

担う重要な研究分野と考えられている。

米国では、2003年秋、NIHが今後の研究の方向性をロードマップという形で発表した。分子プローブの開発とイメージング技術の展開に向けて研究施設とプログラムを設立し、分子イメージングに関する様々な研究開発体制を整えている。また米国エネルギー省は2003年夏に25年間の戦略的計画を公表し、その中で、病気の診断、治療、非侵襲的医学イメージング、バイオメディカル工学のための新しい診断治療の技術開発を行うことを表明している。一方、英国では、インペリアルカレッジがグラクソスミスクラインと共同で、ハマスミス病院に隣接して約150億円をかけて、世界的な規模のイメージングセンターを設立している。新薬のスクリーニングから臨床試験に至る全ての過程に分子イメージングの手法を導入することを目指した本格的な施設である。またスウェーデンのウプサラ大学では、独自のPET技術を基盤にGEとのジョイントベンチャーを設立し、創薬に関連した分子イメージング研究を熱心に行っている。さらに、欧米の巨大製薬企業が、薬剤開発のスピードアップを念頭に、創薬の過程に分子イメージング技術の導入を既に開始している。また、米国FDAも2006年1月に、探索的INDの指針を出して、分子イメージング導入による創薬の加速化を企図している。

我々は、科学技術振興機構の国際共同研究(1993~1997年、研究代表者：渡辺恭良)、日本学術振興会の未来開拓学術研究事業(1998~2003年、プロジェクトリーダー：渡辺恭良)、文部科学省学術創成研究(2001~2006年、研究リーダー：鈴木正昭 岐阜大学教授、サブリーダー：渡辺恭良)のプロジェクトを中心に、PETを用いた分子イメージング研究を行い、多数の標的分子をイメージングするための分子プローブ作りを行ってきた。しかし現状では、追跡できる分子は追跡したい分子の数%にも満たない。まさに、効率の良い分子プローブ設計・合成とそのイメージングによる評価を統合した研究体制と、そのための拠点作りが肝要で

ある。2003年より理化学研究所の野依良治理事長を中心に、我が国の分子イメージング研究体制と拠点構想作り(分子イメージング研究検討会：委員長/渡辺恭良)を行い、文部科学省により、平成17年度から分子イメージングプログラムの予算化が行われ、創薬候補物質探索拠点として理化学研究所が、PET疾患診断研究拠点として放射線医学総合研究所が選出された。現在、この両拠点を中心にオールジャパンでの研究体制作りを行い、国際協力を行っていくための多くの方策がとられつつある(図1)。

2006年には、日本分子イメージング学会も設立され、益々この分野の重要性が認識されて、研究が加速されてきた。我が国が国際社会を牽引して発展すべき分子イメージング研究を阻害する一番の要因は、新しい化合物をFirst-in-manへ導入する際の安全性試験体制の整備(欧米型のmicrodosing concept,あるいは、米国FDA型のexploratory IND)であったが、その点も、杉山雄一委員長をはじめ多彩なメンバー構成でオールジャパンの指針が固まり、厚生労働省のmicrodosing試験指針作成班(大野泰雄班長)での討議を受け、2007年秋には厚生労働省により一定の方針が出される運びとなってきた。

この期において、効率良い標識化合物の合成法を開発し、従来の低分子化合物ばかりでなく、抗体医薬、核酸医薬、ひいてはゲノム創薬につながるEBMのために、高分子物質にまで分子プローブレパートリーを広げ、ほとんどの分子を生体で追跡できるプラットフォームを構築していくことが重要である。以下、それぞれの観点において、現在までに我々が開発してきた技術・最新知見と今後の展望を述べる。

創薬へ

一新発見脳型プロスタサイクリン受容体のPET研究を例に

動物・ヒトで同一個体での薬物動態を研究できること、ヒトにおける薬物送達システム(DDS)の開発、標的分子以外への集積を知る

図1 文部科学省分子イメージング研究プログラムの2拠点体制 (H17~21 年度)

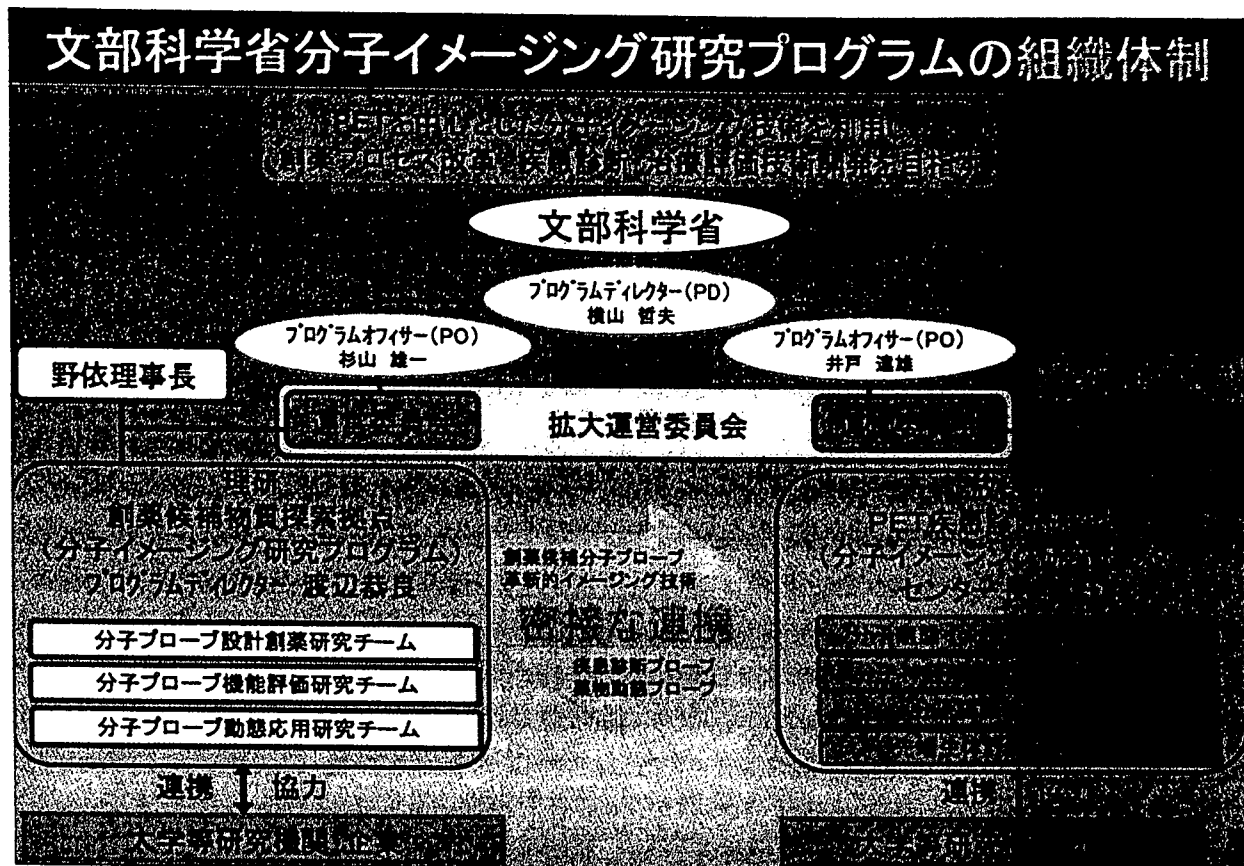


図2 病態科学と創薬における分子イメージングの活用

病態科学と創薬における分子イメージング (Summary)

1. 現病態について臓器機能別診断が可能
2. 病因により肉迫、超早期診断、鑑別診断が可能
3. 症状の重度・進行に伴う分子追跡が可能
4. 薬物動態(DDS, PK/PD)を霊長類・ヒトで解析できる
5. 標的臓器・細胞・分子への到達を個で見ることが可能
6. 個への用量設定、SNP解析との照合が可能
7. 標的臓器以外への集積による副作用情報
8. 薬剤の作用機構の確定が可能
9. 臨床治験早期に開発停止が可能

だが、すべては、如何に早くPET分子イメージングを導入できるかにかかっている!!

ことによる副作用情報、治療効果の標的分子に対する定量的把握、ゲノム情報との適合と乖離、複合医薬の検定等々、創薬に果たす分子イメー

ジングの役割は多大である(図2)。

ただ、研究の現状をみると、如何に(どのような研究体制で)最適な分子プローブのレパー

トリーを作るか、どのように創薬の早い時期で分子イメージングの導入を図るか、解決すべき問題が山積している。ここでは、主に生体分子イメージングの創薬への有用性について、我々がオリジナルに開発した脳型プロスタサイクリン受容体の研究を例示して説明したい。

我々は、以前から脳におけるプロスタグランジン (PG) 類の役割に関する研究を行っていた。その研究の中で、1992年、脳内にプロスタサイクリン (PGL₂) 結合部位を発見した。この脳内中枢型プロスタサイクリン受容体 (IP₂) は、脳幹部に密度濃く存在するものは末梢神経細胞で生合成されて、軸索輸送で運ばれることが判明した¹⁾。さらに、当時開発されたいくつかのアゴニストの³H標識化合物を用いて脳内のIP₂について検討したところ、どうもリガンド化学構造の認識が違う2種類の受容体があることを発見した²⁻⁴⁾。この際、すでに行ってきたプロスタグランジン受容体のPET研究により、代謝安定な位置の炭素原子に¹⁴C標識を入りたいと願望したことから、当時、名古屋大学理学部でプロスタグランジン類の3成分連結法を完成した野依、鈴木両先生と共同研究を開始するに至った。PET用¹⁴C標識化合物の候補として、代謝耐性を中心に考案した(15R)-(m-Tolyl)-17, 18, 19, 20-tetranorisocarbacyclin (15R-TIC) が、特にIP₂に対する親和性が強く、脳幹部にある末梢神経細胞由来のプロスタサイクリン受容体 (後にIP₁と同一と判明) と異なるリガンド特異性を示すことを見いだした³⁾⁴⁾。また、TIC類の構造-結合親和性相関研究の過程で、15位の水酸基を除去した15-deoxy-TICが15R-TICよりも10倍高いIP₂結合親和性を示すことも見いだした⁵⁾。この受容体 (IP₂) は、これまでに末梢臓器 (胸腺、脾臓、血管内皮、血小板など) で見いだされ分子クローニングされたもの (IP₁) と異なることが、IP₁ノックアウト動物で判明した。また、神経細胞の化学破壊実験から、このIP₂はグリア細胞でなく一部の神経細胞に存在することが明らかになった。さらに、TIC類を用いた機

能研究から、海馬由来初代培養神経細胞の高酸素条件下で誘発される神経細胞死 (アポトーシス) に対して強い抑制効果を示すこと⁶⁾ や *in vivo* 脳虚血下での神経細胞保護作用⁷⁾⁸⁾、さらにはラットを用いたアルツハイマー病行動モデルでの進行抑制効果など、注目すべき機能を示すことが見いだされた (図3)。最近になり、この薬効作用は、カニクイザルの中大脳動脈結紮-再灌流モデルを用いたPET研究⁹⁾¹⁰⁾ によって明らかになり、Stroke誌の表紙を飾った¹¹⁾ (図4)。

この受容体 (IP₂) をPETで解析していく手順はまさに、分子イメージングを用いた新規薬物開発のためのほとんどすべての過程を包含している。まず超微量 (1回の合成には、ビールの泡の一滴のようなボリューム) の [¹⁴C] ヨウ化メチルを過剰のトリブチルフェニルスズで捕捉する Stille 型 sp²-sp³ カップリングによる高速メチル化反応の開発に挑んだ。約5年に渡る条件検討の結果、触媒系として Pd₂(dba)₃/P(o-CH₃C₆H₄)₃/CuCl/K₂CO₃ を使い、65℃の加熱下5分間で15R-[¹⁴C]TICメチルエステルを85%の高収率で得ることに成功した (図5)¹²⁾。一方、これまでの化学で標識できた方法¹³⁾ は、カルボン酸の位置に [¹⁴C]メチルエステルを導入したもので、これは、体内でエステラーゼにより加水分解を受けて、放射活性を有した部分は [¹⁴C]メタノールになり、受容体の分布などの画像が得られない。新しい化学反応の創製がPET研究の重要な成否の分水嶺となる。

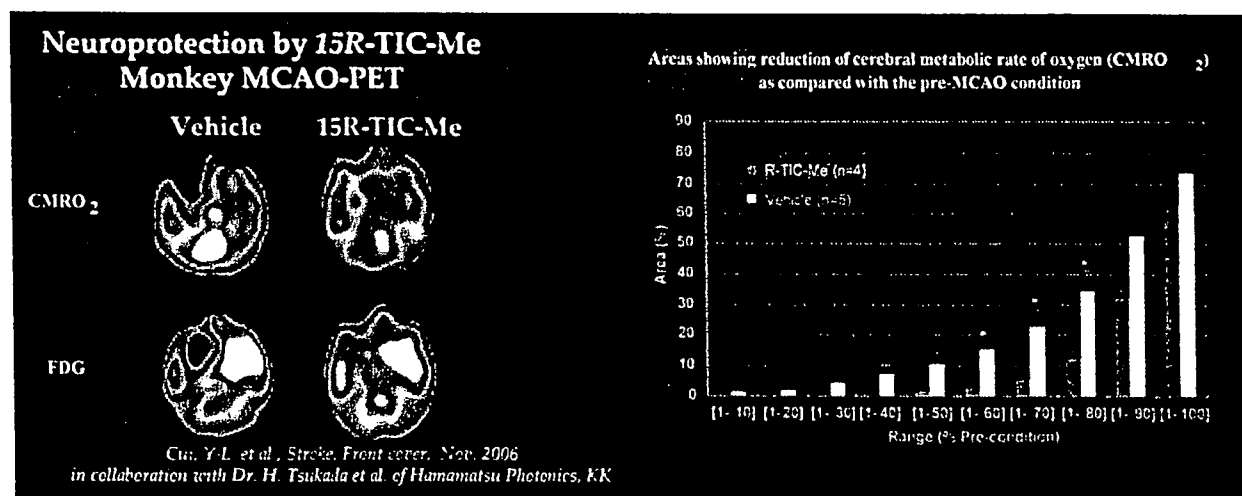
ここで、同一個体のサルに15R-[¹⁴C]TICメチルエステル、15R-[¹⁴C]TIC (カルボン酸)、15R-TIC-[¹⁴C]メチルエステルの3者を順次合成し、¹⁴Cの体内からの消失を確認できる2時間おきに投与し、PET研究を行う (図6, Watanabe Y, et al: manuscript in preparation)。この場合は、受容体に結合する active drug である15R-[¹⁴C]TIC (カルボン酸) (図6中) は血液脳関門を通過しにくく、pro-drug型と考えられる15R-[¹⁴C]TICメチルエステル (図6左) が脳神経細胞に到達し、15R-TIC-

図3 新発見脳型プロスタサイクリン受容体の成果概要

CNS type of prostaglandin I₂ receptor (IP₂)

- recently found by our group in the course of PET study (J. Biol. Chem., 1996)
- ligand specificity quite different from that of peripheral/PNS type PGI₂ receptor (IP₁)
- the specific ligands for IP₂ (Angewandte Chemie, 1996; J. Neurochem., 1999) : 15R-16m-tolyl-isocarbacyclin (15R-TIC), very high-affinity site (K_d = 0.9 nM) and high-affinity site (K_d = ca. 30 nM) ; 15-deoxy-16m-tolyl-isocarbacyclin (15D-TIC), very high-affinity site (K_d = 0.9 nM)
- stimulated expression in IP₁ knockout mouse brain (in collaboration with Prof. Narumiya's lab. in Kyoto University)
- localized in most of cortical regions, especially in the cingulate and piriform cortices, caudoputamen, lateral septal nucleus, thalamic nuclei, med. and lat. geniculate body, dorsal cochlear nucleus, and dentate gyrus, CA1 and CA3 regions of hippocampus (J. Neurochem., 1999)
- exist mainly in neurons (data from kainate lesion, J. Biol. Chem., 1996)
- protective effects on neuronal cell death (Eur. J. Neurosci., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999; Brain Res., 2002)

図4 カニクイサル中大脳動脈結紮-再灌流 (MCAO) モデルにおける脳梗塞巣の広がり PET による解析 (酸素消費率とグルコースの取り込み, 左) と健常側の血流値の%で表した梗塞領域広がり 的定量的解析結果 (右)

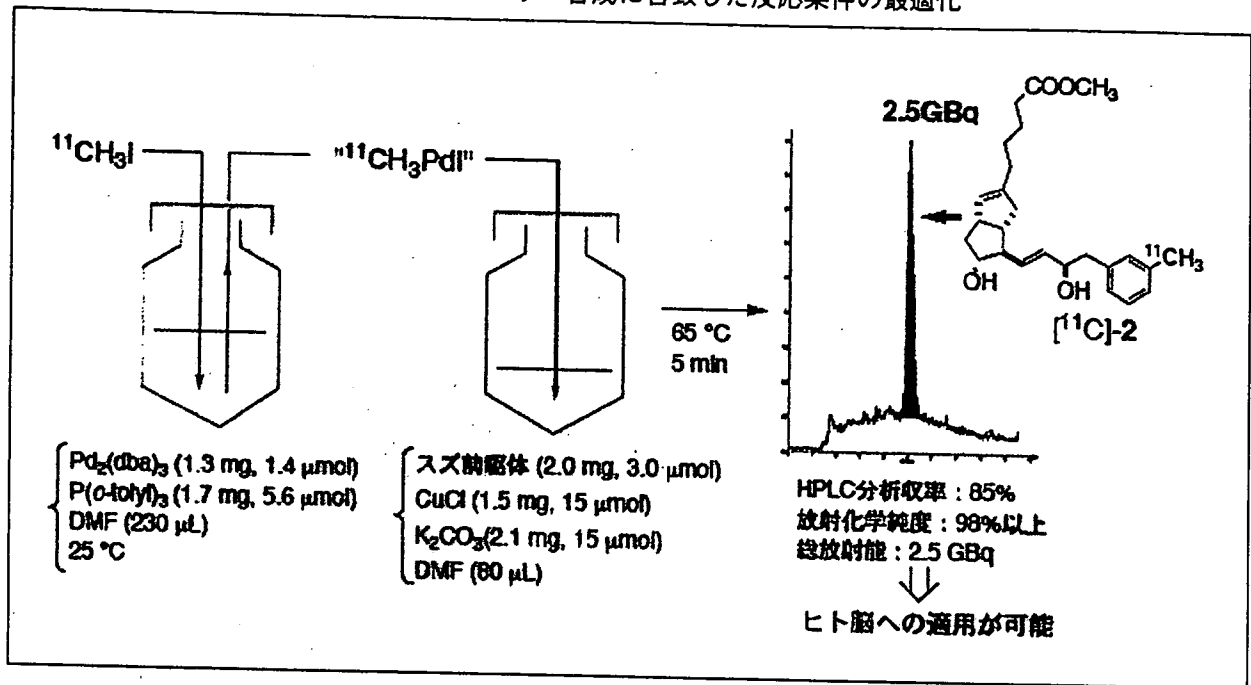


15R-TIC-Me (50μg/kg i.v. dose) の明確な保護効果を認める¹¹⁾。

[¹¹C] メチルエステルの例 (図6右) と比較すると、脳内でこのメチルエステル部分が加水分解されて受容体の存在密な領域に蓄積することがわかる。どの程度が受容体結合を表すかは、試験管内で行うような競合的置換 (displace-

ment) 実験 (図7, Watanabe Y, et al: manuscript in preparation) の結果、保証される。この典型例は、簡単な DDS の研究例としても受け入れられ、基本的に、これらの標識位置の異なる同一化合物や誘導体を用いた PET 研究

図5 高速 C-メチル化反応と PET トレーサー合成に合致した反応条件の最適化



から、Pharmacokinetics (PK) 情報を得ることができる。ヒトを対象にしては、従来の方法論だけでは血液中の情報に留まっていたが、ヒトであるいは患者個人においても、血液中・臓器中（薬物の標的臓器中）の動態を追跡できることが、薬物開発におけるブラックボックスを減らすことになる（図8, Watanabe Y, et al: manuscript in preparation）。

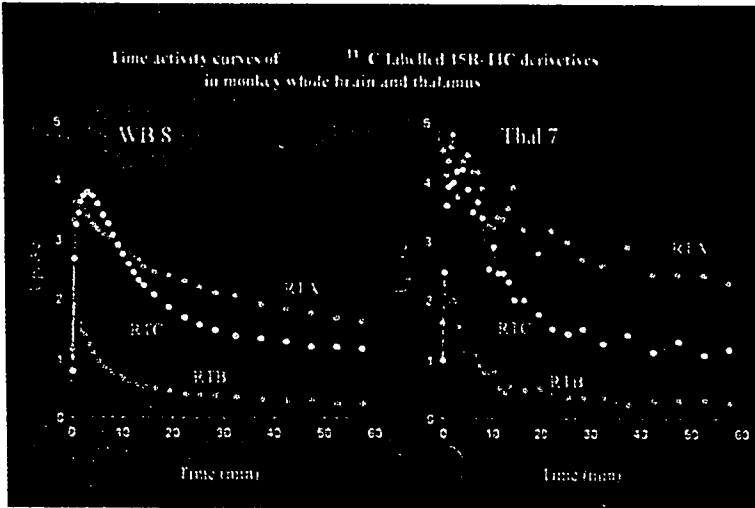
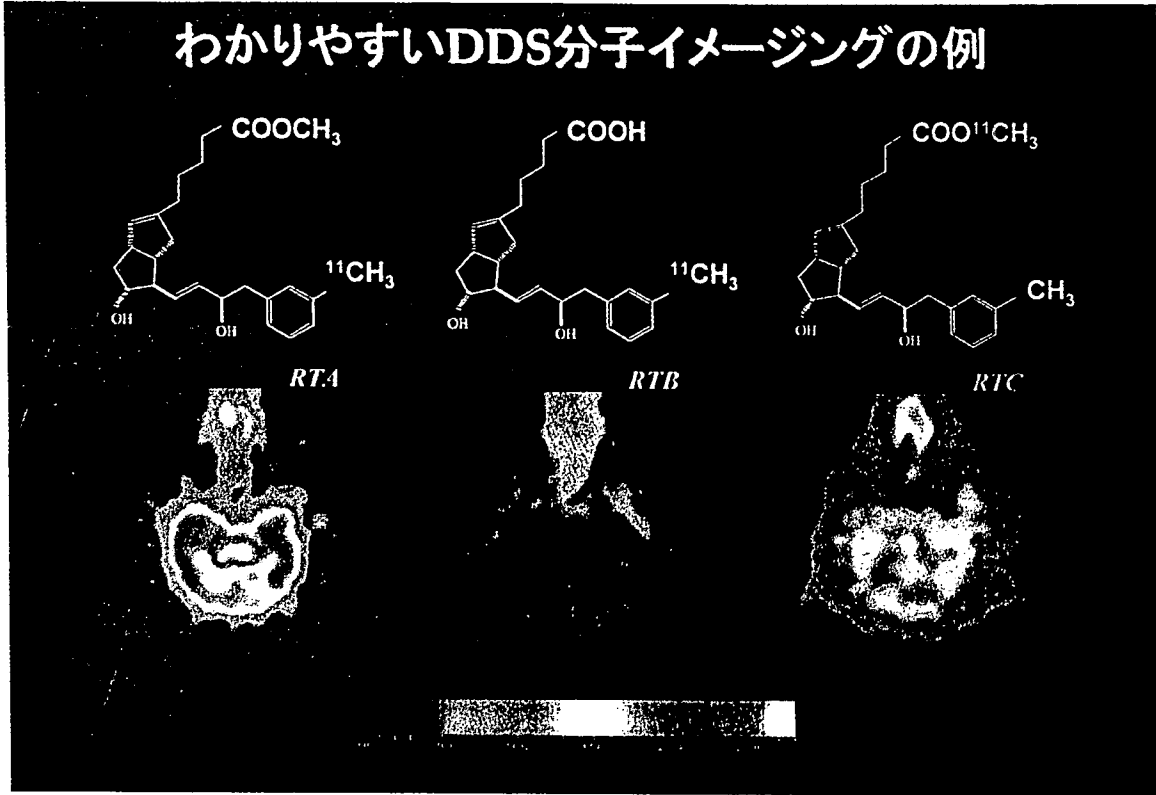
この PET 研究は、上記のサル脳梗塞モデルでの薬効研究とともに、パーキンソン病モデルサル視床での結合数増加を見だし（Onoe H, et al: manuscript in preparation）、microdosing concept のもとにヒト PET 研究に進み、プロスタサイクリンでもう一つ研究されている機能である痛覚過敏（痛覚の伝達機能）を示した成果（Watanabe Y, et al: manuscript in preparation）や神経細胞死が起こってくる神経変性疾患（アルツハイマー病やパーキンソン病など）での臨床研究を開始している（Ataka S, et al: manuscript in preparation）。

βアミロイドの生体分子イメージング

PET を用いた生体分子イメージングによって、生体分子染色とでも言うべき方法論が開発

されてきた。アルツハイマー病（AD）における2大病理所見である老人斑と神経原繊維変化は、その中から抽出された主成分として、βアミロイドペプチド（蛋白）、リン酸化タウ蛋白がそれぞれあげられる。これらの物質の蓄積に関する経時変化と神経細胞死・病状の進行との関連については、様々な議論があるが、ヒト病態においてはまだ詳細な時系列測定が行われておらず、トランスジェニックマウスや培養神経細胞などを用いた実験や投与実験からの推測であることが多い。ことに、βアミロイドの蓄積に関しては、軽度認知障害 Mild Cognitive Impairment (MCI) よりも前から起こってくる事象、すなわち、病因に絡む事象として、古くから注目を浴びてきたが、実際の AD 発症患者で、予知的なデータはまだ得られていない。これは、AD 発症の分子基点を探るためにも重要なポイントである。そのような要請の中で、βアミロイドの蓄積を PET 等の分子イメージング手法で定量化しようという試みが、我々の研究を含めて世界各地で行われてきた。その中から、チオフラビン系化合物を開発してきたピッツバーグ大学とウプサラ大学が共同して、AD 患者におけるβアミロイドに特異的な

図6 標識位置の異なる同一分子（上左 RTAと上右 RTC）と実際に受容体に結合する active drug（上中央 RTB）の同一アカゲサルにおける PET イメージング

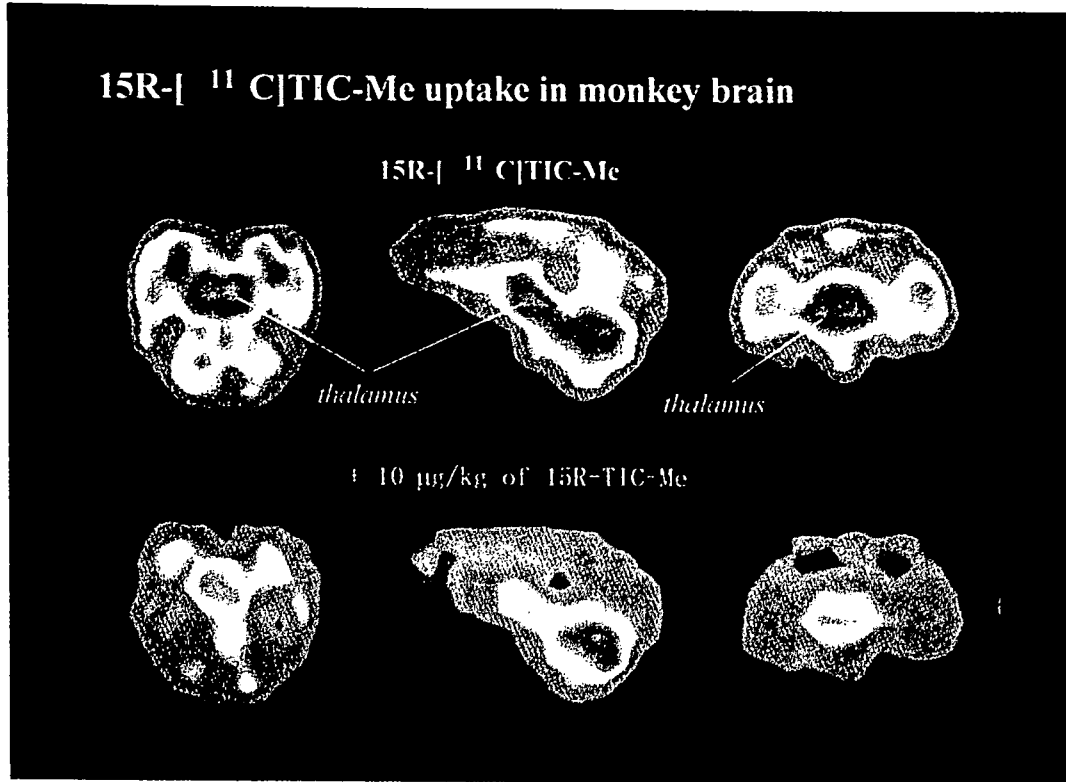


左のグラフは、上の3者の PET 実験から脳全体 (WB8) と視床 (Thal7) における3者の時間-取り込み曲線を示したもの。これらと血液中のデータから定量解析を行う。

PET イメージングに成功した¹⁴⁾。現在、我々のプログラムも含めて世界各国で、MCIと診断される患者や健常老齢者の多施設追跡研究が行われている。数年後には、数100例の追跡研究から様々な新知見が得られると思われる。すでに、ワクチン等の治療効果を判定する臨床研究に分子イメージングが導入されている。理研-大阪市立大学のチームでは、図9に示すように、臨床PET研究が進展し、βアミロイド

蓄積の定量化が行われている。AD患者では、大脳皮質（前頭前野、外側側頭葉、直回）のアミロイド蓄積の平均である Mean Cortical Distribution Volume Ratio (MCDVR) は 1.43 ± 0.37 (n=10) であった。健常者では白質に非特異的集積が強く見られたが、皮質の集積は少なく、MCDVRは 1.12 ± 0.19 (n=7) でAD群と比べ有意に低値であった。MCIはADと健常者のいずれかに類似の集積が認められ、

図7 サル脳における PET 研究：非標識体による競合実験の結果



標識化合物 15R-[¹¹C]TIC メチルエステルを投与（この場合、投与化合物量として 0.12µg/kg i.v. dose）して PET 研究を行い（上3図、左より水平断面、矢状断面、前額断面）、続いて、2時間おいて、同じアカゲサルに 15R-[¹¹C]TIC メチルエステル（同量）+非標識 15R-TIC メチルエステル 10µg/kg i.v. dose を投与し PET 研究を行った（下3図）。視床部分の受容体（脳型 IP₂ と考えられる）はかなりの部分が displace されるが、脳幹部の末梢神経由来と考えている IP₁ には親和性が低いので、ほとんど非特異的結合としてこの量の非標識体の投与では変化しない。

MCDVR は前者では 1.36 ± 0.25 (n=12) であり、アミロイドの蓄積の程度により MCI 患者が2群に分けられた。今後の追跡研究により、このアミロイド蓄積 MCDVR 値と AD 予知、認知症状の進行具合との比較がなされる。AD 以外の認知症では、レビー小体型認知症 (DLB) ではアミロイド蓄積が認められ (n=4のうち2例に)、前頭側頭型認知症 (FTD) (n=2) では余り蓄積を認めない。これらの認知症の間で βアミロイド蓄積のパターンが異なるので、鑑別診断に利用可能である。また、MCDVR は髄液 Aβ₁₋₄₂ とは有意な負の相関 (P<0.03) を認め、髄液 tau, p-tau とは正の相関傾向が認められた¹⁵⁾。

慢性疲労の分子イメージング

前病状態・未病状態で疾病の予兆を予知し、治療法や回復法を開発することで、病気への水際でこれを防ぐことが医療費の削減、健康寿命の延伸につながる。3大生体アラームである痛覚、発熱、疲労のうち、痛覚、発熱についてはその分子神経メカニズムがかなり明らかにされてきているが、疲労については未だ知見が少なかつた。我々は、動物モデルでの疲労状態（図10：ラット過労モデルのグルコース取り込み低下¹⁶⁾、サルの断眠疲労モデルでの GABA-BZD 受容体変化）、健常者の疲労負荷前後や、慢性疲労症候群患者と健常者の比較により、主に脳機能イメージングと分子イメージングでこの問題に迫っており（図11~14）¹⁷⁻¹⁹⁾、前帯状回と

図8 ヒトでの同様の PET 研究から計算した Pharmacokinetics

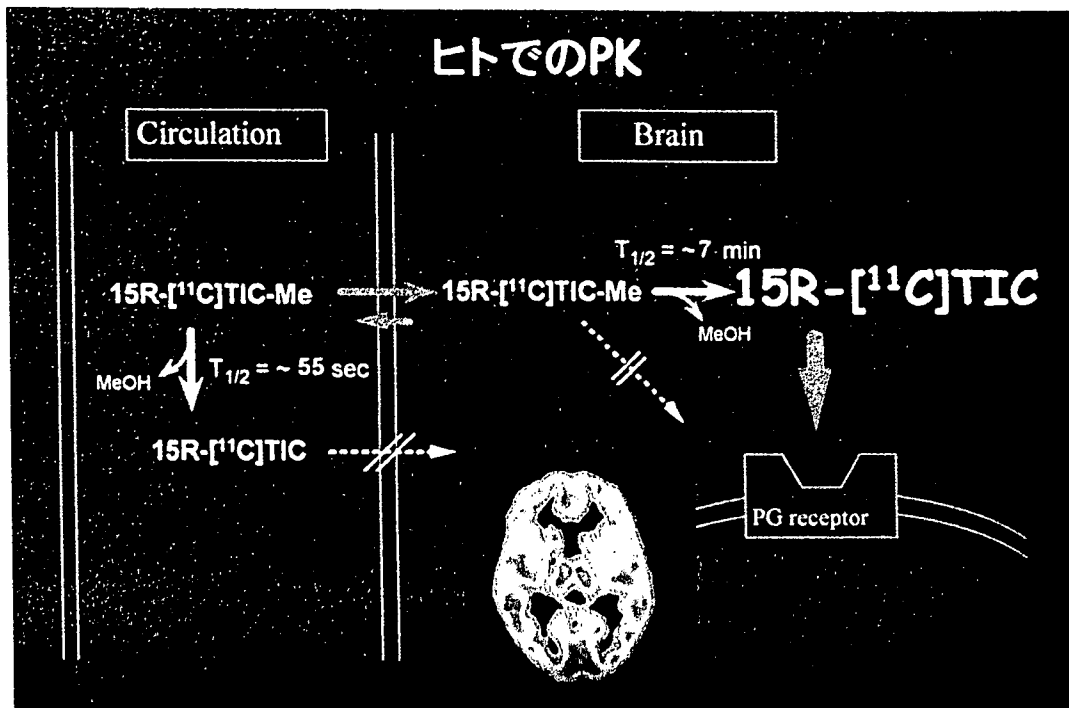
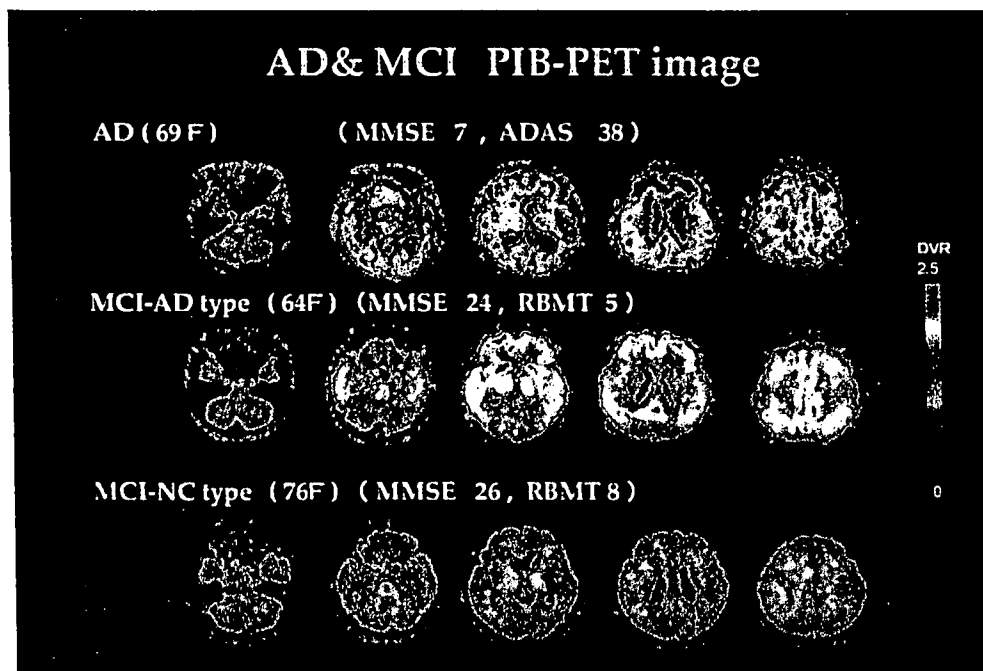


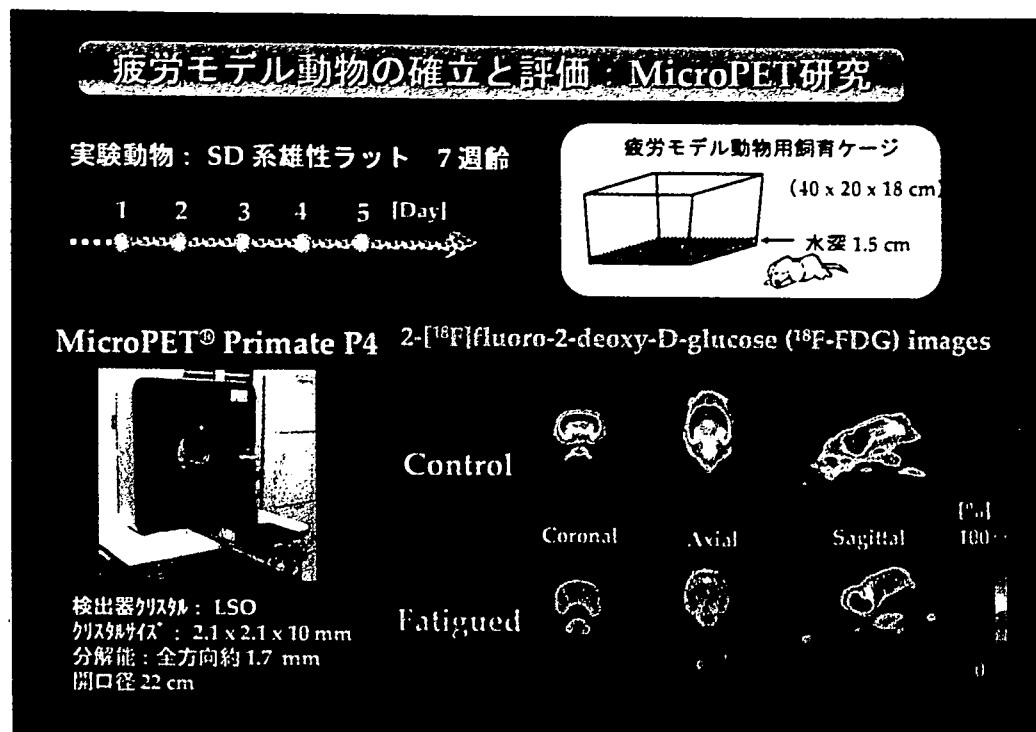
図9 アルツハイマー病患者 (AD) とβアミロイド蓄積状況の異なる軽度認知障害患者 (MCI) の [^11C]PIB を用いた PET 研究 (大阪市立大学大学院神経内科・核医学・脳神経科学教室との共同研究による)



前頭前野の機能低下が慢性疲労の実態である可能性を示唆している。特に、前帯状回のうち前部セグメント (セクター) が問題となり、ここでセロトニン神経系の異常が明らかになった

(図15)²⁰⁾。この場合、遺伝子多型解析からは、セロトニントランスポーターのプロモーター領域にある核酸の繰り返し配列が慢性疲労症候群患者で長いヒトが多い²¹⁾ ことより、セロトニン

図10 ラット過労モデルのグルコース取り込み低下



ラット過労モデルにおける 2-[¹⁸F]fluoro-2-deoxy-glucose (FDG) 取り込みの顕著な低下 (疲労負荷前の 40% 程度に落ちる) と早い回復過程を microPET で追跡できる¹⁶⁾。

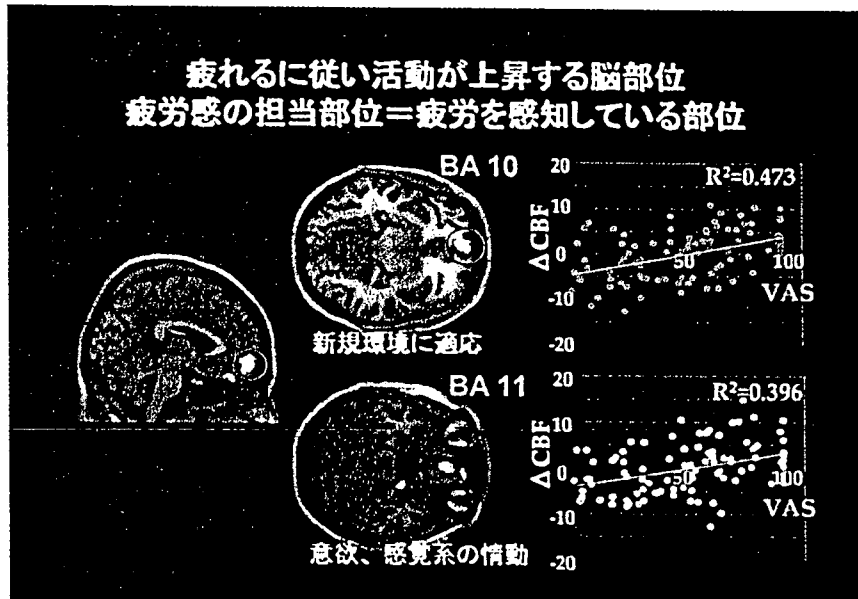
トランスポーターの発現が高率であるかと想像されたが、実際は、前部前帯状回でのセロトニン神経終末の減少によりセロトニントランスポーターの密度も低いと考えられた。このような研究成果は、まさに Genotype の解析だけではだめで、分子イメージングでの実証が必須であることを示しており、ライフサイエンス/医学のパラダイムシフトを意味する。なお、この前帯状回の機能低下は、「緑の香り」などの抗疲労要素で抑えられることも判明した (図16)²²⁾。アロマセラピー効果など多数の抗疲労研究が可能である。

発達障害に対する治療効果の分子イメージング研究

小児自閉症は、広汎性発達障害といわれ、生後発達乳幼児期の社会性・コミュニケーション発達障害により言語・認知能力の発達遅れが悪循環する疾患である。顕著な異常行動も含めて、生後初期のモノアミン系の低形成が推測されてきた。我々は、モノアミン生合成酵素の補酵素

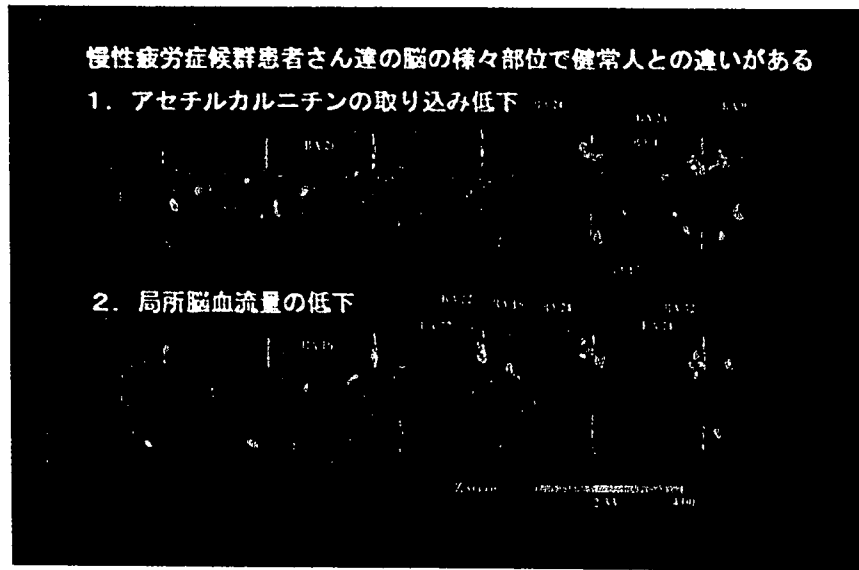
であるテトラヒドロバイオプテリン (BH₄) という生体内物質が、自閉症児の脳脊髄液で低下しており、半数程度の患児に投与効果があることから、この治療効果を PET でドーパミン系をモニターにして検出する研究を開始した。3~7才の患児6例でのスウェーデン・ウプサラ大学 PET センターとの共同パイロット研究では、自閉症児のドーパミン系神経終末の脳各部位への張り出しの未発達を示唆する結果を得た²³⁾。さらに12例の自閉症児に対し、より長い6ヶ月の BH₄ 治療の二重盲検クロスオーバー試験を行った。PET 検査は、0ヶ月、6ヶ月、12ヶ月の3回行い、それぞれの回において、H₂¹⁵O を用いた脳局所血流量、L-[¹¹C]DOPA を用いたドーパミン生合成・代謝回転速度、N-[¹¹C-メチル]スピペロンを用いたドーパミン D₂ 受容体結合指数を検査した。これらを MRI で撮像した解剖学的画像上に貼り付けて、58の関心領域 (脳部位) での各値を計算した。3~7才児の貴重な PET データであり、これまで全くなされたことのない貴重な研究なの

図11 疲れを感じる脳部位



健常被験者 12 名に 2 時間の視覚疲労課題を課し、PET による脳局所血流量を計測しつつ、疲労度を記入させた。疲労感が募るとブロードマン 10 野と 11 野の一部が疲労度に相関して活動が上昇した。疲労感の中核。

図12 慢性疲労症候群におけるアセチルカルニチンの取り込み低下と脳局所血流量の低下

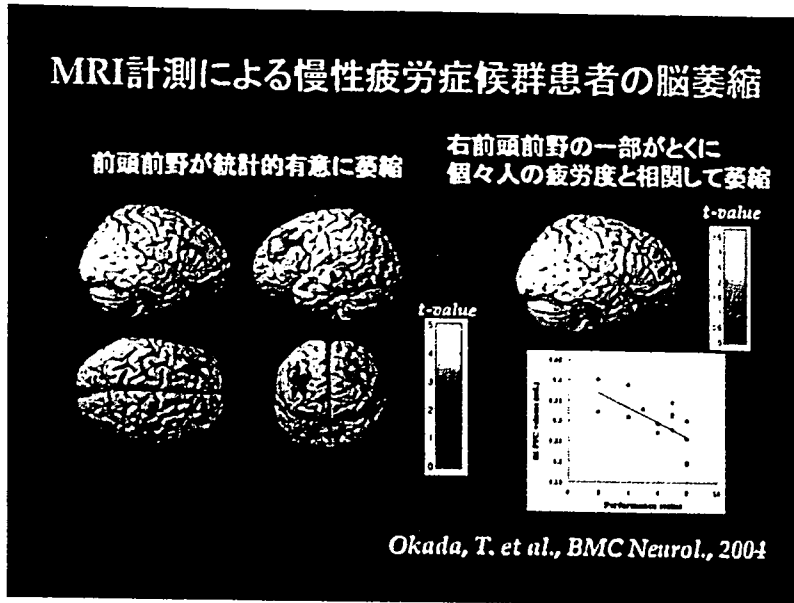


慢性疲労症候群患者と健常者（8 名ずつ）の遊離グルタミン酸プールと脳局所血流量は、前頭前野や前帯状回で統計的有意な低下を示した¹⁷⁾。

で、まず、自閉症の様々な症状をスコア化して、脳の様々な部位での上記 3 項目について相関性などを検討した。いわゆる自閉症の重篤度の指標である Childhood Autism Rating Scale (CARS) と有意に相関を示したのは、扁桃体のドーパミン生合成・代謝回転速度で、重篤である患児ほど扁桃体のドーパミン系の低下（未発達）が見られた（図 17）。扁桃体は、自閉症の研究で最も注目を浴びている脳部位で、発達時の情動による次の発達段階への意欲などの起源として捉えられている。

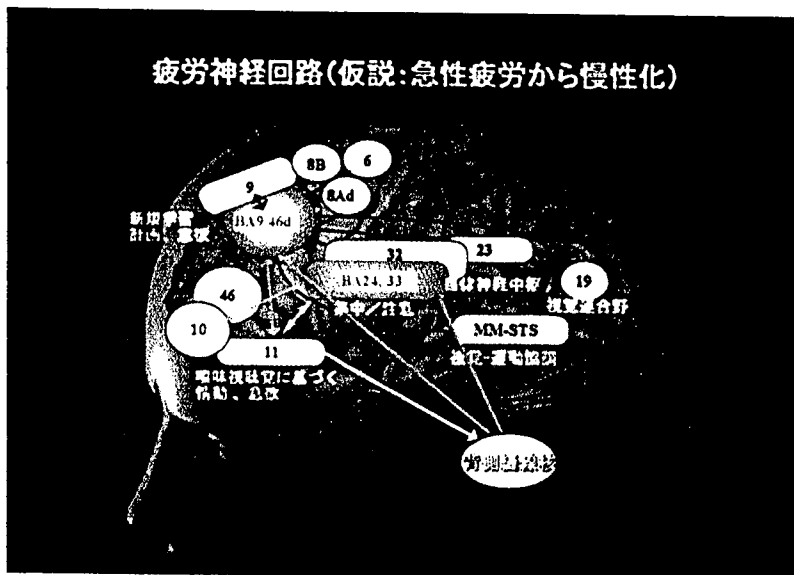
6 ヶ月の BH₄ 治療により、特に、社会性の項目での改善効果が有意に見られた²⁰⁾。BH₄ 治療後の PET の結果をプラシーボ群と比較すると、やはり発達の悪かった前帯状回のドーパミン生合成・代謝回転速度の改善が有意に見られた（図 18A）。また、背外側前頭前野の脳局所血流量の増加も有意な治療効果として見いだされた（図 18B）。これらの結果から判断し、発達段階の自閉症児には扁桃体などのドーパミン入力の異常があり、BH₄ の補充によりこれらのモノアミン系を賦活すると、社会性の発達は

図13 fMRI を用いて慢性疲労症候群患者の易疲労性に関する研究¹⁸⁾を行った際に morphometry の手法で発見した脳萎縮部位



慢性疲労症候群患者には両側の前頭前野に健常者に比し有意な萎縮が見られ、特に右前頭前野の一部では疲労度と相関して萎縮が強い¹⁸⁾。

図14 これまでの健常者の疲労から慢性疲労症候群患者の脳で見られる知見を整理して作った慢性疲労に陥る神経回路の問題の作業仮説 (渡辺による)

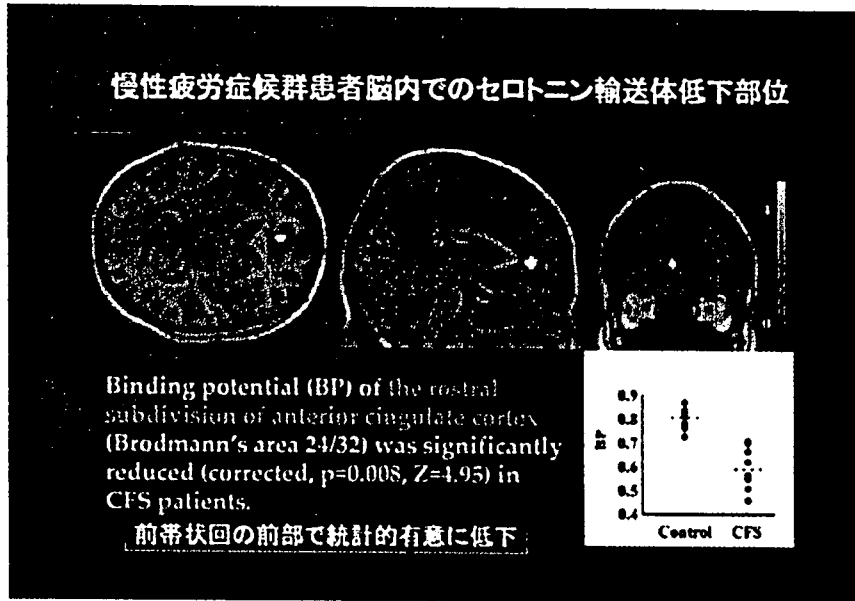


正が起こることが明らかになった。BH₄ は、セロトニン系の生合成の補酵素でもあるので、今後は、現在断片的に行われつつあるセロトニン系の発達についても、実際に発達段階に起こっていることを PET 等の非・低侵襲的方法論で追跡していきたい。この例では、治療薬の有効性を実際の患者の脳内の変化で証明できたわけで、治療薬の薬効のメカニズムも実証できることを示している。

代謝安定型高速¹⁴C-メチル基導入法の開発
—ほとんどすべての有機化合物への
[¹⁴C] 放射性同位元素の導入—

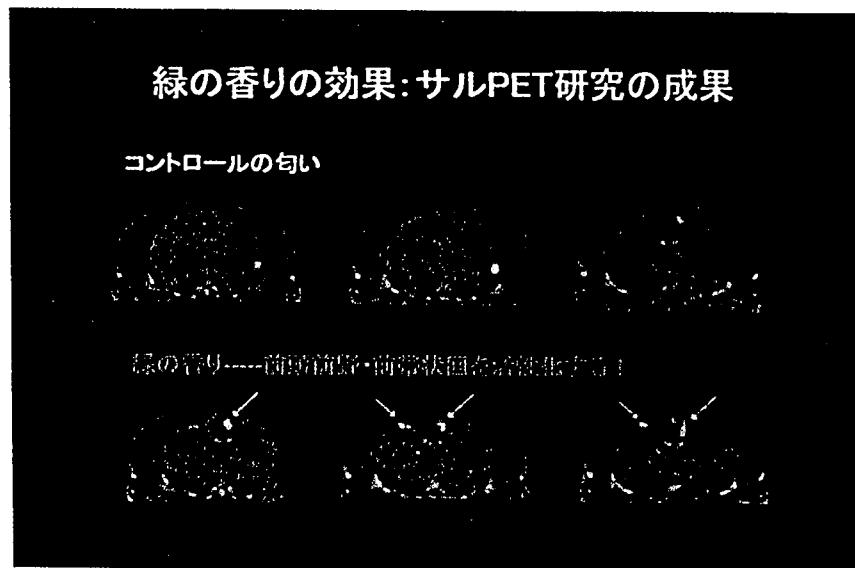
¹⁴Cの利用は、すべての有機化合物がその構造中に炭素原子を有していることから、低分子化合物の PET プローブ化には理想的なポジトロン崩壊核種である。また、¹⁴C (半減期約 20 分) を用いると、同じ合成装置で一日に何度も

図15 $[^{11}\text{C}]\text{McN5652}$ を用いた慢性疲労症候群患者と健常者のセロトニントランスポーターの密度の比較²⁰⁾



前帯状回の前部でのみ、統計的に有意な低下が見られる。

図16 緑の香り (0.03% hexenal と 0.03% hexenol との等量混合物) を与えて、単純作業能率がコントロール匂いより下がらない時のサル PET 脳局所血流量²²⁾

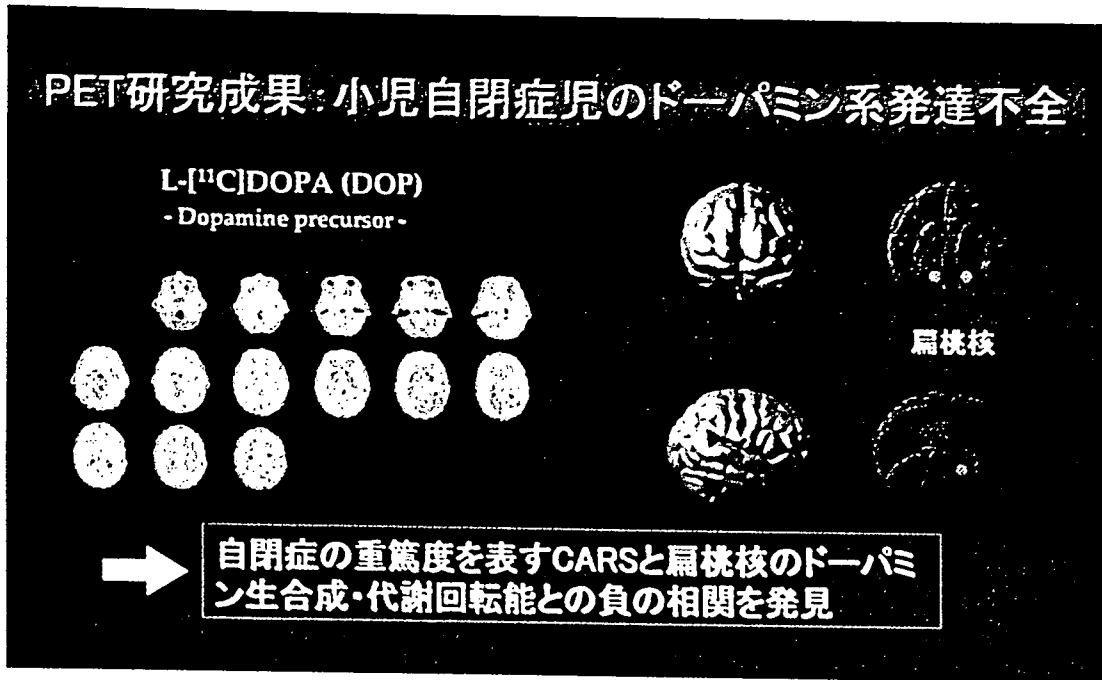


明らかに、ここまで疲労、慢性疲労症候群で問題になってきた前頭前野と前帯状回の活動が緑の香りに支えられていることが興味深い。

サンプル調製が可能であり、放射性副生成物の長期保管の必要もない。このような観点から、我々は短寿命 ^{11}C の導入をこれまで未知であった炭素-炭素結合形成反応による高速メチル化法により達成しようとした。PET 研究分野では、これまで O, N, S などのヘテロ原子上へのメチル化のみが行われてきたが、上記の高速反応が実現すれば、この新しい ^{11}C 導入法はこれらの方法を凌駕する多くの利点をもつ。第一に、標識部位は炭素-炭素結合であるため化学

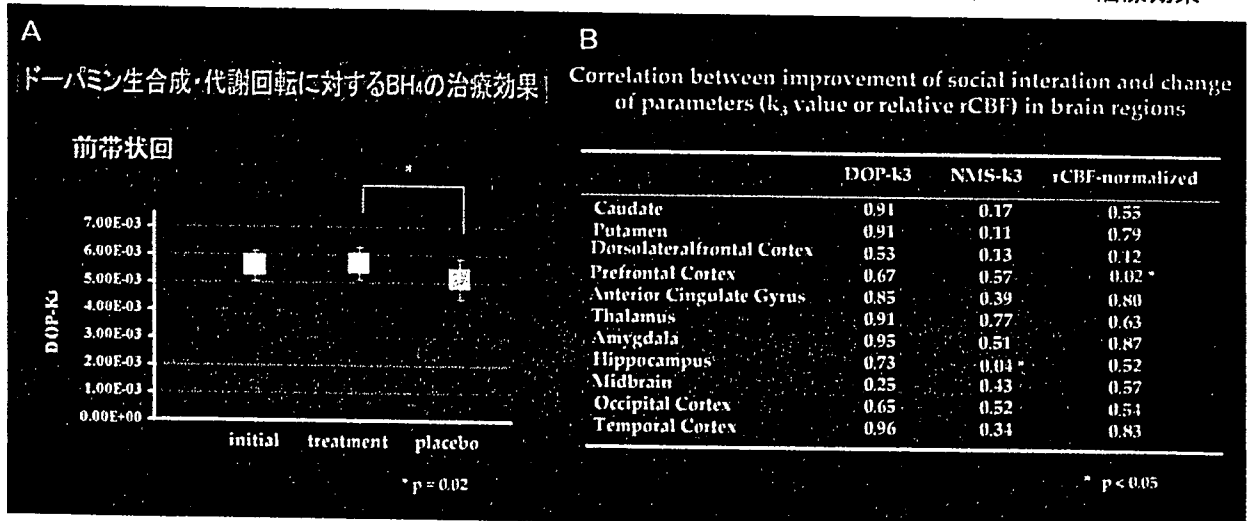
的かつ代謝的に安定であり、疾患診断に不可欠な PET 画像の信憑性が保証される。さらに、メチル基は最小の炭素置換基であり、導入位置への自由度が高く、また極性の変化も最小限に留めることができるため、リード化合物の機能(生物活性)の変化を想定範囲内に設定して PET プローブの設計を行うことができる。すなわち、メチル基が内在する薬剤そのもののみならず新規な創薬候補化合物の迅速なスクリーニングにも最適な方法論となる。

図17 小児自閉症 18 例のドーパミン系の PET 研究



L-[¹¹C]DOPA の利用能の低下の度合いが大きいほど、自閉症の症状が有意に重篤であった。
(Watanabe, Y. et al., in preparation)

図18 L-[¹¹C]DOPA-PET で見た小児自閉症患者 (3~7 歳) に対する 6 ヶ月間の BH₄ の治療効果



A：ドーパミン合成能が発達によって減ってくるが、BH₄投薬によりそのレベルを保ち続ける作用が判明した。
B：特に、社会性の改善が見られた responder の脳内では、社会性改善の度合いと前頭前野の血流の改善の度合い、海馬のセロトニン-2 受容体の正常化の度合いが有意な相関を示した。

PET 研究では放射性合成前駆体 (¹¹CH₃I など) を大過剰の基質で捕獲するため、その合成条件に合致するように、ヨウ化メチルを過剰量 (40 当量) の有機スズ化合物で捕捉する Stille 型高速カップリング反応、すなわち高速メチル化反応の開発を試みた。有機スズ化合物を選択

した理由は、① 多くの反応剤や精製資材に対して安定であるため最終段階での放射性同位元素導入反応が可能なこと、② 極めて低極性であり、生成した超微量 ¹¹C 標識化合物を大過剰の残存非放射性スズ基質から容易に分離できること、など PET トレーサー合成に合致した最

図19 ほとんどすべての低分子有機化合物への¹³C 標識法の開発

Molecular Imaging Research Program, RIKEN

新化学反応の創成: 高速C-メチル化反応の開発とその応用

4 型式 A-D の反応を実現⇒ほとんど全ての低分子有機化合物の¹³C-ラベル化が可能

A. sp²-sp³炭素間カップリング

スズを用いた方法
CH3I + C6H5-Sn(n-C4H9)3 >>[Pd2(dba)3, 4P(o-tolyl)3, 4CuCl, 4K2CO3, DMF, 60°C, 5 min] C6H5-CH3
 40 equiv. 91% 鈴木ら, Chem. Eur. J. 1997, 3, 2039.


ホウ素を用いた方法
CH3I + C6H5-B(OiPr)2 >>[Pd2(dba)3, 4P(o-tolyl)3, 4K2CO3, DMF, 60°C, 5 min] C6H5-CH3
 40 equiv. >92% 鈴木ら, 特開 2008-22169

B. スズを用いたsp²-sp³炭素間カップリング(アルケニルトリブチルスズ化合物)
CH3I + R2C=CR-Sn(n-C4H9)3 >>[Pd2(dba)3, P(o-tolyl)3, CuBr, CsF, DMF, 60°C, 5 min] R2C=CR-CH3
 R 40 equiv. >90% 鈴木ら, 特開 2005-306670, 鈴木ら, Org. Biomol. Chem. 2006, 4, 410.

C. スズを用いたsp²-sp³炭素間カップリング
CH3I + R-C#C-Sn(n-C4H9)3 >>[Pd[P(t-Bu)3]2, KF or CsF, DMF, 60°C, 5 min] R-C#C-CH3
 40 equiv. >92% 鈴木ら, Org. Biomol. Chem. 2004, 2, 24.

D. スズを用いたsp³-sp³炭素間カップリング
CH3I + C6H5-CH2-SnR3 >>[Pd(0), DMF, 5 min] C6H5-CH2-CH3
 40 equiv. 鈴木グループ 研究進行中

高速C-メチル化反応適応型PETレーザー合成装置の開発と目標



新世代型PETレーザー合成装置→溶液移送型法とロボットアーム型法の合体

↓ 反応系のマイクロ化

基質および反応剤の大幅な削減(百分の一)を目指す

■高速C-メチル化反応は理研グループが独自に開発したもの

■本手法は他の追随を許さず、海外の主要研究機関(ウプサラ大学やNIH)にも理研がノウハウを教示

図20 高速C-メチル化反応により最近開発した¹³C 標識化合物の例 (PET)

Molecular Imaging Research Program, RIKEN


高速C-メチル化を用いてPETプローブ化に成功した例

新化合物の発見に新高速反応を組み込み in vitro から in vivo(ヒトレベル)までの一貫貫型研究を達成した

この部位を¹³C核で標識するための高速反応を創成

[13C]CH3I + C6H5-Sn(n-C4H9)3 >>[Pd(0), 60°C, 5 min] C6H5-[13C]CH3

ヒト脳内IP₂受容体の分子イメージングに成功



15 μCi [¹³C] TIC のヒト脳PET画像
ウプサラ大および大阪市入国院で実施

15R-[¹³C] TIC (A1)
 代謝安定な中脳神経系特異的プロスタグリン受容体リガンドの創製
 15R-[¹³C] TIC のヒト脳研究リガンド

[¹³C] nikogalide derivative (A2)
 PAF受容体拮抗性リガンド
 ヒト臨床研究関連

[¹³C] methylincorporated PK derivative (A3)
 新規ベンゾジアゼピン受容体リガンド

[¹³C] methylincorporated PK derivative (A4)
 新規ベンゾジアゼピン受容体リガンド

Boc-protected [¹³C] 11152 (A5)
 Rho-Aオーレチン受容体リガンド

[¹³C] methylincorporated nitro-methylol derivative (A6)
 mGluR2受容体リガンド

[¹³C] compounds for ret-10-16 (A7)
 レチノイド受容体拮抗剤
 アルル化剤

[¹³C] 11152 (A8)
 RhoA受容体受容体リガンド

適な捕獲用基質と判断したためである。また、短寿命 PET トレーサーの合成には通常とは異なった化学反応が必要である。半減期がわずか 20 分である ^{11}C の導入の場合には、放射能の急激な減衰のため、反応、精製、そして生体への投与までを半減期の 2 倍以内に行わなければならない。この全体の制限時間からトレーサーの精製および投与準備時間を差し引くと、 ^{11}C の導入反応に与えられた時間はわずか 5 分程度である。

上記のような背景の下、まず非放射化体であるヨウ化メチルを過剰のトリブチルフェニルスズで捕捉する Stille 型 $\text{sp}^2\text{-sp}^3$ カップリングによる高速メチル化反応の開発に挑んだ。数年 (~5 年) に渡る条件検討の結果、 ^{11}C を導入した PET 用のトレーサーである 15R- ^{11}C]TIC メチルエステルの短時間かつ高収率合成を実現した (上述)。さらに、我々は、高速メチル化反応の拡張を行ってきた (図 19, 論文も図内に記入)。現在、残る $\text{sp}^3\text{-sp}^3$ 高速カップリング研究、および、対象基質の多様性に対応すべくスズ化合物以外の捕捉剤 (有機ホウ素化合物など) の使用を検討しているが、いずれも成功裡に進行している。

我々が目的としている図 19 に示した四型式の高速 ^{11}C メチル化反応が実現すれば、原理的にほとんどすべての有機化合物への ^{11}C の導入 (PET トレーサー化) が可能であり、PET 研究によりヒトまで含めた対象薬剤の体内動態がわかる。このような新しい化学反応を開発して、様々な化合物を動物・ヒトの PET に続々と導入中 (図 20) で、今後、500 種程度の創薬候補化合物が ^{11}C の導入を待っている状況である。また C-メチル化反応は、 $^{13}\text{CH}_3$, $^{14}\text{CH}_3$, および CD_3 基の導入にももちろん適用可能であり、今後、様々な角度からの薬物代謝研究に役立つ。特に $^{14}\text{CH}_3$ 基の導入は、Accelerator Mass Spectrometry (AMS 法, $10^{-18}\sim 10^{-21}\text{M}$ の ^{14}C -enrich した超微量の薬物サンプルを使用した質量分析法で、被曝量が少なくヒトにも適用可能) による長期間の薬物代謝解析研究に有

効である。

タンパク質・ペプチド・糖鎖・核酸塩基配列 (DNA/RNA) を標識した分子イメージング研究

分子イメージングの方法論をさらに汎用化・網羅化するためには、高分子物質にも標識が行われ、本来の機能・生理活性・結合能などを損なわない方法論の開発が重要である。この点でも現在、我々は様々な方法論とそのための自動合成装置 (実験者の被曝を最小限にする) の開発研究 (図 21) を行っている。

タンパク質では、主には、幹細胞認識のための抗 CD133 抗体、細胞障害性ヘルパー T 細胞の認識に抗 CD34 抗体、扁平上皮癌に対する抗 EGF-R 抗体などを標識して、細胞種別 PET 研究を行っている。ペプチドに関しては、サイトカイン・ケモカイン、神経内分泌ペプチドをはじめ多くの活性ペプチドが標的であり、ソマトスタチンやその代謝耐性型のオクトレオタイドなどの ^{68}Ga 標識を進めた。さらに核酸配列や糖鎖への標識には、核酸化学、糖鎖工学、ケミカルバイオロジーの最先端化学者と共同して新規標識法を開拓し、PET 研究を進めている。

薬物動態予測のための薬物トランスポータープローブの開発とリソース化

東京大学大学院薬学系研究科、放医研、理研の共同研究として、薬物の動態予測に資する 10 数種の (すでに分子構造が解明され比較的特異的なリガンドを有する) 薬物トランスポーターに対する分子イメージングプローブの開発を放医研および理研で分担して開始した。放医研では、まず BCRP トランスポーター解析用候補化合物として ^{15}N -標識ダントロレンの合成を行い、正常マウスを用いた PET 計測を行った。現在、基礎的評価を始めている。理研側では、高速 C-C-メチル化反応を用いて、OATP1B1, OAT3, MRP2 トランスポーター解析用候補化合物としてプラバスタチンの標識合成に着手した。本研究のユニークな点は、安全性が保証さ

れ薬理量が実際にヒトで利用されている既存の薬物を標識して行う研究であるので、動物実験直後に直截にヒトの分子イメージング研究に展開できることである。今後、順次異なった薬物トランスポーターに対する候補化合物の標識合成を行い、個々の薬物トランスポーターノックアウトマウス等を用いて PET により解析し、医薬品開発に資するトランスポーター解析ツールを3者の共同研究により確立する。

小動物 PET 計測の最適化

創薬や分子イメージング技術開発に、小動物用の microPET 研究は必須である。我々は、2000年に大阪市立大学に世界第1号機となった microPET を導入したので、和田を中心として、実際の動物実験における microPET 計測に関する諸条件の最適化を図り、画像データ解析法の向上を図ってきた²⁰⁾。超高分解能画像の定量性確保、収集データの高品質化（散乱、ランダムノイズの減少）を行うための具体的な策を見つけ、また、画像間演算による新しい生物学的パラメーターの抽出法を創案する研究である。これまでに、microPET 計測にかかる減弱補正の検討や鉛シールドの適用を行い、定量的・高精度の画像を得ることに成功した。最近では、さらに、理研神戸研の分子イメージング研究プログラム新施設に新規に導入された microPET Focus220 の基本的検討（図22）を行うとともに、PET トレーサーの薬物動態の可視化に成功した。従来定量性が低いと言われていた統計学に基づく画像再構成法のパラメーター・スキャン条件・画像分解能・統計ノイズとの関連性を調べ、高定量である条件を見つけることに成功し、実際のイメージングでの研究を開始した（図23）。3次元的に分布している薬物の動態データを Maximum Intensity Projection (MIP) 画像を用いて分かりやすく表示する方法を開発し、遺伝子発現・分子認識・細胞分別・代謝変換分子および薬物到達・薬物動態解析イメージングで実際に使用を開始している。

コンプトンカメラを利用した複数分子同時イメージング法の開発

同一個体を用いた時差複数分子イメージングを行ってきて、その実例もいくつか挙げてきたが、実際に分子イメージングを行っていくと、病態把握や治療効果モニターなどにおいては、複数分子を同時にイメージングできることの重要さに気づく。GREI (Ge 半導体コンプトンカメラによる γ 線エミッションイメージング装置) 開発による同時複数分子イメージングなど、PET 用分子プローブの適用も視野に入れて、新規のイメージング法の開発にも取り組んできた。和光研究所仁科加速器研究センター RI 製造応用チーム 榎本副チームリーダー、本村基礎科学特別研究員らとの共同研究の中で、技術的開発として、装置の改良、高度化に資するため XY ステージを導入し、スキャン撮像の実現に成功した。また、3次元画像再構成アルゴリズムの改良と高速化を行い、DOI 測定による γ 線相互作用位置の深さ方向の測定精度 1 mm 以下を達成した。さらに、低エネルギー γ 線撮像のための Si 検出器の導入と、現 Ge コンプトンカメラとの融合に関する特許を出願 (2006-220446) した。

一方、GREI による基礎医学的研究においては、GREI 画像と PET 画像の融合を目指しており、現在までに、既存核医学製剤を用いた小動物における複数分子同時イメージングに成功している。すなわち、麻酔下の正常 ICR マウス (8 週齢・♂) に、 $^{65}\text{ZnCl}_2$, $^{85}\text{SrCl}_2$, ^{131}I -ヨウ化メチルノルコレステロールを投与し、GREI による同時撮像を行った。それぞれの製剤の投与量・投与時間は、2 MBq/撮像 30 分前、2 MBq/撮像 1 日前および 18.7 MBq/撮像 5; 4, 3 日前である。副腎シンチグラフィに臨床応用されている ^{131}I -ヨウ化メチルノルコレステロールは 3 日に分けて分割投与した。マウスはネンブタール麻酔状態で 12 時間連続撮像し、その後、連続蓄積撮像のため屠殺して、24 時間の蓄積像を撮像した。この後、解剖して各臓器中

図21 生体高分子標識のための⁶⁸Ga 標識法の開発と自動合成装置

Molecular Imaging Research Program, RIKEN

⁶⁸Ga 標識ペプチド・タンパク・核酸プローブの開発

⁶⁸Ga 標識プローブは、キレート部分のアミノ基への組み込みにより、ほとんどすべてのタンパク、ペプチド、DNA/RNAオリゴヌクレオチドをPETプローブ化でき、分子イメージングの汎用化に大いに寄与する。

DOTA 修飾法の改良 (*in situ* 活性化法)

生体高分子 (ペプチド、蛋白質、核酸等)

⁶⁸GaCl₃ / 1M HCl / pH 5-7 / 40°C, 15 min

生体高分子

生体高分子プローブの汎用化

- ・成功例を増やし、動物研究や疾患の早期診断への展開を進める
- ・⁶⁸Ga 標識用自動合成装置の一般化により、PETプローブ合成のハードルを下げる
- ・PETプローブとして、用途の上昇や利用範囲の拡大を促し、PET/CT 検査の精度向上に貢献する

図22 microPET P4 と microPET focus220 による計測を最適化

	microPET P4	microPET Focus220
Crystal Material	LSO	LSO
Detector Diameter (cm)	26	26
Axial Field of View (cm)	7.8	7.6
Total Number of LSO Elements	10,752	24,192
Crystal Size (mm)	2.2 x 2.2 x 10.0	1.5 x 1.5 x 10.0
Packing Fraction (%)	80	92
Number of Slices	63	95
Slice Pitch (mm)	1.215	0.815

P4

Focus220

図23 ラット脳 FDG-microPET 画像の最適化例

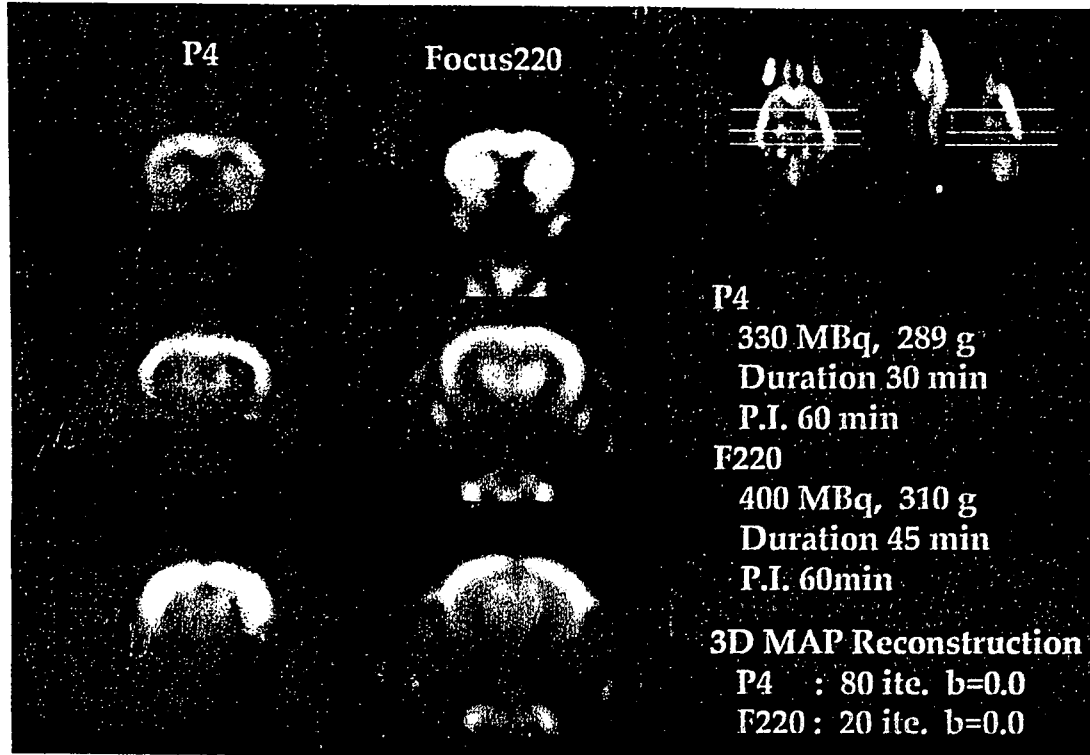


図24 世界初の複数分子同時イメージング成功画像

Molecular Imaging Research Program, RIKEN NOBE **MIRP** RIKEN

複数分子同時イメージングシステムの構築

Ge半導体コンプトンカメラ(GREI: Gamma-ray emission imaging)

◆既存のモダリティでは実現不可能な複数分子プローブの同時可視化を、複数核種のγ線を計測可能な本装置の開発により実現し、癌の早期診断や再生医療に寄与する新診断・治療法開発、創薬を目指す

◆XYステージを組み込んだシステムの構築
⇒ スキャンによる撮像可能

◆低エネルギーγ線撮像のための検出器の設計
⇒ 特許出願(2006-220446)

◆正常ICRマウスにおける複数核種同時γ線代謝イメージング
⇒ ⁶⁵Zn肝・腎集積、⁸⁵Sr骨集積、¹³¹I-ヨウ化メチルノルコレステロール副腎集積(及び、遊離¹³¹Iの甲状腺集積)の同時視覚化に成功

⁶⁵ZnCl₂ ⁸⁵SrCl₂ ¹³¹I-ヨウ化メチルノルコレステロール

⁶⁵Zn

⁸⁵Sr

¹³¹I

ネプタール麻酔下、12時間撮像(累積、DABP(逆重畳)画像)

GREI

撮像中のマウス

XYステージ

⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ¹³¹I

カラーイメージのマウス写真との重ね合わせ

の放射能を Ge 半導体検出器で測定し、核種分布を測定した。図 24 に ^{65}Zn (γ 線エネルギー: 1,115keV), ^{85}Sr (514keV), ^{131}I (364.5keV) 3 核種の同時イメージング像を示す。図から明らかのように、 ^{65}Zn の肝・腎集積, ^{85}Sr の骨集積, ^{131}I -ヨウ化メチルノルコレステロールの副腎への高集積および遊離 ^{131}I の甲状腺集積を同時に可視化することに成功した。この結果は、個別臓器の核種分布測定結果と一致し、時間依存的な代謝イメージングの結果と一致した。今後はこの結果を踏まえて、PET 用分子プローブと既存核医学製剤、マルチレーザーなどの複数分子プローブを用いた複数核種の同時イメージング実験を推進し、病態モデル動物を用いて臨床応用を見据えた複数分子プローブの提案を試みる。また、装置開発と実用化の検討においては、TOI を実装し、既存モダリティと現装置の比較、低エネルギー γ 線対応型 Si/Ge の開発のためのシミュレーションを行い、臨床用装置開発を行っていく。また、宇宙開発機構 (JAXA) の開発した Si/CdTe 検出器による小動物複数分子同時イメージングに着手し、簡易型コンプトンカメラの開発と改良を実施する。

結 び

以上のように、分子イメージング研究が創薬や疾患診断に有用であるということについては言を待たない。それらの実例を積み上げていく努力が必要とされる。しかし、機器開発、計測法、数量モデルデータ解析法、化学、分子設計、分子プローブ機能評価、疾患モデル動物での研究、臨床研究、多施設臨床研究標準化、新しい regulation 作成、等々、この分野にはまだまだ多数の研究と人材が必要であり、それらを融合・統合するための確実なロードマップと研究プログラムが必須である。

謝 辞

これまで研究の機会を与えていただき、また、温かくご指導・ご支援いただきました早石 修先生、井村裕夫先生、野依良治先生、玉尾皓平先生、

野口照久先生、花房秀三郎先生に、心より感謝致します。文部科学省分子イメージング研究プログラム担当の方々、横山哲夫 PD, 杉山雄一 PO, 井戸達雄 PO, 科学技術振興機構の担当の方々、理化学研究所理事の諸先生をはじめ、プライオリティ会議、経営企画部、知的財産戦略センター、神戸研究所、分子イメージング研究プログラム、仁科加速器研究センターの先生方、スタッフの方々に感謝致します。また、大阪市立大学大学院医学研究科、岐阜大学鈴木研究室の先生方、スタッフの方々、先端医療センターはじめ共同研究者の皆様に感謝致します。

文 献

- 1) Matsumura K, Watanabe Yu, Onoe H, Watanabe Y: Prostacyclin receptor in the brain and central terminals of the primary sensory neurons: an autoradiographic study using a stable analogue [^3H]iloprost. *Neuroscience* 65: 493-503, 1995.
- 2) Takechi H, Matsumura K, Watanabe Yu, Kato K, Noyori R, Suzuki M, Watanabe Y: A novel subtype of the prostacyclin receptor expressed in the central nervous system. *J Biol Chem* 271: 5901-5906, 1996.
- 3) Watanabe Yu, Matsumura K, Takechi H, Kato K, Morii H, Björkman M, Långström B, Noyori R, Suzuki M, Watanabe Y: A novel subtype of prostacyclin receptor in the central nervous system. *J Neurochem* 72: 2583-2592, 1999.
- 4) Suzuki M, Kato K, Noyori R, Watanabe Yu, Takechi H, Matsumura K, Långström B, Watanabe Y: (15R)-(m-Tolyl)-17, 18, 19, 20-tetra-norisocarbacyclin. A stable ligand with high binding affinity and specificity for a prostacyclin receptor in the central nervous system. *Angewandte Chemie* 35: 334-336, 1996.
- 5) Suzuki M, Kato K, Watanabe Yu, Satoh T, Matsumura K, Watanabe Y, Noyori R: 15-Deoxy-16-(m-tolyl)-17, 18, 19, 20-tetra-norisocarbacyclin: a simple TIC derivative with potent anti-apoptotic activity for neuronal cells. *Chem Commun*: 307-308, 1999.

- 6) Satoh T, Ishikawa Y, Kataoka Y, Cui Y, Yanase H, Kato K, Watanabe Yu, Nakadate K, Matsumura K, Hatanaka H, Kataoka K, Noyori R, Suzuki M, Watanabe Y: CNS-specific prostacyclin ligands as a novel class of candidates for therapeutic agents against neuronal death. *Eur J Neurosci* 11: 3115-3124, 1999.
- 7) Cui Y, Kataoka Y, Satoh T, Yamagata A, Shirakawa N, Watanabe Yu, Suzuki M, Yanase H, Kataoka K, Watanabe Y: Protective effect of prostaglandin I₂ analogs on ischemic delayed neuronal damage in gerbils. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 301-304, 1999.
- 8) Takamatsu H, Tsukada H, Watanabe Yu, Cui Y-L, Kataoka Y, Hosoya T, Suzuki M, Watanabe Y: Specific ligand for a central type prostacyclin receptor attenuates neuronal damage in a rat model of focal cerebral ischemia. *Brain Res* 925: 176-182, 2002.
- 9) Frykholm P, Andersson JLR, Valtysson J, Silander HC, Hillered L, Persson L, Olsson Y, Yu WR, Westerberg G, Watanabe Y, Långström B, Enblad P: A metabolic threshold for irreversible ischemia demonstrated by PET in a middle cerebral artery occlusion-reperfusion primate model. *Acta Neurol Scand* 102: 18-26, 2000.
- 10) Enblad P, Frykholm P, Valtysson J, Silander HC, Andersson J, Fasth KJ, Watanabe Y, Långström B, Hillered L, Persson L: Middle cerebral artery occlusion and reperfusion in primates monitored by microdialysis and sequential positron emission tomography. *Stroke* 32: 1574-1580, 2001.
- 11) Cui YL, Takamatsu H, Kakiuchi T, Ohba H, Kataoka Y, Yokoyama C, Onoe H, Watanabe Yu, Hosoya T, Suzuki M, Noyori R, Tsukada H, Watanabe Y: Neuroprotection by a central nervous system-type prostacyclin receptor ligand demonstrated in monkeys subjected to middle cerebral artery occlusion and reperfusion: A positron emission tomography study. *Stroke* 37: 2830-2836, 2006.
- 12) Suzuki M, Doi H, Kato K, Björkman M, Långström B, Watanabe Y, Noyori R: Rapid methylation for the synthesis of a ¹⁴C-labeled tolylisocarbacyclin imaging the IP₂ receptor in a living human brain. *Tetrahedron* 56: 8263-8273, 2000.
- 13) Watanabe Y, Långström B, Stålnacke C-G, Gullberg P, Svärd H, Halldin C, Hayaishi O: Synthesis of ¹⁴C-labeled prostaglandins and positron emission tomography studies using the rhesus monkey. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* 17B: 943-945, 1987.
- 14) Klunk WE, Engler H, Nordberg A, et al: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55: 306-319, 2004.
- 15) Shimada H, Ataka S, Yoshioka E, Ishii H, Kawabe J, Wada Y, Takeda K, Tamura A, Masaki H, Tsutada T, Shimonishi S, Shiomi S, Miki T, Mori H, Watanabe Y: (manuscript in preparation). 日本神経学会 2007 特別講演, 2007 年 5 月 17 日 名古屋国際会議場.
- 16) Tanaka M, Nakamura F, Mizokawa S, Matsumura A, Nozaki S, Watanabe Y: Establishment and assessment of a rat model of fatigue. *Neurosci Lett* 352: 159-162, 2003.
- 17) Kuratsune H, Yamaguti K, Lindh G, Evengård B, Hagberg G, Matsumura K, Iwase M, Onoe H, Takahashi M, Machii T, Kanakura Y, Kitani T, Långström B, Watanabe Y: Brain regions involved in fatigue sensation: Reduced acetyl-carnitine uptake into the brain. *Neuroimage* 17: 1256-1265, 2002.
- 18) Tanaka M, Sadato N, Okada T, Mizuno K, Sasabe T, Tanabe HC, Saito DN, Onoe H, Kuratsune H, Watanabe Y: Reduced responsiveness is an essential feature of chronic fatigue syndrome: A fMRI study. *BMC Neurol* 6: 9, 2006.
- 19) Okada T, Tanaka M, Kuratsune H, Watanabe Y, Sadato N: Mechanisms underlying fatigue: a voxel-based morphometric study of chronic fatigue syndrome. *BMC Neurol* 4: 14, 2004.
- 20) Yamamoto S, Ouchi Y, Onoe H, Yoshikawa E, Tsukada H, Takahashi H, Iwase M, Yamaguti K, Kuratsune H, Watanabe Y: Reduction of serotonin transporters of patients with chronic fatigue syndrome. *Neuroreport* 15: 2571-2574,