

一般的にアミロイドイメージング剤についても求められる条件としては、薬剤を投与した後速やかに脳内に取り込まれ、正常脳組織に対して非特異的結合を示さず、短時間で脳内から排泄される必要がある。この性質を持つことにより、脳内に老人斑の沈着があった場合、その領域にアミロイドイメージング剤が保持されることになり、正常脳組織に対してコントラストの高い画像が得られることになる。特に、排泄速度が速ければ速いほど短い撮像時間で高コントラストの画像が得られることになり、実用性の観点からも相応しいものとなる。さらにフッ素 18 標識薬剤に関しては生体内において脱フッ素代謝反応に対して耐性を示すことが必要である。

このような点からスクリーニングされたフッ素 18 標識候補 4 化合物について考察してみると、投与直後における脳内への取り込みはいずれも優れた性質を有していることが明らかになった。しかし、脳内からの排泄という観点では、 ^{18}F Cpd-2 と ^{18}F Cpd-3 が非常に優れた排泄性を示した。これらの排出速度は、現在臨床で評価している ^{11}C BF227 よりも優れていることから、BF227 よりも正常脳組織に対する非特異的結合性が低いと考えられる。

さらに特筆すべき点として、 ^{18}F Cpd-2 と ^{18}F Cpd-3 を投与した場合、骨への放射能集積の時間依存的増加がみられないことから、生体内での脱フッ素代謝反応に対して耐性を有することが推察される。老人斑の高沈着部位である大脳皮質の周辺には頭蓋骨が存在するため、骨に非常に高い放射能集積が存在すると老人斑の画像化や定量解析などにも影響を与える可能性があることから、F18 標識アミロイドイメージング剤を開発する場合は、脱フッ素化されにくい化合物を開発することが重要になるが、この点からも ^{18}F Cpd-2 と ^{18}F Cpd-3 はアミロイドイメージング剤として優れた性質を有していると考えられる。特に ^{18}F Cpd-2 は ^{18}F Cpd-3 よりも A β 凝集体に対して高い結合親和性を示すことから、薬剤名

^{18}F FACT として臨床応用に向けた研究を展開した。

まず前臨床評価として、 ^{18}F FACT のアミロイド斑の結合性、生体画像化の有効性、そして安全性評価(変異原性試験、急性毒性試験)を行った。さらに、実際に臨床で使用可能な ^{18}F FACT 注射液製造システムを構築し、その製品の品質・安全性について評価した。

FACT の変異原性を調べる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ず、さらに、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。

臨床用に自動合成装置によって製造された ^{18}F 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はない。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。また、 ^{18}F FACT 注射液を投与した場合に予想される被曝の影響については、十分に PET 撮像が行えると想定さ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と考えられる。

E. 結論

本研究により、 $[^{11}\text{C}]\text{BF}227$ 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、 $[^{11}\text{C}]\text{BF}227$ 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。そしてフッ素 18 標識アミロイドイメージング剤の有力な候補化合物として新規標識化合物 $[^{18}\text{F}]\text{Cpd-2}$ および $[^{18}\text{F}]\text{Cpd-3}$ の開発に成功した。その $[^{18}\text{F}]\text{Cpd-2}$ については薬剤名 $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ として前臨床的に評価したところ、アミロイド斑特異的結合性が高く、安全性についても問題はみられないことから、臨床用アミロイドイメージング剤として利用可能な薬剤であることが確かめられた。そして、 $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ による臨床アミロイドイメージングを実現するために必要となる注射液の製造システムを確立した。このシステムでは高品質の注射液が製造され、被曝線量、急性毒性についても臨床上問題なく使用できるものであった。以上、蛋白コンフォメーションの *in vivo* 画像診断として最も臨床応用の期待が高いアミロイドイメージングについて、実際の臨床 PET で使用可能な標識薬剤を開発することに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 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.”, *The Journal of Neuroscience* 25: 10857-10862, 2005.
- 2) Ishikawa, Y., R. Iwata, S. Furumoto, C. Pascali, A. Bogni, K. Kubota, K. Ishiwata, “Simple

automated preparation of $[^{11}\text{C}]\text{O-methyl-l-tyrosine}$ for routine clinical use.”, *Applied Radiation & Isotopes* 63: 55-61, 2005.

- 3) Ishikawa, Y., R. Iwata, S. Furumoto, Y. Takai, “Automated preparation of hypoxic cell marker $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ by on-column hydrolysis.”, *Applied Radiation & Isotopes* 62: 705-710, 2005.
- 4) 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.
- 5) 石川洋一、船木善仁、岩田錬、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 $[^{18}\text{F}]\text{FRP-170}$ 注射液の開発”、*核医学*: 42, 1-10, 2005.
- 6) 岡村信行、谷内一彦、古本祥三、工藤幸司、荒井啓行: 脳内アミロイド β 蛋白およびタウ蛋白の PET イメージング技術の開発. *Innervation*. 21:43. 2006
- 7) 岡村信行、古本祥三、工藤幸司、谷内一彦: 臨床応用—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
- 8) 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.
- 9) 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
- 10) 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.
- 11) 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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.
 - 16) 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.
- 1) 古本祥三、岡村信行、田代学、船木義仁、石川洋一、古川勝敏、伊藤正敏、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司：新規アミロイドイメージング剤¹¹C]BF227 の臨床評価. 第46回日本核医学会学術総会(鹿児島). 11月9日-11日. 2006年
 - 2) Okamura N, Kudo Y, Furumoto S, Furukawa K, Tashiro M, Kato M, Ito S, Funaki Y, Akatsu H, Sawada T, Yanai K, Arai H: *In vivo* imaging of amyloid plaques in the brain in [¹¹C]BF-227 PET study. 第25回日本認知症学会学術集会(広島). 10月6日-7日. 2006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：Amyloidosis 特有の病理像を認識する PET プローブの開発. 第57回 日本薬理学会北部会(弘前). 9月14日-15日. 2006年
 - 4) 伊藤啓、岡村信行、加藤元久、古本祥三、赤津裕康、山本孝之、稲田義行、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦：アルツハイマー病のアミロイドを検出する新規 PET プローブ. 第57回日本薬理学会北部会(弘前). 9月14日-15日. 2006年
 - 5) 岡村信行、古本祥三、田代学、加藤元久、伊藤啓、稲田義行、古川勝敏、荒井啓行、岩田錬、工藤幸司、谷内一彦：アミロイド画像化用プローブ¹¹C]BF-227 の臨床評価. 第57回 日本薬理学会北部会(弘前). 9月14日-15日. 2006年
 - 6) 古本祥三、岡村信行、石川洋一、船木義仁、加藤元久、田代学、澤田徹、伊藤正敏、谷内一彦、岩田錬、荒井啓行、工藤幸司：老人斑画像化プローブ¹¹C]BF-227 の合成と評価. 日本薬学会第126年会(仙台). 3月28日. 2006年
 - 7) 藤川陽介、岡村信行、古本祥三、星井嘉信、山田正仁、石原得博、工藤幸司、谷内一彦：AβリガンドBF-227によるアミロイドシ

2. 学会発表
(国内学会)

- スの検出. 第79回日本薬理学会年会(横浜). 3月8日. 2006年
- 8) 伊藤啓、岡村信行、加藤元久、古本祥三、赤津裕康、山本孝之、澤田徹、荒井啓行、工藤幸司 谷内一彦: アルツハイマー病のタウイメージング用新規 PET プローブ. 第79回日本薬理学会年会(横浜). 3月8日. 2006年
- 9) 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
- 10) 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: アミロイドベ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
- 11) 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
- 12) 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 [¹¹C]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
- 13) 岡村 信行 谷内一彦 古本祥三 工藤幸司: [¹¹C]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
- 14) 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: [¹¹C]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)
- 39) 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.
- 40) 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.
- 41) Okamura N, Furumoto S, Ito S, Fujikawa Y, Tashiro M, Funaki Y, Akatsu H, Yamamoto T, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y: 18 F-labeled ethenyl-benzoxazole derivatives for in vivo detection of amyloid plaques in the brain. The 10th International Conference on Alzheimer's and Related Disorders. (Madrid, Spain) July 15-20. 2006.
- 42) Arai H, Okamura N, Furukawa K, Maruyama M, Furumoto S, Narita T, Ito M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: [¹¹C]-BF-227 and PET to visualize amyloid in Alzheimer's disease. The 10th International Conference on Alzheimer's and Related Disorders. (Madrid, Spain) July 15-20,

2006.

- 43) Okamura N, Furumoto S, Tashiro M, Funaki Y, Ishikawa Y, Furukawa K, Arai H, Sawada T, Ito M, Iwata R, Yanai K, Kudo Y: Novel benzoxazole derivatives for in vivo imaging of amyloid plaques in the brain. The 5th Annual Meeting of the Society for Molecular Imaging (Hawaii) Aug 30-Sep 2. 2006
- 44) 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
- 45) 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
- 4) 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、PCT/JP2006/323962、平成18年11月30日。
- 5) 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、PCT/JP2006/325804、平成18年12月25日。
- 6) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行：ベンゾキサゾール誘導体、PCT/JP2007/063350、平成19年7月4日。
- 7) 工藤幸司、古本祥三、岡村信行：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、特願2007-176366、平成19年7月4日。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

- 1) 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。
- 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。
- 3) 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。

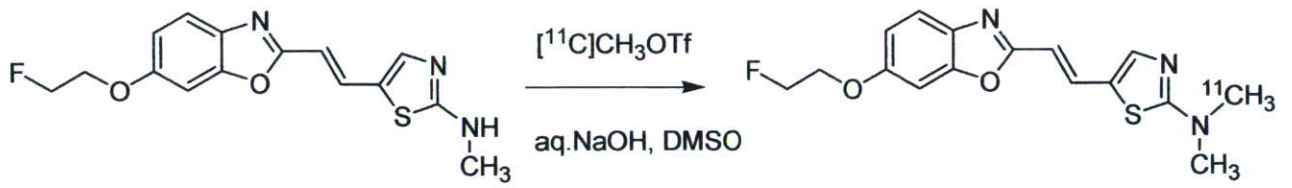


図 1. $[^{11}\text{C}]\text{BF227}$ 標識反応スキーム

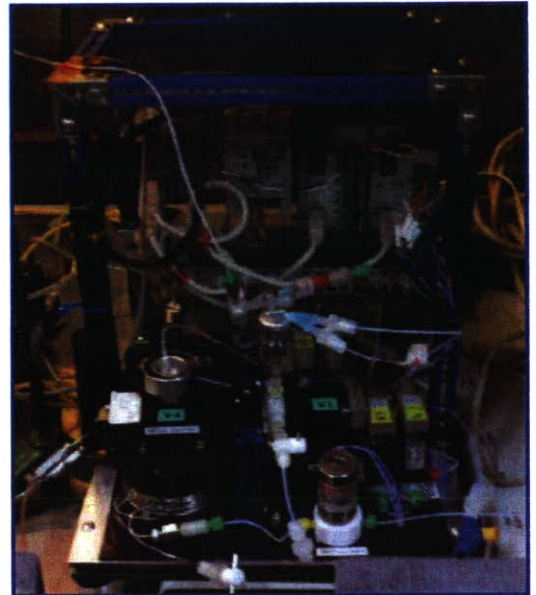
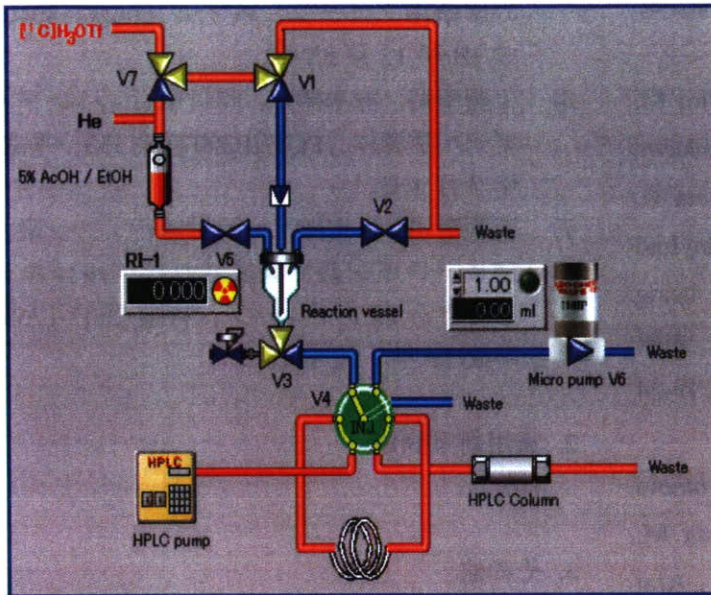


図 2. 標識反応装置周辺の流路概略図と写真

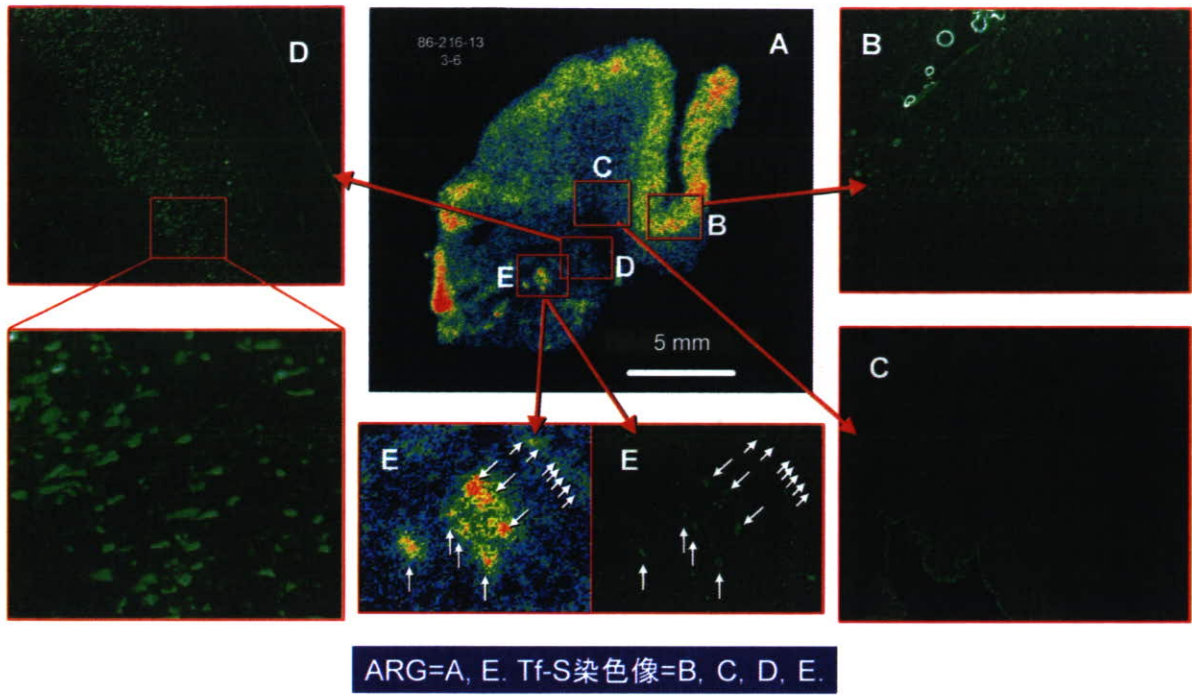


図 3. AD 脳病理組織切片のオートラジオグラフィ

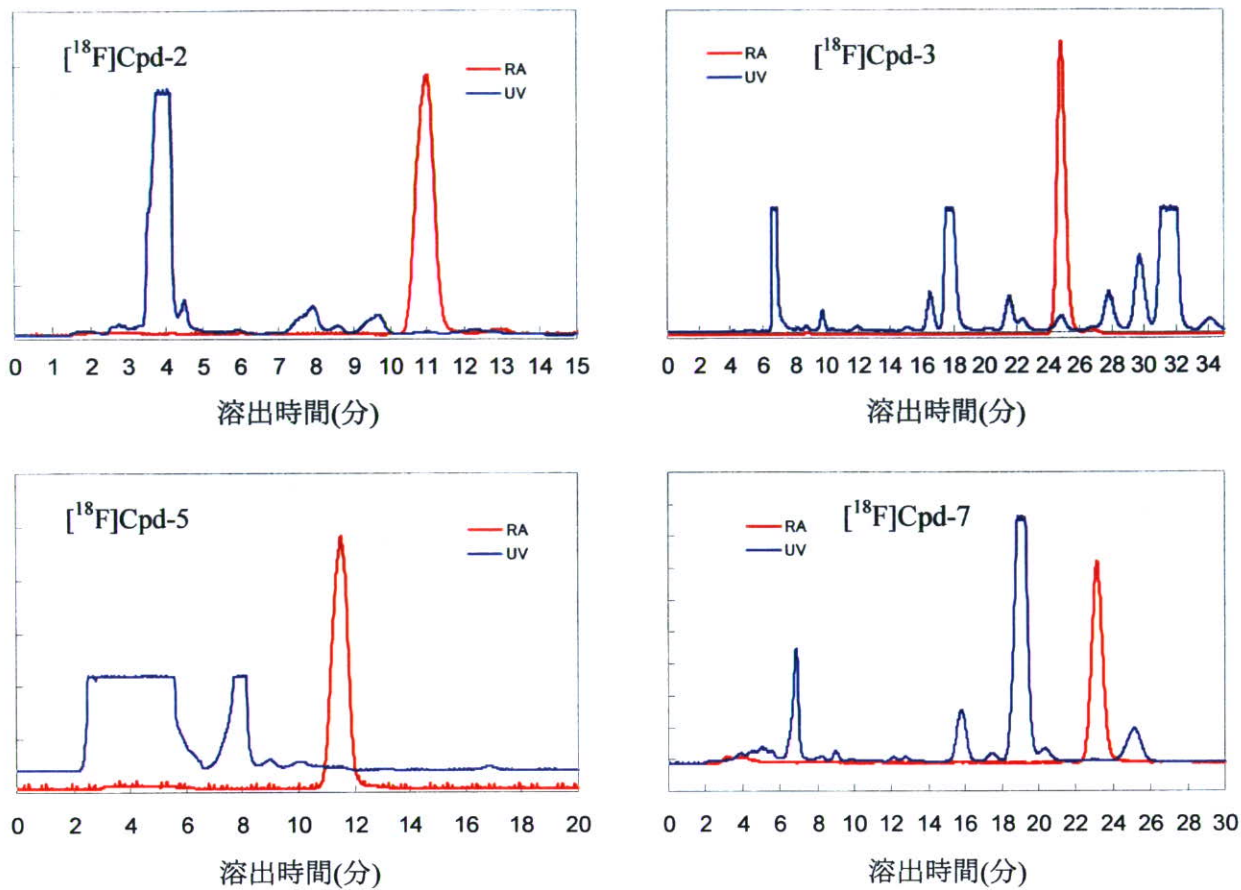


図 4. フッ素 18 標識化合物の分取 HPLC クロマトグラム

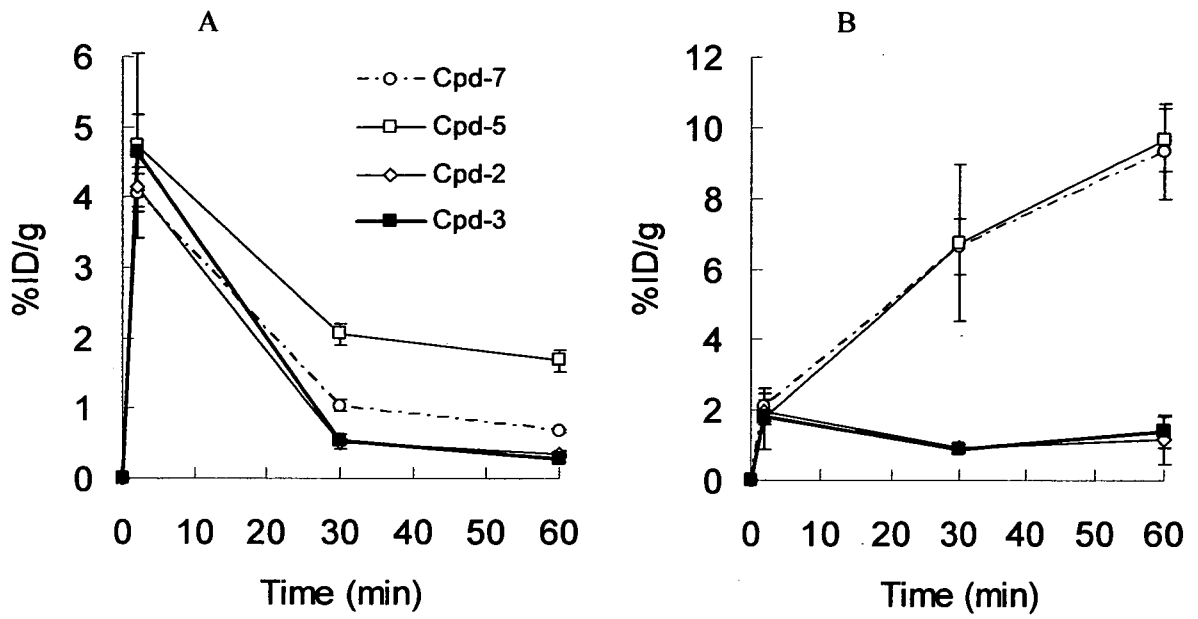


図 5. F18-標識薬剤の脳移行性および骨集積性

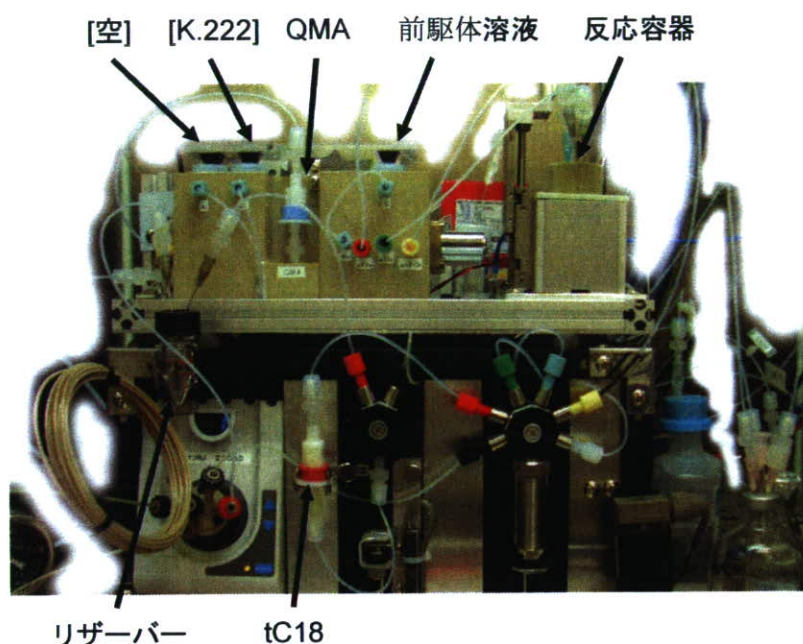


図 6. $[^{18}\text{F}]$ FACT 標識合成装置

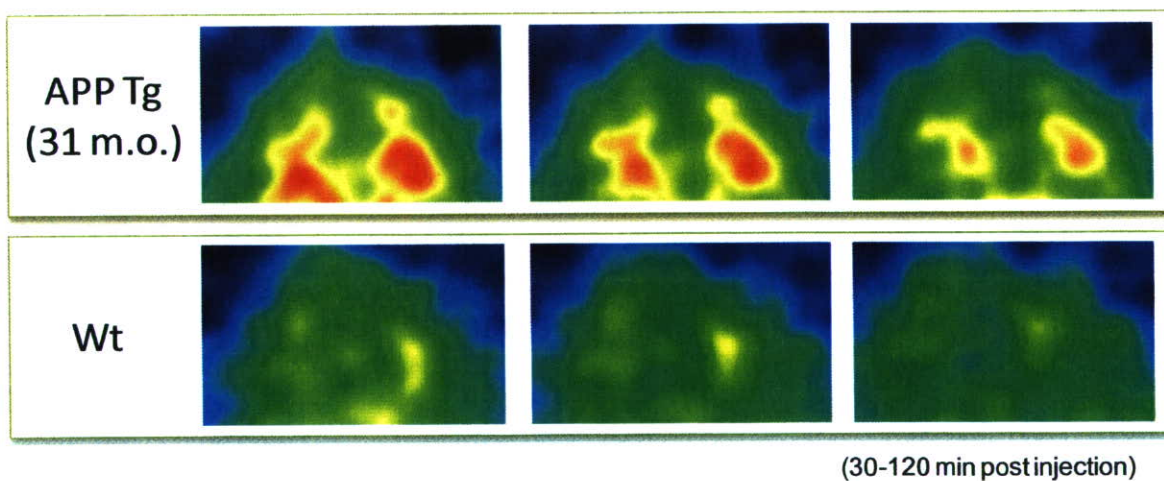


図 7. $[^{18}\text{F}]$ FACT の Fine PET®イメージ

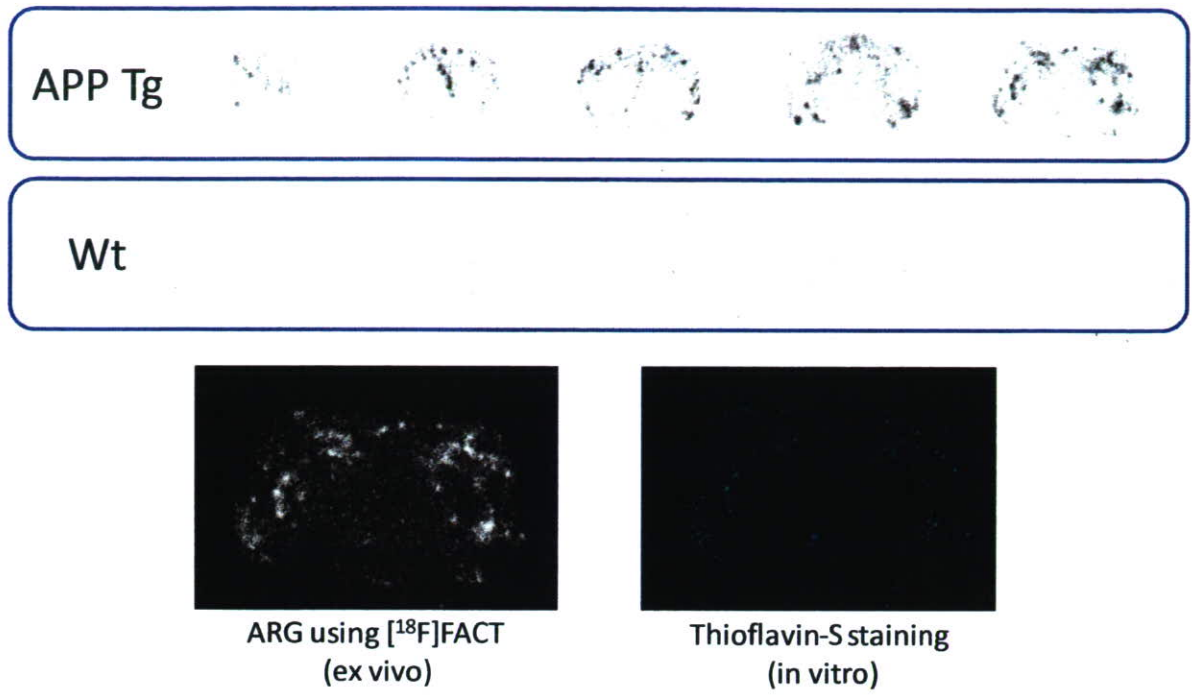


図 8. Tg マウス脳での $[^{18}\text{F}]\text{FACT-ARG}$ 画像とチオフラビン染色像

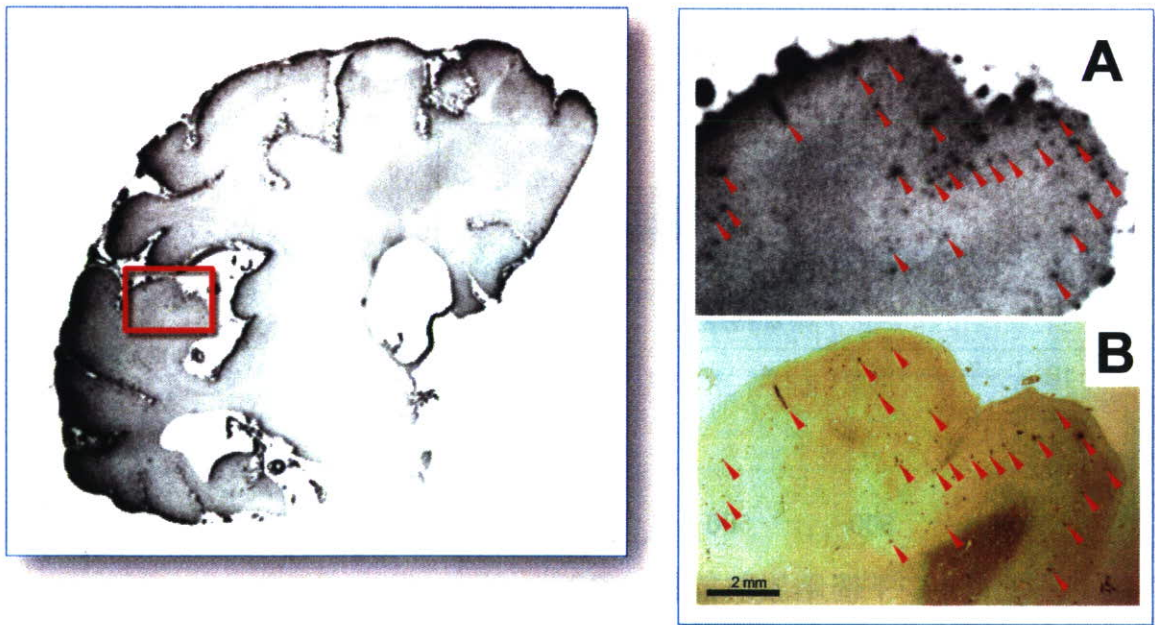
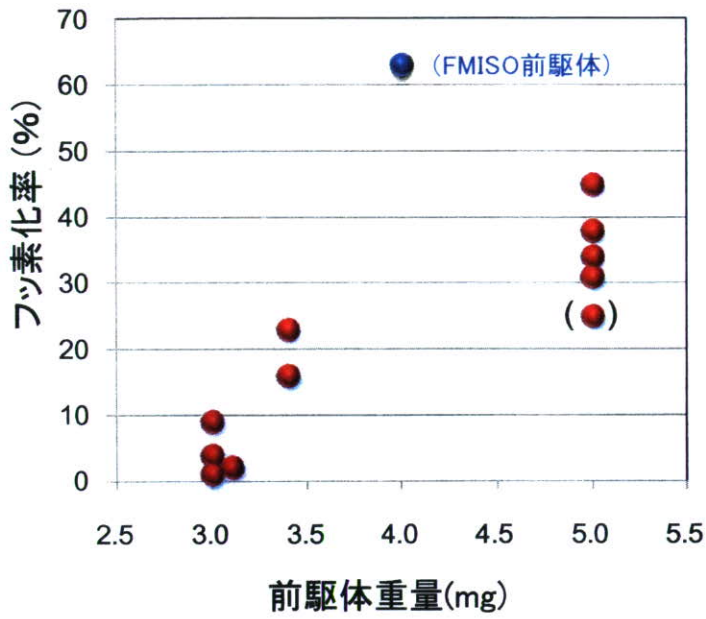
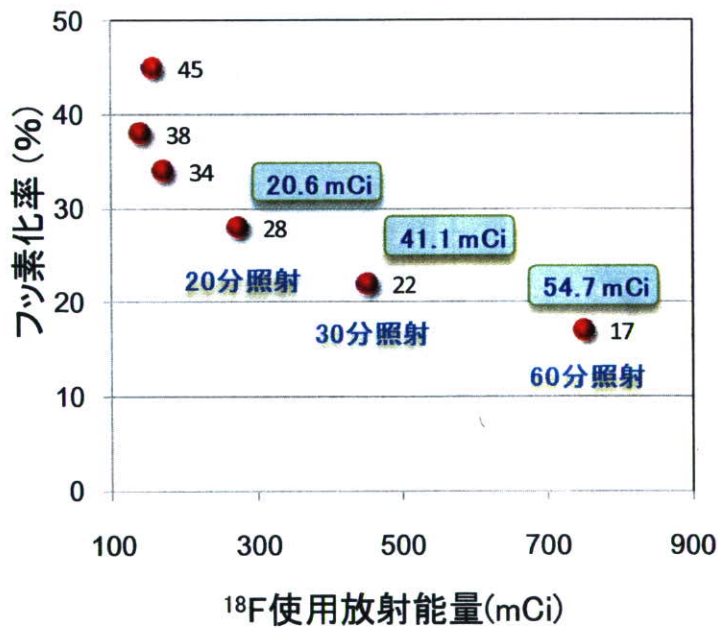


図 9. AD 脳切片での $[^{18}\text{F}]\text{FACT-ARG}$ 画像と $\text{A}\beta$ 免疫染色像



(照射条件: 20 μ A、10分照射)

図 10. $[^{18}\text{F}]$ FACT 合成前駆体重量によるフッ素標識率の変動



(使用前駆体重量: 5 mg)

図 11. ^{18}F 使用放射能量によるフッ素標識率の変動

表 1 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 2 臨床用合成装置によって製造された^[18F]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	
	嫌気性	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。

**厚生労働科学研究費補助金（医療技術実用化総合研究事業：
基礎研究成果の臨床応用推進研究事業）
平成 17 - 19 年度 分担研究報告書**

[¹¹C]BF-227、[¹⁸F]FACT 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研究 —

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・助教
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・助教
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
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	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
研究協力者	古川勝敏	東北大学大学院医学系研究科 先進漢方治療医学・准教授
研究協力者	田代 学	東北大学サイクロトロン R I センター 核医学部・准教授
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 および FACT を開発し、その臨床評価を行った。これらの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。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研究を開始した。その結果、アルツハイマー病および軽度認知障害の症例で、[¹¹C]BF-227 の集積上昇を確認した。また ¹⁸F 標識プローブである [¹⁸F]FACT を用いた探索的臨床研究を平成 20 年 3 月から開始し、アルツハイマー病患者脳内でのプローブの選択的結合像を確認した。以上の結果から、[¹¹C]BF-227 および [¹⁸F]FACT がアルツハイマー病診断用 PET プローブとして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。

我々は 2500 種類以上の化合物についてスクリーニングを実施した結果、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。我々は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ことを目的に、基礎評価および探索的臨床研究を実施した。さらにアミロイドイメージング技術の普及をはかる目的で、BF-227 の ¹⁸F 標識体である [¹⁸F]FACT を開発し、その探索的臨床研究に着手した。

B. 研究方法

1. 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 に対する試験化合物の結合阻害定数 (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 の 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

PS1/APPsw 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。

6. [¹¹C]BF227-PET、[¹⁸F]FACT の臨床評価

[¹¹C]BF227-PET 検査は、健常ボランティア 18 名（うち 60 歳以上の高齢者 12 名）、AD 患者 16 名（平均 MMSE スコア 19.8 点）、軽度認知障害（MCI）症例 12 名（平均 MMSE スコア 26.0 点）、前頭側頭葉型認知症（FTD）1 名、レビー小体型認知症（DLB）3 名、クロイツフェルト・ヤコブ病（CJD）2 名、ゲルストマン・ストロイスラー・シャインカー症候群（GSS）2 名の計 54 症例で実施した。AD の臨床診断は、NINCDS-ADRDA による probable AD の基準を用いた。また MCI は、Petersen らの amnesic MCI の定義（Arch Neurol 1999;56:303-308）に従った。[¹⁸F]FACT を用いた PET 検査は健常高齢者 1 名、AD 患者 1 名の計 2 名で実施した。

PET 検査は全例、東北大学サイクロトロン RI センターで行った。PET スキャナーは SET-2400W（島津製）を 3D モードで使用した。[¹¹C]BF-227 185~370 MBq あるいは [¹⁸F]FACT 185 MBq を静注投与し、その直後から 60 分間のダイナミックスキャンを実施した。

各個人の MRI T1 強調画像を参照にして、前頭葉、外側側頭葉、頭頂葉、側頭後頭葉、後頭葉、前部帯状回、後部帯状回、線条体、視床、内側側頭葉、小脳、橋、皮質下白質に関心領域（ROI）を設定した。次に設定された ROI を、[¹¹C]BF-227-PET SUV 画像上に読み込み、SUV

値を収集した。また大脳新皮質における SUV 値は、前頭葉、外側側頭葉、頭頂葉、側頭後頭葉の SUV 値の平均値とした。線維化アミロイドの沈着しない小脳皮質を参照領域として、投与後 40~60 分の平均 SUV 値の対小脳比（SUVR）を算出した。ROI 解析には AJS 株式会社製 Dr.View/LINUX を使用した。また健常人 2 名、AD 患者 1 名を除く同一被検者群で、FDG-PET を実施し、[¹¹C]BF-227-PET と AD 診断精度を比較した。以下の式を用いて、BF-227 PET 外側側頭葉 SUVR 値、FDG-PET 後部帯状回 SUVR 値の Z スコアを算出した。

$$Z \text{ スコア} = (\text{観察 SUVR 値} - \text{健常高齢者 SUVR の平均値}) / (\text{健常高齢者 SUVR 値の標準偏差})$$

ROC 解析には GraphPad Prism 4 ソフトウェアを使用し、個々人の SUVR を用いて解析を行った。さらに SPM2 ソフトウェアを用いて SUV 画像の解剖学的標準化を行い、voxel 単位で健常者群と AD 患者群の画像の統計学的解析を行った。

（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: 眞野成康薬剤部長、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: 土屋滋教授)

C. 研究結果

1. A β との結合親和性の評価

[¹²⁵I]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。その結果、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

[¹¹C]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)。¹¹C]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研究

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研究を開始した。¹¹C]BF-227 投与後の時間一放射能曲線を健常高齢者と AD 患者で比較したところ、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 [¹¹C]BF-227 のクリアランスが遅延していた (図 4)。このクリアランス遅延は、¹¹C]BF-227 の老人斑との結合を反映していると思われる。一

方、脳幹部、白質、視床においても、 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の排泄が遅延する傾向が認められた。ただし、その集積レベルは健常高齢者と AD 患者ではほぼ同レベルにあることから、AD 特有の病理変化を反映したものではないと考えられる。

健常高齢者、MCI、AD 患者の $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ 投与後の PET 画像(投与後 20-40 分の SUVR 画像)を図 5 に示した。健常高齢者に比べて AD 患者では、大脳皮質の広範な領域で $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ の高集積が観察された。MCI では、健常高齢者と同レベルの集積を示す症例、AD 患者と同レベルの集積を示す症例、その中間の症例などが混在していた。

健常者に比べて AD 患者で集積上昇のみられた脳領域を SPM2 ソフトウェアによって抽出した。その結果、側頭—頭頂葉領域を中心とする大脳皮質の広範な領域で有意な集積上昇が確認された(図 6)。このような集積分布は、病理学的研究で示されている Neuritic plaque の沈着分布に近いことから、BF-227 の脳内集積は比較的成熟した老人斑の蓄積を反映しているものと推測された。

健常若年者、高齢者、MCI、AD、DLB 各症例の大脳新皮質における SUVR 値を図 7 に示した。健常高齢者の平均 SUVR + 1.5SD (1.111) をカットオフ値に設定すると、AD 患者でこのカットオフ値を上回ったのは 16 名中 15 名 (93.8%) であった。一方、健常者でこのカットオフ値を上回ったのは 1 名のみであった。MCI の症例でカットオフ値を上回ったのは 12 名中 8 名 (66.7%) であった。PET 検査後、最長 1.5 年の経過観察期間中に MCI の 3 症例で AD への進行が確認された。この 3 名はいずれも、初回の検査時にカットオフ値を上回る SUVR 値を示していた。AD と鑑別を要する DLB の症例では 3 名全例でカットオフ値を上回る SUVR 値を示したが、いずれも AD の平均値を下回っていた。集積分布に関しては AD との大きな違いは認めなかった。

本 PET 検査の AD 患者と健常高齢者の鑑別能

力を、同一被検者で施行した FDG-PET と比較した。BF227-PET における外側側頭葉 SUVR 値、FDG-PET における後部帯状回 SUVR 値のそれぞれから算出した Z スコアを図 8 に示した。BF227-PET では、AD 患者 16 名中 15 名で Z スコアが 2 以上であったのに対し、健常高齢者の Z スコアは全例 2 以下であった。これに対し、FDG-PET における Z スコアは AD 患者でも軒並み低く、2 以上の Z スコアを示した症例は 16 名中 6 名のみであった。ROC 解析の AUC 値は、FDG-PET (0.8606) に比べて、BF-227-PET では 0.9896 と高く、BF-227 を用いた PET 検査の方が AD 診断において感度・特異度に優れた検査と考えられた(図 9)。

プリオン病症例の解析においては、GSS 症例では小脳で高頻度のアミロイド病変が出現するため、参照領域として橋の ROI 値で代用した。CJD2 名の集積パターンは健常人に近かったが、GSS の 1 例目 (GSS1) では大脳皮質、線条体、視床、小脳皮質での集積上昇が確認された(図 10、図 11)。一方 GSS の 2 例目 (GSS2) では大脳皮質における集積は顕著ではなく、小脳皮質と視床で軽度の集積上昇を認めた(図 10、図 11)。

最後に $[^{18}\text{F}]\text{FACT}$ を用いた PET 検査の結果を 2 名の被検者で実施した。投与後 10-30 分後の SUVR 画像を図 12 に示した。健常高齢者では BF-227 と同様に脳幹部、視床、皮質下白質での集積が認められるが、大脳皮質からの wash out は速やかである。これに対し、AD 患者では側頭部、頭頂部、楔前部を中心に高集積が観察され、老人斑との結合が示唆された。

7. 考察

1990 年代後半に $[^{18}\text{F}]\text{FDDNP}$ が初のアミロイドイメージングプローブとして臨床応用された。しかしながら、その脂溶性の高さからバックグラウンドでの非特異的集積が目立ち、病変部のバックグラウンドに対するコントラストは不良であった。PIB は FDDNP に数年遅れて

実用化された。病変部の集積がバックグラウンドの約2倍に上昇し、コントラスト良くアミロイド沈着病変を描出する。

BF-227 を用いた PET 画像は、病変部位のコントラストが FDDNP よりは優れているものの、PIB よりは劣る。これは主として化合物のβシート構造に対する結合親和性の違いに起因すると考えられる。ただし ROI 解析における SUVR 値の分布を見る限り、PIB と比べて臨床的有用性が劣る印象はない。むしろ PIB に比べて健常人データのばらつきが少なく、高特異度を確保したい場合には BF227-PET の方が有利ではないかと思われる。また FDG-PET と比較しても健常人での個体差が小さく、既存の診断法よりも優れた精度で AD 診断を可能にすることは間違いない。さらに AD への進行が確認された Progressive MCI の症例でも、初回検査時に BF-227 の高集積が確認された。AD の根本的治療薬が開発された暁には、当面の治療介入のタイミングは早期段階の AD もしくは MCI 段階に設定される。その際、多くの臨床施設で共通して使用できる早期診断指標が求められる。BF227-PET は MCI から AD への進行を予測する検査法として、このような要求に応えることができるであろう。

アミロイドイメージングで示されるプローブの集積が、老人斑の蓄積を検出していることは間違いないと思われる。ただしプローブの結合選択性に関しては完全とは言えず、プローブの老人斑以外への結合の可能性についても考慮する必要がある。アミロイドイメージング用プローブでは、主に脂溶性の高さに起因すると思われる白質や脳幹部への非特異的集積がほぼ共通して認められる。またアミロイドアンギオパチーの存在もプローブの局所集積に大きく関与するとみなされている。さらに Gerstmann-Sträussler-Scheinker 病のプリオン病で認められるプラークにも、プローブは結合する。したがってコンフォメーション病と総称さ

れる疾患では、異常集積像を示す可能性があることを留意すべきである。本検査で異常を示す可能性のある疾患、病態としては、(1)AD、(2)MCI、(3)preclinical AD、(4)AD 病変を合併したレビー小体型認知症、(5)アミロイドアンギオパチー、(6)一部のプリオン病、が挙げられる。

^{11}C 標識 PET プローブは、自施設での放射性薬剤の合成が要求され、実施可能な臨床施設が限定される。日本国内では多くても 10~20 施設が限界であろう。本検査の普及には、放射性薬剤としてデリバリー供給できる ^{18}F 標識プローブの実用化が必須である。本研究において [^{18}F]FACT を用いた PET 検査によって、AD 患者で健常人とは異なる集積分布を確認することができた。今後症例数を増やし、本プローブの臨床的有用性を検証する予定である。

本プローブが放射性薬剤として普及すれば、今後多くの臨床施設で本検査が認知症の臨床診断プロセスに組み込まれることになる。そうすれば AD の早期診断・早期治療へ向けた有望なツールになると同時に、AD の病態解明にも大きく寄与するであろう。既存の薬剤、食品やライフスタイルなどが、老人斑の蓄積を抑制（あるいは促進）している可能性も考えられる。アミロイドイメージングを活用すれば、疫学研究で AD 発症との関連性が示唆されている様々な要因と老人斑蓄積との関連性を証明できると思われる。今後の研究の発展に期待したい。

8. 結論

[^{11}C]BF-227 および [^{18}F]FACT がアルツハイマー病診断用 PET プローブとして有用であることを確認した。

9. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamura N, Furumoto S, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y. Imaging amyloid pathology in the living brain. *Curr Med Imaging Rev.* 2008; 4: 56-62.
2. 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.* 2008; 65: 472-479.
3. 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.* 2007;48:553-561.
4. Okamura N, Furumoto S, Funaki Y, Suemoto T, Kato M, Ishikawa Y, Ito S, Akatsu H, Yamamoto T, Sawada T, 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. *Geriatr Gerontol Int.* 2007; 7: 393-400.
5. Furumoto S, Okamura N, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y. Recent advances in the development of amyloid imaging agents. *Curr Top Med Chem.* 2007; 7:1773-1789.
6. Mochizuki H, Tashiro M, Gyoba J, Suzuki M, Okamura N, Itoh M, Yanai K. Brain activity associated with dual-task management differs depending on the combinations of response modalities. *Brain Res.* 2007;1172:82-92.
7. Mochizuki H, Sadato N, Saito DN, Toyoda H, Tashiro M, Okamura N, Yanai K. Neural correlates of perceptual difference between itching and pain: A human fMRI study. *Neuroimage.* 2007;36:706-717.
8. 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 pentylenetetrazol kindling in weanling mice. *Neuropharmacology.* 2006;50:404-411.
9. 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.
10. 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.*, 2005; 5: 298-300.
11. 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.
12. 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, 66 Suppl 1:288-292, 2008.
13. 岡村信行, 古本祥三, 工藤幸司, 谷内一彦. アルツハイマー病. 日本臨床, 65(2):320-325, 2007.
14. 岡村信行, 谷内一彦. 脳の分子イメージング アミロイドイメージング. 遺伝子医学 MOOK ますます広がる分子イメージング技術, p220-224. 株式会社メディカルドゥ
15. 岡村信行, 谷内一彦. アミロイドイメージ