薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
108 (3) 246-249 (1988)

¹²⁵I 標識 D- 及び L-*p*-Iodophenylglycine の調製とそれらの腫瘍集積性

五島廉輔,* 飯塚幸澄, 海野けい子, 岡田昌二, 為政 脩
静岡県立大学薬学部

Preparation of ¹²⁵I-Labeled D- and L-*p*-Iodophenylglycines and Their
Tumor Accumulation

RENSUKE GOTO,* YUKIZUMI IIZUKA, KEIKO UNNO,
SHOJI OKADA, and OSAMU TAMEMASA

School of Pharmaceutical Sciences, University of Shizuoka,
2-1, Oshika 2-chome, Shizuoka, 422, Japan

(Received September 9, 1987)

In order to develop a new tumor-detecting agent with D-amino acid as a parent compound, the preparation of ¹²⁵I labeled D- and L-iodophenylglycines and their distribution in Ehrlich solid tumor-bearing mice were investigated.

Each labeled compound was synthesized *via* the corresponding diazonium compound. The distribution pattern of the D-form was similar to that of the L-form.

Although the tumor uptake of D-form, as well as L-form, at 60 min after the injection was higher than other organs except kidney, stomach, duodenum and thyroid, its uptake ratio was insufficient for use as a tumor-imaging agent.

Keywords—D-*p*-iodophenylglycine-¹²⁵I; L-*p*-iodophenylglycine-¹²⁵I; tumor accumulation; tumor-detecting agent; radiopharmaceutical; Ehrlich solid tumor; tissue distribution

我々は種々の ¹⁴C 標識 D-アミノ酸がその相当する L 体より腫瘍組織に高い集積性を示すことを報告したが,¹⁾ これらの D-アミノ酸を腫瘍検出のための放射性医薬品として用いるためには適当な γ 線放出核種で標識しなければならない。アミノ酸標識核種として従来 ⁷⁵Se, ¹³¹I が主として用いられていたが、これらの核種の長半減期と高エネルギーによる被爆線量の問題から放射性医薬品標識用核種としての使用は減少してきた。現在最も理想的な核種はポジトロンエミッターである ¹¹C や ¹³N であり、これらによって標識されたアミノ酸による脾臓や腫瘍のイメージング剤への研究が報告されているが、その超短半減期のためにそれらの核種の供給には問題がある。またサイクロトロン普及に伴って ¹²³I が ¹³¹I に代って用いられるようになり、¹²³I 標識アミノ酸が脾臓イメージング剤²⁾ 又は腫瘍イメージング剤³⁾ として研究されてきた。

腫瘍集積性について研究されたヨード標識アミノ酸には iodophenylalanine⁴⁾ や iodomethyltyrosine⁵⁾ 等があるが、それらの D 体と L 体間のとりこみの比較については報告されていない。この報告ではアミノ酸として phenylglycine に着目し、放射性ヨード核種として ¹²⁵I を用いて、その D 体及び L 体の標識法と担癌動物体内分布を検討した。

実 験 の 部

実験材料

D-Phenylglycine methyl ester (D- α -aminophenylacetic acid methyl ester) と L-phenylglycine (L- α -aminophenylacetic acid) はそれぞれ東洋醸造(株)と日本化薬(株)より譲渡されたものを使用した。

¹²⁵I 標識ヨウ化ナトリウムは New England Nuclear (U.S.A.) より購入した。その他の試薬は市販品特級を使用した。ddY 雄マウスは静岡県実験動物農業協同組合より入手した。

実験方法

1. 非放射性 D- 及び L-*p*-Iodophenylglycine (D- 及び L- α -Amino-4-iodophenylacetic Acid) の合成 D 体は

Chart 1. Synthesis of *p*-Iodophenylglycine⁵⁾

TABLE I. Chemical Properties and Yield of L-Phenylglycine Derivatives

Compounds	mp (°C) ^{a)}	Specific optical rotation ([α] _D ²⁴) ^{a)}	Yield (%) ^{a)}
L-α-Acetamido-phenylacetic acid	187—189 (186—188)	218.5 [c=1% EtOH] (−217.9)	64.2 (72.0)
L-α-Acetamido-4-nitro-phenylacetic acid	180—183, dec. (180—182, dec.)	204.5 [c=5% EtOH] (−206.4)	47.6 (46.4)
L-α-Acetamido-4-amino-phenylacetic acid	198—202, dec. (207—209, dec.)	181.1 [c=0.5% 1 N HCl] (−182.2)	42.0 (32.0)
L-α-Acetamido-4-iodo-phenylacetic acid	210—212, dec. (217, dec.)	178.6 [c=0.5% 95% EtOH] (−173.2)	13.0 (—)
L-α-Amino-4-iodo-phenylacetic acid (L- <i>p</i> -iodophenylglycine)	201—202, dec. (204—205, dec.)	— [c=0.5% 1 N HCl] (−99.4)	3.7 (48.3)

a) Numbers in parentheses show the values of the corresponding D-form reported by Holdrege.⁵⁾

Holdrege の方法⁵⁾に従って D-phenylglycine を出発原料として合成した (Chart 1). D-Phenylglycine は D-phenylglycine methyl ester 15 g と NaOH 8 g を 70% エタノールに溶かし, 3 時間還流後生じた結晶を濾取, 乾燥後, H₂O より再結晶して得た (収率: 93%).

L 体も D 体と同様にして L-phenylglycine から合成した. 各段階の生成物の融点, 旋光度, 収率を Table I に示した. L-*p*-Iodophenylglycine (C₈H₈NO₂I): Anal. Calcd C, 34.68; H, 2.91; N, 5.06, Found C, 34.92; H, 2.87; N, 4.97.

2. ¹²⁵I 標識 D- 及び L-*p*-Iodophenylglycine (¹²⁵I 標識 D- 及び L-α-Amino-4-iodophenylacetic Acid) の合成
1 で合成した D- 又は L-α-acetamido-4-aminophenylacetic acid 100 mg を trifluoroacetic acid 2 ml に加え, 反応温度を −5—0°C に保ちながら溶解させた. これに微粉末にした NaNO₂ 40 mg を徐々に加え, 30 分間攪拌した. その後反応温度を 0—5°C に上げて Na¹²⁵I 1 mCi を加え, 更に NaI 90 mg をゆっくり加えた. 反応温度を 30°C に上げ 30 分間攪拌後更に 90—100°C で 90 分間加熱還流した. Trifluoroacetic acid を留去・乾燥後, H₂O 2 ml を加えた後再び乾固し, 残渣を少量のエタノールに溶解した.

標識化合物の精製はこの溶液をシリカゲル薄層プレート (Merck 5553, 20×20 cm) に塗布し, 1 N 酢酸飽和ブタノールで展開後, 非放射性 D- 又は L-α-acetamido-4-iodophenylacetic acid 相当部 (*R_f* 値: 0.7, でんぶん反応呈色) のシリカゲルをかきとり, エタノールで 3 回抽出し, 溶媒を留去した. これに 2 N HCl 2 ml, ジオキサン 10 ml を加えて 2 時間還流下脱アセチル化を行った. 溶媒を一度留去した後再び 2 N HCl 0.5 ml に溶解した. この溶液を前記と同様に薄層クロマトプレートに塗布し, 同溶媒で展開後, 非放射性 D- 及び L-α-amino-4-iodophenylacetic acid 相当部 (*R_f* 値: 0.58, ニンヒドリン呈色) をかきとり, 1 N HCl で抽出して, 目的の ¹²⁵I 標識 D- 及び L-体を得た. 比放射能はニンヒドリン反応により iodophenylglycine を定量して算出した. また放射化学的収率は薄層クロマトプレートにスポットし, 1 N 酢酸飽和 *n*-ブタノールで展開後, 薄層クロマトスキャナ (アロカ製) により測定した. 収量: D 体; 14.9 μCi (比放射能; 2.77 mCi/mmol), L 体; 11.2 μCi (比放射能; 2.70 mCi/

mmol). 放射化学的純度はいずれも 95% 以上であった。

3. *In Vivo* 実験 3-1. Ehrlich 固形癌をもったマウスの作製——Ehrlich 腹水癌細胞浮遊液 (1×10^8 個/ml 生理食塩水) 0.2 ml を ddY 雄マウスの大腿部に皮下注射し 8 日後に使用した。

3-2. 体内分布の測定——1 群 5 匹の担癌マウスに ^{125}I 標識 D- 又は L-*p*-iodophenylglycine ($1.5 \mu\text{Ci/ml}$, 2.70 mCi/mmol) 0.2 ml を尾静脈より投与し, 30 分及び 60 分後にエーテル麻酔下採血後, 腫瘍組織及び各種臓器を摘出した。湿重量測定後, ウェルタイプシンチレーションカウンター (Beckman 5500) で放射活性を測定した。

結 果 と 考 察

1. D- 及び L-*p*-Iodophenylglycine の合成

^{125}I 標識体合成の出発原料となる D- 及び L- α -acetamido-4-aminophenylacetic acid までの合成において, D 体の各段階の生成物はいずれも文献記載値⁵⁾ と同程度の収率を示し, L 体もほぼ同様な収率で得られた。更に標識体の確認に用いるために非放射性 NaI を用いて, それぞれ相当する α -acetamido-4-iodophenylglycine と *p*-iodophenylglycine を合成した。D 体の生成物はそれぞれ文献値とほぼ同じ収率, 融点, 旋光度, 元素分析値を示したが, L 体の場合, 最終生成物の収率が低く旋光度の測定はできなかったが, 融点, 元素分析値が一致したので同定の標準物質として使用した。

2. ^{125}I 標識 D- 及び L-*p*-Iodophenylglycine の合成

Na ^{125}I を用いての標識体の合成は非放射性の場合と比べて微量で反応を行うために, 再結晶法による精製は困難であり, 薄層クロマトグラフィーによって精製を行った。各々の放射化学的収率は低かった (D 体: 1.48%, L 体: 1.12%)。

加藤ら⁴⁾ 及び Counsel ら⁶⁾ は放射性ヨード標識 iodophenylalanine の調製を同位体交換法を用いて行っている。iodophenylglycine も同様の方法で検討したが, 収率は本法より低かった。

3. *In Vivo* 実験

Ehrlich 固形癌をもったマウスの腫瘍組織及び各臓器への ^{125}I 標識 D- 及び L-*p*-iodophenylglycine のとりこみを Table II に示した。

D- 及び L-アミノ酸のとりこみ (% dose/g) には立体異性による差はほとんど認められなかった。これは ^{14}C 標識 D-アミノ酸がその相当する L 体より数倍高く腫瘍にとりこまれた結果とは異なっていた。¹⁾ また, アミノ酸

TABLE II. Distribution of ^{125}I -Labeled D- and L-*p*-Iodophenylglycine in Ehrlich Solid Tumor-Bearing Mice at 30 and 60 min after Injection

Tissue ^{b)}	% dose/g wet tissue ^{a)}			
	^{125}I -D- <i>p</i> -Iodophenylglycine		^{125}I -L- <i>p</i> -Iodophenylglycine	
	30 min	60 min	30 min	60 min
Tumor	0.91 ± 0.09	1.07 ± 0.33	1.01 ± 0.16	1.20 ± 0.18
Brain	0.07 ± 0.03 ^{c)}	0.09 ± 0.02 ^{c)}	0.05 ± 0.02 ^{c)}	0.10 ± 0.01 ^{c)}
Pancreas	0.50 ± 0.08 ^{c)}	0.64 ± 0.17 ^{d)}	0.26 ± 0.04 ^{c)}	0.60 ± 0.14 ^{c)}
Liver	0.60 ± 0.07 ^{c)}	0.84 ± 0.29	0.50 ± 0.03 ^{c)}	0.98 ± 0.18
Spleen	0.33 ± 0.05 ^{c)}	0.52 ± 0.10 ^{d)}	0.21 ± 0.02 ^{c)}	0.50 ± 0.20 ^{c)}
Kidney	8.45 ± 5.27 ^{d)}	6.99 ± 4.66 ^{d)}	7.03 ± 4.66 ^{d)}	5.21 ± 3.84 ^{d)}
Stomach	0.58 ± 0.12 ^{d)}	4.43 ± 1.21 ^{c)}	2.97 ± 0.72 ^{c)}	9.37 ± 2.50 ^{c)}
Duodenum	0.93 ± 0.18	1.64 ± 0.72	1.07 ± 0.52	1.56 ± 0.43
Muscle	0.53 ± 0.05 ^{c)}	0.52 ± 0.27 ^{d)}	0.48 ± 0.08 ^{c)}	0.40 ± 0.02 ^{c)}
Lung	0.54 ± 0.07 ^{c)}	0.85 ± 0.17	0.38 ± 0.05 ^{c)}	1.06 ± 0.16
Heart	0.50 ± 0.06 ^{c)}	0.60 ± 0.12 ^{d)}	0.27 ± 0.03 ^{c)}	0.57 ± 0.06 ^{c)}
Testis	0.36 ± 0.05 ^{c)}	0.49 ± 0.05 ^{d)}	0.35 ± 0.05 ^{c)}	0.47 ± 0.18 ^{c)}
Blood	0.88 ± 0.20	1.23 ± 0.26	0.58 ± 0.10 ^{c)}	1.12 ± 0.15

a) Normalized to body weight of 25 g. b) Although the data on thyroid were not shown because the tissue weight was not determined, the values were much higher than 10% dose/g wet tissue.

Significant difference from tumor c) $p < 0.01$, d) $p < 0.05$.

のとりこみが盛んである脾臓においてこれら iodo-phenylglycine のとりこみは低く、投与 1 時間後でも脾/肝比は 1 以下であった。Vaalburg ら⁷⁾は ¹¹C 標識 DL-phenylglycine の脾臓へのとりこみの % dose/g は ¹¹C 標識 phenylalanine のそれより低い、脾/肝比は 7.0 と phenylalanine の 5.2 より高いことを報告している。これらの結果は D- 及び L-phenylglycine がヨード化されることによってそれらのアミノ酸としての性質が大きく変化したことを示唆した。

D 体及び L 体の腫瘍集積性について他の臓器とのとりこみ比を Table III に示した。60 分後のとりこみ比は両アミノ酸とも腎臓、胃、十二指腸を除いて 1 より大きかった。これらの値は現在腫瘍イメージング剤として最も多く用いられている ⁶⁷Ga-citrate の投与 3, 24 時間後のそれら⁸⁾と比較すると腫瘍/肝比 (3 h: 0.5, 24 h: 0.3) は高かったが、腫瘍/腎比 (3 h: 1.2, 24 h: 0.5)、腫瘍/筋肉比 (3 h: 3.9, 24 h: 6.8) は低かった。

短時間での腎臓への高い集積性はこれら ¹²⁵I 標識 p-iodophenylglycine の放射活性の速い排泄を示唆した。また甲状腺への高いとりこみはこれらアミノ酸からのヨードイオンの遊離、つまり標識体の不安定性をも示した。以上の結果から p-iodophenylglycine の場合には、その D 体の腫瘍イメージング剤への利用は期待できないと考えられた。

TABLE III. Tumor to Tissue Ratios of ¹²⁵I-Labeled D- and L-p-Iodophenylglycine at 30 and 60 min after Injection

	¹²⁵ I-D-p-Iodo-phenylglycine		¹²⁵ I-L-p-Iodo-phenylglycine	
	30 min	60 min	30 min	60 min
Tu/Br	13.0	11.9	20.2	12.0
Tu/Pa	1.8	1.7	3.9	2.0
Tu/Li	1.5	1.3	2.0	1.2
Tu/Sp	2.8	2.1	4.8	2.4
Tu/Ki	0.1	0.2	0.1	0.2
Tu/St	1.6	0.2	0.3	0.1
Tu/Du	1.0	0.7	0.9	0.8
Tu/Mu	1.8	2.1	2.1	3.0
Tu/Lu	1.7	1.3	2.7	1.1
Tu/He	1.8	1.8	3.7	2.1
Tu/Te	2.5	2.2	2.9	2.6

Tu, tumor; Br, brain; Pa, pancreas; Li, liver; Sp, spleen; Ki, kidney; St, stomach; Du, duodenum; Mu, muscle; Lu, lung; He, heart; Te, testis.

引用文献

- 1) O. Tamemasa, R. Goto, T. Suzuki, *Gann*, **69**, 517 (1978); O. Tamemasa, R. Goto, A. Takeda, K. Maruo, *Gann*, **73**, 147 (1982); A. Takeda, R. Goto, O. Tamemasa, J. E. Chaney, G. A. Digenis, *Radioisotopes*, **33**, 213 (1984).
- 2) R. M. Lambrecht, H. Atkins, H. Elias, J. S. Fowler, S. S. Lin, A. P. Wolf, *J. Nucl. Med.*, **15**, 863 (1974); U. Tisljar, G. Kloster, F. Ritzl, G. Stocklin, *J. Nucl. Med.*, **20**, 973 (1979).
- 3) H. Bockslaff, G. Kloster, G. Stocklin, N. Safi, H. Bornemann, *Nucl.-Med.*, (Suppl.), **17**, 179 (1980); H. Bockslaff, M. Spitznas, I. Hahn, G. Kloster, *Albrecht von Graefes Arch. Klin. Ophthalmol.*, **217**, 255 (1981).
- 4) 加藤貞武, 倉田邦夫, 杉沢慶彦, 分林孝夫, 薬誌, **90**, 1499 (1970).
- 5) C. T. Holdrege, U. S. Patent 3479339 (1969) [*Chem. Abstr.*, **72**, 55442n (1970)].
- 6) R. E. Counsell, T. D. Smith, W. Digulio, W. H. Beierwaltes, *J. Pharm. Sci.*, **57**, 1958 (1968).
- 7) W. Vaalburg, H. D. Beerling-van der Molen, M. G. Woldring, *Nucl.-Med.*, **14**, 60 (1975).
- 8) 伊東和夫, 小林 真, 久田欣一, 利波紀久, 安東 醇, *Radioisotopes*, **26**, 296 (1977).