

**厚生労働科学研究費補助金
(医療機器開発推進研究)
平成 26 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-5351 注射剤の製造法の確立

分担研究者	古本祥三	東北大学学際科学フロンティア研究所・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	石川洋一	東北大学サイクロトロン・ラジオアイソトープセンター・助手
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 臨床試験推進センター・教授

研究要旨：タウイメージングプローブ ^{18}F THK-5117 の新規誘導体である ^{18}F THK-5351 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-5351 注射剤の製造法を検討した。活性化した ^{18}F アニオンの求核置換反応を利用して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、高速液体クロマトグラフィーで目的とする ^{18}F THK-5351 を分離し、分取フラクションから ^{18}F THK-5351 を固相抽出した。最終的にエバポレーター法で製剤化を行い ^{18}F THK-5351 注射剤を製造した。 ^{18}F THK-5351 注射剤の放射化学的純度、比放射能、安全性、残留溶媒は、臨床で使用するための基準をクリアーし、臨床利用可能な ^{18}F THK-5351 注射剤の製造法を確立できた。

A. 研究目的

アルツハイマー病の重要な神経病理所見である異常リン酸化タウの蓄積は、認知機能障害の症状が出現する以前から脳内で徐々に進行し、その程度は神経変性と相関性が高い。そのタウ病理の進行を早期の段階で精度良く評価できれば、アルツハイマー病の超早期診断や根本治療法の開発や実践に大いに役立つと期待されている。このような観点から、近年、核医学的アプローチでタウ病変の形成をイメージングする研究が精力的に進められてきた。同様なイメージングとして、アルツハイマー病に特徴的に見られるアミロイドタンパク質の脳内異常蓄積を PET により可視化する研究が最近 10 年で大幅な進歩を遂げ、最近、複数のフッ素 18 標識 PET プローブが欧米、日本で承認を受けるところまで発展してきた。この成功を受けて、タウイメージングにおいてもフッ素 18 標識 PET プローブの開発が進められている。

本研究グループでは、フッ素 18 標識タウプローブとして、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5105}$ 、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ を開発し、探索的臨床 PET 研究を展開してきた。開発を重ねるにつれて、プローブのイメージング性能の向上は見られたものの、まだ白質への非特異的集積性について改善の余地があった。そこで我々はその改善を目的

として研究を進め、新規臨床候補誘導体として $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ を開発した。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る、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。

前年度は、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)を用いて $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ 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。 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ と $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ は標識合成手順が同じであるため、上記標識合成装置を応用することができる。そこで本研究では、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ の臨床応用を実現するために、同標識合成装置を使用した臨床用 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ 注射剤の製造法を検討した。

B. 研究方法

$[^{18}\text{F}]\text{THK-5351}$ の標識合成に用いる ^{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。以下、 $[^{18}\text{F}]\text{THK-5117}$ のフッ素化反応およびその後の脱保護反応の手順を適用した。すなわち、ターゲットから回収した ^{18}F アニオンは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。アセトニトリルとの共沸により反応容器内の無水化を行い、標識前駆体の DMSO 溶液を加えて 110 条件でフッ素化反応を行った。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。

反応後の処理手順も^[18F]THK-5117 の方法に準じた。すなわち、脱保護後、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^[18F]THK-5351 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。

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^[18F]THK-5351 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、ラジオ分析 HPLC システムで放射化学的純度と担体濃度を測定し、比放射能も算出した。安全性としては、エンドトキシン試験、無菌試験等を行った。注射液中の残留溶媒濃度はガスクロマトグラフィーで測定した。

C. 研究結果

標識合成では、前駆体を 3mg 使用して安定的にフッ素化反応を行えることを確認した。さらに前駆体を 2mg まで減らしても最終生成物^[18F]THK-5351 の収率に大きな違いがないことが確認できた。

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、その固相への放射能の補足効率はほぼ定量的であった。その後の溶出過程では、^[18F]THK-5117 にエタノール 100% で行うと溶出初期の不要部分の溶出で放射能のロスが生じた。そこでエタノール濃度を下げた水溶液でマイルドに洗浄、溶出を行うと、若干放射能的にロスするが目的とする捕捉放射能を定量的に回収することが可能となった。

分取 HPLC では、UV 吸収のクロマトグラムは再現性良くピーク溶出変化のパターンを示し、セミ分取 HPLC の安定性が確認された。目的とする^[18F]THK-5351 の放射性ピークは約 20分から 22分にかけて溶出した。^[18F]THK-5351 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 2)。

分取後、フラクションから^[18F]THK-5351 を固相抽出でほぼ定量的に回収することができた。その後、エタノール溶出液をエバポレーターに導入し、アス

コルビン酸とポリソルベート 80 を添加して溶媒を減圧留去した。その残渣を生理食塩液に溶解し、フィルター滅菌して注射剤とした。最終 ^{18}F THK-5351 注射液の放射能収量は平均約 3.5GBq あり、3-4 回の PET 検査を実施できる十分量が得られた。

得られた注射薬液の放射化学的純度はいずれも 98%以上あり、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なかった(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 250GBq/ μmol であった。

注射液の pH は約 7、エタノールおよびアセトニトリルの残留溶媒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

^{18}F THK-5351 は、 ^{18}F THK-5117 と化学構造が類似している。その標識方法の基本は同一であることから、 ^{18}F THK-5117 の臨床標識合成装置および手順を利用して、 ^{18}F THK-5351 の臨床向け製造法を検討した。 ^{18}F THK-5351 は ^{18}F THK-5117 よりも脂溶性が低下しているため、反応終了後の後処理にある固相抽出操作では、溶出条件を専用に最適化する必要性があった。当初、100%エタノールによる溶出を、その液量を変化させることで最適化することを試

みた。しかし、液量をごく少量にする必要があったため、送液量の不安定性から溶出回収率の安定性が得られなかった。しかし溶出液のエタノール溶液濃度を低くすることで、液量容積を少なくすることなく溶出が行え、回収安定性が大きく向上した。また、溶出液の有機溶媒率を低くすることができ、分取 HPLC からむへのインジェクション溶液の溶媒-水比率を移動相組成にほぼ同じくすることができ、分取 HPLC の分離能および分離再現性の向上にもつながった。以上から、合成手順は同じでも、処理条件を変えることで、THK-5117 と同じ合成装置で目的とする ^{18}F THK-5351 を製造する方法を最適化できたと判断できる。

製造した ^{18}F THK-5351 注射液の品質は、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予め定められた薬剤基準を満たす結果が得られたことから、 ^{18}F THK-5117 と同様に臨床用 PET 薬剤として使用できる。

E. 結論

以上、本研究において臨床研究に供することが可能な ^{18}F THK-5351 注射剤の自動合成装置製造法を構築し、放射能および品質の観点で必要十分な供給体制が確立できた。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Hiraoka K, Watanuki S, Shidahara M, Miyake M, Ishikawa Y, Matsuda R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y.: [18F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. Eur Nucl Med Mol Imaging. DOI 10.1007/s00259-015-3035-4
2. Li Y, Tsui W, Rusinek H, Butler T, Mosconi L, Pirraglia E, Mozley D, Vallabhajosula S, Harada R, Furumoto S, Furukawa K, Arai H, Kudo Y, Okamura N : Cortical Lamina Binding of PET Amyloid and Tau Tracers in Alzheimer's disease. J N M (2015)56.270-273.
3. Okamura N, Harada R, Furumoto S, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Tau PET imaging in Alzheimer's disease. Current Neurology and Neuroscience Reports, (2014) 14(11):500. doi: 10.1007/s11910-014-0500-6

2 . 学会発表

海外学会発表

1. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, H, Arai H, Yanai K, Kudo Y: [18F]THK-5117 PET for assessing neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease. AD/PD 2015. March 10-17, 2015 Nice France
2. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, H, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Preclinical evaluation of a novel tau PET tracer [18F]THK-5351. AD/PD 2015. March 10-17, 2015 Nice France
3. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Tago T, Iwata R, Tashiro M, Furukawa K, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Characterization of [18F]THK-5351, a novel PET tracer for imaging tau pathology in Alzheimer's disease. EANM'14 (ヨーロッパ核医学会) .Oct 18, 2014. スウェーデン Gothenburg
4. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y: Development of tau selective PET

tracers . NIH-Japan-JSPS Symposium. 2014年10月23日. アメリカ ベセスダ

5. Ishiki A, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Okamura N, Tashiro M, Yanai K, Kudo Y, Arai H : Accumulation of the novel tau imaging tracer, 18F-5117 is associated with brain atrophy in Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2014. 2014年7月12-17日. コペンハーゲン
6. Harada R, Okamura N, Furumoto S, Tago T, Yoshikawa T, Akatsu H, Iwata R, Arai H, Yanai K, Kudo Y : Binding characterization of PET tracer 18F-5117 in non-Alzheimer's neurodegenerative diseases. Alzheimer's Association International Conference 2014. 2014年7月12-17日. コペンハーゲン
7. Okamura N, Harada R, Furumoto S, Furukawa K, Ishiki A, Tomita N, Tashiro M, Iwata R, Yanai K, Arai H, Kudo Y: Comparison of 18F-THK5117 and 11C-PiB PET images in the Patients with Alzheimer's disease. Alzheimer's Association International Conference 2014. 2014年7月12-17日. コペンハーゲン
8. Okamura N, Furumoto S, Harada R, Furukawa K, Ishiki A, Iwata R, Tashiro M, Yanai K, Arai H, Kudo Y : In vivo selective imaging of tau pathology in Alzheimer's disease with 18F-THK5117. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014. 2014年6月7日-11日. セントルイス
9. Barret O, Alagille D, Jennings D, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Marek K, Seibyl J, Tamagnan G: In vivo assessment of four tau protein tracers isomers of [18F]-THK5105 and [18F]-THK5117. Society of Nuclear Medicine and Molecular Imaging 2014. 2014年6月7日-11日. セントルイス

国内学会発表

1. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、多胡

- 哲郎、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: タウイメージング用トレーサー[18F]THK-5351の前臨床評価. 第33回日本認知症学会学術集会.2014年12月1日.パシフィコ横浜
2. 石木愛子、富田尚希、原田龍一、岡村信行、古川勝敏、工藤幸司、荒井啓行: アルツハイマー病患者における[18F]THK-5117PET 集積値と脳容積に関する検討. 第33回日本認知症学会学術集会.2014年12月1日
 3. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、田代学、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: タウイメージングPET トレーサーで見る蛋白質のコンフォメーション. 第33回日本認知症学会学術集会. 平成26年12月1日. パシフィコ横浜
 4. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、田代学、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司. タウイメージングPET トレーサーで見る蛋白質のコンフォメーション. 第33回日本認知症学会学術集会. 平成26年11月29日~12月1日.パシフィコ横浜
 5. 岡村信行、原田龍一、古本祥三、工藤幸司: F-18 THK PET によるタウイメージングの臨床への応用. 第54回日本核医学会. 2014年11月6日.大阪国際会議場
 6. 岡村信行、原田龍一、古本祥三、工藤幸司: F-18 THK PET によるタウイメージングの臨床への応用. 第54回日本核医学会. 2014年11月6日.大阪国際会議場
 7. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、工藤幸司:アルツハイマー病診断用プローブの開発. Bio Japan 2014 セミナー. 平成26年10月15日-17日.パシフィコ横浜
 8. 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、岩田錬、田代学、荒井啓行、谷内一彦、工藤幸司: [18F]THK-5117PET によるアルツハイマー病のタウ病理像の生体画像化. 第37回日本神経科学大会.2014年9月11-13日.パシフィコ横浜
 9. 原田龍一、岡村信行、古本祥三、古川勝敏、石木愛子、富田尚希、岩田錬、田代学、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: In vivo tau imaging in Alzheimer's disease using [18F]THK-5117PET. 第4回日本認知症予防学会学術集会. 2014年.9月26-28日.タワーホール船堀
 10. 岡村信行、古本祥三、原田龍一、多胡哲郎、石木愛子、古川勝敏、田代学、岩田錬、谷内一彦、荒井啓行、工藤幸司: タウイメージング用PET トレーサー[18F]THK-5117の臨床評価. 第9回日本分子イメージング学会総会・学術集会.平成26年5月22-23日.千里ライフサイエンスセンター
 11. 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: タウイメージングトレーサー-18F-THK-5117の結合メカニズムの検討. 第9回日本分子イメージング学会総会・学術集会.平成26年5月22-23日.千里ライフサイエンスセンター
 12. 多胡哲郎、古本祥三、岡村信行、原田龍一、安立創、石川洋一、谷内一彦、工藤幸司、岩田錬: "PET用タウイメージング剤[18F]THK-5105 エナンチオマー体の評価. 第9回日本分子イメージング学会総会・学術集会.平成26年5月22-23日.千里ライフサイエンスセンター
- 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

なし

3. その他

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

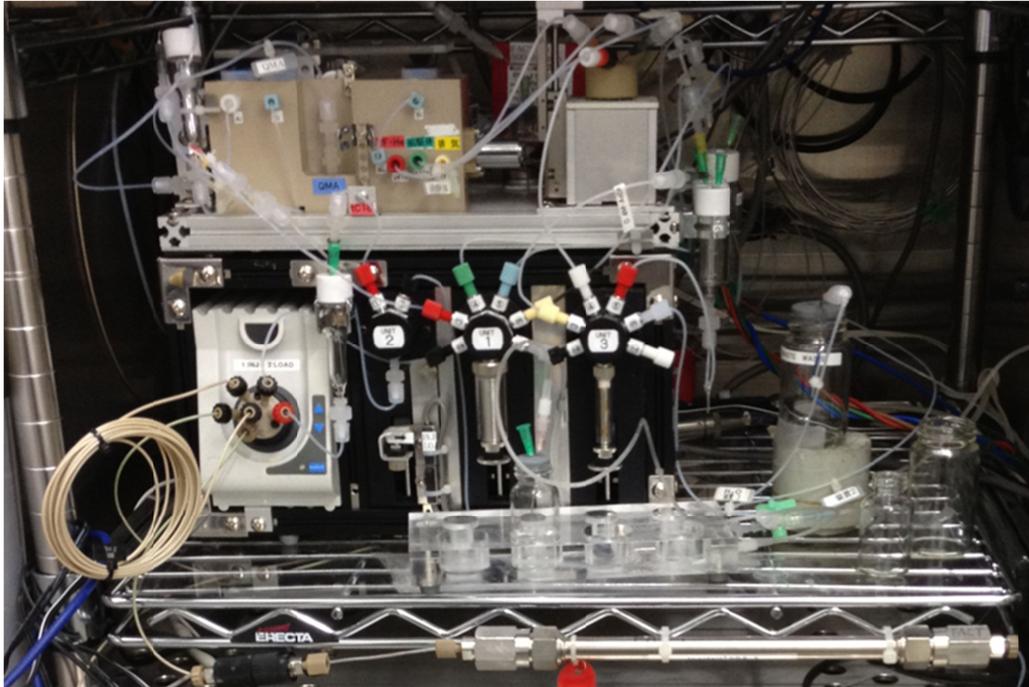


図1 ^{18}F 標識合成装置。6方バルブのついた電動シリンジ2機、HPLC用オートインジェクターを搭載。

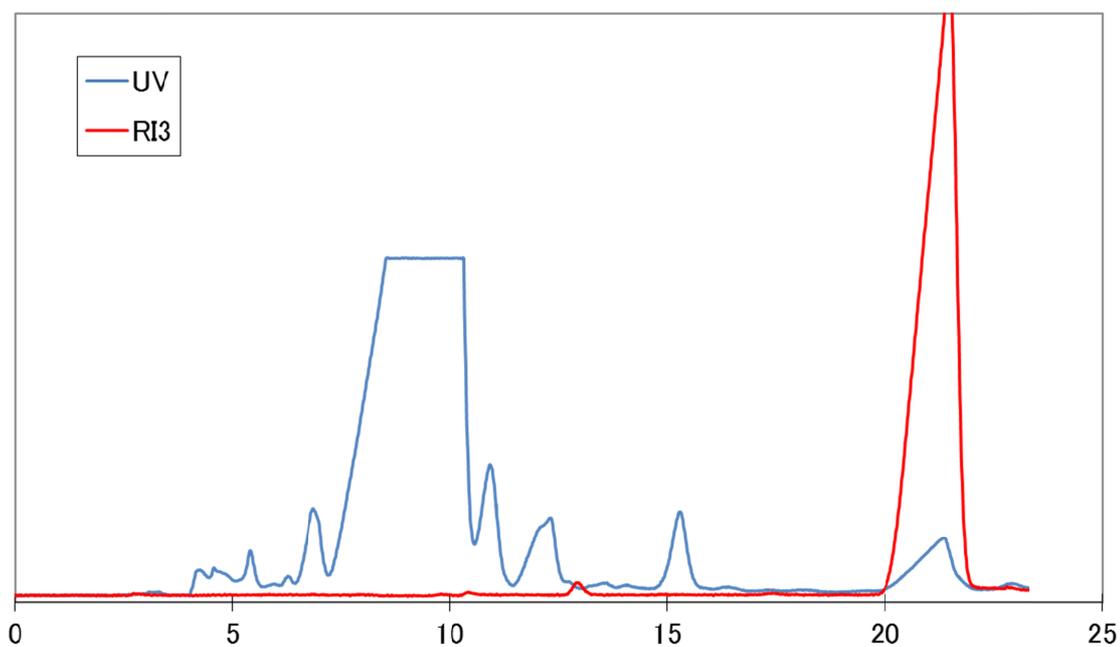


図2 セミ分取高速液体クロマトグラフィーで得られたクロマトグラム の 典型例。横軸スケールは 溶出時間(分)、青線は UV 吸収、赤線は放射能のクロマトグラムを表している。20 から 22 分にかけて目的とする THK-5351 が溶出した。

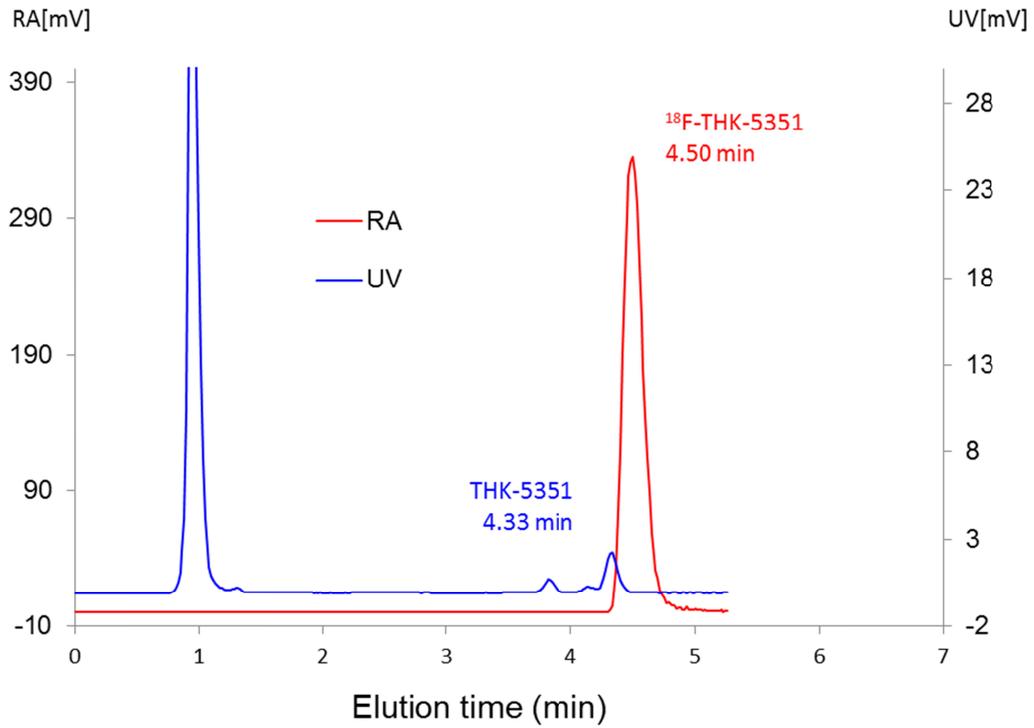


図3 分析高速液体クロマトグラフィーで得られた¹⁸F]THK-5351 のクロマトグラム。青線は UV 吸収、赤線は放射能のクロマトグラムを表している。保持時間約 4.5 分のピークが¹⁸F]THK-5351 である。¹⁸F]THK-5351 以外の放射性ピークはほとんど観察されず、放射化学的純度は非常に高いことが分かる。