

**厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究)
平成 25 年度 分担研究報告書**

**アルツハイマー病診断用タウプローブの開発
および
探索的臨床研究**

THK-5117 の光学異性体の結合特性の検討

研究代表者	工藤幸司	東北大学病院 臨床研究推進 センター・教授
研究協力者	原田龍一	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・大学院生
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・准教授
分担研究者	古本祥三	東北大学サイクロトロン RI センター・核薬学部・准教授
分担研究者	荒井啓行	東北大学加齢医学研究所 加齢老年医学分野・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

研究要旨：タウイメージング用プローブ $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ はフルオロプロパノール側鎖に不斉炭素を有しているため、光学異性体が存在する。そこで今年度はタウ蛋白質への結合性が高く、かつ薬物動態に優れた $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ の光学異性体の結合性検討について検討した。 $(\pm)\text{-}[^3\text{H}]\text{THK-5117}$ を用いて、アルツハイマー病患者脳ホモジネートに対する結合親和性を評価したところ、 $(R)\text{-THK-5117}$ の方が $(S)\text{-THK-5117}$ よりも 2~3 倍程度高い K_i 値を示し、結合性が弱いことが示された。 $(S)\text{-}$ あるいは $(R)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ を用いたアルツハイマー病脳切片におけるオートラジオグラフィの結果、 $(S)\text{-}$ 、 $(R)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ とともにタウの病理像に対して高い結合選択性を示した。ARG 画像のコントラストを比較したが、光学異性体間で有意差は認められなかった。以上の結果から、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ の光学異性体間で結合親和性が異なり、 $(S)\text{-}[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ の方が優れた特性を示す可能性が示唆された。

A. 研究目的

これまでの研究で、AD 患者のタウ病理像に高い結合親和性・選択性を有する候補化合物として ^{18}F THK-5117 を開発した。 ^{18}F THK-5117 はフルオロプロパノール側鎖に不斉炭素を有しているため、光学異性体が存在する。光学異性体はしばし標的への結合性や薬物動態特性など生理活性が異なることが知られている。そこで本年度は、(S)- ^{18}F THK-5117 と(R)- ^{18}F THK-5117(図 1)のアルツハイマー病患者の病理像に対する結合性を比較し、それぞれの結合特性を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

1. アルツハイマー病患者脳ホモジネートを用いた競合結合試験

アルツハイマー病患者脳を PBS で溶解させ、ホモジネートした。不溶性タウ蛋白を多く含むアルツハイマー病患者脳ホモジネートと 2 nM のラセミ体の ^3H THK-5117、様々な濃度(0.1 – 10,000 nM) の (S)-THK-5117 あるいは (R)-THK-5117 とを混合し、3 時間室温で反応させた。結合が定常に達した後、B/F 分離を行い、 ^3H THK-5117 の結合量を算出することにより各化合物の結合親和性を評価した。GraphPad Prism 5.01 を用いてフィッティングを行い、 K_i 値を算出した。

2. オートラジオグラフィ実験

(S)-あるいは(R)- ^{18}F THK-5117(6 $\mu\text{Ci}/\text{mL}$, Specific activity: 1.1-1.2 Ci/ μmol)をアルツハイマー病患者脳切片に滴下し、室温で 30 分間反応させた。その後、PBS1%BSA に 2 分間浸漬し、それを 2 回繰り返す、その後蒸留水に 2 分間浸漬した後、切片を乾燥させた。その後、切片をイメージングプレートにコンタクトして一晩静置し、翌日 FLA-8000 (GE ヘルスケア)にて画像の読み取りを行った。比較として、(\pm)- ^3H THK-5117, ^3H PiB でも同様に行い、切片をトリチウム用イメージングプレート(BAS TR-2025)にコンタクトして2週間静置し、翌日 FLA-7000 (GE ヘルスケア)にて画像の読み取りを行った。さらに連続切片を抗タウ抗体(AT100)を用いて免疫染色し、タウの病理像の分布を確認した。さらに、タウ特異的染色する嗜銀染色法 Gallyas Braaks 染色でも同様にタウ病理像の分布を確認した。

(倫理面への配慮)

AD患者脳標本を使用する場合、ヘルシンキ宣言を基準として倫理面に配慮し、東北大学医学部倫理委員会の承認を得た上で使用する。新規標識プローブを用いた探索的PET臨床研究では「東北大学

における新規PET薬剤の臨床開発の指針」に従って、東北大学放射性薬剤品質管理委員会、同放射性核種を用いる臨床研究委員会、同医学部倫理委員会の承認を得るとともに東北大学利益相反マネジメント委員会の承認を得た上で実施する。

また臨床研究においてはヘルシンキ宣言を基準として倫理面に十分配慮し、研究の目的、ご協力いただきたい内容、PET検査の概要、予想される危険性・副作用、健康被害が生じた場合の補償、プライバシー（秘密）の保護、検査内容・結果の説明、研究結果の公表、利害関係（利益相反）問い合わせ・苦情の窓口等について患者様および家族に十分なる説明を行うとともに「**患者様とご家族へのご協力の同意文書**」、または「**被験者の方への協力の同意文書**」に**同意・署名（インフォームド・コンセント）をいただいた上で実施する。**

動物実験においては、東北大学における動物実験に関する指針（S63.3.24）に従い、十分なる愛護精神をもってできるだけ動物に苦痛を与えぬように配慮する。放射性同位元素を取り扱う試験においては東北大学放射線障害予防規定（H14.6.18）を遵守し、被曝および汚染の防護に努める。

C. 研究結果

T (±)-[³H]THK-5117 を用いたアルツハ

イマー病患者脳ホモジネートに対する競合結合実験の結果、(S)-THK-5117 は $K_i = 9.4 \pm 3.4$ nM、(R)-THK-5117 は $K_i = 25.7 \pm 6.2$ nM と(R)-THK-5117の方が、AD脳ホモジネートに対する結合性が弱いことが示された（図2）。

次に、THK-5117の光学異性体の結合選択性を評価するためにオートラジオグラフィを行った。その結果、両光学異性体ともにアルツハイマー病患者脳の嗅内皮質近傍の分子層ではクラスター状の、灰白質の深い層ではラミナー状の集積分布が確認され、その集積分布はタウの免疫染色、タウの病理像を特異的に染色するガリアスブランク染色の染色パターンと良く一致した。その一方で、アミロイド選択的なPETプローブであるPiBの集積パターン（灰白質上に細かいスポットがびまん性に見られる）とは明らかに異なっていた（図3）。以上のことから、THK-5117の光学異性体はタウ病変に高い結合選択性を有していることが示された。THK-5117の光学異性体の結合選択性の違いはオートラジオグラフィの結果からは区別することはできなかった。また、オートラジオグラフィの画像から画像解析ソフトを用いて画像コントラスト(Signal-to-noise (S/N))を比較したが、光学異性体間で有意な差は認められなかった。

D. 考察

THK-5117 の光学異性体は結合親和性に差が認められ、(R)-THK-5117の方が結合親和性が低いことが示された。このことは、THK-5117のフルオロプロパノール側鎖がタウ病変への結合に重要であることを示唆している。

E. 結論

[¹⁸F]THK-5117の光学異性体間で結合親和性が異なり、(S)-[¹⁸F]THK-5117の方が優れた特性を示す可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamura N, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Villemagne VL. Noninvasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using ¹⁸F-THK5105 PET. Brain (in press)
2. Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, Piguet O, Pejoska S, Doré V, Yanai K, Masters CL, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N. In vivo evaluation of a novel tau imaging tracer for Alzheimer's disease. Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2014; 41: 816-826.
3. Kaneta T, Okamura N, Arai A, Takanami K, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Takahashi S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Analysis of early phase [¹¹C]BF-227 PET, and its application for anatomical standardization of late-phase images for 3D-SSP analysis. Jpn J Radiol. 2014; 32: 138-144.
4. Fodero-Tavoletti MT, Furumoto S, Taylor L, McLean CA, Mulligan RS, Birchall I,

Harada R, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N, Villemagne VL. Assessing THK523 selectivity for tau deposits in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease tauopathies. Alzheimers Res Ther. 2014; 6: 11.

5. Tago T, Furumoto S, Okamura N, Harada R, Ishikawa Y, Arai H, Yanai K, Iwata R, Kudo Y. Synthesis and preliminary evaluation of 2-arylhydroxyquinoline derivatives for tau imaging. J Labelled Comp Radiopharm. 2014; 57: 18-24.
6. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yoshikawa T, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Use of a benzimidazole derivative BF-188 in fluorescence multispectral imaging for selective visualization of tau protein fibrils in the Alzheimer's disease brain. Mol Imaging Biol. 2014; 16: 19-27.
7. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Yoshikawa T, Fodero-Tavoletti M, Mulligan RS, Villemagne VL, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y. Novel ¹⁸F-labeled arylquinoline derivatives for non-invasive imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. J Nucl Med. 2013; 54: 1420-1427.
8. Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VM, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saido TC, Takashima A, Lewis J, Jang MK, Aoki I, Ito H, Higuchi M. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. Neuron 2013; 79: 1094-1108.
9. Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y. A ¹⁸F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. Mol Imaging Biol. 2013; 15: 497-506.

2. 学会発表 海外学会発表

1. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Masters CL, Arai H, Rowe CC, Villemagne VL, Kudo Y. PET imaging of tau deposits in Alzheimer's disease patients using ^{18}F -THK5105 and ^{18}F -THK5117. Human Amyloid Imaging 2014, January 16, 2014, Miami, USA
2. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. PET imaging of tau pathology in patients with Alzheimer's disease using ^{18}F -THK5117. Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CtaD) 2013, November 14, 2013, San Diego, USA
3. Okamura N. Imaging tau pathology in Alzheimer's disease using ^{18}F -THK5105 and ^{18}F -THK5117 PET. ADNI PPSB meeting, October 26, 2013, Washington DC, USA
4. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. In vivo detection of tau protein deposits in Alzheimer's disease using ^{18}F -labeled 2-phenylquinoline derivatives. Alzheimer's Association International Conference 2013, July 13-17, 2013, Boston, USA
5. Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Okamura N. In vivo pattern of tau and A β deposition in the brain might distinguish healthy controls from preclinical Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2013, July 16, 2013, Boston, USA
6. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yoshikawa T, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Binding characterization of a novel PET tracer [^{18}F]THK-5117 in Alzheimer's disease brain. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2013, July 13-17, 2013, Boston, USA
7. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. PET tau imaging in Alzheimer's disease using novel ^{18}F -labeled 2-phenylquinoline derivatives. SNMMI Annual Meeting, June 11, 2013, Vancouver, Canada
8. Villemagne V.L., Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti M.T, Mulligan R.S, Masters C.L, Yanai K., Kudo Y, Rowe C.C, Okamura N. In vivo tau imaging in Alzheimer's disease. SNMMI Annual Meeting, June 11, 2013, Vancouver, Canada

国内学会発表

1. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、岩田錬、田代学、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: タウ蛋白を標的とした分子イメージングプローブの開発. 日本薬学会 第 134 年会 熊本大学、パレアホール、ホテル日航、同仁堂ホール、水道町エリア、鶴屋百貨店、平成 26 年 3 月 29 日
2. 岡村信行、原田龍一、古本祥三、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: PET tau imaging in Alzheimer's disease using ^{18}F -THK-5105 and ^{18}F -THK5117. 第 88 回日本薬理学学会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 21 日
3. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、多胡哲郎、吉川雄朗、岩田錬、田代学、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦: Binding characterization and clinical application of novel PET tracer ^{18}F -THK5117 for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. 第 88 回日本薬理学学会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 20 日
4. Okamura N. Tau PET imaging in Alzheimer's disease using novel 2-phenylquinoline derivatives. The

- Fifteenth Conference of Peace through Mind Brain Science, 2014年2月19日 浜松
5. 岡村信行・認知症患者におけるアミロイド・タウの分子イメージング・薬物動態・個体差要因可視化による個別化EBMの促進 学術講演会 2014年2月7日 金沢
 6. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、平岡宏太良、四月朔日聖一、松田林、石川洋一、田代学、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司、Rachel S Mulligan、Christopher C Rowe、Victor L Villemagne。アルツハイマー病患者における ^{18}F THK-5105、 ^{18}F THK-5117の臨床評価。第53回日本核医学会学術総会 2013年11月8日 福岡
 7. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司、Rachel S Mulligan、Christopher C Rowe、Victor L Villemagne。 ^{18}F THK-5105 PETを用いたアルツハイマー病タウ病理像の生体画像化。第32回日本認知症学会学術集会 2013年11月8日 松本
 8. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、吉川雄朗、荒井啓行、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司。タウイメージング用トレーサー ^{18}F THK-5117の前臨床評価。第32回日本認知症学会学術集会 2013年11月8日 松本
 9. 工藤幸司、岡村信行、古本祥三、原田龍一、古川勝敏、樋口真人、Victor L Villemagne、谷内一彦、荒井啓行。タウイメージング用PETプローブの現状。第32回日本認知症学会学術集会 ホットトピック 2013年11月8日~10日 松本
 10. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司、Michelle T Fodero-Tavoletti、Christopher C Rowe、Victor L. Villemagne。 ^{18}F THK-5105を用いたアルツハイマー病脳内タウ蛋白のPETイメージング。第8回日本分子イメージング学会総会・学術総会 2013年5月30日 横浜
 6. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、吉川雄朗、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司。タウイメージング用トレーサー ^{18}F THK-5117の結合性評価。第8回日本分子イメージング学会総会・学術総会 2013年5月30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
次および次々ページに特許出願状況を(すべて国内移行)を示しました。
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

特許出願状況

発明の名称	発明者	出願人	出願登録区分	出願番号(出願日)	出願区分	出願国	メモ
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	14102100.7(2014年3月3日)	国外	香港	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2013124812(2013年5月28日)	国外	ロシア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2011321310(2013年4月21日)	国外	オーストラリア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	225888(2013年4月22日)	国外	イスラエル	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2013 - 7013588(2013年5月28日)	国外	韓国	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	11836445.4(2013年5月23日)	国外	ヨーロッパ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2815960(2013年4月25日)	国外	カナダ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	B R 112013010333-7(2013年4月26日)	国外	ブラジル	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	201303398 - 0(2013年4月29日)	国外	シンガポール	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	13/881872(2013年4月26日)	国外	アメリカ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	特願：2012-540957(2013年4月25日)	国内	日本	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	201180062845.8(2013年6月16日)	国外	中国	国内移行

発明の名称	発明者	出願人	出願登録区分	出願番号(出願日)	出願区分	出願国	メモ
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	W 00201301795 (2013年4月26日)	国外	インドネシア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	MX/A2013/004834(2013年4月29日)	国外	メキシコ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	3985/CHENP/2013(2013年5月21日)	国外	インド	国内移行

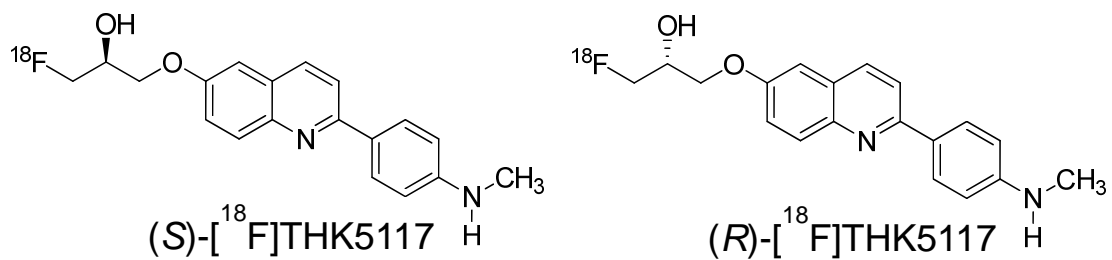
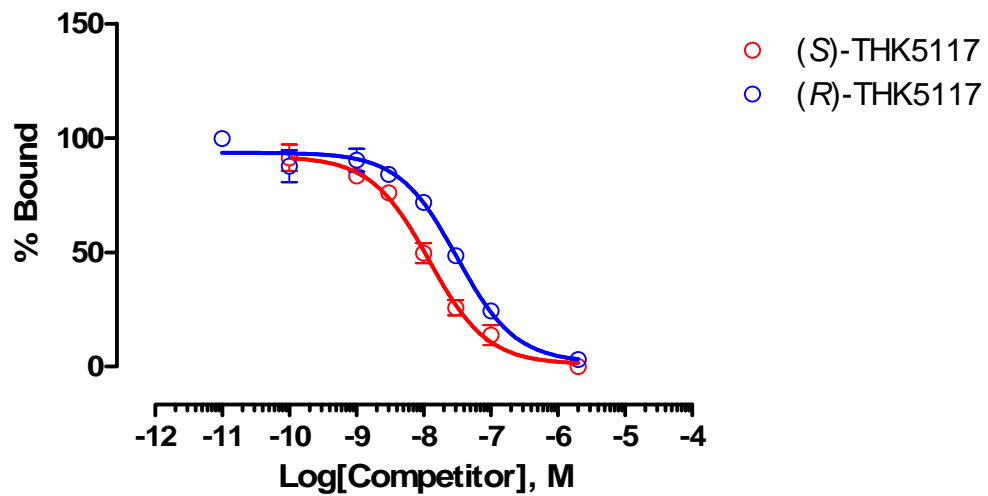


図1 (S)-[¹⁸F]THK-5117 と(R)-[¹⁸F]THK-5117 の化学構造式



	K_i (nM)
(S)-THK-5117	9.4±3.4
(R)-THK-5117	25.7±6.2

図2 (±)-[³H]THK-5117 を用いたアルツハイマー病患者脳ホモジネートに対する競合結合実験結果

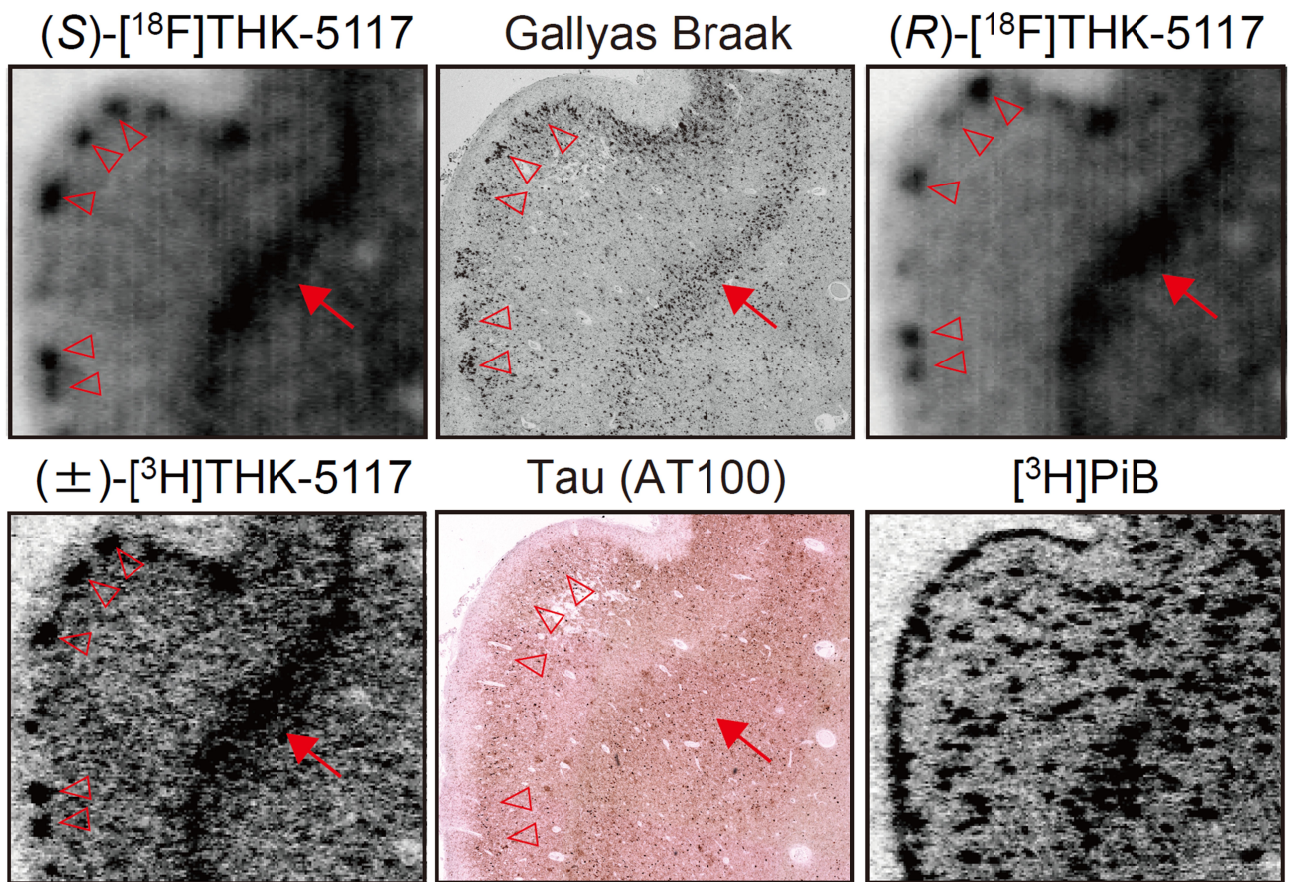


図3 アルツハイマー病患者脳切片における嗅内皮質近傍の(S)-[¹⁸F]THK-5117 と (R)-[¹⁸F]THK-5117 のオートラジオグラフィー像 矢印: 灰白質におけるラミナー状のタウの病理像、矢じり: 嗅内皮質におけるタウ病理像のクラスター状の分布 THK-5117 の光学異性体、ラセミ体ともにタウ病理像に対して選択的な結合が確認できる。アミロイド PET プローブである PiB ではスポット状の集積がびまん性に見られ、THK-5117 の集積分布とは明らかに異なっている。コントラストを比較しても、ARG 実験では光学異性体間で差は認められなかった。

**厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究)
平成 25 年度 分担研究報告書**

**アルツハイマー病診断用タウプローブの開発
および探索的臨床研究**

臨床用 ^{18}F THK-5117 注射剤の製造法の確立

分担研究者	古本祥三	東北大学サイクロトロン RI センター・核薬学部・准教授 機能薬理学分野・准教授
分担研究者	岡村信行	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・准教授
研究協力者	原田龍一	東北大学大学院医学系研究科 機能薬理学分野・大学院生
研究協力者	岩田錬	東北大学サイクロトロン・ラジオア イソトープセンター・教授
研究代表者	工藤幸司	東北大学病院 臨床研究推進 センター・教授

研究要旨: タウイメージングプローブ ^{18}F THK-5117 の臨床応用を実現するために、標識合成装置を使用した臨床用 ^{18}F THK-5117 注射剤の製造法を検討した。DMSO 溶媒中で ^{18}F アニオンの求核置換反応により標識前駆体のフッ素化を行い、続いて酸性条件下で脱保護反応を実施した。その後固相抽出操作で粗精製を行い、セミ分取 HPLC で目的とする ^{18}F THK-5117 を単離した。そして分取フラクションから ^{18}F THK-5117 を固相抽出した後、製剤化を行って ^{18}F THK-5117 注射剤を製造した。この一連の製造工程の各条件を最適化した結果、一度の製造で複数回の臨床 PET 撮像が可能となる十分な放射エネルギーを製造できた。 ^{18}F THK-5117 注射剤の放射化学的純度、比放射能、安全性、残留溶媒は、臨床使用するための基準をクリアした。以上の結果より、臨床利用可能な ^{18}F THK-5117 注射剤の製造法を確立できた。

A. 研究目的

老年性認知症の主要原因疾患であるアルツハイマー病の患者脳内には、アミロイドタンパク質とタウタンパク質が異常凝集を起こし、蓄積している。このような神経病理学的変化はアルツハイマー病を診断する際の重要なマーカーとなっている。そのタンパクの異常蓄積現象は、臨床的に認知症の症状が出現する10年以上前から脳内で進行することが病理学的研究で明らかにされている。そこで、そのようなタンパク質の異常蓄積をPETによって非侵襲的に定量評価できれば、非常に精度の高いアルツハイマー病の早期診断を実現できると期待されている。また、現在、アルツハイマー病治療薬の開発トレンドとしては、アミロイドやタウの異常蓄積を阻止するタイプの根治療法薬が主流となっている。このようなタイプの治療薬の薬効評価や治療対象患者の選別に、アミロイドやタウのPETイメージング技術が有用であると期待されている。

このような背景から、我々は世界に先駆けて独自のPET用タウイメージング薬剤の開発研究を開始した。これまでに ^{18}F THK-523や ^{18}F THK-5105を開発し、臨床研究を展開してタウイメージングの実用性を検証してきた。その結果、

^{18}F THK-5105はタウイメージング薬剤としての有用性は確認できたものの、実用性の観点からは、脳内動態性能の改善の位置があることも明らかになった。そこで、 ^{18}F THK-5105よりも白質への非特異的結合性を低減し、脳内動態性の改善を目指した改良型薬剤 ^{18}F THK-5117を開発するに至った。前年度は、バッチ合成法で ^{18}F THK-5117の標識合成条件を検証し、臨床合成への適用が可能であることを確認した。一般に、臨床PET用標識合成では、再現性良く安定的に高品質な薬剤を製造する必要があり、また、製造者の被曝防護の観点から、合成装置による薬剤製造が求められる。そこで本研究では、 ^{18}F THK-5117の臨床応用を実現するために、標識合成装置を使用した臨床用 ^{18}F THK-5117注射剤の製造法を検討した。

B. 研究方法

^{18}F THK-5117の標識合成に用いる合成装置は、東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンターで開発された、マルチライン切り替えポート付電動シリンジを2台搭載した標識合成装置(図1)を用いた。 ^{18}F アニオンの製造は、小型サイクロトロンHM-12を使用した。製造した ^{18}F アニオンはターゲットから回収してイオ

ン交換樹脂上に補足し、クリプトフィックス 222 を溶解したアセトニトリル溶液で反応容器に溶出した。アセトニトリルを用いた共沸操作により反応容器内の無水化を行い、標識前駆体を溶解した DMSO を加えて反応溶液とした。反応溶液を加熱して一定時間フッ素化反応を行った後、塩酸水溶液を添加して保護基の除去反応を行った。

脱保護を行った後、反応溶液を中和して、SepPak-tC18 を利用した固相抽出操作を行った。その固相に補足された放射性の脂溶性物質を溶出して適量の水で希釈し、セミ分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって目的とする $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ を単離した。セミ分取 HPLC では、オクタデシル逆相カラムを使用し、アセトニトリル-20mMNaH₂PO₄ 水溶液系を移動相とした。カラムからの溶出状態は紫外可視光検出器と放射能検出器で UV 吸収と放射能の経時変化をモニターして、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ のピークを分取(単離)した。

分取フラクションは、アスコルビン酸注射液を添加した水で希釈し、固相法で $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ を抽出した。可溶化剤としてポリソルベート 80 を使用して生理食塩液を調製し、濾過滅菌を施した。

得られた注射液については、フローカウンタ放射能検出器を備えた分析 HPLC システムで放射化学的純度と担体濃度を測

定し、またその結果を基に比放射能も算出した。安全性については、無菌試験、エンドトキシン試験等を行った。さらにガスクロマトグラフィーで溶液中の残留溶媒濃度を測定した。

C. 研究結果

標識合成装置による合成では、製造途中で各操作ステップの放射能を測定することはできないため、製造終了後に、各ステップで生じた残留放射能のデータに基づいてフッ素化率等の反応・製造効率(収率)を調べた。その結果、標識合成第一段階のフッ素化反応では、約 70~80%と優れた収率でフッ素化体が得られた。

次いで、脱保護反応後、中和及び希釈して、固相抽出用逆相カートリッジに反応溶液を導入した(図 2)。その固相への放射能の補足効率はほぼ定量的であった。しかし、その後の溶出過程では、若干放射能的にロスすることが明らかになった。しかし、大半の放射能を回収することができた。

固相抽出で得られた回収溶液は、ほとんど放射能をロスすることなく、セミ分取 HPLC でインジェクションすることができた。インジェクション後は、UV 吸収のクロマトグラムは再現性良く同じピーク溶出変化パターンを示し、セミ分取 HPLC の安定性が確認された。目的とする

[¹⁸F]THK-5117 の放射性ピークは約 18 分から 19 分にかけて溶出した。¹⁸F]THK-5117 の UV 吸収ピークは放射性ピークと同じ形状のシングルピークであることが確認され、十分な分離が達成された(図 3)。

[¹⁸F]THK-5117 のピークを分取した後の固相抽出では、ほぼ定量的に目的物の [¹⁸F]THK-5117 を回収することができた。その後の製剤化過程では、使用したガラス製容器内とその後の滅菌用フィルターに若干の放射能が残留した。そのため、最終 [¹⁸F]THK-5117 注射液の放射能収量は製剤化の過程でロスしたことになるが、その割合は小さく、臨床用注射薬剤として十分量が得られた。

得られた注射薬液について分析 HPLC で放射化学的純度を調べたところ、製剤化時の放射性分解等の影響はクロマトグラム上観察されず、再現性良く 95%以上の純度であることが判明した(図 4)。そして分析 HPLC の結果に基づいて算出した比放射能は、平均で約 74GBq/μmol であった。

注射剤の pH 及び残留溶媒(エタノール、アセトニトリル)はいずれも基準範囲内であった。また、発熱性物質試験及び無菌試験ではいずれも陰性であった。

D. 考察

臨床用 PET 薬剤は、製造終了後速やかに被検者に投与して PET 撮像に使用するため、細心の注意を払って製造する必要がある。安定した製造再現性を達成するためには合成装置による機械合成が必須である。前臨床段階の合成条件検討では、¹⁸F]THK-5117 の精製純度を高めるために合成反応後に固相抽出操作を取り入れたが、本研究ではサイクロトロン・ラジオアイソトープセンターで独自に開発された装置を使用することで、その固相抽出操作を容易に自動化することができた。固相抽出操作では、高精度に制御できる電動シリンジを利用したため、固相抽出時のロスを最小限に抑えることが可能になった。これによってその後のセミ分取 HPLC において再現性の高い安定した精製を行うことができ、結果として高品質の [¹⁸F]THK-5117 注射液を製造することが可能になったと考えられる。

製造された [¹⁸F]THK-5117 注射液の品質検定では、放射化学的純度、pH、残留溶媒、発熱性物質試験、無菌試験等において薬剤基準を満たす結果となり、臨床用 PET 薬剤として問題なく使用できることが確認された。そして実際に確立した標識自動合成法によって臨床用途に [¹⁸F]THK-5117 注射液を製造したところ、全ての回において薬剤品質は基準を満たし、問題なく安定

的に臨床サイドに供給できた。

E. 結論

以上の結果より、本研究において臨床使用に耐えうる¹⁸F]THK-5117 注射剤の自動合成装置製造法を確立し、安定的に臨床PET 検査用途に同薬剤を供給できるようになった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Okamura N, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Villemagne VL. Noninvasive assessment of Alzheimer's disease neurofibrillary pathology using ¹⁸F-THK5105 PET. *Brain* (in press)
2. Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Hodges J, Harada R, Yates P, Piguet O, Pejoska S, Doré V, Yanai K, Masters CL, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N. In vivo evaluation of a novel tau imaging tracer for Alzheimer's disease. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014; 41: 816-826.
3. Kaneta T, Okamura N, Arai H, Takanami K, Furukawa K, Tashiro M, Furumoto S, Iwata R, Takahashi S, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Analysis of early phase [¹¹C]BF-227 PET, and its application for anatomical standardization of late-phase images for 3D-SSP analysis. *Jpn J Radiol*. 2014; 32: 138-144.
4. Fodero-Tavoletti MT, Furumoto S, Taylor L, McLean CA, Mulligan RS, Birchall I, Harada R, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Okamura N, Villemagne VL. Assessing THK523 selectivity for tau deposits in Alzheimer's disease and non-Alzheimer's disease tauopathies. *Alzheimers Res Ther*. 2014; 6: 11.
5. Tago T, Furumoto S, Okamura N, Harada R, Ishikawa Y, Arai H, Yanai K, Iwata R, Kudo Y. Synthesis and preliminary evaluation of 2-arylhydroxyquinoline derivatives for tau imaging. *J Labelled Comp Radiopharm*. 2014; 57: 18-24.
6. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Yoshikawa T, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Use of a benzimidazole derivative BF-188 in fluorescence multispectral imaging for selective visualization of tau protein fibrils in the Alzheimer's disease brain. *Mol Imaging Biol*. 2014; 16: 19-27.
7. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Yoshikawa T, Fodero-Tavoletti M, Mulligan RS, Villemagne VL, Akatsu H, Yamamoto T, Arai H, Iwata R, Yanai K, Kudo Y. Novel ¹⁸F-labeled arylquinoline derivatives for non-invasive imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Nucl Med*. 2013; 54: 1420-1427.
8. Furumoto S, Okamura N, Furukawa K, Tashiro M, Ishikawa Y, Sugi K, Tomita N, Waragai M, Harada R, Tago T, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y. A ¹⁸F-Labeled BF-227 Derivative as a Potential Radioligand for Imaging Dense Amyloid Plaques by Positron Emission Tomography. *Mol Imaging Biol*. 2013; 15: 497-506.

2. 学会発表

海外学会発表

9. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Masters CL, Arai H, Rowe CC, Villemagne VL, Kudo Y. PET imaging of tau deposits in Alzheimer's disease patients using ¹⁸F-THK5105 and ¹⁸F-THK5117. *Human Amyloid Imaging 2014*, January 16, 2014, Miami, USA
10. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y. PET imaging of tau pathology in patients with Alzheimer's disease using ¹⁸F-THK5117. *Clinical Trials on Alzheimer's Disease (CtaD) 2013*, November 14, 2013, San Diego, USA
11. Okamura N, Furumoto S, Harada R,

- Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. In vivo detection of tau protein deposits in Alzheimer's disease using ¹⁸F-labeled 2-phenylquinoline derivatives. Alzheimer's Association International Conference 2013, July 13-17, 2013, Boston, USA
12. Villemagne VL, Furumoto S, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Harada R, Yates P, Pejoska S, Kudo Y, Masters CL, Yanai K, Rowe CC, Okamura N. In vivo pattern of tau and Aβ deposition in the brain might distinguish healthy controls from preclinical Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2013, July 16, 2013, Boston, USA
 13. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yoshikawa T, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y. Binding characterization of a novel PET tracer [¹⁸F]THK-5117 in Alzheimer's disease brain. Alzheimer's Association International Conference (AAIC) 2013, July 13-17, 2013, Boston, USA
 14. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti MT, Mulligan RS, Masters CL, Yanai K, Kudo Y, Rowe CC, Villemagne VL. PET tau imaging in Alzheimer's disease using novel ¹⁸F-labeled 2-phenylquinoline derivatives. SNMMI Annual Meeting, June 11, 2013, Vancouver, Canada
 15. Villemagne V.L., Furumoto S, Harada R, Fodero-Tavoletti M.T, Mulligan R.S, Masters C.L, Yanai K., Kudo Y, Rowe C.C, Okamura N. In vivo tau imaging in Alzheimer's disease. SNMMI Annual Meeting, June 11, 2013, Vancouver, Canada
- 国内学会発表
11. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、岩田錬、田代学、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: タウ蛋白を標的とした分子イメージングプローブの開発. 日本薬学会 第 134 年会 熊本大学、パレオホール、ホテル日航、同仁堂ホール、水道町エリア、鶴屋百貨店、平成 26 年 3 月 29 日
 12. 岡村信行、原田龍一、古本祥三、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: PET tau imaging in Alzheimer's disease using ¹⁸F-THK-5105 and ¹⁸F-THK5117. 第 88 回日本薬理学学会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 21 日
 13. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、多胡哲郎、吉川雄朗、岩田錬、田代学、荒井啓行、工藤幸司、谷内一彦: Binding characterization and clinical application of novel PET tracer ¹⁸F-THK5117 for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. 第 88 回日本薬理学学会 東北大学百周年記念会館川内萩ホール 仙台国際センター. 平成 26 年 3 月 20 日
 14. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、平岡宏太良、四月朔日聖一、松田林、石川洋一、田代学、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司、Rachel S Mulligan、Christopher C Rowe、Victor L Villemagne. アルツハイマー病患者における [¹⁸F]THK-5105, [¹⁸F]THK-5117 の臨床評価. 第 53 回日本核医学会学術総会 2013 年 11 月 8 日 福岡
 15. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司、Rachel S Mulligan、Christopher C Rowe、Victor L Villemagne. [¹⁸F]THK-5105 PET を用いたアルツハイマー病タウ病理像の生体画像化. 第 32 回日本認知症学会学術集会 2013 年 11 月 8 日 松本
 16. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、吉川雄朗、荒井啓行、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司. タウイメージング用トレーサー [¹⁸F]THK-5117 の前臨床評価. 第 32 回日本認知症学会学術

- 集会 2013年11月8日 松本
17. 工藤 幸司、岡村 信行、古本 祥三、原田 龍一、古川 勝敏、樋口 真人、Victor L Villemagne、谷内 一彦、荒井啓行: タウイメージング用PETプローブの現状. 第32回日本認知症学会学術集会 ホットピック 2013年11月8日~10日 松本
 18. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、岩田錬、谷内一彦、工藤幸司、Michelle T Fodero-Tavoletti、Christopher C Rowe、Victor L. Villemagne . [¹⁸F]THK-5105 を用いたアルツハイマー病脳内タウ蛋白の PET イメージング . 第8回日本分子イメージング学会総会・学術総会 2013年5月30日 横浜
 6. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡哲郎、吉川雄朗、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司 . タウイメージング用トレー

サー[¹⁸F]THK-5117の結合性評価 . 第8回日本分子イメージング学会総会・学術総会 2013年5月30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

特許出願状況を次および次々ページに示しました(すべて国内移行)。

2. 実用新案登録 なし

3. その他 なし

特許出願状況

発明の名称	発明者	出願人	出願登録区分	出願番号(出願日)	出願区分	出願国	メモ
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	14102100.7(2014年3月3日)	国外	香港	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2013124812(2013年5月28日)	国外	ロシア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2011321310(2013年4月21日)	国外	オーストラリア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	225888(2013年4月22日)	国外	イスラエル	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2013 - 7013588(2013年5月28日)	国外	韓国	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	11836445.4(2013年5月23日)	国外	ヨーロッパ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	2815960(2013年4月25日)	国外	カナダ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	B R 112013010333-7(2013年4月26日)	国外	ブラジル	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	201303398 - 0(2013年4月29日)	国外	シンガポール	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	13/881872(2013年4月26日)	国外	アメリカ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	特願：2012-540957(2013年4月25日)	国内	日本	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	201180062845.8(2013年6月16日)	国外	中国	国内移行

発明の名称	発明者	出願人	出願登録区分	出願番号(出願日)	出願区分	出願国	メモ
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	W 00201301795 (2013年4月26日)	国外	インドネシア	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	MX/A2013/004834(2013年4月29日)	国外	メキシコ	国内移行
タウイメージングプローブ	工藤幸司 岡村信行 古本祥三	クリノ株式会社	出願	3985/CHENP/2013(2013年5月21日)	国外	インド	国内移行

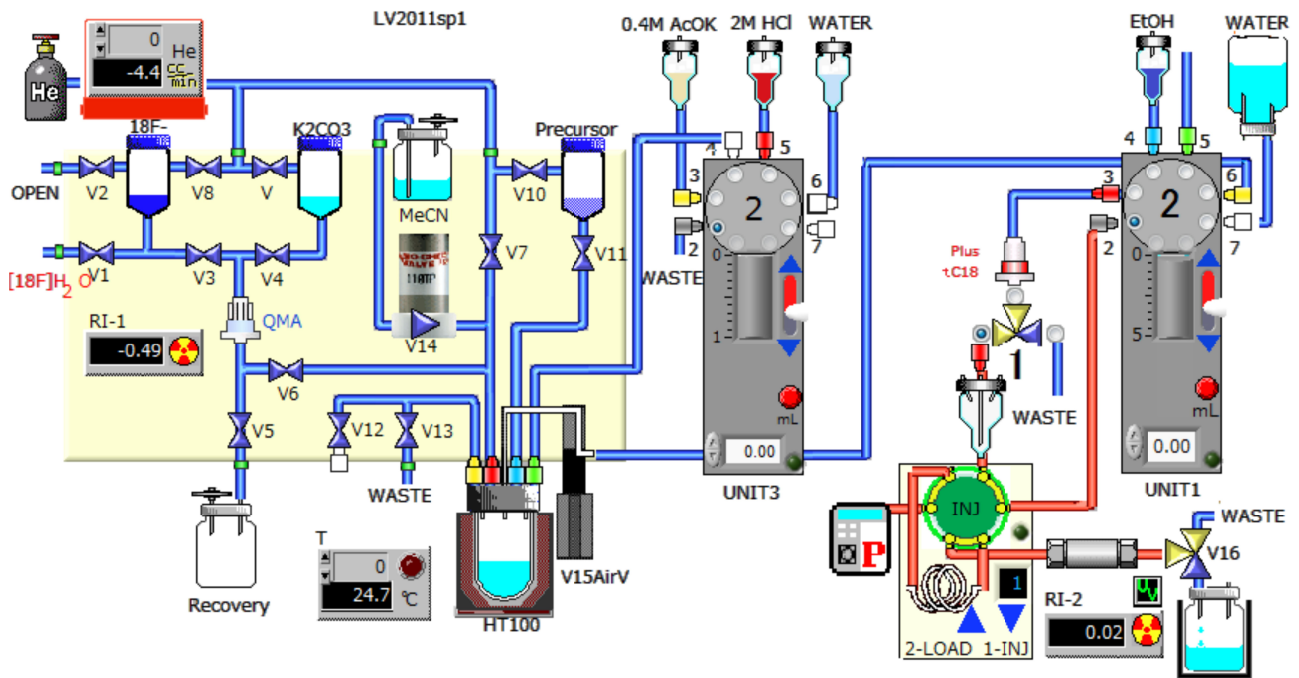


図1 標識合成装置の制御画面図。流路接続、電磁弁、温度モニター、流量モニター、放射能モニター、電動シリンジ、固相抽出ユニット、HPLC 送液システム、HPLC カラム、各種リザーバーなどが表示されている。



反応液回収

水洗浄

溶出

図2 標識合成後の固相抽出操作のモニター画像。黄色の脂溶性粗生成物が固相上に補足され、洗浄操作で流出することなく、その後の溶出操作で溶出していく様子が確認できる。

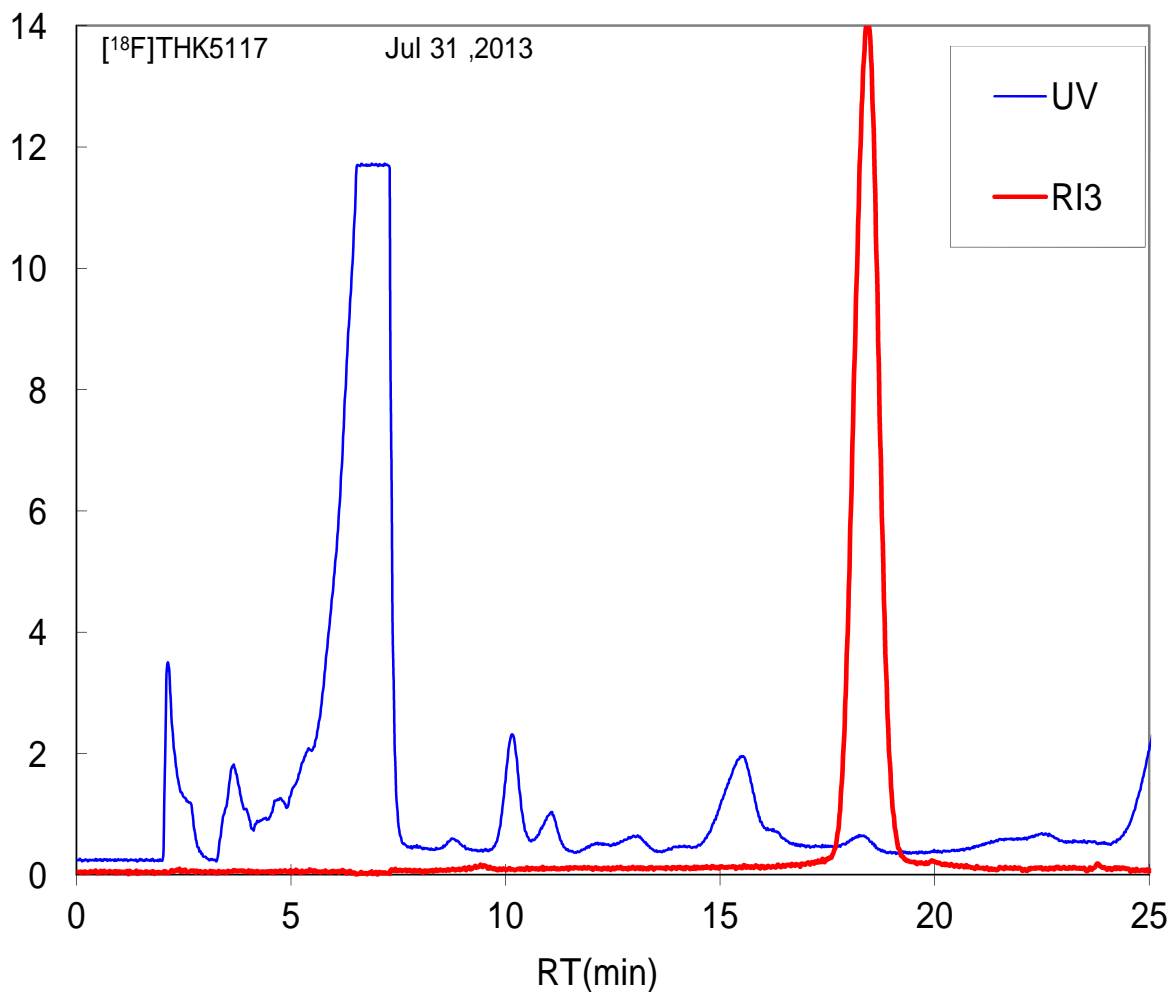


図3 セミ分取高速液体クロマトグラフィーで得られたクロマトグラムの典型例。青線はUV吸収のクロマトグラムを表し、赤線は放射能のクロマトグラムを表している。UVクロマトグラムから明らかなように、目的とするTHK5117以外の非放射性夾雑物の混入は見られない。UVピークサイズが小さいことは、製造された¹⁸F]THK5117の比放射能が高いことを示している。

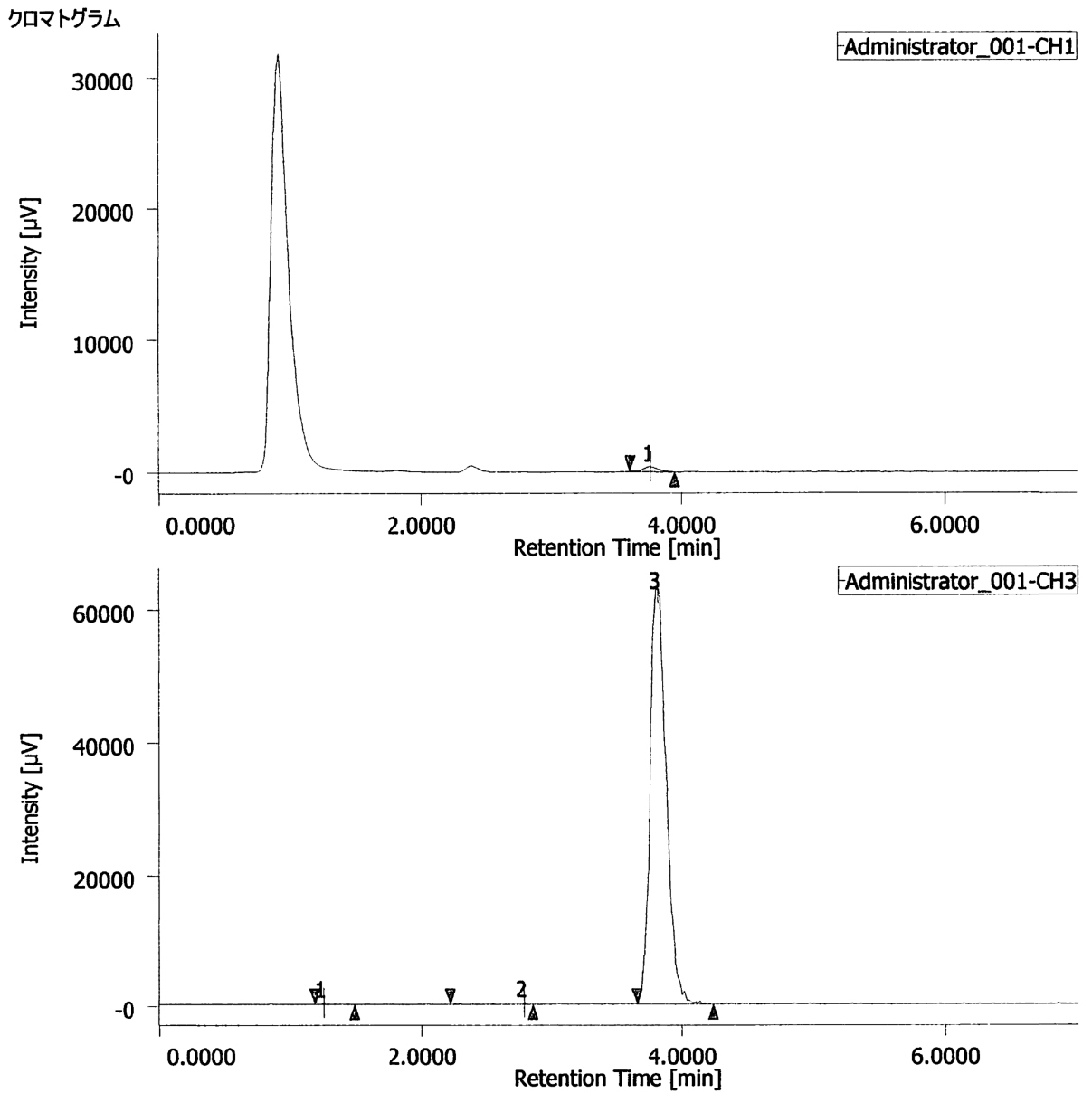


図4 分析高速液体クロマトグラフィーで得られた ^{18}F THK5117のクロマトグラム。上段はUV吸収のクロマトグラムで、保持時間約3.6分のピーク1がTHK5117である。下段は放射線のクロマトグラムで、保持時間約3.6分のピーク3が ^{18}F THK5117である。 ^{18}F THK5117以外の放射性ピークはほとんど観察されず、放射化学的純度は非常に高いことが分かる。

