

Z00400268 A

厚生労働科学研究費補助金

基礎研究成果の臨床応用推進研究事業

蛋白コンフォメーションのイン ビボ画像診断

平成17年度 総括研究報告書

主任研究者 工藤 幸司

平成18年（2006年） 4月

目 次

I. 総括研究報告

蛋白コンフォメーションのイン ビボ 画像診断-----	1
工藤 幸司（東北大学先進医工学研究機構）	

II. 分担研究報告

1. 臨床応用を目的とした ^[11C] BF-227注射液の開発-----	7
古本祥三（東北大学先進医工学研究機構）	
2. ^[11C] BF-227を用いた脳内アミロイド蓄積の非侵襲的PET計測 — アルツハイマー病患者を対象とした探索的臨床試験 — -----	13
岡村信行（東北大学医学系研究科）	
3. ^[11C] BF-227を用いたプリオン病における脳内アミロイド蓄積の 非侵襲的PET計測および ^[18F] 標識プリオン イメージング プロ ーブ開発のための基礎試験 -----	23
堂浦 克美（東北大学医学系研究科）	
4. ^[18F] 標識アミロイド イメージングプローブ開発のための F化化合物の最適化-----	29
工藤 幸司（東北大学先進医工学研究機構）	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	37
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	39
-----------------------	----

総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
平成 17 年度 総括 研究報告書

蛋白コンフォメーションのイン ビボ画像診断

主任研究者 工藤幸司 東北大学先進医工学研究機構
高度情報通信分野・教授

研究要旨：平成 17 年度（3 年計画の 1 年目）の研究計画は、1) 主任研究者らによって開発されたコンフォメーション変化（ β シート構造）蛋白を認識するプローブ [^{11}C]BF-227 のヒトにおける探索的臨床試験を実施すること、2) [^{11}C]標識プローブに比しより臨床有用性の高い [^{11}C]標識プローブを開発するための F 化合物の最適化を行うことであった。1) については [^{11}C]BF-227 注射液を開発し、各種薬理試験を実施した結果、 [^{11}C]BF-227 はアルツハイマー病（AD）の主たる病理像、すなわち老人斑に結合親和性が高く、また PET 用プローブとしてヒトへ投与可能な安全性を備えていることが確かめられた。ヒト探索的臨床試験実施のために東北大 3 委員会へ申請し、承認されたことから平成 17 年 7 月から [^{11}C]BF-227 を用いた探索的臨床試験を開始した。これまでに 8 名の健常者、9 名の AD 患者において PET 検査を実施した結果、健常者と AD 患者間に [^{11}C]BF-227 集積に明らかな差が見られ、また [^{11}C]BF-227 の AD 患者脳における集積は老人斑好発部位に認められたことから、プローブ [^{11}C]BF-227 の AD 診断における高い有用性が示唆された。プリオン病患者を用いた試験については平成 17 年度中に各種手続きを終了し、平成 18 年度初頭より探索的臨床試験を開始する予定。2) については約 750 化合物をスクリーニングし、それを基に F 化合物を合成し各種試験に供した。F 化合物および [^{18}F]標識体はアミロイドイメージング用プローブとして求められる特性を有していた。

分担研究者

谷内一彦	東北大学大学院 医学系研究科 機能薬理学分野・教授
荒井啓行	東北大学大学院 医学系研究科 先進漢方治療医学・教授
堂浦克美	東北大学大学院 医学系研究科 創生応用医学研究センター プリオン蛋白分子解析分野・教授
岡村信行	東北大学大学院 医学系研究科 機能薬理学分野・助手
古本祥三	東北大学先進医工学研究機構 高度情報通信分野・助手

A. 研究目的

アルツハイマー病（AD）は患者を取り巻く家族または臨床家が、この疾病特有の臨床症状に気づいたときには、その病理像はすでに取り返しのつ

かない状態まで進展していることが知られている。すなわち、現状の AD 診断を癌のそれに例えるなら、末期状態に達した時点でしか検出されていないことになる。近年、AD の一部前駆状態と

考えられている軽度認知機能障害 (MCI; Mild Cognitive Impairment) に相当する Very Mild AD という極めて早期の症例であっても、その剖検例ではすでに多数の老人斑・神経原線維変化が出現し、病理学的にはすでに立派な AD 状態であることが明らかにされていることから、AD は物忘れ症状が発現するかなり以前からその病理像がスタートしていることになる。つまり AD の病理像と臨床像との間には極めて大きな乖離が存在していることになる (Pathological AD と Clinical AD との乖離)。AD 患者の特有の脳内病理像、すなわち老人斑は、アミロイド β 蛋白 ($A\beta$) が凝集して不溶化し、 β シート構造と呼ばれる立体構造を形成して細胞外に沈着したものである。したがって、老人斑の脳内蓄積量を生体で非侵襲的に計測できれば、上記疾患の早期診断法、さらには新しい薬効評価系として活用できると考えられる。

この脳内老人斑の非侵襲的脳内計測法こそ、主任研究者らが永年研究し、且つ本研究課題でもあるアミロイドイメージングと呼ばれる新しい診断技術である。それではアミロイド イメージングとはいかなるストラテジイに基づく技術であるかについて解説すると、概念は以下の通りである。

1. AD の病理学的主徴のひとつ、老人斑のほとんどは β シート構造をとった $A\beta$ によって形成されている。
2. 同シート構造をとった $A\beta$ に特異的選択的に結合し、かつ容易に血液-脳関門を透過する低分子有機化合物を見いだす。
3. この化合物を PET で扱うことが可能な核種で標識する。
4. これをプローブとして生体に静脈内投与する。
5. プローブは血液-脳関門を越えて脳内の老人斑を形成している $A\beta$ に結合する。一定時間後には非結合プローブは洗い流され、 $A\beta$ に結合に結合したプローブのみが脳内に残る。
6. これを PET を用い、イメージング画像として取り込み、 β シート構造をとった脳内 $A\beta$ (=老人斑) 蓄積量の定量およびその空間的分布から AD を診断する。

日本には約 2500 万人 (平成 17 年度厚生労働白書)、先進国には約 1 億 8500 万人の 65 歳以上人口が存在する (国連 World Population Prospects. <http://esa.un.org/unpp/> より引用)。

本研究課題によって開発される診断法は AD 発症に 10 年以上先行する病理像を追跡することか

ら、原理的に AD の発症前ないしは早期診断を可能とする。我々の診断法と近年開発されつつあるワクチン、 β および γ セクレターゼ阻害剤等の根本治療法とを組み合わせることにより、診断時点で発症前でさえあれば、少なくとも前述した日本における 2500 万人、先進国における 1 億 8500 万人の大半が AD に罹患せずに人生をおくれる時代を到来させることができる。結果として医療経済学的節約効果および社会への貢献、各国民の保健・医療・福祉の向上等に対する福音は多大なものになるであろう。

主任研究者らは老人斑の脳内蓄積を検出する画像診断用プローブを開発する目的で、2500 個以上の化合物について、老人斑の主成分である $A\beta$ との結合親和性および脳血液関門透過性に関するスクリーニングをこれまでに実施した。その結果、benzoxazole 誘導体が、 $A\beta$ 蛋白に対する高い結合親和性を示し、同時に脳血液関門透過性を有することを見出し、複数の標識薬剤候補化合物の中から、プローブ特性に優れた [^{11}C]標識 BF-227 を $A\beta$ イメージング用プローブとして選定した。

従って平成 17 年度はまず [^{11}C]BF-227 のヒトにおける探索的臨床試験の実施を本研究課題の第 1 の目的とした。

BF-227は [^{11}C]標識プローブとして開発されたが、 [^{11}C]標識プローブと [^{18}F]標識プローブでは、半減期の長い後者のプローブの方が圧倒的に臨床での有用性が高いことが知られている (半減期; [^{11}C]: 20分、 [^{18}F]: 109.7分)。さらに [^{11}C]標識プローブでは短い半減期のゆえに、PET装置近傍に設置されたサイクロトロン-化合物合成装置で標識合成し供給することが求められるが、 [^{18}F]標識プローブでは工場的施設で合成し、それを各PET施設へ運搬することも可能であり、事実 [^{18}F]FDG供給では一部この方式がとられている。現時点における有用性が高いことが報告されている [^{11}C]PIB、 [^{11}C]SB-13 そして [^{11}C]BF-227等のアミロイド イメージングプローブは [^{11}C]標識プローブであるが、この診断法を今後広く世に普及されるためには、優れた [^{11}C]標識プローブを開発する必要がある。

そこで [^{18}F]標識プローブを開発するためのF化合物の最適化度アップを本年度の第2の目的とした。

B. 研究方法

1. [^{11}C]BF-227 を用いたヒトにおける探索的臨床試

験

I. [¹¹C]BF-227 を用いた AD における探索的臨床試験

古本らは [¹¹C]BF-227 の標識方法および同注射液を開発し、同注射液の安全性評価、 [¹¹C]BF-227 の健常マウスにおける脳移行性および AD 脳切片上の老人斑への結合性をオートラジオグラフィで評価した。

岡村らは [¹¹C]BF-227 を用いた AD における探索的臨床試験を中心に、トランスジェニック マウスにおける有用性の検証、Aβ との結合親和性等を検討し、外部委託した毒性試験結果を報告した。

II. [¹¹C]BF-227 を用いたプリオン病における探索的臨床試験

堂浦らはプリオン病における探索的臨床試験実施のために、各種資料を添えて東北大学倫理委員会へ申請した。

2. [¹⁸F]標識アミロイド イメージングプローブ開発のための F 化合物の最適化

I. アルツハイマー病診断用 [¹⁸F]標識プローブの開発

工藤らは以下の手順で実験を行った。

- 1) 市販および化合物供給商社からの化合物の購入
- 2) 各種薬理試験の実施
- 3) 2) または 5) ~9) のデータを基に新規 F 化合物のドラッグデザイン
- 4) F 化合物の合成 (外注)
- 5) F 化合物の凝集アミロイドβ 蛋白 (Aβ) に対する結合性 (イン ビトロ)
- 6) F 最適化化合物の AD 患者脳における染色性の検討
- 7) F 最適化化合物の血液-脳関門透過性検討 (イン ビボ)
- 8) 選ばれたヒット F 化合物の急性毒性検討 (マウス、静脈内投与)
- 9) ヒット化合物の Aβ 蛋白脳内蓄積動物での検討 (イン ビボ)
- 10) 3) ~9) を繰り返し、11) へ進捗させる化合物を決定する。
- 11) [¹⁸F] 標識化合物合成用の前駆体合成 (外注)
- 12) [¹⁸F] 標識プローブの手動合成法の開発
- 13) [¹⁸F] 標識プローブの Aβ 蓄積 Tg マウスにおけるオートラジオグラフィ撮影
- 14) [¹⁸F] 標識プローブの血液-脳関門透過性検討

II. プリオン病診断用 [¹⁸F]標識プローブの開発

堂浦らは以下の手順で実験を行った。

- 1) F 化合物の異常型プリオン蛋白との結合性
ヒトプリオン病 (ゲルストマン・ストライヤー・シャインカー病、弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病、硬膜移植に基づく医原性クロイツフェルト・ヤコブ病) 脳病理標本を F 化合物溶解液で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。いずれも連続切片において免疫染色を行い、特異性を検討した。
- 2) F 化合物の異常型プリオン蛋白産生阻害作用
プリオン病モデル培養細胞を継代する際の培養上清中に、化合物を種々の濃度で加えた。コンフルエントとなった細胞を回収し、蛋白質分解酵素抵抗性の異常型プリオン蛋白産生量をウエスタンブロット法により検討し、抗プリオン蛋白産生阻害効果を観察した。

(倫理面への配慮)

AD およびプリオン病患者脳標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する、また臨床試験においてはヘルシンキ宣言を基準として倫理面に十分配慮するとともに、東北大学医学部倫理委員会、同薬剤研究委員会、同臨床研究委員会の承認を得た上で実施する。動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針 (S 63.3.24) に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。放射性同位元素を取り扱う試験においては東北大学放射線障害予防規定 (H14.6.18) を遵守し、被曝および汚染の防護に努める。

C. 研究結果

1. [¹¹C]BF-227 を用いたヒトにおける探索的臨床試験

I. [¹¹C]BF-227 を用いた AD における探索的臨床試験

[¹¹C]BF-227 の標識方法および同注射液を開発し、各種薬理試験を実施した結果、 [¹¹C]BF-227 は脳移行および脳からのクリアランスに優れるとともに、AD の主たる病理像、すなわち老人斑に結合親和性が高く、また PET 用プローブとしてヒトへ投与可能な安全性を備えていることが確かめられた。ヒト探索的臨床試験実施のために毒性試験等の各種資料を揃えて東北大 3 委員会 (東北大学放射性薬剤品質管理委員会、放射性核種を用いる臨床研究委員会および東北大学医学部医学部倫理委員会) へ申請し、承認されたことから平成 17 年 7 月から東北大学サイクロトロン・RI センターにおいて

[¹¹C]BF-227 を用いた探索的臨床試験を開始した。これまでに 8 名の健常者、9 名の AD 患者において PET 検査を実施した結果、健常者と AD 患者間に [¹¹C]BF-227 集積に明らかな差が見られ、また [¹¹C]BF-227 の AD 患者脳における集積は老人斑好発部位に認められたことから、プローブ [¹¹C]BF-227 の AD 診断における高い有用性が示唆された。

II. [¹¹C]BF-227 を用いたプリオン病における探索的臨床試験

プリオン病患者を用いた試験については平成 17 年度中に各種手続きを終了した。探索的臨床試験は平成 18 年度初頭より開始される予定。

2. [¹⁸F]標識アミロイド イメージングプローブ開発のための F 化合物の最適化

I. アルツハイマー病診断用 [¹⁸F]標識プローブの開発

平成 18 年 3 月 28 日までに約 750 化合物をスクリーニングし、その結果を基に 8 個の新規 F 化合物を合成し、各種薬理試験に供した。代表的 F 化合物 THK-5B5 および THK-7B7 は A β に親和性が高く、AD 患者脳切片において A β ないしは老人斑を認識し、静脈内投与された両化合物は Tg マウスにおいて選択的に脳アミロイド班に結合し、静脈内投与された両 [¹⁸F]標識体はマウスにおいて脳移行性・脳からのクリアランスに優れていた。

II. プリオン病診断用 [¹⁸F]標識プローブの開発

東北大 (THK) シリーズ化合物溶解液による染色では、ヒトプリオン病脳標本における異常プリオン蛋白沈着が高い感度で検出された。多くの化合物が GSS 脳標本の小脳皮質分子層を中心とした異常プリオン蛋白の斑状沈着に一致した蛍光シグナルを描出した。

特に THK5B5 溶解液によって、弧発性クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳における斑状シグナルや硬膜移植に基づく医原性クロイツフェルト・ヤコブ病患者脳標本における粗大顆粒状シグナルが鮮やかに描出された。

検討した THK シリーズ化合物 2 種について、in vitro で異常型プリオン蛋白の産生阻害効果を認めた。50% の阻害を生じるのに必要な濃度 (IC50) はナノモルオーダーであった。細胞毒性は 10 μ M まで認められなかった。

D. 考察

平成 17 年度 (3 年計画の 1 年目) の研究計画は、1) 主任研究者らによって開発された β シート構造を有する蛋白を認識するプローブ [¹¹C]BF-227 のヒト

における探索的臨床試験を実施すること、2) [¹¹C]標識プローブに比し より臨床有用性の高い [¹¹C]標識プローブを開発するための F 化合物の最適化を行うことであった。

1) については平成 17 年 7 月から [¹¹C]BF-227 を用いた探索的臨床試験を開始した。これまでに 8 名の健常者、9 名の AD 患者において PET 検査を実施した結果、健常者と AD 患者間に [¹¹C]BF-227 集積に明らかな差が見られ、また [¹¹C]BF-227 の AD 患者脳における集積は老人斑好発部位に認められたことから、プローブ [¹¹C]BF-227 の AD 診断における高い有用性が示唆された。プリオン病患者を用いた試験については平成 17 年度中に各種手続きを終了し、平成 18 年度初頭より探索的臨床試験を開始する予定。

2) については約 750 化合物をスクリーニングし、そのデータを基に 8 個の F 化合物を合成し各種試験を実施した。F 化合物は A β に親和性が高く、AD 患者脳切片において A β ないしは老人斑を認識し、静脈内投与された F 化合物は Tg マウスにおいて選択的に脳アミロイド班に結合し、静脈内投与された [¹⁸F]標識体はマウスにおいて脳移行性・脳からのクリアランスに優れていた。

AD のアミロイド β 蛋白に結合性の高い化合物は、プリオン病の異常型プリオン蛋白の蓄積像のうち、斑状および粗大顆粒状シグナルシグナルに結合すること および異常型プリオン蛋白の産生阻害効果を示すことが確かめられた。

今後更なる F 化合物の最適化を実施する予定。

E. 結論

1. [¹¹C]BF-227 を用いた探索的臨床試験し、プローブ [¹¹C]BF-227 の AD 診断における高い有用性が示唆された。プリオン病における探索的臨床試験は平成 18 年度初頭より実施する予定。

2. より臨床有用性の高い [¹⁸F]標識アミロイドイメージングプローブ開発のために、約 750 化合物をスクリーニングし、それを基に F 化合物を合成し各種試験に供した。F 化合物および [¹⁸F]標識体はアミロイドイメージング用プローブとして求められる特性を有していた。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Tashiro M, Maruyama M, Suemoto T, Akatsu H,

- Yamamoto T, Sawada T, Iwata R, Yanai K, Arai H: BF-227, a novel PET imaging agent for in vivo detection of amyloid plaque in Alzheimer's disease. *J Neurosci.* (submitted)
2. Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y: Quinoline and Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes for In Vivo Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *J Neurosci.* 25: 10857-10862, 2005.
 3. Maruyama M, Ishizawa K, Tomita N, Nemoto M, Yasuda H, Ebihara S, Ohru T, Seki T, Iwasaki K, Okamura N, Higuchi M, Yoshida H, Kudo Y, Arai H, Sasaki H: Lithium therapy and cerebrospinal fluid biomarker levels in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int.* 5:298-300.2005
 4. Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T and Kudo Y. Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* (2005) 25: 10857- 10862
 5. Maruyama M, Ishizawa K, Tomita N, Nemoto M, Yasuda Y, Ebihara, Ohru T, Seki T, Iwasaki K, Okamura N, Higuchi M, Yoshida H, Kudo Y, Arai H, Sasaki H. Lithium therapy and cerebrospinal fluid biomarker levels in Alzheimer's disease. *Geriatr Gerontol Int* (2005) 5: 298-300
 6. 工藤幸司: アルツハイマー病診断用プローブ. *日本薬理学会雑誌.* (2005) 126:199-205
 7. 工藤幸司: アルツハイマー病の画像診断の進歩: 老年医学 Update2005-2006(2005) PP45-55. 編集日本老年医学会雑誌編集委員会、メディカルビュー社、東京
 8. Kawatake S, Nishimura Y, Sakaguchi S, Iwaki T, Doh-ura K: Surface plasmon resonance analysis for the screening of anti-prion compounds. *Biol Pharm Bull.* (in press), 2006
 9. Rainov NG, Whittle IR, Doh-ura K: Treatment options in patients with prion disease-the role of long term cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate. In: Prions-Food and Drug Safety. (ed. Kitamoto T) Springer pp.41-66, 2005
 10. Todd NV, Morrow J, Doh-ura K, Dealler S, O'Hare S, Farling P, Duddy M, Rainov NG: Cerebroventricular infusion of pentosan polysulphate in human variant Creutzfeldt-Jakob disease. *J Infect Dis.* 50(5):394-396, 2005
 11. Tsuboi Y, Baba Y, Doh-ura K, Imamura A, Fujioka S, Yamada T: Diffusion-weighted MRI in familial Creutzfeldt-Jacob disease with the codon 200 mutation in the prion protein gene. *J Neurol Sci.* 232:45-49, 2005
 12. Sasaki K, Doh-Ura K, Wakisaka Y, Tomoda H, Iwaki T: Fatal familial insomnia with an unusual prion protein deposition pattern: an autopsy report with an experimental transmission study. *Neuropathol Appl Neurobiol.* Feb;31(1):80-87, 2005
 13. 逆瀬川裕二、堂浦克美: プリオン病の治療法の現状。 *医学のあゆみ* 215(11):901-905, 2005
 14. 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美: プリオン病の治療—ペントサンポリサルフェート脳室内持続投与—。 *神経内科*63 (5) : 441-445, 2005
 15. 坪井義夫、山田達夫、堂浦克美: プリオン病の治療—経口キナクリン療法とペントサン硫酸の脳室内持続投与方法の現状。 *Brain Medical.* 17(3):259-264, 2005
 16. 石川謙介、堂浦克美: プリオンイメージングの試み。 *臨床神経科学* 24(3):313-316, 2006

2.学会発表

1. Okamura N., S. Furumoto, M. Maruyama, M. Tashiro, Y. Funaki, M. Kato, M. Nemoto, H. Akatsu, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Itoh, R. Iwata, H. Arai, K. Yanai, Y. Kudo. Development of novel PET tracer for in vivo detection of amyloid plaques. The 7th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Disease, 2005年3月9日-13日 (Sorrento, Italy)
2. S. Furumoto, N. Okamura, Y. Ishikawa, M. Tashiro, M. Kato, Y. Funaki, M. Maruyama, H. Akatsu, T. Suemoto, T. Yamamoto, H. Arai, T. Sawada, R. Iwata, K. Yanai, Y. Kudo; "[¹¹C]BF227: A New ¹¹C-Labeled 2-Ethenylbenzoxazole Derivative for Amyloid-β Plaques Imaging" Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Istanbul (Turkey), October 15-19, 2005.
3. Takai Y., Kaneta T., Hakamatsuka T., Nemoto K., Yamada S., Iwata R., Funaki Y., Furumoto S., Nakata E., Kudo Y. Tujitani N., "[¹⁸F]FRP-170: Novel Hypoxia Maker for PET: Animal Data Analysis, and Evaluation in Normal Volunteers and Initial Clinical Experience", American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 47th Annual Meeting held in Denver, Colorado, October 16-20, 2005.
4. Okamura N., S. Furumoto, M. Maruyama, M.

- Tashiro, Y. Funaki, M. Kato, M. Nemoto, H. Akatsu, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Itoh, R. Iwata, H. Arai, K. Yanai, Y. Kudo, "In vivo imaging amyloid plaques in the brain using BF-227", Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, Washington
5. 堂浦克美：プリオン病治療法の開発。第7回生命化学研究会シンポジウム、仙台、2005年1月21日
 6. 逆瀬川裕二、渡辺光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：リコンビナントプリオン蛋白質を用いた蛋白質unfolding因子の探索。2005年プリオン研究会、天童、2005年8月26、27日
 7. 坪井義夫、堂浦克美、山田達夫：CJDの新しい治療法の試み『ペントサンプリサルフェート脳室内持続投与。2005年プリオン研究会、天童、2005年8月26、27日
 8. 照屋健太、堂浦克美：GPIアンカー型プリオン蛋白質アナログの調製。2005年プリオン研究会、天童、2005年8月26、27日
 9. Ishikawa K, Kudo Y, Nishida N, Suemoto T, Sawada T, Iwaki T, Doh-ura K: Amyloid imaging probes for detection of prion plaques and treatment of prion diseases. 2005 Japan-America Frontiers of Engineering Symposium, Hitachi Global Storage Technologies, San Jose, CA, November 3-5, 2005
 10. 逆瀬川裕二、渡邊光太、八谷如美、堂浦克美、金子清俊：The ATP-bound form of Hsp90 can

unfold recombinant prion protein. 日本分子生物学会第28回年会大阪、2005年12月7日-10日

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特願2006-047064・アミロイドβ蛋白質が蓄積する疾患の画像診断プローブ、平成18年2月23日、東北大学、工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、谷内一彦
2. 特願2005-371821・コンフォメーション病の診断用プローブ、平成17年12月26日、東北大学、工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美
3. 特願2005-347818・コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物、平成17年12月1日、東北大学、工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美
4. 特願2005-322230・アミロイド蓄積性疾患の新規診断用装置およびその操作方法、平成17年1月7日、東北大学、工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩
5. 特願2005-51999・プリオン病発症予防剤とそれを含む食品添加剤及び飼料添加剤、平成17年2月25日、東北大学、堂浦克美
6. 特願 2005-293011・哺乳動物組織材料の前処理方法、平成17年10月5日、東北大学、堂浦克美、岡周作、弘田量二、角田正也：

分 担 研 究 報 告

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
平成 17 年度 分担研究報告書

臨床利用を目的とした ^{11}C BF-227 注射液の開発

分担研究者	古本祥三	東北大学先進医工学研究機構 高度情報通信分野・助手
研究協力者	岩田 鍊	東北大学サイクロトロン・R I センター 核薬学部・教授
分担研究者	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・助手
主任研究者	工藤幸司	東北大学先進医工学研究機構 高度情報通信分野・助手

研究要旨：

本研究では、老人斑画像化を目的とした臨床で利用可能な ^{11}C BF-227 注射液の開発を行った。 ^{11}C メチル基による BF227 標識化反応の条件最適化を行い、独自に開発した標識合成装置を使うことによって、効率よく安定的に ^{11}C BF-227 を標識合成することが可能になった。また、毒性および被曝の観点からも安全である無菌状態の注射液を調製することができた。 ^{11}C BF-227 注射液を使って、マウス投与実験による脳移行性の検討を行ったところ、投与直後脳内へ速やかな移行が確認され、さらにその後脳内から排泄され、60 分後で 10 %以下にまで減少し、老人斑画像化薬剤として優れた薬物動態性を示した。また、 ^{11}C BF-227 は、AD 脳組織切片中の老人斑に選択的に結合することが確認された。以上から、老人斑画像化薬剤として利用可能な安全性の高い ^{11}C BF-227 注射液を確立できたといえる。

A：研究目的

アルツハイマー病の治療薬であるコリンステラーゼ阻害薬の登場に伴い、認知症の早期診断の重要性が強く認識されるようになった。しかしながら現在の認知症の臨床診断プロセスでは、臨床症状が顕在化した患者を診断することはできても、認知機能障害が顕著にみられない早期の症例を診断する精度は十分とはいえず、病初期の患者を高精度かつ非侵襲的に検出できる診断法の開発が求められている。過去の神経病理学的研究によると、アルツハイマー病

に特徴的な脳病理所見である老人斑の蓄積は、臨床症状の出現よりも数十年先行すると考えられている。したがって、生体において老人斑を可視化できれば、従来の診断法よりも早期段階で高精度にアルツハイマー病を診断できるようになる。また、アルツハイマー病に特有の病理変化を検出するため、他の非アルツハイマー型痴呆との鑑別診断にも有用と考えられる。

このような背景にあって、アルツハイマー病の重要な病理所見である老人斑を PET により画像化することを目的として、 $\text{A}\beta_{1-40}$ および

$\text{A}\beta_{1-42}$ の凝集体に対して強い結合性を示す低分子化合物の BF-227 が、当研究課題の主任研究者である工藤らによって開発された。本研究では、PET で BF-227 を利用するために必要となる炭素 11 標識体(^{11}C]BF227)の標識合成法および臨床で使用可能な注射液の調製法を確立することを目的とした。また、実際に合成した ^{11}C]BF227 を用いて、基礎実験により老人斑画像化薬剤としての有用性(薬物動態性、特異性など)を検討した。

B : 研究方法

B-1. ^{11}C]BF227 の標識合成

^{11}C]BF227 の標識部位は、ジメチルアミノ基のメチル基を ^{11}C]CH₃ で標識することにした。従って、BF227 のモノ脱メチル体を標識前駆体として、 ^{11}C]CH₃OTf を用いてメチル化反応により標識することにした(図 1)。BF227 は難溶性の化合物であることから、溶解性の高い DMSO を標識反応溶媒とした。実際の標識合成は以下の手順で行った(図 2)。

サイクロトロン HM12(住友重機械社製)で加速した 12MeV の陽子ビームを N₂ ガス(0.5% O₂ ガス含有)に 30 分間照射して ^{11}C]CO₂ を合成した。続いて MicroLab ヨウ化メチル合成システム(GE 社製)を用いて ^{11}C]CO₂ から ^{11}C]CH₃I を合成し、加熱した AgOTf 充填カラム(約 190°C)に通すことで ^{11}C]CH₃I を ^{11}C]CH₃OTf に変換した。そして、標識前駆体(約 1mg)を DMSO(450 μ L)に溶解し、2M NaOH 水溶液(7 μ L)を添加した溶液中に、室温条件下、 ^{11}C]CH₃OTf を含有したヘリウムガスを流し込むことで炭素 11 標識メチル化反応を行った。この反応溶液に 5% AcOH(エタノール溶液、150 μ L)を加えてよく攪拌し、その混合液をセミ分取 HPLC(カラム: YMC-Pack Pro C18 RS(10 \times 250 mm)+ガードカラム(10 \times 30 mm)、移動相: EtOH/MeCN/20mM NaH₂PO₄ =15/40/45、流速: 6.0mL/min)にかけて、約 9-10 分に溶出する ^{11}C]BF227 由来の放射性ピークを分取した。この ^{11}C]BF227 含有フラクションから、以下の手順に従って、注射液の調製を行った。

B-2. ^{11}C]BF227 注射液の調製と安全性評価

^{11}C]BF227 含有フラクションを蒸留水(約 30mL)で希釈して Sep-Pak tC18 カートリッジ(Waters 社製)にロードし、蒸留水でカートリッジを洗浄後、EtOH で ^{11}C]BF227 を溶出した。この EtOH 溶出液に 25% アスコルビン酸水溶液および 5% ポリソルベート 80 エタノール溶液を適量加えて 80°C で加熱しながらロータリーエバポレーターで溶媒を留去し、得られた ^{11}C]BF227

含有放射性残渣を生理食塩液に溶解して 0.22 μ m フィルターに通し濾過滅菌した。臨床で使用する薬剤については、滅菌済みバイアルに封入した。調製した標識薬剤については、東北大学サイクロトロン RI センターで通常行われている標識薬剤(注射液)の無菌試験(嫌気性、好気性)及び発熱性試験により安全性を評価した。

B-3. ^{11}C]BF227 の脳移行性(健常マウス)

ICR マウス(雄、28-32g)に ^{11}C]BF227 注射液(0.2mL、1.1-6.3MBq)を尾静脈内投与し、一定時間後(2、10、30、60、90 分後)に脳、血液を採取し、組織重量と放射能を計測して単位組織重量あたりの放射能集積率(%ID/g)を算出して脳移行性を評価した。(*%ID/g=(組織放射能/組織重量)/投与放射能 \times 100)

B-4. ^{11}C]BF227 の AD 脳老人斑への結合性評価

AD と確定診断された患者脳組織切片を ^{11}C]BF227 生理食塩液(1.2MBq/mL)に 20 分間浸した後、水、50% EtOH、水の順に洗浄し、乾燥させた。この切片上の放射能分布は、BAS-5000(Fuji Film)を用いて解析した。また、放射能減衰後、老人斑の存在を確認するために同一切片を Tf-S (チオフラビン-S)で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

C : 研究結果

C-1. ^{11}C]BF227 標識合成結果

室温、DMSO 中でメチル化を行ったところ、非常に効率よくメチル化反応が進行した。分取 HPLC のクロマトグラムから求めた反応収率は 50-75%であった。分取 HPLC 直後の ^{11}C]BF227 の放射化学的純度(分取フラクション中)は、99%以上であった。よって、化学的見地からは、先に記した標識合成方法および精製方法は十分に実用性のある方法であることが確認された。

C-2. ^{11}C]BF227 注射液の調製結果と安全性

^{11}C]BF227 は脂溶性の化合物であることから、注射液の調製にあたっては、溶解補助剤として日本薬局方に掲載されているポリソルベート 80 を添加した。溶解率は、ポリソルベート 80 の濃度が 0.1%で 90%以上の値となり十分な結果であったが、濾過滅菌用のシリンジフィルターに通過させた際、フィルターに吸着を起こすことが明らかになった。そこでポリソルベート 80 の濃度を 1%にしたところ、放射能から算出した薬剤の濾過率は約 90%となった。また、薬液調製のプロセスでエバポレーターにより濃縮・蒸発乾固操作を行うが、その際放射線分解が起き、放射化学的純度が低下することが判明

したため、安定化剤としてアスコルビン酸を添加することにした。

最終的に調製された注射液の放射化学的純度は95%以上、比放射能は100-210 GBq/ μ molとなり、また、無菌試験および発熱性試験で陰性となり、臨床で使用する上で問題のない事が確認された。

C-3. [11 C]BF227 の脳移行性

脳内の老人斑をPETで画像化するためには、標識薬剤が速やかに脳内へ移行し、PET撮像時間内に、非結合薬剤が脳外へ排泄されることが必要である。 [11 C]BF227 がこのような脳移行性を有しているかを健常マウスで評価した。投与2分後では、標識薬剤の脳集積率は7.9%ID/gという非常に良好な値となり、脳内への移行性に優れていることが確認された。さらに、投与後10、30、60分にかけて脳集積率は、3.7、1.4、0.64%ID/gと速やかな減少を示したことから、 [11 C]BF227 の脳内からの排泄性は優れていることが明らかになった。

C-4. [11 C]BF227 のAD脳老人斑への結合性評価

AD脳組織切片上の放射能分布を画像的に評価したところ、白質領域と比較して灰白質に相当する領域には相対的に高い放射能集積が確認できた(図3)。さらに、所々ホットスポット状に放射能の集積が観察された。この切片をTf-Sで染色したところ、放射能集積の高い領域に、同様なパターンで老人斑が密に分布していることが明らかになった。ホットスポットの確認された領域には、各ホットスポットに対応する位置に輪郭のくっきりした老人斑が確認された。また、その切片上ではTf-Sで神経原線維変化が密に分布する領域が確認されたが、対応する領域では白質領域と同等の放射能集積しか認められなかった。

D: 考察

標識合成法および注射液の安全性に関して

PET用の標識薬剤を開発する上で重要な点は、(1)再現性良く安定的・効率的に標識化合物を合成できること、および、(2)その標識化合物を含む薬剤(注射液)が十分に安全であること、である。

本研究で確立した [11 C]BF227 の標識合成法については、東北大学サイクロトロンRIセンターの既存の装置と独自に開発した標識合成装置を組み合わせて使うことで、半自動的に合成が行えるようになり、標識合成の再現性、安定性に関しては、十分な実用性がある。

一方、安全性については、 [11 C]BF227 注射液に

は、極少量の非標識体BF227が含まれるため、ヒトに投与した場合の安全性を確保するために、ラットの最大耐容量1 mg/kgを基準に、安全係数を1万、ヒトの体重を60 kgとして、ヒトに単回投与できる非放射性担体量を6 μ g (18 nmol)以下と定めた。この安全性基準以下では、単回投与による急性毒性に関しては全く問題ないと考えられる。変異原性については、最大量となる6 μ gを投与した場合において、分布容積を42 L(0.7 L/kg x 60 kg)とすれば、非放射性担体の生体内濃度は 0.142×10^{-9} g/mLとなり、変異原性試験(Ames test)で有意な変異が認められた最小濃度 0.0145×10^{-3} mg/mLの10万分の1以下となる。さらに、BF227は、FDDNPおよびPIBよりも変異原性比活性が小さいことから、本注射液の変異原性に対する安全性に問題はないと考えられる。

被曝に関しては、一回に投与できる最大放射線量は720 MBq (20 mCi)とし、この投与量以下では、全身の実効線量は1.82 ~ 1.84 mSv以下となり、「東北大学にける新規PET薬剤の臨床開発の指針(平成16年7月)」で定められている内部基準(最大10 mSv/5年で、1年に5 mSvを超えない)をみたし、安全性に問題はない。

老人斑画像化薬剤としての有用性について

基礎実験の結果から、投与2分後の脳集積率は 7.9 ± 1.3 %ID/gと高く、脳イメージング用放射性薬剤として十分な脳移行性を有していた。さらに投与後時間の経過とともに脳内の [11 C]BF-227 は速やかに排泄され、脳集積率は投与後60分でピークの10%以下まで低下していることから、投与後のクリアランスも [11 C]標識薬剤として実用的なレベルにあり、脂溶性薬剤にしばしばみられる大脳白質への非特異的集積は少ないと推定された。また、AD脳組織切片のオートラジオグラフィから、 [11 C]BF-227 は病理組織中の老人斑に結合するが、神経原線維変化にはほとんど結合しないことが明らかになり、老人斑を選択的に画像化するPET用標識薬剤として十分に利用できるものと考えられる。

E: 結論

本研究により、 [11 C]BF227 を臨床で利用するために必要な標識合成方法・システムを確立し、その注射液の安全性についても問題のないことを確認した。そして基礎実験により、 [11 C]BF227 の老人斑画像化標識薬剤として有用性に優れていることが明らかになった。

F. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. M. Suzuki, K. Yamaguchi, G. Honda, R. Iwata, S. Furumoto, M. Jeong, H. Fukuda and M. Itoh, "An experimental study on O-[¹⁸F]fluoromethyl-L-tyrosine for differentiation between tumor and inflammatory tissues.", *Annals of Nuclear Medicine* 19: 589-595, 2005.
2. Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y., "Quinoline and Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes for In Vivo Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease.", *The Journal of Neuroscience* 25: 10857-10862, 2005.
3. Ishikawa, Y., R. Iwata, S. Furumoto, C. Pascali, A. Bogni, K. Kubota, K. Ishiwata, "Simple automated preparation of [¹¹C]O-methyl-L-tyrosine for routine clinical use.", *Applied Radiation & Isotopes* 63: 55-61, 2005.
4. Ishikawa, Y., R. Iwata, S. Furumoto, Y. Takai, "Automated preparation of hypoxic cell marker [¹⁸F]FRP-170 by on-column hydrolysis.", *Applied Radiation & Isotopes* 62: 705-710, 2005.
5. 丸山将浩、富田尚希、根本都、藤原博典、関隆志、岩崎鋼、岡村信行、古本祥三、工藤幸司、荒井啓行、佐々木英忠、"MCI の概念とアルツハイマー病"、*神経研究の進歩*: 49, 401-409, 2005.
6. 石川洋一、船木善仁、岩田隼、古本祥三、仲田栄子、工藤幸司、金田朋洋、袴塚崇、高井良尋、山田章吾、"低酸素細胞の PET 画像化を目的とする [¹⁸F]FRP-170 注射液の開発", *核医学*: 42, 1-10, 2005.
7. Kazunori T., H. Nakamura, S. Furumoto, K. Yamamoto, H. Fukuda, A. Matsumura, Y. Yamamoto, "Synthesis and in vivo biodistribution of BPA-Gd-DTPA complex as a potential MRI contrast carrier for neutron capture therapy.", *Bioorganic Medicinal Chemistry*, 13: 735-743, 2005.

2. 学会発表

1. S. Furumoto, N. Okamura, Y. Ishikawa, M. Tashiro, M. Kato, Y. Funaki, M. Maruyama, H. Akatsu, T. Suemoto, T. Yamamoto, H. Arai, T. Sawada, R. Iwata, K. Yanai, Y. Kudo; "[¹¹C]BF227: A New ¹¹C-Labeled 2-Ethenylbenzoxazole Derivative for Amyloid- β Plaques Imaging" Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Istanbul (Turkey), October 15-19, 2005.
2. G. Yamaura, T. Yoshioka, H. Fukuda, K.

Yamaguchi, M. Suzuki, S. Furumoto, R. Iwata, C. Ishioka, "O-[¹⁸F]Fluoromethyl-L-Tyrosine as a powerful tracer for monitoring tumor response to the chemotherapy, compared with deoxyglucose and thymidine in vivo." Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Istanbul (Turkey), October 15-19, 2005. Takai Y., Kaneta T., Hakamatsuka T., Nemoto K., Yamada S., Iwata R., Funaki Y., Furumoto S., Nakata E., Kudo Y. Tujitani N., "[¹⁸F]FRP-170: Novel Hypoxia Maker for PET: Animal Data Analysis, and Evaluation in Normal Volunteers and Initial Clinical Experience", American Society for Therapeutic Radiology and Oncology, 47th Annual Meeting held in Denver, Colorado, October 16-20, 2005.

3. Kaneta, T., Y. Takai, T. Hakamatsuka, E. Nakata, S. Furumoto, R. Iwata, M. Ito, H. Fukuda, M. Tsujitani, S. Takahashi, S. Yamada., "Preliminary Results of Clinical PET Studies Using a New Hypoxia Maker, 18F-FRP-170", Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine, Istanbul (Turkey), October 15-19, 2005.
4. Okamura N., S. Furumoto, M. Maruyama, M. Tashiro, Y. Funaki, M. Kato, M. Nemoto, H. Akatsu, T. Yamamoto, T. Sawada, M. Itoh, R. Iwata, H. Arai, K. Yanai, Y. Kudo, "In vivo imaging amyloid plaques in the brain using BF-227", Society for Neuroscience, 35th Annual Meeting, Washington, DC, November 12-16, 2005.

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、谷内一彦：アミロイド β 蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブ、特願 2006-047064、平成 18 年 2 月 23 日。
2. 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病の診断用プローブ、特願 2005-371821、平成 17 年 12 月 26 日。
3. 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美：コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物、特願 2005-347818、平成 17 年 12 月 1 日。
4. 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩：アミロイド蓄積性疾患の新規診断用装置およびその操作方法、特願 2005-322230、平成 17 年 11 月 7 日。

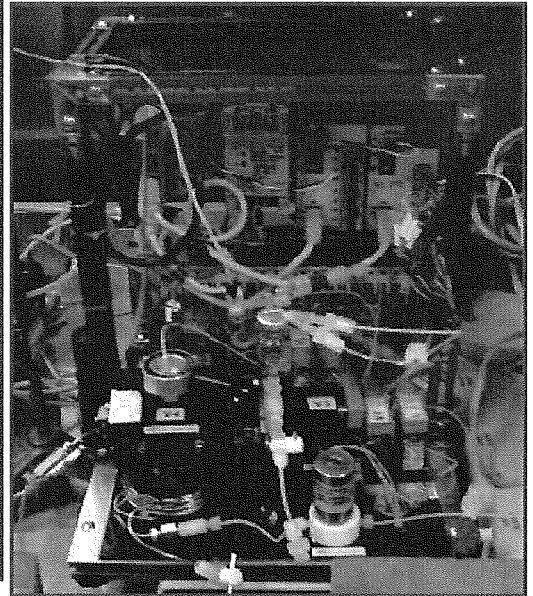
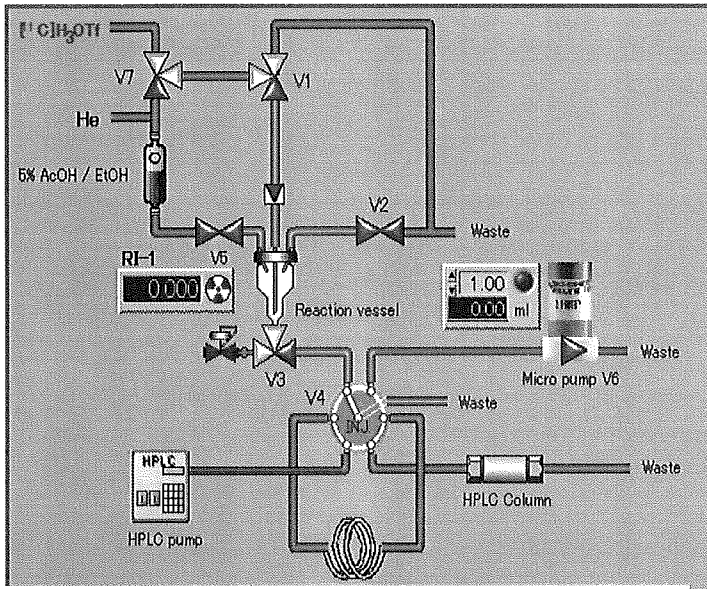
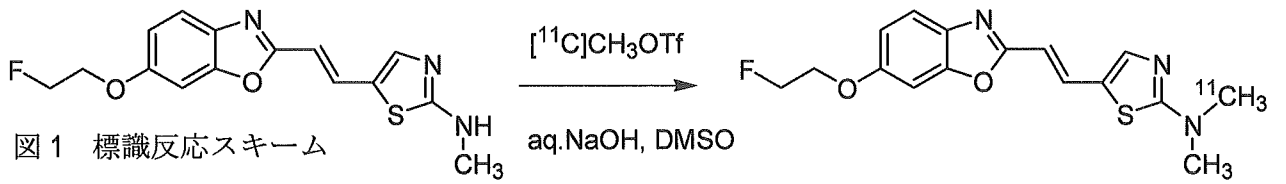


図2 標識反応装置周辺の流路概略図と写真

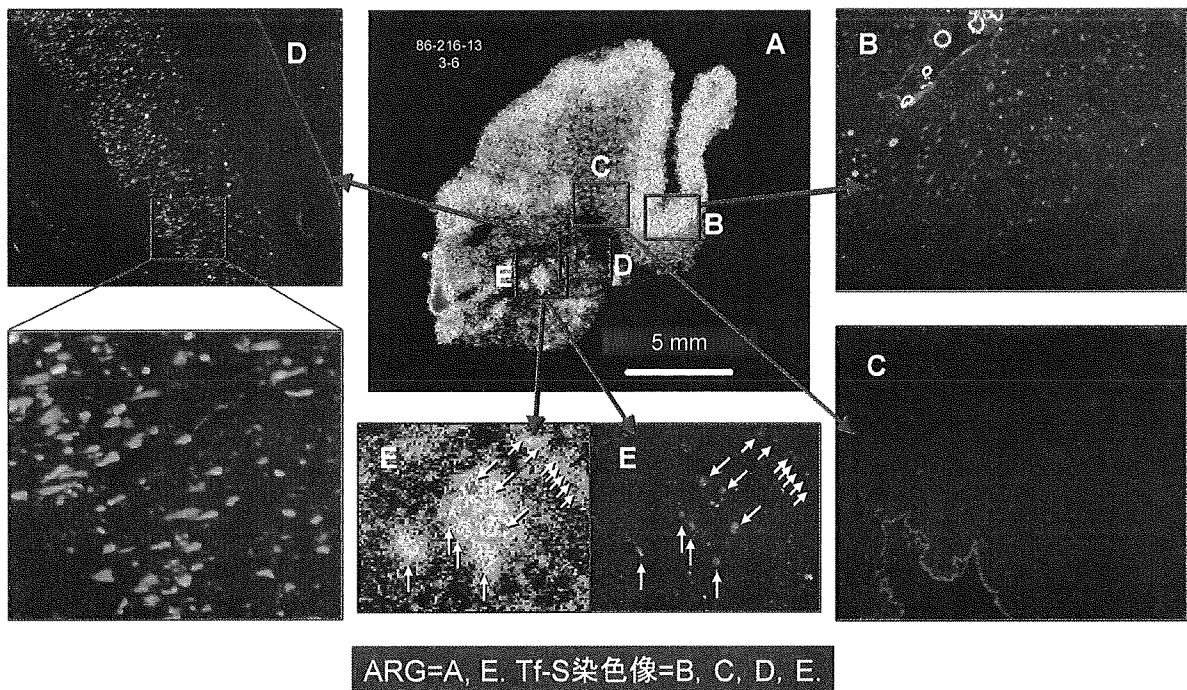


図3 AD脳病理組織切片のオートラジオグラフィ
 Tf-S: チオフラビン-S

厚生労働科学研究費補助金（基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
平成 17 年度 分担研究報告書

[¹¹C]BF-227 を用いた脳内アミロイド蓄積の非侵襲的 PET 計測
— アルツハイマー病患者を対象とした探索的臨床試験 —

分担研究者	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・助手
分担研究者	谷内一彦	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・教授
分担研究者	古本祥三	東北大学先進医工学研究機構 高度情報通信分野・助手
分担研究者	荒井啓行	東北大学大学院医学系研究科 先進漢方治療医学・教授
研究協力者	岩田 錬	東北大学サイクロトロン・R I センター・核薬学部・教授
研究協力者	伊藤正敏	東北大学サイクロトロン・R I センター・核医学部・教授
研究協力者	丸山将浩	東北大学病院 老年科・医員 (現・放射線医学総合研究所)
主任研究者	工藤幸司	東北大学先進医工学研究機構 高度情報通信分野・教授

研究要旨：脳内に蓄積した老人斑を生体画像化するためのプローブとして、ベンズオキサゾール誘導体である BF-227 を開発した。本プローブはアミロイドβ 蛋白に対する結合親和性が高く、脳血液関門透過性にも優れ、また PET トレーサーとして投与可能な安全性を備えていた。この BF-227 の ¹¹C 標識体を用いて、平成 17 年 7 月から健常高齢者およびアルツハイマー病患者を対象とした探索的臨床試験を開始した。アルツハイマー病患者では老人斑の好発部位である大脳皮質領域において [¹¹C]BF-227 の集積を認め、健常高齢者とは異なる画像所見を示した。またダイナミック撮像データを用いて定量解析を実施した結果、アルツハイマー病患者では、側頭葉外側部を中心とする大脳皮質において BF-227 の分布容積が有意に上昇していた。以上の所見から、 [¹¹C]BF-227 がアルツハイマー病の脳病理像を生体画像化する PET プローブとしてアルツハイマー病診断に有用であることを確認した。

A. 研究目的

認知症の最大の原因疾患であるアルツハイマー病 (AD) の患者数は、我が国では約 110 万人、米国では約 500 万人と推定され、その早期診断・治療法および予防法の確立は全世界的な課題である。現在、画像あるいは血液・脳脊髄液を用いたいかなる診断法によっても、発症前段階で孤発性 AD 患者を診断することはできない。しかしながら認知機能低下が顕在化するかなり前から、AD ではアミロイドβ 蛋白 (Aβ) およびタウの凝集物である老人斑 (アミロイド斑)・神経原線維変化が脳内に蓄積するといわれている。もしこのような病理像を生体で検出することができれば、AD の発症前診断が可能となるはずである。

現在開発中の AD 治療薬の多くは、脳内への Aβ 沈着を抑止することを創薬のターゲットとしている。このような治療薬を用いて AD の予防的治療介入を図るには、治療対象者の適切な選択のために脳内の Aβ 沈着の有無を確認し、不可逆的な神経細胞脱落が始まる前に AD を早期診断する必要が生ずる。また治療開始後の薬効評価を確実なものとするためには、Aβ 蓄積量を経時的にモニタリングできることが望ましい。だが今のところ脳内 Aβ 蓄積量を生体で確実に計測する手段は存在せず、臨床症状の変化を治療評価の唯一の指標として頼らざるを得ない。このような精度の高い薬効評価系の不足は、新規 AD 治療薬の実用化を困難にしている要因の一つと考えられる。

AD 患者の脳内に蓄積する老人斑は、Aβ が凝集して不溶化し、β シート構造と呼ばれる立体構造を形成して細胞外に沈着したものである。したがって、老人斑の脳内蓄積量を生体で非侵襲的に計測できれば、上記疾患の早期診断法、さらには新しい薬効評価系として活用できると考えられる。その戦略は、1) Aβ に特異的に結合し、脳血液関門透過性の高い低分子化合物をポジトロン放出核種で標識し、患者に静脈内投与する、2) 標識化合物が脳内の不溶性蛋白に結合する、3) ポジトロン CT (PET) を利用して不溶性蛋白の蓄積量およびその空間分布を計測する、というものである。

主任研究者らは老人斑の脳内蓄積を検出する画像診断用プローブを開発する目的で、2500 種類以上の化合物について、老人斑の主成分である Aβ との結合親和性および脳血液関門透過性に関するスクリーニングをこれまでに実施

した。その結果、benzoxazole 誘導体が、Aβ 蛋白に対する高い結合親和性を示し、同時に脳血液関門透過性を有することを見出した。本年度において、我々は複数の標識薬剤候補化合物の中から、プローブ特性に優れた BF-227 を Aβ イメージング用プローブとして選定し、その有用性を評価するための基礎評価および探索的臨床試験を実施した。

B. 研究方法

1. BF-227 の Aβ との結合親和性評価

BF-227 の Aβ との結合親和性を評価する目的で、2-(4-Methylamino)styryl-5-benzoxazole の ¹²⁵I 標識体 (¹²⁵I]BF-180) を放射性リガンドとして、37°C で 40 時間インキュベートして作成した合成 Aβ 線維との結合飽和試験をまず行った。続いて BF-227 の ¹²⁵I]BF-180 との結合阻害試験から、Aβ に対する BF-227 の結合阻害定数 (K_i) を算出した

2. AD 脳病理標本における結合性の検証

BF-227 は蛍光を有する化合物であり、Aβ 線維と結合することによりその蛍光強度が増強する特性を有する。そこで BF-227 が AD 患者の脳内に蓄積した老人斑と選択的に結合するかどうかを検証する目的で、AD 患者脳病理切片における染色性を蛍光顕微鏡により評価した。厚さ 6 μm の脳切片に BF-227 溶液 (100 μM) を滴下し、10 分間反応させた後の脳標本を励起波長 (400-440 nm)、蛍光波長 (470 nm~) で観察した。また連続切片において 6F/3D を一次抗体に用いて Aβ 免疫染色を行った。

3. 脳血液関門透過性の評価

¹¹C]BF-227 の脳移行性を評価する目的で、1.1 ~ 6.3 MBq の ¹¹C]BF-227 を正常マウスに静注後 2 分、10 分、30 分、60 分後の脳組織濃度を、組織 1g 当たりの投与量に対する集積率 (%ID/g) で算出した。

4. AD 動物モデルにおける有用性の検証

BF-227 が生体内の Aβ と *in vivo* で結合するかどうかを検証するため、脳内にアミロイド斑が自然沈着する PS1/APP^{sw} トランスジェニックマウスを用いて静脈内投与実験を行った。32 週齢のトランスジェニックマウスおよび野生型マウスの尾静脈より BF-227 溶液 4 mg/kg を静注投与し、その 2 時間後に脳を摘出し、蛍光顕微鏡で脳切片を観察した。

5. 安全性評価

BF-227 の安全性評価として、雌雄マウス、雌雄ラットに対する静脈内単回投与毒性試験、雌雄マウス、雌雄ラットに対する静脈内投与による 2 週間反復投与毒性試験、雄性マウスに対する安全性薬理試験を行った（三菱化学安全科学研究所への委託試験）。

6. PET を用いたヒト探索的臨床試験

東北大学医学部倫理委員会での承認後、健康人 8 名（うち若年者 3 名、高齢者 5 名）と AD 患者 9 名（平均 MMSE スコア 20 点）を対象として探索的臨床試験を実施した。PET スキャナーには、東北大学サイクロトロン RI センターに設置されている SET-2400W（島津製）を 3D モードで使用した。 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 5-10 mCi 静注投与直後から 90 分間のダイナミックスキャンを実施した。脳組織における $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 集積量を投与量および体重で標準化した SUV (standardized uptake value) 値を算出し、その画像を作成した。同時に加温した動脈化静脈からの連続採血を行い、代謝物の補正を加えた上で入力関数とした。前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、前部帯状回、後部帯状回、線条体、視床、小脳、白質の各領域に関心領域 (ROI) を設定し、その放射活性を計測した。また Logan のグラフ解析法により、小脳皮質を参照領域として、分布容積比 (Distribution Volume Ratio (DVR)) を算出した。

(倫理面への配慮)

マウスやラットを用いた動物実験は、東北大学における動物実験に関する指針に従い、十分な愛護的配慮をもって実施した。また放射性同位元素を取り扱う実験においては、東北大学放射線障害予防規定を遵守し、被曝及び汚染の防護に努めた。臨床研究は、ヘルシンキ宣言を遵守して倫理面には最大限の配慮を行い、倫理委員会、薬剤委員会の承認を経て実施した。東北大学では「東北大学における新規 PET 薬剤の臨床開発の指針」という内部基準を作成して新規標識リガンドによる探索的 PET 臨床研究を行っている。東北大学における審査体制は以下の 3 委員会構成されている。

- 1) 放射性薬剤品質管理委員会（委員長：後藤順一薬剤部長、PET 関連委員会）
- 2) 放射性核種を用いる臨床研究委員会（委員長：菅村和夫医学系研究科長）
- 3) 東北大学医学部医学部倫理委員会（委員長：小林俊光教授）

C. 研究結果

1. A β との結合親和性の評価

$[^{125}\text{I}]\text{BF-180}$ との結合阻害試験から、BF-227 の A β に対する結合阻害定数を算出した結果、Ki 値は 1.8 ± 0.42 nM (A β 1-40)、 4.3 ± 1.5 nM (A β 1-42) であった。これまでに報告した benzoxazole 誘導体とほぼ同様の値であり、BF-227 が A β に対する優れた結合親和性を有することが確認された。

2. AD 脳病理切片における結合性の検証

AD 患者脳標本を用いた染色の結果、BF-227 と老人斑との結合を示す明瞭な蛍光像が観察された。この蛍光像は連続切片における A β 免疫染色とほぼ一致した染色像を示した（図 1）。A β 線維量の多い老人斑の core 領域に特に強い結合を示すほか、AD の病初期段階から蓄積するびまん性老人斑との結合像もわずかながら確認された。一方、老人斑の非蓄積部位では、いかなる蛍光像も観察されなかった。

3. 脳血液関門透過性の評価

$[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 投与 2 分後の脳集積率は 7.9 ± 1.3 %ID/g と高く、脳イメージング用放射性薬剤として十分な脳移行性を有していた。さらに投与 10、30、60 分後の集積率は、それぞれ 3.7 ± 0.37 %ID/g、 1.4 ± 0.36 %ID/g、 0.64 ± 0.15 %ID/g であった（図 2）。 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の脳集積率は、投与後 60 分でピークの 10%以下まで低下しており、正常脳組織からの優れたクリアランスを示した。これまでに我々が開発した BF-168 と比較しても、BF-227 はより優れた脳移行性、クリアランスを示していた。

4. AD 動物モデルにおける有用性の検証

BF-227 溶液 4 mg/kg を静注投与し、その 2 時間後に脳を摘出し、その脳切片を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、トランスジェニックマウスの脳切片では、大脳皮質領域に多数の明瞭な蛍光像が観察され、その蛍光像は A β 免疫染色の分布と一致していた（図 3）。一方、老人斑の蓄積しない野生型マウスではいかなる蛍光像も観察されなかった。

5. 安全性評価

BF-227 の単回投与毒性試験では、マウス、ラットの最大耐容量はそれぞれ 10 mg/kg、1 mg/kg となった。2 週間反復静脈内投与試験では、ラット、マウス共に無毒性量は 25 μ g/kg 以上と判断された。また、マウスによる安全性薬理試験では、25 μ g/kg までの静脈内投与において、

一般症状、自発行動量に対する作用は認められなかった。また被曝量に関しては、一回に投与できる最大放射エネルギーは 720 MBq (20 mCi) とし、この投与量以下では、全身の実効線量は 1.82~1.84 mSv 以下となり、「東北大学にける新規 PET 薬剤の臨床開発の指針(平成 16 年 7 月)」で定められている内部基準(最大 10 mSv/5 年で、1 年に 5 mSv を超えない)を満たしていた。

6. PET を用いたヒト探索的臨床試験

先に述べた学内における 3 委員会の承認を経て、平成 17 年 7 月から東北大学サイクロトロン RI センターにおいて [¹¹C]BF-227 を用いた探索的臨床試験を開始した。これまでに 8 名の健常者、9 名の AD 患者において [¹¹C]BF-227 を用いた PET 検査を実施している。 [¹¹C]BF-227 の脳血液関門透過性はヒトにおいても良好であり、静脈内投与直後から [¹¹C]BF-227 は速やかに脳内に移行した。健常者の SUV 画像を投与直後から後半まで順に観察すると、視床、脳幹部、白質領域において若干のクリアランス遅延を認めるものの、大脳皮質からは速やかに [¹¹C]BF-227 が排出された。健常若年者と健常高齢者の SUV 画像を比較したところ、加齢に伴う集積分布の明らかな変化は見出されなかった (図 4)。次に健常高齢者と AD 患者の SUV 画像を比較すると、投与直後の段階では健常者と AD 患者の間に明らかな集積分布の違いは見出されないものの、投与後 30 分以降の画像では側頭葉を中心とする大脳皮質領域で [¹¹C]BF-227 の集積が AD 患者で観察された (図 5)。各脳領域における時間一放射能曲線を健常高齢者と AD 患者で比較した (図 6)。前頭葉、側頭葉、頭頂葉などの老人斑の好発部位では健常高齢者に比べて AD 患者でクリアランスの遅延がみられたが、小脳、視床、白質などの老人斑非蓄積部位では両群間に差を認めなかった。このことから本プローブが老人斑に特異的に結合していることが示唆される。最後に Logan のグラフ解析法により DVR 画像を作成した結果、健常者と AD 患者では際立った違いを示した (図 7)。脳各領域における DVR 値を比較したところ、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉、後部帯状回などの老人斑好発部位では健常者に比べて AD 患者の DVR 値が有意に上昇しており、群間で値にオーバーラップが見られなかった (図 8)。本プローブを用いた PET 検査が AD 診断に有用であることを示唆する所見といえる。

D. 考察

以上の結果から、 [¹¹C]BF-227 は老人斑を検出する PET プローブとして AD 診断に活用できることが確認された。これまでに海外において AD 患者を対象とした臨床 PET study が [¹⁸F]FDDNP、 [¹¹C]6-OH-BTA-1 (PIB)、 [¹¹C]SB-13 の 3 薬剤で実施されている。この中では PIB の研究が最も進んでおり、複数の研究施設で AD 診断における有用性が証明されている。本臨床試験で示された [¹¹C]BF-227 の特性は PIB に近似しており、AD 診断における有用性はほぼ同等であろうと予測される。ただし大脳皮質における集積パターンが PIB では前頭葉優位であるのに対し、BF-227 は側頭葉優位である点に若干の食い違いがみられる。この点に関しては、症例サンプルの違いに起因したものか、或いはプローブの結合特性の違いに依存したものか、今のところ不明である。今後症例数を増やした更なる検討を要する。アミロイドイメージング用プローブの開発は未だ発展途上の段階にあり、スタンダードに位置づけられる PET プローブは存在しないのが現状である。来年度は AD の発症予備群とされている軽度認知機能障害の症例での検討を行い、AD 早期診断における有用性について、他の診断法との比較も交えて検討したいと考えている。

E. 結論

[¹¹C]BF-227 は AD 患者の脳内に蓄積する老人斑に特異的に結合し、脳血液関門透過性に優れたプローブである。また BF-227 は PET プローブとして臨床で使用するのに足る十分な安全性を備えていた。探索的臨床試験の結果、 [¹¹C]BF-227 は老人斑を生体画像化する PET プローブとして AD 診断に有用であることが確認された。

F. 研究発表

(岡村信行)

1. Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y. Quinoline and Benzimidazole Derivatives: Candidate Probes for In Vivo Imaging of Tau Pathology in Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.*, 2005; 25: 10857-10862.
2. Jia F, Kato M, Dai H, Xu A, Okuda T, Sakurai E, Okamura N, Lovenberg TW, Barbier A, Carruthers NI, Iinuma K, Yanai K. Effects of histamine H(3) antagonists and donepezil on learning and mnemonic deficits induced by pentylene tetrazol kindling in weanling mice. *Neuropharmacology*. 2006;50:404-411.
3. Maruyama M, Ishizawa K, Tomita N, Nemoto M, Yasuda H, Ebihara S, Ohri T, Seki T, Iwasaki K, Okamura N, Higuchi M, Yoshida H, Kudo Y, Arai H, Sasaki H. Lithium therapy and cerebrospinal fluid biomarker levels in Alzheimer's disease. *Geriatr. Gerontol. Int.*, 2005; 5: 298-300.
4. Horikawa E, Okamura N, Tashiro M, Sakurada Y, Maruyama M, Arai H, Yamaguchi K, Sasaki H, Yanai K, Itoh M. The Neural Correlates of Driving Performance Identified Using Positron Emission Tomography. *Brain and Cognition*, 2005; 58: 166-171.

- 岡村信行, 谷内一彦. PET を用いた脳機能の分子イメージング法. 日本薬理学会雑誌 126: 347-352, 2005
- 岡村信行, 工藤幸司. 痴呆の画像診断 - 脳アミロイド画像化の試み. よくわかって役に立つ痴呆症のすべて, p134-145. 永井書店
- 岡村信行. 老人斑を生体画像化する新規 PET プローブの開発. 東北医学雑誌 117: 50-52, 2005

(谷内一彦)

- Tashiro M, Mochizuki H, Sakurada Y, Ishii K, Oda K, Kimura Y, Sasaki T, Ishiwata K, Yanai K. Brain histamine H1 receptor occupancy of orally-administered antihistamines measured by positron emission tomography with ¹¹C-doxepin in a placebo-controlled crossover study-design in healthy volunteers: a comparison of olopatadine and ketotifen. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61: 16-26 (2006)
- Suzuki A, Tashiro M, Kimura Y, Mochizuki H, Ishii K, Watabe H, Yanai K, Ishiwata K, Ishii K. Use of reference tissue models for quantification of histamine H1 receptors in human brain by using positron emission tomography and [¹¹C]doxepin. *Ann Nucl Med.* 19:425-433 (2005)
- Yoshida A, Mobarakeh JI, Sakurai E, Sakurada S, Orito T, Kuramasu A, Kato M, Yanai K. Intrathecally-administered histamine facilitates nociception through tachykinin NK1 and histamine H1 receptors: a study in histidine decarboxylase gene knockout mice. *Eur J Pharmacol.* 522:55-62 (2005)
- Dai H, Okuda T, Sakurai E, Kuramasu A, Kato M, Jia FY, Xu AJ, Iinuma K, Sato I, Yanai K. Blockage of histamine H1 receptor attenuates social isolation-induced disruption of pre-pulse inhibition: A study in H1 receptor gene knockout mice. *Psychopharmacology* 183(3):285-293 (2005)
- Mobarakeh J I, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, Naghdi N, Yanai K. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly administered orexin A in histamine H1 or H2 receptor gene knockout mice. *Pain* 118(1-2):254-262 (2005)
- Tashiro M, Horikawa E, Mochizuki H, Sakurada Y, Kato M, Inokuchi T, Ridout F, Hindmarch I, Yanai K. Effects of fexofenadine and hydroxyzine on brake reaction time Hum. *Psychopharmacol.* 20: 501-509 (2005).
- Iwabuchi K, Ito C, Tashiro M, Mochizuki H, Kato M, Kano M, Ishii K, Ishiwata K, Itoh M, Iwata R, Matsuoka H, Sato M, and Yanai K. A PET study of histamine H1 receptors in the schizophrenic patients assessed by [¹¹C]doxepin. *Eur Neuropsychopharmacol.* 15(2):185-191 (2005).
- Mobarakeh JI, Takahashi K, Sakurada S, Nishino S, Watanabe H, Kato M, Yanai K. Enhanced antinociception by intracerebroventricularly and intrathecally-administered orexin A and B (hypocretin-1 and -2) in mice. *Peptides* 26:767-777 (2005)

(荒井啓行)

- Tanji H, Ootsuki M, Matsui T, Maruyama M, Nemoto M, Tomita N, Seki T, Iwasaki K, Arai H, Sasaki H. Dementia caregiver's burden and use of public services. *Geriatrics & Gerontology International* 5:102-106, 2005
- Arai H, Maruyama M. The heterogeneity and natural history of mild cognitive impairment. *Arch.Neurol.*62:163-164, 2005.
- Yamada M, Ohru T, Asada M, Ishizawa K, Ebihara S, Arai H, Sasaki H. Acarbose attenuates hypoglycemia from dumping

syndrome in an elderly man with gastrectomy. *J. Am. Geriatr. Soc.* 53:358-359, 2005

- Horikawa E, Matsui T, Arai H, Seki T, Iwasaki K, Sasaki H. Risk of falls in Alzheimer's disease: A prospective study. *Intern. Med.* 44:717-721, 2005.
- Mochizuki H, Masaki T, Matsushita S, Ugawa Y, Kamakura K, Arai H, Motoyoshi K, Higuchi S. Cognitive impairment and diffuse white matter atrophy in alcoholics. *Clin Neurophys* 116(1): 223-228, 2005.
- Matsushita S, Arai H, Matsui T, Yuzuriha T, Urakami K, Masaki T, Higuchi S. Brain-derived neurotrophic factor gene polymorphisms and Alzheimer's disease. *J Neural Transms* 112:703-711, 2005.
- Hamaguchi T, Kitamoto T, Sato T, Mizusawa H, Nakamura Y, Noguchi M, Furukawa Y, Ishida C, Kuji I, Mitani K, Kurayama S, Kohriyama T, Katayama S, Yamashita M, Mamamoto T, Udaka F, Kawakami A, Ihara Y, Nishinaka T, Kuroda S, Suzuki N, Shiga Y, Arai H, Maruyama M, Yamada M. Clinical diagnosis of MM2-type sporadic Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurology* 64:643-648, 2005.
- Seki T, Iwasaki K, Arai H, Sasaki H, Hayashi H, Yamada S, Toba K. Acupuncture for dysphasia in poststroke patients: A videofluoroscopic study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 2005;53:1083-1084.
- Oomori K, Ebihara S, Kuriyama S, Ugajin T, Ogata M, Hozawa A, Matsui T, Tsubono Y, Arai H, Sasaki H, Tsujii I. The relationship between body mass index and a plasma lipid peroxidation biomarker in an older, healthy Asian community. *Ann Epidemiol.* 2005 Jan;15(1):80-4.
- Kurusu M, Watanabe K, Nakazawa T, Seki T, Arai H, Sasaki H, Fuse N, Tamai M. Acupuncture for patients with glaucoma. *Explore* 1:372-372, 2005.
- Kuriyama S, Hozawa A, Ohmori K, Shimazu T, Matsui T, Ebihara E, Awata S, Nagatomi R, Arai H, and Tsujii I. Green tea consumption and cognitive function: a cross-sectional study from the Tsurugaya Project. *Am. J. Clin. Nutr.* 2006 ;83:355-61.
- Arai H, Akishita M, Teramoto S, Arai H, Mizukami K, Morimoto S, Toba K. Incidence of adverse drug reactions in geriatric units of university hospitals. *Geriatr.Gerontol. Int.* 5:293-297, 2005.

G. 知的財産権の出願・登録状況

- 特願 2006-047064 アミロイドβ蛋白が蓄積する疾患の画像診断プローブ 平成18年2月23日 東北大学 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、谷内一彦
- 特願 2005-371821 コンフォメーション病の診断用プローブ 平成17年12月26日 東北大学 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美
- 特願 2005-347818 コンフォメーション病診断および治療用の長波長蛍光物質を含む組成物 平成17年12月1日 東北大学 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩、堂浦克美
- 特願 2005-322230 アミロイド蓄積性疾患の新規診断用装置およびその操作方法 平成17年11月7日 東北大学 工藤幸司、荒井啓行、岡村信行、古本祥三、丸山将浩