

《ノート》

高速液体クロマトグラフィを用いた ^{125}I -IMP の代謝産物の分析

Analysis of ^{125}I -IMP and Its Metabolites Using
a High Performance Liquid Chromatography

佐藤 始広* 石川 演美** 武田 徹** 吳 効**
倉本 憲明** 板井 悠二** 吉澤 卓*** 中島光太郎****

Motohiro SATOH*, Nobuyoshi ISHIKAWA**, Tohoru TAKEDA**, Wu JIN**,
Kenmei KURAMOTO**, Yuji ITAI**, Takashi YOSHIZAWA***
and Kotaro NAKAJIMA****

*Department of Radiology, University Hospital of Tsukuba, **Department of Radiology,

***Department of Neurosurgery, Institute of Clinical Medicine, University of Tsukuba

****Department of Radiology, Hitachi General Hospital

I. はじめに

N -isopropyl- p -[^{123}I]iodoamphetamine (以下 IMP) は局所脳血流測定用トレーサとして広く臨床的有用性が認められている^{1~5)}。静注された IMP は血流に応じて速やかに脳内に移行し、その初期分布は局所脳血流量を反映する^{1~3)}。しかし、IMP の体内動態、特に再分布現象を含めた delayed 画像の臨床的意義についてはなお不明の点が多い。

Baldwin らは IMP を静脈内に投与した後の血清および尿の分析を高速液体クロマトグラフィ (以下 HPLC) を用いて行い、その代謝産物は Fig. 1 に示す物質であることを報告している⁶⁾。これによれば、血清中では静注直後には IMP 分

画が大部分を占めるが、静注数時間以後には PIA (p-iodoamphetamine), PIB (p-iodobenzoic acid), PIH (p-iodohippuric acid) 分画が徐々に増加し 50% 以上を占める⁶⁾。一方で、PIPA (p-iodophenylacetone) および、遊離の放射性ヨウ素はわずかに検出されるにとどまったと報告されている。これらの代謝産物が各臓器にどのように分布しているかについて、Matsuda ら¹⁷⁾, Rapin ら¹¹⁾ がそれぞれ脳内での検討を行っているが他の体内臓器については十分の検討はなされていない。そのためわれわれは IMP およびその代謝産物の諸臓器への分布について、家兎および Mongolian gerbil (砂ネズミ) を用いて若干の検討を加えたので報告する。

II. 方 法

1) IMP の血液内動態に関する検討

ネンブタール序酔下に、家兎 (雌 3.0~3.3 kg) 2 羽の大腿動静脈に観血的にカテーテルを挿入した。

Key words: N -isopropyl- p -[^{125}I]iodoamphetamine (IMP) High performance liquid chromatography (HPLC), Delayed image, Metabolite.

* 筑波大学附属病院放射線科

** 同 臨床医学系放射線科

*** 同 脳神経外科

**** 日立総合病院放射線診療科

受付: 2年 10月 24日

最終稿受付: 2年 12月 26日

別刷請求先: 茨城県つくば市天久保 2-1-1 (番 305)

筑波大学附属病院放射線科

佐 藤 始 広

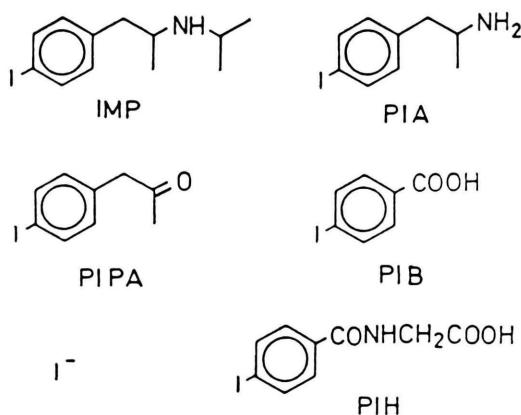


Fig. 1 Chemical structures of IMP and its metabolites.

静脈カテーテルより 3.7 MBq ($100 \mu\text{Ci}$) の ^{125}I -IMP (日本メジフィジックス社) を急速静注し、静注後 1 分、5 分、15 分、30 分、1 時間、3 時間、6 時間に動脈カテーテルより採血した。得られた血液より、1 ccあたりの全血カウント数をウエル型ガンマカウンタ (ARC 601: アロカ社製) にて測定した。また $1,500 \text{ G}$ で 20 分遠沈して血清成分を分離し、全血に対する血清成分のカウント比を求めた。さらにオクタノール抽出率を犬上らの方法に準じて測定した⁷⁾。

2) IMP の代謝産物に関する検討

本実験には、体重 70 g 、20週齢前後の雌の砂ネズミ (Mongolian gerbil) を使用した。

砂ネズミを ketamine hydrochloride (体重 1 kg あたり 80 mg 筋注) による麻酔下にて頸部を正中切開し右総頸動脈を露出し、Matsumoto らの方法⁸⁾にて 5 時間結紮したのち再解放することで一時的な脳虚血モデルを作成した。血行再開 24 時間後に 1.85 MBq ($50 \mu\text{Ci}$) の ^{125}I -IMP を右大腿静脈より急速静注し、15 分、および 3 時間後に断頭し速やかに左右大脳半球、肺、肝臓、血液を採取した。

採取後各臓器を直ちにヘキサンードライアイスで -80°C にて凍結させ、自動凍結乾燥機 (UNRAP II, バーチス社) にて凍結乾燥した。また血液の一部は 1500 G で 20 分間遠沈後、血清を

分離した。得られた試料から、酢酸エチルを用いて IMP とその代謝産物の抽出を行った。すなわち各試料に 0.5 N 水酸化ナトリウム $0.2\text{--}0.5 \text{ cc}$ を加えてアルカリ性にしたのち、試料の湿潤重量の 5 倍量の酢酸エチルを加えてホモジナイズした。さらに速やかに 1500 G 、10 分間遠沈し溶媒層を分離した。次に抽出後の試料に 0.5 N 塩酸 $0.2\text{--}0.5 \text{ cc}$ を加えて酸性としたのち、同様に酢酸エチルを加えて遠沈し溶媒層を分離した。

この抽出物を HPLC にて分析した。HPLC は日本分光の 880-PV、カラムは Finepak SIL C₁₈ T-5 を用いた。溶離液は 0.4% $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ 水溶液- 0.2% CH_3COOH - 50% CH_3CN とし、流速 $1.0 \text{ ml}/\text{min}$ 、試料注入量 $10 \mu\text{l}$ 、室温分析を行った。また検出には紫外線検出器 (日本分光 UV/VIS、 254 nm) と、放射活性測定法を用いた。

3) 統計処理

データは $\text{mean} \pm 1 \text{ S.D.}$ で示した。またデータの一部の有意差の検定は Mann-Whitney 検定を用いて行った。

III. 結 果

1) IMP の血液内動態に関する検討

家兎での IMP 投与後の全血 1 cc の放射能のカウント数の経時的变化を Fig. 2 にしめす。グラフは得られたカウントの物理的半減期の補正をしたのち、2 羽の平均値をプロットした (以下同様)。血中の放射能のカウントは静注直後のピークより急速な減少を示し、ヒトでの報告⁹⁾と同様の結果であった。しかし静注後 15 分以降カウント数は徐々に増加し、3~4 時間後に再びピークとなりその後緩やかに減少した。同様に全血液に対する血清成分の放射能の割合の経時的变化を Fig. 3 に示す。静注直後には血球成分のカウントが多かつたが、時間の経過とともに血清カウントの割合が増加した。静注 1 時間以後には血清中カウントが 80% 以上であった。

オクタノール抽出率の経時的变化を Fig. 4 に示す。静注直後に抽出率はほぼ 100% であったが、以後時間とともに低下し 3 時間後には 24.3% と

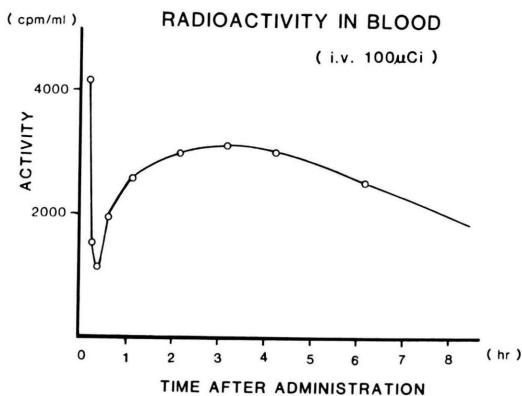


Fig. 2 I-125-IMP blood disappearance curve in rabbits. The activity decreases first and a rise is seen at 20 min after injection.

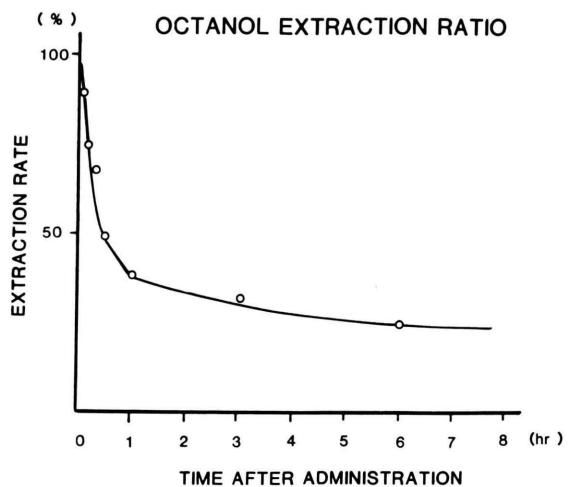


Fig. 4 Temporal change of octanol extraction ratio in rabbit. Octanol extraction ratio decreases first by a fast component followed by a slow component.

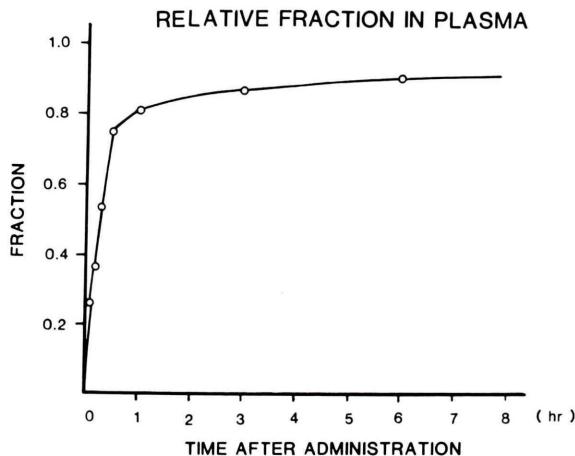


Fig. 3 Temporal change of relative fraction of IMP in plasma. Relative fraction of IMP in plasma increases gradually to a plateau value of 80%.

なった。

2) IMP 代謝産物の経時的変化

砂ネズミの麻酔から覚醒後の神経症状の有無は Matsumoto らの判定法⁸⁾に準じて判定した。12匹中3匹に神経症状がみられ、8匹は正常、1匹は処理時間までに死亡した。3匹に認められた神経学的異常は左片麻痺、右方旋運動のいずれかないしその双方であった。

酢酸エチルによる血液、組織からの IMP およ

びその代謝産物の一回抽出率は $79.0 \pm 7.3\%$ (アルカリ性で 52.3%、酸性で 26.7%) であった。

正常側大脳 (左大脳半球) の IMP 静注後 15 分の HPLC クロマトグラムを Fig. 5 にしめす。図、左は分析波長 254 nm でのクロマトグラム、右は放射能測定による結果を示してある。両者のピークは比較的良く一致し IMP に相当するピークが大部分を占めており、PIA, PIB に対応するピークはきわめて小さかった。他の代謝産物は検出されなかった。PIB と PIH の HPLC での分離が困難であるため両者をまとめて PIB とした⁶⁾。正常側脳の静注 3 時間後のクロマトグラムを Fig. 6 に示す。静注 15 分後のクロマトグラムと異なり、IMP の量と比較してその代謝産物である PIA の増加が明らかである。しかし PIB に対するピークは静注 15 分後と同程度で小さかった。

HPLC の分析の結果より各臓器での IMP と主たる代謝産物である PIA, PIB の分画の静注 15 分後 (図中 EARLY) および 3 時間後 (図中 DELAY) における 5 匹の平均比率を Fig. 7 に示す。Fig. 1 に示した PIPA、遊離の放射性ヨウ素は、いずれの臓器においても 5% 以下と微量であるためこの

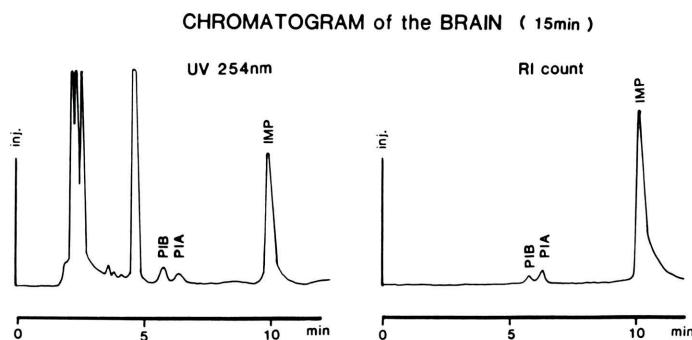


Fig. 5 A typical HPLC chromatogram of I-125-IMP and its metabolites of the normal gerbil's brain (15 min after IMP administration) using a Finepak SIL C₁₈ T-5 column and eluted with 0.4%CH₃COONH₃—0.2%CH₃COOH—50%CH₃CN solution at a flow rate 1 ml/min.

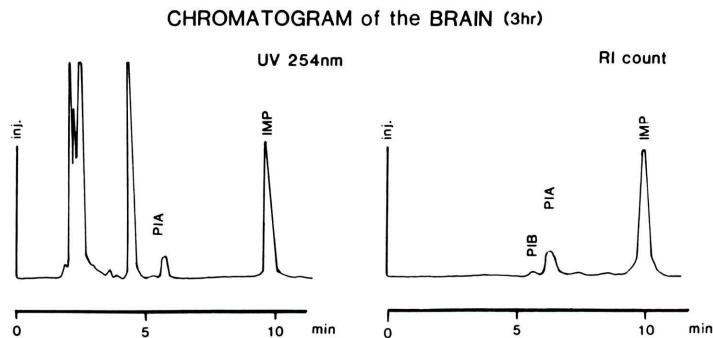


Fig. 6 A typical HPLC chromatogram of normal gerbil's brain (3 hours after IMP administration).

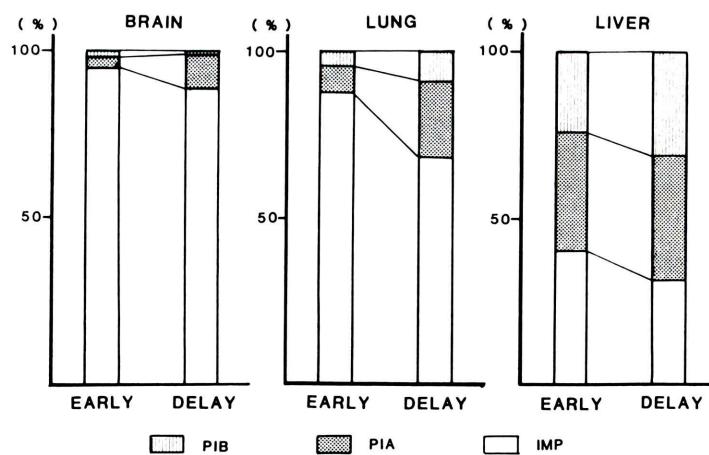


Fig. 7 Composition of IMP and its metabolites (PIA, PIB) in gerbil's organs at 15 min (EARLY) and 3 hours (DELAY) after IMP administration.

グラフより除いてある。正常脳では早期にはIMPが $94.3 \pm 0.78\%$ を占めるが、3時間後にはPIAの割合が有意に増加した($p < 0.01$)。しかしPIBの増加は、3時間後にも認められなかった。肺においても3時間後にはPIAが有意に増加し($p < 0.01$)、同様の傾向を認めた。肝臓においては早期からPIA、PIBの比率が高く、静注後早期より代謝産物の蓄積が起きていた。同様に全血での構成比は早期にはIMPが $53 \pm 9.4\%$ を占めたが、3時間後にはPIA、PIBの割合が増加した(Fig. 8)。特に血清では早期よりPIBの分画が $82.0 \pm 6.4\%$ 、3時間後には $92.1 \pm 2.8\%$ と大部分を占めた。

また、大脳半球の正常側と虚血側のIMP、PIB、PIAの構成比は、静注後早期には差を認めなかつた(Table 1)。すなわち、IMPが正常側では $94.3 \pm 0.78\%$

$\pm 0.78\%$ 、虚血側では $94.3 \pm 0.46\%$ を占め、PIA、PIBはわずかに認められるのみであった。静注3時間後、PIAは増加したが虚血側と正常側とで有意差を認めなかつた。虚血側のPIBは正常側より多い傾向にはあったが同様に有意差はなかつた。

IV. 考 察

¹²³I-IMPの局所脳血流測定トレーサとしての有用性は多くの基礎的、臨床的検討により実証されている^{1~5)}。しかし、IMPの脳内比放射能は静注20~30分後にピークとなったのち徐々に分布が変化し、特に虚血巣などの病変領域においてはいわゆる再分布現象を呈する¹⁰⁾。この現象は臨床の分野では脳組織のviabilityとの関連づけられて注目されてきたが¹¹⁾、現在では局所脳血流量に依存した現象であると考えられており、viabilityとの関連性については疑問視されている¹²⁾。ところで、静注後IMPの代謝産物が血液中に徐々に増加することはよく知られている¹⁰⁾。脳delayed画像については、この代謝産物がどのように影響しているかを検討することが必要である。

今回の家兎を用いた実験では、静注約15分以後、3時間をピークとして血液中の放射能の増加が見られ、これまでのヒトの血液における時間放射能曲線と類似のパターンを示した。このピークには肺からのIMPの洗い出しが強く影響していると考えられる。また血清/全血比、オクタノール抽出率の結果から、この時期に血清に親和性の強い水溶性代謝産物が増加していることが示唆される。実際砂ネズミの血液のHPLCによる検討では、代謝産物であるPIA、PIBが血中に徐々に増加することが確認され、特に水溶性代謝産物であるPIBは主として血清中に存在することが明

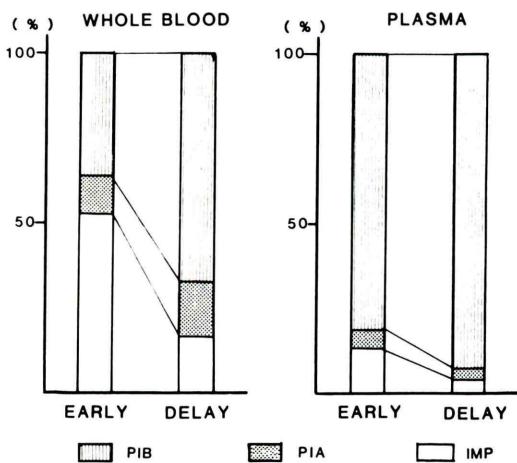


Fig. 8 Composition of IMP and its metabolites (PIA, PIB) in gerbil's blood and plasma at 15 min (EARLY) and 3 hours (DELAY) after IMP administration.

Table 1 Composition of IMP and its metabolites in gerbil's brain

	EARLY (15 min)			DELAY (3 hours)				
	n	PIB	PIA	IMP	n	PIB	PIA	IMP
Normal hemisphere	5	1.86 ± 0.50	3.82 ± 0.32	94.3 ± 0.78	5	3.14 ± 1.05	13.0 ± 3.90	83.8 ± 3.81
Ischemic hemisphere	4	1.68 ± 0.51	4.30 ± 0.11	94.3 ± 0.46	7	5.03 ± 1.98	14.9 ± 4.24	80.8 ± 5.50

(mean \pm 1 S.D. %)

* n: number, PIB: p-iodobenzoic acid, PIA: p-iodoamphetamine.

らかとなった。

これらの代謝産物のうち PIA は正常脳では時間とともに蓄積する傾向にあった。しかし水溶性代謝産物である PIB は脳への蓄積が 3 時間後にもほとんど見られなかった。Rapin らは PIA は脂溶性代謝産物であり IMP と似た体内挙動をとると報告している¹¹⁾。本研究の結果から正常脳の動態には IMP, PIA の脂溶性物質が大きく関与するが、水溶性代謝産物の関与はほとんど無視し得ると考えられる。肺では静注後早期、3 時間後とも正常脳に比較して PIA, PIB の集積比率が高いものの、IMP の分画が 75% 以上を占め、PIB の貯留は少なかった。PIA, PIB の集積比率が脳より多いのは、肺の血液含有量が多いためと考えられる。したがって肺の集積にも水溶性代謝産物の関与はほとんどないと考えられる。肝では静注後早期より代謝産物の蓄積が多いことが証明された。これが肝での代謝によるのか他の臓器での代謝産物の単なる貯留なのかは今後検討する必要がある。

ところで砂ネズミ (Mongolian gerbil) は一側総頸動脈結紮によって同側大脳半球の梗塞病変を約 30~60% の頻度で発生する¹³⁾。このことは後交通動脈、前交通動脈の形成不全に由来することが明かとなっており、脳梗塞のモデル動物として広く用いられている^{13~16)}。

この砂ネズミの正常脳と虚血脳との代謝産物の蓄積比の差からは、静注後 15 分には正常脳、虚血脳間に有意差は認められず、いずれも IMP が約 94% を占めていた。したがって、早期像は正常部位、虚血部位とも代謝産物の影響のない IMP 自体の分布を示しており、正確に脳血流分布に従っていると考えられた。静注 3 時間後にも IMP が正常側で 83.8%、虚血側で 80.0%、PIA が正常側で 13.0%、虚血側で 14.7% と両者で大部分を占めていた。PIB は虚血側で正常より増加していたが全分画の 5% 程度であり、再分布への関与はほとんど無視し得ると考えられた。このことから、急性期の虚血部位の再分布は IMP と PIA の動態に依存しているといえる。Matsuda らはラット中大脳動脈閉塞モデルのオートラジオグラフィによ

る再分布の検討を行っており、その中で急性期の虚血脳で認められる代謝産物は PIA のみであったと報告している¹⁷⁾。これは薄層クロマトグラフィによる検討であるが、今回の検討の結果と一致している。

しかし、この急性期には脳血液閑門はまだ破綻していない。脳血液閑門の破綻した亜急性期に、水溶性代謝産物である PIB が再分布に関与するか否かは興味ある問題である。ただ、PIB は血清に親和性が強いため脳内に分布しにくく、また PIB に対する脳内貯留機構の存在も不明である。しかし、luxury perfusion の状態においては、血流量の増加が PIB, PIA の脳内への集積に強く関与する可能性がある。つまり亜急性期の脳梗塞の delayed 画像で梗塞巣が正常組織より高集積を示すような症例において、PIA, PIB は強く関与しているのではないかと考えられる。これらの点について亜急性期から慢性期までのさまざまな病態のモデルを用いて今後さらに検討を加える必要がある。特に砂ネズミの一側総頸動脈閉塞は虚血モデルとしては再現性が低いため、より再現性の高いモデルにおいてオートラジオグラフィと組み合わせた検討が必要と考えられる。

V. 結 論

高速液体クロマトグラフィを用いて、砂ネズミでの IMP とその代謝産物の体内分布について検討した。本方法は定量性に優れ、実験的脳虚血モデルの代謝分析に応用可能と考えられた。

謝辞：稿を終えるに当たり、HPLC 分析にご協力いただいた日本医科大学中村俊彦氏に感謝いたします。また ¹²⁵I-IMP を提供いただいた日本メディフィジックス社に感謝致します。

文 献

- 1) Holman BL, Zimmerman RE, Schapiro JR, et al: Biodistribution and Dosimetry of N-Isopropyl-p-[¹²³I]Iodoamphetamine in the Primate. J Nucl Med 24: 922~931, 1983
- 2) Kuhl DE, Barrio JR, Huang SC, et al: Quantifying Local Cerebral Blood Flow by N-Isopropyl-p-

$^{[123]\text{I}}$ Iodoamphetamine (IMP) Tomography. *J Nucl Med* **23**: 196–203, 1982

3) Lassen NA, Henriksen L, Holm S, et al: Cerebral Blood-Flow Tomography: Xenon-133 Compared with Isopropyl-Amphetamine-iodine-123: Concise communication. *J Nucl Med* **24**: 17–21, 1983

4) 松田博史, 関 宏恭, 石田博子, 他: N-Isopropyl-p-[^{123}I]Iodoamphetamine とガンマカメラ回転型ECTによる局所脳血流測定. *核医学* **22**: 9–18, 1985

5) 棚田修二, 米倉義晴, 鳥塚莞爾, 他: N-Isopropyl-p-[^{123}I]Iodoamphetamine によるシングル・フォトン・エミッショントマトグラフィーにおける脳血管障害例におけるX線CTとの対比検討——. *脳卒中* **7**: 275–282, 1985

6) Baldwin RM, Wu JL, Lin TH, et al: Pharmacokinetics of N-Isopropyl-p-[^{123}I]Iodoamphetamine in humans. In: M.W. Billingham ed. *Current Concepts in Radiopharmacology*. Proceedings of 4th Int. Symp. Radiopharmacol. Sept 11–14, 1985

7) 犬上 篤, 相沢康夫, 三浦修一, 他: 脳血管障害の診断におけるN-Isopropyl-p-[^{123}I]Iodoamphetamineの有用性の評価——とくに脳血流量の定量的測定. *医学のあゆみ* **134**: 53–57, 1985

8) Matsumoto M, Hatakeyama T, Akai F, et al: Prediction of Stroke Before and After Unilateral Occlusion of the Common Carotid Artery in Gerbils. *Stroke* **19**: 490–497, 1988

9) Moretti JL, Cinotti L, Cesaro P, et al: Amines for brain tomosintigraphy. *Nucl Med Commun* **8**: 581–595, 1987

10) Creutzig H, Schober O, Gielow P, et al: Cerebral dynamics of N-Isopropyl-p-[^{123}I]Iodoamphetamine. *J Nucl Med* **27**: 178–183, 1986

11) Rapin JR, Poncin-Lafitte ML, Duterte D, et al: Iodoamphetamine as a New Tracer for Local Cerebral Blood Flow in the Rat: Comparison with Isopropylidoamphetamine. *J Cereb Blood Flow Metabol* **4**: 270–274, 1984

12) Tsukuda M, Kuwabara Y, Ichiya Y, et al: Evaluation of the significance of “redistribution” in ^{123}I -IMP SPECT in cerebrovascular disorders—a comparative study with PET. *Eur J Nucl Med* **15**: 746–749, 1989

13) 堀添 宏, 福田武美, 田村 晃: Mongolian gerbilの脳底部血管走行と脳梗塞——前大脳動脈の血管走行と梗塞巣との関連——. *脳神経* **33**: 825–831, 1981

14) 陣之内正史, 星 博昭, 渡辺克司, 他: 脳虚血モデルを用いたN-isopropyl-p-iodoamphetamineの脳内分布に関する実験的研究. *日本医学会誌* **48**: 352–366, 1988

15) Crockard A, Iannotti F, Hunstock AT, et al: Cerebral Blood Flow and Edema Following Carotid Occlusion in the Gerbil. *Stroke* **11**: 494–498, 1980

16) Matsumoto M, Kimura K, Fujisawa A, et al: Regional blood flows measured in Mongolian gerbil by a modified microsphere method. *Am J Physiol* **242**: H990–H995, 1982

17) Matsuda H, Tsuji S, Oba H, et al: Autoradiographic Analysis of Iodoamphetamine Redistribution in Experimental Brain Ischemia. *J Nucl Med* **31**: 660–667, 1990