

後、LEICA CM1900 により厚さ 10 μm の切片を作製した。切片トリガン
ド (100 μM in 50%EtOH) を 10 分
間、または切片と Th-S を 3 分間反応

C. 研究結果

AD の特徴的病理学的変化のうち最も初期段階に始まるとされる老人斑に着目し、老人斑の主構成成分である $\text{A}\beta$ に特異的結合性を有するイメージングプローブの開発を計画した。本研究では、NSAIDs を基盤分子とする種々の放射性ヨウ素標識化合物を合成し、アミロイドイメージングプローブとしての有用性の評価を行った。

NSAIDs 派生化合物の合成

図 1 から 1 3 に NSAIDs 派生化合物の合成経路を示した。それぞれのプロモ化合物はパラジウムを触媒とするビス(トリブチルスズ)との反応によりトリブチルスズ体へと変換した。これらのトリブチルスズ体はヨウ素と反応させることによりヨウ素体へと変換した。

^{125}I 標識実験

^{125}I 標識は、過酸化水素を酸化剤として用い、スズ-ヨウ素交換反応により目的とする ^{125}I 標識体を得た(図 1 4)。あらかじめ 254 nm における非放射能化合物の吸光度を逆相 HPLC で分析

させた後、50%EtOH で 2 回洗浄し、Nikon ECLIPSE 80i を用い、波長 365 nm、380-420 nm で観察した。

しておき、その保持時間と一致する化合物を分離精製することにより、目的とする ^{125}I 標識体を 98%以上の放射化学的純度で得た。

$\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体との結合親和性に関する検討

合成した化合物に関して、アミロイド β 4 2 凝集体を用いたインビトロ結合実験を行い、化合物のアミロイドに対する結合性を定性的に評価した。その結果を図 1 5 のグラフに示した。横軸に化合物の濃度、縦軸にアミロイド凝集体に結合した放射能を示す。アミロイド結合性は、化合物によって異なったが、化合物 3 6 および化合物 3 7 はアミロイド凝集体への高い結合性を有することが示唆された。

さらに、アミロイド凝集体との結合親和性の指標となる阻害定数: K_i を算出するため、 ^{125}I IMPY を放射性リガンドとして用いた結合阻害実験を行った。実験の結果得られた K_i を表 1 に示す。ジフェニルオキサジアゾール誘導体における $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対する結合親和性は、置換基の種類により異なり、 $\text{OH} < \text{NH}_2 = \text{NHMe} = \text{NMe}_2$

< OMe の順で向上することが示された。これら化合物の K_i 値は 4 から 47 nM であり、いずれの化合物も、インビボアミロイドイメージングを行うのに十分な結合性を示した。

正常マウスにおける体内放射能分布実験

4-5 週齢正常マウスを用いて ^{125}I 標識化合物 36、37、54、55、56、57 の体内放射能分布実験を行った (表 2)。いずれの化合物も 1 %ID/g 以上の脳移行性を示し、アミロイドイメージングに十分な放射能が脳へ到達した。 [^{125}I] 37 は、 [^{125}I] 36 に比べて、速やかな放射能消失を示すことが確認された。また、1,2,4 誘導体に比べ、1,3,4 誘導体は高い脳移行性を示した。中でも [^{125}I] 20 は、最も速や

かな放射能消失を示しことが確認された。また、いずれの化合物も肝臓への高い集積を示し、経時的に腸管へと排泄された。

アルツハイマー病病態モデルマウス脳組織切片を用いた蛍光染色実験

次に、実際にアミロイド斑への結合性を検討するために、化合物 36 および化合物 37 を使用し、アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた蛍光染色実験を行った。その結果、アルツハイマー病モデルマウス脳切片上には、同月齢のワイルドタイプマウス脳切片には観察されない、多数の蛍光が観察され、この蛍光像は、隣接切片を用いて行った抗アミロイド β 抗体による免疫染色の陽性部位と一致した。

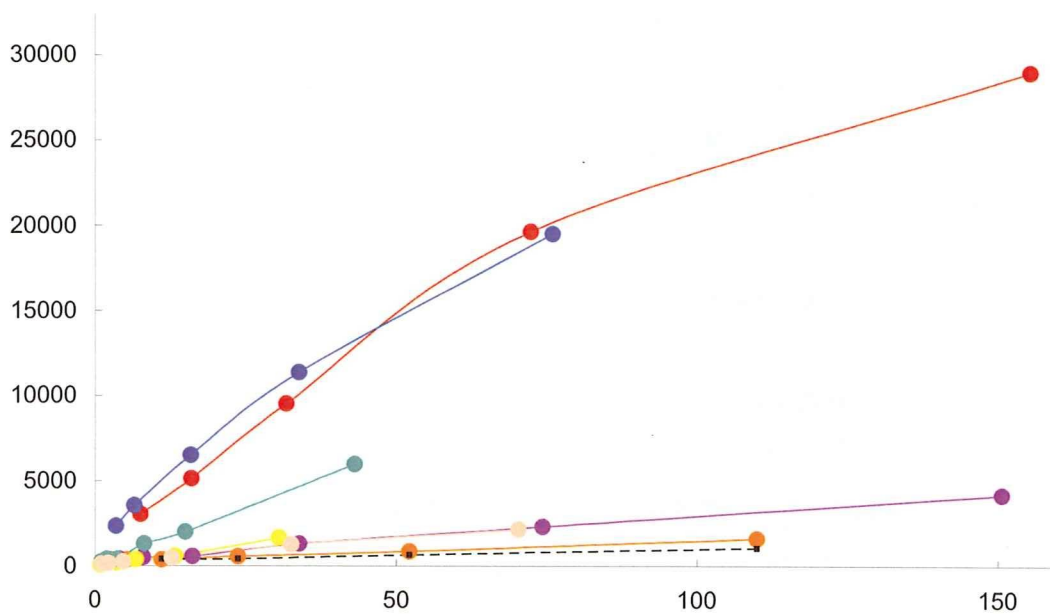
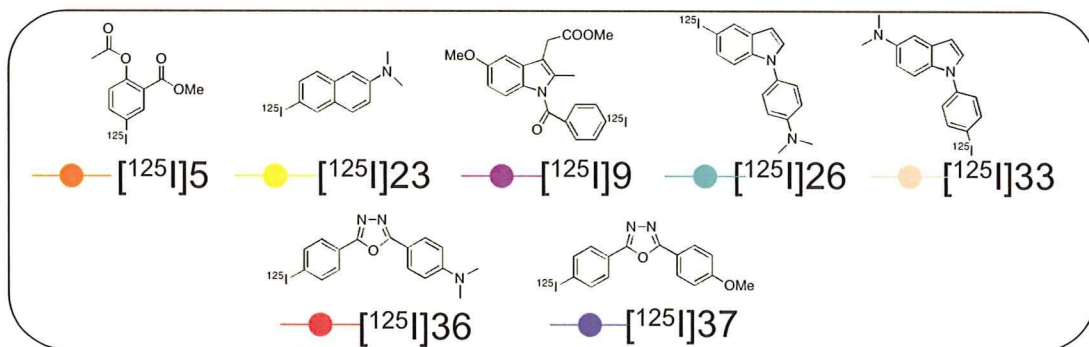


図 1 5. Aβ42 凝集体を用いたインビトロ結合実験

表 1. $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ を放射性リガンドとして用いたジフェニルオキサジアゾール誘導体の A β 42 凝集体への結合阻害実験

Compound	K_i (nM) ^a
36	20.1 \pm 2.6
37	46.1 \pm 12.6
39	229.6 \pm 47.3
40	282.2 \pm 61.4
41	348.6 \pm 51.7
42	257.7 \pm 34.8
54	14.2 \pm 1.4
55	14.3 \pm 3.6
56	15.4 \pm 1.4
57	4.3 \pm 2.1
58	47.1 \pm 4.1

^aValues are means \pm standard error of the mean of 3-6 independent experiments.

表 2. 正常マウス体内放射能分布実験 ^a

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
	$[^{125}\text{I}]\mathbf{54}$			
Blood	4.55 (0.64)	2.32 (0.63)	3.09 (0.22)	2.99 (0.31)
Liver	21.36 (3.13)	17.37 (1.72)	14.89 (1.47)	12.33 (2.19)
Kidney	8.24 (1.26)	6.94 (0.70)	5.86 (0.56)	5.15 (0.74)
Intestine	1.50 (0.36)	3.08 (0.47)	5.84 (0.75)	8.33 (1.39)
Spleen	6.13 (1.67)	8.87 (2.35)	6.89 (0.81)	5.02 (0.55)

Pancreas	3.69 (2.30)	3.88 (0.54)	3.36 (0.36)	2.83 (0.32)
Heart	9.29 (1.66)	4.02 (0.48)	3.48 (0.24)	3.51 (0.61)
Stomach ^b	0.92 (0.31)	1.70 (0.18)	4.05 (0.96)	5.15 (1.32)
Brain	1.61 (0.23)	2.48 (0.16)	3.32 (0.31)	3.29 (0.58)
[¹²⁵I]55				
Blood	3.54 (0.26)	1.84 (0.24)	1.52 (0.13)	1.54 (0.09)
Liver	14.62 (1.30)	12.37 (2.09)	8.53 (0.98)	7.30 (0.78)
Kidney	9.53 (0.83)	5.30 (0.94)	3.39 (0.66)	3.02 (0.58)
Intestine	1.36 (0.21)	2.83 (0.93)	5.67 (1.44)	8.46 (1.36)
Spleen	4.58 (0.62)	4.70 (0.48)	2.84 (0.35)	2.14 (0.22)
Pancreas	3.34 (0.38)	3.91 (0.60)	3.06 (0.58)	1.88 (0.25)
Heart	9.51 (0.77)	3.05 (0.50)	1.68 (0.21)	1.27 (0.20)
Stomach ^b	1.08 (0.11)	2.32 (0.62)	4.89 (0.99)	7.38 (0.97)
Brain	1.44 (0.12)	1.98 (0.36)	2.56 (0.44)	2.70 (0.33)
[¹²⁵I]56				
Blood	5.42 (0.85)	2.41 (0.22)	1.79 (0.24)	1.56 (0.27)
Liver	13.94 (3.26)	8.27 (1.49)	5.89 (1.75)	5.15 (1.92)
Kidney	7.83 (3.53)	7.67 (1.62)	4.81 (1.01)	3.31 (0.77)
Intestine	1.59 (0.28)	2.40 (0.36)	4.12 (0.99)	5.37 (1.01)
Spleen	6.26 (1.53)	4.56 (1.11)	3.11 (0.62)	2.41 (0.29)
Pancreas	3.17 (0.73)	3.80 (0.50)	2.86 (1.64)	2.47 (0.62)

Heart	11.04 (2.43)	4.81 (1.07)	2.20 (0.54)	1.24 (0.68)
Stomach ^b	1.28 (0.21)	3.28 (0.36)	4.80 (0.56)	5.75 (2.47)
Brain	1.07 (0.23)	1.45 (0.27)	2.23 (0.61)	2.32 (0.64)

[¹²⁵I]57

Blood	1.96 (0.66)	1.63 (0.14)	1.23 (0.39)	1.12 (0.26)
Liver	11.94 (1.92)	9.35 (1.17)	6.13 (0.76)	4.44 (0.60)
Kidney	8.77 (1.17)	6.22 (0.87)	3.85 (1.01)	2.95 (0.66)
Intestine	1.70 (0.27)	3.53 (0.32)	6.62 (0.90)	8.21 (1.84)
Spleen	4.41 (0.72)	3.62 (0.28)	2.13 (0.53)	1.34 (0.40)
Pancreas	4.55 (0.77)	4.94 (0.26)	2.84 (0.48)	1.45 (0.28)
Heart	11.30 (1.92)	4.44 (0.67)	1.84 (0.32)	1.35 (0.29)
Stomach ^b	0.62 (0.21)	1.64 (0.10)	2.46 (0.80)	3.16 (1.39)
Brain	2.06 (0.45)	2.76 (0.23)	2.82 (0.34)	2.01 (0.33)

[¹²⁵I]36

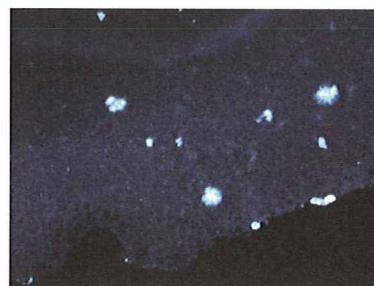
Blood	3.28 (0.46)	3.51 (0.29)	2.53 (0.28)	2.21 (0.41)
Liver	15.87 (3.49)	19.12 (2.43)	12.64 (2.44)	10.01 (1.64)
Kidney	9.14 (1.60)	7.80 (0.64)	5.71 (1.35)	3.81 (0.64)
Intestine	2.28 (0.55)	11.34 (1.61)	12.58 (2.35)	16.22 (2.51)
Spleen	3.56 (0.96)	4.10 (0.40)	2.63 (0.54)	2.05 (0.41)
Pancreas	5.32 (0.98)	4.39 (2.17)	2.50 (0.56)	2.14 (0.90)
Heart	3.99 (3.10)	3.55 (1.86)	2.03 (0.30)	1.54 (0.31)

Stomach ^b	0.71 (0.13)	1.41 (0.91)	3.12 (0.90)	2.90 (1.57)
Brain	2.98 (0.53)	5.93 (0.76)	3.16 (0.69)	1.78 (0.41)
[¹²⁵ I]37				
Blood	1.84 (0.30)	1.60 (0.30)	1.26 (0.26)	0.80 (0.20)
Liver	9.60 (1.73)	12.60 (1.14)	8.07 (1.66)	4.65 (1.34)
Kidney	7.14 (1.46)	4.85 (0.48)	3.92 (1.97)	2.48 (0.37)
Intestine	2.07 (0.36)	4.49 (0.60)	10.06 (1.81)	19.85 (4.71)
Spleen	2.44 (0.28)	1.51 (0.26)	0.80 (0.10)	0.60 (0.26)
Pancreas	4.74 (0.63)	1.98 (0.37)	0.96 (0.03)	0.57 (0.14)
Heart	4.80 (1.33)	1.73 (0.27)	0.92 (0.25)	0.43 (0.11)
Stomach ^b	0.71 (0.13)	1.41 (0.91)	3.12 (0.90)	2.89 (1.57)
Brain	3.75 (0.78)	2.74 (0.37)	1.04 (0.14)	0.36 (0.10)

^aExpressed as % injected dose per gram. Each value represents the mean (s.d.) for 3-5 animals at each interval. ^bExpressed as % injected dose per organ. ^cnot determined



36



チオフラビン S



37



チオフラビン S

図16. アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた化合物36と37の蛍光染色

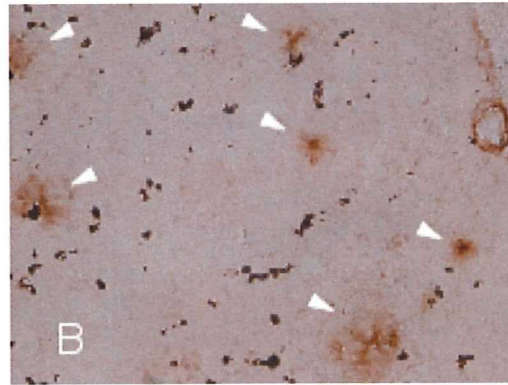
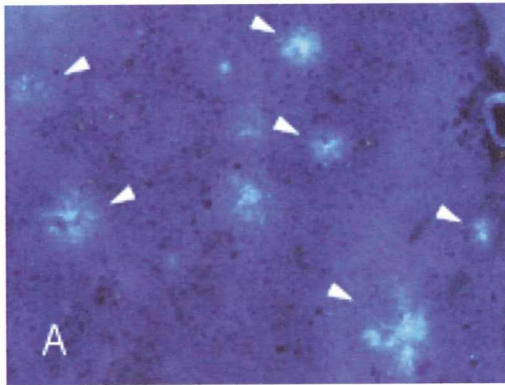
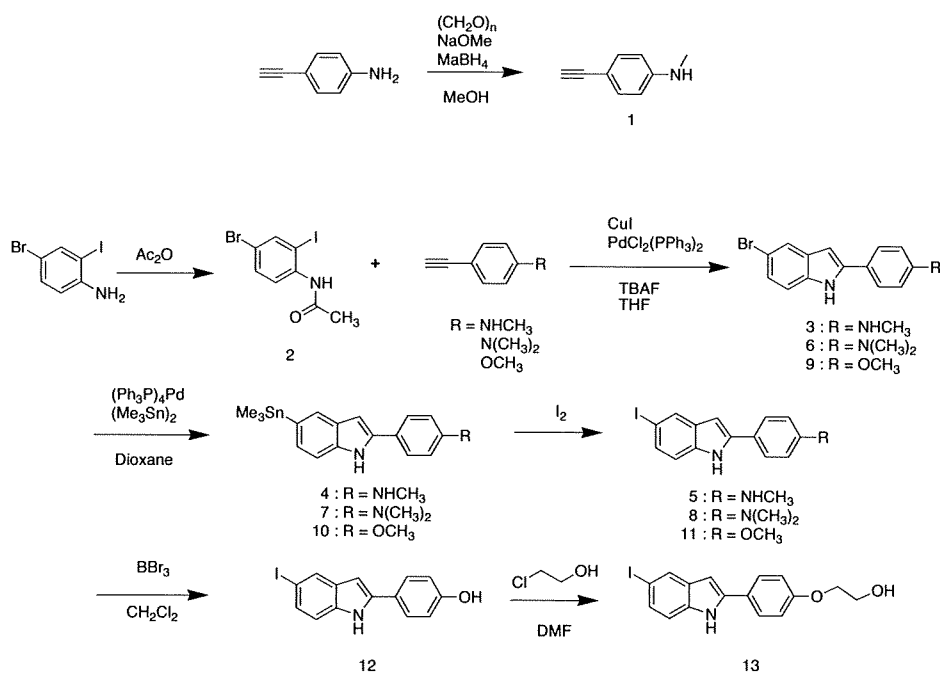


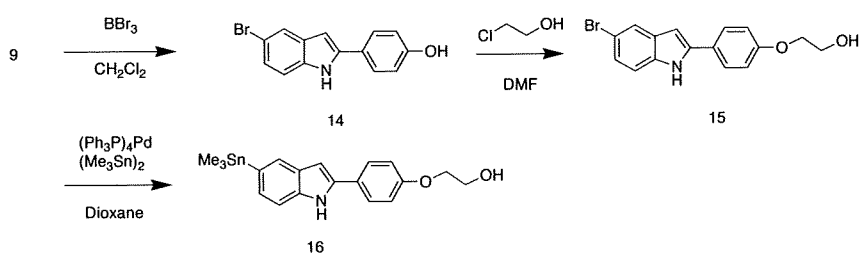
図17. アルツハイマー病モデルマウス脳切片を用いた化合物56の蛍光染色(A)と隣接切片を用いた抗アミロイドβ抗体による免疫染色(B)

フェニルインドール誘導体の合成

Scheme 1, 2 にフェニルインドール誘導体の合成経路を示す。2-PI の合成は、以前に報告された方法によって行った [30]。4-Bromo-2-iodoaniline に無水酢酸を加えることによって得た化合物 5 9 と、種々の置換基を導入したエチニルベンゼンとを反応させることで、インドール骨格の 2 位にフェニル基を導入した化合物 6 1、6 4、6 7 を 27.2 - 49.5% の収率で得た。その

後、ビストリメチルスズと反応させることによってスズ体である 6 2、6 5、6 8 を得、スズ-ヨウ素交換反応によって、2-PI 誘導体である化合物 6 3、6 6、6 9 をそれぞれ得た。6 7、6 9 の三臭化ホウ素による脱メチル化反応によって 7 2、7 0 をそれぞれ 13%、19.5% の収率で得、7 2、7 0 をエチレンクロロヒドリンとそれぞれ反応させることによって 7 3、7 1 を得た。

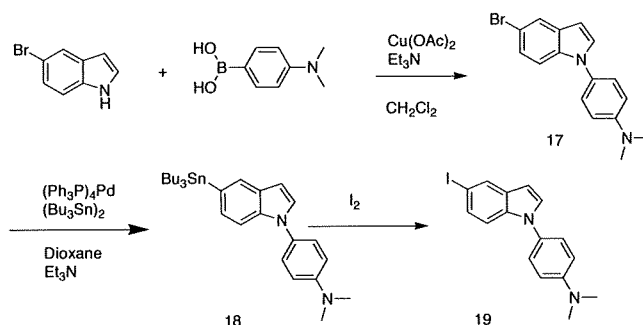




Scheme 1.

1-PI の合成は、以前に報告された方法によって行った。5-Bromoindole と 4-(dimethylamino)phenylboronic acid を酢酸銅存在化で反応させることでインドール骨格の 1 位にフェニル基を

導入した 75 を 44.2% の収率で得た。ビストリブチルスズと反応させることによってスズ体である 76 を得、スズ-ヨウ素交換反応によって 77 を得た。

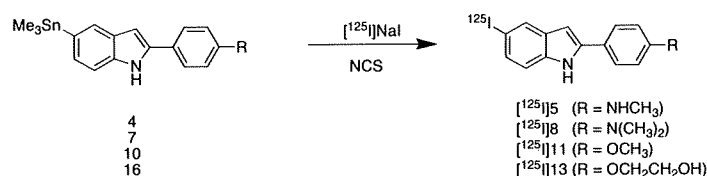


Scheme 2.

2-PI 誘導体の ¹²⁵I 標識

Scheme 3 に ¹²⁵I 標識経路を示す。¹²⁵I 標識は以前報告された方法に従って行い、目的とする [¹²⁵I]5、[¹²⁵I]8、[¹²⁵I]11、

[¹²⁵I]13 を放射化学的収率 14 ~ 56%、放射化学的純度 99% 以上でそれぞれ得た。



Scheme 3.

フェニルインドール誘導体の Aβ(1-42)凝集体に対する結合親和性の検討

合成した種々のフェニルインドール誘導体の Aβ(1-42)凝集体への結合性を検討するため、^[125I]IMPY を放射性リガンドに用いたインビトロ競合阻害実験を行い、GraphPad Prism 4.0 を用いて阻害実験曲線を作成し IC₅₀ を算出した(表 3)。阻害定数は、 $K_i = IC_{50}/(1+[L]/K_d)$ の式を用いて算出した。 $[L] = [^{125}I]IMPY$ 濃度、 K_d は IMPY の解離定数($K_d = 5.0$ nM)を用いた。

インドール骨格の 2 位にフェニル基

を導入した 2-PI 誘導体である化合物 63、66、69、70、71 は K_i 値がそれぞれ、27、4、20、33、26 nM と算出され、いずれの化合物も Aβ凝集体に対し高い結合親和性を示した。一方、インドール骨格の 1 位にフェニル基を導入した 1-PI 誘導体である化合物 77 は、 K_i 値が 10000 以上となり Aβ凝集体に対して顕著な結合性を持たないことが示された。以上の結果より、Aβ(1-42)との結合親和性にはインドール骨格へのフェニル基の導入位置が重要であることが明らかになった。

表 3. Inhibition constants (K_i) for binding of PI derivatives determined using ^[125I]IMPY as the ligand in Aβ (1-42) aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a
63	27.0 ± 0.18
66	4.24 ± 0.71
69	20.2 ± 5.15
70	32.9 ± 2.93
71	25.9 ± 5.13
77	>10000

^aValues are means ± standard error for the mean for 3-6 independent experiments.

Tg2576 トランスジェニックマウス脳切片を用いた蛍光染色

化合物 66 を用いて、Tg2576 トランスジェニックマウス脳切片の蛍光染色を行い、2-PI のアミロイド斑への

結合性を確認した。また、蛍光染色を用いた切片の隣接切片を用いて、老人斑アミロイド蛍光染色試薬として知られているチオフラビン S による蛍光染色を行い、アミロイド斑の存在を確

認した。比較として、wild-type マウス脳切片を用いた蛍光染色も行った。その結果、Tg2576 マウス脳切片上には wild-type マウス脳切片上には認められない複数の蛍光像が観察され、その

蛍光像は、チオフラビン S の蛍光像と一致した。この結果より、2-PI 誘導体である化合物 **8** がマウス脳内に蓄積したアミロイド斑に対して選択的結合性を有することが明らかになった。



図 18. Neuropathological staining of compound **66** on 10- μ m AD model mouse sections (left) and wild-type mouse sections (middle). Labeled plaques were confirmed by staining of the adjacent sections with thioflavin S (right).

正常マウスを用いた体内放射能分布実験

A β 凝集体に対して高い結合親和性を示した 2-PI 誘導体 [125 I]**63**、[125 I]**66**、[125 I]**69**、[125 I]**71** に関して、正常マウスを用いた体内放射能分布実験を行った。[125 I]**63**、[125 I]**66**、[125 I]**69**、[125 I]**71** を正常マウスに投与後の体内放射能分布の結果を表 4 に示す。

[125 I]**63**、[125 I]**66**、[125 I]**69**、[125 I]**71** は、投与 2-10 分後にそれぞれ、1.7、1.2、2.1、2.6 %ID/g の放射能が脳へ移行した。しかしながら、2 分に対する 30 分の放射能の割合は、もっとも速やか

なクリアランスを示した [125 I]**69** で 64.4%と、いずれの化合物においても脳内における滞留傾向を示した。この脳内放射能挙動の結果は、これまでに報告されたチオフラビン-T 類縁化合物の放射性ヨウ素標識体と類似したものであった。

また、2-PI にジメチルアミノ基を導入した [125 I]**66** は胃への著しい放射能集積が見られ、体内における不安定性が示唆される結果となった。

表 4. Biodistribution of radioactivity after injection of [¹²⁵I]2-PI derivatives in normal mice^a.

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹²⁵I]63				
Blood	3.77 (1.25)	1.71 (0.15)	1.36 (0.15)	0.85 (0.15)
Liver	22.85 (9.60)	26.83 (1.28)	23.07 (2.33)	18.59 (5.60)
Kidney	5.53 (1.77)	4.31 (0.44)	3.84 (0.67)	2.95 (0.87)
Intestine	0.97 (0.33)	3.57 (0.34)	8.54 (1.80)	10.46 (1.11)
Spleen	7.83 (2.24)	19.67 (8.82)	10.34 (1.26)	7.77 (0.50)
Pancreas	2.31 (0.70)	2.87 (0.33)	2.12 (0.32)	1.38 (0.16)
Heart	5.68 (1.27)	3.59 (0.29)	2.96 (0.42)	2.11 (0.57)
Stomach ^b	0.52 (0.03)	1.34 (0.53)	2.55 (2.12)	1.90 (0.52)
Brain	1.10 (0.27)	1.68 (0.13)	1.42 (0.03)	0.90 (0.15)
[¹²⁵I]66				
Blood	6.18 (0.65)	4.53 (0.37)	3.68 (0.41)	3.29 (1.00)
Liver	10.20 (1.92)	5.14 (1.01)	3.55 (0.62)	3.24 (0.76)
Kidney	9.49 (1.61)	4.46 (0.71)	4.58 (1.24)	4.71 (2.44)
Intestine	1.80 (0.24)	3.09 (0.40)	4.52 (0.58)	6.08 (1.58)
Spleen	4.13 (0.64)	3.28 (0.57)	2.60 (0.41)	2.24 (0.64)
Pancreas	5.21 (2.50)	4.13 (0.67)	3.10 (0.41)	2.30 (0.54)
Heart	8.08 (1.59)	4.82 (0.67)	1.87 (0.21)	1.84 (0.76)
Stomach ^b	4.03 (0.65)	10.65 (2.18)	17.77 (2.04)	16.26 (3.52)
Brain	1.19 (0.34)	1.19 (0.30)	0.96 (0.17)	0.71 (0.19)
[¹²⁵I]69				
Blood	3.59 (1.41)	1.97 (0.54)	1.38 (0.25)	0.80 (0.43)
Liver	17.81 (5.73)	13.96 (4.21)	10.38 (2.64)	8.26 (2.29)
Kidney	8.76 (2.19)	4.96 (1.44)	2.89 (0.44)	2.06 (0.66)
Intestine	1.90 (0.66)	6.85 (1.86)	12.32 (3.65)	21.11 (6.94)
Spleen	4.22 (0.78)	3.43 (1.15)	2.96 (0.41)	2.04 (1.12)

Pancreas	4.54 (0.44)	3.94 (1.46)	1.95 (0.33)	1.29 (0.45)
Heart	7.72 (1.94)	2.97 (1.26)	1.47 (0.20)	1.12 (0.48)
Stomach ^b	0.72 (0.39)	1.38 (1.42)	2.67 (3.24)	3.06 (1.28)
Brain	2.11 (0.69)	2.07 (0.71)	1.36 (0.37)	1.16 (0.39)

[¹²⁵I]71

Blood	4.07 (0.30)	1.60 (0.30)	1.26 (0.26)	0.80 (0.20)
Liver	17.69 (2.64)	16.77 (2.20)	13.42 (1.70)	8.17 (1.28)
Kidney	11.93 (1.83)	9.35 (0.46)	6.77 (0.83)	2.76 (0.45)
Intestine	1.97 (0.22)	5.76 (0.66)	11.32 (1.65)	18.98 (3.21)
Spleen	7.56 (1.24)	7.09 (1.60)	4.75 (0.82)	2.39 (0.52)
Pancreas	5.55 (1.00)	5.59 (0.56)	3.57 (0.40)	2.22 (0.29)
Heart	12.91 (2.16)	5.84 (0.36)	2.97 (0.62)	1.36 (0.17)
Stomach ^b	0.97 (0.31)	1.97 (1.05)	2.11 (0.26)	1.62 (0.44)
Brain	2.13 (0.54)	2.62 (0.21)	1.93 (0.18)	1.82 (0.35)

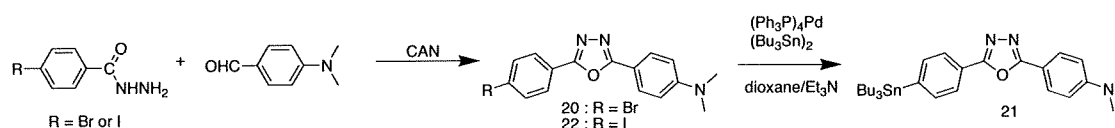
^a Expressed as % injection dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 2-5 animals.

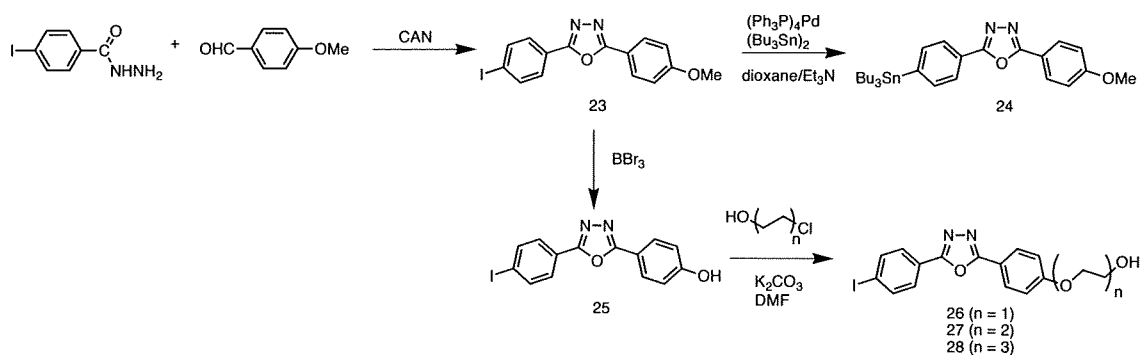
^b Expressed as % injected dose per organ.

1,3,4-DPOD 誘導体の合成

Scheme 4 に1,3,4-DPOD誘導体の合成経路を示す。オキサジアゾール骨格の合成は以前に報告された方法で行った。4-Iodobenzohydrazide と 4-(dimethylamino)benzaldehyde を出発原料として、1段階の反応により、**70** を、4-iodobenzhydrazide と 4-methoxybenzaldehydeから**71**を得た。

71の三臭化ホウ素による脱メチル化反応により**73**を49%の収率で得、**73**と *n*が1~3のエチレンオキシ鎖とをそれぞれ反応させることによって**74**、**75**、**76**を得た。**78**と**81**をそれぞれビストリメチルスズと反応させることによってスズ体である**21**、**24**を8.2%、6.5%の収率で得た。



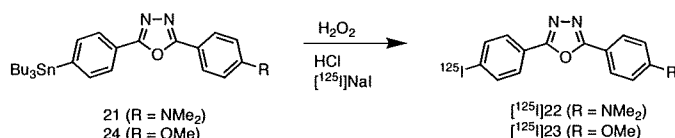


Scheme 4.

1,3,4-DPOD 誘導体の ^{125}I 標識

Scheme 5 に ^{125}I 標識経路を示す。目的とする $[^{125}\text{I}]\mathbf{80}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{81}$ を放射化学的収

率 45%以上、放射化学的純度 99%以上でそれぞれ得た。



Scheme 5.

ジフェニルオキサジアゾール誘導体の $\text{A}\beta(1-42)$ 凝集体に対する結合親和性の検討

1,3,4-DPOD 誘導体の K_i 値は、20~349 nM であり、 $\text{A}\beta$ 凝集体に対し結合親和性を有することが示された。また、その結合性は導入した側鎖によって異なり、特に水酸基、エチレンオキシ鎖をそれぞれ導入した化合物 $\mathbf{83} \sim \mathbf{86}$ は高い K_i 値を示した。このことより

1,3,4-DPOD の $\text{A}\beta$ 凝集体への結合性には、導入する側鎖が影響することが示唆された。また、1,3,4-DPOD 中でも最も高い結合親和性を示した化合物 $\mathbf{80}$ は以前に報告された 1,2,4-DPOD 誘導体にジメチルアミノ基を導入した 4-(3-(4-iodophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl)-*N,N*-dimethylamine (1,2,4-DPOD-DM, $\text{K}_i = 15$ nM) とほぼ同等の結合親和性を示した。

表 5. Inhibition constants (K_i) for binding of 1,3,4-DPOD derivatives determined using $[^{125}\text{I}]\text{IMPY}$ as the ligand in $\text{A}\beta(1-42)$ aggregates.

Compound	K_i (nM) ^a
80	20.1 ± 2.5
81	46.1 ± 12.6
83	229.6 ± 47.3
84	282.2 ± 61.4
85	348.6 ± 51.7
86	257.7 ± 34.8

^aValues are the mean ± standard error for the mean for 4-6 independent experiments.

II-iv Tg2576 トランスジェニックマウス脳切片を用いた蛍光染色

化合物 **80** を用いて、Tg2576 トランスジェニックマウス脳切片の蛍光染色を行い、1,3,4-DPOD のアミロイド斑への結合性を確認した。また、蛍光染色を用いた切片の隣接切片を用いて、老人斑アミロイド蛍光染色試薬として知られているチオフラビン S による蛍光染色を行い、アミロイド斑の存在を確認した。比較として、wild-type マ

ウス脳切片を用いた蛍光染色も行った。その結果、Tg2576 マウス脳切片上には wild-type マウス脳切片上には認められない複数の蛍光像が観察され、その蛍光像は、チオフラビン S の蛍光像と一致した。この結果より、1,3,4-DPOD 誘導体である化合物 **80** がマウス脳内に蓄積したアミロイド斑に対して選択的結合性を有することが明らかになった。

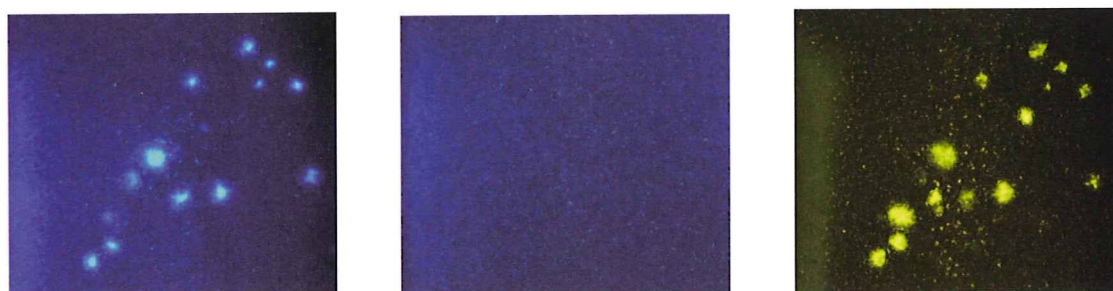


図 19. Neuropathological staining of compound **80** on 10- μ m AD model mouse sections (left) and wild-type mouse sections (middle). Labeled plaques were confirmed by staining of the adjacent sections with thioflavin S (right).

II-v 水/オクタノール間の分配係

数測定による LogP 値の算出

1,3,4-DPOD 誘導体である^[125I]80、^[125I]81 の LogP 値は、それぞれ 2.43、2.58 となり、1,2,4-DPOD 誘導体である^[125I]1,2,4-DPOD-DM、^[125I]3-(4-iodophenyl)-5-(4-methoxyphenyl)-1,2,4-oxadiazole (1,2,4-DPOD-OMe)

の LogP 値 3.22、3.37 より低い値を示した (表 4)。また、^[125I]80、^[125I]81 の LogP 値は血液脳関門の透過に必要であると報告されている、logP 値 1~3 の範囲内であることが示された。

表 6. Partition coefficients for 1,2,4-DPOD and 1,3,4-DPOD derivatives.

Compound	log P ^a
80	2.43 ± 0.07
81	2.58 ± 0.06
1,2,4-DPOD-DM	3.22 ± 0.01
1,2,4-DPOD-OMe	3.37 ± 0.04

^aOctanol/buffer (0.1 M phosphate-buffered saline, pH 7.4) partition coefficients. Each value represents the mean (SD) for 2-3 experiments.

II-vi 正常マウスを用いた体内放射能分布実験

5 週齢正常マウスを用いて 1,3,4-DPOD 誘導体の体内放射能分布実験を行った。^[125I]80、^[125I]81 を正常マウスに投与後の脳における放射能挙動を、以前に報告された 1,2,4-DPOD 誘導体である^[125I]1,2,4-DPOD-DM、^[125I]1,2,4-DPOD-OMe の結果と併せて示す (図 20)。また、体内放射能分布の結果は表 7 に示す。

1,2,4-DPOD 誘導体である^[125I]1,2,4-DPOD-DM、^[125I]1,2,4-DPOD-OMe は、脳への取り込みが遅く、その後の放射能は滞留傾

向を示したのに対して、1,3,4-DPOD 誘導体である^[125I]80、^[125I]81 は投与早期にそれぞれ 3.7、5.9%の放射能が脳へ移行しその後、経時的な放射能消失を示した。この放射能挙動の相違の一因として、1,3,4-DPOD が 1,2,4-DPOD より低い脂溶性を有することが考えられた。

以上の結果より、DPOD 誘導体の脳への移行性とクリアランスにはオキサジアゾール環へのフェニル基の導入位置が重要であると考えられた。

表 7 . Biodistribution of radioactivity after injection of [¹²⁵I]1,3,4-DPOD derivatives in normal mice^a.

Tissue	Time after injection (min)			
	2	10	30	60
[¹²⁵I]80				
Blood	3.28 (0.46)	3.51 (0.29)	2.53 (0.28)	2.21 (0.41)
Liver	15.87 (3.49)	19.12 (2.43)	12.64 (2.44)	10.01 (1.64)
Kidney	9.14 (1.60)	7.80 (0.64)	5.71 (1.35)	3.81 (0.64)
Intestine	2.28 (0.55)	11.34 (1.61)	12.58 (2.35)	16.22 (2.51)
Spleen	3.56 (0.96)	4.10 (0.40)	2.63 (0.54)	2.05 (0.41)
Pancreas	5.32 (0.98)	4.39 (2.17)	2.50 (0.56)	2.14 (0.90)
Heart	3.99 (3.10)	3.55 (1.86)	2.03 (0.30)	1.54 (0.31)
Stomach ^b	1.40 (0.10)	4.73 (1.86)	4.79 (1.12)	5.50 (0.51)
Brain	2.98 (0.53)	5.93 (0.76)	3.16 (0.69)	1.78 (0.41)
[¹²⁵I]81				
Blood	1.84 (0.30)	1.60 (0.30)	1.26 (0.26)	0.80 (0.20)
Liver	9.60 (1.73)	12.60 (1.14)	8.07 (1.66)	4.65 (1.34)
Kidney	7.14 (1.46)	4.85 (0.48)	4.36 (1.12)	2.48 (0.37)
Intestine	2.07 (0.36)	4.49 (0.60)	10.06 (1.81)	19.85 (4.71)
Spleen	2.44 (0.28)	1.51 (0.26)	0.80 (0.10)	0.60 (0.26)
Pancreas	4.74 (0.63)	1.98 (0.37)	0.96 (0.03)	0.57 (0.14)
Heart	4.80 (1.33)	1.73 (0.27)	0.92 (0.25)	0.43 (0.11)
Stomach ^b	0.71 (0.13)	1.41 (0.91)	3.12 (0.90)	2.90 (1.57)
Brain	3.75 (0.78)	2.74 (0.37)	1.04 (0.14)	0.36 (0.13)

^aExpressed as % injection dose per gram. Each value represents the mean (SD) for 4-6 animals.

^bExpressed as % injected dose per organ.

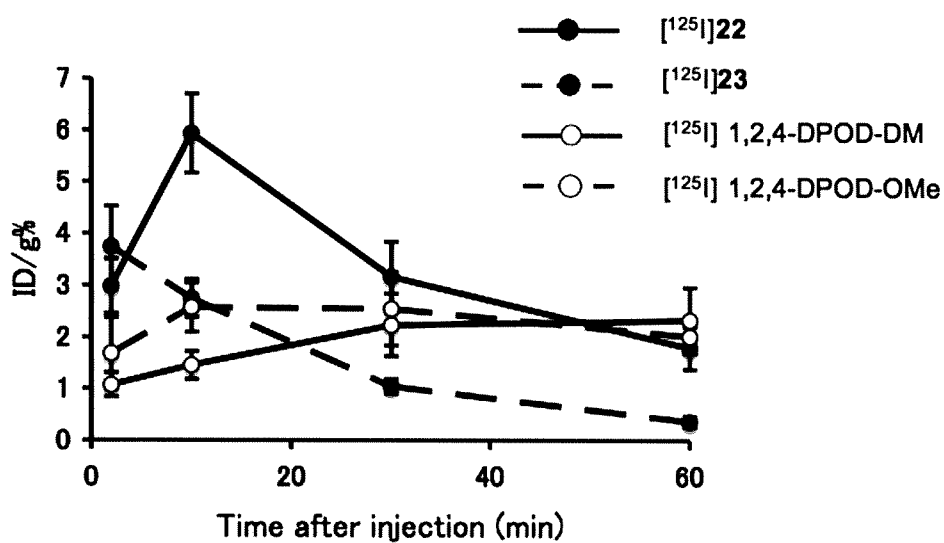


Figure 20. Comparison of brain uptake of [¹²⁵I]80, [¹²⁵I]81, [¹²⁵I]1,2,4-DPOD-DM and [¹²⁵I]1,2,4-DPOD-OMe in normal mice. The kinetics of the uptake of [¹²⁵I]1,3,4-DPOD-DM and [¹²⁵I]1,3,4-DPOD-OMe may provide a better pattern for the localization of A β plaques in the brain.

D. 考察

本研究において、ADの早期診断を目的とした新規 SPECT 用アミロイドイメージングプローブとして、フェニルインドールおよびジフェニルオキサジアゾールを基本骨格とした種々の¹²⁵I 標識体の設計・合成およびその基礎的評価を行い、以下に述べる知見を得た。

- (1) 種々の置換基を導入した5種の2-PI誘導体、1種の1-PI誘導体および6種の1,3,4-DPOD誘導体を合成することに成功した。
- (2) A β (1-42)凝集体を用いたインビトロ結合実験において、インドール骨格の2位にフェニル基を導入した2-PIは側鎖に導入した置換基に関わらず、A β 凝集体に対し高い結合親和性を示したのに対してインドール骨格の1位にフェニル基を導入した1-PIはA β 凝集体に対して、顕著な結合親和性を示さなかった。1,3,4-DPOD誘導体はいずれの化合物もA β 凝集体に対して結合親和性を示したが、導入した側鎖によって結合性には変化が見られた ($K_i = 20 \sim 349$ nM)。また、化合物**22**はこれまでに我々が報告してきた1,2,4-DPOD-DMとほぼ同

等の結合性を示した。

- (3) Tg2576脳切片を用いた蛍光染色において、2-PI誘導体である化合物**8**、1,3,4-DPOD誘導体である化合物**22**は、インビトロ結合実験の結果を反映して、アミロイド斑への結合性を示した。
- (4) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において2-PIは脳への移行性を示したものの、クリアランスが遅く、脳内での滞留性が示唆された。この結果は、これまでに報告されてきたチオフラビンT 類似構造を基本骨格とした放射性ヨウ素標識体と類似したものだっ
- (5) 正常マウスを用いた体内放射能分布実験において1,3,4-DPODは1,2,4-DPODと比較して投与早期の高い脳取り込みと速やかな脳からの放射能消失を示した。この放射能挙動の相違の一因として、1,3,4-DPODが1,2,4-DPODより低い脂溶性を有することが考えられた。

以上の結果より、2-PI および1,3,4-DPOD は今後のアミロイドイメージングプローブの開発において有用な基本骨格となることが示された。