

新 劑

藥

140

京大附函

アミノ酸代謝機能診断用
放射性医薬品に関する研究

川 井 惠 一

アミノ酸代謝機能診断用
放射性医薬品に関する研究

川 井 惠 一

目 次

緒言	-----	1
第1章 ポジトロン放出核種 ^{14}C 標識アミノ酸に関する検討		
第1節 ^{14}C 標識アミノ酸の体内挙動と代謝親和性	-----	5
引用文献	-----	21
第2節 ^{14}C -L-methionineの標識部位による代謝親和性の変化		25
引用文献	-----	38
第2章 シングルフォトン放出放射性ヨウ素標識アミノ酸のアミノ酸代謝機能診断薬としての可能性に関する検討	-----	40
引用文献	-----	51
第3章 In vivo機能診断薬としての放射性ヨウ素標識アミノ酸の開発に関する検討		
第1節 ^{123}I -3-iodo-D-tyrosine : 脾臓のアミノ酸膜輸送機能診断薬	-----	54
引用文献	-----	70
第2節 ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine : 脳、脾臓におけるアミノ酸膜輸送機能診断薬	-----	73
引用文献	-----	99
結語	-----	102
謝辞	-----	105

緒 言

In vivo核医学の目的は、人体内に投与した放射性医薬品の動態を放射線を指標にして体外測定装置により追跡し、得られるデータに基づいて、生体器官や組織の形態、機能についての臨床診断を行なうことにある。この診断法の特徴は、非侵襲的かつ生理的状态を変化させずにin vivoで超微量濃度の化合物の動態を把握できることにある。

正常組織に比べて、疾患組織では、その病態の状況に応じ、種々の代謝性基質や生理活性物質の動態に変化がもたらされ、これらの変化に基づく病態時の機能的変化は、従来の診断法でもとらえ得る形態的变化に先んずるといわれている。そこで、アミノ酸が、脳、膵臓、腫瘍等における代表的な代謝性基質であることを考慮すると、アミノ酸代謝機能の変化を測定することは、これらの組織の重要な診断情報となる可能性が高いと考えられる。中でも、膵臓は、タンパク合成の盛んな組織であることから、放射性核種標識アミノ酸は、膵臓機能診断用放射性医薬品として高く期待され、現在、 ^{75}Se -seleno-L-methionineが唯一臨床使用されている。しかし、 ^{75}Se -seleno-L-methionineは、膵臓選択性が低く、核種の物理的性質も核医学診断に適したものでない等の点で問題がある。

超短半減期ポジトロン放出核種 (^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O) が、医療用超小型サイクロトロン の病院内設置により利用できるようになり、それに伴い、ポジトロン放出核種標識化合物を用いたポジトロン断層撮影法 (PET) 診断が可能となった。PETは、従来の平面画像法に比較して、局所における定量性に優れており、ポジトロン放出核種標識の生体内代謝性基質を用いる代謝機能診断が、新しい核医学診断領域として注目されている。中でも、 ^{11}C あるいは ^{13}N 標識アミノ酸は、脳、膵臓、腫瘍等の診断への応用に期待がもたれたが、アミノ酸の選択やそこから得られる診断情報の評価については、曖昧なところが多い。特に、膵臓機能診断への標識アミノ酸の利用が数多く試みられ、高い膵臓集積を示すアミノ酸が経験的に見つけ出されているが、アミノ酸の構造と集積性あるいは集積機序との間に一定の相関性を見い出すには至っていない。そこで、膵臓におけるアミ

ノ酸の集積を膜透過、遊離アミノ酸プールへの貯留、タンパク合成の3つの過程としてとらえ、それぞれの過程に特徴的と考えられるアミノ酸を選択し、その膵臓集積に対する各過程の寄与を検討することにより、膵臓機能診断に適したアミノ酸について考察した。

上記のポジトロン放出核種は、それぞれアミノ酸の構成元素の放射性同位体であるため、母体化合物の化学的性質をほとんど変化させることなく標識することができるが、これらの半減期が極めて短いことから、その標識合成、精製操作には、特別な配慮が必要である。そこで、半減期が20分の ^{11}C を用いた ^{11}C 標識アミノ酸の迅速自動合成法、即ち、サイクロトロンによる ^{11}C 製造から ^{11}C 標識アミノ酸合成に至る一連の反応を、短時間内に遠隔操作で遂行し得る合成法について検討した。

一方、主として合成上の理由から、アミノ酸放射性医薬品として[S-methyl- ^{11}C]-L-methionineが、用いられるようになり、京都大学医学部附属病院においても、自動合成装置が設置され、臨床研究が開始されるに至った。[S-methyl- ^{11}C]-L-methionineの膵臓への集積は、他のアミノ酸と同様に、膵臓のタンパク合成機能を反映しているといわれているが、脳における定量的解析の結果では、必ずしもタンパク合成機構だけが関与しているのではないことも示唆されている。そこで、[S-methyl- ^{11}C]-L-methionineの膵臓のタンパク合成機能診断薬としての可能性を評価するために、標識部位の異なる3種の ^{14}C -L-methionine([S-methyl- ^{14}C]-、[1- ^{14}C]-、[3,4- ^{14}C]-)の集積性と代謝挙動に対する標識部位の影響を検討した。

これまでに述べたように、ポジトロン放出核種標識アミノ酸を用いる核医学診断は、有用な代謝機能診断情報を与えるが、このような核医学診断法の普及のために、企業供給の可能な ^{123}I 等のシングルフォトン放出核種標識放射性医薬品の開発が強く望まれている。一方、標的組織への集積放射能を定量的に測定し、代謝機能を速度論的に解析する定量的核医学診断においては、特定の代謝機構に対する親和性を保持し、その代謝機構のみを考慮した単純なコンパートメントモデルによって解析できる異種元素導入放射性医薬品の高い有用性が認められている。以上の観

点から、細胞膜能動輸送機構、タンパク合成機構等の一連の機序に基づき、高く持続的な膵臓集積を示したL-phenylalanineを母体化合物とし、アミノ酸代謝挙動に対する放射性ヨウ素標識の影響を、 ^{125}I -p-iodo-D,L-phenylalanineをモデル化合物として基礎的に検討し、ヨウ素標識アミノ酸が、膵臓のアミノ酸能動輸送機能を選択的に測定し得る放射性医薬品である可能性を提示した。

この結果をふまえ、臨床応用の可能な膵臓のアミノ酸膜輸送機能診断用 ^{123}I 標識アミノ酸の開発を計画した。臨床応用を考える上では、簡便な標識、精製操作によって、代謝機能診断に必要な高い比放射能を有する標識化合物が得られること、母体アミノ酸と同様の組織選択性を示し、診断の目的である代謝機構に対する親和性を保持していること、放射性ヨウ素標識化合物を用いる際に特に問題となる酵素的脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を有すること等の条件を満たさなければならない。フェノール基を側鎖に有するtyrosineは、無担体条件下での簡便なヨウ素標識と精製が可能であると考えられるアミノ酸である。また、D-アミノ酸は、L-体と同様の膵臓集積性を示し、更に、3-iodo-D-tyrosineは、脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を有することが示唆されている。以上の観点から、 ^{123}I -3-iodo-D-tyrosineを選択し、膵臓におけるアミノ酸膜輸送機能診断薬としての有用性を検討した。

また、近年、種々の精神疾患における脳のtyrosine輸送機能の変化が報告され、その診断的価値が議論されている。そこで、次に、脳のアミノ酸輸送機能を選択的に測定し得る ^{123}I 標識アミノ酸の開発を計画した。脳を標的組織とした場合、血液脳関門や脳細胞膜が、アミノ酸のL-体に対して高い立体選択性を有しているため、先に述べた条件に加え、L-体構造を保持したまま酵素的脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を与えなければならない。従って、精神疾患との関わりが注目されているL-tyrosineの誘導体であり、簡便で無担体状態での標識の可能なフェノール基を有し、 α 炭素の立体配置がL-体であるのに加え、脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を向上させるための α -メチル基を有する ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{123}I -L-AMT)の脳集積性と集積機序、及び、生体内における代謝

安定性について検討した。

更に、この¹²³I-L-AMTは、膵臓のアミノ酸膜輸送機能診断薬としても、必要な条件を満たしていることから、¹²³I-L-AMTの膵臓集積性も併せて検討し、ドラッグデザインの妥当性について考察した。

本研究は、以下に詳述するように、臨床利用に有望なアミノ酸膜輸送機能診断用放射性医薬品の開発に一つの指針を与えると共に、脳、膵臓における今後の核医学代謝機能診断に新しい方向を示すものとして評価されると考えられる。

第1章 ポジトロン放出核種 ^{11}C 標識アミノ酸に関する検討

第1節 ^{11}C 標識アミノ酸の体内挙動と代謝親和性

代謝機能診断に用いられる放射性医薬品が具備すべき基本的性質として、標的組織に特徴的な生理、代謝機能を反映する体内挙動を示すことがあげられる。 ^{11}C あるいは ^{13}N 標識アミノ酸は、代謝性基質として、アミノ酸代謝の盛んな脳、膵臓、腫瘍等の診断への応用に期待がもたれた。

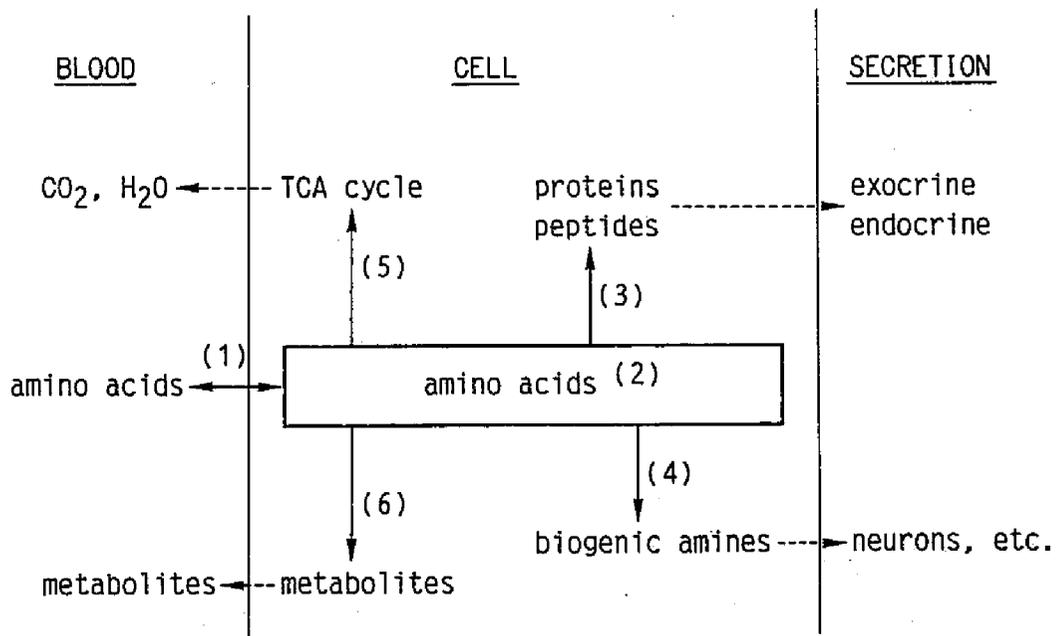


Fig. 1-1 Scheme showing amino acid metabolic pathways. (1) Membrane transport; (2) free amino acid pool; (3) protein synthesis; (4) biogenic amine synthesis; (5) energy-producing metabolism; and (6) catabolism.

1982年、京都大学医学部附属病院においても、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 等の超短半減期ポジトロン核種の生産を目的とした医療用超小型サイクロトロンが設置され、医療現場におけるサイクロトロン核医学が開始された[1]。

一方、膵臓は、タンパク合成をはじめ、アミノ酸を基質とする活発な合成代謝機能を有し、周辺組織に比較して非常に高いアミノ酸集積性を示す組織である[2-5]。現在までに、 ^{11}C あるいは ^{13}N 標識アミノ酸の膵臓機能診断への利用が数多く試みられ、高い膵臓集積を示すアミノ酸が経験的に見つけ出されている[6-10]。また、種々のアミノ酸の膵臓集積に対するタンパク合成の寄与についても検討されている[11]が、アミノ酸の構造と集積性あるいは集積機序との間の相関性を見出すには至っていない。そこで、Fig.1-1に示すアミノ酸の集積、代謝挙動のうちでも、膵臓においては、膜透過、遊離アミノ酸プールへの貯留、タンパク合成の3つの過程が重要であると考え、集積に対する各過程の寄与を検討することにより、膵臓機能診断に適したアミノ酸について考察した。

更に、これらの考察をふまえて、いくつかの ^{11}C 標識アミノ酸の合成を行なった。

1. 実験方法

^{14}C 標識アミノ酸の選択

先に述べた3つの過程に特徴的なアミノ酸を以下の理由で選択した。アミノ酸の膜透過は、エネルギー依存性能動輸送によることが知られ、特にL-leucineを代表とする一連の側鎖の大きい中性L-アミノ酸を輸送するleucine系輸送機構の活性が高いことが知られている[12,13]。そこで、この膜輸送機構に高い親和性を有するアミノ酸として、輸送機構の命名の起源となったL-leucine及びL-leucineと同等の高い親和性を有することが知られているL-phenylalanine[12,13]を選択した。更に、膵臓組織内における遊離アミノ酸含有量[14]及び膵臓で多量に合成される外分泌

Table 1-1 AMINO ACID CONTENTS IN PANCREATIC DIGESTIVE PROTEINS AND
AMINO ACID CONCENTRATION IN FREE AMINO ACID POOL

	PROTEIN POOL							FREE POOL
	AMY (2.0	CBP 26.0	CTP 32.0	DRB 1.4	RBN 2.4	TRY 14.0)	total proteins ^{b)}	free amino acid pool ^{c)}
Ser	6.8	10.4	12.4	11.7	12.1	14.9	9.34	85.6
Gly	11.1	7.5	10.2	3.5	2.4	10.9	7.06	233.1
Ala	6.3	6.8	9.7	8.6	9.7	6.1	6.23	381.6
Val	7.8	5.2	10.2	9.3	7.3	7.9	6.17	45.2
Leu	4.9	7.5	8.4	9.0	1.6	6.1	5.76	25.2
Asn	---	5.5	6.2	4.7	8.1	7.4	4.72	36.3
Lys	4.2	4.9	6.2	3.5	8.1	6.6	4.50	35.6
Ile	4.4	6.8	4.4	4.3	2.4	6.6	4.32	14.5
Thr	4.9	8.5	1.8	5.8	8.1	4.4	3.75	27.7
Asp	14.0	3.9	4.0	7.8	4.0	3.9	3.33	138.2
Gln	---	3.6	4.4	3.5	5.7	5.2	3.26	342.0
Tyr	3.8	6.2	1.8	5.8	4.8	4.4	3.06	9.4
Pro	4.4	3.3	4.0	3.5	3.2	3.5	2.83	37.4
Phe	4.9	5.2	2.7	4.3	2.4	1.3	2.60	10.9
Cys	2.1	0.7	4.4	1.6	6.5	5.2	2.54	(2.5)
Glu	8.0	4.6	2.2	3.9	4.0	0.9	2.33	951.5
Trp	3.2	2.3	3.5	1.2	0.0	1.8	2.05	4.0
Arg	5.7	3.6	1.8	4.3	3.2	0.9	1.87	14.4
His	1.9	2.6	0.9	2.3	3.2	1.3	1.29	17.4
Met	1.7	1.0	0.9	1.6	3.2	0.9	0.79	2.0

a) % protein abundance in pancreatic juice.

b) sum of % amino acid found in protein x (a).

c) amino acid concentration in free amino acid pool (umol/100g wet tissue).

AMY: amylase, CBP: carboxypeptidase, CTP: chymotrypsinogen,
DRB: deoxyribonuclease, RBN: ribonuclease, TRY: trypsinogen.

消化酵素タンパク中におけるアミノ酸含有率 [15-21] (Table 1-1) に注目し、遊離アミノ酸として最も多いL-glutamic acid、及び、外分泌消化酵素タンパク中に最も多く含有されているL-serineをそれぞれの代表として選択した。

[U-¹⁴C]-L-phenylalanine (¹⁴C-Phe: 16.7GBq/mmole)、[U-¹⁴C]-L-leucine (¹⁴C-Leu: 11.1GBq/mmole)、[U-¹⁴C]-L-serine (¹⁴C-Ser: 5.55GBq/mmole)、[U-¹⁴C]-L-glutamic acid (¹⁴C-Glu: 7.40GBq/mmole)は、フランス原子力庁より購入した。その他の試薬は、すべて試薬特級品を用いた。

¹⁴C標識アミノ酸のラット組織切片集積実験

ラット組織切片集積実験は、藤林らの方法 [22] に従った。組織には、脾臓、及び、イメージングの際に特に問題となる肝臓 [9, 23] を対照として用いた。Wistar系雄性ラットを断頭し、即座に組織を取り出した。各組織は、氷冷HEPES緩衝生理食塩溶液 (pH 7.4) で洗浄した後、Stadie-Riggsスライサーにより組織切片を作製し [24]、その100±5mgを秤量後、HEPES緩衝生理食塩溶液 (pH 7.4) 1.9mlを入れたバイアルに移した。標識アミノ酸のHEPES緩衝生理食塩溶液0.1ml (最終アミノ酸濃度: 1×10^{-7} M, 1.1~3.3kBq) を加え、37℃にて1時間振盪した。液を除去した後、氷冷HEPES緩衝生理食塩溶液2mlにて組織切片を2回洗浄した。組織はNCS組織溶解剤 (Amersham社) 1mlを加え、50℃、3時間振盪して溶解した後、DPO、POPOPをそれぞれ第一、第二溶質とするトルエンシンチレーターを8ml加え、液体シンチレーションカウンター (Packard社 3385型 TRI-CARB) にて組織切片に集積した放射能を測定した。Ouabainによる膜能動輸送阻害実験では、 5.0×10^{-5} Mのouabainを含む溶媒中、37℃で30分間、予め振盪した後、標識アミノ酸を加えて、120分間振盪した。

¹⁴C標識アミノ酸のマウス体内分布実験

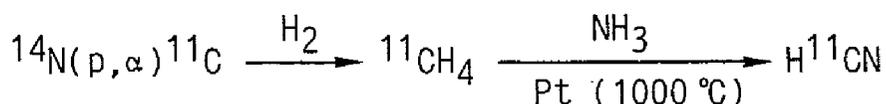
標識アミノ酸の生理食塩溶液0.1ml (7.4 kBq、 4.4×10^{-10} ~ 1.3×10^{-9} mole) を体重約25gのddY系雄性マウスに尾静脈より投与し、一

定時間後にエーテル麻酔にて屠殺した。ヘパリン処理注射器を用いて心臓穿刺により採血した後、脾臓、肝臓、腎臓を摘出した。血液は遠心分離して血漿を0.1ml採取し、各組織は約100mgを秤量し、液シンバイアルに移して上記の方法により放射能を測定した。

^{11}C 標識アミノ酸の合成

^{11}C は、5% H_2 を含む N_2 ガスをターゲットとして、京都大学医学部付属病院設置の医療用超小型サイクロトロン（住友重機械工業 CYPRIIS Model 325）により加速された11.3MeVのエネルギーの陽子を照射し、 $^{14}\text{N}(\text{p}, \alpha)^{11}\text{C}$ 反応により製造した。

SYNTHESIS OF ^{11}C -HCN



SYNTHESIS OF ^{11}C -AMINO ACIDS

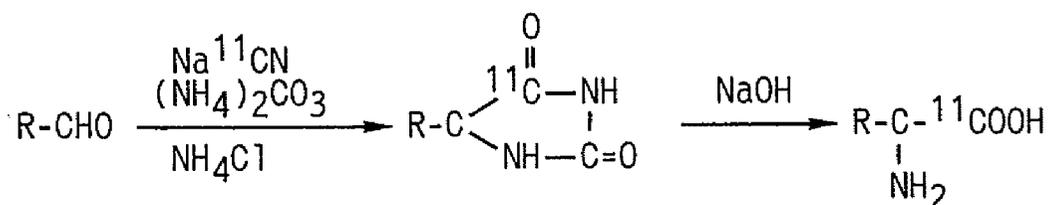


Fig. 1-2 Synthesis of ^{11}C -HCN and ^{11}C -amino acids.

^{11}C 標識アミノ酸の合成は、Fig.1-2に示すBucherer-Strecker反応の改良法 [25, 26] に従い、Fig.1-3に示す合成装置を用いて行なった。合成する ^{11}C 標識アミノ酸としては、脳、膵臓及び腫瘍への集積が高いと報告されている [1- ^{11}C]-D,L-leucine (^{11}C -Leu)、[1- ^{11}C]-D,L-valine (^{11}C -Val) 及び [1- ^{11}C]-D,L-phenylalanine (^{11}C -Phe) [6-8, 27] を選択した。 ^{11}C -Leuは、以下の操作により合成した。サイクロトロンにより製造された ^{11}C - CH_4 をアンモニア存在下で白金を触媒として反応させることにより

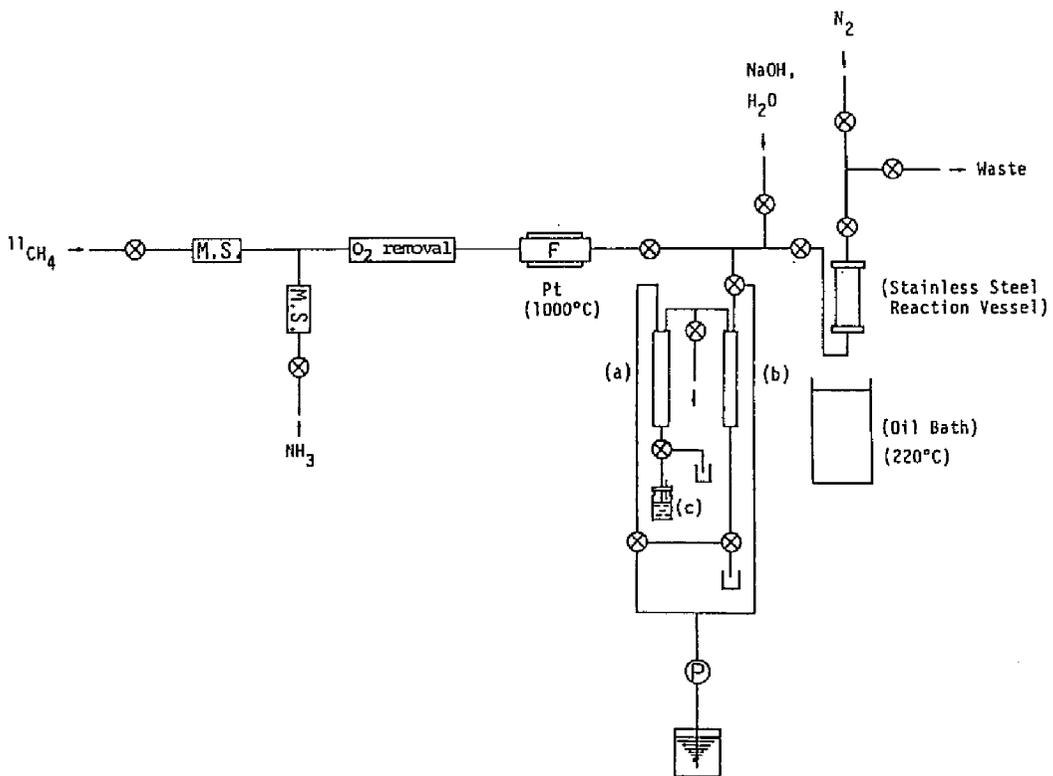


Fig. 1-3 Diagram of the system used for the preparation of ^{11}C -amino acids. (a) Anion exchange column; (b) cation exchange column; (c) ^{11}C -amino acid solution; (M.S.) molecular sieve; (\otimes) solenoid valve; and (\textcircled{P}) pump.

^{14}C -HCNを合成した。直前に蒸留したisovaleraldehyde 54 μl (0.5mmole)、 $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 72mg (0.75mmole)、 NH_4Cl 7mg (0.125mmole)、 KCN 8mg (0.125mmole)を予め0.003N NaOH 1.5mlに溶解し、ステンレス製の密封反応容器に入れ、 ^{14}C -HCNガスをバブリングした。必要な放射能をトラップさせた後、容器を密封し、シリコンオイル中で、220 $^\circ\text{C}$ 、10分間加熱して、hydantoinを形成させた。冷却後、6.25N NaOHを1ml加え、更に、220 $^\circ\text{C}$ 、10分間加熱し、加水分解した。冷却後、反応液をIRA-400陰イオン交換カラム(10 \times 100mm)に通し、精製した。得られた放射性画分を6N HClでpH7に調整し、実験に用いた。 ^{14}C -Val、 ^{14}C -Pheは、isobutylaldehyde 45 μl (0.5mmole)、phenylacetaldehyde 62 μl (0.5mmole)をそれぞれ原料とし、上記と同様の操作により合成した。放射化学的純度は、ブタノール：酢酸：水=4:1:1 (Rf値、Leu、Val、Phe=0.4~0.6、 CN^- =origin、hydantoin=0.8~0.9)を展開溶媒とする、シリカゲル薄層クロマトグラフィ(Merck社 Art.5553)を用いて検討した。

^{14}C 標識アミノ酸のマウス体内分布実験

体重約25gのddY系雄性正常及び担癌マウスに、 ^{14}C 標識アミノ酸0.1ml (投与開始時換算 0.4~1.2MBq)を尾静脈より投与し、一定時間後に断頭屠殺し、血液を採取すると共に各組織を摘出し、重量を秤量した後、放射能を測定した。担癌マウスとしては、Ehrlich癌を大腿部皮下に移植した後、1週間を経て腫瘍の重量が1g前後になったものを用いた。放射能の測定には、Packard社製AUTO-GAMMA 500を用いた。放射能の半減期を補正した後、各組織への集積率(%投与量/g組織)を求めた。

2. 結果

^{14}C 標識アミノ酸のラット組織切片への集積

選択した標識アミノ酸の膵臓及び肝臓切片への集積を、ouabain負荷時のそれと合わせてFig.1-4に示す。膵臓切片への集積は、 ^{14}C -Pheが最も

高く、 ^{14}C -Leu、 ^{14}C -Serがそれに続いた。これらのアミノ酸では、取り込みの大きいものほどouabainによる阻害が大きい傾向を示した。 ^{14}C -Gluは、 ^{14}C -Serよりも大きなouabainによる集積阻害を示したが、集積量

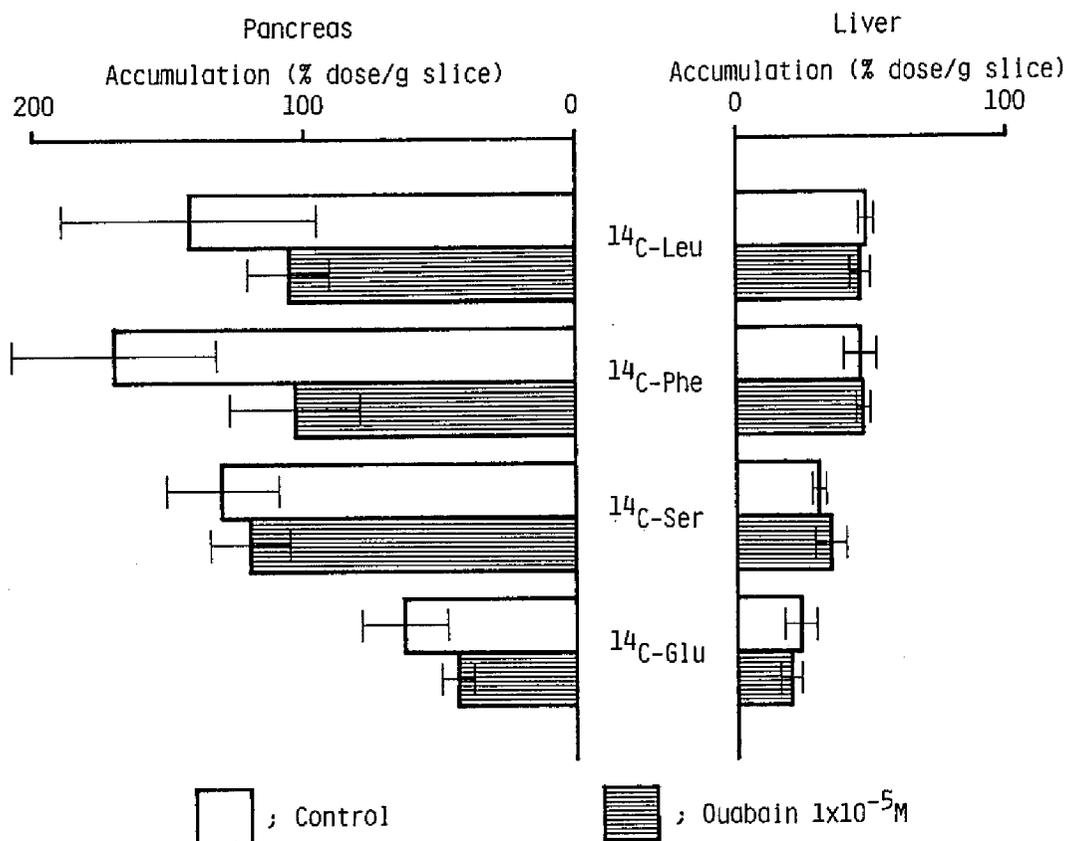


Fig. 1-4 Accumulation of ^{14}C -L-amino acids in rat tissue slices and the effect of ouabain. Each bar represents the mean ± 1 S.D. of four to five experiments. Open bars show incubation for 60 min. at 37°C , while striped bars show the effect of preincubation for 30 min. at 37°C in medium containing $1 \times 10^{-5}\text{M}$ ouabain.

としては最も低い値にとどまった。一方、肝臓切片への集積は、膵臓切片への集積に比較すると低く、かつ、ouabainによる阻害効果も認められなかった。

^{14}C 標識アミノ酸のマウス体内分布

各標識アミノ酸の投与後30分のマウス体内分布をTable 1-2に示す。In vitroの場合と同様に、膵臓への集積が顕著であり、各アミノ酸の膵臓集積を比較した場合、 ^{14}C -Pheが最も高く、 ^{14}C -Leu、 ^{14}C -Serがそれに続いた。 ^{14}C -Gluは最も低かった。

Table 1-2 MOUSE BIODISTRIBUTION OF ^{14}C -L-NATURAL AMINO ACIDS^{a)}

	^{14}C -Phe	^{14}C -Leu	^{14}C -Ser	^{14}C -Glu
Pancreas	46.14 (12.41)	30.07 (4.52)	26.74 (4.53)	8.30 (1.25)
Liver	7.81 (0.08)	4.49 (0.40)	3.96 (0.60)	1.83 (0.24)
Plasma	1.61 (0.08)	0.32 (0.03)	0.90 (0.15)	0.71 (0.17)

a) Mice were sacrificed 30 min. after intravenous injection (% dose/g tissue, mean (1 S.D.) of the data from three mice).

^{14}C 標識アミノ酸の合成

^{14}C 標識アミノ酸の合成、精製は、 ^{14}C -HCNバブリング後、40分で終了し、反応収率は55~70%であった。また、精製後、放射化学的収率40~50%、放射化学的純度85%以上の ^{14}C 標識アミノ酸が得られた。

Table 1-3 BIODISTRIBUTION OF ^{11}C -LEU, ^{11}C -VAL, AND ^{11}C -PHE IN MICE^{a)}

	5min	10min	20min	30min	45min	60min
^{11}C -Leu :						
Blood	2.02 (0.15)	1.61 (0.22)	1.23 (0.21)	1.36 (0.63)	----	1.10 (0.23)
Brain	1.12 (0.16)	1.06 (0.08)	1.30 (0.13)	1.57 (0.53)	----	1.21 (0.23)
Pancreas	10.81 (0.34)	13.23 (1.98)	15.91 (1.21)	12.08 (2.10)	----	8.72 (1.19)
Liver	5.73 (0.24)	4.51 (0.13)	4.09 (0.33)	3.70 (0.38)	----	3.02 (0.34)
Kidney	9.31 (2.69)	7.26 (0.98)	5.91 (0.83)	5.25 (0.64)	----	4.83 (0.81)
^{11}C -Val :						
Blood	3.09 (0.22)	2.68 (0.10)	1.92 (0.15)	1.87 (0.28)	----	1.46 (0.29)
Brain	0.91 (0.03)	0.94 (0.07)	0.95 (0.09)	1.12 (0.17)	----	0.94 (0.28)
Pancreas	6.26 (0.68)	8.68 (0.53)	11.26 (1.02)	13.92 (1.64)	----	10.57 (2.04)
Liver	5.40 (0.33)	5.85 (0.26)	5.02 (0.50)	4.71 (0.22)	----	3.44 (0.69)
Kidney	9.68 (1.09)	7.43 (0.42)	5.31 (0.41)	9.01 (1.87)	----	4.64 (1.13)
^{11}C -Phe :						
Blood	----	3.28 (0.60)	2.74 (0.73)	2.36 (0.37)	2.02 (0.21)	2.33 (0.49)
Brain	----	2.40 (0.58)	2.53 (0.91)	2.10 (0.23)	1.55 (0.27)	1.55 (0.68)
Pancreas	----	13.32 (2.86)	18.44 (4.02)	23.57 (3.83)	25.96 (4.79)	25.05 (5.15)
Liver	----	7.67 (1.47)	7.74 (0.73)	8.04 (1.13)	6.95 (0.33)	7.41 (1.88)
Kidney	----	8.12 (1.38)	7.27 (1.08)	8.72 (1.27)	7.98 (0.70)	8.16 (1.64)

a) % dose/g tissue, mean (1 S.D.) of the data from four mice.

¹¹C標識アミノ酸のマウス体内分布

¹¹C標識アミノ酸の正常及び担癌マウスにおける体内分布の経時的変化をそれぞれTable 1-3、1-4に示す。また、正常マウスにおける脾臓対肝臓、担癌マウスにおける腫瘍対筋肉の組織単位重量当たりの集積比をTable 1-5に示す。いずれのアミノ酸においても、脾臓への非常に高い集積が観察された。また、腫瘍や脳にも高く集積した。

Table 1-4 BIODISTRIBUTION OF ¹¹C-LEU, ¹¹C-VAL, AND ¹¹C-PHE IN TUMOR BEARING MICE^{a)}

	5min	10min	20min	30min	45min	60min
¹¹ C-Leu :						
Blood	2.65 (0.21)	1.71 (0.38)	1.82 (0.18)	1.72 (0.31)	2.18 (0.20)	1.68 (0.35)
Tumor	2.24 (0.39)	2.50 (0.16)	2.55 (0.39)	2.28 (0.45)	2.66 (0.15)	2.95 (0.61)
Muscle	2.65 (0.43)	2.52 (0.81)	1.45 (0.04)	1.28 (0.31)	0.80 (0.45)	1.25 (0.51)
¹¹ C-Val :						
Blood	3.93 (0.60)	2.86 (0.19)	2.41 (0.14)	2.09 (0.16)	1.54 (0.05)	1.26 (0.19)
Tumor	3.84 (0.13)	4.11 (0.27)	4.10 (0.05)	3.99 (0.35)	3.34 (0.39)	2.97 (0.19)
Muscle	4.92 (1.28)	3.07 (0.48)	2.71 (0.17)	1.95 (0.25)	1.18 (0.27)	1.00 (0.22)
¹¹ C-Phe :						
Blood	2.60 (1.05)	2.28 (0.34)	1.71 (0.32)	2.01 (0.17)	2.42 (0.25)	2.58 (0.50)
Tumor	2.96 (0.21)	3.71 (0.97)	3.47 (0.51)	3.36 (0.81)	3.65 (0.60)	3.80 (0.59)
Muscle	1.73 (1.22)	2.32 (0.26)	1.42 (0.28)	1.59 (0.37)	0.93 (0.06)	0.86 (0.52)

a) % dose/g tissue, mean (1 S.D.) of the data from four mice.

Table 1-5 RATIO OF PANCREAS TO LIVER AND TUMOR TO MUSCLE OF ^{11}C -LEU, ^{11}C -VAL, AND ^{11}C -PHE IN MOUSE BIODISTRIBUTION^{a)}

	5min	10min	20min	30min	45min	60min
^{11}C -Leu :						
Pancreas / Liver	1.89	2.94	3.93	3.42	----	2.94
Tumor / Muscle	0.83	1.05	1.75	1.89	2.95	2.61
^{11}C -Val :						
Pancreas / Liver	1.16	1.48	2.25	2.96	----	3.09
Tumor / Muscle	0.83	1.35	1.52	2.07	2.93	3.19
^{11}C -Phe :						
Pancreas / Liver	----	1.74	2.38	2.93	3.74	3.38
Tumor / Muscle	1.71	1.60	2.44	2.11	3.92	4.42

a) mean of the data from four mice.

3. 考察

まず、膵臓機能診断に適したアミノ酸の選択を目的として、膜輸送、遊離アミノ酸プールへの貯留、タンパク合成の3つの過程に特徴的な ^{14}C 標識アミノ酸を選択し、更に、それらのアミノ酸の膵臓集積性と各過程に関するパラメータとを比較した。膵臓集積の最初の過程である膜輸送に関してみると、 ^{14}C -Phe、 ^{14}C -Leu、 ^{14}C -Ser等の中性アミノ酸では、能動輸送機構の寄与が大きいアミノ酸ほど高い集積を示す傾向が観察された (Fig.1-5)。しかしながら、中性アミノ酸とは輸送機序が異なる ^{14}C -Glu [28,29] では、エネルギー依存性画分が比較的大きかったにもかかわらず集積は低く、その相関性は異なる輸送機序にまで一貫したものでは

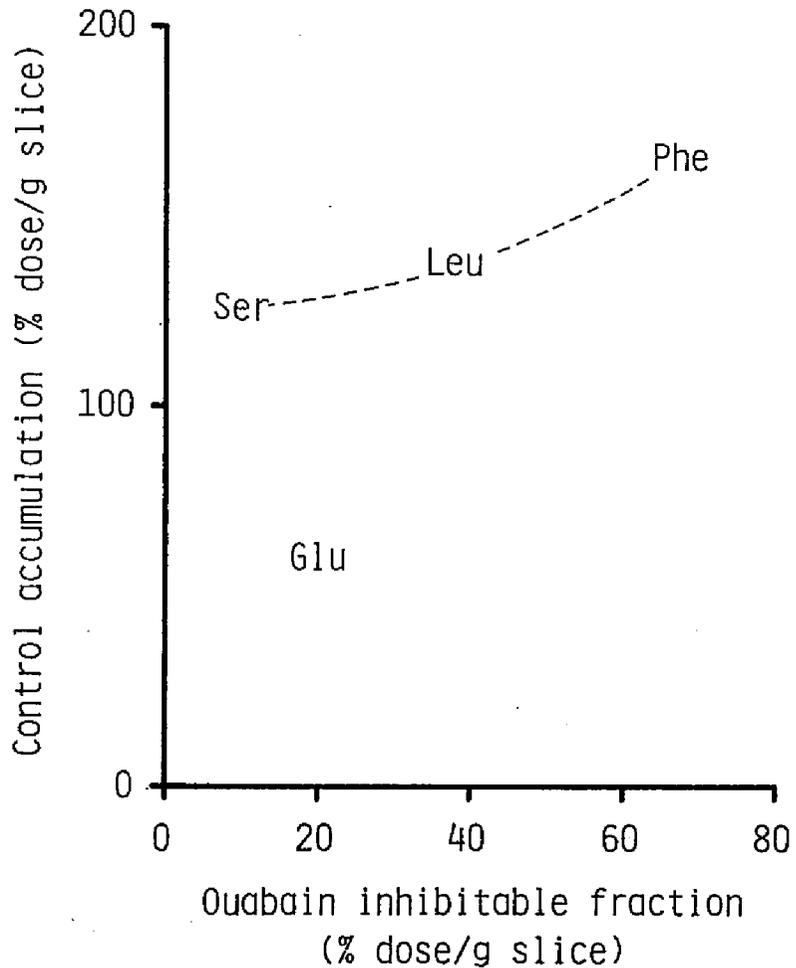


Fig. 1-5 Relationship between control accumulation of ^{14}C -L-amino acids in rat pancreatic slices and the ouabain inhibitable fraction.

ないことが示された。次に、貯蔵プールにおける遊離アミノ酸含有量との関連を見たところ、*in vitro*、*in vivo*共にアミノ酸濃度の対数に対して良好な負の相関性が観察され (Fig.1-6)、遊離アミノ酸プールに少ないものほど細胞外から活発に取り込まれるのではないかと考えられた。一

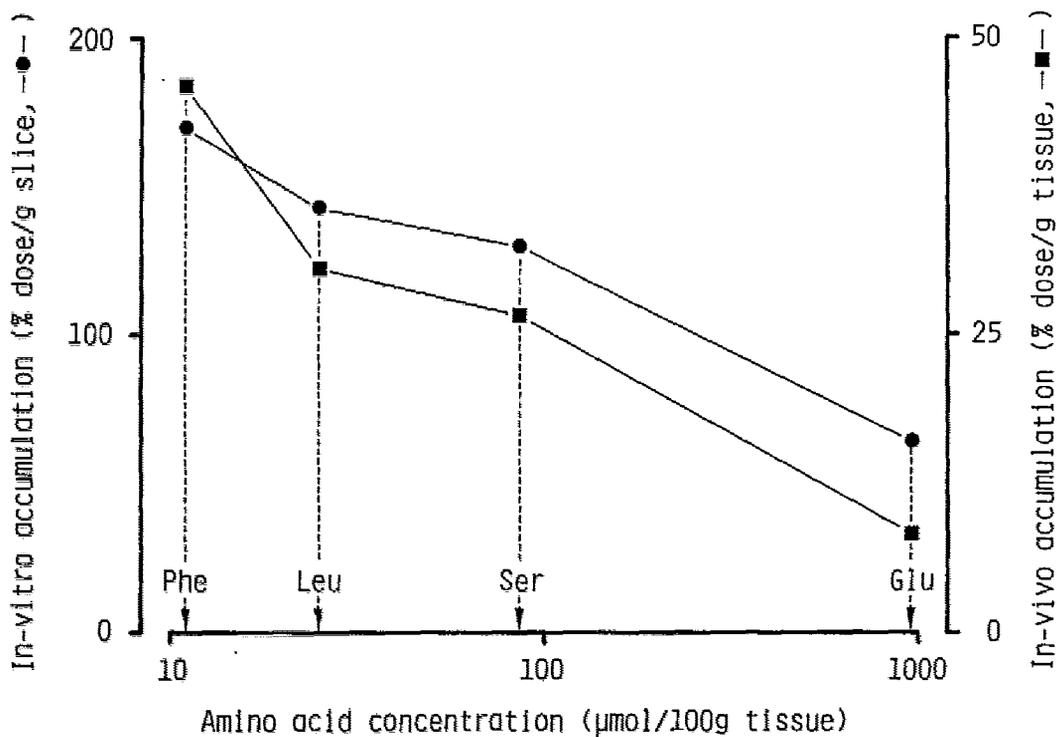


Fig. 1-6 Relationship between pancreatic accumulation of ^{14}C -L-amino acids and the amino acid concentration in the pancreatic free amino acid pool.

方、膵臓において多量に合成される消化酵素タンパク中のアミノ酸含有率、即ち、タンパク合成への利用度との比較においては、そのような相関性は観察されず (Fig. 1-7)、膵臓のタンパク合成への利用度が直接的にアミノ酸集積に寄与するのではないことが示唆された。

以上を総合すると、膵臓におけるアミノ酸集積においては、貯蔵遊離アミノ酸プールに少なく外部からの供給に依存しなければならないアミノ酸ほど高い集積を示し、その集積は能動輸送への親和性とも関連していると考えられた。一方、アミノ酸のタンパク合成機構への関与は非常に大きいにもかかわらず、アミノ酸の膵臓への集積性自体との関連は見

い出されず、集積そのものをタンパク合成機能の直接的指標として評価することには注意が必要であることが示された。遊離アミノ酸プールに少なく、細胞外部から積極的に取り込む必要があるアミノ酸、即ち、活発な膜能動輸送機構に対する親和性の高いアミノ酸が、膵臓の核医学診断において必須である高い膵臓集積を示し、かつ、その挙動は、主として輸送機構の活性に依存するところが多く、タンパク合成との直接的な関連は少ないことが明らかとなった。

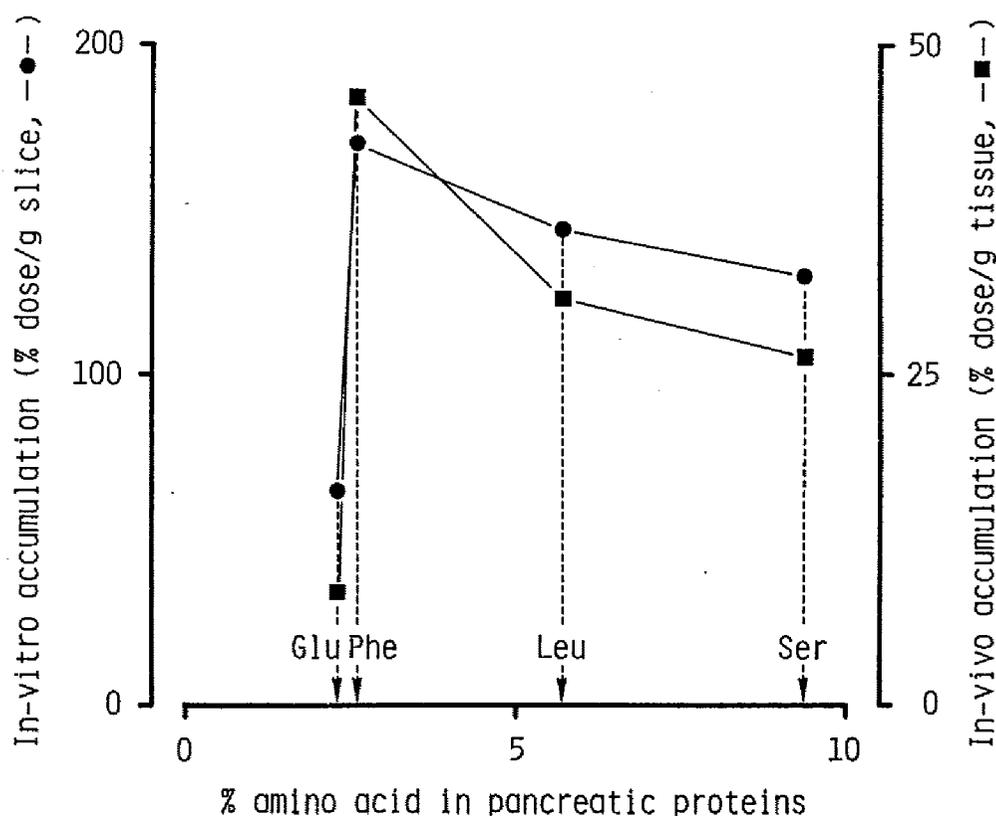


Fig. 1-7 Relationship between pancreatic accumulation of ^{14}C -L-amino acids and the amino acid content in the pancreatic digestive proteins.

以上の結果に基づき、実際に、脳、脾臓及び腫瘍への集積が高いと報告されており [6-8,27]、かつ、アミノ酸膜能動輸送機構に対して親和性の高い [12,13] ^{14}C -Leu、 ^{14}C -Val及び ^{14}C -Pheの核医学診断への有用性が確認されたと考え、これらの合成を試みた。 ^{14}C 標識化合物の合成は、 ^{14}C の半減期が20分と非常に短いために、収率、純度と共に、精製後、使用可能となるまでの時間が問題となる。今回検討した合成、精製法は、この観点に関する限り、満足されるものであった。更に、これらの ^{14}C 標識アミノ酸の体内分布を検討した結果、脾臓、脳、腫瘍等に特異的に集積し (Table 1-3,1-4,1-5)、その核医学診断への応用が期待された。

一方、今回合成されたアミノ酸は、すべてラセミ体である。 ^{14}C 標識アミノ酸の光学異性体分割に関しては、既に、不必要なエナンチオマーに対する固定化アミノ酸オキシダーゼ [30,31] やキラルな移動相を用いる高速液体クロマトグラフィー [27,32] 等の方法が報告されており、いずれも、十分利用可能な方法であると考えられたが、今回は、これについての検討には至らなかった。

引 用 文 献

- 1) Torizuka K, Saji H, Morita R, Yokoyama A: Medical small cyclotron at Kyoto University Hospital. Radiol Med 1: 56-63, 1983
- 2) Friedberg F, Tarver H, Greenberg DM: The distribution pattern of sulfur-labeled methionine in the protein and the free amino acid fraction of tissues after intravenous administration. J Biol Chem 173: 355-361, 1948
- 3) Hansson E: The formation of pancreatic juice proteins studied with labelled amino acids. Acta Physiol Scand 46: Suppl 161, 1-99, 1959
- 4) Busch H, Davis JR, Honig GR, Anderson DC, Nair PV, Nyhan WL: The uptake of a variety of amino acids into nuclear proteins of tumors and other tissues. Cancer Res 19: 1030-1039, 1959
- 5) Blau M, Manske RF: The pancreas specificity of Se⁷⁵-selenomethionine. J Nucl Med 2: 102-105, 1961
- 6) Vaalburg W, Beerling-van der Molen HD, Woldring MG: Evaluation of carbon-11 labelled phenylglycine and phenylalanine for pancreas scintigraphy. Nucl-Med 14: 60-66, 1975
- 7) Washburn LC, Wieland BW, Sun TT, Hayes RL, Butler TA: [1-¹¹C]DL-Valine, a potential pancreas-imaging agent. J Nucl Med 19: 77-83, 1978
- 8) Hubner KF, Andrews GA, Buonocore E, Hayes RL, Washburn LC, Collmann IR, Gibbs WD: Carbon-11-labeled amino acids for the rectilinear and positron tomographic imaging of the human pancreas. J Nucl Med 20: 507-513, 1979
- 9) Syrota A, Comar D, Cerf M, Plummer D, Maziere M, Kellershohn C: [¹¹C]Methionine pancreatic scanning with positron emission computed tomography. J Nucl Med 20: 778-781, 1979

- 10) Kubota K, Fukuda H, Yamada K, Endo S, Ito M, Abe Y, Yamaguchi T, Fujiwara T, Sato T, Yamaura H, Matsuzawa T, Ishiwata K, Iwata R, Ido T: Experimental pancreas imaging study with ^{13}N -glutamate using positron computer tomography. *Eur J Nucl Med* **8**: 528-530, 1983
- 11) Sokoloff L, Smith C: In *PET of The Brain*. pp 2-18, Springer-Verlag (Berlin) 1982
- 12) Oxender DL, Christensen HN: Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* **238**: 3686-3699, 1963
- 13) Blasberg R, Lajtha A: Substrate specificity of steady-state amino acid transport in mouse brain slices. *Arch Biochem Biophys* **112**: 361-377, 1965
- 14) Tallan HH, Moore S, Stein WH: Studies on the free amino acids and related compounds in the tissues of the cat. *J Biol Chem* **211**: 927-939, 1954
- 15) Neurath H: In *Chiba Foundation Symposium on the Exocrine Pancreas*. pp 69, J.&A. Churchill (London) 1962
- 16) Sanders TG, Rutter WJ: Molecular properties of rat pancreatic and parotid α -amylase. *Biochemistry* **11**: 130-136, 1972
- 17) Vandermeers A, Christophe J: α -Amylase et lipase du pancreas de rat. Purification chromatographique, recherche du poids moleculaire et composition en acides amines. *Biochim Biophys Acta* **154**: 110-129, 1968
- 18) Verger R, De Haas GH, Sarda L, Desnuelle P: Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity. *Biochim Biophys Acta* **188**: 272-282, 1969
- 19) Cozzone P, Pasero L, Beaupoil B, Marchis-Mouren G: Characterization of porcine pancreatic isoamylases chemical and physical studies. *Biochim Biophys Acta* **207**: 490-504, 1970

- 20) Dayhoff MO: In Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol 5, National Biomedical Foundation (Washington D.C.) 1972
- 21) Dayhoff MO: In Atlas of Protein Sequence and Structure. Vol 5, Suppl 2, National Biomedical Foundation (Washington D.C.) 1972
- 22) Fujibayashi Y, Saji H, Yomoda I, Suzuki KH, Torizuka K, Yokoyama A: A new approach toward a pancreas-seeking zinc radiopharmaceutical I. Accumulation of ^{65}Zn -amino acid and aminopolycarboxylic acid complexes in pancreatic tissue slices. Eur J Nucl Med 11: 484-487, 1986
- 23) Agnew JE, Maze M, Mitchell CJ: Pancreatic scanning. Br J Radiol 49: 979-995, 1976
- 24) Stadie WC, Riggs BC: Microtome for the preparation of tissue slices for metabolic studies of surviving tissue in vitro. J Biol Chem 154: 687-690, 1944
- 25) Hayes RL, Washburn LC, Wieland BW, Sun TT, Anon JB, Butler TA, Callahan AP: Synthesis and purification of ^{11}C -carboxyl-labeled amino acids. Int J Appl Radiat Isot 29: 186-187, 1978
- 26) Washburn LC, Sun TT, Byrd BL, Hayes RL: High-level production of C-11-carboxyl-labeled amino acids. In Radiopharmaceuticals II. pp 767-777, Society of Nuclear Medicine (New York) 1979
- 27) Washburn LC, Sun TT, Byrd BL, Callahan AP: Resolution of [^{11}C]DL-leucine and [^{11}C]DL-tryptophan by high-performance liquid chromatography. J Label Compd Radiopharm 22: 135-142, 1985
- 28) Wiseman G: Absorption of amino acids using an in vitro technique. J Physiol 120: 63-72, 1953
- 29) Christensen HN: Amino acid transport and nutrition. Fed Proc 22: 1110-1114, 1963
- 30) Casey DL, Digenis GA, Wesner DA, Washburn LC, Chaney JE, Hayes

- RL, Callahan AP: Preparation and preliminary tissue studies of optically active ^{11}C -D- and L-phenylalanine. Int J Appl Radiat Isot **32**: 325-330, 1981
- 31) Barrio JR, Keen RE, Ropchan JR, MacDonald NS, Baumgartner FJ, Padgett HC, Phelps ME: L-[1- ^{11}C]Leucine: routine synthesis by enzymatic resolution. J Nucl Med **24**: 515-521, 1983
- 32) Washburn LC, Sun TT, Byrd BL, Callahan AP: Production of L-[1- ^{11}C]valine by HPLC resolution. J Nucl Med **23**: 29-33, 1982

第2節 ^{14}C -L-methionineの標識部位による代謝親和性の変化

標識アミノ酸の中で、[S-methyl- ^{14}C]-L-methionineは、L-homocysteineを原料とし、メチル化剤である ^{14}C - CH_3I と反応させることにより、光学異性体分割の必要無しに、L-アミノ酸として短時間に得られるという合成上の有利性を有しているが、 ^{14}C - CH_3I の自動合成装置の開発研究の進歩を背景として、本化合物の合成が行われ、膵臓[1]、脳[2]、腫瘍[3-5]等の核医学診断への応用が報告されるようになった。京都大学医学部附属病院においても[S-methyl- ^{14}C]-L-methionineの臨床研究が開始され[6]、その代謝機能診断薬としての基礎的な評価が急がれた。[S-methyl- ^{14}C]-L-methionineの膵臓集積に関しては、既に、PETを用いた種々の検討において、膵臓の外分泌機能を反映していることが示された報告もなされた[1]が、一方、第1章第1節で示したように、アミノ酸

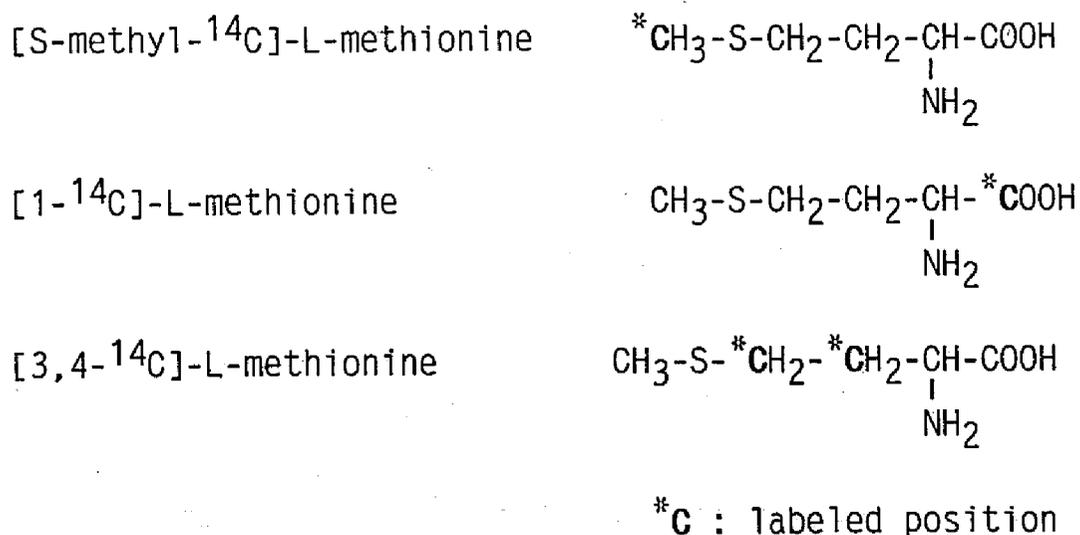


Fig. 1-8 Labeled position of ^{14}C -L-methionines. (*C) labeled position.

の膵臓への集積は、必ずしも、タンパク合成機能を反映しているとはいえない。

そこで、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine (Fig. 1-8) を用い、膵臓における集積性とその代謝挙動について基礎的に検討した。同時に、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine に関する知見を正確に評価するために、脳のタンパク合成速度の測定に適するといわれている [1-¹⁴C]-L-methionine [7,8]、側鎖の骨格を標識した [3,4-¹⁴C]-L-methionine (Fig. 1-8) の膵臓集積性と代謝挙動を比較した。

1. 実験方法

マウス体内分布実験

各 ¹⁴C-L-methionine 0.1ml (7.4kBq, $3.39 \times 10^{-9} \sim 3.92 \times 10^{-9}$ mole) を体重約25g の ddY 系雄性マウスに尾静脈より投与した。以下の操作は、第1章第1節に既述した方法に従って行なった。組織に集積した放射能は、液体シンチレーションカウンター (Aloka社 ARC-900) にて測定した。

組織集積放射能のタンパク画分への組み込み率の検討では、組織50mg を精秤し、重炭酸緩衝溶液450 μ l を加え、ホモジナイズした。この一定量を1.9ml に希釈し、100%トリクロロ酢酸溶液0.1ml を加え、混和した。沈澱画分を0.45 μ m のグラスフィルター (東洋濾紙 GC-50) に捕集し、氷冷5%トリクロロ酢酸溶液で洗浄した後、150 $^{\circ}$ C、1時間加熱処理することによりタンパクを固定し、その放射能を測定した。

[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine (1.89GBq/mmole)、[1-¹⁴C]-L-methionine (1.91GBq/mmole)、[3,4-¹⁴C]-L-methionine (2.18GBq/mmole) は、フランス原子力庁より購入し、生理食塩水にて希釈して用いた。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。

マウス体内分布における動力学的解析

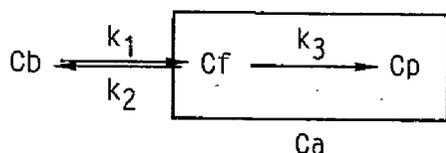
マウス体内分布実験により得られた血中及び膵臓における放射能の経

時的曲線に従い、動力的解析を行なった。まず、血液クリアランス曲線を(1)式にあてはめ、simplex法により $P_1 \sim P_4$ を求めた。

$$C_b = P_1 \times \text{Exp}(-P_2 t) + P_3 \times \text{Exp}(-P_4 t) \text{ ----- (1)}$$

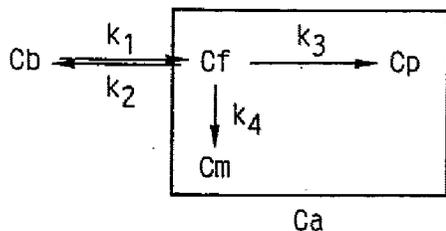
これらの結果を用い、膵臓の集積曲線を、Fig.1-9に示すコンパートメントモデルにあてはめた。膵臓に集積した ^{14}C -L-methionineが遊離のアミノ酸画分あるいはタンパク画分のみには存在する場合には、FDG型モデルを適用することが可能であり、(2)式のように表される[9]。

FDG MODEL



- * C_b : conc. in plasma
- C_f : conc. in free pool
- C_p : conc. in protein fraction
- * C_a : $C_a = C_f + C_p$
- k_1, k_2, k_3 : rate constants
- * : data used

MODIFIED FDG MODEL



- * C_b : conc. in plasma
- C_f : conc. in free pool
- * C_p : conc. in protein fraction
- C_m : conc. in metabolite(s)
- * C_a : $C_a = C_f + C_p + C_m$
- k_1, k_2, k_3, k_4 : rate constants
- * : data used

Fig. 1-9 The FDG and modified FDG kinetic models.

$$\begin{aligned} dC_f/dt &= k_1 C_b - (k_2 + k_3) C_f \\ dC_p/dt &= k_3 C_f \end{aligned} \quad \text{----- (2)}$$

しかし、膵臓に集積した放射能が、アミノ酸以外の低分子代謝物画分にも存在する場合は、代謝物への移行をも考慮した修正FDG型モデルが適用され、(3)式が導かれる。

$$\begin{aligned} dC_f/dt &= k_1 C_b - (k_2 + k_3 + k_4) C_f \\ dC_p/dt &= k_3 C_f \\ dC_m/dt &= k_4 C_f \end{aligned} \quad \text{----- (3)}$$

但し、(2)式、(3)式では、今回検討した投与後15分までには、放射性炭素が組み込まれたタンパクの分解あるいはタンパクや低分子代謝物の膵臓外への放出は無視できると仮定されている。上記式中の各記号は、以下のように定めた。

- C_b : 血液に存在する放射能濃度 (%投与量/ml血漿)
- C_f : 膵臓の遊離アミノ酸画分中の放射能濃度 (%投与量/g組織)
- C_p : 膵臓のタンパク画分中の放射能濃度 (%投与量/g組織)
- C_m : 膵臓のアミノ酸以外の低分子代謝物画分中の放射能濃度
(%投与量/g組織)
- t : 投与後の経過時間 (分)

薄層クロマトグラフィーによる酸可溶性代謝物の分析

[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine 0.1ml (185kBq, 9.80×10^{-8} mole) を体重約25gのddY系雄性マウスに尾静脈より投与し、15分後にエーテル麻酔により屠殺し、膵臓(110~150mg)を摘出した。直ちに、重炭酸緩衝溶液を加え、全量を475 μ lとし、ホモジナイズした。その後、100%トリクロロ酢酸溶液25 μ lを加えて、混和し、遠心分離により得た上清をシリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck社 Art. 5553、展開溶媒: ブタノール: 酢酸: 水 = 4:1:1、メタノール: 25% アンモニア水 = 70:1) にて分析した。L-methionineのS-メチル基は、メチル基転移反応の一般的な基質である[10]ことから、メチル基転移反応における最も重要な中間体であるS-adenosyl-L-methionine (Sigma社) を標準物質の1つとして用いた。

放射能の測定には、ラジオクロマトスキャナー（Aloka社 Radiochromanizer）を用いた。また、非放射性標準物質の検出には、ニンヒドリン発色法を用いた。

2. 結果

マウス体内分布及び膵臓内タンパクへの組み込み

Table 1-6には、各 ^{14}C -L-methionineのマウス体内分布実験の結果を示す。いずれの ^{14}C -L-methionineも肝臓あるいは血漿に比較して、膵臓への選択的な集積を示した。しかし、放射能の膵臓集積は、それぞれ異なる経過を示した。即ち、[S-methyl- ^{14}C]-L-methionineが最も安定な滞留を、ついで[3,4- ^{14}C]-L-methionineが滞留を示した。一方、[1- ^{14}C]-L-methionineは、投与後15分以内に消失しはじめた。このように、 ^{14}C -L-methionineの標識部位の相違は、結果的に、膵臓における放射能の滞留性を顕著に変化させた。

そこで、各 ^{14}C -L-methionineの膵臓におけるタンパク合成機構への親和性に関する検討を行なった。Fig.1-10に、マウス膵臓における放射能のタンパク画分への組み込み率を示す。[S-methyl- ^{14}C]-L-methionine、[3,4- ^{14}C]-L-methionineが投与後10分以降、総集積放射能の50~60%と比較的安定したタンパク組み込み率を示したのに対し、[1- ^{14}C]-L-methionineの場合には、投与後15分以降に集積した放射能の90%以上がタンパク画分に見い出された。

マウス体内分布における動力学的解析

Fig.1-11には、[S-methyl- ^{14}C]-L-methionineを投与したマウス体内分布の結果をFig.1-9に示すFDG型モデルと修正FDG型モデルに基づき、simplex法により解析した結果を示す。(1)式より、血液クリアランスの媒介変数である P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 はそれぞれ6.0%投与量/ml血漿、 0.98min^{-1} 、0.82%投与量/ml血漿、 0.0047min^{-1} となった。これらの定数

Table 1-6 BIODISTRIBUTION OF ^{14}C -L-METHIONINES IN MICE^{a)}

	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min
[S-methyl- ^{14}C]-L-methionine :					
Pancreas	24.20 (2.84)	30.31 (5.86)	32.67 (9.11)	36.74 (10.85)	41.44 (4.67)
Plasma	2.41 (0.46)	1.33 (0.17)	1.25 (0.35)	1.50 (0.49)	1.91 (0.31)
Liver	9.54 (1.17)	10.45 (1.26)	14.41 (1.29)	13.56 (5.47)	14.98 (3.51)
Kidney	7.86 (1.54)	6.68 (0.77)	7.73 (1.30)	6.85 (1.66)	7.80 (0.61)
[1- ^{14}C]-L-methionine :					
Pancreas	20.82 (5.45)	27.31 (9.12)	34.46 (10.73)	29.87 (7.24)	27.77 (3.78)
Plasma	1.14 (0.13)	1.28 (0.08)	2.07 (0.54)	1.63 (0.37)	2.00 (0.08)
Liver	6.30 (2.75)	4.97 (0.47)	7.87 (2.34)	7.14 (1.36)	5.28 (0.73)
Kidney	6.04 (0.82)	6.79 (0.34)	6.97 (1.10)	6.76 (0.42)	5.53 (0.30)
[3,4- ^{14}C]-L-methionine :					
Pancreas	35.38 (5.02)	28.07 (2.25)	30.10 (10.14)	31.78 (3.53)	33.40 (3.58)
Plasma	6.46 (0.70)	4.65 (0.30)	3.92 (0.62)	3.03 (0.23)	2.87 (0.37)
Liver	4.69 (0.66)	4.39 (0.54)	5.51 (0.43)	6.41 (0.91)	6.60 (0.45)
Kidney	14.09 (0.92)	12.66 (0.75)	14.46 (2.16)	19.01 (1.39)	19.78 (3.51)

a) % dose/g tissue, mean (1 S.D.) of the data from three mice.

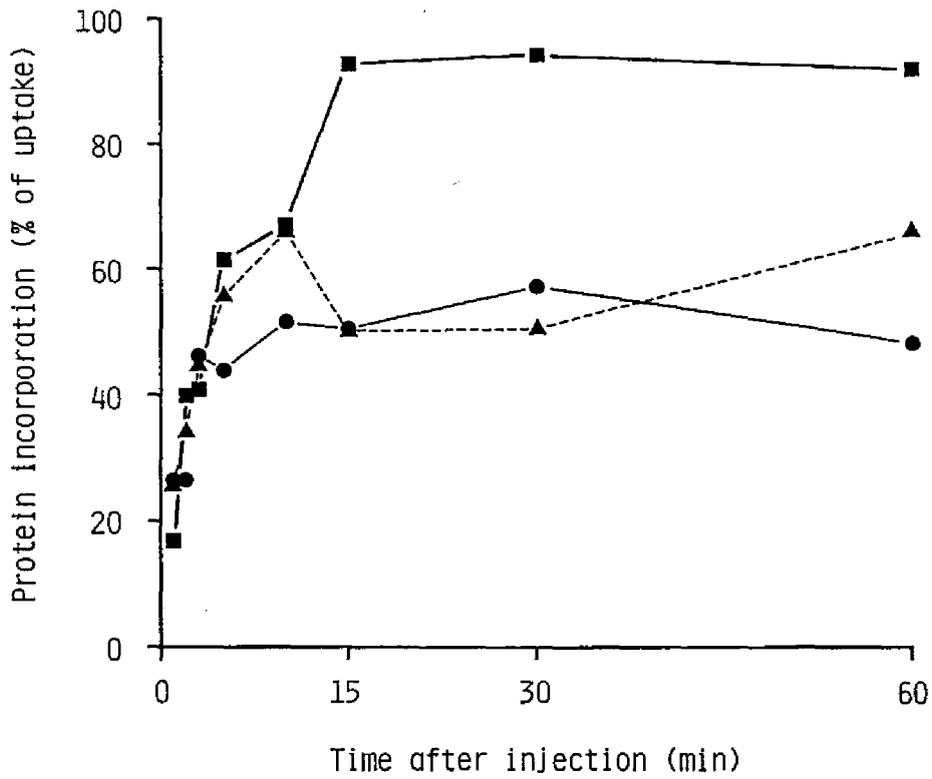


Fig. 1-10 Protein incorporation of ^{14}C -L-methionines by mouse pancreas. Each point represents the mean of the data from three mice. (●) [S-methyl- ^{14}C]-L-methionine; (■) [1- ^{14}C]-L-methionine; and (▲) [3,4- ^{14}C]-L-methionine.

を(2)式に代入し、膵臓領域における集積曲線を解析した結果、 k_1 、 k_2 、 k_3 はそれぞれ 5.5min^{-1} 、 0.35min^{-1} 、 0.20min^{-1} に収束したが、得られた曲線は、膵臓の集積量(C_a)とは合致したものの、タンパク画分(C_p)を過剰評価した(Fig.1-11)。同様に(3)式において解析を行なった結果、 k_1 、 k_2 、 k_3 、 k_4 はそれぞれ 5.8min^{-1} 、 0.65min^{-1} 、 0.23min^{-1} 、 0.19min^{-1} となり、集積量、タンパク画分、遊離アミノ酸を含む低分子代謝物画分

($C_f + C_m$) 共に、得られたデータと良く合致した (Fig. 1-11)。

同様の解析を [$1-^{14}\text{C}$]-L-methionine を投与したマウス体内分布について行なった結果、血液クリアランスの媒介変数である P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 はそれぞれ 7.7% 投与量/ml 血漿、 0.57min^{-1} 、1.2% 投与量/ml 血漿、 0.0050min^{-1} となった。これらの定数を用い、FDG 型モデル (Fig. 1-9) において解析した結果、 k_1 、 k_2 、 k_3 はそれぞれ 3.5min^{-1} 、 0.69min^{-1} 、 0.27min^{-1} に収束し、集積量、タンパク画分共に、得られたデータと合致した (Fig. 1-12)。

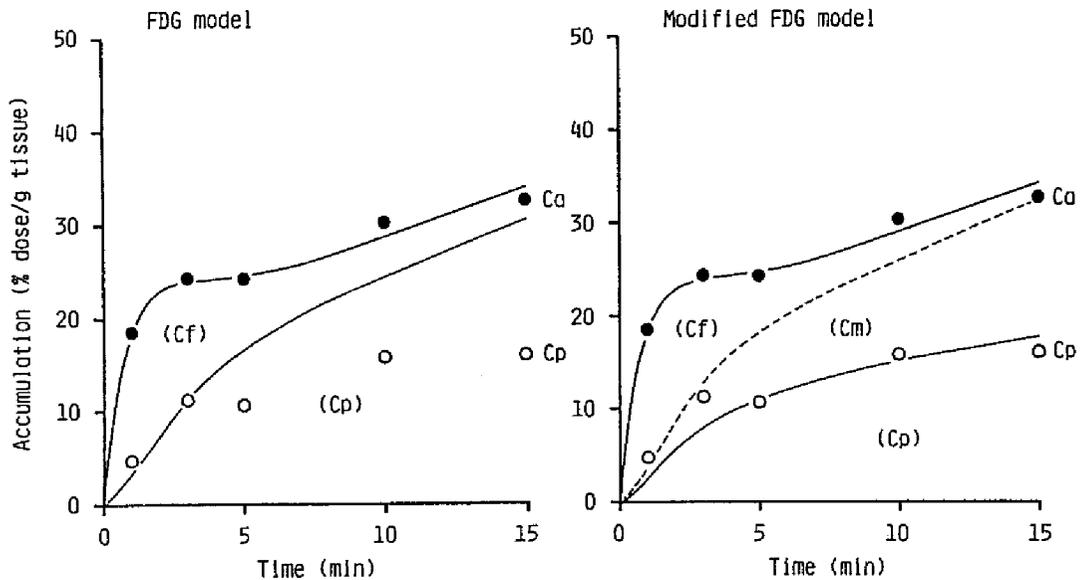


Fig. 1-11 Accumulation of [$S\text{-methyl-}^{14}\text{C}$]-L-methionine in mouse pancreas and the result of kinetic analysis by the FDG and modified FDG models. The experimental data (● ; Ca, ○ ; Cp) are compared with the theoretical curves (lines).

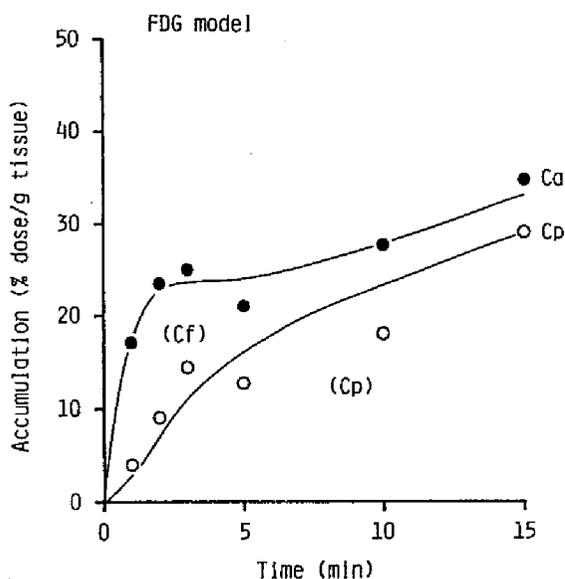


Fig. 1-12 Accumulation of $[1-^{14}\text{C}]$ -L-methionine in mouse pancreas and the result of kinetic analysis by the FDG model. The experimental data (●; Ca, ○; Cp) are compared with the theoretical curves (lines).

薄層クロマトグラフィーによる酸可溶性代謝物の分析

S-メチル基由来の酸可溶性放射性代謝物をより詳しく検討するために、 $[S\text{-methyl-}^{14}\text{C}]\text{-L-methionine}$ を投与したマウス膵臓の酸可溶性画分に存在する放射能を薄層クロマトグラフィーにより分析した。酸性及び塩基性展開溶媒のいずれにおいても、投与後15分の初期において、膵臓に存在する放射能の大部分は、S-adenosyl-L-methionineと同じ画分に見い出された (Fig. 1-13)。

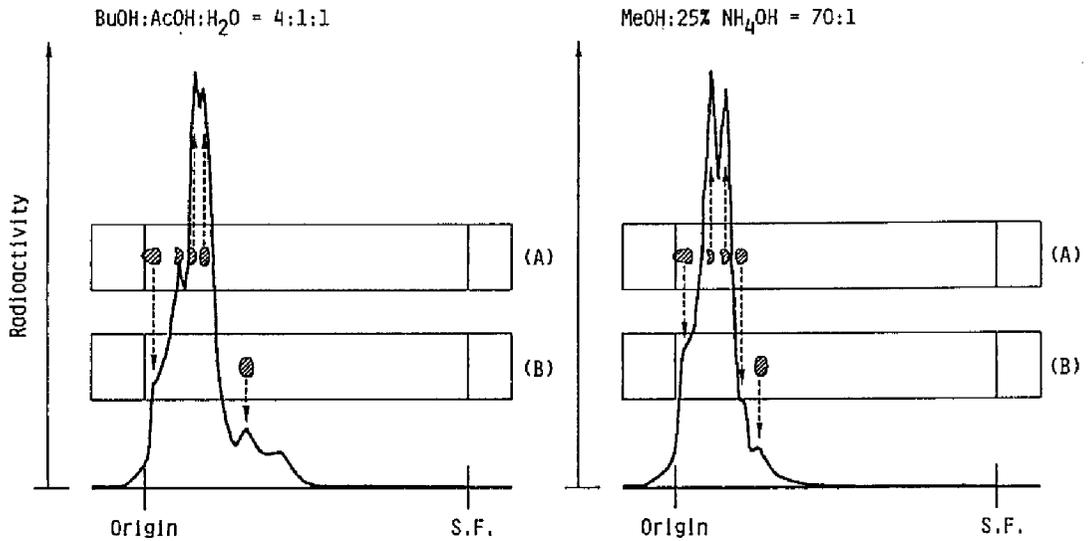


Fig. 1-13 Thin-layer chromatography profiles of the radioactivity in the acid soluble fraction of mouse pancreas injected with [S-methyl-¹⁴C]-L-methionine. Ninhydrin spots of (A) S-adenosyl-L-methionine, and (B) L-methionine.

3. 考察

タンパク合成機能の測定におけるアミノ酸の標識部位の重要性は、既に、脳において議論されている [7,8]。一般に、アミノ酸は、タンパク合成、神経伝達物質合成、エネルギー産生等の基質として用いられる。L-methionineの代謝過程をFig.1-14に示す。[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine特有の標識部位であるS-メチル基は、メチル基転移反応の一般的な基質であり、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineとして投与された¹⁴Cは、脳において、タンパクへ組み込まれるだけでなく、S-adenosyl-L-methionineを経て神経伝達物質や代謝中間体等の種々のメチル基受容

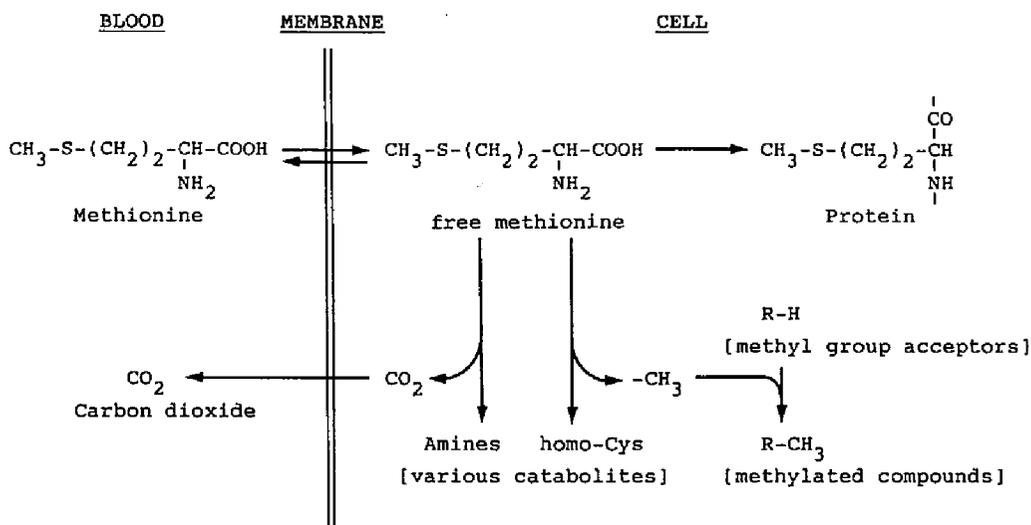


Fig. 1-14 Metabolic pathway of L-methionine.

物質に転移され[10]、滞留する。[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineを投与したマウスにおいて、脾臓に存在する放射能の大部分が、S-adenosyl-L-methionineと同じ画分に見い出された(Fig.1-13)ことより、メチル基転移反応は、脾臓においても同様に[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineの滞留に寄与する代謝過程の1つであることが示された。事実、¹⁴C-L-methionineにおける標識部位の相違は、放射能の脾臓への分布を変化させた(Table 1-6)。脾臓のタンパクに組み込まれた放射能の絶対量は、3種の¹⁴C-L-methionineで同じ値になることから、このような標識部位による分布挙動の変化は、おもに酸可溶性代謝物の性質によるものであり、タンパク合成の寄与によるものではないと思われた。特に、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineの場合、放射能の滞留に対する酸可溶性画分の寄与が大きいことが認められた(Fig.1-10)。[S-methyl-¹⁴C]-L-methionine投与マウスの脾臓においては、メチル基転移反応は、放射能の滞留に寄与する重要な機序であると考えられる。モデル解析の結果でも示されたように、[S-methyl-¹¹C]-L-methionineの滞留は、タンパク合成と滞留性メチ

ル基転移反応の和として評価できると考えられる (Fig.1-11)。組織の残存放射能からタンパク合成速度を計算するためには、標的組織における放射性代謝物を無視しなければならないことから [11]、当初期待された [S-methyl- ^{14}C]-L-methionineを用いる膵臓のタンパク合成速度の測定は困難であることが明らかとなった (Fig.1-15)。

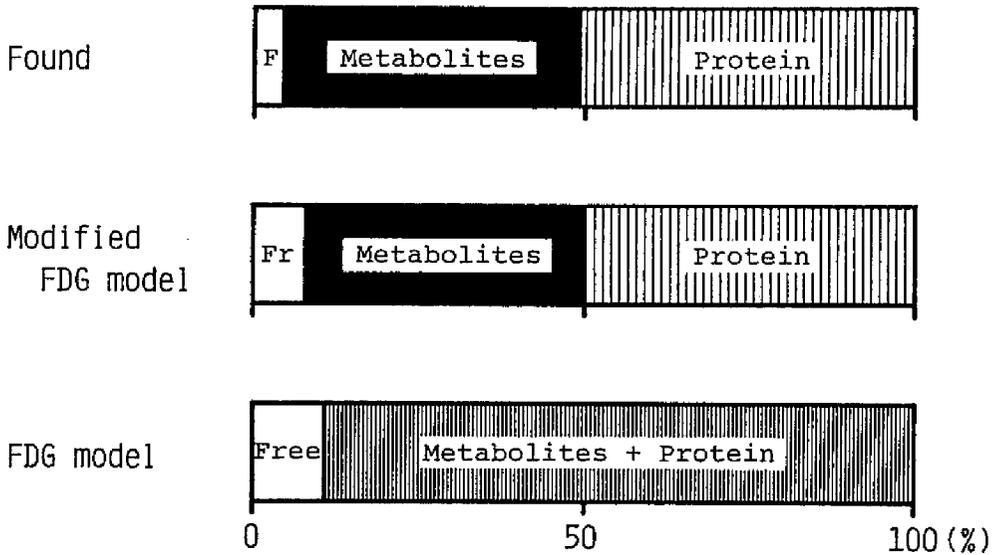


Fig. 1-15 Fractional ^{14}C distribution in mouse pancreas injected with [S-methyl- ^{14}C]-L-methionine 15 min. after intravenous injection. Open area, free amino acid fraction; solid area, metabolite fraction; and striped area, protein fraction.

Sokoloffらは、脳のタンパク合成速度の測定には、1-位標識アミノ酸を用いることを提唱している [9]。膵臓においても、[1- ^{14}C]-L-methionineを投与した場合には、投与後15分で集積した放射能の90%以上がタンパクに組み込まれており (Fig.1-10)、モデル解析の結果において

も、その集積、滞留が、タンパク合成を選択的に反映していた (Fig. 1-12)。これらの結果より、膵臓においても、[1-¹⁴C]-L-methionineは、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineよりタンパク合成速度の測定に適していると思われた。

結論として、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineは、膵臓において、タンパク合成とメチル基転移反応の和で近似されるmethionine代謝全体を反映すると考えられる挙動を示し、タンパク合成機能診断薬としては用い得ないことが明らかとなった。

引用文献

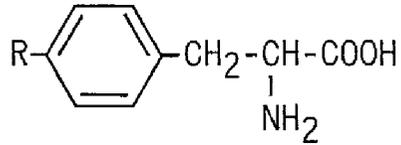
- 1) Syrota A, Comar D, Cerf M, Plummer D, Maziere M, Kellershohn C: [^{11}C]Methionine pancreatic scanning with positron emission computed tomography. *J Nucl Med* **20**: 778-781, 1979
- 2) Bustany P, Henry JF, Sargent T, Zarifian E, Cabanis E, Collard P, Comar D: Local brain protein metabolism in dementia and schizophrenia: in vivo studies with ^{11}C -methionine and positron emission tomography. In *Positron Emission Tomography of the Brain*. pp 208-211, Springer-Verlag (Berlin) 1983
- 3) Meyer GJ, Schober O, Hundeshagen H: Uptake of ^{11}C -L- and D-methionine in brain tumors. *Eur J Nucl Med* **10**: 373-376, 1985
- 4) Bergstrom M, Collins P, Ehrin E, Ericson K, Eriksson L, Greitz T, Halldin C, von Holst H, Langstrom B, Lilja A, Jundqvist H, Nagren K: Discrepancies in brain tumor extent as shown by computed tomography and positron emission tomography using [^{68}Ga]-EDTA, [^{11}C]glucose and [^{11}C]methionine. *J Comput Assist Tomogr* **7**: 1062-1066, 1983
- 5) Kubota K, Matsuzawa T, Ito M, Ito K, Fujisawa T, Abe Y, Yoshioka S, Fukada M, Hatazawa J, Iwata R, Watanuki S, Ido T: Lung tumor imaging by positron emission tomography using C-11 L-methionine. *J Nucl Med* **26**: 37-42, 1985
- 6) Shibata T, Yamamoto K, Yonekura Y, Senda M, Nishizawa S, Tamaki N, Mukai T, Saji H, Fujibayashi Y, Konishi J: PET imaging of the pancreatic diseases using ^{11}C -methionine. *Jpn J Nucl Med* **24**: 1110(abstract), 1987
- 7) Barrio JR, Keen RE, Chugani H, Ackermann R, Chugani DC, Phelps ME: L-[1- ^{11}C] Phenylalanine for the determination of cerebral protein synthesis rates in man with positron emission tomography. *J Nucl Med* **24**: P70, 1983

- 8) Bolster JM, Vaalburg W, Elsinga PhH, Wynberg H, Woldring MG: Synthesis of DL-[1-¹¹C] methionine. Appl Radiat Isot 37: 1069-1070, 1986
- 9) Smith CB, Davidsen C, Deibler G, Patlak C, Pettigrew K, Sokoloff L: A method for the determination of local rates of protein synthesis in brain. Trans Am Soc Neurochem. 11: 94, 1980
- 10) Cooper AJL: Biochemistry of sulfur-containing amino acids. Ann Rev Biochem 52: 187-222, 1983
- 11) Barrio JR: Biochemical principles in radiopharmaceutical design and utilization. In Positron Emission Tomography and Autoradiography: Principles and Applications for the Brain and Heart. pp 451-492, Raven Press (New York) 1986

第2章 シングルフォトン放出放射性ヨウ素標識アミノ酸のアミノ酸代謝機能診断薬としての可能性に関する検討

第1章で述べたように、 ^{11}C 、 ^{13}N 等のポジトロン放出核種標識アミノ酸を用いる機能診断は、膵臓の核医学診断に非常に有用な情報を与える[1-5]が、この核医学診断法の普及のためには、企業供給の可能な ^{123}I 等のシングルフォトン放出核種で標識された放射性医薬品の開発が更に強く望まれるところである[6]。一方、近年、核医学診断において標的組織における代謝機能を定量的に測定し、その結果を速度論的に解析する定量的核医学診断が種々検討されているが、このような定量的核医学診断を行なう場合、 ^{18}F -2-deoxy-2-fluoro-D-glucoseのように異種標識元素を導入した標識化合物の高い有用性が認められている[7-9]。即ち、標識天然化合物が多く代謝機構の関与した解析の困難な複雑な集積挙動を示すのに対して、特定の代謝機構のみに対して親和性を保持する異種元素導入放射性医薬品は、その代謝機構のみを考慮した単純なモデルによって解析できる点に優れる訳である。以上の観点から、放射性ヨウ素標識アミノ酸の開発は、アミノ酸代謝に関連する核医学検査の普及に貢献するのみでなく、そのヨウ素修飾によって代謝要素の解析をより容易にする可能性が期待される。

第1章の検討から、L-phenylalanineが、L-leucine、L-methionine、L-serine等の他の中性アミノ酸と比較して、高く持続的な膵臓集積を示すことを見出した。そこで、膵臓における代謝機能診断用 ^{123}I 標識アミノ酸放射性医薬品の開発を目的として、アミノ酸代謝挙動に対する放射性ヨウ素標識の影響を、 ^{125}I -p-iodo-D,L-phenylalanine (^{125}I -PIPA: Fig. 2-1)をモデル化合物として基礎的に検討した。 ^{125}I -PIPAについては、高い膵臓集積を示すことが報告されているが、ヨウ素修飾が、複雑なアミノ酸代謝機構にどのような影響を与えるかについては十分には論じられていない[10-14]。本章では、膵臓における集積挙動を母体天然アミノ酸である[U- ^{14}C]-L-phenylalanine (^{14}C -Phe)とin vitro、in vivoの両面



R = H : phenylalanine (Phe)

R = I : p-iodophenylalanine (PIPA)

Fig. 2-1 Structure of phenylalanine and p-iodophenylalanine.

R=H: phenylalanine (Phe), R=I: p-iodophenylalanine (PIPA).

から比較することにより、アミノ酸の代謝挙動に対するヨウ素修飾の影響を明らかにすると共に、ヨウ素標識アミノ酸の放射性医薬品としての有用性を考察した。

1. 実験方法

¹²⁵I-PIPAの調製

¹²⁵I-PIPAは、Counsellらの方法 [11] に従い、同位体交換法により調製した。反応容器内を乾燥N₂ガスで置換した後、無担体¹²⁵I-NaI溶液10μl (37MBq: Amersham社) と非放射性PIPA 100mgを溶解した酢酸溶液0.5mlをN₂ガス気流下容器に入れた。蒸留水3mlで酢酸溶液を洗い込んだ後、110℃で24時間還流した。反応後、メタノール: 水系でPIPAを析出させ、20%メタノールで洗浄し、遊離のヨウ素イオン(I⁻)より分離、精製した。比放射能及び放射化学的純度は、メタノール: 酢酸=100:1 (Rf値、PIPA=0.50、I⁻=0.75) 並びにメタノール: 10%酢酸アンモニウム=10:1 (Rf値、PIPA=0.55、I⁻=0.80) の溶媒系によるシリカゲル薄層クロマト

グラフィー (Merck社 Art. 5553) を用いて検討した。

比較には、標識天然アミノ酸として、 ^{14}C -Phe (16.7GBq/mmole)、 ^{14}C -Leu (11.1GBq/mmole)、 ^{14}C -Ser (5.55GBq/mmole)、 ^{14}C -Glu (7.40GBq/mmole) は、フランス原子力庁、[S-methyl- ^{14}C]-L-methionine (^{14}C -Met: 1.90GBq/mmole) は、New England Nuclear社より購入したものをを用いた。

ラット組織切片集積実験

ラット組織切片集積実験は、第1章第1節に既述した方法に従って行なった。サンプル中の最終アミノ酸濃度は、 ^{125}I -PIPA: 1×10^{-5} M (0.44kBq/ml)、 ^{14}C -Phe: 1×10^{-7} M (1.7kBq/ml) とした。

Ouabainによる膜能動輸送機構阻害実験では、 $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-3}$ Mのouabainを含む溶媒を用いた。また、PIPAによる ^{14}C 標識天然アミノ酸集積阻害実験では、非放射性PIPA (最終濃度: 1×10^{-3} M) と ^{14}C 標識天然アミノ酸 (最終濃度: 1×10^{-7} M, 0.38~3.3kBq) を同時投与し、37°Cで、120分間、振盪した。

放射能の測定には、 ^{125}I -PIPAは、井戸型シンチレーションカウンター (Aloka社 ARC-300) を、 ^{14}C 標識アミノ酸は、第1章第1節に既述した方法で組織を溶解した後、液体シンチレーションカウンター (Packard社 3385型 TRI-CARB) を用いた。

マウス体内分布実験

標識アミノ酸の生理食塩溶液0.1ml (^{125}I -PIPA: 2×10^{-7} mole, 8.8kBq, ^{14}C -Phe: 4×10^{-10} mole, 7.4kBq) を体重約25gのddY系雄性マウスに尾静脈より投与し、一定時間後にエーテル麻酔にて屠殺した。ヘパリン処理注射器を用いて心臓穿刺により採血した後、脾臓、肝臓を摘出した。 ^{14}C -Phe投与マウスの血液は遠心分離して血漿を0.1ml採取し、上記の方法により放射能を測定した。また、第1章第2節に既述した方法に従い、タンパクに組み込まれた放射能を測定した。

2. 結果

^{125}I -PIPAの調製

精製後、比放射能 $44\text{MBq}/\text{mmole}$ 、放射化学的純度95%以上の ^{125}I -PIPAが得られた。

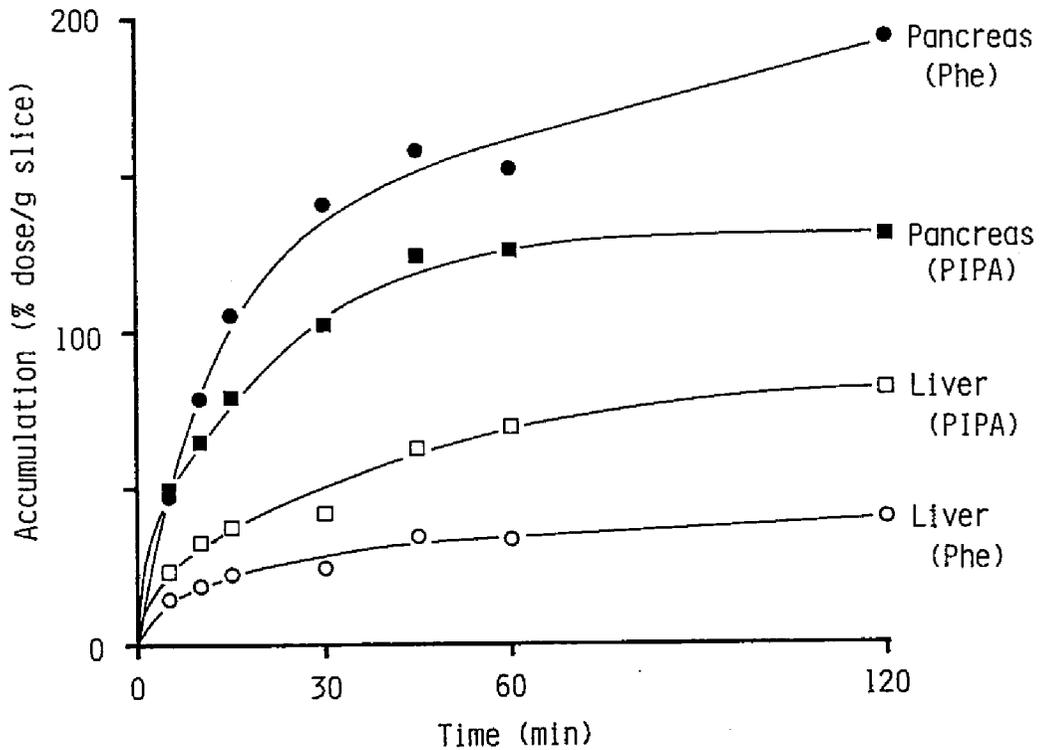


Fig. 2-2 Accumulation of ^{125}I -PIPA and ^{14}C -Phe in rat tissue slices at 37°C . Each point represents the mean of five experiments. (■) ^{125}I -PIPA accumulation in pancreas slices and (□) its accumulation in liver slices. (●) ^{14}C -Phe accumulation in pancreas slices and (○) its accumulation in liver slices.

ラット組織切片への集積

ラット膵臓あるいは肝臓切片1g当たりの集積率をFig. 2-2に示す。 ^{125}I -PIPAの集積は、1時間で膵臓切片に $126.3 \pm 19.8\%$ 投与量/g組織、肝臓切片に $69.4 \pm 4.3\%$ 投与量/g組織であり、膵臓切片への集積が肝臓の約2倍であった。また、 ^{125}I -PIPAの膵臓切片への集積は、投与後5分では ^{14}C -Pheと同等であったが、時間の経過と共に増加率は若干減少し、45分～60分後で、 ^{14}C -Pheの約8割程度になった。一方、 ^{125}I -PIPAの肝臓切片への集積は、投与初期から ^{14}C -Pheの1.6倍であり、更に、60分迄に2倍になるなど増加する傾向が観察された。

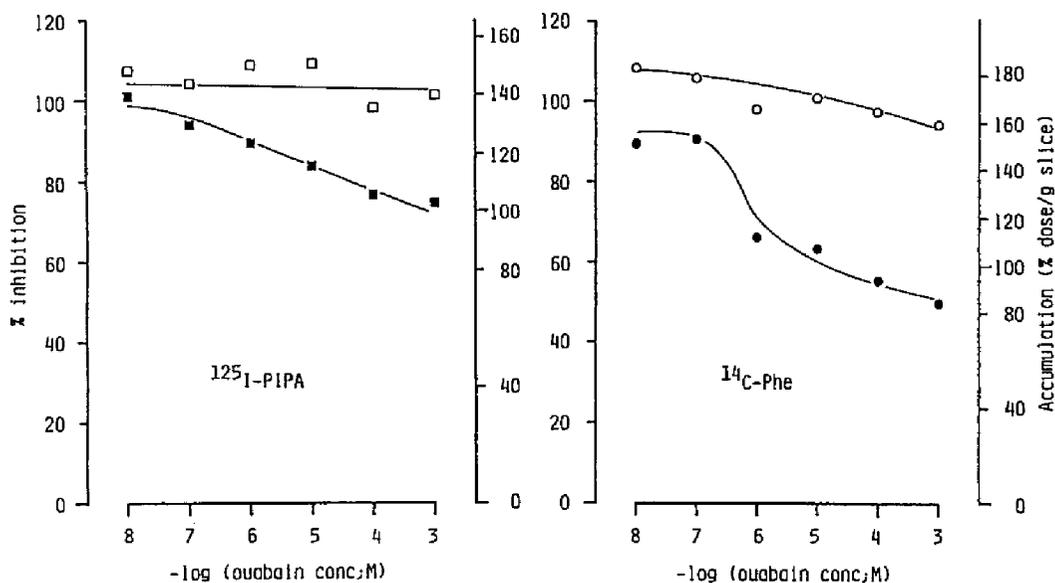


Fig. 2-3 Effects of ouabain on ^{125}I -PIPA and ^{14}C -Phe accumulation in rat tissue slices. Each point represents the mean of five experiments. Solid symbols show % of control accumulation in pancreatic slices, and open symbols show the same for liver slices.

ラット組織切片への集積に対する ouabain の影響

Fig. 2-3に、 ^{125}I -PIPA、 ^{14}C -Pheの膵臓あるいは肝臓切片への集積に対する ouabain 濃度の影響を対照群に対する割合で表す。エネルギー依存性能動輸送機構の阻害剤である ouabain は、 ^{125}I -PIPA、 ^{14}C -Pheの膵臓切片への集積を 1×10^{-6} Mの低濃度領域から阻害し、ouabain 濃度 1×10^{-4} Mで、 ^{125}I -PIPA: $76.8 \pm 7.0\%$ 、 ^{14}C -Phe: $55.1 \pm 11.1\%$ と集積の低下が示された。一方、肝臓切片においては、同様の濃度の ouabain で、 ^{125}I -PIPA: $98.6 \pm 17.6\%$ 、 ^{14}C -Phe: $97.1 \pm 12.9\%$ であり、両者共、ほとんど阻害が認められなかった。

^{14}C 標識天然アミノ酸のラット組織切片への集積に対する非放射性PIPAの影響

Table 2-1に、 ^{14}C 標識天然アミノ酸の膵臓あるいは肝臓切片への集積に対する非放射性PIPAの影響を対照群に対する割合で示す。PIPAは、ラット血漿中 phenylalanine 濃度 [15] の約10倍の濃度において、 ^{14}C -Phe: $66.2 \pm 8.2\%$ と膵臓への集積を低下させた。一般に、脳、腎臓、腫瘍等において複数の中性アミノ酸能動輸送機構 (leucine系、alanine系等) の

Table 2-1 EFFECT OF PIPA ON ^{14}C -L-NATURAL AMINO ACID ACCUMULATION IN RAT TISSUE SLICES^{a)}

	^{14}C -Phe	^{14}C -Leu	^{14}C -Met	^{14}C -Ser	^{14}C -Glu
Pancreas	66.22 (8.23)	75.13 (9.26)	87.15 (11.64)	82.63 (8.68)	98.26 (5.58)
Liver	97.35 (11.28)	95.77 (18.42)	94.88 (4.78)	94.89 (13.03)	95.57 (9.61)

a) % accumulation of control, mean (1 S.D.) of the data from three to ten rats.

存在が知られている [16-18] が、L-phenylalanineと同じleucine系輸送機構によって膜輸送されると言われている ^{14}C -Leu、 ^{14}C -Serも膵臓においては集積が低下し、leucine系、alanine系両方に親和性を有する ^{14}C -Metも小さいながらも低下を示した。また、酸性アミノ酸能動輸送機構によって膜輸送される ^{14}C -Glu [19, 20] では、PIPAの存在による集積阻害が観察されなかった。一方、肝臓では、すべてのアミノ酸において、影響が認められなかった。

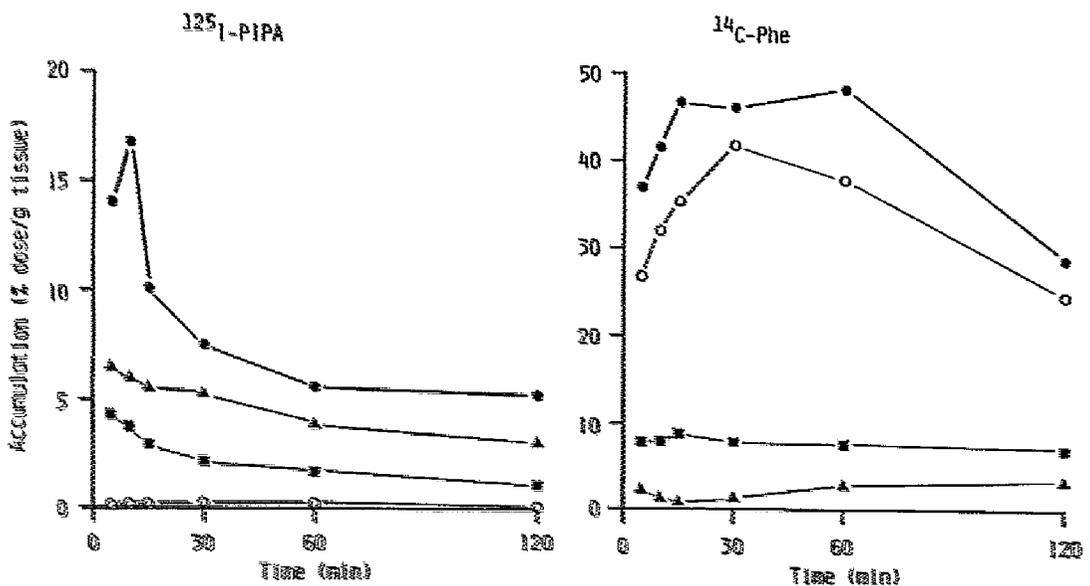


Fig. 2-4 Biodistribution of ^{125}I -PIPA and ^{14}C -Phe in mice. Each point represents the mean of the data from three mice. (●) Accumulation in the pancreas; (■) accumulation in the liver; (▲) ^{125}I -PIPA level in blood and ^{14}C -Phe level in plasma; and (○) protein incorporation by the pancreas.

マウス体内分布及び膵臓内タンパクへの組み込み

Fig. 2-4に、 ^{125}I -PIPAと ^{14}C -Pheのマウス体内分布における膵臓、肝臓、血液または血漿への集積を、また、Table 2-2に、膵臓における全集積量に対するタンパク画分中の放射能の割合を経時的に示す。膵臓において、 ^{14}C -Pheでは、投与後15分 ($46.7 \pm 4.9\%$ 投与量/g組織) から60分 ($48.1 \pm 6.4\%$ 投与量/g組織) にかけて持続性の高い集積が観察され、クリアランスも比較的遅いことが認められた。また、集積量の70%以上が常にタンパク画分に見い出された。これに対し ^{125}I -PIPAでは、投与後10分 ($16.8 \pm 5.6\%$ 投与量/g組織) にピークが現れた後、早いクリアランスが認められ、また、タンパク画分には常に集積量の5%以下しか見い出されなかった。両者のタンパク合成機構に対する親和性の差は、光学異性の影響としては大きすぎるため、おもにヨウ素修飾に起因するものであると考えられる。肝臓への分布は、 ^{14}C -Pheの方が、血液レベルは ^{125}I -PIPAの方がそれぞれ高く、また、 ^{125}I -PIPAでは肝臓、血液共に早いクリアランスが観察された。更に、投与後120分までの範囲で、 ^{14}C -Pheで見られた肝臓への貯留や血液への再分布が、 ^{125}I -PIPAでは認められなかった。 ^{125}I -PIPAの体内分布の結果は、Ullbergらの報告[10]と良く一致していた。

Table 2-2 PROTEIN INCORPORATION OF ^{125}I -PIPA AND ^{14}C -PHE IN MOUSE PANCREAS^{a)}

	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	120 min
^{125}I -PIPA	1.13 (0.59)	0.94 (0.83)	1.85 (1.02)	3.63 (0.84)	4.86 (1.48)	2.05 (2.04)
^{14}C -Phe	72.67 (3.79)	77.03 (8.05)	76.20 (5.98)	97.75 (29.07)	78.87 (6.90)	86.07 (11.68)

a) % protein incorporation of accumulation in pancreas, mean (1 S.D.) of the data from three mice.

Table 2-3に、Fig.2-4のマウス体内分布における肝臓、血液または血漿への集積に対する膵臓への集積の割合を示す。¹²⁵I-PIPAの膵臓対肝臓比、膵臓対血液比は共に¹⁴C-Pheのそれらより低いものの、膵臓のイメージングの際に特に問題となる膵臓対肝臓比は、投与後10分の早期において、¹⁴C-Pheの 5.33 ± 0.62 に匹敵する 4.44 ± 1.43 の高値が得られた。

Table 2-3 PANCREAS TO OTHER TISSUE RATIO OF ¹²⁵I-PIPA AND ¹⁴C-PHE ACCUMULATION IN MICE^{a)}

	5 min	10 min	15 min	30 min	60 min	120 min
¹²⁵ I-PIPA :						
Pancreas / Liver	3.25 (0.26)	4.44 (1.43)	3.38 (0.31)	3.44 (0.69)	3.34 (0.68)	4.78 (0.62)
Pancreas / Blood	2.18 (0.16)	2.78 (0.97)	1.82 (0.29)	1.41 (0.18)	1.45 (0.36)	1.74 (0.38)
¹⁴ C-Phe :						
Pancreas / Liver	4.74 (0.72)	5.33 (0.62)	5.50 (0.58)	5.90 (1.60)	6.41 (0.80)	4.81 (0.58)
Pancreas / Plasma	14.88 (1.85)	27.31 (0.79)	44.60 (9.76)	28.40 (6.58)	16.85 (4.08)	8.37 (1.17)

a) mean (1 S.D.) of the data from three mice.

3. 考察

代謝機能診断に用いられる放射性医薬品が具備すべき基本的性質として、標的組織に特徴的な生理、代謝機能を反映する体内挙動を示すことがあげられる。膵臓は、タンパク合成をはじめ、アミノ酸を基質とする活発な合成代謝機能を持ち、周辺組織に比較して非常に高いアミノ酸集

積性を有する組織である [21-24]。 ^{125}I -PIPAはヨウ素修飾アミノ酸であるにもかかわらず、*in vitro*及び*in vivo*において、母体天然アミノ酸である ^{14}C -Pheの挙動とは量的には若干異なるものの、それに匹敵する膵臓選択性を示した (Fig. 2-2, 2-4)。一般に、薬物の標的組織における集積には、第一段階として、取り込み機序が大きく影響する。第1章の検討でも見い出されたように、アミノ酸の膵臓への選択的取り込み機序としては、細胞膜のエネルギー依存性能動輸送機構の存在が知られている [25]。 *In vitro*において、能動輸送機構阻害剤であるouabainにより、 ^{125}I -PIPAの膵臓切片への集積が、 ^{14}C -Pheと同様に減少したことは、 ^{125}I -PIPAが、膵臓におけるアミノ酸能動輸送機構に対する親和性を保持していることを示している (Fig. 2-3)。また、PIPAの存在によって、 ^{14}C -PheをはじめとするL-phenylalanineと共通の輸送機構によって膜輸送される他の天然アミノ酸の膵臓への集積が選択的に低下したことより、PIPAがL-phenylalanineと同様の中性アミノ酸能動輸送機構によって膜輸送されることが確認された (Table 2-1)。更に、 ^{125}I -PIPA、 ^{14}C -Pheの肝臓切片への集積が共に低く、ouabainによる集積の低下が見られなかった結果 (Fig. 2-2, 2-3)も併せて考慮すると、膵臓選択的なアミノ酸集積性は膜能動輸送機構の寄与によるものであることが示唆された。

*In vivo*における ^{125}I -PIPAと ^{14}C -Pheの高い類似性は、投与後早期において観察された (Fig. 2-4)。しかし、その後の膵臓における分布挙動に関しては、 ^{14}C -Pheに観察された滞留が ^{125}I -PIPAでは認められず、滞留機構に対する親和性の相違が示唆された。そこで、膵臓内タンパクへの取り込みを検討した結果、 ^{125}I -PIPA投与では膵臓内に存在する放射能のほとんどが低分子のままであり (Table 2-2)、ヨウ素修飾によってL-phenylalanineが本来有していたタンパク合成機構への親和性を失ったことが明らかとなった。また、 ^{125}I -PIPAは、遊離のヨウ素イオンに特有な体内挙動を示さず、ヨウ素標識放射性医薬品において問題とされる脱ヨウ素化反応に対して、抵抗性を有しているものと推測された。これらの結果から、 ^{125}I -PIPAは、膵臓においてその活発な膜能動輸送機構の寄与により選択的に膵細胞内に集積し、更に、タンパク合成機構に代表され

るその後の滞留機構への親和性を持たないために、速やかに細胞外に移行すると考えられた。即ち、PIPAは膵臓におけるアミノ酸能動輸送機能のみを反映するアミノ酸放射性医薬品として評価される基本的な性質を有していると考えられた。

一方、標的組織における放射能の挙動を体外から定量的に測定、解析するにあたっては、標的組織対周辺組織集積比が十分に高いことが必須条件である。肝臓切片において、 ^{125}I -PIPAが ^{14}C -Pheに比較して若干高く集積したことは、ヨウ素修飾の影響に望ましくない部分があることを示している (Fig. 2-2)。しかし、このような影響は、*in vivo*においては、 ^{125}I -PIPAの血中消失の速さによって問題となくなっている。更に、ヨウ素修飾によって、天然アミノ酸の持つ多様な代謝経路に対する一部の親和性を失っているため、 ^{14}C -Pheで見られた肝臓への比較的高い集積、貯留や血液への放射能の再分布は、 ^{125}I -PIPAには認められず (Fig. 2-4)、結果的には、ヨウ素修飾によって標的組織における相対的選択性を維持しつつ (Table 2-3)、体内挙動解析を容易にすることが可能になったと考えられた。

^{125}I -PIPAの膵臓集積性に関しては、動物種差が報告されている [26] が、このような種差については、ヨウ素修飾アミノ酸のみならず天然アミノ酸においても同様に見い出されている [2]。即ち、動物種差の主たる原因がヨウ素修飾によるものではないと考えられる。

以上の結果より、ヨウ素修飾アミノ酸であるPIPAの膵臓への集積は、膵臓のアミノ酸能動輸送機能のみを反映し、しかも、周辺組織に比較して、高い膵臓集積比を示すことが認められた。従って、PIPAに代表されるヨウ素修飾アミノ酸は、膵臓におけるアミノ酸代謝、特にタンパク合成機構へ原料物質を供給する上で非常に重要なアミノ酸能動輸送機能を、体外より選択的に測定できる放射性医薬品として高い可能性を持つと考えられる。

引用文献

- 1) Vaalburg W, Beerling-van der Molen HD, Woldring MG: Evaluation of carbon-11 labelled phenylglycine and phenylalanine for pancreas scintigraphy. Nucl-Med **14**: 60-66, 1975
- 2) Washburn LC, Wieland BW, Sun TT, Hayes RL, Butler TA: [^{11}C]DL-Valine, a potential pancreas-imaging agent. J Nucl Med **19**: 77-83, 1978
- 3) Hubner KF, Andrews GA, Buonocore E, Hayes RL, Washburn LC, Collmann IR, Gibbs WD: Carbon-11-labeled amino acids for the rectilinear and positron tomographic imaging of the human pancreas. J Nucl Med **20**: 507-513, 1979
- 4) Syrota A, Comar D, Cerf M, Plummer D, Maziere M, Kellershohn C: [^{11}C]Methionine pancreatic scanning with positron emission computed tomography. J Nucl Med **20**: 778-781, 1979
- 5) Kubota K, Fukuda H, Yamada K, Endo S, Ito M, Abe Y, Yamaguchi T, Fujiwara T, Sato T, Yamaura H, Matsuzawa T, Ishiwata K, Iwata R, Ido T: Experimental pancreas imaging study with ^{13}N -glutamate using positron computer tomography. Eur J Nucl Med **8**: 528-530, 1983
- 6) Wagner HN Jr: SPECT and Pet advances herald new era in human biochemistry. J Nucl Med **27**: 1227-1238, 1986
- 7) Gallagher BM, Ansari A, Atkins H, Casella V, Christman DR, Fowler JS, Ido T, MacGregor RR, Som P, Wan CN, Wolf AP, Kuhl DE, Reivich M: Radiopharmaceuticals. XXVII. ^{18}F -Labeled 2-deoxy-2-fluoro-D-glucose as a radiopharmaceutical for measuring regional myocardial glucose metabolism in vivo: tissue distribution and imaging studies in animals. J Nucl Med **18**: 990-996, 1977
- 8) Gallagher BM, Fowler JS, Guttererson NI, MacGregor RR, Wan CN,

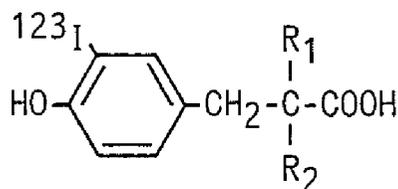
- Wolf AP: Metabolic trapping as a principle of radiopharmaceutical design: some factors responsible for the biodistribution of [^{18}F]-2-deoxy-2-fluoro-D-glucose. *J Nucl Med* **19**: 1154-1161, 1978
- 9) Phelps ME, Kuhl DE, Mazziotta JC: Metabolic mapping of the brain's response to visual stimulation: studies in humans. *Science* **211**: 1445-1448, 1981
- 10) Ullberg S, Blomquist L: Selective localization to pancreas of radioiodinated phenylalanine analogs. *Acta Pharm Suecica* **5**: 45-53, 1968
- 11) Counsell RE, Smith TD, Diguilio W, Beierwaltes WH: Tumor localizing agents VIII: radioiodinated phenylalanine analogs. *J Pharm Sci* **57**: 1958-1961, 1968
- 12) Blomquist L, Flodh H, Ullberg S: Uptake of ^{125}I -labelled 4-iodophenylalanine in tumours of mice. *Br J Cancer* **23**: 150-153, 1968
- 13) Varma VM, Beierwaltes WH, Lieberman LM, Counsell RE: Pancreatic concentration of ^{125}I -labeled phenylalanine in mice. *J Nucl Med* **10**: 219-223, 1969
- 14) Lambrecht RM, Atkins H, Elias H, Fowler JS, Lin SS, Wolf AP: A novel ^{123}I -labeling reagent. XIII. Synthesis and loading-dose effects of ^{123}I -4-iodophenylalanine and ^{123}I -5- and 6-iodotryptophan. *J Nucl Med* **15**: 863-867, 1974
- 15) Scharff R, Wool IG: Concentration of amino-acids in rat muscle and plasma. *Nature* **202**: 603-604, 1964
- 16) Blasberg R, Lajtha A: Substrate specificity of steady-state amino acid transport in mouse brain slices. *Arch Biochem Biophys* **112**: 361-377, 1965
- 17) Christensen HN, Jones JC: Amino acid transport models: renal resorption and resistance to metabolic attack. *J Biol Chem*

- 237: 1203-1206, 1962
- 18) Oxender DL, Christensen HN: Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. J Biol Chem **238**: 3686-3699, 1963
 - 19) Wiseman G: Absorption of amino acids using an in vitro technique. J Physiol **120**: 63-72 1953
 - 20) Christensen HN: Amino acid transport and nutrition. Fed Proc **22**: 1110-1114 1963
 - 21) Friedberg F, Tarver H, Greenberg DM: The distribution pattern of sulfur-labeled methionine in the protein and the free amino acid fraction of tissues after intravenous administration. J Biol Chem **173**: 355-361, 1948
 - 22) Hansson E: The formation of pancreatic juice proteins studied with labelled amino acids. Acta Physiol Scand **46**: Suppl 161, 1-99, 1959
 - 23) Busch H, Davis JR, Honig GR, Anderson DC, Nair PV, Nyhan WL: The uptake of a variety of amino acids into nuclear proteins of tumors and other tissues. Cancer Res **19**: 1030-1039, 1959
 - 24) Blau M, Manske RF: The pancreas specificity of Se^{75} -selenomethionine. J Nucl Med **2**: 102-105, 1961
 - 25) Begin N, Scholefield PG: The uptake of amino acids by mouse pancreas in vitro I. General characteristics. Biochim Biophys Acta **90**: 82-89, 1964
 - 26) Blomquist L: Species differences in the accumulation of 4-iodophenylalanine in the exocrine pancreas. Comp Biochem Physiol **28**: 777-782, 1969

第3章 In vivo機能診断薬としての放射性ヨウ素標識アミノ酸の開発に関する検討

第1節 ^{123}I -3-iodo-D-tyrosine: 膵臓のアミノ酸輸送機能診断薬

第2章の検討より、放射性ヨウ素標識アミノ酸が、膵臓のアミノ酸膜輸送機能を選択的に測定できる放射性医薬品としての可能性を有することが示された。しかし、第2章で用いたPIPAは、標識操作が煩雑で反応に時間を要する同位体交換反応を用いているために、高い比放射能を得ることが困難である等の点から、 ^{123}I を用いる臨床応用が期待できない。そこで、最も簡便な放射性ヨウ素標識法であるchloramine-T法によって無担体標識体が得られ[1]、かつ、精製も容易である[2]放射性ヨウ素標識アミノ酸として、3-iodotyrosine(MIT)に注目した。一方、MITの臨床利用には、更に、アミノ酸としての性質を保持しつつ、代謝安定性、特に、酵素的脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を与えるためのドラッグデザ



$\text{R}_1 = \text{NH}_2, \text{R}_2 = \text{H} : ^{123}\text{I}$ -3-iodo-D-tyrosine (^{123}I -D-MIT)

$\text{R}_1 = \text{H}, \text{R}_2 = \text{NH}_2 : ^{123}\text{I}$ -3-iodo-L-tyrosine (^{123}I -L-MIT)

Fig. 3-1 Structure of ^{123}I -3-iodotyrosine. $\text{R}_1=\text{NH}_2, \text{R}_2=\text{H} : ^{123}\text{I}$ -3-iodo-D-tyrosine (^{123}I -D-MIT), $\text{R}_1=\text{H}, \text{R}_2=\text{NH}_2 : ^{123}\text{I}$ -3-iodo-L-tyrosine (^{123}I -L-MIT).

インが必須である。そこで、脱ヨウ素化酵素がL-体に立体特異性を有することが示唆されている[3]ことに加えて、D-アミノ酸がL-体と同様の膵臓集積性を示す[4-8]ことから、 ^{123}I -3-iodo-D-tyrosine (^{123}I -D-MIT; Fig. 3-1)に着目した。この ^{123}I -D-MITは、D-tyrosineを標識原料として用いることにより、原料の光学活性を保持したまま容易に得られる合成上の利点も有している。

本節では、 ^{123}I -D-MITの膵臓集積性、ヨウ素修飾体としての代謝選択性及び代謝安定性について、母体天然アミノ酸である[U- ^{14}C]-L-tyrosine (^{14}C -L-Tyr)、光学異性体の ^{125}I -3-iodo-L-tyrosine (^{125}I -L-MIT; Fig. 3-1)と比較することにより、 ^{123}I -D-MITの膵臓におけるアミノ酸膜輸送機能診断薬としての有用性に関する検討を行なった。

1. 実験方法

^{125}I -D-MIT、 ^{125}I -L-MIT及び ^{123}I -D-MITの調製

^{125}I -NaIは、Amersham社より購入し、 ^{123}I -NaIは、日本メジフィジックス社より提供を受けた。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。 ^{125}I -D-MIT、 ^{125}I -L-MIT及び ^{123}I -D-MITは、D-及びL-tyrosineを原料としてchloramine-T法によりそれぞれ作製した。即ち、chloramine-T 2.0×10^{-8} mole (Aldrich社)を溶解した0.05Mリン酸緩衝溶液 (pH6.2) 10 μl を、標識原料のアミノ酸 1.0×10^{-8} moleと無担体 ^{125}I -NaI (7.4~37MBq)を含む35 μl の0.4Mリン酸緩衝溶液 (pH6.2)に加えた。 ^{123}I 標識では、標識原料 1.0×10^{-8} moleとchloramine-T 2.0×10^{-8} moleを含む0.4Mリン酸緩衝溶液45 μl を、予めpH9に調整した500 μl の無担体 ^{123}I -NaI溶液 (74~111MBq)に加えた。反応液を2分間放置し、飽和ピロ亜硫酸ナトリウム水溶液の10倍希釈液を加え、反応を止めた。放射性ヨウ素標識MITの精製は、Sephadex LH-20 (Pharmacia社)カラムクロマトグラフィー (10 \times 200mm、溶出液：酢酸エチル：メタノール：2N アンモニア水=40:10:4)により行なった[2]。溶出した標識アミノ酸画分を集め、減圧下、溶媒を完全に

留去した後、生理食塩水に溶解し、以下の実験に用いた。放射化学的純度は、第2章に既述した方法に従い、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを用いて検討した。

$^{14}\text{C-L-Tyr}$ (18.5kBq/mole) は、New England Nuclear社より購入した。

ラット組織切片集積実験

ラット組織切片集積実験は、第1章第1節に既述した方法に従って行なった。サンプル中の放射性アミノ酸の最終濃度は、 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 及び $^{125}\text{I-L-MIT}$: $2.7 \times 10^{-11}\text{ M}$ (1.85kBq/ml)、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$: $1.0 \times 10^{-7}\text{ M}$ (1.85kBq/ml)とした。

Ouabainによる膜能動輸送機構阻害実験では、組織切片を $5.0 \times 10^{-5}\text{ M}$ のouabainを含む溶媒中で、37°Cで30分間、予め振盪した後、標識アミノ酸を加えて、120分間、振盪した。

放射能の測定は、第2章に既述した方法で行なった。

マウス組織ホモジネートを用いた脱ヨウ素化反応の検討

体重約25gのddY系雄性マウスを屠殺解剖した後、即座に脾臓、肝臓及び腎臓を摘出し、一定量の組織に氷冷したKrebs-Ringerリン酸緩衝溶液(pH 7.4)を加えてホモジナイズした。氷冷した各ホモジネート100 μl に $^{125}\text{I-D-MIT}$ あるいは $^{125}\text{I-L-MIT}$ を20 μl ($1.1 \times 10^{-13}\text{ mole}$ 、7.4kBq)加えて、37°Cあるいは4°Cにて振盪し、一定時間後、トリクロロ酢酸を最終濃度が5%になるように加えた。遠心分離した後、その上清を第2章に既述した溶媒系による薄層クロマトグラフィーにて分析した。また、対照として、予め加熱処理あるいは5%トリクロロ酢酸処理したホモジネートを用いて、同様の検討を行なった。

マウス体内分布実験と代謝物の分析

各標識アミノ酸の生理食塩溶液0.1ml ($^{125}\text{I-D-MIT}$ 及び $^{125}\text{I-L-MIT}$: $1.6 \times 10^{-13}\text{ mole}$ 、11.1kBq、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$: $4.0 \times 10^{-10}\text{ mole}$ 、7.4kBq)を体重約25gのddY系雄性マウスに尾静脈より投与し、一定時間後にエーテル麻酔

にて屠殺した。ヘパリン処理注射器を用いて心臓穿刺により採血した後、脾臓、肝臓、腎臓、胃を摘出した。 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ 投与マウスの血液は遠心分離して血漿を0.1ml採取し、第2章に既述した方法により放射能を測定した。また、第1章第2節に既述した方法に従い、タンパクに組み込まれた放射能を測定すると共に、その上清を第2章に既述した溶媒系による薄層クロマトグラフィーにて分析した。

犬の腹部イメージングと動力学的解析

$^{123}\text{I-D-MIT}$ (40MBq)の生理食塩溶液をペントバルビタール麻酔処理した雄性雑種犬(体重15kg)の大腿静脈より投与した。高解像型平行コリメータを装着したシンチカメラ(島津製作所 LFOV)を用い、投与直後より30秒ごとに15分間、平面分布データを収集し、脾臓、肝臓、腎臓、小腸及び心血液プールにおける放射能の単位領域(pixel)当たりの経時的集積曲線を求めた。心血液プールにおける血液クリアランス曲線を(1)式にあてはめ、simplex法により $P_1 \sim P_4$ を求めた。その結果を用い、脾臓の集積曲線を2-コンパートメントモデルにあてはめた。血液からの各組織への供給と平衡に達するまでの時間的ずれを考慮して、(2)式に遅延因子を導入した。

$$C_b = P_1 \times \text{Exp}(-P_2 t) + P_3 \times \text{Exp}(-P_4 t) \text{ ----- (1)}$$

$$dC_f/d(t-D) = k_1 C_b - k_2 C_f \text{ ----- (2)}$$

C_b, C_f : 血液、脾臓に存在する放射能濃度 (count/min/pixel)

t : 投与後の経過時間 (分)

D : 遅延因子 (分)

2. 結果

$^{125}\text{I-MIT}$ 、 $^{123}\text{I-D-MIT}$ の調製

精製後、放射化学的純度95%以上の無担体 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 及び $^{123}\text{I-D-MIT}$ が得られた。

ラット組織切片への集積と ouabain の影響

ラット組織切片1g当たりの集積率をFig.3-2に示す。検討した時間内では、 ^{125}I -D-MIT、 ^{125}I -L-MITは、それぞれ肝臓に比べ膵臓に約2倍集積した。また、これらの膵臓切片への集積は、 ^{14}C -L-Tyrの集積より多少低かった。

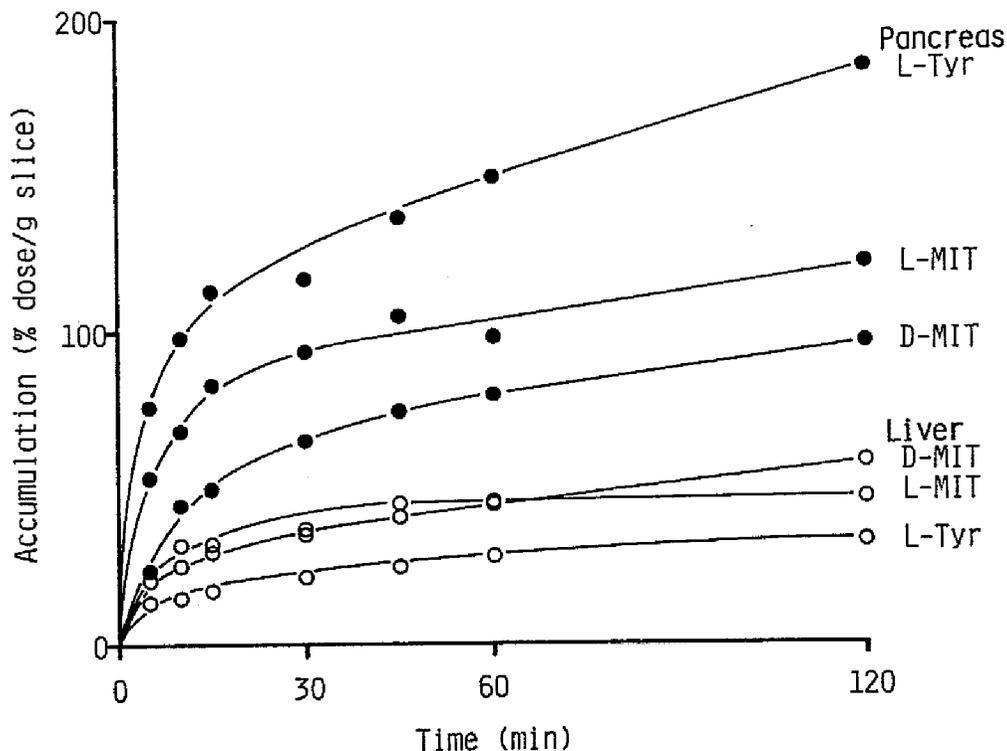


Fig. 3-2 Accumulation of ^{125}I -D-MIT, ^{125}I -L-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in rat tissue slices at 37°C. Each point represents the mean of five experiments. Solid symbols show accumulation in pancreatic slices and open symbols show accumulation in liver slices.

Fig. 3-3には、 ^{125}I -D-MIT、 ^{125}I -L-MIT及び ^{14}C -L-Tyrの膵臓、肝臓切片への集積に対するouabainの阻害度を対照群に対する割合で表した。Ouabainは、膵臓切片において、 ^{125}I -D-MIT: 20.5%、 ^{125}I -L-MIT: 24.7%、 ^{14}C -L-Tyr: 35.2%とそれぞれの集積を低下させた。一方、肝臓切片においては、 ^{125}I -D-MIT: 2.7%、 ^{125}I -L-MIT: 1.4%、 ^{14}C -L-Tyr: 1.0%といずれもほとんど阻害が認められなかった。

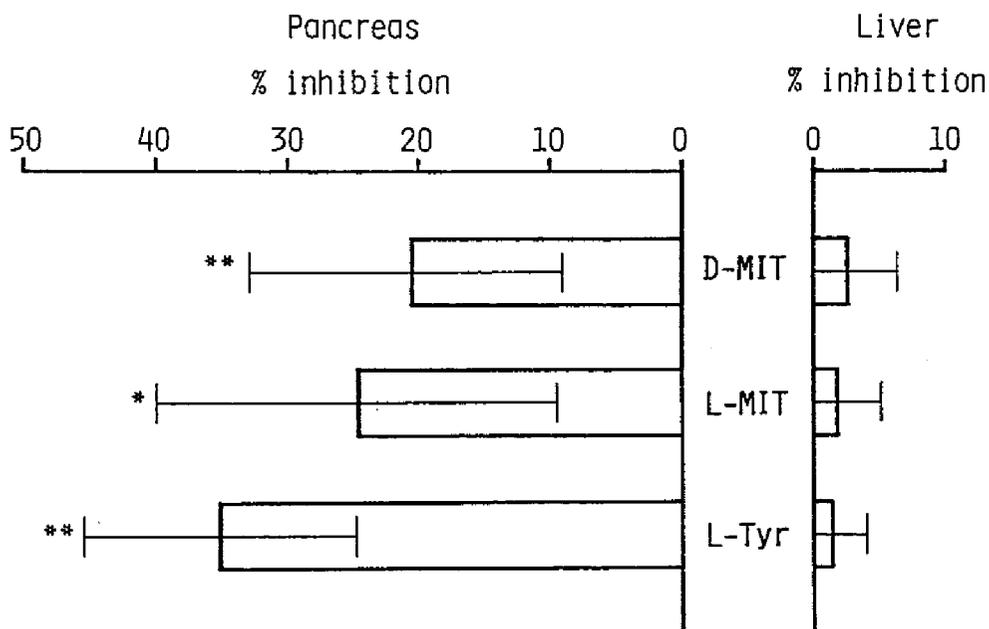


Fig. 3-3 Effects of ouabain on the accumulation of ^{125}I -D-MIT, ^{125}I -L-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in rat tissue slices. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of four to five experiments. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.02$ compared to control.

マウス組織ホモジネートにおける脱ヨウ素化反応に対する安定性

Fig. 3-4には、 ^{125}I -D-MIT及び ^{125}I -L-MITのマウス組織ホモジネートにおける脱ヨウ素化率を経時的に示す。 ^{125}I -D-MITは、いずれの条件においても全く脱ヨウ素化を受けなかった。一方、 ^{125}I -L-MITは、37℃の振盪により速やかに脱ヨウ素化された。この脱ヨウ素化反応は、温度依存性であ

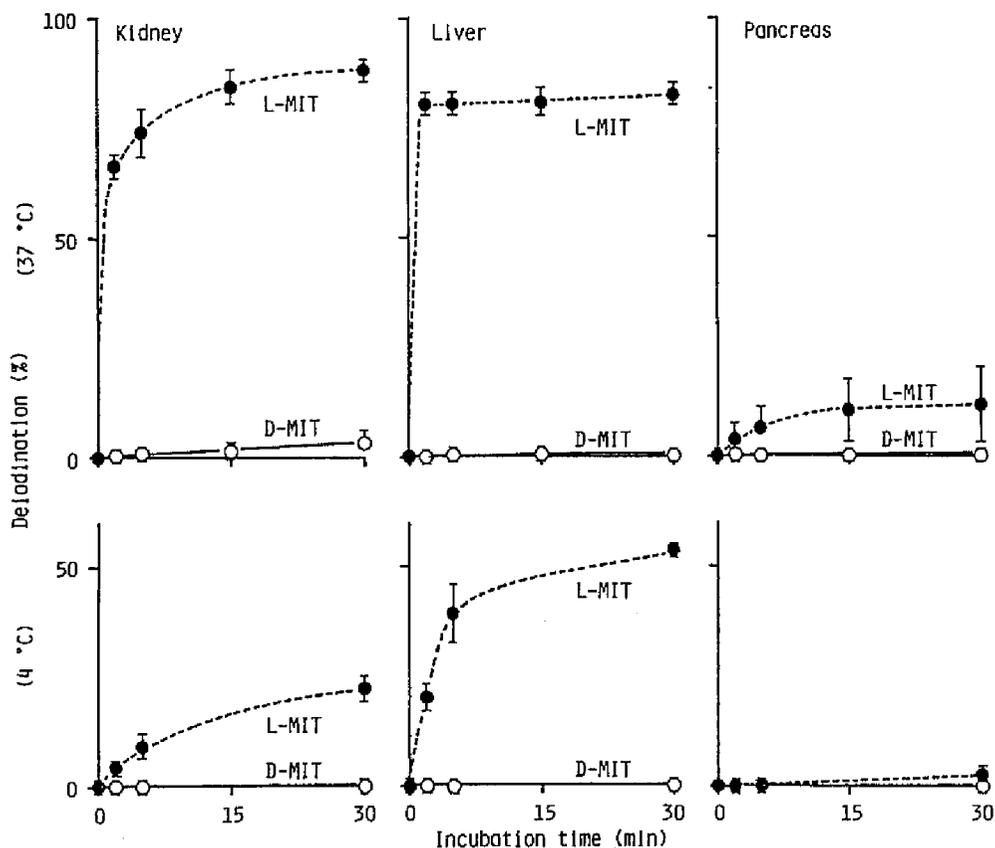


Fig. 3-4 Deiodination of ^{125}I -D-MIT and ^{125}I -L-MIT in mouse tissue homogenates. Each point represents the mean \pm 1 S.D. of three experiments. Open symbols show ^{125}I -D-MIT and solid symbols show ^{125}I -L-MIT.

ることが見い出され、また、予め加熱処理あるいはトリクロロ酢酸処理したホモジネートでは、完全に阻害された。

マウス体内分布と膵臓内タンパクへの組み込み及び生体内における安定性

Fig. 3-5には、 ^{125}I -D-MIT、 ^{125}I -L-MIT及び ^{14}C -L-Tyrのマウス体内分布と膵臓のタンパク画分に見い出された放射能を経時的に示す。膵臓にお

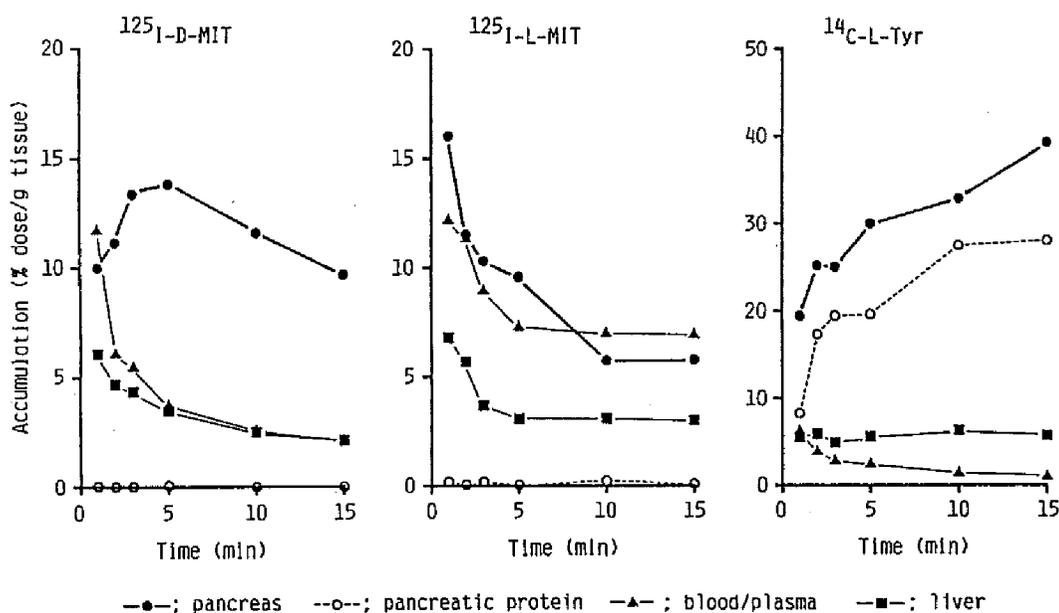


Fig. 3-5 Biodistribution of ^{125}I -D-MIT, ^{125}I -L-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in mice and protein incorporation by the mouse pancreas. Each point represents the mean of the data from three to five mice. (●) Accumulation in the pancreas; (■) accumulation in the liver; (▲) ^{125}I -MIT level in blood and ^{14}C -L-Tyr level in plasma; and (○) protein incorporation by the pancreas.

いては、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の集積は、投与後15分 ($39.2 \pm 10.6\%$ 投与量/g組織)まで増加し、集積量の70%以上が常にタンパク画分に見い出された。 $^{125}\text{I-D-MIT}$ では、投与後5分 ($13.8 \pm 0.8\%$ 投与量/g組織)にピークが現れた後、早いクリアランスが認められた。 $^{125}\text{I-L-MIT}$ も、膵臓に高く集積するものの、 $^{125}\text{I-D-MIT}$ より早いクリアランスが観察された。 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 及び $^{125}\text{I-L-MIT}$ 共に、タンパク画分にはほとんど見い出されなかった。

Table 3-1には、マウス体内分布における膵臓への集積の他組織への集積に対する割合を示す。 $^{125}\text{I-D-MIT}$ の膵臓対肝臓比は、投与後10分において、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の 5.35 ± 1.00 に匹敵する 4.53 ± 0.83 という値に達し、膵臓対血液比も 4.87 ± 1.09 が得られた。また、脱ヨウ素化の結果生ずる遊離ヨウ素イオンが特異的に集積する胃との集積比は、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ のそれと比

Table 3-1 PANCREAS TO OTHER TISSUE RATIO OF $^{125}\text{I-D-MIT}$, $^{125}\text{I-L-MIT}$ AND $^{14}\text{C-L-TYR}$ ACCUMULATION IN MICE^{a)}

	$^{125}\text{I-D-MIT}$	$^{125}\text{I-L-MIT}$	$^{14}\text{C-L-Tyr}$
Pancreas / Liver	4.53 (0.83)	1.83 (0.13)	5.35 (1.00)
Pancreas / Blood	4.87 (1.09)	0.82 (0.07)	22.58 ^{b)} (7.87)
Pancreas / Kidney	1.32 (0.38)	0.80 (0.07)	5.58 (0.75)
Pancreas / Stomach	3.34 (0.18)	0.28 (0.09)	----

a) mean (1 S.D.) of the data from three mice, 10 min. after intravenous injection.

b) Pancreas / Plasma.

較して非常に高かった。現在、臨床使用されている ^{75}Se -seleno-L-methionineの膵臓対肝臓比は、 2.12 ± 0.18 であり[10]、 ^{125}I -D-MITは、 ^{75}Se -seleno-L-methionineの2倍の膵臓選択性を示した。

Table 3-2には、 ^{125}I -D-MITと ^{125}I -L-MITのin vivoにおける安定性を示す。 ^{125}I -D-MITでは、膵臓へ集積した放射能の85%以上が未変化体として存在した。また、肝臓においても、集積した放射能の約50%が、未確認の代謝物に変化しているものの、遊離ヨウ素は約10%程度であった。一方、 ^{125}I -L-MITは、膵臓、肝臓及び腎臓において容易に脱ヨウ素化され、放射能の65%以上が遊離ヨウ素として見い出された。また、尿中では ^{125}I -D-MITで62%、 ^{125}I -L-MITでは94%が遊離ヨウ素として検出された。

Table 3-2 IN VIVO STABILITY OF ^{125}I -D-MIT AND ^{125}I -L-MIT IN MICE^{a)}

	^{125}I -D-MIT		^{125}I -L-MIT	
	MIT	Free I ⁻	MIT	Free I ⁻
Pancreas	85.13 (6.94)	4.51 (2.46)	13.34 (3.46)	76.37 (5.32)
Liver	35.56 (8.58)	10.52 (5.74)	13.87 (2.90)	66.25 (5.39)
Kidney	76.00 (11.22)	6.52 (2.81)	14.07 (4.55)	75.07 (6.13)
Urine	35.67 (7.56)	62.22 (8.27)	4.79 (1.52)	94.21 (1.19)

a) mean (1 S.D.) of the data from three mice, 10 min. after intravenous injection.

犬の腹部イメージングと動力的解析

Fig. 3-6に示すように、 ^{123}I -D-MIT投与後早期(1.5~2.0分)には、肝臓と右の腎臓の間に脾臓が描出されたが、その像は、速やかに消失した(4.5~5.0分)。Fig. 3-8は、Fig. 3-7に示す関心領域の単位領域当たりの放射能の経時的变化を示したものである。脾臓領域は、腎臓、肝臓、小腸等の領域とは明らかに異なる経時的变化を示した。

Fig. 3-9には、simplex法による動力的解析の結果を示す。(1)式より、血液クリアランスの媒介変数である P_1 、 P_2 、 P_3 、 P_4 はそれぞれ369.7count/min/pixel、 0.8141min^{-1} 、346.5count/min/pixel、 0.03433min^{-1} となった。これらの定数を(2)式に代入し、脾臓領域における集積曲線を解析した結果、 k_1 、 k_2 、 D はそれぞれ 1.575min^{-1} 、 1.410min^{-1} 、1.125minに収束し、得られた曲線は、元の曲線に良く合致した。同様の解析を肝臓領域の集積曲線において行なった結果、 k_1 、 k_2 、 D はそれぞれ 0.2517min^{-1} 、 0.2230min^{-1} 、0.6504minとなった。

3. 考察

D-MITは、ヨウ素の導入と光学異性化の二つの修飾が加えられている修飾アミノ酸である。修飾アミノ酸は、“代謝されない”アミノ酸として膜輸送機構のみに親和性を有すると考えられ、アミノ酸膜輸送機能測定剤として用い得る数種の修飾アミノ酸が知られている[11,12]。核医学においても、 $[1-^{11}\text{C}]\text{-1-aminocyclopentanecarboxylic acid}$ [13,14]、 $[1-^{11}\text{C}]\text{-}\alpha\text{-aminoisobutyric acid}$ [15]等の修飾アミノ酸放射性医薬品が開発され、*in vivo*アミノ酸輸送機能測定が試みられている[16]。しかしながら、これらの化合物は、サイクロトロン産生の超短半減期放射性核種標識のために、汎用性の面で制限がある。

放射性ヨウ素標識D-MITは、*in vitro*、*in vivo*の両検討において脾臓組織への高い集積選択性を示した(Fig. 3-2, 3-5, Table 3-1)。更に、その高い脾臓集積性に、エネルギー依存性の能動輸送機構の寄与が大きいこ

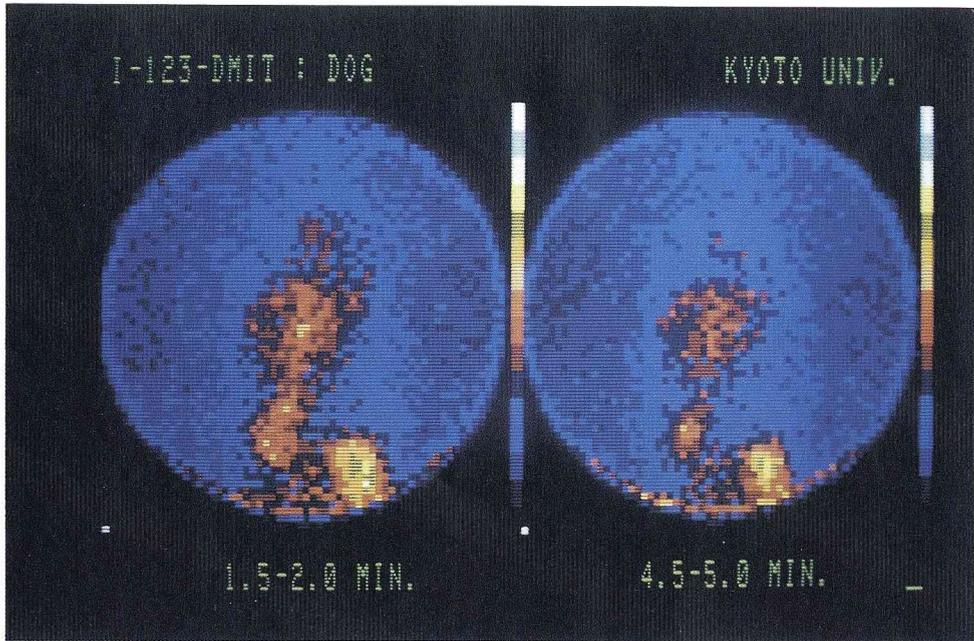


Fig. 3-6 Anterior abdominal scintigrams of a dog injected with ^{123}I -D-MIT. Scintigraphic images were obtained 1.5-2.0 min. and 4.5-5.0 min. after intravenous injection.

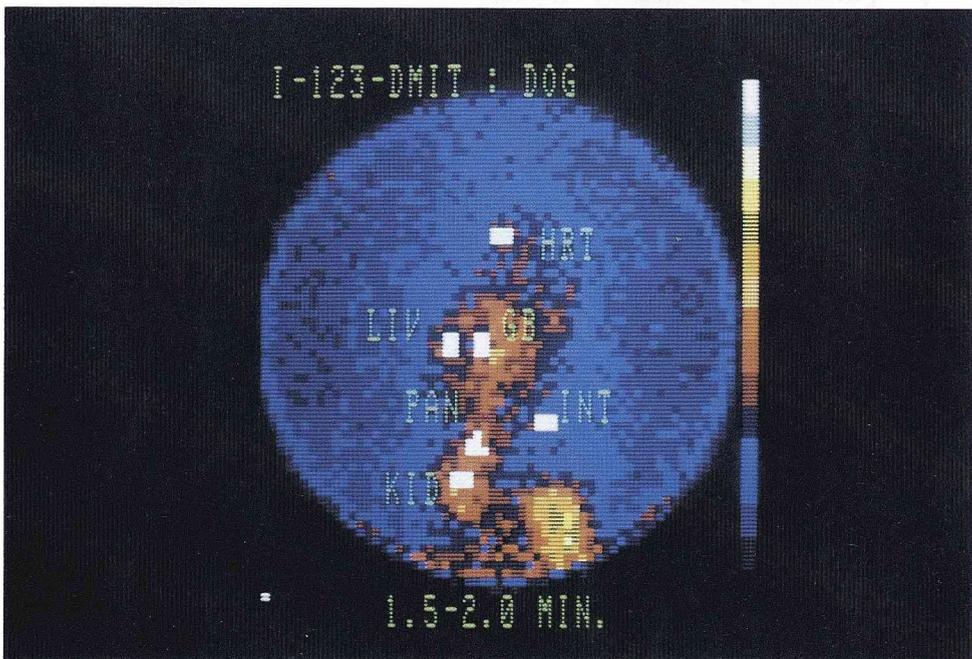


Fig. 3-7 The regions of interest for each organ in the scintigraphic image. PAN, pancreas; LIV, liver; KID, kidney; HRT, heart; INT, intestines; and GB, gallbladder.

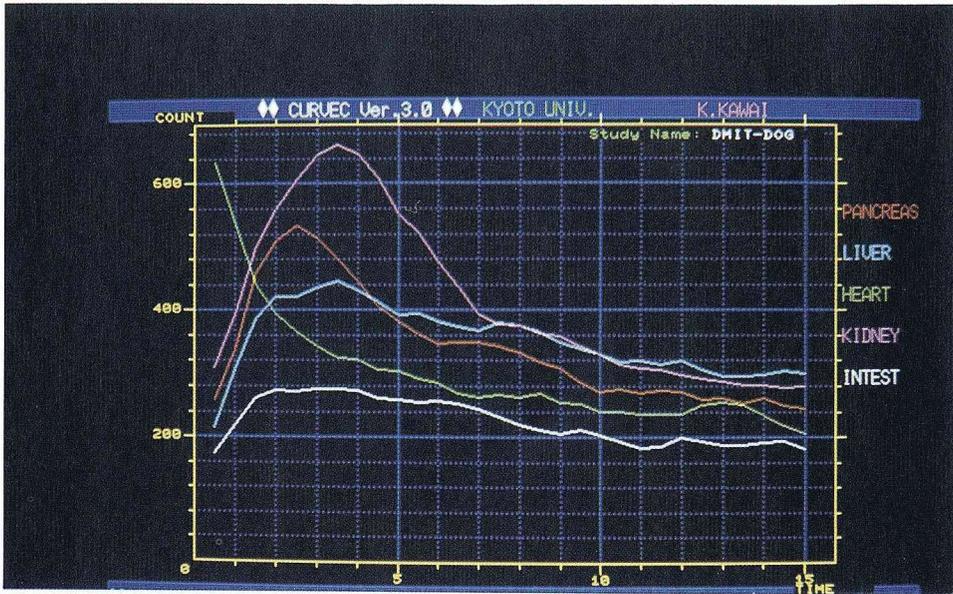


Fig. 3-8 The time-radioactivity curves of the regions of interest for each organ in the image shown in Fig. 3-7. Red, pancreas; blue, liver; purple, kidney; green, heart; and white, intestines.

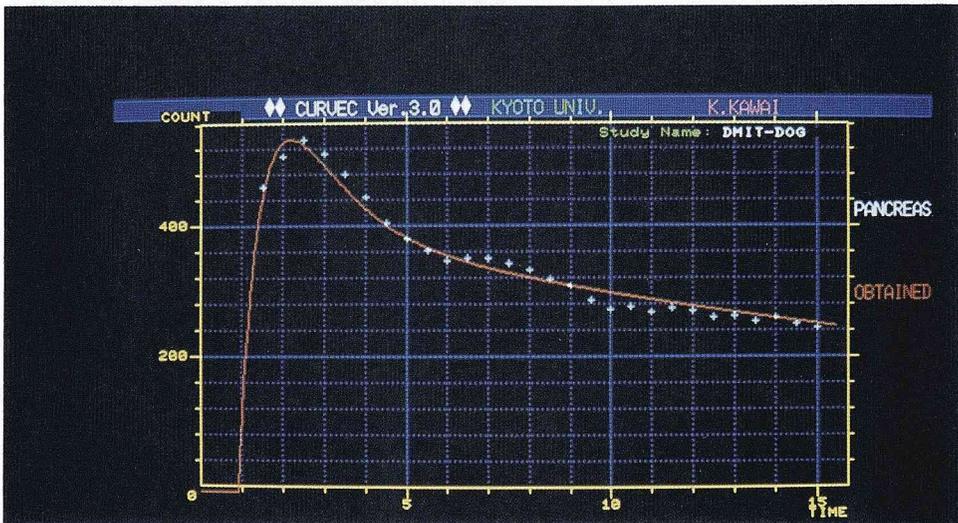


Fig. 3-9 Accumulation of ^{123}I -D-MIT in the dog pancreas and the result of kinetic analysis by the simplex method. The scintigraphic experimental data (+) are compared with the theoretical curve (line).

とが認められた (Fig. 3-3)。これらの性質は、母体化合物である ^{14}C -L-Tyr と類似していた。L-tyrosine は、中性アミノ酸能動輸送機構、特に leucine 系輸送機構により膜輸送されると言われている [17, 18] が、D-MIT も同様の機構によって、膜輸送されていると思われた。

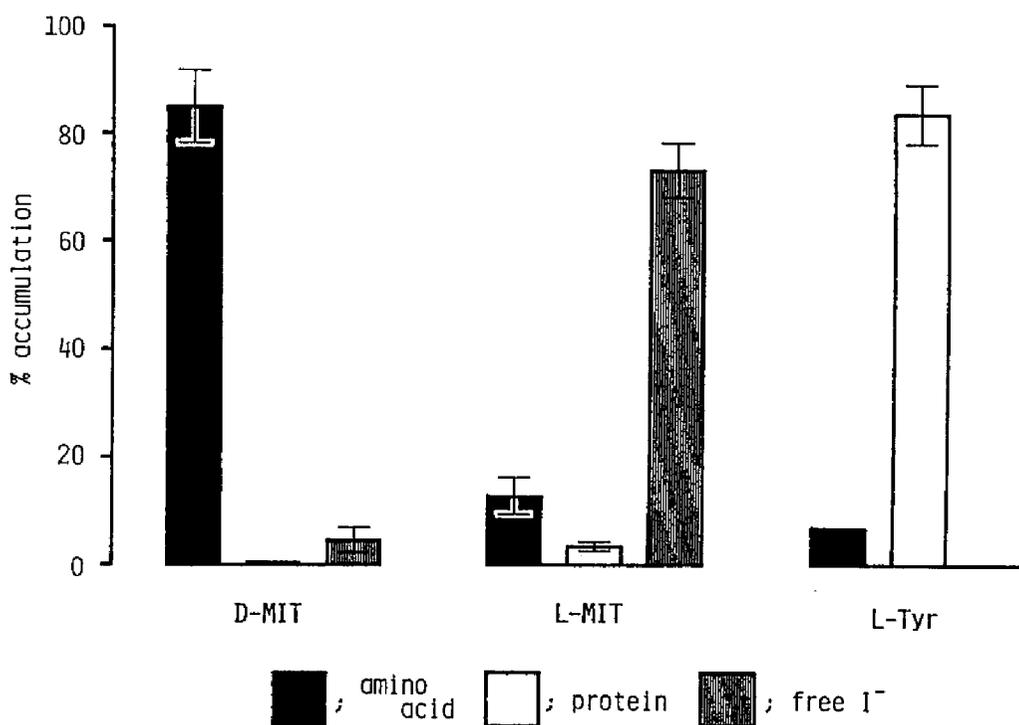


Fig. 3-10 Fate of ^{125}I -D-MIT, ^{125}I -L-MIT and ^{14}C -L-Tyr in the mouse pancreas at 10 min. after intravenous injection. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of the data from three to four mice. The result for the amino acid fraction of ^{14}C -L-Tyr is from a single mouse. Solid bars, amino acid fraction; open bars, protein fraction; and striped bars, free I^- fraction.

一方、MITの細胞内代謝に対する親和性に関する知見を得るために、特に、タンパク合成と脱ヨウ素化反応について検討した。第1章で示したように、タンパク合成機構は、天然アミノ酸の重要な滞留機構である。ヨウ素修飾アミノ酸である¹²⁵I-D-MIT、¹²⁵I-L-MITは、共にタンパクには組み込まれず、速やかに脾臓から消失した(Fig. 3-5)。これは、¹⁴C-L-Tyrとは対照的な挙動であった。即ち、第2章のPIPAの場合と同様に、tyrosine分子へのヨウ素の導入は、結果的にタンパク合成機構への親和性を失わせたと考えられた。脱ヨウ素化は、体内被曝の増大等の理由から、放射性ヨウ素標識放射性医薬品における最も好ましくない性質である。L-MITは、甲状腺ホルモンの代謝物として生体内に天然に存在し、脱ヨウ素化酵素に対する高い親和性を有している[3, 9, 19, 20]。しかし、その光学異性体である¹²⁵I-D-MITは、¹²⁵I-L-MITが容易に脱ヨウ素化を受ける条件下において、脱ヨウ素化反応に対する高い安定性を示し、酵素的脱ヨウ素化に対する抵抗性を示唆した(Fig. 3-4)。これらのことは、*in vivo*においても同様に示された(Fig. 3-10)。肝臓、腎臓においては、¹²⁵I-D-MITは他の代謝機構に対する親和性を多少有しており、最終的には脱ヨウ素化され、血液より速やかに排泄された(Table 3-2)。このようなD-MITの代謝は、残存放射能を血液から速やかに消失させることにより、*in vitro*組織切片集積実験で観察されたヨウ素修飾あるいは光学異性化による脾臓選択性の若干の低下を補い、その結果、D-MITは、相対的に高い脾臓選択性を示した(Table 3-1)。更に、標的組織におけるD-MITの高い代謝安定性は、L-tyrosineのような天然アミノ酸の複雑な代謝挙動とは異なる単純な分布挙動をもたらし、体内挙動解析を容易にする上で重要な要素であると思われた。

以上の基礎検討の成果をふまえ、¹²³I-D-MIT投与の犬における腹部シンチグラフィー実験を行なったところ、十分な脾臓選択性が観察された(Fig. 3-6)。その動力学的解析の結果より、¹²³I-D-MITが脾臓におけるアミノ酸膜輸送機能を選択的に測定し得る¹²³I標識アミノ酸放射性医薬品として、評価し得ることが示された(Fig. 3-9)。このようなシングルフォトン放出核種標識放射性医薬品を用いた脾臓の機能診断法は、他に例がな

い。脾臓を肝臓、腎臓からより鮮明に区別するためには、SPECTの使用が必須であると思われるが、 ^{123}I の物理的性質はSPECTに適しており、第3章第2節に示すように、現在、リング型SPECTの開発によって、定量性の高い経時的なデータ収集も可能になっている。このような新しい画像装置との組合せによって、 ^{123}I -D-MITの臨床応用が期待されるところである。

引用文献

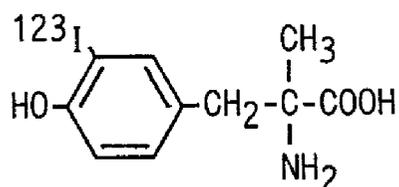
- 1) Kloss G, Leven M: Accumulation of radioiodinated tyrosine derivatives in the adrenal medulla and in melanomas. *Eur J Nucl Med* **4**: 179-186, 1979
- 2) Williams AD, Freeman DE, Florsheim WH: Sephadex LH-20 column separation of thyroidal iodoamino acids. *J Chromatog* **45**: 371-380, 1969
- 3) Stanbury JB, Kassenaar AAH, Meijer JWA: The metabolism of iodotyrosines. I. The fate of mono- and di-iodotyrosine in normal subjects and in patients with various diseases. *J Clin Endocrinol Metab* **16**: 735-746, 1956
- 4) Shindo H, Miyakoshi N, Takahashi I: Studies on the metabolism of D- and L-isomers of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA). I. Autoradiographic study on the distribution of ^{14}C -labeled D- and L-DOPA and dopamine after intravenous administration in rats. *Chem Pharm Bull* **19**: 2490-2500, 1971
- 5) Shindo H, Nakajima E, Kawai K, Miyakoshi N, Tanaka K: Studies on the metabolism of D- and L-isomers of 3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA). III. Absorption, distribution and excretion of D- and L-DOPA- ^{14}C in rats following intravenous and oral administration. *Chem Pharm Bull* **21**: 817-825, 1973
- 6) Goto R, Tezuka M, Tamemasa O: Incorporation pattern of L-, D-, and DL-amino acids into the pancreas of mice. *Chem Pharm Bull* **25**: 1574-1581, 1977
- 7) Casey DL, Digenis GA, Wesner DA, Washburn LC, Chaney JE, Hayes RL, Callahan AP: Preparation and preliminary tissue studies of optically active ^{11}C -D- and L-phenylalanine. *Int J Appl Radiat Isot* **32**: 325-330, 1981
- 8) Tamemasa O, Goto R, Takeda A, Maruo K: High uptake of ^{14}C -

- labeled D-amino acids by various tumors. Jpn J Cancer Res **73**: 147-152, 1982
- 9) Stanbury JB: The requirement of monoiodotyrosine deiodinase for triphosphopyridinenucleotide. J Biol Chem **228**: 801-811, 1957
 - 10) Fujibayashi Y, Saji H, Yomoda I, Horiuchi SK, Torizuka K, Yokoyama A: A new approach toward a pancreas-seeking zinc radiopharmaceutical II. ^{62}Zn -EDDA (ethylene-diamine-N,N'-diacetic acid) for pancreas PCT imaging. Eur J Nucl Med **11**: 488-493, 1986
 - 11) Christensen HN: Intestinal absorption with special reference to amino acids. Fed Proc **21**: 37-42, 1962
 - 12) Christensen HN, Jones JC: Amino acid transport models: renal resorption and resistance to metabolic attack. J Biol Chem **237**: 1203-1206, 1962
 - 13) Hayes RL, Washburn LC, Wieland BW, Sun TT, Turtle RR, Butler TA: Carboxyl-labeled ^{11}C -l-aminocyclopentanecarboxylic acid, a potential agent for cancer detection. J Nucl Med **17**: 748-751, 1976
 - 14) Washburn LC, Sun TT, Anon JB, Hayes RL: Effect of structure on tumor specificity of alicyclic α -amino acids. Cancer Res **38**: 2271-2273, 1978
 - 15) Dunzendorfer U, Schmall B, Bigler RE, Zanzonico PB, Conti PS, Dahl JR, Kleinert E, Whitmore WF: Synthesis and body distribution of alpha-aminoisobutyric acid-L- ^{11}C in normal and prostate cancer-bearing rat after chemotherapy. Eur J Nucl Med **6**: 535-538, 1981
 - 16) Bigler RE, Zanzonico PB, Schmall B, Conti PS, Dahl JR, Rothman L, Sgouros G, MacEwen EG: Evaluation of [1- ^{11}C]- α -aminoisobutyric acid for tumor detection and amino acid transport

- measurement: spontaneous canine tumor studies. Eur J Nucl Med **10**: 48-55, 1985
- 17) Oxender DL, Christensen HN: Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. J Biol Chem **238**: 3686-3699, 1963
- 18) Blasberg R, Lajtha A: Substrate specificity of steady-state amino acid transport in mouse brain slices. Arch Biochem Biophys **112**: 361-377, 1965
- 19) Roche J, Michel R, Michel O, Lissitzky S: Sur la deshalogenation enzymatique des iodotyrosines par le corps thyroide et sur son role physiologique. Biochim Biophys Acta **9**: 161-169, 1952
- 20) Tata JR: An unusual property of thyroxine and other iodophenols. Biochem J **72**: 214-222, 1959

第2節 ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine: 脳、脾臓におけるアミノ酸膜輸送機能診断薬

近年、種々の精神疾患における脳のアミノ酸輸送、特に、tyrosine輸送機能の変化に関して報告されている [1]。そこで、脳のアミノ酸輸送機構に親和性を有する ^{123}I 標識修飾アミノ酸の開発を計画した。第2章、第3章第1節で、放射性ヨウ素標識アミノ酸が、膜能動輸送機構に対する高い親和性を保持していること、及び、代謝機構に対する選択性を向上させることから、放射性ヨウ素の導入によるアミノ酸の修飾が有用であることを明らかにした。脳のアミノ酸輸送機能の測定を目的とした放射性ヨウ素標識アミノ酸は、第3章第1節でも述べたヨウ素化の容易性、代謝、特に、酵素的脱ヨウ素化反応に対する安定性に加え、血液脳関門や脳細胞膜が、アミノ酸のL-体に対して高い立体選択性を有しているため [2, 3]、L-体構造の保持を必要とする。そこで、これらの条件を満たすアミノ酸として、 ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{123}I -L-AMT: Fig. 3-11) を選択した。このL-AMTは、(1) 精神疾患との関わりが注目されているL-tyrosineの誘導体であり、(2) 簡便で無担体条件下での放射性ヨ



^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{123}I -L-AMT)

Fig. 3-11 Structure of ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine (^{123}I -L-AMT).

ウ素標識の可能なフェノール基を有し、(3) α 炭素の立体配置がL-体であるのに加え、(4)代謝安定性、特に、脱ヨウ素化反応に対する抵抗性の向上を期待させる α -メチル基を有する等の構造上の特徴を有しており、これらの特徴は、目的とする放射性ヨウ素標識アミノ酸の性質に合致するものと期待された。

放射性ヨウ素標識AMTは、既に、膵臓[4,5]、メラノーマ[6-9]、脳腫瘍[10]のイメージング剤として報告されているが、これらの報告では、 α -methyl-3,4-dihydroxyphenylalanine(α -methyl-DOPA)が、膵臓に高く集積する[4,5]こと、あるいは、副腎髄質ホルモンやメラニンの生合成前駆体の類似体として、メラノーマに集積する可能性が高い[6-9]ことに基づき、その誘導体であるI-AMTに関して、単にその集積性の観点から検討されているのみである。

本節では、L-AMTの脳集積性とその集積機序、及び、生体内における代謝安定性、特に、酵素的脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を ^{14}C -L-Tyr、3-iodotyrosine(^{125}I -L-MIT、 ^{125}I -D-MIT)と比較、検討すると共に、 ^{123}I -L-AMTを用いた犬の頭部断層撮影とその結果の動力学的解析を行なった。

更に、前述の(1)~(4)の条件は、第3章第1節で検討したD-MITとは異なった観点から、膵臓のアミノ酸膜輸送機能診断薬としての必要なドラッグデザインの条件を満たしていることから、L-AMTの膵臓集積性も併せて検討した。

1. 実験方法

^{125}I -L-AMT、 ^{123}I -L-AMTの調製

^{125}I -NaIは、Amersham社より購入し、 ^{123}I -NaIは、日本メジフィジック社より提供を受けた。その他の試薬は、試薬特級品を用いた。 ^{125}I -L-AMTは、 α -methyl-L-tyrosine(Aldrich社)を原料として、第3章第1節に既述した方法に従い、標識、精製した。 ^{123}I -L-AMTでは、標識原料を 1.0×10^{-6} mole含む1Nリン酸溶液25 μl とchloramine-Tを 2.0×10^{-6} mole含む

0.4Mリン酸緩衝溶液20 μ lを、予めpH9に調整した500 μ lの無担体 $^{123}\text{I-NaI}$ 溶液(74~111MBq)に加えた。標識効率及び放射化学的純度は、第2章に既述した方法に従い、シリカゲル薄層クロマトグラフィーを用いて検討した。

比較には、標識天然アミノ酸として、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ (18.5GBq/mmole)は、New England Nuclear社より購入したものを用いた。更に、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 及び $^{125}\text{I-D-MIT}$ は第3章第1節と同様の方法で調製し、 $^{123}\text{I-N-isopropyl-p-iodoamphetamine}$ ($^{123}\text{I-IMP}$)は、日本メジフィジックス社のものを用いた。

マウス体内分布実験と代謝物の分析

各標識アミノ酸の生理食塩溶液0.1ml($^{125}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 及び $^{125}\text{I-L-MIT}$: 1.6×10^{-13} mole、11.1kBq、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$: 4.0×10^{-10} mole、7.4kBq)を体重約25gのddY系雄性マウスに尾静脈より投与した。その他の操作は、第3章第1節に既述した方法に従って行なった。液体シンチレーションカウンターは、Aloka社製ARC-900を用いた。

分配係数の測定

油層にn-octanol、水層に0.1Mリン酸緩衝溶液を2.0mlずつ用い、 $^{123}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ 及び $^{123}\text{I-IMP}$ の分配係数を測定した。その際、水層を脳、脾臓等の細胞内pHが低い組織、及び、血液の指標として、それぞれpH7.0、pH7.4とした。予め、油層と水層を1分間ずつ2回、室温で激しく攪拌した。20 μ lの放射性試料を加え、更に、1分間ずつ2回、室温で激しく攪拌した後、遠心分離し、各層の放射能を測定した。

Brain Uptake Indexの測定

Brain Uptake Index(BUI)は、Oldendorfの方法[2.11]に従って測定した。各放射性試料3.7kBqと $^3\text{H-H}_2\text{O}$ (New England Nuclear社:9.25MBq/ml)3.7kBqを含む生理食塩水200 μ lをWistar系雄性ラット(体重250~300g)の右総頸動脈より投与し、15秒後に断頭した。脳の右半球

を摘出すると共に、その放射能を測定し、以下の式によりBUIを算出した。また、競合的阻害実験では、投与溶液に非放射性L-tyrosineあるいは非放射性L-AMTを 1×10^{-3} Mになるように添加した。この濃度は、正常ラットにおける内因性tyrosineの血漿中濃度 [12] の約14倍である。

$$\text{BUI} = \frac{\text{組織中 } ^{125}\text{I あるいは } ^{14}\text{C 濃度} / \text{組織中 } ^3\text{H 濃度}}{\text{溶液中 } ^{125}\text{I あるいは } ^{14}\text{C 濃度} / \text{溶液中 } ^3\text{H 濃度}} \times 100$$

ラット組織切片集積実験

ラット脳切片集積実験は、吉田らの方法 [13] に準じて行なった。体重約250 g のWistar系雄性ラットを断頭し、即座に脳を取り出した。脳組織は、氷冷したKrebs-Ringerリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) で洗浄した後、Stadie-Riggsスライサーにより、組織切片を作製し [14]、その 100 ± 5 mgを精秤し、溶媒にKrebs-Ringerリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を用いて、 37°C で30分間、振盪した。膜能動輸送機構阻害実験としては、 4°C における振盪、及び、ouabain存在下での検討を行なった。Ouabainによる膜能動輸送機構阻害実験は、放射性試料を加える前に、脳切片を 1.0×10^{-5} Mのouabainを含む溶媒中で、 37°C で20分間、予め振盪した。更に、tyrosineによる競合的阻害実験では、非放射性L-あるいはD-tyrosineを、最終濃度 1.0×10^{-4} Mになるように放射性試料と同時に投与し、その集積に与える影響を検討した。

ラット膵臓、肝臓切片集積実験は、第1章第1節に既述した方法に従って行なった。

なお、試料の溶媒は2.0 mlとし、放射性アミノ酸の最終濃度は、 ^{125}I -L-AMT、 ^{125}I -D-MIT及び ^{125}I -L-MIT: 2.7×10^{-11} M (1.85 kBq/ml)、 ^{14}C -L-Tyr: 1.0×10^{-7} M (1.85 kBq/ml) とした。

犬の頭部断層撮影実験と動力的解析

ベントバルビタール麻酔処理後、背位に固定した雄性ビーグル犬 (体重10 kg) の大腿静脈より、 ^{123}I -L-AMT 48 MBqを含む生理食塩水を投与した。リング型頭部用SPECT (島津製作所 SET-030W) を用いて、投与直後より

2.5分ごとに頭部正中断層データを収集した。

また、雄性雑種犬（体重15kg）の前肢静脈より、 $^{123}\text{I-L-AMT}$ (26MBq)を投与し、同様に頭部orbitomeatal (OM)横断断層撮影を行なうと共に、大腿動脈より、動脈血を採取し、その放射能を測定した。各データをコンピューターにより画像化し、同時に、脳における放射能の単位領域 (boxel)当たりの経時的集積曲線を求めた。集積曲線の動力的解析は、第3章第1節の方法に準じて行なった。血液クリアランス曲線を(1)式にあてはめ、simplex法により $P_1 \sim P_6$ を求めた。その結果を用い、脳の集積曲線を2-コンパートメントモデルにあてはめた。

$$C_b = P_1 \times \text{Exp}(-P_2 t) + P_3 \times \text{Exp}(-P_4 t) + P_5 \times \text{Exp}(-P_6 t) \dots (1)$$

$$dC_f/dt = k_1 C_b - k_2 C_f \dots \dots \dots (2)$$

C_b : 血液に存在する放射能濃度 (count/min/ml血液)

C_f : 脳に存在する放射能濃度 (count/min/boxel)

t : 投与後の経過時間 (分)

2. 結果

$^{125}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{123}\text{I-L-AMT}$ の調製

精製後、放射化学的収率50-60%、放射化学的純度95%以上の無担体 $^{125}\text{I-L-AMT}$ 及び $^{123}\text{I-L-AMT}$ が得られた。

マウス体内分布と代謝物の分析

マウス体内分布における $^{125}\text{I-L-AMT}$ の脳集積率を $^{125}\text{I-L-MIT}$ 、 $^{125}\text{I-D-MIT}$ 、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ のそれらと比較し、Fig. 3-12に示す。 $^{125}\text{I-L-MIT}$ と $^{125}\text{I-D-MIT}$ とを比較すると、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ の方が高い脳集積を示し、ヨウ素修飾アミノ酸においても脳のL-体に対する立体選択性が示された。また、その α -メチル誘導体である $^{125}\text{I-L-AMT}$ は、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ よりも高い脳への集積を示した。更に、投与後10分までの初期において、 $^{125}\text{I-L-AMT}$ の脳集積は、母体アミノ酸である $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の集積を上回った。しかしながら、その後、

^{125}I -L-AMTは、脳から速やかに消失した。

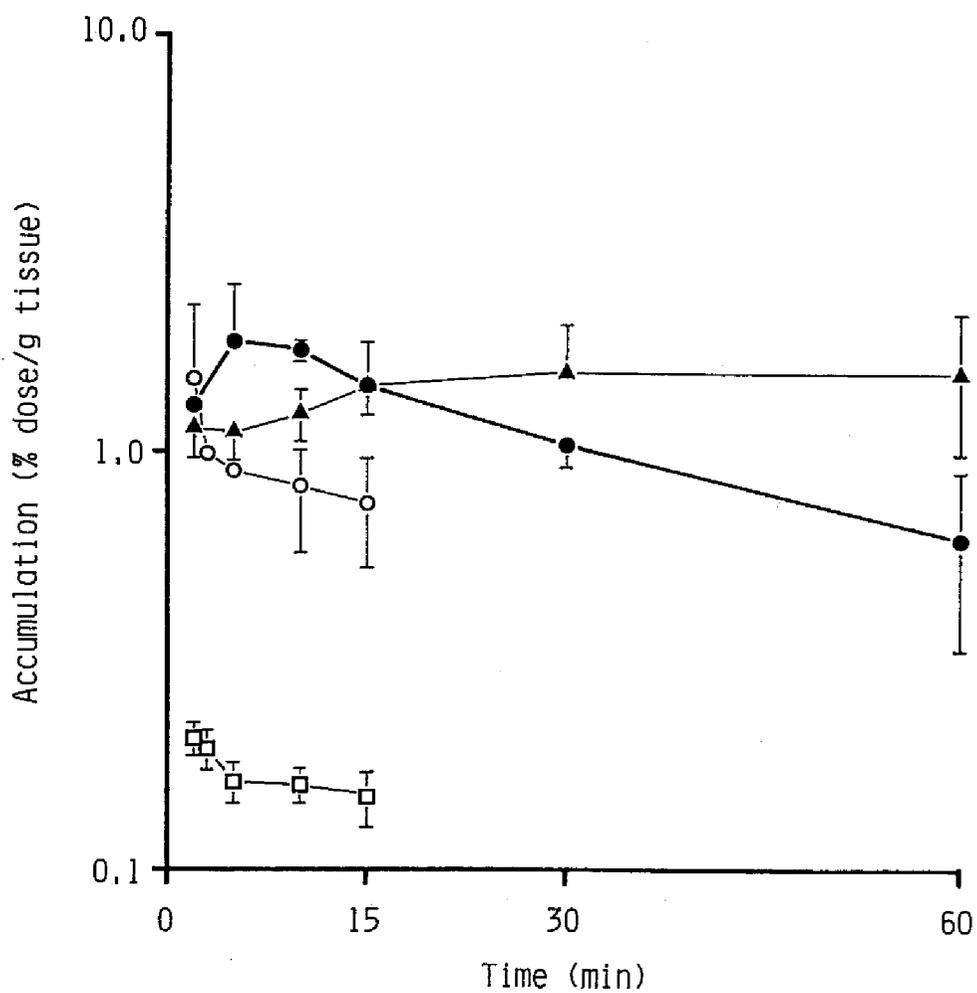


Fig. 3-12 Brain accumulation of ^{125}I -L-AMT, ^{125}I -L-MIT, ^{125}I -D-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in mice. Each point represents the mean \pm 1 S.D. of the data from four to five mice. (●) ^{125}I -L-AMT; (○) ^{125}I -L-MIT; (□) ^{125}I -D-MIT; and (▲) ^{14}C -L-Tyr.

Fig. 3-13には、それぞれの標識アミノ酸の血液クリアランスを示す。
 ^{125}I -L-AMTは、血液からの消失も速く、第3章第1節で示したように、脱
 ヨウ素化反応に対して安定な ^{125}I -D-MITとほぼ類似したクリアランスを示

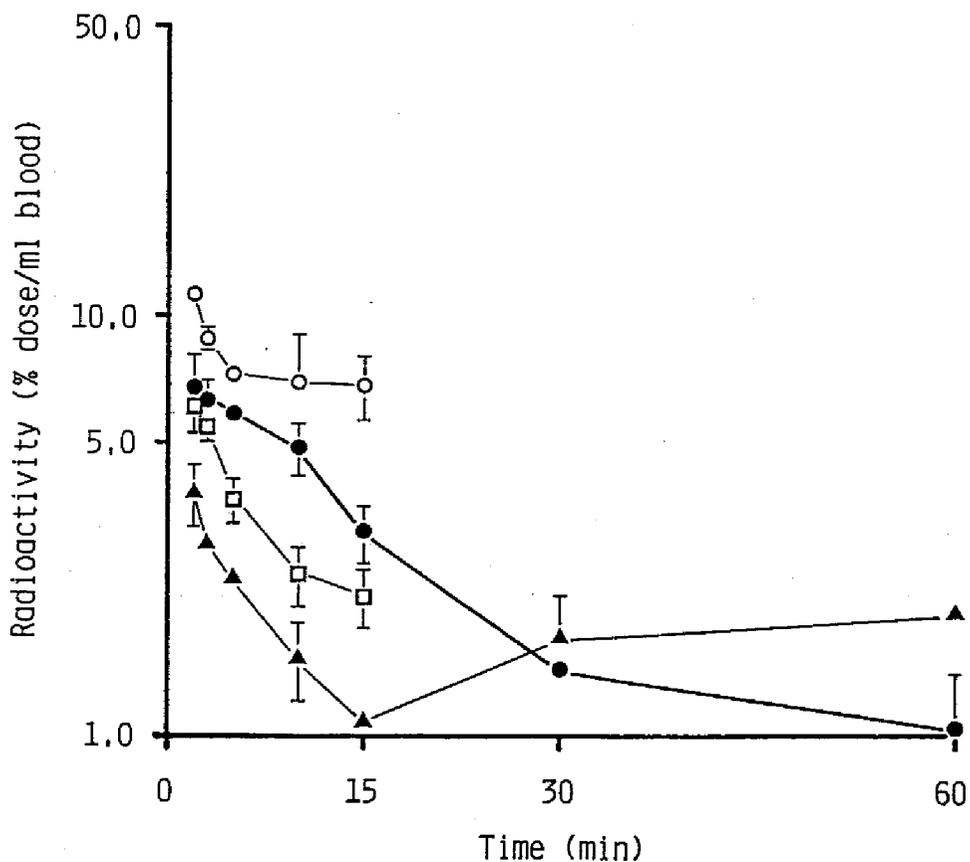


Fig. 3-13 Blood clearance of ^{125}I -L-AMT, ^{125}I -L-MIT, ^{125}I -D-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in mice. Each point represents the mean \pm 1 S.D. of the data from four to five mice. The data for ^{14}C -L-Tyr are in plasma. (●) ^{125}I -L-AMT; (○) ^{125}I -L-MIT; (□) ^{125}I -D-MIT; and (▲) ^{14}C -L-Tyr.

した。また、 ^{14}C -L-Tyrをはじめとする天然アミノ酸に特有の血液への再分布も見い出されず、結果的には、投与後30分以降における血液中の放射能は、 ^{125}I -L-AMTの方が低くなった。

Fig. 3-14には、マウス体内分布におけるその他の組織への集積率を示す。 ^{125}I -L-AMTは、膵臓において、脳への分布と類似した挙動を示した。

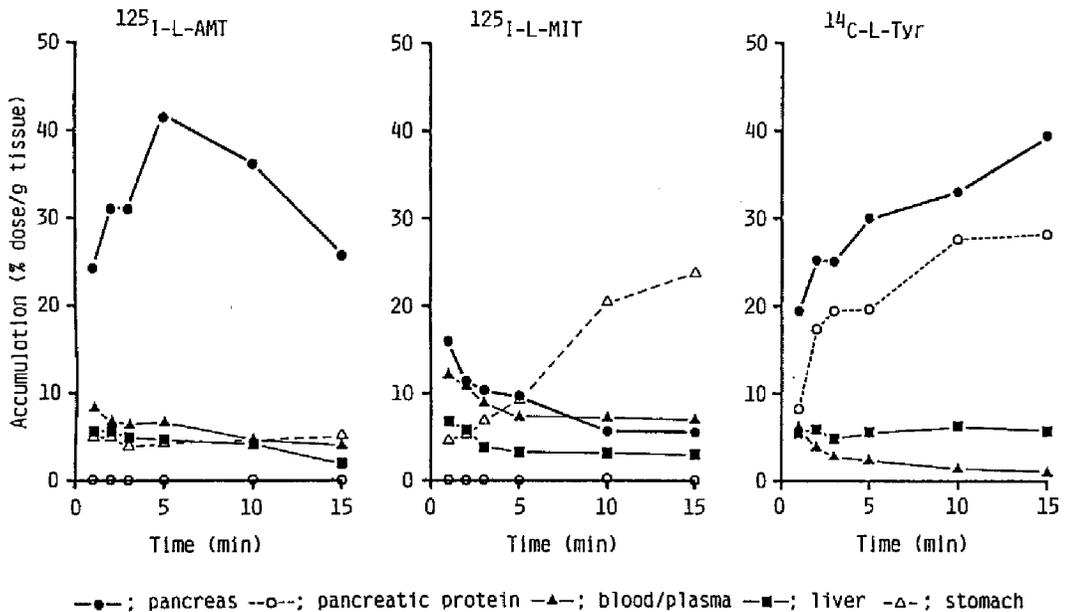


Fig. 3-14 Biodistribution of ^{125}I -L-AMT, ^{14}C -L-Tyr, and ^{125}I -L-MIT in mice and protein incorporation by the mouse pancreas. Each point represents the mean of the data from three to five mice. (●) Accumulation in the pancreas; (■) accumulation in the liver; (△) accumulation in the stomach; (▲) ^{125}I -L-AMT and ^{125}I -L-MIT levels in blood, and ^{14}C -L-Tyr level in plasma; and (○) protein incorporation by the pancreas.

即ち、投与後5分 ($41.5 \pm 5.2\%$ 投与量/g組織)をピークとする $^{14}\text{C-L-Tyr}$ を越える高い集積を示した後、速い消失が認められた。これに対し、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ では、投与後30分まで集積の増加が認められた。また、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ では、投与後早期に膵臓への集積が認められるものの、非常に速いクリアランスが観察され、血液レベルを越える集積はほとんど認められなかった。

Table 3-3には、マウス体内分布の投与後10分における膵臓への集積の他組織への集積に対する割合を示す。 $^{125}\text{I-L-AMT}$ の膵臓対血液比、膵臓対腎臓比は $^{14}\text{C-L-Tyr}$ より低いものの、膵臓のイメージングの際に特に問題となる膵臓対肝臓比においては、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の 5.35 ± 1.00 を上回る 8.67 ± 2.19 という高値が得られた。また、遊離ヨウ素イオンが特異的に集積する胃との比も 7.95 ± 1.04 と高く、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ の 0.28 ± 0.09 を大幅に

Table 3-3 PANCREAS TO OTHER TISSUE RATIO OF $^{125}\text{I-L-AMT}$,
 $^{125}\text{I-L-MIT}$ AND $^{14}\text{C-L-TYR}$ ACCUMULATION IN MICE^{a)}

	$^{125}\text{I-L-AMT}$	$^{125}\text{I-L-MIT}$	$^{14}\text{C-L-Tyr}$
Pancreas / Liver	8.67 (2.19)	1.83 (0.13)	5.35 (1.00)
Pancreas / Blood	7.56 (1.47)	0.82 (0.07)	22.58 ^{b)} (7.87)
Pancreas / Kidney	0.48 (0.08)	0.80 (0.07)	5.58 (0.75)
Pancreas / Stomach	7.95 (1.04)	0.28 (0.09)	----

a) mean (1 S.D.) of the data from three to four mice, 10 min. after intravenous injection.

b) Pancreas / Plasma.

改善した結果が得られた。これらの値は、Tisljarらの報告と良く一致している [4]。

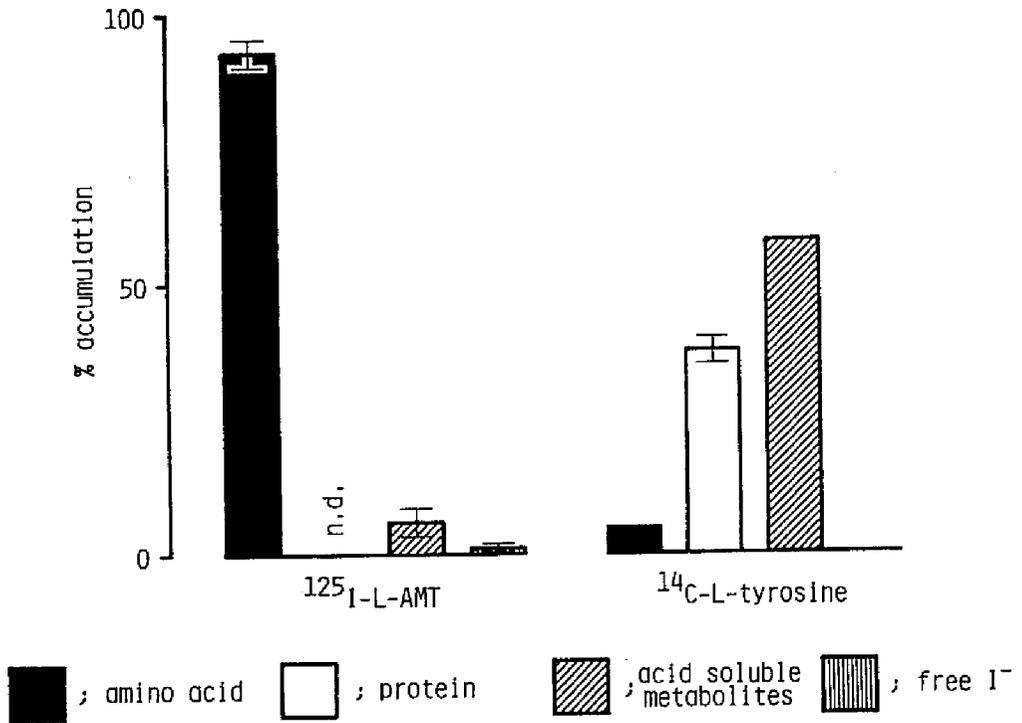


Fig. 3-15 Fate of ^{125}I -L-AMT and ^{14}C -L-Tyr in the mouse brain at 10 min. after intravenous injection. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of the data from three mice. The results for amino acid and acid soluble metabolite fractions of ^{14}C -L-Tyr are from a single mouse. Solid bars, amino acid fraction; open bars, protein fraction; obliquely striped bars, acid soluble metabolite fraction; and vertically striped bars, free I^- fraction.

更に、投与後10分のマウス脳内における放射能の化学形態をFig. 3-15に示す。 ^{14}C -L-Tyr投与マウスの脳では、tyrosineは5%以下しか存在せず、放射能の37.4%、56.8%が、それぞれタンパク画分、酸可溶性代謝物画分に見い出された。一方、 ^{125}I -L-AMTは、脳に集積した放射能の93%以上が

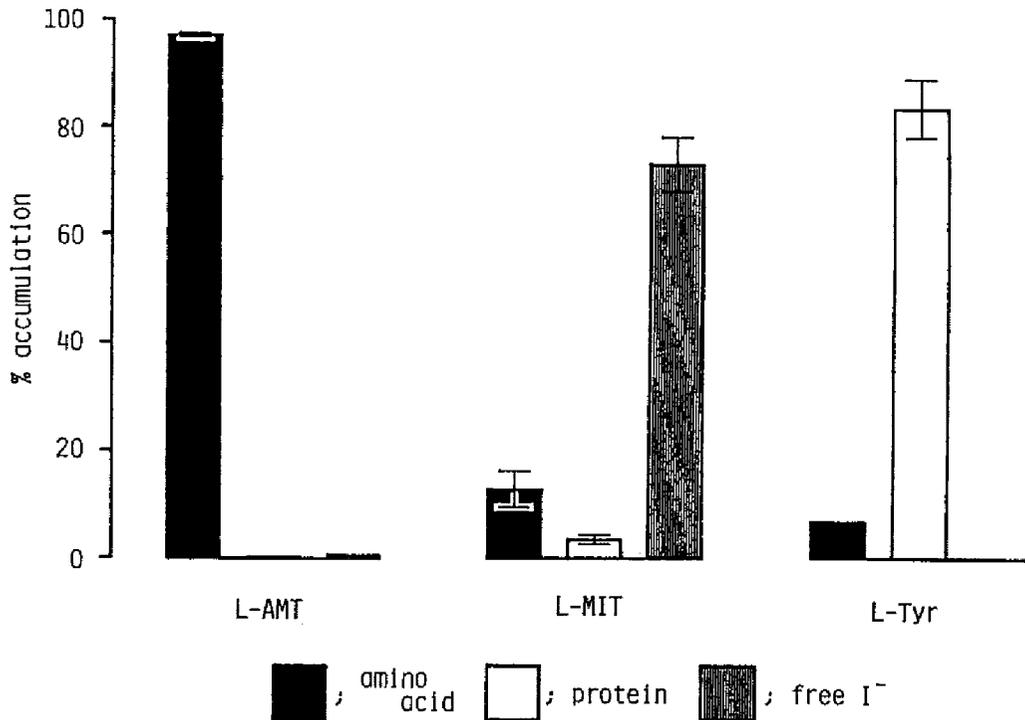


Fig. 3-16 Fate of ^{125}I -L-AMT, ^{125}I -L-MIT, and ^{14}C -L-Tyr in the mouse pancreas at 10 min. after intravenous injection. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of the data from three to four mice. The result for the amino acid fraction of ^{14}C -L-Tyr is from a single mouse. Solid bars, amino acid fraction; open bars, protein fraction; and striped bars, free I⁻ fraction.

遊離のアミノ酸として存在し、タンパクや酸可溶性代謝物としてはほとんど検出されなかった。

同様に、Fig. 3-16には、投与後10分のマウス膵臓内における放射能の化学形態を示す。 ^{14}C -L-Tyr投与では、遊離のtyrosineは、10%以下しか存在せず、放射能の80%以上は、タンパク画分に見い出された。 ^{125}I -L-MITでは、75%以上の放射能が、遊離ヨウ素として存在していた。それに対し、 ^{125}I -L-AMTでは、膵臓に集積した放射能の97%以上がAMTとして存在し、脳の場合と同様に、高い代謝安定性が確認された。

Table 3-4には、マウス各組織中の放射能の遊離アミノ酸画分とヨウ素イオン画分における存在比を ^{125}I -L-MITと比較して示す。 ^{125}I -L-AMTでは、遊離のヨウ素は、脳、膵臓で1%、肝臓、腎臓及び尿中においても、4%以

Table 3-4 IN VIVO STABILITY OF ^{125}I -L-AMT AND ^{125}I -L-MIT IN MICE^{a)}

	^{125}I -L-AMT		^{125}I -L-MIT	
	AMT	Free I ⁻	MIT	Free I ⁻
Pancreas	97.19 (0.46)	0.56 (0.29)	13.34 (3.46)	76.37 (5.32)
Liver	55.25 (7.05)	1.88 (1.34)	13.87 (2.90)	66.25 (5.39)
Kidney	94.93 (1.42)	2.21 (1.45)	14.07 (4.55)	75.07 (6.13)
Urine	93.09 (2.45)	3.81 (2.00)	4.79 (1.52)	94.21 (1.19)

a) mean (1 S.D.) of the data from three to four mice, 10 min. after intravenous injection.

下であり、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ とは対照的に脱ヨウ素化反応に対する高い抵抗性が示された。

分配係数

$^{123}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ 及び $^{123}\text{I-IMP}$ の分配係数をTable 3-5に示す。Tyrosine分子に対するヨウ素及びメチル基の導入は、脂溶性をある程度増加させたが、脂溶性の脳指向性アミンである $^{123}\text{I-IMP}$ [15]よりは、非常に低い分配係数を示した。また、pH 7.0とpH 7.4で $^{123}\text{I-IMP}$ に見られるような分配係数の違いが観察されなかった。

Table 3-5 PARTITION COEFFICIENTS^{a)}

	pH 7.0	pH 7.4
$^{123}\text{I-L-AMT}$	-0.879 (0.003)	-0.911 (0.004)
$^{14}\text{C-L-Tyr}$	-1.98 (0.02)	-2.00 (0.05)
$^{123}\text{I-IMP}$	0.722 (0.026)	0.940 (0.008)

a) $\log(\text{n-Octanol}/0.1\text{M Phosphate Buffer})$.

Brain Uptake Index

Fig. 3-17に示すように、 $^{125}\text{I-L-AMT}$ のBUI値は 62.1 ± 4.3 であり、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の 34.2 ± 4.7 と比較して高い値を示した。更に、 $^{125}\text{I-L-AMT}$ の脳への移行は、非放射性L-tyrosineまたは非放射性L-AMTの同時投与によって低下した。同様の効果が、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ についても認められた。

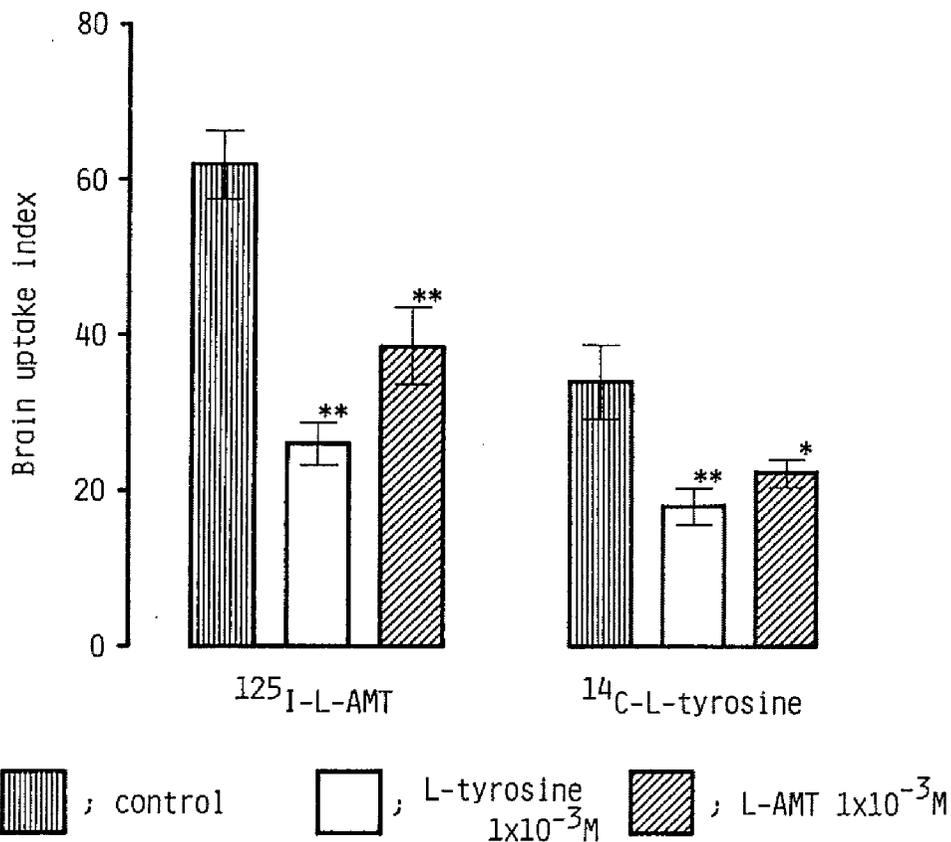


Fig. 3-17 Brain uptake index of $^{125}\text{I-L-AMT}$ and $^{14}\text{C-L-Tyr}$ determined in the rat brain. Each bar represents the mean ± 1 S.D. of the data from four to six rats. L-tyrosine and L-AMT were loaded at a dose of 1×10^{-3} M. Vertically striped bars, control index; open and obliquely striped bars; 1×10^{-3} M L-tyrosine or L-AMT was simultaneously added, respectively. (*) $p < 0.005$, (**) $p < 0.001$ compared to control.

ラット組織切片への集積

ラット脳切片への集積、阻害実験の結果をFig. 3-18に示す。37℃、30分間の振盪において、 ^{125}I -L-AMTと ^{14}C -L-Tyrは、それぞれ

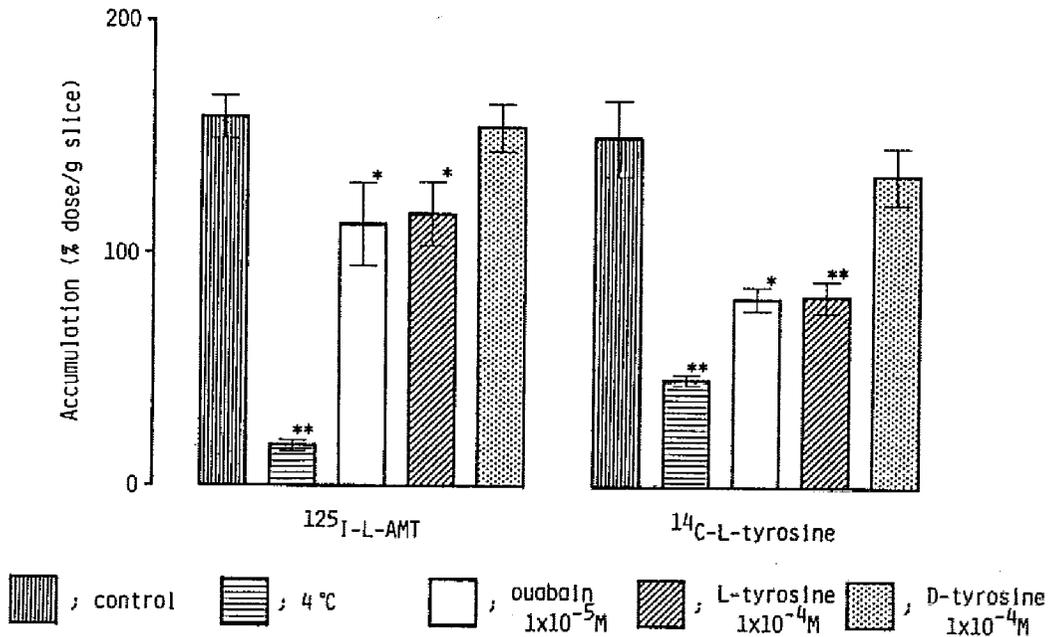


Fig. 3-18 Effects of inhibition on ^{125}I -L-AMT and ^{14}C -L-Tyr accumulation in rat brain slices. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of five experiments. Vertically striped bars, samples incubated for 30 min. at 37°C; horizontally striped bars, samples incubated at 4°C; open bars; samples loaded with 1×10^{-5} M ouabain and preincubated for 20 min.; obliquely striped and dotted bars, 1×10^{-4} M L-tyrosine or D-tyrosine was simultaneously added, respectively. (*) $p < 0.005$, (**) $p < 0.001$ compared to control.

158.4±9.4%投与量/g組織、151.0±16.6%投与量/g組織と同程度の集積を示した。この両者の集積は、4°Cの振盪で大きな低下が認められ、エネルギー依存性能動輸送機構の阻害剤であるouabainの存在によっても、有意に低下した。また、この集積は、非放射性L-tyrosineの存在により低下するものの、非放射性D-tyrosineによる影響は認められず、立体選択的阻害が観察された。これらの性質は、¹⁴C-L-Tyrと類似していた。

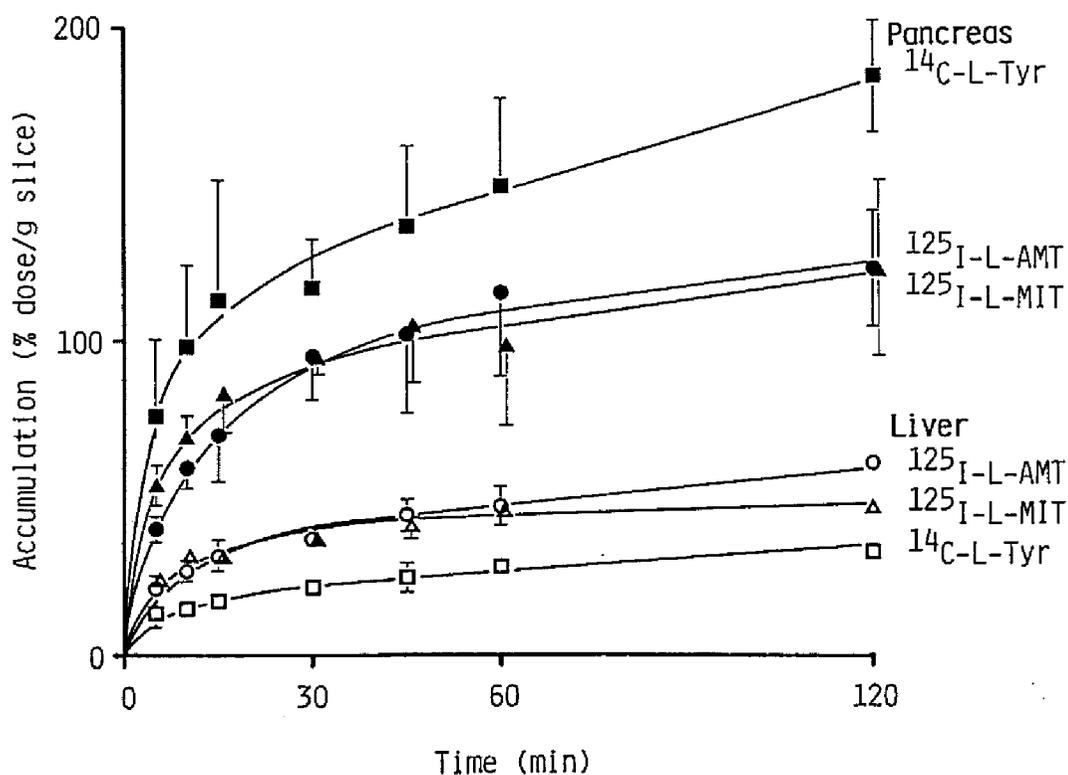


Fig. 3-19 Accumulation of ¹²⁵I-L-AMT, ¹²⁵I-L-MIT, and ¹⁴C-L-Tyr in rat tissue slices at 37°C. Each point represents the mean ± 1 S.D. of five experiments. Solid symbols show accumulation in pancreatic slices and open symbols show accumulation in liver slices.

ラット膵臓、肝臓切片への集積率の経時的変化をFig. 3-19に示す。
 $^{125}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ の集積は時間と共に増加し、投与後30分で膵臓切片に $95.0 \pm 13.6\%$ 投与量/g組織、 $94.0 \pm 5.0\%$ 投与量/g組織、肝臓切片に $36.7 \pm 2.1\%$ 投与量/g組織、 $36.9 \pm 3.5\%$ 投与量/g組織とそれぞれ肝臓に比べ膵臓に2.5倍高く集積した。また、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の集積と比較すると、両者とも膵臓では低く、逆に肝臓では多少高くなった。

Fig. 3-20には、 $^{125}\text{I-L-AMT}$ 、 $^{125}\text{I-L-MIT}$ 及び $^{14}\text{C-L-Tyr}$ の膵臓、肝臓切片への集積に対するouabainの阻害度を示す。Ouabainは、膵臓切片におい

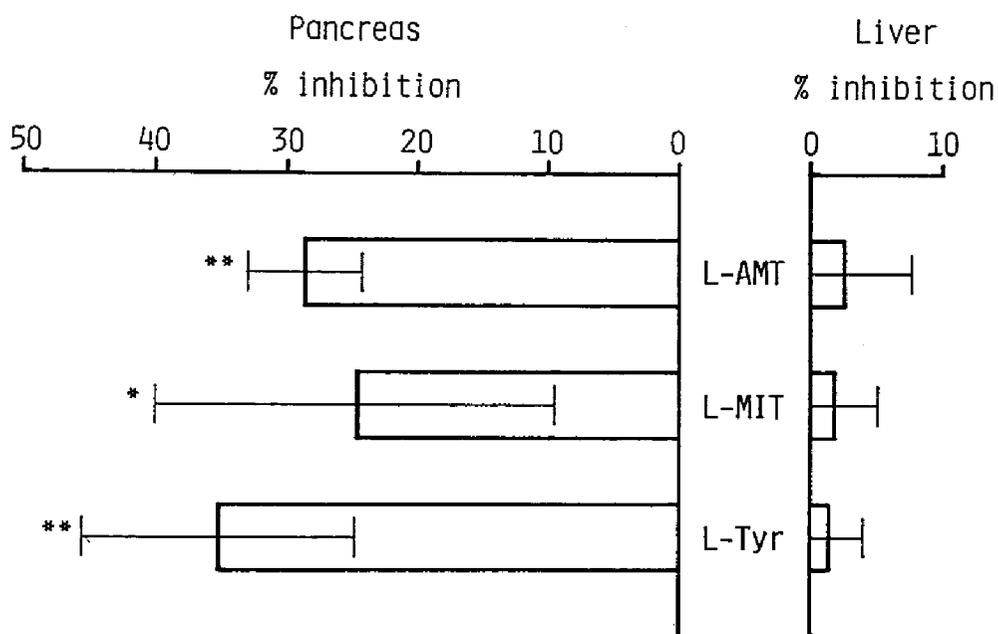


Fig. 3-20 Effects of ouabain on the accumulation of $^{125}\text{I-L-AMT}$, $^{125}\text{I-L-MIT}$, and $^{14}\text{C-L-Tyr}$ in rat tissue slices. Each bar represents the mean \pm 1 S.D. of four to five experiments. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ compared to control.

て、 $^{125}\text{I-L-AMT}$: 28.7%、 $^{125}\text{I-L-MIT}$: 24.7%、 $^{14}\text{C-L-Tyr}$: 35.2%とそれぞれの集積を低下させた。一方、肝臓切片においては、いずれも有意な阻害が認められなかった。

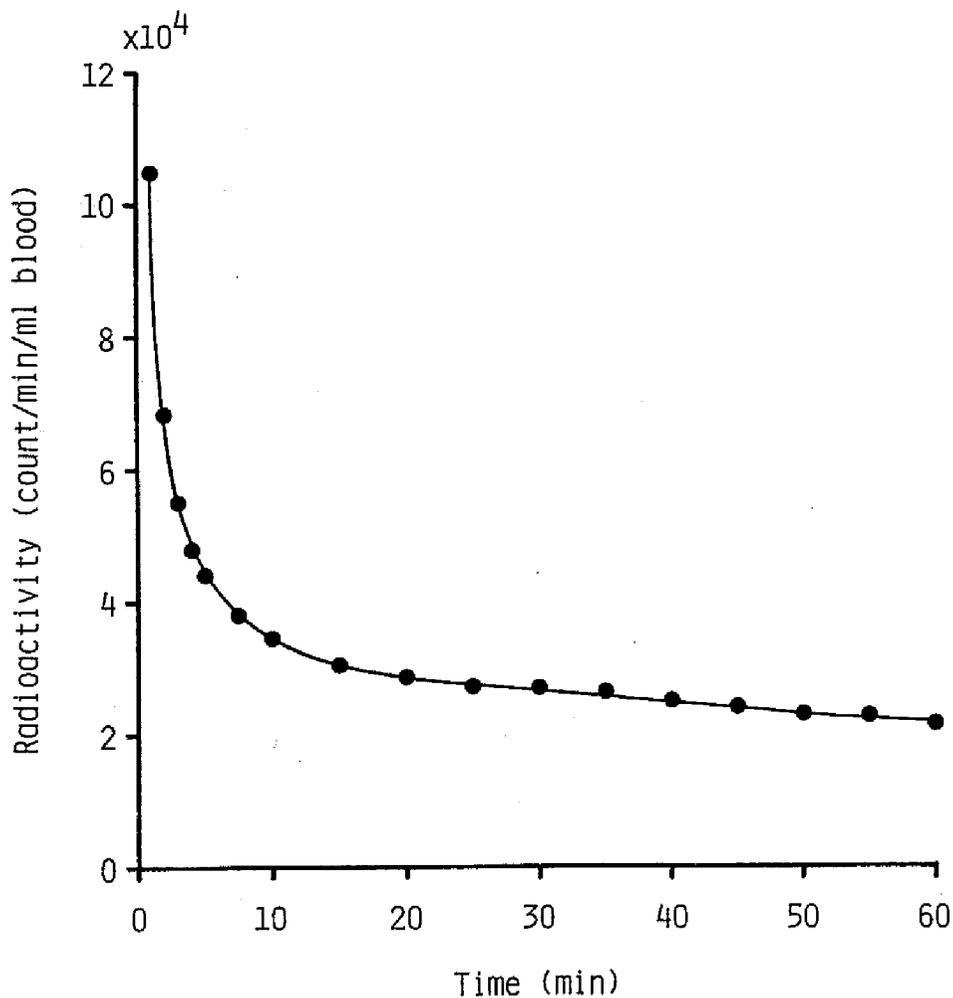


Fig. 3-22 Arterial blood clearance of $^{123}\text{I-L-AMT}$ in the dog and the result of kinetic analysis by the simplex method. The experimental data (●) are compared with the theoretical curve (line).

犬の頭部断層撮影と動力的解析

Fig. 3-21は、 $^{123}\text{I-L-AMT}$ 投与後10~30分の犬の頭部正中断層像である。写真下部に、 $^{123}\text{I-L-AMT}$ の脳への高い集積が、明瞭に描出されている。上部、三日月型の集積部位は、タンパク合成の盛んな組織、即ち、アミノ酸の需要が多い組織として知られる唾液腺、もしくは、鼻粘膜の一部である。

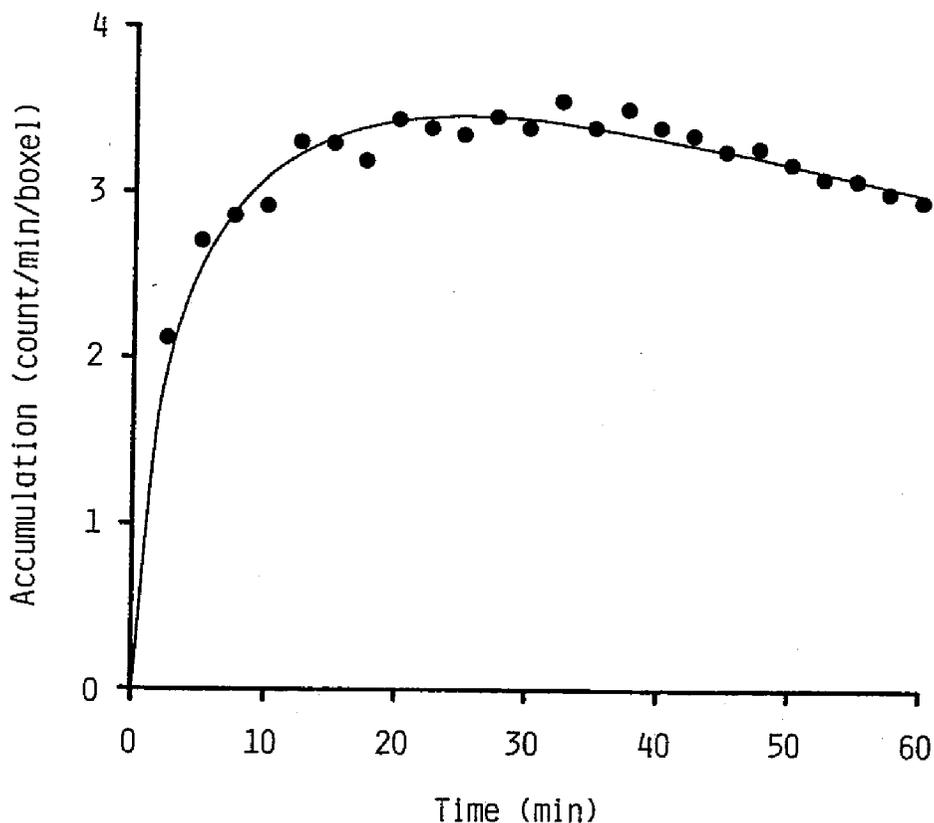


Fig. 3-25 Accumulation of $^{123}\text{I-L-AMT}$ in the dog brain and the result of kinetic analysis by the simplex method. The SPECT experimental data (●) are compared with the theoretical curve (line).

また、別に検討した¹²³I-L-AMT投与犬の血液放射能濃度とその解析結果より得られた曲線をFig. 3-22に示す。血液クリアランスの媒介変数： $P_1 \sim P_6$ は、それぞれ、 $144100 \text{ count/min/ml 血液}$ 、 1.318 min^{-1} 、 $43110 \text{ count/min/ml 血液}$ 、 0.2735 min^{-1} 、 $33670 \text{ count/min/ml 血液}$ 、 $0.007292 \text{ min}^{-1}$ となり、得られた曲線は、血液放射能濃度と良く一致した。Fig. 3-23は、投与後10～30分の左上に鼻を向けた状態での頭部OM横断断層像である。中央の断層像に、良好な脳のOM断層像が描出されている。Fig. 3-24にFig. 3-23の頭部OM横断断層像に設定した脳の関心領域と、その単位領域当たりの放射能の経時的变化を示す。上記の定数を(2)式に代入し、解析を行なった結果、 $k_1 = 7.82 \times 10^{-6} \text{ ml 血液/min/boxel}$ 、 $k_2 = 6.27 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ に収束し、得られた曲線は、脳領域の放射能変化とほぼ合致した(Fig. 3-25)。

3. 考察

今回の検討の結果、¹²³I-L-AMTは、前述した脳のtyrosine輸送機構診断薬としての条件をすべて満たすことが示された。L-AMTは、L-tyrosineの基本構造を有する α -メチル置換tyrosine誘導体である。この放射性ヨウ素標識L-AMTは、in vitro、in vivoの両検討において、非常に高い脳への集積を示した(Fig. 3-12, 3-17, 3-18, 3-21, 3-23)。また、この化合物は、側鎖にフェノール基を有するために、臨床応用性に優れる¹²³Iをはじめとする放射性ヨウ素により簡便に標識され、無担体条件下での精製も可能であった。放射性ヨウ素標識L-AMTは α -メチル基と放射性ヨウ素の導入にも関わらず、脳のアミノ酸輸送機構に対するL-tyrosineとしての生化学的特性を保持していた。特に、L-AMTの血液脳関門、脳細胞膜における輸送機序は、tyrosine選択的な担体を介するものであった(Fig. 3-17)。更に、脳切片における高い集積性は、L-体選択的なエネルギー依存性の能動輸送機構によるものであった(Fig. 3-18)。L-AMTの分配係数は、脂溶性によって脳内に移行するには低く[16]、また、脳内pHと血液pHで分配

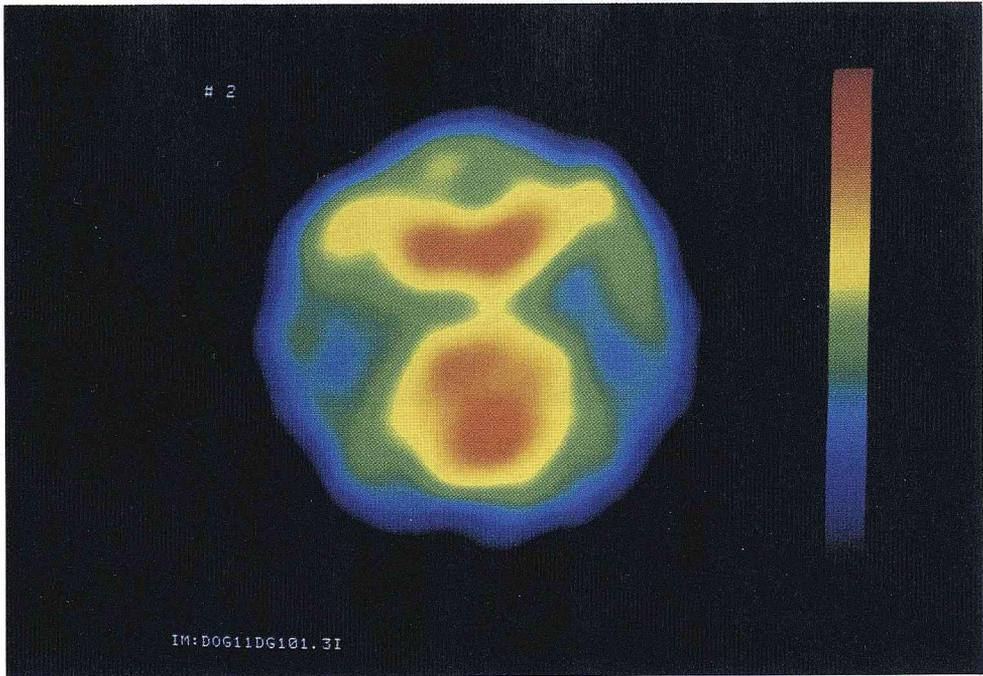


Fig. 3-21 Head SPECT image of a dog 10 to 30 min. after intravenous injection of ^{123}I -L-AMT. The high accumulation of ^{123}I -L-AMT in the brain is clearly visualized as a circle in the lower part of the photograph. The crescent-shaped accumulation may represent the salivary glands or the nasal mucosa, which are known to be sites of high protein synthesis and thus sites with a high amino acid requirement.

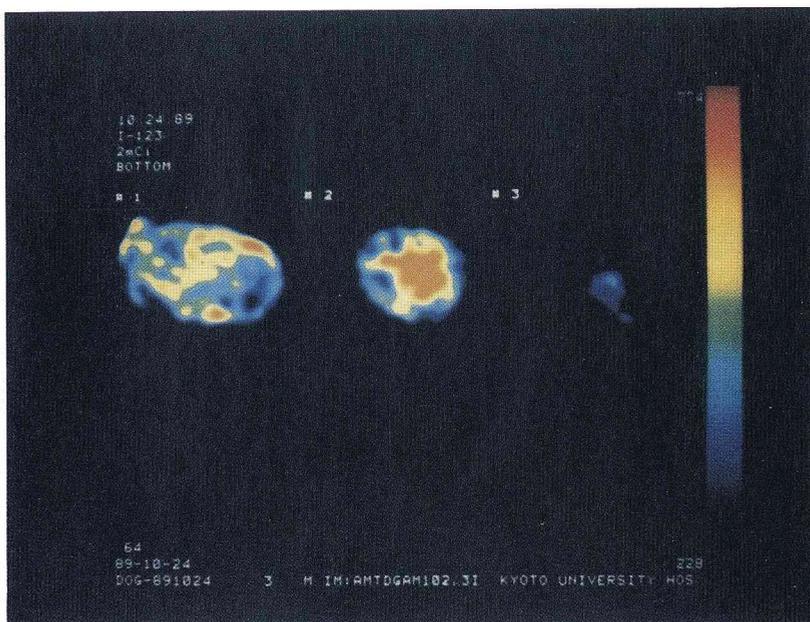


Fig. 3-23 Head SPECT image of a dog parallel to the orbitomeatal line 10 to 30 min. after intravenous injection of ^{123}I -L-AMT. The high accumulation of ^{123}I -L-AMT in the brain is clearly visualized as a circle in the center slice.

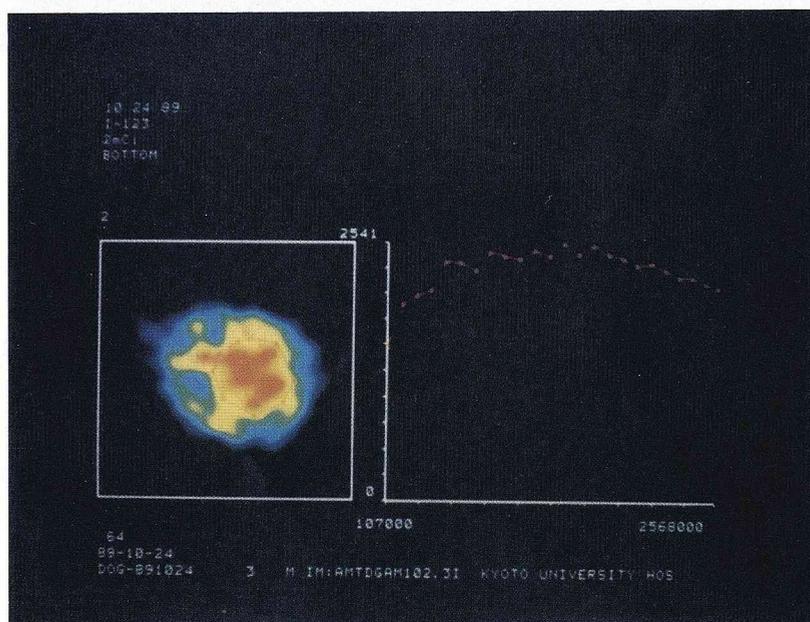


Fig. 3-24 The region of interest for the brain in the SPECT image shown in Fig. 3-23 and the time-radioactivity curve for the brain region.

係数はほとんど変化しないことより、いわゆるpH-shift機構[17]の関与も否定された(Table 3-5)。これらの特徴は、母体化合物である¹⁴C-L-Tyrと類似しており、L-tyrosineの脳内移行機序との相同性が強く示唆された。一方、脳内移行後の代謝安定性に関しては、L-AMTはL-tyrosineとは異なり、¹⁴C-L-Tyrにおける滞留機構と考えられるタンパク合成機構と酸可溶性低分子代謝機構への親和性を有しておらず(Fig. 3-15)、その結果、速やかに脳から消失した(Fig. 3-12)。これらの結果より、L-AMTが、アミノ酸膜輸送機構への親和性と併せて、所期の代謝安定性の高い修飾アミノ酸としての基本的な特徴を有していることが明らかとなった。

放射性ヨウ素標識放射性医薬品の開発においては、酵素的脱ヨウ素化反応に対する抵抗性を十分考慮しなければならない。第3章第1節でも示したように、L-tyrosineにヨウ素のみを導入したL-MITは、脱ヨウ素化酵素により速やかに代謝される[18,19]。しかし、L-MITの α 位にメチル基を導入したL-AMTは、脳において、脱ヨウ素化をはじめとする分解代謝機構に対する高い抵抗性を示した(Fig. 3-15)。肝臓においては、酸可溶性低分子代謝物が観察されるものの、L-AMTは、生体内で安定に存在し、最終的に未変化体として排泄されることが示唆された(Table 3-4)。

以上の結果を踏まえ、¹²³I-L-AMT投与の犬における頭部断層撮影実験を行なったところ、脳の断層が明瞭に描出された(Fig. 3-21, 3-23)。更に、脳以外のアミノ酸代謝の盛んな組織への集積も観察された。脳領域における集積曲線は、膜能動輸送機構のみを考慮した臨床応用の可能な2-コンパートメントモデルによる解析結果と合致し、¹²³I-L-AMTを用いる脳のtyrosine輸送機能の定量的解析が実際に行ない得ることが示された。

更に、L-AMTは、膵臓のアミノ酸膜輸送機能診断薬として必要な条件を満たしていることから、膵臓に関する検討も行なった。L-AMTは、母体アミノ酸であるL-tyrosineと同様に、in vitro、in vivoの両検討において高い膵臓選択性を示した(Fig. 3-14, 3-19, Table 3-3)。更に、その高い膵臓集積性は、肝臓とは異なり、エネルギー依存性の能動輸送機構の寄与が認められた(Fig. 3-20)。第3章第1節でも述べたように、L-tyrosine

の細胞内移行機序は、中性アミノ酸能動輸送機構、特にleucine機構によるものと言われている[20,21]が、L-AMTの膵臓選択性と能動輸送の寄与は、L-tyrosineのそれらに匹敵するものであり、脳の場合と同様に、膵臓内移行機序の相同性が強く示唆された。

一方、膵臓内移行後の滞留に関しては、L-AMTは、膵臓においてアミノ酸の最も有力な滞留機構と考えられるタンパク合成機構への親和性を有しておらず(Fig.3-16)、in vivoにおいて速やかに膵臓から消失した(Fig.3-14)。更に、L-AMTは、膵臓においても、脱ヨウ素化をはじめとする分解代謝機構に対する高い安定性を示した(Fig.3-16, Table 3-4)。このようなL-AMTの代謝は、第3章第1節で検討したD-MITと同様に、体内分布における放射能の血液や他の組織からの消失を速やかにすると共に、単純な代謝挙動をもたらし、体内挙動解析を容易にすると考えられた。

結論として、 ^{123}I -L-AMTは、体外測定可能な高い脳及び膵臓への集積を示し、臨床応用に適した放射性核種 ^{123}I で容易に標識され、無担体条件下での標識、精製が可能であり、アミノ酸膜輸送機構に対する選択的な親和性を有し、代謝、特に、脱ヨウ素化反応に対して非常に安定な放射性医薬品であることが示された。このような ^{123}I -L-AMTの性質は、精神疾患との関連が報告されている脳におけるtyrosine輸送機能[1]、あるいはタンパク合成の基質である膵臓のアミノ酸輸送機能の選択的測定に非常に適している。よって、 ^{123}I -L-AMTは、脳及び膵臓のアミノ酸輸送機能を選択的に測定し得る放射性機能診断薬として有用であると評価し得る。

Langenらは、本研究成果に基づき、L-AMTを32人の脳腫瘍患者に応用した[22]。その一例をFig.3-26に示す。このように、ヒトにおいても正常脳組織の良好な断層像が得られている。また、腫瘍部及びその周辺領域に正常組織に比較して高い集積が認められている。更に、正常大脳皮質領域の放射能の経時的变化(Fig.3-27)も、先の犬における結果と良く一致しており、アミノ酸膜輸送機能を反映していたと報告されている。特に、腫瘍部のアミノ酸膜輸送機能の亢進が報告され、 ^{123}I -L-AMTを用いることによって、病態におけるアミノ酸膜輸送機能の変化も検出し得ることが示された。

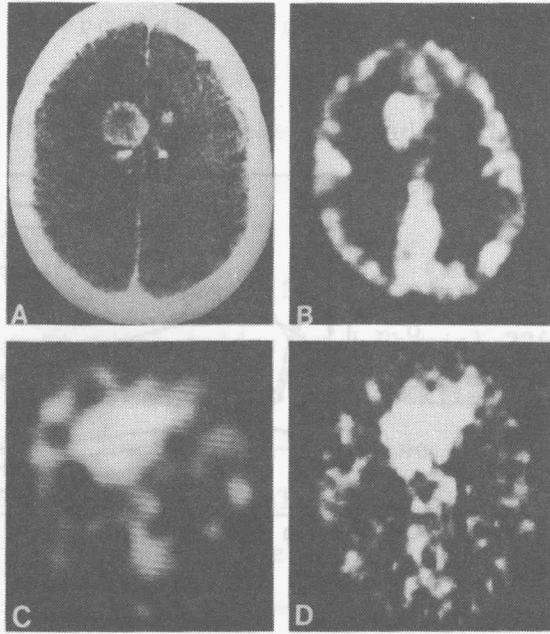


FIGURE 4

Contrast enhanced CT scan (A), ^{18}F FDG-PET scan (B), ^{123}I IMP-SPECT scan (C), and ^{124}I IMP-PET scan (D) of Patient 2. The tumor size appears larger on the ^{124}I IMP-PET scan than on the CT scan and on the ^{18}F FDG-PET scan. This finding resembles that in brain tumor studies with ^{11}C -L-methionine, where a similar relationship prevailed and in which the area of the visualized tumor is correlated exactly with the anatomic tumor size (*7*). The ^{123}I IMP-SPECT scan gives nearly the same result as the ^{124}I IMP-PET scan.

Fig. 3-26 Langen KJ, et al. J Nucl Med **31**: 281-286, 1990.

FIGURE 3
Kinetics of tracer activity in cerebral cortex, tumor and plasma during ^{124}I MT PET studies.

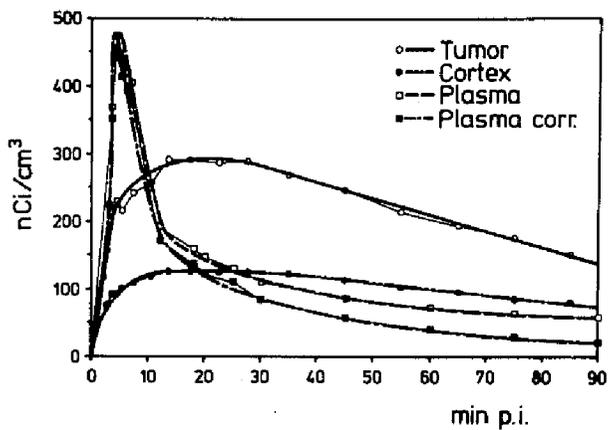


Fig. 3-27 Langen KJ, et al. J Nucl Med 31: 281-286, 1990.

引用文献

- 1) Hagenfeldt L, Venizelos N, Bjerkenstedt L, Wiesel FA: Decreased tyrosine transport in fibroblasts from schizophrenic patients. *Life Sci* **41**: 2749-2757, 1987
- 2) Oldendorf WH: Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am J Physiol* **221**: 1629-1639, 1971
- 3) Oldendorf WH: Stereospecificity of blood-brain barrier permeability to amino acids. *Am J Physiol* **224**: 967-969, 1973
- 4) Tisljar U, Kloster G, Ritzl F, Stocklin G: Accumulation of radioiodinated L- α -methyl-tyrosine in pancreas of mice: concise communication. *J Nucl Med* **20**: 973-976, 1979
- 5) Kloster G, Coenen HH, Szabo Z, Ritzl F, Stocklin G. Radiohalogenated L- α -methyl-tyrosines as potential pancreas imaging agents for PECT and SPECT. In: *Progress in Radiopharmacology*, Vol 3, pp 97-107, Martinus Nijhoff (Den Haag) 1982
- 6) Kloss G, Leven M: Accumulation of radioiodinated tyrosine derivatives in the adrenal medulla and in melanomas. *Eur J Nucl Med* **4**: 179-186, 1979
- 7) Bockslaff H, Kloster G, Stocklin G, Safi N, Bornemann H: Studies on L-3-[^{123}I]iodo- α -methyl-tyrosine: a new potential melanoma seeking compound. *Nuklearmedizin suppl* **17**: 179-182, 1980
- 8) Bockslaff H, Kloster G, Dausch D, Schad K, Hundeshagen H, Stocklin G: First clinical results using L-3- ^{123}I - α -methyl tyrosine for the non-invasive detection of intraocular melanomas. *Nuklearmedizin suppl* **18**: 840-844, 1981
- 9) Bockslaff H, Spitznas M, Hahn I, Kloster G: Noncontact detection of experimental amelanotic ocular melanoma with

- L-3-¹²³I-iodo- α -methyltyrosine. Albrecht von Graefes Arch Klin Ophthal **217**: 255-266, 1981
- 10) Biersack HJ, Coenen HH, Stocklin G, Reichmann K, Bockisch A, Oehr P, Kashab M, Rollmann O: Imaging of brain tumors with L-3-[¹²³I]iodo- α -methyl tyrosine and SPECT. J Nucl Med **30**: 110-112, 1989
 - 11) Oldendorf WH: Measurement of brain uptake of radiolabeled substances using a tritiated water internal standard. Brain Res **24**: 372-376, 1970
 - 12) Scharff R, Wool IG: Concentration of amino-acids in rat muscle and plasma. Nature **202**: 603-604, 1964
 - 13) Yoshida H, Namba J, Kaniike K, Imaizumi R: Studies on active transport of L-DOPA (dihydroxyphenylalanine) into brain slices. Jpn J Pharmacol **13**: 1-9, 1963
 - 14) Stadie WC, Riggs BC: Microtome for the preparation of tissue slices for metabolic studies of surviving tissues in vitro. J Biol Chem **154**: 687-690, 1944
 - 15) Winchell HS, Baldwin RM, Lin TH: Development of I-123-labeled amines for brain studies: localization of I-123-iodophenyl-alkyl amines in rat brain. J Nucl Med **21**: 940-946, 1980
 - 16) Levin VA: Relationship of octanol/water partition coefficient and molecular weight to rat brain capillary permeability. J Med Chem **23**: 682-684, 1980
 - 17) Kung HF, Tramosch KM, Blau M: A new brain perfusion imaging agent: [I-123]HIPDM: N,N,N'-trimethyl-N'-[2-hydroxy-3-methyl-5-iodobenzyl]-1,3-propanediamine. J Nucl Med **24**: 66-72, 1983
 - 18) Roche J, Michel R, Michel O, Lissitzky S: Sur la deshalogenation enzymatique des iodotyrosines par le corps thyroide et sur son role physiologique. Biochim Biophys Acta **9**: 161-169, 1952

- 19) Stanbury JB, Kassenaar AAH, Meijer JWA: The metabolism of iodotyrosines. I. The fate of mono- and di-iodotyrosine in normal subjects and in patients with various diseases. *J Clin Endocrinol Metab* **16**: 735-746, 1956
- 20) Oxender DL, Christensen HN: Distinct mediating systems for the transport of neutral amino acids by the Ehrlich cell. *J Biol Chem* **238**: 3686-3699, 1963
- 21) Blasberg R, Lajtha A: Substrate specificity of steady-state amino acid transport in mouse brain slices. *Arch Biochem Biophys* **112**: 361-377, 1965
- 22) Langen KJ, Coenen HH, Roosen N, Kling P, Muzik O, Herzog H, Kuwert T, Stocklin G, Feinendegen LE. SPECT studies of brain tumors with L-3-[¹²³I]iodo- α -methyl tyrosine: comparison with PET, ¹²⁴IMT and first clinical results. *J Nucl Med* **31**: 281-286, 1990

結 語

本研究により得られた知見は、以下のように要約される。

(1) 代謝機能診断に適するアミノ酸の選択を目的として、膵臓におけるアミノ酸集積を、膜透過、細胞内遊離アミノ酸プールへの貯留、タンパク合成の3つの過程としてとらえ、集積に対する各過程の寄与を検討することにより、膵臓機能診断に適したアミノ酸はどのような性質を有するものかを考察した。上記の3つの過程に特徴的と考えられるアミノ酸を選択し、それらのアミノ酸について、各過程に関する生化学的パラメータと膵臓集積性とを比較した。その結果、アミノ酸の膵臓集積は、細胞内遊離アミノ酸プールへの貯留量が少なく能動輸送機構に親和性の高いもので増加する傾向がみられ、一方、タンパク合成への寄与は直接的要因とはならないことが明らかとなった。これらの成果を基に、[1-¹¹C]アミノ酸の合成について検討し、その迅速自動合成法を確立した。

(2) [S-methyl-¹¹C]-L-methionineは合成上の理由から、現在、臨床研究に最もよく用いられているアミノ酸放射性医薬品である。[S-methyl-¹¹C]-L-methionineの膵臓のタンパク合成機能診断薬としての可能性を評価するために、¹⁴C-L-methionine([S-methyl-¹⁴C]-, [1-¹⁴C]-, [3,4-¹⁴C]-)の膵臓集積性と代謝挙動に対する標識部位の影響を検討した。マウス体内分布において、¹⁴C-L-methionineは、標識部位依存的な異なった分布挙動を示した。特に、[S-methyl-¹⁴C]-L-methionineでは、膵臓における貯留機構として、タンパク合成とメチル基転移反応が見い出され膵臓のタンパク合成機能診断薬としては問題があることが示された。

(3) サイクロトロン産生超短半減期核種は、汎用性の面で制限されるため、企業供給の可能な¹²³I等のシングルフォトン放出核種標識放射性医薬品の開発を目的とし、¹²⁵I-p-iodo-D,L-phenylalanine(¹²⁵I-PIPA)をモデル化合物として、アミノ酸代謝挙動に対する放射性ヨウ素標識の影響

を基礎的に検討した。 ^{125}I -PIPAは、ラット組織切片集積実験において、母体アミノ酸である[U- ^{14}C]-L-phenylalanine(^{14}C -Phe)と同種の膜能動輸送機構に基づく膵臓組織への高い集積を示した。マウス体内分布実験においても、 ^{125}I -PIPAは、投与初期には ^{14}C -Pheと類似した膵臓への選択的な集積が観察された。一方、 ^{125}I -PIPAは、滞留代謝機構に対する親和性を有していないことが示された。よって、 ^{125}I -PIPAに代表されるヨウ素標識アミノ酸は、膵臓のアミノ酸膜能動輸送機能を選択的に評価し得る放射性医薬品である可能性が高いと考えられた。

(4) 臨床応用の可能な、膵臓におけるアミノ酸膜輸送機能診断用 ^{123}I 標識修飾アミノ酸の開発を目的とし、 ^{123}I -3-iodo-D-tyrosine(^{123}I -D-MIT)について検討した。ラット組織切片集積実験及びマウス体内分布実験において、 ^{125}I -D-MITは、高い膵臓への集積と膜能動輸送機構に対する選択的な親和性を示し、更に、酵素的脱ヨウ素化反応に対して非常に安定であった。犬の腹部シンチグラフィとその動力学的解析の結果、 ^{123}I -D-MITは、膵臓におけるアミノ酸膜輸送機能を選択的に測定し得る修飾アミノ酸放射性医薬品として、評価し得ることが示された。

(5) 種々の精神疾患における脳のtyrosine輸送機能の変化が報告されていることから、脳のアミノ酸輸送機能を測定し得る ^{123}I 標識修飾アミノ酸の開発を計画し、 ^{123}I -3-iodo- α -methyl-L-tyrosine(^{123}I -L-AMT)の脳集積性とその集積機序、生体内における代謝安定性、及び、脱ヨウ素化反応に対する抵抗性について検討した。 ^{125}I -L-AMTは、マウスにおいて高い脳集積を示した。また、 ^{125}I -L-AMTのbrain uptake indexは、[U- ^{14}C]-L-tyrosineのそれを上回っていた。更に、血液脳関門及び脳細胞膜において、 ^{125}I -L-AMTは、担体を介する立体選択的な能動輸送機構に対する高い親和性を有していた。脳に集積した放射能の大部分が、未変化のI-L-AMTとして存在し、 ^{125}I -L-AMTの代謝安定性が示された。 ^{123}I -L-AMTを投与した犬の頭部SPECTでは、脳への高い集積が明瞭に描出され、その集積曲線は、臨床使用の可能な単純なモデルによる解析が可能であることが示

された。

更に、この ^{123}I -L-AMTは、D-MITとは異なった観点から、脾臓のアミノ酸膜輸送機能診断薬として、必要な条件を満たしていることから、 ^{123}I -L-AMTの脾臓集積性も検討した。その結果、 ^{123}I -L-AMTは、脳及び脾臓のアミノ酸輸送機能を選択的に測定するための機能診断薬剤として、優れた性質を有すると考えられた。

以上、本研究で得られた ^{11}C 及び ^{123}I 標識アミノ酸放射性医薬品の研究成果は、脳、脾臓における今後の核医学代謝機能診断に有用な情報を与えるものと考ええる。

謝 辞

終わりに臨み、本研究の実施に際し、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました恩師、京都大学薬学部横山 陽教授に謹んで感謝の意を表します。

同時に、本研究の直接の御指導をいただいた京都大学医学部藤林靖久博士に心から御礼申し上げます。

また、有益な御助言と御指導を賜った東京理科大学薬学部久保寺昭子教授、京都大学化学研究所杉浦幸雄教授、大阪薬科大学千熊正彦教授、京都大学薬学部佐治英郎助教授、京都大学医学部米倉義晴助教授、研究全般にわたって貴重な御教示をいただいた京都大学薬学部堀内和子博士、京都大学薬学部荒野 泰博士、京都大学医学部間賀田泰寛博士、大阪薬科大学大桃善朗博士に深く感謝いたします。

更に、実験に協力していただいた徳井太郎修士、八槻美弥学士、久下裕司修士、松本和也修士、安田隆一学士、船戸直子学士、討論に参加していただき御助言をいただいた京都大学薬学部放射性薬品化学教室、東京理科大学薬学部放射薬品化学教室、京都大学医学部付属病院放射線核医学科の諸氏、薬物体内動態解析のプログラムを提供していただいた京都大学薬学部山岡 清博士、東 真博士、放射性同位元素を提供していただいた日本メジフィジックス社に感謝いたします。