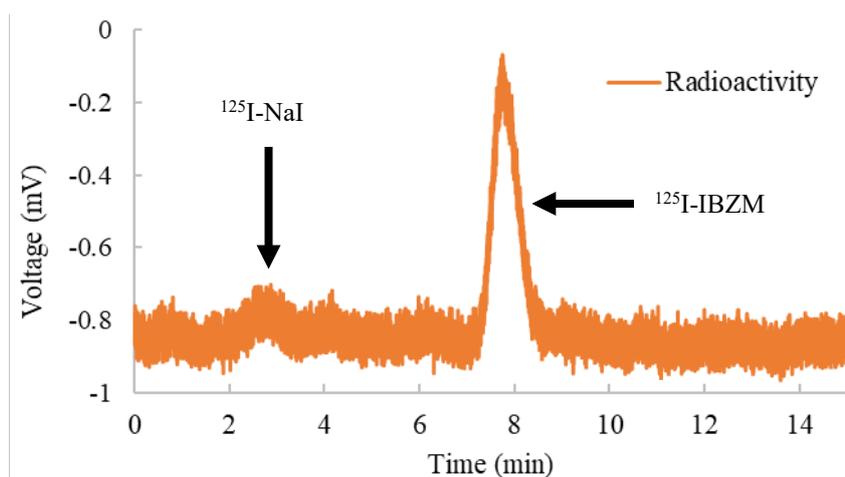


Fig. 3 HPLC による ^{125}I -IBZM のクロマトグラム

III. In vitro D2R 結合阻害実験

(A) 実験方法と材料

脳内 D2R 結合率を評価するため、D2R が高発現している線条体と D2R が発現していない小脳を ddY マウス (オス, 6 週齢, 日本 SLC) より摘出し, tris-HCl buffer (pH 7.4) を各組織の湿重量の 100 倍量加え, (1) ホモジナイザー (Sonifire250, Branson) を用いて組織を破碎した. その後, (2) 遠心分離機 (himacCF16RX, Hitachi) を用いて 20000 g, 20 分, 4 °C で遠心分離し, 上清を取り除いた後, tris-HCl buffer を 400 μL 加えて上記の (1), (2) を繰り返した. 2 度目の遠心分離後, 上清を取り除き, assay buffer (50 mM tris-HCl buffer (pH 7.4), 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2) を加えてホモジナイザーで組織を破碎した後, 蛋白量が 55 $\mu\text{g protein}/50 \mu\text{L}$ となるように assay buffer で希釈し, ホモジネートを得た. このホモジネートに assay buffer 100 μL , D2R 遮断薬 100 μL を混和した後, ^{125}I -IBZM 100 μL を加えることにより反応を開始させ, 37 °C の温浴 (T-25J, Thomas) 中で 15 分振盪させた. その後, サンプルを 90 μL ずつ glass filter (GC-50, Advantec) に捕集して反応を停止させ, 氷冷した tris-HCl buffer 1 mL で 3 度洗浄し, glass filter を乾燥させてオートウェル γ カウンタで放射能を測定した. D2R 遮断薬には, 脳へはほとんど移行せず主に末梢性である domperidone (富士フィルム和光純薬), domperidone よりも中枢移行性の高い sulpiride (東京化成工業), itopride (東京化成工業), および中枢移行性に優れる IBZM (Abx) の 4 種を用い, 1 nM ~ 1 mM (domperidone のみ 0.1 nM ~ 1 mM) の各濃度で加えた. D2R 遮断薬を加えないサンプルは assay buffer を 200 μL とした. なお, 本実験では投与放射能に対する glass filter で捕集した放射能の割合を結合率 (%ID) として評価した.

(B) 結果と考察

In vitro D2R 結合阻害実験の線条体ホモジネートでの結果を Fig. 4 に示す. 小脳ホモジネートでは ^{125}I -IBZM の D2R への特異的な結合は見られなかったが, 線条体ホモジネートでは D2R 遮断薬無負荷条件において約 16 % の高い特異的な結合が確認された. また, 全ての D2R 遮断薬において D2R 遮断薬が高濃度であるほど ^{125}I -IBZM 結合率は低下し, ^{125}I -IBZM の D2R への結合が阻害さ

れた. Domperidone は本検討で使用した D2R 遮断薬の中で最も中枢移行性が低いものの, ^{125}I -IBZM の D2R 結合阻害効果は高く, D2R への親和性が高いことが示唆された. IBZM は中枢移行性, 親和性がともに高く, domperidone と同程度の阻害効果が確認された. 一方, sulpiride, itopride は domperidone よりも中枢移行性が高いものの, 阻害効果は低く, D2R への親和性が高くないことが明らかとなった.

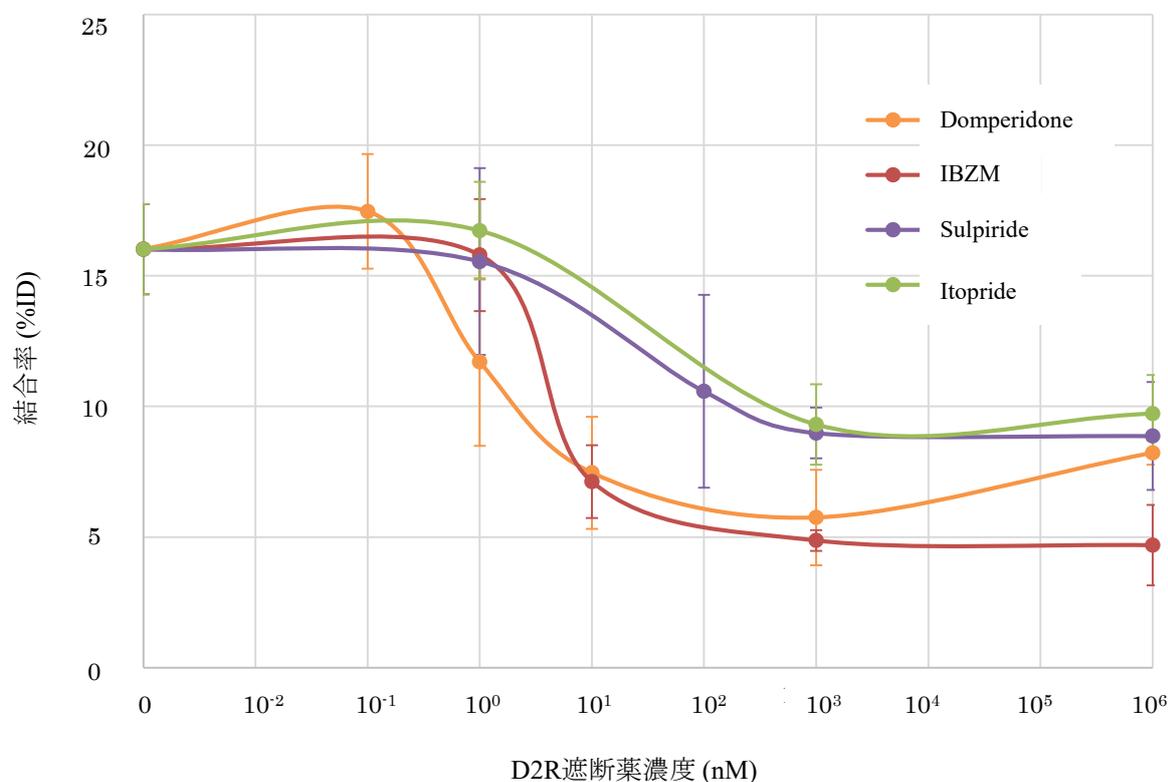


Fig. 4 In vitro 結合阻害実験結果

IV. In vivo 結合阻害実験

(A) 実験方法と材料

^{125}I -IBZM を生理食塩水で希釈し, 200 kBq/100 μL になるように調整した. 希釈した ^{125}I -IBZM を 6 時間絶食措置を施した ddY マウス (オス, 6 週齢, 日本 SLC) 4 匹に尾静脈より投与し, control とした. 各 D2R 遮断薬は 30 mg/kg でマウス 4 匹に腹腔投与し, 60 分後に control と同様に ^{125}I -IBZM を投与した. ^{125}I -IBZM 投与 15 分後にイソフルラン (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, 速やかに大脳皮質, 線条体, 小脳, 海馬, その他の脳組織を摘出し, それぞれの湿重量を秤量した後, 放射能を測定した. 測定した各臓器の湿重量, 放射能から ^{125}I -IBZM の集積率を以下の式より算出するとともに, 線条体と小脳集積率の比を求めた.

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

(B) 結果と考察

採取した組織の重量集積率, 線条体-小脳比をそれぞれ Fig. 5, 6 に示す. ^{125}I -IBZM の脳内分布では, D2R が高発現している線条体において特異的高集積が認められ, D2R が発現していない小

脳での集積が最も低くなった。各 D2R 遮断薬を負荷することで線条体への集積は低下したが、本検討では D2R 遮断薬を高容量負荷したために、その阻害率は D2R への親和性の高い domperidone で 58.0 %, IBZM で 50.0 % に対し、D2R への親和性の低い sulpiride で 26.7 %, itopride では 21.0 % となり D2R 親和性を反映した阻害率が得られた。また、線条体-小脳比においても同様に domperidone および IBZM において大きく低下した。

以上より、in vivo D2R 遮断薬負荷においても in vitro 結合阻害実験と同様に、D2R 遮断薬を負荷することで ^{125}I -IBZM の線条体 D2R への結合が遮断され、D2R 遮断薬の中枢移行性と受容体親和性を反映した ^{125}I -IBZM の D2R 結合阻害効果が得られることが確認された。特に高容量負荷においては、D2R 遮断薬の D2R への結合には中枢移行性以上に D2R への親和性が深く関与していることが示された。

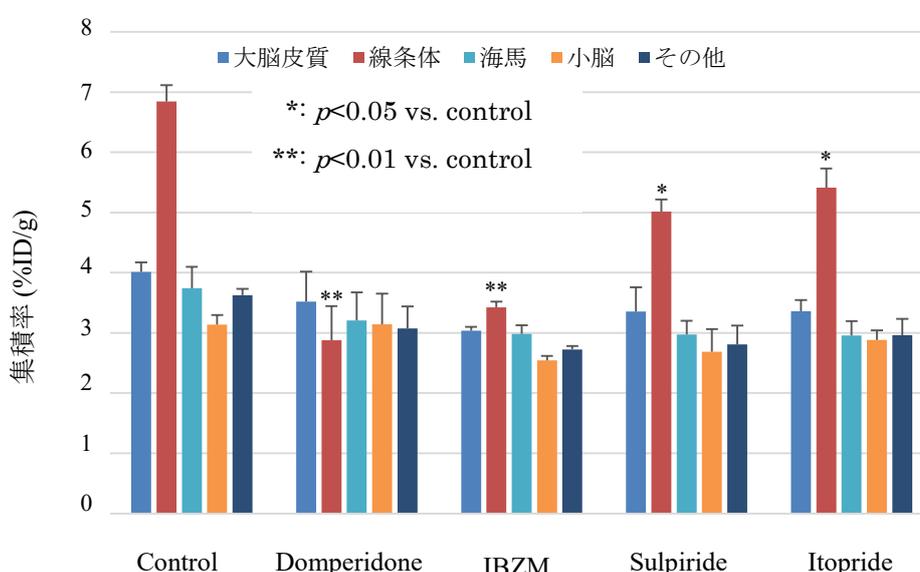


Fig. 5 各脳組織の集積率

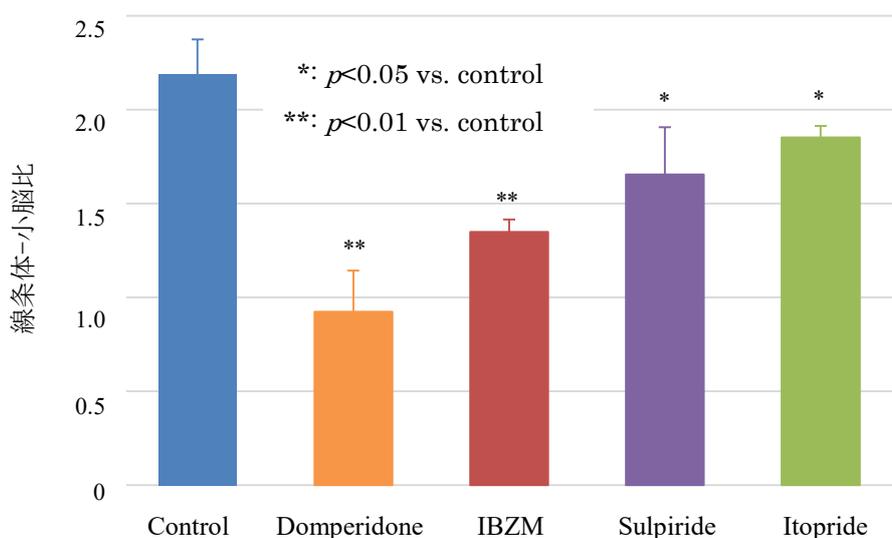


Fig. 6 線条体-小脳集積比

V. 結語

TBZM を ^{125}I 標識した結果、標識率 90.0 %、放射化学的純度は 95 %以上であり、高い標識率、放射化学的純度の ^{125}I -IBZM が得られた。マウス脳組織ホモジネートを用いた *in vitro* 実験では ^{125}I -IBZM は D2R へ特異的に結合し、D2R 遮断薬によってその結合が遮断されることを確認した。また、マウス生体内では ^{125}I -IBZM は線条体 D2R へ特異的に結合し、D2R 遮断薬の中枢移行性が低くとも高容量負荷した場合には、D2R への親和性を反映した ^{125}I -IBZM の線条体 D2R への結合阻害効果が十分に検出できることが確認された。以上より、D2R 遮断薬を投与後の IBZM の線条体 D2R 結合率変化をイメージングにより評価することで、D2R 遮断薬の脳内 D2R 結合率を中枢移行性および受容体親和性を包括した定量値として間接的に評価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、小林正和准教授、水谷明日香助教、およ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) Nicola SM, Surmeier J, Malenka RC, *et al.* Dopaminergic modulation of neuronal excitability in the striatum and nucleus accumbens. *Ann Rev Neurosci.* 2000; 23: 185-215.
- 2) Kung FH, Kasliwal R, Pan S, *et al.* Dopamine D-2 receptor imaging radiopharmaceuticals: Synthesis, radiolabeling, and *in vitro* binding of (R) - (+)- and (S) - (-)-3-iodo-2-hydroxy-6-methoxy-*N*-[(1-ethyl-2-pyrroindinyl)-methyl]benzamide. *J Med Chem.* 1988; 31: 1039-1043.
- 3) Kung FH, Alavi A, Chang W, *et al.* *In vivo* SPECT imaging of CNS D-2 dopamine receptors: Initial studies with iodine-123-IBZM in humans. *J Nucl Med.* 1990; 31: 573-579.
- 4) Toyama H, Ichise M, Ballinger JR, *et al.* Dopamine D₂ receptor SPECT imaging: Basic *in vivo* characteristics and clinical applications of ^{123}I -IBZM humans. *Ann Nucl Med.* 1993; 7 (1): 29-38.