

ス 2007年6月9日 松本

5. 岡村信行. アミロイドイメージングを用いたアルツハイマー病の早期診断. 第4回 Neuroscience Frontier Research Conference 2007年7月28日 千葉
6. 岡村信行. アミロイドイメージングの進歩. 第11回 富山認知症研究会 2007年9月1日 富山
7. 岡村信行、工藤幸司. アミロイドイメージング. 口演 第9回 感情・行動・認知(ABC)研究会 2007年10月27日 大阪
8. 岡村信行、谷内一彦. [^{11}C]BF-227を用いた脳アミロイド斑の画像化. 口演 第47回 日本核医学会学術総会 シンポジウム 2007年11月5日 仙台
9. 岡村信行. BF-227を用いたアミロイドイメージング. 口演 第11回 Neurology SPECT 定量検討会 2007年11月17日 東京
10. 岡村信行、工藤幸司、古本祥三、田代学、加藤元久、船木善仁、森雅憲、堂浦克美、荒井啓行、谷内一彦. BF-227を用いた神経変性疾患の脳内アミロイドのPET計測. 第81回日本薬理学会年会 2008年3月19日 横浜

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

特許出願状況

1. PCT/JP2007/063350 ベンゾキサゾール誘導体(平成19年7月4日)(工藤幸司、古本祥三、岡村信行)
2. 特願 2007-176366 フッ素およびヒドロキシ基で置換されたアルコキシ基を有するPETプローブ(平成19年7月4日)(工藤幸司、古本祥三、岡村信行)

新規アミロイドイメージング剤^[18F]FACT の安全性評価

分担研究者：工藤 幸司¹、岡村 信行²

研究協力者：古本 祥三¹、石川 洋一³、船木 善仁³、岩田 鍊³

（¹東北大学先進医工学研究機構、²東北大学大学院医学系研究科、³東北大学サイクロトロン・RIセンター）

[研究要旨]

新規アミロイドイメージング剤として開発された^[18F]FACTの臨床利用を目的として、その変異原性、急性毒性、被曝線量、注射液の品質について安全性を確認する目的で各種試験を実施した。変異原性および急性毒性に対する安全性については、実際のPET検査で投与される注射液中のFACT濃度(1×10^{-9} g/mL以下)では問題ないことが確認された。被曝線量に関しては、一回のPET検査で5 mCiを投与した場合、マウスの全身分布データを基にMIRD法によって推定した全身の実効線量は2.57 mSv（男）、3.15 mSv（女）となり、安全性に問題はないと考えられた。^[18F]FACT注射液の品質に関しては、放射化学的純度は95%以上、残留溶媒(エタノール、アセトニトリル)はガイドライン基準値以下、エンドトキシン試験および無菌試験は陰性の結果が得られ、臨床上問題なくPET検査に利用できることが示された。

A. 研究目的

我々がこれまでに展開してきたアミロイドイメージングの多施設研究により、^[11C]BF227は臨床的にADの早期診断に有用性の高いことが示されてきた。このアミロイドイメージングによるAD早期診断の普及を考えた場合、炭素11よりも半減期が長く、将来的にデリバリーによる薬剤の供給も可能となるフッ素18で標識した薬剤の開発が必要となる。そこで我々は次世代アミロイドイメージング剤となりうるフッ素18標識薬剤の開発に取り組み、前年度、その有力な候補として^{18F}-標識化合物FACT (Fluorinated Amyloid-imaging Compound of TOHOKU, IUPAC名:(E)-6-[(1-^{18F})Fluoromethyl-2-hydroxy]ethoxy]-2-[2-[2-dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl]benzoxazole)の開

発に成功した。このような経緯から、本年度は^[18F]FACTの前臨床評価試験に位置づけられる安全性評価を目的として、FACTの変異原性試験、急性毒性試験、被曝線量の推定、注射剤の品質に関わる各種試験を行った。

B. 研究方法

FACTの安全性評価に関わる変異原性試験及び急性毒性試験については、そのデータの客観的信頼性を担保するためにそれぞれ外部機関の(財)食品農医薬品安全性評価センター及び(株)三菱化学安全科学研究所に依頼して行った。

B-1. 変異原性に対する安全性評価

FACTの遺伝子突然異変誘発性の有無を検討す

るために、ネズミチフス菌 TA100 株及び TA98 株を用いた復帰突然変異試験を行った。試験における陰性対照は FACT の溶媒である DMSO とし、陽性対照は 2-(2-フリル)-3-(5-ニトロ-2-フリル)アクリルアミド(AF-2)及び 2-アミノアントラセン(2-AA)とした。

試験は以下の手順に従った。①試験管に FACT 溶液(DMSO 溶媒、6 用量設定、100 μ L)あるいは対照物質溶液(100 μ L)を、次いで、代謝活性化系非存在下(-S9 処理)の場合は、0.1 mol/L ナトリウムリン酸緩衝液(pH7.4、500 μ L)を、代謝活性化系存在下(+S9 処理)の場合は S9mix(500 μ L)を分注、②試験菌株懸濁液(100 μ L)を添加して 37 $^{\circ}$ C で 20 分間インキュベーション、③トップアガーを添加して内容物を混合、④混合液をプレートに移し 37 $^{\circ}$ C で 48 時間培養した。

評価方法は、復帰突然変異により生じたプレート上のコロニー数を計測し、その値が陰性対照の 2 倍以上に増加し、かつその増加に用量依存性あるいは再現性がみられた場合、遺伝子突然変異誘発性があると判定した。そしてその復帰突然変異コロニー数が陰性対照の 2 倍以上となる最小設定用量における FACT 濃度を 18 F]FACT 投与時の変異原性に対する安全性の評価基準とした。

B-2. 急性毒性に対する安全性評価

18 F]FACT 注射液を静脈内投与したときの急性毒性に対する安全性を評価するために、ICR 系雌雄マウスのび静脈内に FACT 溶液を投与し、一般状態及び体重推移を観察し、最後に剖検を行った。

投与用量は 1 mg/kg とし、投与液は DMSO で溶解させた後、1 mol/L 塩酸及び生理食塩液を用いて 0.1 mg/mL の濃度なるように調製した。対照として媒体のみを投与する群を設けた。投与経路は尾静脈内とし、毎分約 1mL の速度で投与した。

投与回数は各動物あたり 1 回とした。使用した動物の個体数は、各群につき雌雄各 5 匹ずつとした。

薬液投与後は動物の一般状態観察および体重測定を実施し、第 15 日目に全例について主要臓器(脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、副腎)の剖検を行った。

この投与用量 1 mg/kg における急性毒性試験結果を基に、 18 F]FACT 投与時の急性毒性に対する安全性評価を行った。

B-3. 被曝線量の推定

18 F]FACT 注射液を ICR マウス(5 週齢)に尾静脈内投与(約 30 μ Ci/匹)し、一定時間後(2、10、30、60、120 分後)に麻酔下頸椎脱臼により屠殺し、速やかに採血後、各種臓器組織を採取してそれらの放射能並びに重量を測定した。投与放射能に対する各試料重量 1 グラム当りの放射能の割合(% ID/g)を算出し、MIRD 法により各種臓器及び全身被曝線量を推定した。

B-4. 18 F]FACT 注射液の品質安全性評価

18 F]FACT 注射液の安全性評価を目的として、臨床用 18 F]FACT 注射液製造装置(分担研究者報告「PET 診断利用を目的とした 18 F-標識 FACT 自動合成装置の開発」の内容を参照)により製造された 18 F]FACT 注射液について、①分析 HPLC により放射化学的純度及び FACT 担体量の測定を行った。② 18 F]FACT 注射液製造時に用いられる有機溶媒(アセトニトリル、エタノール)の残留量をガスクロマトグラフィーにて測定した。③ゲル化法によるエンドトキシン試験を実施した。④血液培養システムを用いた試験法により無菌テストを実施した。⑤ 18 F]FACT 注射液の静脈内投与時における急性毒性に対する安全性を調べるため、B-2 と同様の急性毒性試験を実施した。この

場合、 ^{18}F FACT 注射液製造後 1 週間冷凍保存し、放射能が十分に減衰したものを 0.5 mL/kg となるように投与した。対照としては生理食塩液投与群を設定した。

C. 研究結果

C-1. 変異原性に対する安全性評価

FACT 処理群では、+S9 処理の TA100 株において、用量が 78.1 μg /プレート(2.6 mL)の時に陰性対照群の 2 倍を超える復帰変異コロニー数の増加が認められた。-S9 処理の TA100 株および両処理の TA98 株においては、復帰変異コロニー数の明確な増加は認められなかった。一方、陽性対照物質は、復帰突然変異を顕著に誘発した。以上から、本試験条件において、FACT の遺伝子突然変異誘発性は陽性と判定されたが、有意に突然変異が観察された FACT の最小濃度は 30×10^{-6} g/mL であり、通常用いられる PET 薬剤に含まれる担体濃度よりも十分に高い値であった。また、変異原性の強さに関する相対比較値である比活性値は 3058 (mg 当り : TA100 株、+S9 処理、156 μg /プレート)と算出され、既知変異原性物質と比較して FACT の変異原性は弱いものと判定された。

C-2. 急性毒性に対する安全性評価

FACT 溶液を投与したすべてのマウスにおいて死亡は発現せず、一般状態にも異常は認められなかった。また、体重推移や剖検にも異常は認められなかった。

C-3. 被曝線量の推定

^{18}F FACT の体内分布実験の結果は表 1 の通りとなった。血液中からの消失は速やかであり、肝臓小腸排泄、尿中排泄が確認された。体内分布の結果から MIRD 法により推定される臓器別被曝

線量は表 2 の通りとなった。全身(体重 57kg で推定)の実効線量当量は 13.9 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$ (男)、17.0 $\mu\text{Sv}/\text{MBq}$ (女)となった。1 回の投与量を 5 mCi とすれば全身の実効線量は 2.57 mSv (男)、3.15 mSv (女)となる。

C-4. ^{18}F FACT 注射液の品質安全性評価

^{18}F FACT 注射液の分析結果(①~④)については表 3 にまとめて示した。⑤ ^{18}F FACT 注射液の単回投与急性毒性試験については、投与したすべてのマウスにおいて死亡は発現せず、一般状態にも異常は認められなかった。また、体重推移や剖検にも異常は認められなかった。

D. 考察

本研究では、 ^{18}F FACT の前臨床評価として、変異原性、急性毒性、被曝線量、注射液の品質について安全性を確認する目的で各種試験を実施した。FACT の復帰突然変異試験では、 30×10^{-6} g/mL 以上の濃度で有意に遺伝子突然変異の誘発が認められたが、 ^{18}F FACT 注射液に含まれる担体量は 1×10^{-9} g/mL 以下であることが確認されたので、変異原性の観点からは ^{18}F FACT 注射液の安全性に問題はないと考えられる。またマウスを用いた急性毒性試験では、投与用量 1 mg/kg において一般状態、剖検で異常は確認されなかったが、仮に ^{18}F FACT 注射液 10 mL を体重 50 kg 以上の被験者に投与したとしても含まれる担体量は 2×10^{-10} g/kg 以下となることから、 ^{18}F FACT 注射液をヒトに投与した場合の急性毒性については問題ないと考えられる。被曝については、十分に PET 撮像が行えると考えられる放射エネルギーの 5 mCi を投与した場合であっても全身の実効線量は 2.57 mSv (男)、3.15 mSv (女)となり、一般的な FDG-PET 検査による被曝線量の 2.2 mSv よ

りも若干高い程度であり、CT 検査の場合の 3-10 mSv と比較しても安全性に問題のない被曝線量の範囲である。臨床用に自動合成装置によって製造された¹⁸F]FACT 注射液の化学的品質については、3 回の試験合成においていずれも放射化学的純度は 95%以上であり、残留溶媒は「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に記載されている濃度限界値を十分下回っていることから問題ない。さらに生物学的品質についてもエンドトキシン試験および無菌試験は陰性を示したことから問題は認められなかった。よって、注射液の品質という観点からも安全性に問題はないと見なせる。

E. 結論

以上、本研究において¹⁸F]FACT の前臨床評価結果として、急性毒性、変異原性、被曝線量、品質の点において安全性が確認され、¹⁸F]FACT 注射液は臨床上問題なく PET 検査に利用できることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Okamura N, Furumoto S, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Imaging amyloid in the living brain. *Curr Med Imaging Rev* .4. 56-62. 2008
- 2) Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R, Yanai K, Arai H: 2-(2-[2-Dimethylaminothiazol -5-yl] ethenyl) -6-(2- [fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients. *J Nucl Med*. 48. 553-561.2007.
- 3) Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y:Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 7.1773-1789.2007.
- 4) Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada S, Arai H, Kudo Y, Yanai K: Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease. *Japan Geriatrics Society*. 7. 393-400.2007.
- 5) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行：アミロイドイメージング「アミロイド画像化用プローブ」. *日本臨床*.66Suppl 1.300-306.2008.
- 6) 岡村信行、谷内一彦、古川勝敏、荒井啓行、工藤幸司:アミロイドイメージング「PET」. *日本臨床*.66Suppl 1.288-292.2008.
- 7) 荒井啓行、古川勝敏、工藤幸司：アルツハイマー病バイオマーカー開発の現状と Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *ヒューマンサイエンス*.19.12-17.2008
- 8) 岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦: 脳の分子イメージング「アルツハイマー病」. *日本臨床*.65. 320-326.2007.
- 9) 岡村信行、谷内一彦、工藤幸司:アミロイドイメージングの進歩.*Dementia Japan*. 20. 216-225.2007.
- 10) 荒井啓行、工藤幸司: 病理像を画像化する分子神経イメージング法による Alzheimer 病の早期診断 -日本での BF-227 の開発と臨床応用.*医学のあゆみ*. 220.404-408.2007
- 11) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行：アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の診断.小川誠司、上野照剛 編集. *In*“非侵襲・可視化技術ハンドブック”.NTS 社.東京.562-566. 2007.
- 12) 古本祥三、岡村信行、工藤幸司：アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の早期診断. 伊藤正敏 編集. *In*“臨床医

のためのクリニカルPET—病期・病態診断のためのガイドブック—。先端医療技術研究所.東京. 205-210.2007.

2. 学会発表

(国内学会)

- 1) 岡村信行、工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦：アミロイド斑の生体イメージング、第 80 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3 月 14 日-16 日、2007 年
- 2) 伊藤啓、岡村信行、加藤元久、古本祥三、赤津裕康、山本孝之、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦：アルツハイマー病脳内のアミロイドを検出する 18F 標識新規 PET プローブ、第 80 回 日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3 月 14 日-16 日、2007 年
- 3) 藤川陽介、岡村信行、古本祥三、星井嘉信、石原得博、山田正仁、工藤幸司、谷内一彦：アミロイドペータのリガンドである BF-227 による新たなアミロイドーシス探索法、第 80 回 日本薬理学会年会、名古屋国際会議場、3 月 14 日-16 日、2007 年
- 4) 古本 祥三、渋間祐太郎、石川洋一、工藤幸司、岩田錬：生体 MMP_2 イメージングを目的としたフッ素 18 標識 MMP2 阻害剤の開発、日本薬学会 第 127 年会、富山国際会議場、3 月 28 日-30 日、2007 年
- 5) 森雅憲、岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦：近赤外線蛍光イメージングによる脳内アミロイドの非侵襲的検出、第 58 回日本薬理学会北部会、北海道大学学術交流会館、9 月 29 日、2007 年
- 6) 谷内一彦 岡村 信行 工藤幸司 荒井啓行： ^{11}C]BF-227 を用いたアルツハイマー病におけるアミロイド斑の分子イメージング、第 50

回日本神経化学会、パシフィコ横浜、9 月 10 日、2007 年

- 7) Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Funaki Y, Yanai K, Arai H: Noninvasive detection of amyloid deposits in the patients with Alzheimer's disease using ^{11}C]BF-227 PET、第 26 回認知症学会学術集会・第 13 回国際老年精神医学会、大阪国際会議場、10 月 14 日-18 日、2007 年
- 8) 古本祥三 渋間祐太郎 金田朋洋 石川洋一 工藤幸司 岩田錬：マトリックスメタロプロテアーゼ-2 のイメージングを目指した PET 用標識薬剤の開発、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11 月 4 日-6 日、2007 年
- 9) 岡村 信行 谷内一彦 古本祥三 工藤幸司： ^{11}C]BF-227PET を用いた脳アミロイド斑の画像化、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11 月 4 日-6 日、2007 年
- 10) 古本祥三、本田芳雄、堀勝義、石川洋一、工藤幸司、岩田錬：血管標的薬剤 AVE8062 による誘発される腫瘍低酸素状態の評価、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11 月 4 日-6 日、2007 年
- 11) 田代学、岡村信行、熊谷和明、古本祥三、船木善仁、木村雄一、石渡喜一、岩田錬 工藤幸司、荒井啓行、谷内一彦： ^{11}C]BF-227PET を用いた脳内アミロイド蓄積に関する定量的検討、第 47 回日本核医学会核術総会、仙台国際センター、11 月 4 日-6 日、2007 年

(国際学会)

- 1) Arai H, Okamura N, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y: In Vivo Detection of Amyloid Deposits in Normals, Mild Cognitive Impairment and

Alzheimer's Disease Patients Using
[11C]BF-227 and PET, Human Amyloid
Imaging · Boston2007, Boston Back Bay
Hilton Hotel, 5月4日,2007年

- 2) Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Tashiro M,
Furukawa K, Funaki Y, Kato M, Ito S, Ishikawa
Y, Maruyama M, Arai H, Fukuda H, Iwata R,
Itoh M, Yanai K: In vitro detection of amyloid
deposits in Alzheimer's disease using
[11C]BF-227 PET, Brain'07&BrainPET'07, 大
阪国際コンベンションセンター, 5月20日-24
日, 2007年
- 3) Tashiro M, Kumagai K, Okamura N, Furumoto
S, Furukawa K, Funaki Y, Maruyama M,
Kimura Y, Itoh M, Iwata R, Kudo Y, Arai
H, Yanai K: Quantitative analysis of detection
of amyloid deposition in human brain using PET
and a new imaging probe [¹¹C]BF-227,
Brain'07&BrainPET'07, 大阪国際コンベンシ
ョンセンター, 5月20日~24日,2007年

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得
次頁参照

1)特許番号 (出願番号)・発明の名称

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

特許出願状況

	出願/登録 の別	出願番号	発明の名称	出願日	出願人	発明者
1	未登録	PCT/JP2007/063350	ベンゾキサゾール誘 導体	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行
2	未登録	特願 2007-176366	フッ素およびヒドロ キシ基で置換された アルコキシ基を有す る PET プローブ	平成 19 年 7 月 4 日	東北大学	工藤幸司 古本祥三 岡村信行

表1 ICR マウスにおける¹⁸F]FACT の体内分布結果

経過時間(分)	平均%ID/g (n=4)					標準偏差				
	2	10	30	60	120	2	10	30	60	120
血液	3.65	2.54	1.19	0.64	0.44	0.66	0.35	0.49	0.13	0.08
心臓	5.84	2.25	0.88	0.55	0.39	0.54	0.20	0.12	0.07	0.12
肺	6.99	3.36	1.66	1.06	0.60	0.37	0.11	0.26	0.07	0.11
肝臓	9.38	10.9	11.3	14.06	11.7	0.43	0.55	1.32	0.55	1.77
脾臓	3.49	2.15	0.84	0.52	0.34	0.73	0.29	0.26	0.09	0.08
小腸	4.19	8.09	10.1	13.9	15.9	0.73	0.82	0.43	3.01	3.20
腎臓	10.2	6.00	4.17	3.25	2.47	1.05	0.52	0.44	0.27	0.55
膀胱	2.77	4.31	17.9	7.70	5.42	0.61	2.16	21.78	3.10	8.81
脳	4.64	1.66	0.53	0.28	0.22	0.55	0.16	0.11	0.04	0.05
骨	1.84	1.32	0.88	1.38	1.55	0.18	0.07	0.07	0.46	0.22
筋肉	3.44	1.45	0.66	0.55	0.27	0.31	0.15	0.10	0.24	0.04
皮膚	1.76	1.84	1.19	0.84	0.46	0.20	0.10	0.19	0.31	0.11

表2 臓器別推定被曝線量

臓器	線量 (μGy/MBq)	臓器	線量 (μGy/MBq)
脳	2.37	上方大腸壁	30.5
甲状腺	3.51	下方大腸壁	15.9
胸腺	4.07	副腎	8.34
乳房	3.80	腎臓	15.8
心臓壁	6.03	精巣	4.63
肺	6.12	卵巣	21.3
肝臓	50.9	子宮	20.4
膵臓	9.00	膀胱壁	43.4
脾臓	6.17	骨	6.77
胃壁	8.52	骨髄	7.76
小腸壁	231	筋肉	5.57

表3 臨床用合成装置によって製造された $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ 注射液の各種試験結果まとめ

試験 No.		1	2	3
放射化学的純度		99%	97.6%	99%
担体量		0.31 nmol/mL	0.41 nmol/mL	0.50 nmol/mL
比放射能		58.5 GBq/ μmol	312.6 GBq/ μmol	155.4 GBq/ μmol
pH		7	7	7
エンドトキシン試験		陰性	陰性	陰性
無菌試験	好気性	陰性	陰性	陰性
	嫌気性	陰性	陰性	陰性
残留溶媒	エタノール*1	126 ppm	108 ppm	72.2 ppm
	アセトニトリル*2	4.9 ppm	2.6 ppm	2.9 ppm

*1 エタノールは「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に記載されているクラス3の溶媒（GMP 又はその他の品質基準により規制すべき溶媒）で、医薬品中残存量の妥当性についての理由を示さなくても許容される濃度は5000 ppm 以下である。

*2 アセトニトリルは「医薬品の残留溶媒ガイドライン」に記載されているクラス2の溶媒（医薬品中の残留量を規制すべき溶媒）であり、医薬品中に残留が許容される濃度は410 ppm 以下である。

PET 診断利用を目的とした ^{18}F -標識 FACT 自動合成装置の開発

分担研究者：岩田 錬¹、青木 康²

研究協力者：古本祥三³、石川洋一¹、渡辺利光²

¹東北大学サイクロトン・RI センター、²住友重機械工業株式会社・技術開発センター、東北大学先進医工学研究機構

[研究要旨]

本研究では、実用的な ^{18}F -標識アミロイドイメージング剤 (^{18}F FACT) の自動合成装置の開発を目指し、昨年度試作した3つのモジュールから構成される超小型合成装置（ミニチュアモジュール）を一部改良し、合成操作と反応条件の最適化を行った。本装置を使用して ^{18}F FACT 合成を3回連続的に行い、臨床利用可能な ^{18}F FACT 合成における再現性・信頼性を実証した。

A. 研究目的

臨床利用可能な ^{18}F -標識アミロイドイメージング剤 (^{18}F FACT) 自動合成装置の開発を目標に、前年度では、 ^{18}F フッ素イオンモジュール、 ^{18}F -標識反応モジュール、精製モジュールの3つのモジュールから構成される自動超小型合成装置（ミニチュアモジュール）を設計・試作した。本年度は、変更を加えた精製モジュールの試作と評価を継続し、また、制御プログラムを確立してトータルシステムとして完成させることを目的とした。動作試験、再現性試験、合成される ^{18}F FACT 注射液の品質検査などを行い、本年度内での最初の臨床利用を目指した。

B. 研究方法

1. 合成装置

ミニチュアモジュール技術で昨年度試作した ^{18}F フッ素イオンモジュールと ^{18}F -標識反応モジュールに、新たに小型シリンジポンプ6方切換バルブユニットを組み込んだ精製モジュール

を導入して、 ^{18}F FACT 自動合成装置とした。図1は精製モジュールの概念図を、図2はホットセル内に設置した ^{18}F FACT 自動合成装置を示す。

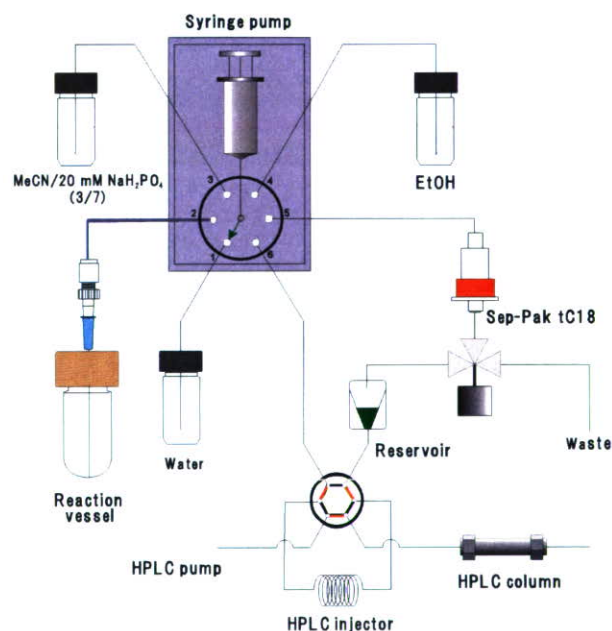


図1. 精製モジュール

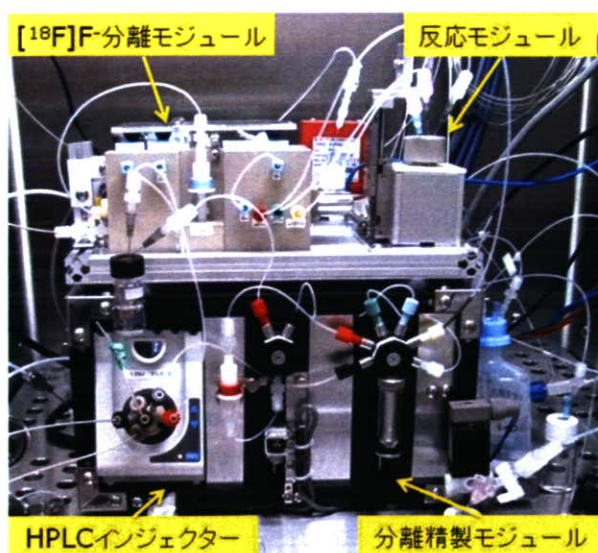


図 2. ホットセル内の $[^{18}\text{F}]$ FACT 自動合成装置

2. 合成プロセス

$[^{18}\text{F}]$ FACT 合成の過程は以下の 6 ステップから構成される。図 2 に示す装置ではステップ 1 から 4 までを自動的に実行し、ステップ 5 及び 6 には別途に開発した装置を転用した。

1. $[\text{K}/\text{K}.222]^{18}\text{F}$ の調製： $[^{18}\text{F}]$ フッ素イオン/ $[^{18}\text{O}]$ ターゲット水を導入し、陰イオン交換カラムにより $[^{18}\text{O}]$ ターゲット水を回収後、 $[^{18}\text{F}]$ フッ素イオンを溶出してアセトニトリルとの共沸乾固により無水の $[\text{K}/\text{K}.222]^{18}\text{F}$ を調製する。
2. $[^{18}\text{F}]$ フッ素置換反応： $[\text{K}/\text{K}.222]^{18}\text{F}$ に DMSO に溶解した反応前駆体を加えて加熱し、 $[^{18}\text{F}]$ フッ素イオンによる置換反応を行う。
3. 固相抽出法 (SPE) による前処理：反应用液に水を加えて tC18 カートリッジに目的物を捕集し、緩衝液で洗浄後エタノールで溶出する。
4. 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による精製：SPE で粗精製された目的物に水を加えて HPLC インジェクターによりカラムに注入する。
5. SPE による前調製： $[^{18}\text{F}]$ FACT 画分を大量

の水に集め、tC18 カートリッジを通して捕集する。次に少量のエタノールで $[^{18}\text{F}]$ FACT を溶出してロータリエバポレータに移送する。

6. 注射液の調製：あらかじめアスコルビン酸を入れたフラスコに $[^{18}\text{F}]$ FACT のエタノール溶液を集め、減圧下溶媒を留去する。次に生食を加えて残差を溶解し、メンブランフィルターを通して滅菌バイアルに集める。
7. 本年度は特にステップ 3 の固相抽出法による前処理法を最適化した。固相抽出カラム (Sep-Pak tC18 カートリッジ) に捕集した反応物を効率よく HPLC に導入可能な処理法を、使用する溶離液の容量を変えて検討した。
8. 3. 制御プログラム
9. 制御プログラムは LabView で作成し、PC からは USB ケーブルでホットセルの下に設置した制御インターフェイスにつないだ。図 3 に制御 PC 画面を示す。

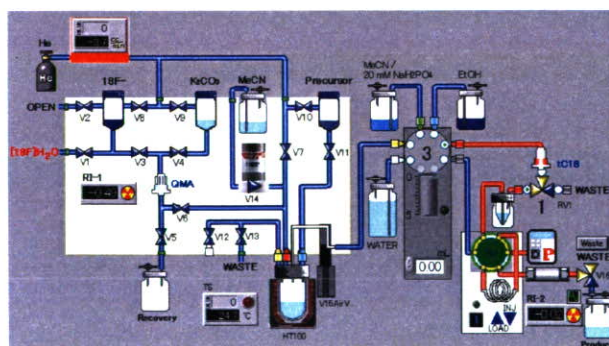


図 3. 制御画面

C. 研究結果

1. ミニチュア加熱モジュールの性能評価

図 4 に示すマイクロセラミックヒーターを組み込んだ完全遮光の加熱モジュールで、実際に使用

する液量で乾固操作を行った。水-アセトニトリル混合溶媒を加熱下 He 気流で蒸発させ、その流速変化から留去状態を検出した。図 5 に最適化した条件下での内部温度と He 流速の時間変化を示す。アセトニトリルの添加を 2 回の繰り返し、完全に反応容器から水分を留去するのに 24 分を要した。

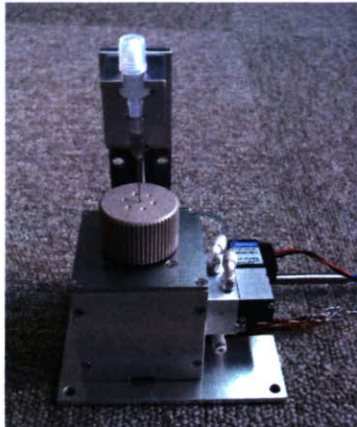


図 4. ミニチュア加熱モジュール

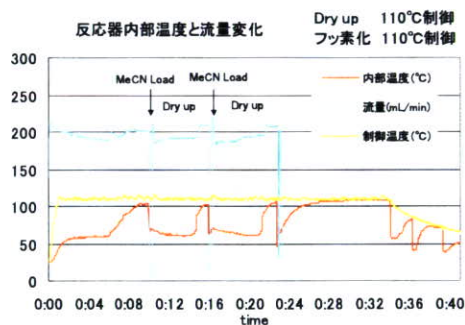


図 5. 反応容器内部温度と He 流速変化

2. HPLC による精製

以下に示す分離条件で反応物の HPLC 精製を検討した。

- 分取カラム : Inertsil ODS-3、250 X 10 mm ID)
- 溶離液 : 20 mM NaH₂PO₄/MeCN=60/35
- 流速 : 6.0 mL/min
- 検出器 : RI、UV (400 nm)

その結果、図 6 に示すように良好な分離が得られ、¹⁸F]FACT は約 18 分過ぎに高い化学的・放射化学的純度で得られた。

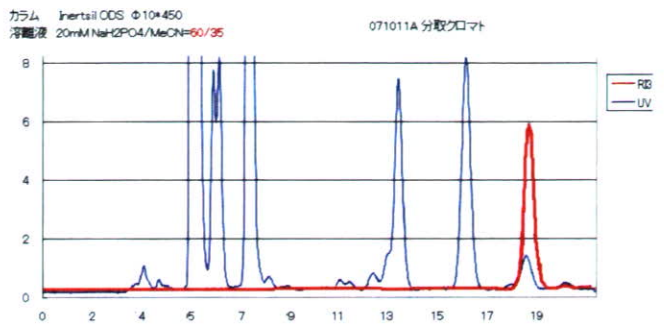


図 6. HPLC クロマトグラム

3. 臨床利用に向けた合成試験の結果

最適化した反応・精製条件を用い、合成試験を 3 回連続して行い、得られた¹⁸F]FACT 注射液に対し化学的純度 (混入有機溶媒量の GC 分析を含む)、放射化学的純度、比放射能、エンドトキシンおよび無菌試験を行い、すべての検定項目につき基準値を満たした。図 7 には HPLC 分析の結果を示す。

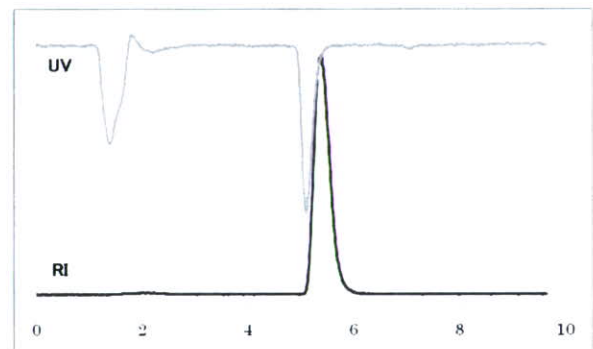


図 7. HPLC 分析

HM-12 サイクロトロンのプロトンビーム 30 μA で 45 分間照射して得られる¹⁸F]フッ素イオンから出発し、約 1 時間半の自動合成と注射液調製により、30-40 mCi の¹⁸F]FACT が投与可能な注射液として PET 臨床試験に供給できた。

D. 考察

合成の最初の過程である¹⁸F]フッ素イオンの乾固操作に時間を要しすぎているが、一方では高い合成の再現性が得られ、超小型の加熱モジュールを使用した蒸発乾固操作では無理な時間短縮を追及すべきではないと考える。再現性良く確実に

合成できることが望ましい。合成時間の短縮は、別途開発中の電気化学的な ^{18}F フッ素イオン濃縮法を導入することで容易に実現可能となるであろう。

本法ではHPLC分取液からの注射液調製に固相抽出法を使用しているが、この操作を自動的に実行可能なモジュールは本装置には含まれていない。本研究では既設のものを使用して行ったが、他の施設に導入する際には自動固相抽出モジュールの開発も必要と考える。

E. 結論

試作した ^{18}F FACT 注射液自動合成装置を用いて、その反応と精製条件を最適化し、臨床利用可能な ^{18}F FACT 注射液を得ることができた。LabView プログラムで制御された超小型合成モジュールはその実用性を実証し、 ^{18}F FACT 注射液の自動合成装置の開発は完了した。

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定も含む）

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著書氏名	掲載文のタイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	頁	出版年
工藤幸司、古本祥三、岡村信行	アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の診断	小川誠司、上野照剛	非侵襲・可視化技術ハンドブック	NTS社	東京	562-566	2007
古本祥三、岡村信行、工藤幸司	アミロイドイメージングによるアルツハイマー病の早期診断	伊藤正敏	臨床医のためのクリニカルPET—病期・病態診断のためのガイドブック—	先端医療技術研究所	東京	205-210	2007
伊藤健吾、加藤隆司	画像診断		認知症の予防と治療	長寿科学振興財団	東京	127	2007
伊藤健吾、加藤隆司	伊藤健吾、加藤隆司: アルツハイマー病. 臨床医のためのクリニカルPET. 先端医療技術研究所, p182-186, 200	クリニカルPET編集委員会	臨床医のためのクリニカルPET	先端医療技術研究所	東京	182	2007

雑誌

発表者名	論文タイトル	発表誌名(略名)	巻号	開始—終了頁	出版年
Kudo Y, Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Furukawa K, Maruyama M, Itoh M, Iwata R,	2-(2-[2-Dimethylamino- thiazol -5-yl] ethenyl) -6-(2- [fluoro]ethoxy) benzoxazole: A novel PET agent for in vivo detection of dense amyloid plaques in Alzheimer's disease patients	J Nucl Med	48	553-561	2007
Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y	Recent advances in the development of amyloid imaging agents.	Curr Topics in Medic Chem	7	1773-1789	2007
Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada S, Arai H, Kudo Y	Binding and safety profile of novel benzoxazole derivative for in vivo imaging of amyloid deposits in Alzheimer's disease.. 7. 393-400.2007.	Geriatr Gerotol Int	7	393-400	2007

Okamura N, Funaki Y, Tashiro M, Kato M, Ishikawa Y, Maruyama M, Ishikawa H, Meguro K, Iwata R, Yanai K.	In vivo visualization of donepezil binding in the brain of patients with Alzheimer's disease.	Br J Clin Pharmacol.	65(4)	472-479	2008
Okamura N, Furumoto S, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y	Imaging amyloid in the living brain. Curr Med Imaging Rev .4. 56-62. 2008	Curr Med Imaging Rev .4. 56-62. 2008	4	56-62	2007
工藤幸司、古本祥 三、岡村信行	アミロイドイメージング「アミロイド画像化用プロー ブ」.	日本臨床	66suppl	300-306	2008
岡村信行、谷内一 彦、古川勝敏、荒井 啓行、工藤幸司	アミロイドイメージング「PET」.	日本臨床	66Suppl	1288-1292	2008
荒井啓行、古川勝 敏、工藤幸司	アルツハイマー病バイオマーカー開発の現状と Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative.	ヒューマンサイエンス	19	12-17	2008
岡村信行、古本祥 三、工藤幸司、谷内 一彦	脳の分子イメージング「アルツハイマー病」	日本臨床	65	320-326	2007
岡村信行、谷内一 彦、工藤幸司	アミロイドイメージングの進歩	Dementia Japan.	20	216-225	2007
荒井啓行、工藤幸 司	病理像を画像化する分子神経イメージング法によ るAlzheimer病の早期診断 -日本でのBF-227の開 発と臨床応用	医学のあゆみ	220	404-408	2007
伊藤健吾	FDG-PETによるAlzheimer病の診断	医学の歩み	220	399-403	2007
加藤隆司、伊藤健 吾	PET/SPECTIによるMCIから初期認知症への進行評 価	老年精神医学雑誌	18	834-840	2007
Nihashi T, Yatsuya H, Hayasaka K, Kato R, Kawatsu S, Arahata Y, Iwai K, Takeda A, Washimi Y, Yoshimura K, Mizuno K, Kato T, Naganawa S, Ito K.	Direct comparison study between FDG- PET and IMP-SPECT for diagnosing Alzheimer's disease using 3D-SSP analysis in the same patients. Radiat Med 25: 255-262, 2007	Radiat Med	25	255-262	2007
伊藤健吾	J-ADNIの先行研究としてのJ-COSMIC, SEAD- Japan	Cognition and Dementia	6	281-286	2007
加藤隆司、伊藤健 吾、新畑 豊	「脳神経、核医学」特集 高齢者における画像診 断 ~高齢者にみられる画像変化を中心に~	日獨医報	52	460-469	2007

研究成果の刊行物・別冊

2-(2-[2-Dimethylaminothiazol-5-yl]Ethenyl)-6-(2-[Fluoro]Ethoxy)Benzoxazole: A Novel PET Agent for In Vivo Detection of Dense Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Patients

Yukitsuka Kudo¹, Nobuyuki Okamura², Shozo Furumoto¹, Manabu Tashiro³, Katsutoshi Furukawa⁴, Masahiro Maruyama⁴, Masatoshi Itoh³, Ren Iwata⁵, Kazuhiko Yanai², and Hiroyuki Arai⁴

¹Tohoku University Biomedical Engineering Research Organization (TUBERO), Sendai, Japan; ²Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; ³Division of Cyclotron Nuclear Medicine, Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University, Sendai, Japan; ⁴Department of Geriatrics and Gerontology, Center for Asian Traditional Medicine, Tohoku University School of Medicine, Sendai, Japan; and ⁵Division of Radiopharmaceutical Chemistry, Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University, Sendai, Japan

Extensive deposition of dense amyloid fibrils is a characteristic neuropathologic hallmark in Alzheimer's disease (AD). Noninvasive detection of these molecules is potentially useful for early and precise detection of patients with AD. This study reports a novel compound, 2-(2-[2-dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole (BF-227), for in vivo detection of dense amyloid deposits using PET. **Methods:** The binding affinity of BF-227 to amyloid- β (A β) fibrils was calculated. The binding property of BF-227 to amyloid plaques was evaluated by neuropathologic staining of AD brain sections. Brain uptake and in vivo binding of BF-227 to A β deposits were also evaluated using mice. For clinical evaluation of ¹¹C-BF-227 as a PET probe, 11 normal (healthy) subjects and 10 patients with AD participated in this study. Dynamic PET images were obtained for 60 min after administration of ¹¹C-BF-227. The regional standardized uptake value (SUV) and the ratio of regional to cerebellar SUV were calculated as an index of ¹¹C-BF-227 retention. The regional tracer distribution in AD patients was statistically compared with that of aged normal subjects on a voxel-by-voxel basis. **Results:** BF-227 displayed high binding affinity to synthetic A β 1-42 fibrils (K_i [inhibition constant], 4.3 ± 1.5 nM). Neuropathologic staining has demonstrated preferential binding of this agent to dense amyloid deposits in AD brain. Moreover, a biodistribution study of this agent revealed excellent brain uptake and specific labeling of amyloid deposits in transgenic mice. The present clinical PET study using ¹¹C-BF-227 demonstrated the retention of this tracer in cerebral cortices of AD patients but not in those of normal subjects. All AD patients were clearly distinguishable from normal individuals using the temporal SUV ratio. Voxel-by-voxel analysis of PET images revealed that cortical BF-227 retention in AD patients is distributed primarily to the posterior association area of the brain and corresponded well with the preferred site

for neuritic plaque depositions containing dense A β fibrils. **Conclusion:** These findings suggest that BF-227 is a promising PET probe for in vivo detection of dense amyloid deposits in AD patients.

J Nucl Med 2007; 48:553-561
DOI: 10.2967/jnumed.106.037556

Substantial neuropathologic evidence suggests that the deposition of senile plaques (SPs) and neurofibrillary tangles (NFTs) represents the characteristic neuropathologic hallmark in Alzheimer's disease (AD) (1). Progressive accumulation of SPs is considered fundamental to the initial development of dementia. Extensive deposition of SPs in the brain is present even in very mild AD and precedes the presentation of cognitive impairment (2,3). Several anti-amyloid drugs are under development for the treatment and prevention of AD (4). For early detection and preventive intervention for AD, noninvasive imaging of neuropathologic lesions is a powerful strategy.

For this purpose, several imaging techniques have been developed that can noninvasively detect SPs in the brain using PET, SPECT, and MRI. Among these imaging modalities, PET is the most advanced and practical method for in vivo measurement of SP depositions. To achieve successful imaging using PET, various radiolabeled agents have been developed. Currently, 6OH-BTA-1 (PIB) is the most successful PET agent for in vivo amyloid imaging. This tracer sensitively detects amyloid fibrils in the brain and is proven to be useful for early diagnosis of AD (5-7).

However, amyloid- β (A β) deposition is also frequent in aging, even in cognitively intact individuals. Excessive identification of A β has a potential risk to misjudge the normal aging process with abnormal A β deposition. In the

Received Oct. 23, 2006; revision accepted Jan. 20, 2007.
For correspondence or reprints contact: Nobuyuki Okamura, MD, Department of Pharmacology, Tohoku University School of Medicine, 2-1, Seiryomachi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan.
E-mail: oka@mail.tains.tohoku.ac.jp
COPYRIGHT © 2007 by the Society of Nuclear Medicine, Inc.

normal aging process, noncompact or diffuse amyloid plaques containing less fibrillar A β are deposited primarily in the brain. Brains from patients with AD are characterized by an anatomically widespread process of amyloid deposition and neuritic plaque formation containing dense amyloid fibrils (8). A shift of brain A β from the soluble to the fibrillar form is closely associated with the onset of AD (9). Therefore, selective detection of dense amyloid fibrils would be advantageous to differentiate the normal aging process from AD with high specificity.

We have previously demonstrated a novel series of benzoxazole derivatives as promising candidates for an in vivo imaging probe of SPs (10–12). These derivatives showed comparatively high blood–brain barrier (BBB) permeability, high binding affinity for A β aggregates, and high specificity for fibrillar A β deposits, suggesting potential merit for the early detection of AD-related pathologies. Herein we introduce an optimized derivative, 2-(2-[2-dimethylaminothiazol-5-yl]ethenyl)-6-(2-[fluoro]ethoxy)benzoxazole (BF-227), as a PET probe for in vivo detection of dense amyloid deposits in humans.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Compounds

BF-227 (Fig. 1) and its *N*-desmethylated derivative (a precursor of ^{11}C -BF-227) were custom-synthesized by Tanabe R&D Service Co. ^{11}C -BF-227 was synthesized from the precursor by *N*-methylation in dimethyl sulfoxide (Fig. 1) using ^{11}C -methyl triflate (13,14). After quenching the reaction with 5% acetic acid in ethanol, ^{11}C -BF-227 was separated from the crude mixture by semipreparative reversed-phase high-performance liquid chromatography and then isolated from the collected fraction by solid-phase extraction. The purified ^{11}C -BF-227 was solubilized in isotonic saline containing 1% polysorbate-80 and 5% ascorbic acid. The saline solution was filter-sterilized with a 0.22- μm Millipore filter for clinical use. The radiochemical yields were >50% based on ^{11}C -methyl triflate, and the specific radioactivities were 119–138 GBq/ μmol at the end of synthesis. The radiochemical purities were >95%.

In Vitro Binding Assays

Binding affinities of the compounds for synthetic A β 1-42 aggregates were examined as described previously (10). Briefly, solid-form A β 1-42 (Peptide Institute) was dissolved in 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) and incubated at 37°C for 40 h. The binding assay was performed by mixing 100 μL of aggregated

A β 1-42 with the appropriate concentration of ^{125}I -labeled 2-(4-methylamino)styryl-5-iodo-benzoxazole (BF-180) and 8% ethanol. After incubation for 4 h at room temperature, the binding mixture was filtered and filters containing bound ^{125}I ligand were counted using a γ -counter. The dissociation constant (K_d) and maximum specific binding (B_{max}) of BF-180 were determined. For inhibition studies, binding studies were performed using synthetic A β 1-42 aggregates. A mixture containing 50 μL of BF-227, 50 μL of 0.05 nM ^{125}I -BF-180, 100 μL of 100 nM A β 1-42, and 800 μL of 8% ethanol was incubated at room temperature for 4 h. The mixture was then filtered through Whatman GF/B filters, and filters containing bound ^{125}I ligand were counted in a γ -counter. Values for the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) were determined from displacement curves of 3 independent experiments using Prism software (GraphPad), and values for the inhibition constant (K_i) were determined using the Cheng–Prusoff equation.

Measurement of Octanol/Water Partition Coefficients

Phosphate-buffered saline (PBS) and 1-octanol (Wako) were saturated with 1-octanol and PBS, respectively, before use. BF-227 was dissolved in 1-octanol and shaken with equal amounts of PBS for 30 min at room temperature. After centrifugation at 2,000 rpm for 15 min, absorbency of the 1-octanol layer was measured at the peak wavelength of the absorbance spectrum of BF-227 using a Spectra Max 190 microplate reader (Molecular Devices). Octanol/water partition coefficients were determined by comparing absorbency with that before shaking with PBS. Each data point was performed in duplicate.

BBB Permeability of BF-227 in Normal Mice

Brain uptake of BF-227 was measured using ^{11}C -labeled compound. The ^{11}C -BF-227 (1.1–6.3 MBq) was administered into the tail vein of male C57B6 mice ($n = 23$; mean weight, 28–32 g). Mice were then sacrificed by decapitation at 2, 10, 30, and 60 min after injection. The whole brain was removed and weighed, and radioactivity was counted using an automatic γ -counter. The percentage injected dose per gram of tissue (%ID/g) was calculated by normalizing tissue counts to tissue weight. Each %ID/g value is expressed as a mean \pm SD of 3 or 4 separate experiments.

Neuropathologic Staining

Postmortem brain tissues from a 69-y-old man with autopsy-confirmed AD and an 81-y-old man with autopsy-confirmed physiologic aging were obtained from Fukushima Hospital (Toyohashi, Japan). Experiments were performed under the regulations of the ethics committee of BF Research Institute. Serial sections (6- μm thick) from paraffin-embedded blocks of temporal cortex, striatum, and cerebellum were prepared in xylene and ethanol. Before

FIGURE 1. Chemical structures of BF-227 and BF-168 and radiosynthesis of BF-227.

