

《原 著》

Paroxetine の肺機能測定放射性薬剤としての可能性の検討

橋本 謙二* 五郎丸 純*

要旨 強力なセロトニン再吸収阻害作用を有する非三環系抗うつ薬である paroxetine の ³H 標識体の肺における放射性薬剤としての可能性を評価した。 ³H-paroxetine をマウスに静脈内投与し、経時的に各臓器における放射能分布を測定した結果、肺に非常に高い放射能の集積が見られた。しかしながら、肺における放射能分布はキャリアである paroxetine あるいは他のモノアミン再吸収阻害薬の投与によって減少しなかった。さらに、³H-paroxetine のマウス肺におけるインビトロ結合飽和実験の結果より、肺にも特異的結合部位が高密度に存在することが判った。また、トレーサ投与 1 時間後の肺における放射性物質を TLC および HPLC で分析した結果、未変化体であることが判った。以上の結果より、³H-paroxetine はセロトニンの代謝臓器としての肺の機能検査に応用できる放射性薬剤になる可能性があると思われる。

I. 序 論

Paroxetine (Fig. 1) は強力でかつ選択性のセロトニン再吸収阻害作用を有する非三環系抗うつ薬である^{1,2)}。代表的な三環系抗うつ薬には imipramine がある。³H-paroxetine と ³H-imipramine は脳および血小板におけるセロトニン再吸収部位を特異的にラベルすることが報告されている^{3~5)}。さらに、これらの部位の密度 (B_{max}) がうつ病やパーキンソン氏病等において減少していることが報告されている^{6,7)}。また、³H-imipramine に対する特異的結合部位が肺にも高密度に存在することが報告されている^{6,8,9)}。

最近、われわれは ³H-paroxetine がマウス脳内セロトニン再吸収部位のインビトロ測定に優れたラジオリガンドであることを報告した^{10,11)}。今回、マウスにおける ³H-paroxetine の体内動態を検討した結果、肺への放射能の集積が非常に高く、肺機能検査のための優れた放射性薬剤になる可能性が示唆されたので報告する。

II. 方 法

1. 標識化合物および試薬

³H-paroxetine (1,032.3 GBq/mmol (27.9 Ci/mmol)) は New England Nuclear (Boston, MA, USA) より購入した。Paroxetine は Beecham Pharmaceuticals (Surrey, UK) より提供を受けた。Desipramine および GBR 12909 はそれぞれ Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA) および Research Biochemical Inc. (Wayland, MA, USA) より購入した。6-nitroquipazine は 2-chloro 6-nitroquinoline と無水ピペラジンの反応により合成した¹²⁾。その他の試薬は市販の特級品を使用した。

2. マウスにおける ³H-paroxetine の体内動態

実験には ddy 雄性マウス (30~35 g) を使用した。³H-Paroxetine (60 kBq (1.6 μCi)) の生理食塩水溶液 0.2 mL をマウスの尾静脈より投与した。トレーサ投与 0.5, 1.0, 3.0 および 5.0 時間後にエーテル麻酔下屠殺して、血液、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓および脳を摘出して重量を測定し、サンプルオキシダイザー (アロカ、ACS-113) で燃焼した後、放射能を液体シンチレーションカウンター (アロカ、LSC-1000) で測定した。放射能の値は、すべて %Dose/g で表示した。

* 福山大学薬学部放射性薬品化学研究室

受付：元年 1 月 23 日

最終稿受付：元年 5 月 15 日

別刷請求先：広島県福山市東村町 985 (番号 729-02)

福山大学薬学部放射性薬品化学研究室

橋 本 謙 二

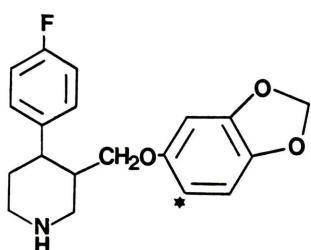


Fig. 1 Chemical structure of paroxetine. (★: Position of tritium).

次に、各臓器における放射能分布が特異的結合によるものか否かを調べるために、³H-paroxetine (60 kBq (1.6 μCi), 1 mg/kg) をマウスに静脈内投与して同様に放射能分布を求めた。

他のモノアミン再吸収阻害薬の影響を調べるために、6-nitroquipazine (1 mg/kg), desipramine (1 mg/kg) および GBR 12909 (1 mg/kg) をマウスに腹腔内投与し、30 分後に ³H-paroxetine (60 kBq (1.6 μCi)) を静注し、1 時間後の放射能分布を求めた。

3. 体内での安定性

³H-paroxetine のマウスにおける安定性を調べるために、ラジオトレーサ投与 1 時間後、肺を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4, 25°C) 0.5 ml でホモジナイズした後、このホモジネート 0.5 ml を paroxetine (1 mg) を含むエタノール 0.5 ml で抽出した。エタノール抽出物を薄層クロマトグラフィー (TLC; silicagel, chloroform : triethylamine = 20 : 1) および高速液体クロマトグラフィー (HPLC; C18-column, acetonitrile : 1% aqueous triethylamine acetate (pH 4) = 4 : 6) で分析した。TLC 分析に関しては、上記の展開溶媒系で展開した後、1 cm 間隔にかき取り放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。また HPLC 分析に関しては、上記の方法で分離した後、各フラクションの放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。

4. ³H-paroxetine 結合実験

ddy 雄性マウス (30~35 g) を断頭した後、すばやく肺を摘出した。50 倍容の 120 mM NaCl, 5 mM KCl を含む 50 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH

7.4, 25°C) とともに Kinematica Polytron ホモジナイザー (setting 5, 30 s) を用いてホモジナイズした後、35,000 g で 10 分間遠心分離した。得られた沈渣を同緩衝液で洗浄した後、再び同様に遠心分離した。この操作をもう一度行って得られた沈渣を同緩衝液に懸濁し膜標品とした。結合飽和実験は、終濃度 40~1,600 pM の ³H-paroxetine と同緩衝液および膜標品を加えて行った (最終容量 1 ml)。非特異的結合は 10 μM の paroxetine の存在下での結合量として求めた。37°C で 40 分間インキュベーションした後、4 ml の冷却した同緩衝液を加えて、24 チャンネル型セルハーベスター (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) を用いて、あらかじめ 0.05% polyethyleneimine で処置した Whatman GF/B フィルター上に吸引濾過し、冷却した同緩衝液 5 ml で 3 回洗浄した後、濾紙上の放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。蛋白量はスタンダードとして牛血清アルブミンを用いる Lowry 法¹³⁾ によって求めた。

結合実験の解析は非線形最小二乗法で、Damping Gauss-Newton 法によった。

III. 結 果

³H-paroxetine をマウスに投与した後の各臓器における放射能分布の経時変化を Table 1 に示す。ラジオトレーサ投与後、肺に非常に高い放射能の集積がみられ、以後徐々に減少することが判った。また、心臓における放射能分布は肺における放射能分布と比較するとかなり低く、心臓の放射能に対する肺の放射能の比 (肺/心臓) は非常に高い値 (約 10~13) を示した。

次に、肺への高い放射能分布が特異的結合によるものか否かを調べるために、キャリアとして非放射性の paroxetine (1 mg/kg) をラジオトレーサと一緒に投与して各臓器における放射能分布を求めた。Table 2 に示しているように、血液における放射能分布はキャリアの同時投与によって著しく減少したが、肺の放射能分布はほとんど影響を受けていないか、あるいは少し増加する傾向がみられた。また投与 3 および 5 時間後の脳における放

射能分布はキャリアの同時投与によっていくぶん減少した。

さらに、肺における放射能分布に及ぼす他のモノアミン再吸収阻害薬の影響を調べた。 ^3H -paroxetine 投与 1 時間後の肺における放射能分布

はセロトニン再吸収阻害作用を有する 6-nitro-quipazine, ノルエピネフリン再吸収阻害作用を有する desipramine およびドーパミン再吸収阻害剤 GBR 12909 の前投与によってほとんど影響を受けないことが判った (Table 3)。

Table 1 Distribution of radioactivity in mice after intravenous administration of ^3H -paroxetine

%Dose/g

	0.5 hr	1.0 hr	3.0 hr	5.0 hr
Blood	2.36±0.39	1.63±0.14	0.434±0.06	0.220±0.03
Heart	2.74±0.29	1.47±0.04	0.491±0.05	0.221±0.02
Lung	32.22±4.23	16.77±1.61	4.49±1.67	2.37±0.38
Liver	10.73±3.91	6.73±0.79	3.47±0.27	2.37±0.47
Spleen	8.85±1.63	5.46±0.09	1.86±0.69	0.823±0.24
Kidney	12.09±0.50	8.26±0.89	2.41±0.52	1.26±0.17
Brain	2.61±0.12	2.43±0.16	1.58±0.21	0.854±0.08

Three mice in each group; average±1 SD

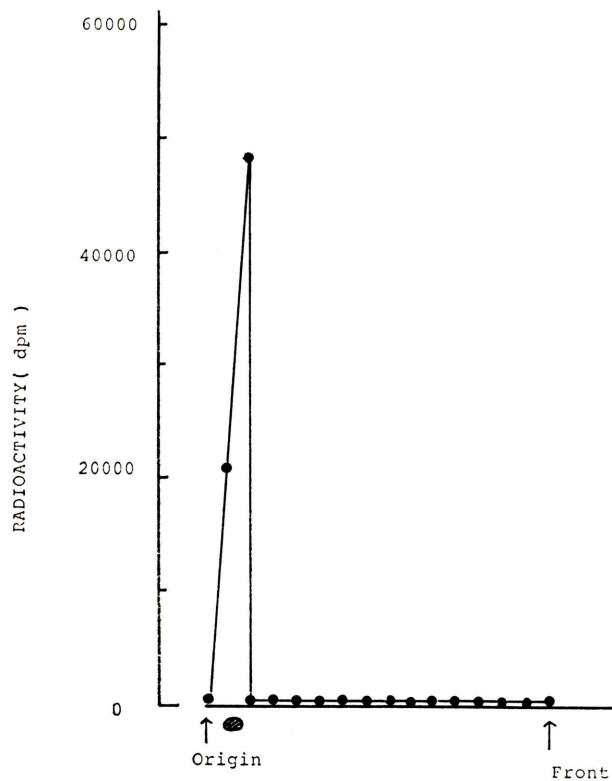


Fig. 2 TLC analysis of radioactive materials in the mouse lung at 1 hr after intravenous administration of ^3H -paroxetine. Solvent system; chloroform: triethylamine=20:1, Rf value=0.15, ●; Paroxetine detected by UV lamp.

Table 2 Distribution of radioactivity in mice after intravenous administration of carrier-added (1 mg/kg) ^3H -paroxetine

	0.5 hr	1.0 hr	3.0 hr	5.0 hr	%Dose/g
Blood	0.924±0.10	0.611±0.16	0.263±0.05	0.153±0.02	
Heart	2.77±0.25	2.12±0.28	0.783±0.07	0.407±0.08	
Lung	31.87±2.01	24.44±2.83	8.64±1.26	3.67±0.35	
Liver	8.44±0.28	7.85±1.28	4.77±1.18	2.66±0.35	
Spleen	4.91±0.12	4.45±0.90	1.47±0.17	0.811±0.24	
Kidney	13.08±2.69	10.51±1.95	4.46±0.28	2.15±0.49	
Brain	2.69±0.13	2.58±0.25	1.12±0.11	0.546±0.16	

Three mice in each group; average±1 SD

Table 3 Effect of monoamine uptake inhibitors on distribution of radioactivity in mice after intravenous administration of ^3H -paroxetine

	Vehicle	6-Nitroquipazine	Desipramine	GBR 12909	%Dose/g
Blood	1.41±0.26	0.693±0.09	1.52±0.09	1.57±0.08	
Heart	1.42±0.03	1.55±0.22	1.57±0.09	1.60±0.07	
Lung	19.41±1.74	16.63±7.13	21.85±7.77	21.02±5.73	
Liver	7.86±0.78	7.08±0.43	7.52±0.95	7.18±0.03	
Spleen	6.14±0.49	3.34±0.20	7.00±0.61	6.74±0.63	
Kidney	8.34±1.50	10.48±1.40	9.01±2.09	7.85±1.54	
Brain	2.24±0.14	1.90±0.24	2.50±0.01	2.34±0.12	

Three mice in each group; average±1 SD

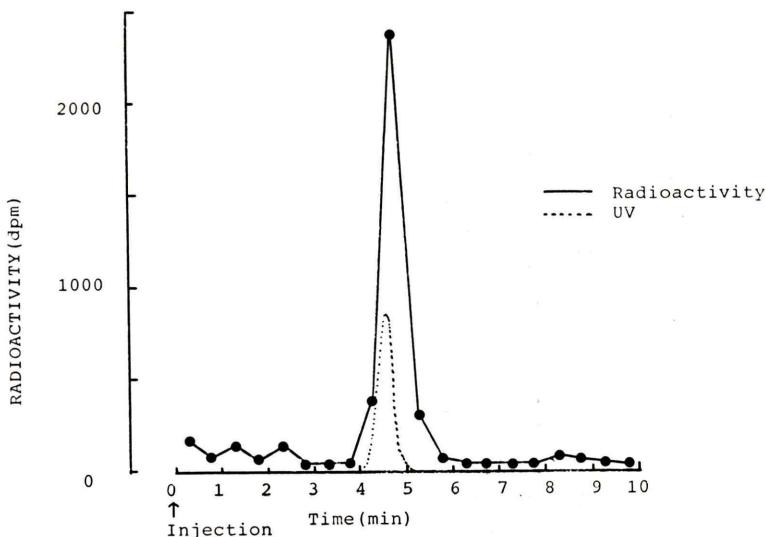


Fig. 3 HPLC analysis of radioactive materials in the mouse lung at 1 hr after intravenous administration of ^3H -paroxetine. Column; Shim-pack CLC-ODS, Mobile phase; acetonitrile: 1% aqueous triethylamine acetate (pH 4)=4: 6, Flow rate; 2 ml/min, Detector; UV (254 nm), Retention time of paroxetine (4.6 min).

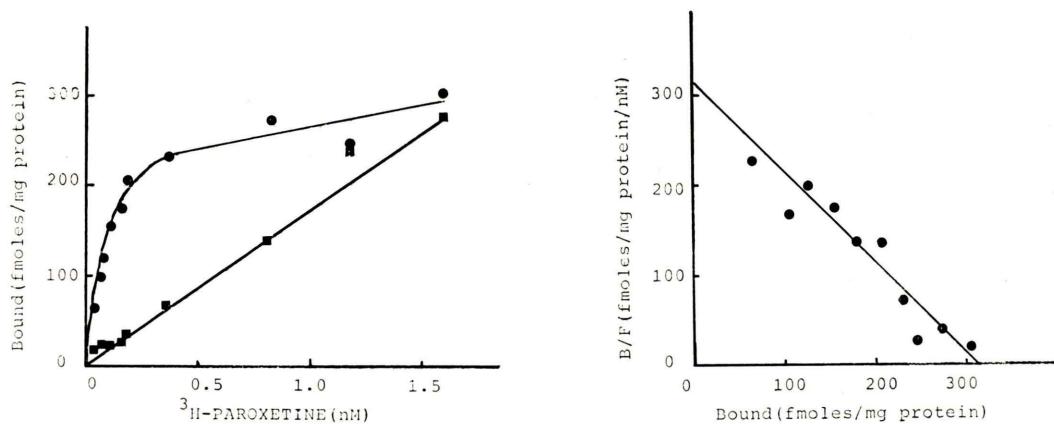


Fig. 4 Specific ^3H -paroxetine binding in mouse lung. Abscissa: ^3H -paroxetine concentration (nM). Ordinate: ^3H -paroxetine bound (fmole/mg protein). Homogenates of mouse lung (approximately 0.65 mg protein/ml) were incubated for 40 min at 37°C as described in Methods with 10 concentrations of ^3H -paroxetine between 40 and 1,600 pM. Each value represents the mean of duplicate determinations. Non-specific binding (■) and specific binding (●). Insert: Scatchard plot analysis of ^3H -paroxetine binding. Abscissa: ^3H -Paroxetine bound (fmol/mg protein). Ordinate: bound/free (fmol/mg protein/nM). Each point is the average of duplicate determinations. All binding parameters were estimated by means of the non-linear least-squares method using a Damping Gauss-Newton algorithm.

また、 ^3H -paroxetine 投与 1 時間後の肺における放射性物質は、TLC および HPLC で分析した結果、 ^3H -paroxetine によるものであることが判った (Fig. 2, Fig. 3)。

次に、生体内温度 (37°C) における ^3H -paroxetine のインビトロでの結合飽和実験を行った。 ^3H -paroxetine の濃度を 40 pM から 1,600 pM まで展開して特異的結合をプロットすると飽和曲線が得られ、また非特異的結合は直線的に増加した (Fig. 4)。次に、特異的結合を Scatchard 解析すると直線になり、一成分と考えられる高親和性の結合部位の存在が示された (Fig. 4)。解離結合定数 K_d 値は 92.2 ± 24.9 pM ($N=3$)、最大結合数 B_{\max} 値は 302.8 ± 49.0 fmol/mg protein ($N=3$) であった。

IV. 考 察

以前より、 ^3H -imipramine に対する特異的結合部位が肺に存在することが報告されている^{6,8,9)}が、 ^3H -paroxetine に対してもインビトロ 結合飽和実

験から特異的結合部位が肺に存在することが判った。また、生体内温度 (37°C) では ^3H -paroxetine の解離結合定数 (K_d) の値は ^3H -imipramine の値と比較してきわめて小さいことが予想されるので、インビトロ研究においては ^3H -paroxetine の方が ^3H -imipramine より優れているであろう。

また、 ^3H -paroxetine 投与後にみられる肺への高い放射能の集積が、paroxetine および 6-nitroquipazine の投与によって減少しなかったことより、特異的結合によるものであることを確認することができなかった。しかしながら、生体内温度においても ^3H -paroxetine に対する結合部位が高密度に存在することから、肺への高い放射能集積は特異的結合による可能性が十分に高いと考えられる。さらに、 ^3H -imipramine に対する特異的結合部位は心臓に存在しないことが報告されており⁶⁾、肺における放射能と心臓における放射能の差は特異的結合を反映しているかもしれない。

肺は内因性あるいは外因性のアミン類を含む多

くの循環性物質の調節に重要な役割を果たしており、塩基性化合物の肺への高い集積が数多く報告されている^{14~16)}。また、³H-paroxetine投与後の肺への放射能分布が他のモノアミン再吸収阻害作用を有する薬物の投与によって減少しなかったことより、このラジオトレーサーの肺への高い取り込みが塩基性薬物の肺への再吸収過程によるものでないことが示唆された。

一般に、肺におけるセロトニンの再吸収は、飽和性でかつNa⁺依存性であることが、以前より報告されている^{17,18)}。また、肺におけるセロトニンの再吸収の速度論的パラメータは血小板や脳のそれと類似しており、イミプラミンはセロトニンの肺動脈からの再吸収を特異的に阻害することが知られている。一方、肺は他の臓器と違ってセロトニンを貯蔵することができず、取り込まれたセロトニンをすばやく5-ヒドロキシインドール酢酸へ代謝することが報告されている^{17,18)}。このように、肺動脈内皮細胞はセロトニンを不活性化することにより、血中のセロトニンの量を制御して循環器系において保護的役割を果たしていると考えられている^{8,17,18)}。また、³H-imipramineや³H-paroxetineで特異的にラベルされる部位は、血中のセロトニンの量をコントロールする際、セロトニンの再吸収部位において重要な生理的役割を担っていると思われる。

以上の結果より、³H-paroxetineはセロトニンの代謝を司る重要な臓器である肺の機能検査に応用できるラジオトレーサーになると思われる。さらに、ポジトロン放出核種である¹⁸Fで標識した¹⁸F-paroxetineとpositron emission tomography(PET)を用いることにより、ヒトにおけるセロトニンの代謝臓器としての肺の生理的役割を研究することは興味があることと思われる。今後、いろいろな動物モデルを用いて肺における³H-paroxetineの放射性薬剤としての有効性を検討する必要があろう。

謝辞 Paroxetineの原末を提供していただいたBecham薬品株式会社に感謝いたします。

文 献

- Petersen EN, Bechgaard E, Sortwell RJ, et al: Potent depletion of 5-HT from monkey whole blood by a new 5-HT uptake inhibitor, paroxetine (FG 7051). *Eur J Pharmacol* **52**: 115~119, 1978
- Thomas DR, Nelson DR, Johnson AM: Biochemical effects of the antidepressant paroxetine, a specific 5-hydroxytryptamine uptake inhibitor. *Psychopharmacology* **93**: 193~200, 1987
- Mellerup ET, Plenge P, Engelstoft M: High affinity binding of ³H-paroxetine and ³H-imipramine to human platelets membranes. *Eur J Pharmacol* **96**: 303~309, 1983
- Mellerup ET, Plenge P: High affinity binding of ³H-paroxetine and ³H-imipramine to rat neuronal membranes. *Psychopharmacology* **89**: 436~439, 1986
- Habert E, Graham D, Tahraoui L, et al: Characterization of ³H-paroxetine binding to rat cortical membranes. *Eur J Pharmacol* **118**: 107~114, 1985
- Langer SZ, Raisman R, Sechter D, et al: ³H-Imipramine and ³H-desipramine binding sites in depression. "Frontiers in Biochemical and Pharmacological Research in Depression", Usdin E, Asberg M, Bertilsson L, Sjoqvist F, eds, Raven Press, New York, 1984, p. 113
- Raisman R, Cash R, Agid Y: Parkinson's disease: Decreased density of ³H-imipramine and ³H-paroxetine binding sites in putamen. *Neurology* **36**: 556~560, 1986
- Raisman R, Langer SZ: Specific high affinity ³H-imipramine binding sites in rat lung are associated with a non-neuronal uptake site for serotonin. *Eur J Pharmacol* **94**: 345~348, 1983
- Morin D, Zini R, Lange J, et al: Evidence for high affinity ³H-imipramine binding sites in human lung. *Biochem Biophys Res Commun* **120**: 926~932, 1984
- 橋本謙二, 五郎丸毅: 新抗うつ薬³H-paroxetineのマウスにおける脳内動態. 薬物動態 **3**: 574~575, 1988
- Hashimoto K, Goromaru T: In vivo binding of ³H-paroxetine in mouse brain. *Nucl Med Biol*, submitted
- Owen RT: DU-24565, 6-Nitroquipazine. *Drugs Future* **10**: 385~386, 1985
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265~275, 1951
- Bend JR, Serabjit-Singh CJ, Philpot RM: The pulmonary uptake, accumulation and metabolism of xenobiotics. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **25**: 97~125, 1985

- 15) Hashimoto K, Inoue O, Suzuki K, et al: Synthesis and evaluation of ^{11}C -cyanoimipramine. Nucl Med Biol **14**: 587-592, 1987
- 16) Hashimoto K, Inoue O, Suzuki K, et al: Bio-distribution study of ^3H -PK 11195 in mice. Ann Nucl Med **3**: in press, 1989
- 17) Junod AF: Uptake, metabolism and efflux of ^{14}C -5-hydroxytryptamine in isolated perfused rat lungs. J Pharmacol Exp Ther **183**: 341-355, 1972
- 18) Pickett RD, Anderson MW, Orton TC, et al: The pharmacodynamics of 5-hydroxytryptamine uptake and metabolism by the isolated perfused rabbit lung. J Pharmacol Exp Ther **194**: 545-553, 1975

Summary

Evaluation of ^3H -Paroxetine as a Radiopharmaceutical for Lung Function

Kenji HASHIMOTO and Tsuyoshi GOROMARU

Department of Radiopharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences,
University of Fukuyama, Higashimura-cho, Fukuyama, Japan

The potential of ^3H -paroxetine as a radiotracer for in vivo study of the function in mouse lung was examined. The high accumulation of radioactivity in the mouse lung was observed after intravenous administration of ^3H -paroxetine. However, the distributions of radioactivity in the mouse lung were not significantly decreased by treatment with paroxetine or other monoamine uptake inhibitors (6-nitroquipazine, desipramine and GBR 12909). It was found that the radioactivity in the mouse lung at 1 hr after intravenous administration of ^3H -paroxetine was due to unmetabolized

^3H -paroxetine from TLC and HPLC analyses. Furthermore, ^3H -paroxetine exhibits both saturable and high affinity binding sites in mouse lung with a maximal number of binding sites (B_{\max}) of 303 fmoles/mg protein and a dissociation constant (K_d) of 92.2 pM. These results suggest that ^3H -paroxetine would be a suitable radiopharmaceutical for in vivo study of the function of lung as a metabolic organ of serotonin.

Key words: Paroxetine, In vivo binding, Serotonin uptake, Lung, Positron emission tomography.