
東北大学分子イメージング教育コースシンポジウム 2012

震災復興分子イメージング化学シンポジウム 「次世代分子イメージングプローブの将来展望」

Symposium for Molecular Imaging Educational Course of Tohoku University 2012:
Future Prospects of Next-generation Molecular Imaging Probes

2012年3月6日(火)

長陵会館



TOHOKU
UNIVERSITY

東北大学分子イメージング推進室

はじめに

2010年3月12日に東北大学分子イメージング教育コースプログラムによる第1回国際シンポジウム“The ART of Loss”が開催され、今回が第2回目となります。2011年3月11日の大震災により東北大学も甚大な被害を蒙りましたが、中でも大型機器は地震の加速度に抗しがたいために損害は甚大でした。サイクロトロン・ラジオアイソトープセンターのサイクロトロンもこの例にもれず、930型サイクロトロンとHM12サイクロトロン共に1年以上の運転休止に追い込まれてしまっていますが、政府の復興支援のおかげでようやくこの4月頃から徐々に運転が再開される見通しとなっています。ご存知のように、サイクロトロンなしではPET分子イメージング研究を継続することはほぼ不可能です。しかし、幸いも国内外の多くの方々から暖かい支援の手を差し伸べていただき、この間も研究・教育活動を継続することができました。実験の機会を提供していただきました放医研分子イメージングセンター、理研（神戸）分子イメージング科学研究センターおよび東京都健康長寿医療センターに、この場をおかりしてお礼を申し上げます。

本シンポジウムは、この歴史的な大震災から復興しつつある東北大学の分子イメージング研究の再生と発展を祈願して企画しました。講演者には、それぞれの分野で非常に活躍し注目すべき研究成果を上げている若手（アラフォー）研究者9名を学外からお招きました。中でも2013年6月には済州島にて放射性医薬品化学国際シンポジウム（ISRS2013）を開催する発展著しい隣国韓国から若手ホープの全北大学 Kim Dong Wook 博士にプロトン供与性溶媒での ^{18}F 標識法に関して講演をお願いしています。活発な議論を通して競争と連帯の意識を育むことで、アジアにおける分子イメージング研究の発展に少しでも寄与できればと願う次第です。

講演座長には次の東北大学関係の先生方をお願いしましたが、年度末でお忙しい中お引き受けいただき大変感謝申し上げます。

- 東京都健康長寿医療センター研究所附属診療所・神経画像研究チーム研究部長
石渡 喜一（サイクロトロン・RIセンター研究教授）
- 放医研分子イメージングセンター・分子認識研究プログラム分子プローブ開発チームリーダー
張 明 栄（大学院薬学研究科分子イメージング薬学分野客員教授）
- 未来医工学治療開発センター教授
工藤 幸司
- 大学院薬学研究科教授
根東 義則

最後に、本シンポジウム開催のためにご尽力いただきました会長の医学系研究科・谷内一彦教授に深く感謝します。また、開催のためにご協力いただいた方々、遠くから参加された多くの方々に御礼を申し上げます。

2012年3月6日

シンポジウム実行委員会

岩田 錬

東北大学分子イメージング教育コースシンポジウム2012
震災復興分子イメージング化学シンポジウム：次世代分子イメージングプロブの将来展望
 Symposium for Molecular Imaging Educational Course of Tohoku University 2012: Future Prospects of Next-generation Molecular Imaging Probes

場所: 長陵会館
 日時: 2012年3月6日(火) 10時～17時
 Venue: Gomyo-Kaikan
 Date: 10:00-17:00, March 6, 2012

セッション Session	座長 Chair	No.	時間 Time	演者 Speaker	演題 Title
— 開会 Opening —			10:00 ~ 10:10	谷内 一彦 Kazuhiko Yanai	開会の挨拶 Welcome
I	石渡 喜一 Kiichi Ishiwata	1	10:10 ~ 10:35	小川 美香子 Mikako Ogawa	マルチモダル分子イメージングによる生体機能解析 (In vivo Molecular Imaging with Various Modalities)
	根東 義則 Yoshinori Kondo	2	10:35 ~ 11:00	菊池 達矢 Tatsuya Kikuchi	脳内機能の定量測定を可能とするPETプローブの開発 (Development of PET Probes for Quantifying the Functions in the Brain)
		3	11:00 ~ 11:25	土居 久志 Hisashi Doi	有機金属化学的手法を用いたPET分子プローブの合成 (Organometallic Chemistry for Synthesis of PET Molecular Probe)
		4	11:25 ~ 11:50	木村 寛之 Hiroyuki Kimura	迅速・効率的なラベル合成法の開発: マイクロリアクターとマイクロウェーブの利用 (Development of Rapid and Effective Methodology for Radiolabeling Using Microreactor and Microwave)
— 昼休み Lunch —			11:50 ~ 13:30		
II	岩田 鍊 Ren Iwata	5	13:30 ~ 14:15	Dong Wook Kim	F-18 Labeling Protocols in Protic Reaction Media
	工藤 幸司 Yukitsukasa Kudo	6	14:15 ~ 14:40	小野 正博 Masahiro Ono	アルツハイマー病診断用分子イメージングプローブの開発 (Molecular Imaging Probes for Diagnosis of Alzheimer's Disease)
		7	14:40 ~ 15:05	古本 祥三 Shozo Furumoto	神経病理像を標的としたアルツハイマー病画像診断薬の開発研究 (Development of Diagnostic Imaging Agents Targeting Neuropathology of Alzheimer's Disease)
— 休憩 Coffee & tea —			15:05 ~ 15:35		
III	張 明榮 Ming-Rong Zhang	8	15:35 ~ 16:00	清野 泰 Yasushi Kiyono	放射性臭素標識プローブの開発: 診断から治療へ (Development of Radiobromine Labeled Probes: from Diagnosis to Therapy)
		9	16:00 ~ 16:25	長谷川 功紀 Koki Hasegawa	生体高分子を用いたPETプローブ創製 (Preparation of PET Probes Utilizing Biological Macromolecules)
		10	16:25 ~ 16:50	永津 弘太郎 Kotaro Nagatsu	金属核種の遠隔製造 (Remote Production of Metallic Radioisotopes)
— 閉会 Closing —			16:50 ~ 17:00	岩田 鍊 Ren Iwata	閉会の挨拶 Closing

目 次

はじめに

プログラム

1. マルチモダル分子イメージングによる生体機能解析
In vivo molecular imaging with various modalities
小川 美香子、Mikako Ogawa (浜松医科大学)1
2. 脳内機能の定量測定を可能とする PET プロブの開発
Development of PET probes for quantifying the functions in the brain
菊池 達矢、Tatsuya Kikuchi (放医研)4
3. 有機金属化学的手法を用いた PET 分子プロブの合成
Organometallic chemistry for synthesis of PET molecular probe
土居 久志、Hisashi Doi (理研)7
4. 迅速・効率的標識合成法の開発：マイクロリアクターとマイクロウェーブの利用
Development of rapid and effective methodology for radiolabeling using microreactor and microwave
木村 寛之、Hiroyuki Kimura (京都大学) 11
5. F-18 Labeling protocols in protic reaction media
Dong Wook Kim (韓国・全北大学)16
6. アルツハイマー病診断用分子イメージングプロブの開発
Molecular imaging probes for diagnosis of alzheimer's disease
小野 正博、Masahiro Ono (京都大学)17
7. 神経病理像を標的としたアルツハイマー病画像診断薬の開発研究
Development of diagnostic imaging agents targeting neuropathology of Alzheimer's disease
古本 祥三、Shozo Furumoto (東北大学)22
8. 放射性臭素標識プロブの開発：診断から治療へ
Development of radiobromine labeled probes: from diagnosis to therapy
清野 泰、Yasushi Kiyono (福井大学)26
9. 生体高分子を用いた PET プロブ創製
Preparation of PET probes utilizing biological macromolecules
長谷川 功紀、Koki Hasegawa (理研)29
10. 金属核種の遠隔製造
Remote production of metallic radioisotopes
永津 弘太郎、Kotaro Nagatsu (放医研)33

1. マルチモダル分子イメージングによる生体機能解析

In vivo molecular imaging with various modalities

浜松医科大学 メディカルフォトンクス研究センター

Medical Photonics Research Center, Hamamatsu University School of Medicine

小川 美香子、Mikako Ogawa

ヒトや動物の内部を生きたまま観察することができる生体イメージング法は、ライフサイエンスの基礎研究から臨床診断まで幅広く利用されている。生体イメージング法は、臓器などの形を描出する「形態イメージング法」と、特定の生体内機能を描出する「機能イメージング法」に大別される。X線CT（コンピューター断層撮像法: computed tomography）、MRI（核磁気共鳴画像法: magnetic resonance imaging）、超音波エコー（ultrasound (US)）は前者に分類され、核医学イメージング法（positron emission tomography (PET); single photon emission computed tomography (SPECT)）や光イメージング法は後者に分類される。また、生体内の標的分子の動きをインビボで画像化する技術を「分子イメージング」と呼ぶ。つまり、機能イメージング法は元来、分子イメージング法と同義であり、また近年では、形態イメージング法においても分子イメージングが試みられはじめている。この分子イメージングを行うためには、分子イメージングプローブの創製が必須である。分子イメージングプローブは、標的分子を認識する部位（標的指向性分子）とイメージング法に適した信号を放出する部位（シグナル部位）からなる。標的指向性分子としては、低分子有機化合物、ペプチド、タンパク、ナノ粒子などが用いられ、シグナル部位としては、CTではヨウ素や金、MRIではガドリニウムやマンガン、核医学イメージングでは放射性核種（PETではポジトロン放出核種である ^{11}C 、 ^{15}O 、 ^{13}N や ^{18}F 、SPECTではシングルフォトン放出核種である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ や ^{111}In など）、光イメージングでは蛍光物質が利用される。

表1に示すように、それぞれのイメージング法は利点・欠点を持つため、観察対象や用途に適した分子イメージングモダリティを選択することが重要である。たとえば、核医学イメージング法であるPETは定量性に優れており、また、シグナル部位として前述のようにC、O、Nなどの生体構成元素や、Hと互換性のあるFを利用することができるという大きな利点を持つ。さらに、これらの元素は原子量が小さいため、標的指向性分子として低分子有機化合物を用いれば、分子イメージングプローブ全体として小さい分子量のものを作成可能である。この性質は、血液脳関門により大きな分子の透過が制限されている脳をイメージングする際に有効で

表1 各イメージング法の特徴

	CT	MRI	US	核医学イメージング光イメージング			
				PET	SPECT	蛍光	発光
分解能	◎	◎	◎	△	△	△~◎	△
定量性	○	△	△	◎	○	△	△
深さ	◎	◎	○	◎	◎	△	△
感度	×	△	△	◎	◎	◎	◎
簡便性	○	○	◎	×	△	◎	◎
被曝	×	◎	◎	×	×	◎	◎
分子イメージング	△	○	○	◎	◎	◎	◎

あり、プローブの体内動態の制御も容易となる。しかしながら一方で、核種の半減期が短いためにはプローブの合成に工夫が必要であること、用事合成が必須であること、生体内へ投与後速やかに標的分子を認識する必要があるなどの欠点も持つ。さらに、サイクロトロンなどの大型設備を必要とし、画像化装置も複雑で高価であり、放射性物質であるため取扱に特別な管理も必要となる。

また、インビボイメージングがインビトロイメージングと大きく異なる点として、血中滞留や標的組織外での非特異的結合など、生理的に存在するイメージングプローブを、インビトロの実験系のように容易に洗い流すことができないという点が挙げられる。このため、インビボイメージングで非特異的な正常組織からのシグナルが大きい場合、特異的シグナルを拾い上げるのが困難になることがある。インビボ分子イメージングにおけるこの問題点を解決する一つの手段が、シグナルを標的組織においてのみ ON にすることができるアクチベータブルプローブである。インビボイメージングにアクチベータブルプローブを用いることにより、非標的組織からの背景の

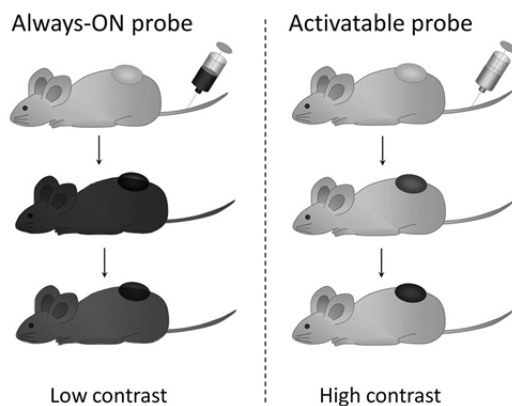


図1. アクチベータブルプローブの特徴
従来の Always-ON タイプのプローブでは、全身にプローブが分布した後、非標的組織からのクリアランスを待ってイメージングを行うが、完全に非特異的信号を押さえることは難しい。一方、標的組織でのみ信号が ON となるアクチベータブルプローブを用いることによって、非標的組織からの信号を押さえ、極めて特異性の高い画像を得ることができる。

シグナルを押さえ、極めて特異性の高い画像を得ることができるわけである (図1)。光イメージングでは、この「アクチベータブルプローブ」を作成することが可能であるため、特異性の高いイメージングが達成される。また、光イメージングは、大型設備を必要とせず、また、装置が比較的安価であるなど、簡便性に優れている。他方で、他の分子イメージング法に比べ、光イメージングは、光信号の生体透過性が低く、吸収や散乱によって定量性が低下するという欠点がある。すなわち、可視領域の光はヘモグロビンに吸収され、また 900 nm を超える長波長の光は水に吸収されてしまうため、深部組織のイメージングは難しい。近赤外光 (Near infrared, NIR, 650 nm ~ 900 nm) の領域は「生体の窓」と呼ばれ、比較的組織透過性が高いためインビボイメージングに利用可能であるが、透過性は数センチ程度であり、核医学イメージングと比べるとはるかに劣る。しかしながら、可視光領域の光は文字通り「可視」であり、ヒトの目で見るため術中イメージングには大変有用であり、近赤外光も CCD カメラで容易に捉えることができるため、内視鏡やロボット手術などカメラを用いたイメージングではその効果を発揮する。

MRI は、前述のように、旧来、形態イメージング法に分類されていたが、近年では、MRI 用の分子イメージングプローブの開発も行われている。MRI は核医学イメージング、光イメージングと比較すると、感度が約 1,000~10,000 倍劣ることから、プローブの投与量が多くなるためその毒性 (副作用) に注意する必要がある。また、極微量の標的分子を捉えることが難しいという欠

点を持つが、MR造影剤を用いた分子イメージングでは形態画像を同時に得ることが可能であり、また、解像度に優れているという特徴も持つ。さらに最近では、MRIにおいてもアクチベータブルプローブの開発が行われている。

上記のように、各イメージング技術は、それぞれ異なった利点・欠点を持つ。そこで、お互いの利点を生かし、欠点を補いあうことを目的に、近年、これらを組み合わせたマルチモダルイメージングが様々なグループから報告されている。マルチモダルイメージングによれば、各技術の「いいとこどり」をすることにより、見たい情報をよりの確に得ることができると考えられる。我々も、アクチベータブルプローブを用いた光イメージングと核医学イメージングを組み合わせることで、標的分子の特異的描出と、標的指向性分子の体内動態評価を同時に可能とする分子イメージングプローブの作成に成功した。このように、その有用性が期待されるマルチモダルプローブだが、克服すべき課題も存在する。核医学イメージングやMRIでは断層像を得ることが可能である。これに対し、光イメージングでは、現在のところ2Dでのプロジェクション画像が主流である。そこで、核医学画像、MR画像などの三次元あるいは断層画像と二次元のプロジェクション蛍光画像を重ね合わせることは容易ではない。最近では、蛍光トモグラフィイメージングが可能な装置も開発されてきているが、マウスでの利用が限界であり、解像度もかなり劣るものとなっており、さらに、ヒトにおいては体幹部の断層像を得るのはおそらく不可能であると思われる。また、前述のようにMRIはイメージングプローブに対する感度が低い。すなわち、これに伴い、核医学あるいは光イメージングプローブと投与量が大幅に異なることとなる。今後、このようなマルチモダルイメージングにおける課題を克服、あるいはより上手に使いこなすことが、それぞれのモダリティが協調したより効果的な分子イメージングを実現するために重要であろう。

本講演では、各イメージングモダリティの特徴を概説し、マルチモダルイメージングについての最近のトピックスを、我々のデータを交えて紹介する。

2. 脳内機能の定量測定を可能とする PET プローブの開発 Development of PET probes for quantifying the functions in the brain

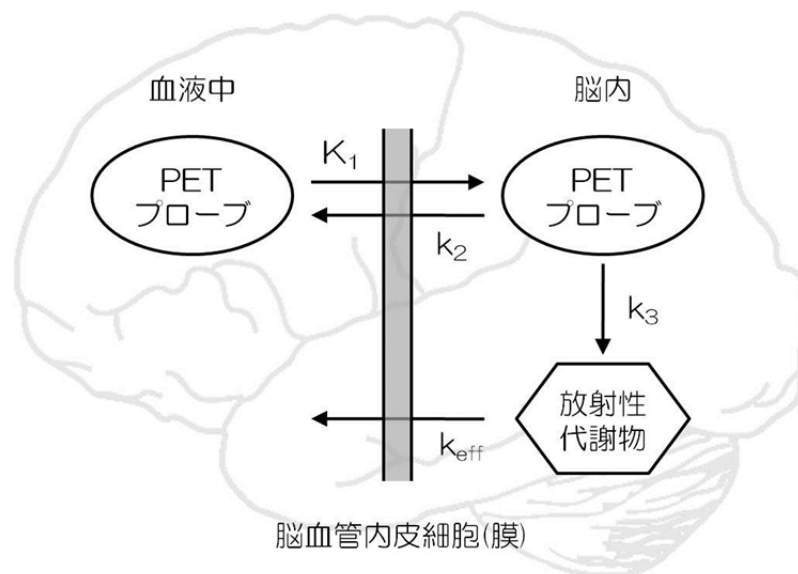
放射線医学総合研究所分子イメージングセンター
Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences

菊池 達矢、Tatsuya Kikuchi

PET は、疾病に関与する生体分子や機能の変化を捉え、疾患の早期診断や治療の方針策定および効果判定等の医療に直接貢献する情報を与えるだけでなく、さらに生体機能や疾患の基礎的な理解にも貢献すると期待される、侵襲性が極めて低い生体分子イメージング技術のひとつである。これらの情報の取得は、PET の持つ高い時間分解能と放射能の定量性にに基づき、イメージングの情報を数値で表現することにより可能になる。すなわち、PET プローブの生体内分布の時間変化を、動態に基づく数学的な解析を用いてひも解き、定量的な生化学・生理学的情報を得る。ここで、PET プローブの動態が複雑であれば、その動態解析が困難になり、その結果、得られる情報の定量性は低下する。したがって、PET によって得られる情報の信頼性、PET プローブの動態に大きく左右されてしまう。

医療に直接貢献するようなプローブ開発の過程においては、既に治療を目的として開発された医薬品を放射能標識することで有用なプローブを得ることも少なくない。しかしながら、医薬品においては問題とならない動態が、PET プローブとしては致命的な場合がある。例えば、医薬品においては血中タンパク質や測定対象組織への非特異結合が許容されても、PET プローブにおいてはそれらが組織移行性の低下やバックグラウンドの上昇の原因となり、その結果、得られる情報の定量性が低下してしまう。このような場合には、その問題を解決する誘導体化を試みる。また、測定対象となる生体の機能や標的分子に見合った測定原理を考案しつつ、リード化合物の分子設計を行ない、さらに最適化を行うことで創薬的に新規の分子プローブ開発することも重要となる。多くの医薬品は、受容体や酵素に結合してその薬効を発揮する。一方、病理組織標本などにおける酵素の染色方法では、抗体などの対象酵素に結合する試薬を用いる場合もあるが、古くから対象酵素の基質または基質誘導体を試薬として用い、酵素活性に従って生成する代謝物を利用することも多い。同様に、このような酵素基質または基質誘導体を PET プローブとして用い、脳内の酵素活性を測定する方法がある。

基本的な脳内酵素活性の測定原理は、脳に移行した PET プローブが測定対象とする酵素の活性に従って脳内に保持されるというものであるが、PET プローブを用いて脳内の酵素活性を精度良く定量測定するためには、PET プローブがいくつかの条件を満たす必要がある。脳内での代謝を利用する PET プローブの脳内動態モデルを図(次ページ)に示す。構造的に PET 核種で標識可能であることや化学的に安定であることが前提となるが、まず、当然ではあるが PET プローブが脳毛細血管の内皮細胞を通過し脳内に移行しなければならない。このため、比較的脂溶性の化学構造であり、血漿タンパクとの強固な結合が少なく、また脳毛細血管に存在する薬物排出トランスポーターに対する基質性が乏しいことが望まれる。一方、脳内で酵素によって生成する放射性の代謝物は、ある程度脳内に保持されなければならない。したがって、脳内の放射性代謝物は、血管の内皮細胞を通過して脳から流出しないような親水性や脳組



織への結合性を持つことが望まれる。次に、これも当然ではあるが、測定対象とする酵素に特異的に代謝されなければならない。最後に、PETプローブの脳内における測定対象酵素による代謝速度(k_3)が、PETプローブそのものの脳からの流出速度(k_2)に比べある一定の割合である必要がある。なぜならば、代謝速度があまりに速い場合、脳に移行するPETプローブのほぼすべてが代謝物となり、脳内に蓄積する放射能は、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{HMPAO}$ や $[^{99m}\text{Tc}]\text{ECD}$ を用いた場合のように単に脳血流(K_1)を反映することになる。一方、代謝速度があまりに遅い場合には、脳内で生成し保持される放射性代謝物の量が低くなり、測定が困難になってしまう。脳内の酵素活性を測定するPETプローブを開発する際には、このような条件を満たすようにPETプローブを設計し、各条件について評価を行なうことが重要になる。

さらに、上記のように脳内の代謝を利用したPETプローブを用いることで、脳に存在する薬物排出トランスポータ活性の測定も可能になる。薬物排出トランスポータは、有害な代謝物や異物を体外へ排出し、生体を守る機能を持つ。一方、このような脳毛細血管壁に存在する薬物排出トランスポータがある種の治療薬の脳移行性を低下させ、腫瘍においては薬剤耐性に関与することが薬物治療における障壁となっている。これらのことから、薬物排出トランスポータの活性を測定することは、治療薬剤の脳移行性の検討や、腫瘍や脳神経疾患における薬剤耐性の評価、また神経変性疾患における病態もしくは病因の解明に大きく寄与すると期待される。現在、様々な薬物排出トランスポータ活性を測定するPETプローブが開発されているが、これらは薬物排出トランスポータの基質であることから、脳を測定対象とした場合、正常脳への移行性が低いため変化の定量性が低く、さらに脂溶性基質ではトランスポータに依存しない脳への移行および排出があることから、トランスポータ活性の定量測定ができない。また、動物を用いた研究では、長半減期の放射性核種で標識した薬物排出トランスポータの基質を直接脳内に投与方法が実施されている。しかしながら、この方法は侵襲的であり、また同一個体での検討が困難であるため、動物においても非常に多くの労力を要し、ましてやヒトで実施することはできない。そこで、我々はそれらの問題を克服するために、上記のような脳内代謝を利用したPETプローブによる新たな薬物排出トランスポータ活性の測定原理を考案した。薬物排出トランスポータ活性の高精度な定量測定は、薬物排出トランスポータ基質を組織内で生成する、いわばプロドラッグのようなPETプローブにより対象組織に放射能を送達し、

脳組織内で生じた代謝物の放射能の消失速度 (k_{eff}) を測定することで可能となる。この方法では、脳内で効率的に放射性代謝物を生成させることが重要であることから、PET プローブの脳内代謝速度 (k_3) は速ければ速いほど良い。また、放射性代謝物の脳からの消失速度に影響を与えるような脳組織中での結合能があってはならない。

さて、生体の様々な生理・生化学的機能やそれらの変化を測定するために、このような PET プローブの開発が盛んに行われているが、さらに今後は生体内物質や薬物そのものの PET 核種標識体を用い、その体内動態を検討することも重要であろう。すなわち、これまでの PET を用いた研究では、生体内物質や薬物、もしくはそれらの誘導体の動態から、生体の情報を間接的に得ることに注目が集まり、意外にもそれらそのものの動態はあまり注目されなかった。そこに注目したのがマイクロドージングである。一方、生体内物質や薬物そのものの生体における動態や機能を中長半減期の放射性標識体を用いて探索する研究(トレーサー実験)は古くから行われてきた。しかしながら、これまでの PET 装置や標識技術では小動物を用いた検討や、任意の物質を PET 核種標識することは困難であったことから、このような目的に PET を用いるには制約があった。これに対し近年の小動物用 PET の開発および標識技術の飛躍的な向上は、様々な標識物質の小動物同一個体における経時的かつ定量的な動態測定を可能にした。今後は基礎研究の分野においても小動物 PET によるトレーサー実験が有用になるだろう。本シンポジウムでは、上記の測定原理に基づくプローブ開発や、これまでその存在意義が不明だった生体内物質の機能探索について、実際のケースを例にとりて紹介する。

3. 有機金属化学的手法を用いた PET 分子プローブの合成 Organometallic chemistry for synthesis of PET molecular probe

理化学研究所分子イメージング科学研究センター
RIKEN Center for Molecular Imaging Science

土居 久志、Hisashi Doi

陽電子放射断層画像撮影法 (PET) は、化学・物理学・工学・生物学・薬学・医学が融合した学際研究であり、機能性化合物の創製ならびに標識化学反応の開発に始まり、続くラット・サルを用いた分子動態イメージング研究を経て、最終的にはヒト臨床研究に至る一貫型研究である。私達合成化学者の立場からすると、本 PET 研究の推進には生物活性有機化合物の創製と陽電子放出核種での標識化が重要課題であり、本学際研究の基盤でもある。化学に対する期待とその責任は大きいと感じる。

“ヒトに適用でき、かつ、ヒトにやさしい分子科学、すなわちヒト志向型ライフサイエンス研究の推進”。これは、恩師鈴木正昭教授 (現・理化学研究所分子イメージング科学研究センター・副センター長) の研究理念である。鈴木教授は有機化学者としては 1990 年代の初頭から PET の潜在性に着目され、有機合成化学およびケミカルバイオロジー分野において上記の「ヒト学のすすめ」を提唱されてきた。以降、私達は、従来の有機合成化学と意を同じくしつつも、合成方法論が大きく異なる PET 分子プローブ合成化学に参画させて頂いた。

PET 法で用いられる陽電子放出核種の中でも ^{11}C (半減期 20.4 分) 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有機化合物の PET 分子プローブ化には理想的な放射性核種である。そこで私達は、最小の炭素置換基であるメチル基に着目し、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 $\text{C}^{[11\text{C}]}$ メチル化法により達成したいと考え研究を行ってきた。これまでに、有機スズ化合物と $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルを用いたパラジウム触媒によるクロスカップリング反応の開発に成功した¹⁾ (Fig. 1)。本反応の特徴の一つとしては、わずか 5 分で反応が終結することがあげられる。現在、私達は、この高速 $\text{C}^{[11\text{C}]}$ メチル化反応の研究を芳香

環上からさらにオレフィンやアルキン上へと展開 (Fig. 1)、加えて、従来の有機スズ化合物と相補的に新たに有機ホウ素化合物を用いた高速 $\text{C}^{[11\text{C}]}$ メチル化反応および高速 $\text{C}^{[18\text{F}]}$ フルオロメチル化反応^{1d)}を開発している (Fig. 1, 2)。

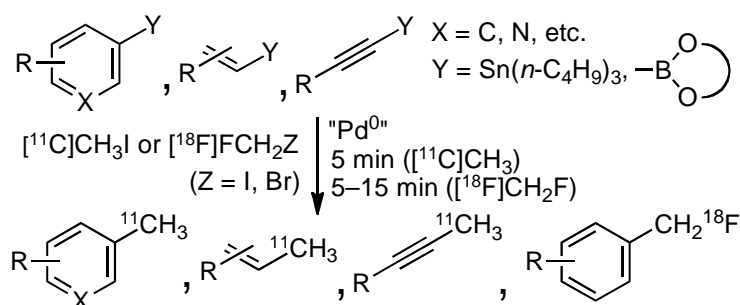


Fig. 1. Pd⁰-Mediated rapid $\text{C}^{[11\text{C}]}$ methylations and $\text{C}^{[18\text{F}]}$ fluoromethylations¹⁾

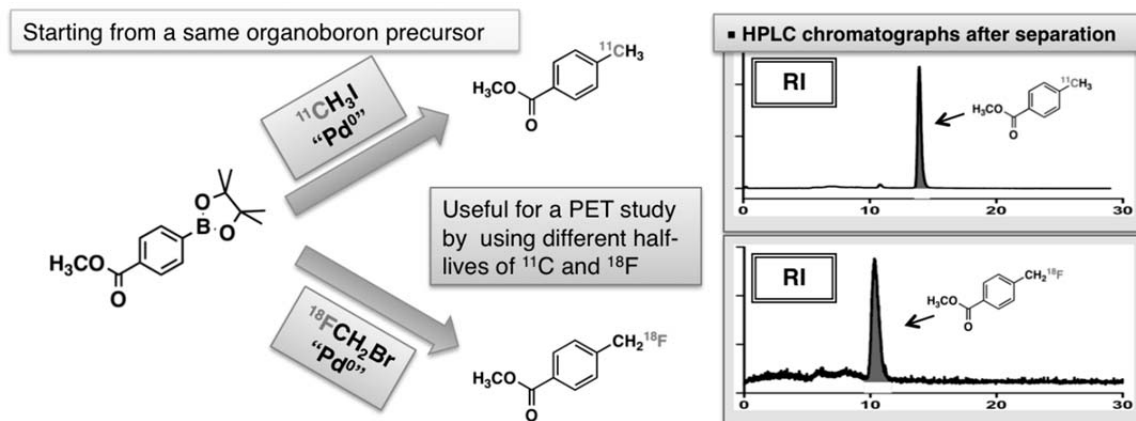


Fig. 2. Line-upped rapid $C^{[11C]}$ methylations and $C^{[18F]}$ fluoromethylations^{1c)}

高速 $C^{[11C]}$ メチル化反応や高速 $C^{[18F]}$ フルオロメチル化反応は精密有機合成の流れを汲む有機金属化学的手法であるが、現在の反応条件では、厳密な無水条件や不活性ガスは不要であり、パラジウム触媒などの反応剤や有機溶媒も市販のものを直接用いても問題はない。合成操作も比較的シンプルになっている。本反応の基本概念は 2010 年のノーベル化学賞の授賞対象となった「パラジウム触媒によるクロスカップリング反応」に起因するものである。しかしながら、有機金属化学においては sp^3 混成軌道を持つメチル基のクロスカップリングは通常は極めて困難であるとされてきた。上記の高速 $C^{[11C]}$ メチル化反応の開発が本質的に難しかった理由の一つがここにある。なお、化学反応の一大使命として、「安価で豊富な原料から地球にやさしい方法で人類に有益な高付加価値の物質を生み出すこと」があげられる。実のところ、クロスカップリング反応をはじめとした一般的な化学反応においては、これまでは反応時間を積極的に速く短くしようという研究はほとんどなく、むしろ人類社会にとって良い物であれば環境にやさしく経費が許す限りじっくりと時間をかけて化学合成を行ってきた感がある。高速 $C^{[11C]}$ メチル化反応の開発を発端として、クロスカップリング反応が持つ化学的潜在性は、現在では「時間との闘い」である PET 分子プローブの合成に応用・拡張することが可能となってきた。時間の概念を加味した新たな化学反応へとさらなる進展を続けていると言える。

上記の内容は主に低分子化合物の標識化を目指したものであるが、現在では、生体高分子の 18F -標識化研究 (18F 半減期 109.7 分) にも取り組んでいる。先行研究の一例として、大阪大学大学院薬学研究科の小比賀聡教授との共同下に、 $[^{18F}]$ ベンジルフルオリドを用いた化学量論的クリック化学標識法の開発を行ってきた。具体的には、オリゴヌクレオチドの 18F -標識化の実現に向けて、従来型の求核的 $[^{18F}]$ フッ素化法に今回新たに開発した高速クリック反応(反応時間 15 分)を組み合わせ、被標識基質： 18F のモル比がほぼ当量となる化学量論的 18F -標識法の開発に成功した²⁾ (Fig. 3)。本法を用いて、天然型および人工核酸 BNA 修飾型オリゴヌクレオチドの計 27 化合物の 18F -標識体の合成を行い、ラット PET 研究を実施してきた。本研究では、核酸医薬の開発研究に対して PET 分子イメージングがその潜在性・可能性にどのようにアプローチできるのかを主題として研究を進めている。なお、理研における PET 分子プローブの研究背景としては、当施設に

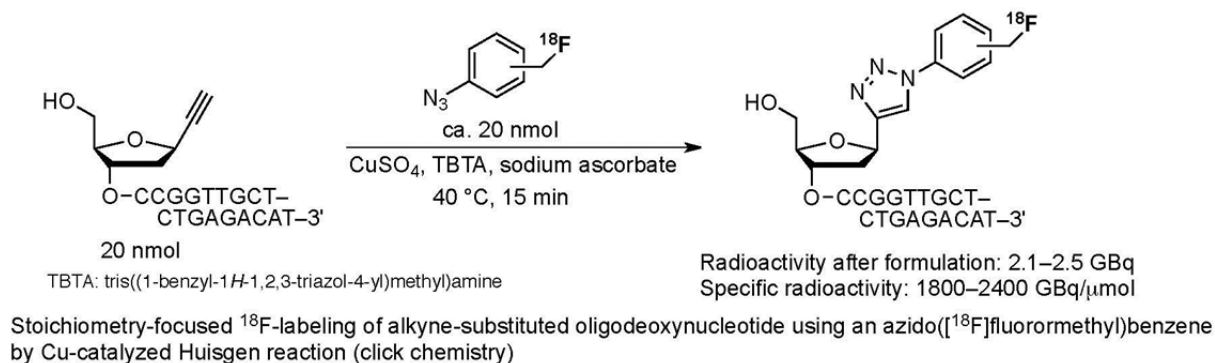


Fig. 3. Stoichiometry-focused ^{18}F -labeling of oligodeoxynucleotides²⁾

において 2007 年 6 月に初めて ^{11}C DASB の合成に成功し、その翌月から本格的な動物 PET 研究を実施するに至った。2012 年 1 月時点において、これまでに開発した PET 分子プローブとしては、理研オリジナル PET 分子プローブは 121 種類、一般普及型 PET 分子プローブは 58 種類である。現在までにヒト臨床 PET 研究に展開できたオリジナルプローブはまだ数種類であるが、引き続き、真に価値のある PET 分子プローブの開発に向けて努力を続けたい。

本シンポジウムでは、生命機能の探索ならびに創薬支援に必要な PET 分子プローブの合成法、とくに ^{11}C および ^{18}F 核種の導入のための新規 PET 化学反応についてご紹介させて頂くとともに、現在推進中の PET 合成化学研究や、臨床研究への飛躍に向けた研究戦略を議論させて頂きたい。2011 年 3 月 11 日の未曾有の東日本大震災から 1 年にあたるこの時に、我が国の PET 研究の先駆けであるこの東北大学にて、まず震災の犠牲になられた方々の追悼と復興・新生を深く祈念し、謹んで私達の PET 化学の研究進捗をご報告させて頂きたい。

Our chemistry groups are working to develop general synthetic methodologies for short-lived PET molecular probes. As one of our main projects, we are striving toward introducing ^{11}C into carbon frameworks of bioactive organic compounds by developing rapid C - ^{11}C methylation reactions based on carbon-carbon bond formation, focusing on the methyl group as the minimum carbon substituent. We have already succeeded in developing several cross-coupling reactions between organotin or organoboron compounds and ^{11}C methyl iodide in the presence of palladium catalyst (Fig. 1).¹⁾ We are currently expanding to the rapid C - ^{11}C methylation onto heteroaromatic frameworks, and also evolving from the introduction of ^{11}C methyl group to ^{18}F fluoromethyl group^{1c)} (Fig. 1 and 2). Furthermore, we are engaged in developing the stoichiometry-focused ^{18}F -labeling of oligodeoxynucleotides and peptides by the application of Click chemistry (Fig. 3).²⁾ In this symposium held in Tohoku University as Japan's pioneering PET research group, marking one year since the Great East Japan Earthquake on March 11, 2011, we hope for early recovery of our country and would like to introduce our ongoing progress of PET chemistry toward human clinical research.

References

- 1) For review articles of our rapid C-[¹¹C]methylations, see (a) and (b); (a) M. Suzuki, H. Doi, *J. Synth. Org. Chem. Jpn.*, **2010**, *68*(11), 1195–1206. (b) M. Suzuki, H. Koyama, M. Takashima-Hirano, H. Doi in *Positron Emission Tomography: Current Clinical and Research Aspects*, InTech, 2011, *in press*. (c) H. Doi, M. Goto, M. Suzuki, 15th European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, Edinburgh, Scotland (UK), April 8–11, 2010, Abstract, *Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, April 2010, *54*, Suppl. 1 to No. 2, pp 18–19.
- 2) T. Kuboyama, M. Nakahara, M. Yoshino, Y. Cui, T. Sako, Y. Wada, T. Imanishi, S. Obika, Y. Watanabe, M. Suzuki, H. Doi, *Bioorg. Med. Chem.* **2011**, *19*, 249–255.

4. 迅速・効率的標識合成法の開発：マイクロリアクターとマイクロウエーブの利用

Development of rapid and effective methodology for radiolabeling using microreactor and microwave

京都大学放射性同位元素総合センター
Radioisotope Research Center of Kyoto University

木村 寛之、Hiroyuki Kimura

1. 序論

種々の疾患イメージングに用いられる Positron Emission Tomography (PET) 分子プローブの合成において、トレーサ量の合成に特化した微量合成法の開発、放射線の遮蔽の観点から合成装置の小型化、並びに用いる核種の半減期に応じた短時間合成法の確立が強く求められている。一方、近年マイクロリアクターと呼ばれる反応装置が開発されており、ナノ・マイクロリットル単位の微小流路内で反応を行うことで反応容量並びに装置自体のサイズの低減が可能であり、さらに優れた熱効率・混合効率により短時間・高効率合成が可能であることから、PET 分子プローブの合成に適した特徴を有していると考えられる。そのため、マイクロリアクターは PET 分子プローブの標識合成用装置としての応用が期待されている。

実際これまでに、マイクロリアクターを用いた PET 分子プローブの標識反応として、 $[^{11}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ を用いた carboxyl 基の $O\text{-}^{11}\text{C}$ -メチル化反応¹⁾や、 $^{18}\text{F}^-$ による triflate 基の求核置換反応^{2,3)}などが報告されており、我々も tosyl 基の ^{18}F 置換反応や hydroxyl 基の $O\text{-}^{11}\text{C}$ -メチル化反応等、一段階標識反応においてマイクロリアクターを用いた短時間・高収率の合成に成功してきた (Fig. 1)。そこで本研究では、マイクロリアクターの PET 分子プローブ合成装置としてのさらなる展開を目

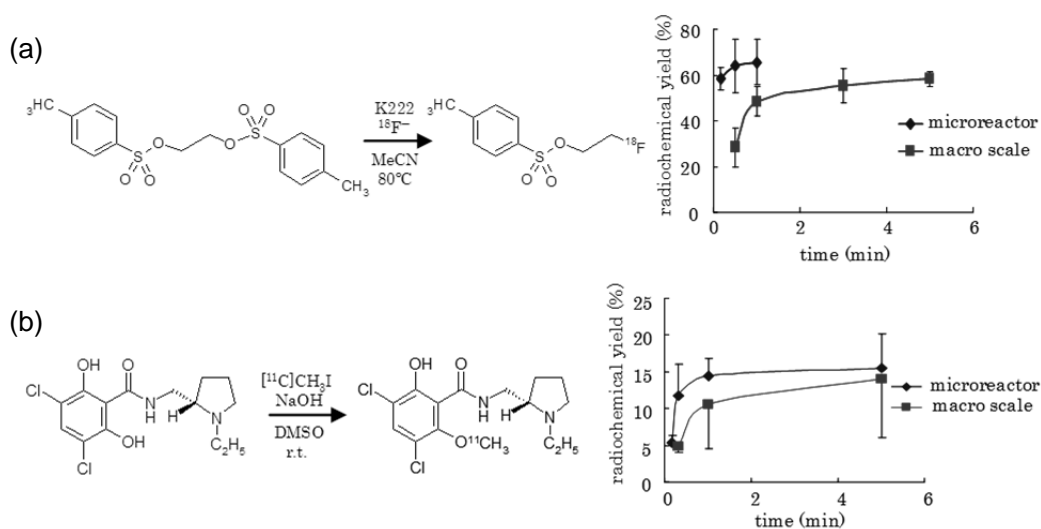


Fig. 1. Comparison of radiochemical yields between microreactor and macro scale. (a) 2- $[^{18}\text{F}]$ fluoroethyl tosylate, (b) $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$.

指し、新たな標識反応と今後の汎用性に必要な多段階合成反応への応用を試みた。本研究におけるモデル化合物として、ペプチドや蛋白質などの高分子化合物の ^{18}F 標識試薬として広く用いられ、その合成工程にこれまでマイクロリアクターを用いた報告例のない trimethylammonium 基の ^{18}F 置換反応ならびに三段階の合成ステップを必要とする *N*-succinimidyl 4- ^{18}F fluorobenzoate (^{18}F SFB) を選択した。

2. 実験方法

チップの設計・作製

サンドブラスト法によりガラスチップ上に流路を形成し、フッ酸接合法により上からガラスを張り合わせることでマイクロリアクター用反応チップを作製した。一段階反応用チップ（流路幅：150 μm ，深さ：150 μm ，流路長：250 mm，容積：5.625 μl ；Fig.2 (a)）、三段階反応用チップ（流路幅：150 μm ，深さ：150 μm ，流路長：250 + 50 + 200 mm，容積：5.625 + 1.125 + 4.5 μl ；Fig. 2 (b)）をそれぞれ設計・作製した。

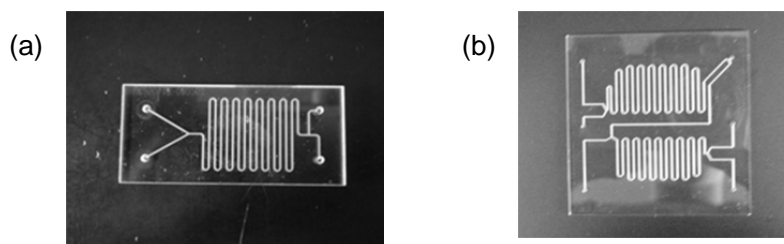


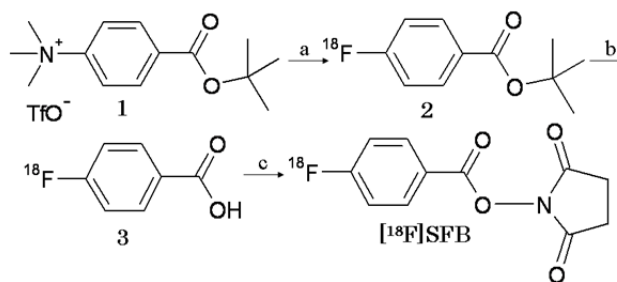
Fig. 2. Microchips for single-step-reaction (a) and three-step-reaction (b).

反応条件の最適化

各ステップにおけるマイクロリアクター/マクロスケール条件下での反応溶媒、反応温度、反応時間を検討した。マイクロリアクターを用いた ^{18}F SFB 合成には、すべての合成がオンラインで行えること、できる限り操作を簡略化することが必要である。そこで、one-pot 合成から one-flow 合成への展開を検討し、更に、既報の合成法では行っている二段階目 (2 \rightarrow 3) (Scheme 1) の反応終了後の脱水操作について検討した。

^{18}F SFB の one-flow 合成の検討

上記での最適化された条件を基に、三段階反応用チップを用いた ^{18}F SFB one-flow 合成を検討した。



Scheme 1. Synthesis of ^{18}F SFB.

(a) K222, K_2CO_3 , $^{18}\text{F}^-$; (b) TPAH; (c)

3. 結果・考察

同一チップ内で多段階合成を行うには、温度制御の観点から単一温度であることが望まれる。しかし、従来法での反応温度は二段階目のみが 120°C と他工程よりも高く、さらにこの温度では溶媒の MeCN がマイクロチップの流路内で蒸発することが明らかとなった。そこで、反応溶媒と温度についてマクロスケールにて検討を行った (Fig. 3.)。その結果、DMSO を用いた場合、120°C で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の放射化学的収率は最大となり、さらに MeCN では反応中間体 **2** が 10% 前後残っていたのに対し、DMSO では二段階目の脱保護反応がほぼ完全に進行した。以上より、マイクロリアクターを用いた $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ 合成の反応溶媒には DMSO を、反応温度は 120°C を選択した。

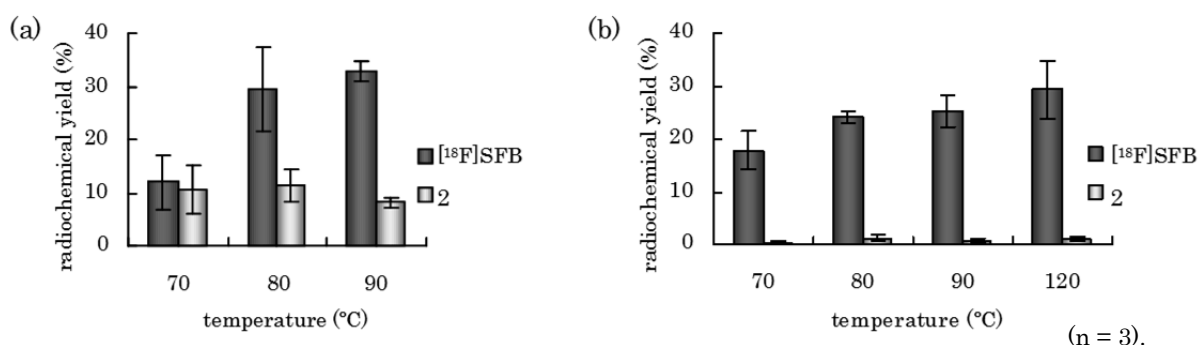


Fig.3. Comparison of radiochemical yield $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ and **2** between MeCN (a) and DMSO (b).

一段階目の trimethylammonium 基を脱離基とした ^{18}F 置換反応における、マイクロリアクター/マクロスケールの反応時間と放射化学的収率を比較した (Fig. 5)。その結果、マイクロリアクターを用いた反応ではマクロスケールに比べ短時間で収率が上昇し、反応条件を検討した結果、DMSO、120°C、5 分のとき収率は最大の 81% となった。すなわち、マイクロリアクターにより収率・反応時間が共に大幅に改善することが明らかになった (15 分、67% → 5 分、81%)。次に、二段階目の脱保護反応における比較を行った (Fig. 6)。反応条件を検討した結果、DMSO、120°C の条件において、マイクロリアクター、マクロスケールともに短時間で定量的に反応が進行した。マイクロリアクターを用いて多段階合成を行うには、すべての合成をオンラインで行うため、可能な限り操作を簡略化する必要がある。しかし、マクロスケールによる従来の合成法では、 $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ 合成の二段階目の反応終了後に煩雑な脱水操作を行っていた。そこで、この操作の必要性をマクロスケールにて検討した。その結果、脱水操作を行わない時の含水率は約 2% であるにもかかわらず、含水率 10% 以下では収率の低下を認めなかった (Fig. 7)。これは、三段階目の反応に用いた TSTU は低含水条件 (20%) でも反応が進行するという報告⁴⁾と合致し、また、活

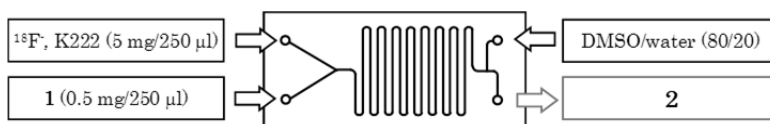


Fig. 4. A microsystem for single-step synthesis of **2**.

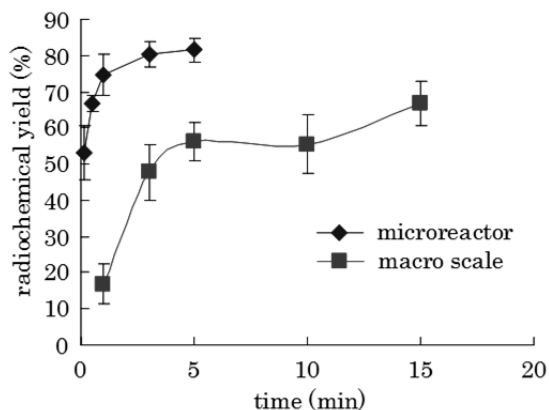


Fig. 5. Comparison of radiochemical yield **2** between microreactor and macro scale at step 1 (n = 4-5).

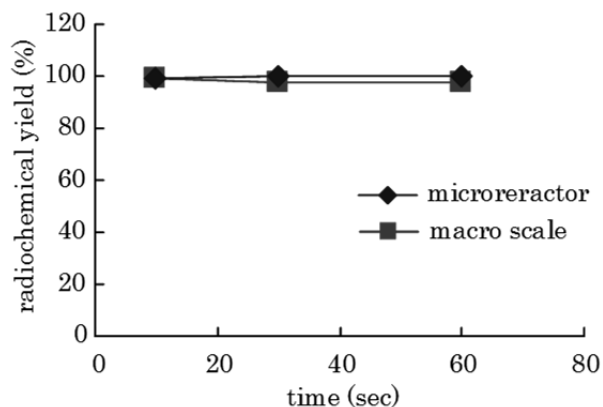


Fig. 6. Comparison of radiochemical yield **3** between microreactor and macro scale at step 2 (n = 4).

性エステルが導入される **3** はトレーサ量であるため、過剰量の TSTU と十分に反応できたものと考えられる。上記検討結果から、本標識合成において脱水操作は省略できることを見出した。

三段階の各反応時間は一段階反应用マイクロリアクターで検討した結果から 5 分、30 秒、1 分と設定し、反応時間にあわせて流路を作製した。このマイクロリアクターを用いて、 $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の三段階反応を連続して行った (Fig. 8)。その結果、反応時間 6.5 分、放射化学的収率 61.9% で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ が得られた。従来の脱水操作を行っていたマクロスケール合成法では反応時間約 60 分、放射化学的収率約 40% であったことから、収率・反応時間ともに向上した。

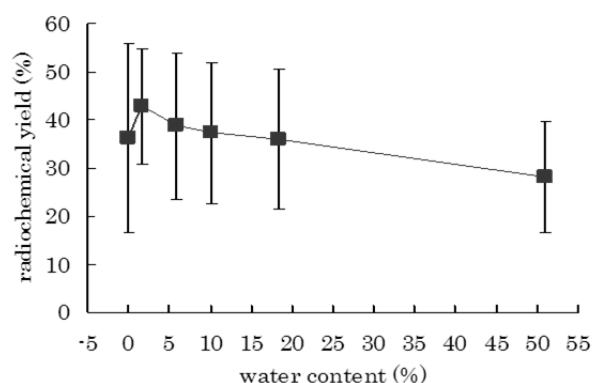


Fig. 7. Radiochemical yield of $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ when water contents were prepared between 0-51% (n = 3).

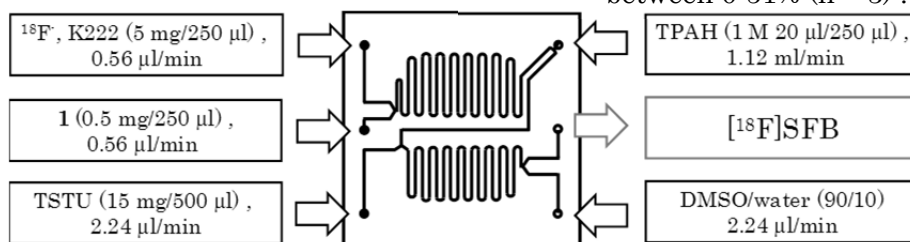


Fig. 8. A microsystem for three-step synthesis of $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$.

4. 結論

本研究で新規に設計・開発したマイクロリアクターを用い、従来法より高収率・短時間で $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の合成に成功した。マイクロリアクターを用いた新たな標識反応に成功し、また、これまで報告のない PET 標識用化合物の多段階合成にも成功したことから、マイクロリアクターの PET 分子プローブ合成装置としての有効性が示され、多くの PET 分子プローブの合成にマイクロリアクタ

一を利用できる可能性が示された。現在は、本システムを用いた自動合成装置の開発を行っている。マイクロリアクターを用いた超高速標識合成法が確立されれば、これまで核種の半減期の問題から合成が困難であった多段階合成が可能となることから、放射合成化学の新しい領域を切り開くことが出来ると考えられる。更に、 $[^{18}\text{F}]\text{SFB}$ の高速合成法の確立により、 ^{18}F -標識ペプチドや蛋白質の合成が容易となり、PET 診断技術がより広い範囲の疾患に利用出来ると考えられる。また、 ^{18}F -標識ペプチドや蛋白質を用いた医薬品の体内動態解析も容易となり、医薬品開発にも大きく貢献することが期待される。

参考論文および引用文献

- 1) Shui-Yu Lu. *et al.*, *Lab. Chip*, **4**, 523–525 (2004).
- 2) Chung-Cheng Lee. *et al.*, *Science*, **310**, 1793-1796 (2005).
- 3) J.M. Gillies. *et al.*, *Appl. Radiat. Isot.*, **64**, 325–332 (2006).
- 4) W. Bannwarth. *et al.*, *Tetrahedron Letters.*, **32**, 1157-1160 (1991).

5 . F-18 Labeling protocols in protic reaction media

Department of Nuclear Medicine, Cyclotron Research Center, Molecular Imaging Chemistry Laboratory (MICL), Chonbuk National University Medical School (韩国 · 全北大学)

Dong Wook Kim

Positron emission tomography (PET) is widely used for the medical imaging of molecular and biological processes, which provides promising opportunities to monitor metabolism and detect diseases in humans. It is necessary to prepare specific molecular imaging probes labeled with positron-emitting radioisotopes for obtaining high-quality PET imaging. For this application, in particular, fluorine-18 has many desirable characteristics.

However, despite of many desirable characteristics of fluorine-18, only a few [¹⁸F]radiolabeling processes are currently available for introducing fluorine-18 to biologically active compounds rapidly, efficiently, conveniently. Therefore, alternative [¹⁸F]radiolabeling reactions method for the mild condition but chemo-selective introduction of [¹⁸F]fluorine into biologically active compounds for PET imaging has much interest in many research group.

In order to develop improved F-18 labeling techniques using polymer/nanomaterials, we plan to use non-soluble polystyrene, or soluble polyethyleneglycol, iron oxide paramagnetic nanoparticles for nanomaterials, and phase transfer catalyst to improve the yield of nucleophilic F-18 labeling reaction and also make easy purification after the reaction. We plan to develop labeling technology for each PET radiopharmaceuticals using customized step by step labeling and purification techniques to develop high yielding (>50% radiochemical yield) labeling technology.

Final goal of these novel fluorine-18 radiolabeling protocols are to obtain F-18 labeled radiopharmaceuticals efficiently for their application as PET imaging agents in nuclear medicine and life science.

6. アルツハイマー病診断用分子イメージングプローブの開発 Molecular imaging probes for diagnosis of Alzheimer's disease

京都大学大学院薬学研究科

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University

小野 正博、Masahiro Ono

1. 研究の背景

近年の急速な高齢化に伴い、アルツハイマー病（AD）をはじめとする認知症患者の増加が大きな社会問題になっている。現在、ADの確定診断は患者剖検脳の病理学的所見に依ることから、重篤な脳障害が生じる前の早期段階でADを診断することは困難となっている。ADの特徴的病理学的変化として、老人斑の沈着と神経原線維変化の出現が知られている¹⁾。前者の主構成成分は β シート構造をとったアミロイド β タンパク質（ $A\beta$ ）であり、後者は過剰リン酸化されたタウタンパク質である。特に $A\beta$ の蓄積はAD発症過程の最も初期段階より始まることから、脳内 $A\beta$ の検出がADの早期診断につながる可能性がある。このような概念の基に、非侵襲的かつ信頼性に優れたADの早期診断を目的として、AD脳内に沈着する老人斑アミロイドを体外から検出する分子イメージングプローブの開発が活発に行われてきた²⁻⁴⁾。本講演では、AD診断を目的とした $A\beta$ イメージングの原理とアミロイドイメージング用分子プローブの開発状況について紹介する。

2. アミロイドイメージングの原理

アミロイドイメージングは、ADの初期脳病変である老人斑の主要な構成成分である $A\beta$ 凝集体に選択的な結合性を有する、PET/SPECT用分子イメージングプローブを利用して、生体の老

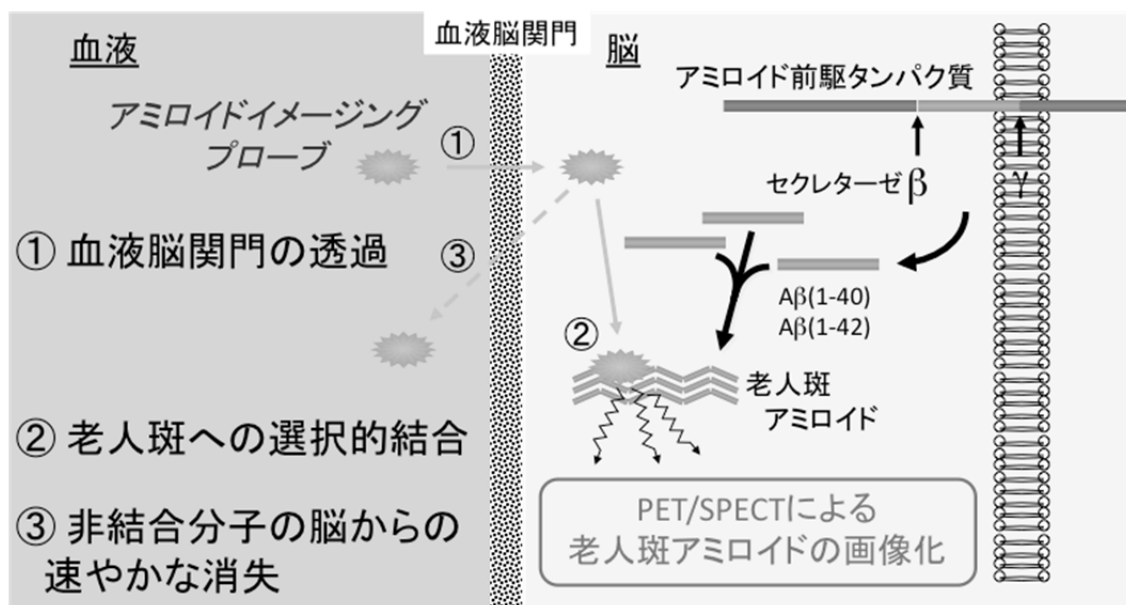


図1. アミロイドイメージングの概念図

人斑アミロイドを体外から画像化する技術である(図1)。老人斑アミロイドは、セクレターゼβおよびγにより切断されたAβ(Aβ(1-40)およびAβ(1-42))が凝集・繊維化し脳内に蓄積する。脳内に蓄積した老人斑アミロイドを体外より画像化するためには、生体内に投与されたプローブが血液脳関門を透過し、脳組織内へ移行することが必須である(図1—①)。アミロイドイメージングプローブの血液脳関門の透過性には、分子サイズ、脂溶性、分子量、電荷など多くのファクターが関与しており、一般的には、電氣的に中性、適度な脂溶性(分配係数log Pが1~3)、分子量が650 Da以下の低分子化合物が適している。次に、脳移行後に老人斑アミロイドへ選択的に結合する必要がある(図1—②)。アミロイドとの結合性に関しては、アミロイドとの結合解離定数(K_d)が20 nM以下を示す化合物であれば、アミロイドイメージングに応用可能であると考えられている。さらに、アミロイドの画像精度を向上させるためには、脳内移行後にアミロイドに選択的に結合するとともに、正常脳部位から血液中に可能な限り速やかに消失する必要がある(図1—③)。これらの条件を同時に満たすプローブが脳内アミロイドイメージングには理想的であり、高性能なプローブの開発研究が活発に行われてきた。

3. アミロイドイメージングプローブの開発状況

既報のAβイメージングプローブの多くはPET/SPECT用プローブであり、その多くが2種類の古典的Aβ蛍光染色試薬であるコンゴレッドおよびチオフラビンTの化学構造を起源としている。コンゴレッドおよびチオフラビンTはいずれもAβに高い結合性を有するため、これら化合物を放射性同位元素で標識し、生体内に投与すれば、脳内のAβを画像化できる、という戦略に基づいている。コンゴレッドは、イオン性化合物で電荷を持つこと、分子サイズが大きいこと、などの理由から血液脳関門の透過には適していない。

一方、チオフラビンTはコンゴレッドに比べ分子量が小さく、生体内投与後の脳移行性が期待されることから、多くの誘導体が開発されてきた。なかでもピッツバーグ大学のMathisらにより開発された[¹¹C]PIBは、現在最も臨床評価の進んだPET用プローブである(図2)⁵⁻⁷⁾。一方

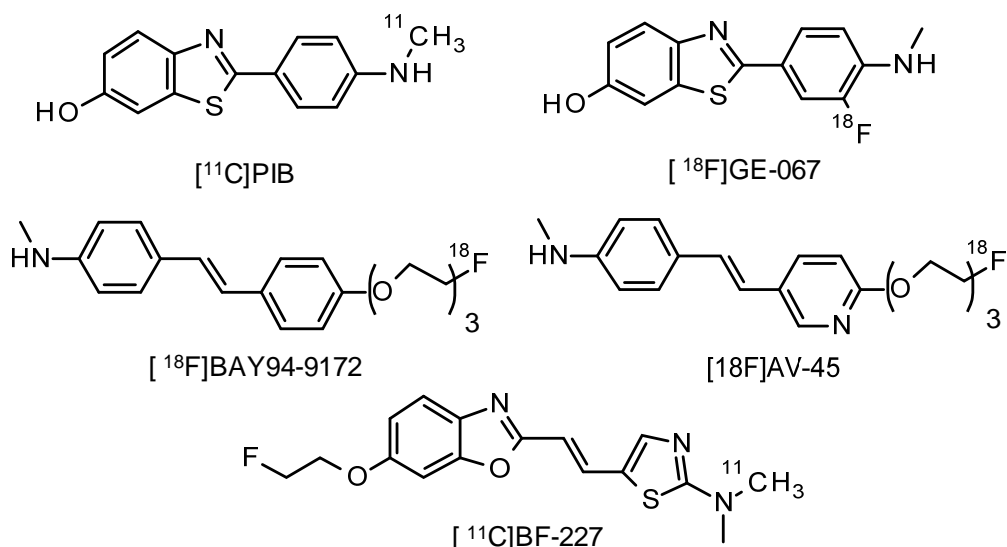


図2. 代表的なアミロイドイメージングプローブの化学構造

で、 ^{11}C PIB は物理的半減期の短い ^{11}C ($t_{1/2} = 20 \text{ min}$) 標識化合物であり、その使用に制限が生じることから、 ^{11}C より長い半減期の ^{18}F ($t_{1/2} = 110 \text{ min}$) を標識核種とする ^{18}F 標識化合物の開発研究が行われてきた。これら ^{18}F プローブのなかでも、 ^{11}C PIB と同様のフェニルベンゾチアゾール誘導体である ^{18}F GE-067 (flutemetamol)⁸⁾、スチルベンを母核とする ^{18}F BAY94-9172 (florbetaben)⁹⁾、スチリルピリジンを母核とする ^{18}F AV-45 (florbetapir)¹⁰⁾ は、今後の実用化が期待されている (図 2)。本邦においても、東北大学で開発された、 ^{11}C BF227 などを用いた臨床研究が行われている¹¹⁾。

私たちがチオフラビン T の類似構造を有するフェニルベンゾフランを基本骨格とする一連の PET 用化合物の開発評価を行ってきた^{12,15)}。その結果、フェニルベンゾフラン誘導体は、置換基の種類やヨウ素の置換位置に関わらず、いずれもチオフラビン T 誘導体と同様に老人斑アミロイドへの高い結合性を示した。さらに、アミロイド結合性と動態に関する最適化研究を継続した結果、ピリジルベンゾフランを母核とする ^{18}F 標識プローブ (^{18}F FPYBF-2) の開発に成功した (図 3)^{14,15)}。 ^{18}F FPYBF-2 は、 $\text{A}\beta$ (1-42)凝集体を用いた結合実験を行ったところ、阻害定数が 2.4

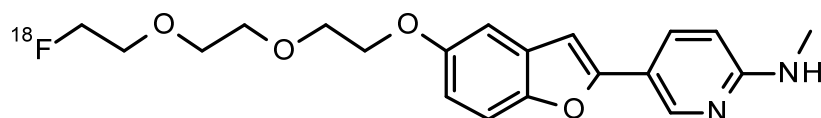


図 3. ^{18}F FPYBF-2 の化学構造

nM と非常に高い結合性を有することが示された。 ^{18}F 標識を行い、正常マウスにおける体内放射能分布を検討したところ、投与早期の高い脳移行性とその後の速やかなクリアランスを示した。さらに、アミロイド前駆タンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウス (Tg2576 マウス) に投与後、脳切片を作製し、切片上の放射能をオートラジオグラフィー法により検出したところ、野生型マウスには確認されない、多くの放射能スポットが観察された。また、この放射能スポットは、老人斑アミロイドの蛍光染色試薬であるチオフラビン S の蛍光染色位置とも一致したことから、 ^{18}F FPYBF-2 は生体内に静脈投与後、老人斑アミロイドへ結合することが明らかとなった (図 4)。これらのインビトロおよびインビボにおける性能は、前述の ^{18}F AV-45 とほぼ同程度であった¹⁶⁾。

さらに私たちは、今後急増が予想される AD 患者の核医学診断に対応するために、臨床診断において最も汎用性の高い放射性核種である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ を標識核種とする SPECT 用アミロイドイメージングプローブの開発を計画した。 ^{18}F FPYBF-2 と同様のピリジルベンゾフランを母核に選択し、血液脳関門の透過性を考慮して、Tc と電気的に中性な錯体を形成することが知られている、ビスアミノエタンチオール (BAT) を $^{99\text{m}}\text{Tc}$ との配位部位として導入した、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識プローブを設計・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を評価した (図 5)。 $\text{A}\beta$ 42 凝集体を用いたインビトロ結合実験において、いずれのベンゾフラン誘導体も $\text{A}\beta$ 凝集体への高い結合性を示した。正常マウスにおける体内放射能分布実験において、いずれの $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 標識ベンゾフラン誘導体も脳移行性を示し、なかでも $^{99\text{m}}\text{Tc}$ BAT-PYBF-2 は最も速やかな放射能消失を示した。Tg2576

マウスを用いた *ex vivo* ARG において、 $[^{99m}\text{Tc}]$ BAT-PYBF2 は脳内アミロイド斑への結合性を有することが確認された。

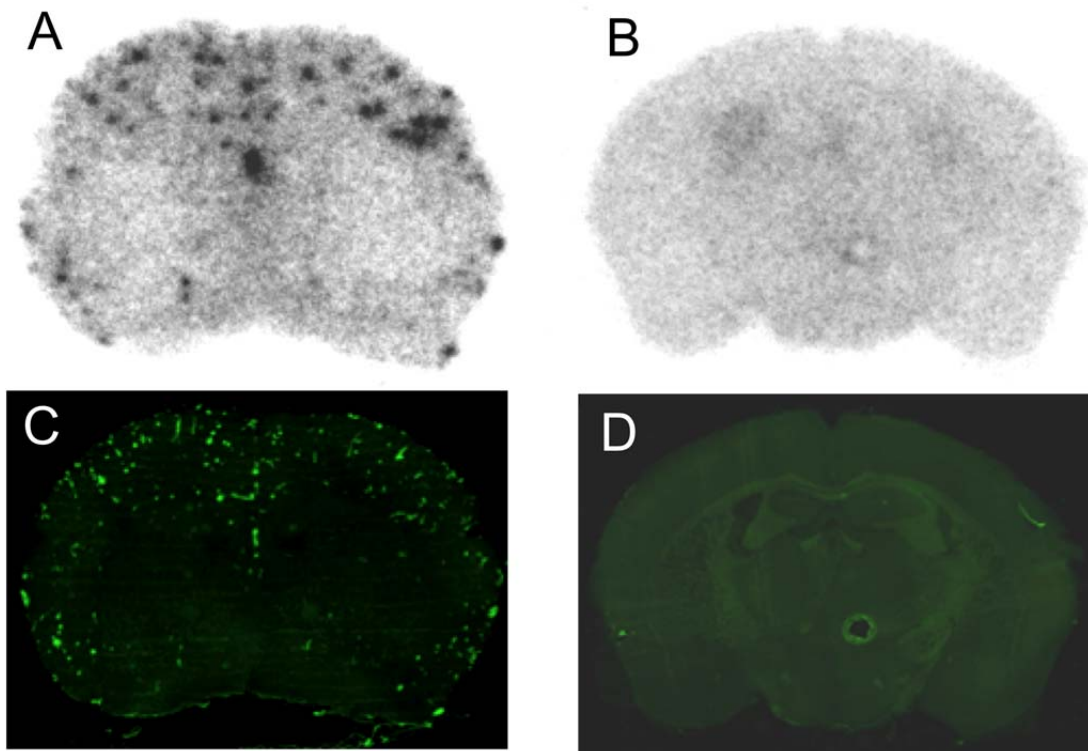


図4. APP トランスジェニック(A)および野生型マウス(B)における $[^{18}\text{F}]$ FPYBF-2 静脈内投与後のオートラジオグラフィーと同一切片におけるチオフラビン S による蛍光染色 (C および D)

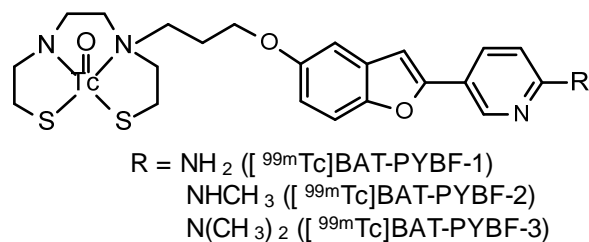


図5. ^{99m}Tc 標識ピリジルベンゾフラン誘導体の化学構造

4. 将来の展望

アミロイドイメージングは、AD の早期診断への有用性だけでなく、保健医療分野へ大きく貢献すると考えられる。現在、アミロイドワクチンをはじめとする老人斑アミロイドを標的分子にしたアルツハイマー病治療薬の開発研究が活発に行われているが、生体のアミロイド蓄積量を定量的に評価可能なアミロイドイメージングは、これら治療薬の開発および薬剤の治療効果判定に多いに貢献すると考えられる。

参考文献

- 1) D. J. Selkoe, *Physiol Rev* **2001**, 81(2), 741-766.
- 2) D. J. Selkoe, *Nat Biotechnol* **2000**, 18(8), 823-824.
- 3) A. Nordberg, *Lancet Neurol* **2004**, 3(9), 519-527.
- 4) M. Ono, *Chem Pharm Bull* **2009**, 57(10), 1029-1039.
- 5) C. A. Mathis et al., *J Med Chem* **2003**, 46(13), 2740-2754.
- 6) W. E. Klunk et al., *Ann Neurol* **2004**, 55(3), 306-319.
- 7) N. M. Scheinin et al., *Neurology* **2009**, 73(15), 1186-1192.
- 8) M. Koole et al., *J Nucl Med* **2009**, 50(5), 818-822.
- 9) C. C. Rowe et al., *Lancet Neurol* **2008**, 7(2), 129-135.
- 10) S. R. Choi et al., *J Nucl Med* **2009**, 50(11), 1887-1894.
- 11) Y. Kudo et al., *J Nucl Med* **2007**, 48(4), 553-561.
- 12) M. Ono et al., *J Med Chem* **2006**, 49(9), 2725-2730.
- 13) Y. Cheng et al., *ACS Med Chem Lett* **2010**, *in press*.
- 14) M. Ono et al., *J Med Chem* **2011**, 54, 2971-2979.
- 15) Y. Cheng et al., *Bioorg Med Chem Lett* **2010**, 20, 6141-6144.
- 16) H. F. Kung et al., *J Med Chem* **2010**, 53(3), 933-941.

7. 神経病理像を標的としたアルツハイマー病画像診断薬の開発研究

Development of diagnostic imaging agents targeting neuropathology of Alzheimer's disease

東北大学大学院医学系研究科

Graduate School of Medicine, Tohoku University

古本 祥三、Shozo Furumoto

1. はじめに

アルツハイマー病 (Alzheimer's disease; AD) は、病理学的特徴として老人斑と神経原線維変化を伴う進行性の神経変性疾患であり、老年性認知症において最も頻度の高い原因疾患となっている。両病理所見は、アロイス・アルツハイマー博士が 100 年以上前に見いだして以来 AD 診断基準の必須要件となってきただけでなく、その形成は AD 発症機序の中軸となる病態過程であることが明らかにされてきた。通常、AD の診断は臨床症状の評価や神経心理学的検査を基本に行われるが、これらの診断法では、神経病理学的観点からは相当程度に病期が進んだ状態を捉えているに過ぎないため、診断精度には限界がある。一方、AD の確定診断は剖検脳組織を顕微鏡下で観察し、老人斑と神経原線維変化の病理所見を確認することで行われる。従って、その脳内病変を PET で非侵襲的に評価できるようになれば、AD の病態機序の解明や治療法開発の手段として役立つだけでなく、現在の診断法よりも格段に優れた精度で早期の AD を診断できるようになると期待されている。本シンポジウムでは、このような背景を踏まえ我々が取り組んできた AD 神経病理像の画像化を目的とした PET 用画像診断薬の開発研究について講演する。

2. アミロイド画像化プローブ

病態生理学的に、AD における老人斑の沈着は臨床的に認知機能の障害が観察されはじめる 10 年以上前から出現する所見であり、疾患特異性も高いことから、その生体画像化を目指した PET 用薬剤の開発が進められた。老人斑は、分子の実体としてアミロイド β タンパク質 ($A\beta$) が β シート構造を特徴とする凝集体によって構成されている。そのアミロイド凝集体に結合する PET 用の標識化合物として、スチルベン誘導体の $[^{11}\text{C}]\text{SB-13}^1)$ (Fig. 1B) やチオフラビン T 誘導体の $[^{11}\text{C}]\text{PIB}^2)$ (Fig. 1A) などが米国の大学グループによって開発され、特に $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ は世界各国で幅広く利用され、臨床レベルでアミロイド画像化の有用性が示されている $^3)$ 。

一方国内では、BF 研究所が化学構造的にスチルベンとチオフラビン T の中間的な BF-168 を開発した $^4)$ 。さらにその誘導体として BF-227 を開発し (Fig. 1C)、東北大学において炭素 11 標識体の開発と評価研究が展開された $^5)$ 。 $[^{11}\text{C}]\text{BF-227}$ は、 $A\beta$ 凝集体に対して高い結合親和性を示し、AD 脳標本を使用した蛍光染色実験およびオートラジオグラフィーから、老人斑に対する選択的結合性が認められた。また、PET 用脳画像化プローブとして十分な脳移行性を示すと共に、脳外排泄も速やかで、先行した PIB や SB-13 と比較しても遜色ない性能を示した。

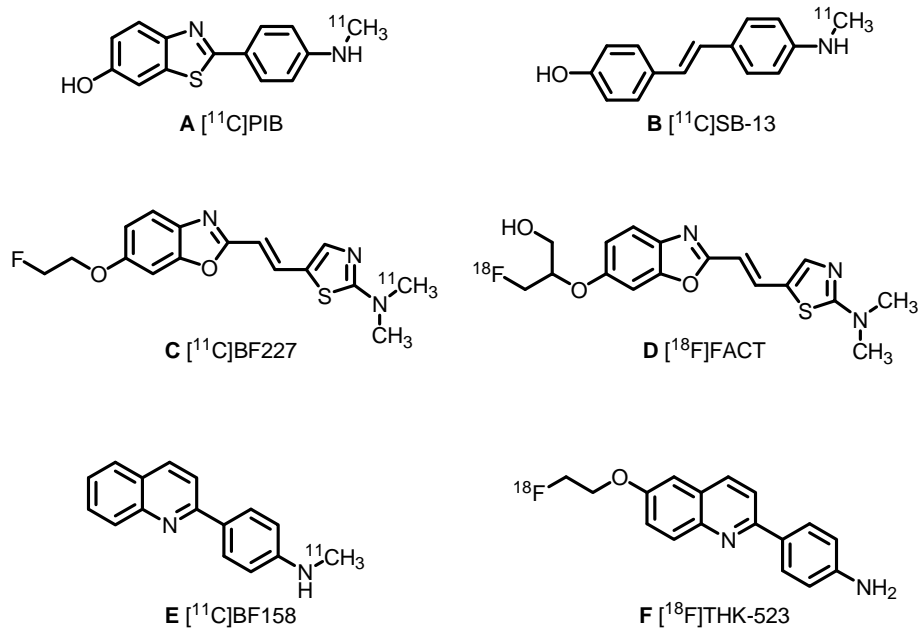


Fig. 1. Chemical structures of amyloid and tau probes.

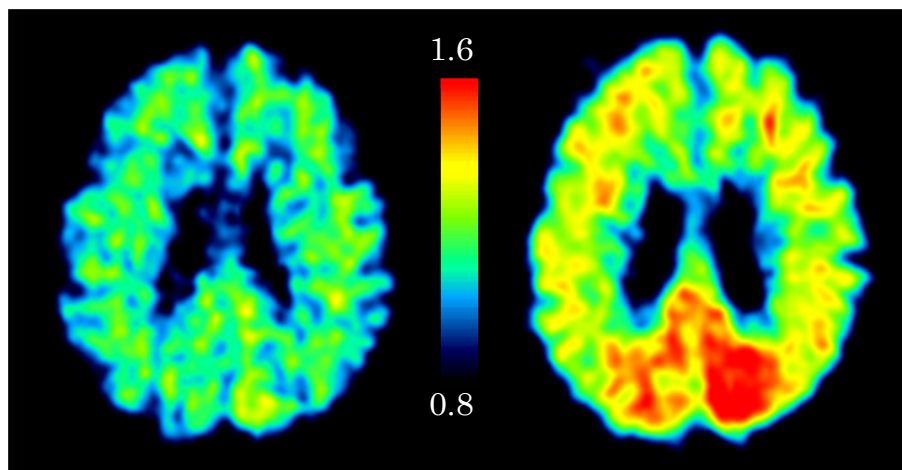


Fig. 2. SUVR images by PET with [11C]BF-227. Left: aged normal. Right: AD.

そこで、健常者、軽度認知機能障害(MCI)患者、AD患者を対象とした[11C]BF-227の臨床PET検査を実施したところ、AD患者では大脳皮質領域に高い放射能集積性を示し、その集積率(SUVR: SUVの対小脳比)は健常者と比較して約1.2倍となり、画像的には病変部のコントラストは若干低いが、統計学的に有意な差が認められた(Fig. 2)。感度・特異度に優れていることからAD診断上の有用性は高い。そしてAD患者のほぼ全例、そしてMCI患者の約60%において、大脳皮質領域で高い集積性を示す結果が得られている。

このように臨床応用可能なアミロイド画像化プローブの開発は着実な進展を見せたが、PIBやBF-227のように炭素11標識体の場合、その半減期の短さからPET検査の実施効率は低く、またそれらを利用できるPET施設の数も非常に限定されてしまう。そこで、より半減期の長いフッ

素 18 で標識したプローブの開発研究が広く展開されることとなった。その結果、スチルベン系統の化合物として Florbetaben (AV-1) や Flobetapir (AV-45)、チオフラビン系統として Flutemetamol (^{18}F -PIB) や AZD4694 が開発され、世界各国で臨床研究や治験が進行している。一方、我々も BF-227 をベースとしたフッ素 18 標識誘導体の合成と評価を進め、臨床候補化合物として FACT (Fig. 1D) を開発するに至った。

FACT の構造的特徴は、フッ素 18 導入部位を 3-フロロ-1-プロパノール構造とし、その 2 位で母格にエーテル結合させた点にある。これにより、フッ素 18 は一般的な求核置換反応で容易に導入することができ、また、水酸基を持たせたことで化合物の脂溶性を下げることに成功した。 ^{18}F FACT の臨床 PET イメージングでは、 ^{11}C BF-227 と同様に若干白質への滞留性が観察されたものの、脳内からの消失性に優れ、投与後 30 分で健常者と比べて灰白質の放射能集積率に有意な差が現われ、アミロイド画像化プローブとしての有用性が示された。

この FACT で用いられた 3-フロロ-1-プロパノール構造は、他のアミロイド画像化プローブのフッ素 18 標識誘導体化にも有用であると考えられる。そこでチオフラビン T 系統の骨格を持つ誘導体 ^{18}F THK-930 を合成し評価したところ、優れた結合親和性と脳内動態性を示し、AD モデルマウスの小動物 PET でもアミロイド沈着領域は明瞭に画像化された。この標識方法はフッ素 18 標識アミロイド画像化プローブの標識方法として汎用性があると期待される。

3. タウ画像化プローブ

神経原線維変化に関しては、その分子の実体であるリン酸化タウ凝集体に選択的に結合する PET 用プローブは、アミロイド画像化プローブと比べて開発は遅れた。しかし、神経原線維変化は老人斑と比較して AD の病態進行度とより相関性の高いことが知られており、アミロイド画像化技術の成功をうけて、同様にタウ画像化技術の開発も強く望まれるようになってきた。

A β とタウは、AD 脳組織中で病的に凝集沈着する場合、ともに立体構造的に β シートの繰り返し構造を形成するため、一般的にタウ凝集体に結合性を示す化合物は A β 凝集体に対しても同等に結合性を示す場合が多い (低い結合選択性)。しかし、我々は独自に構築したライブラリー化合物を用いて AD 脳病理標本への結合性評価を行い、2-アリアルキノリン誘導体がタウ病変に高い結合選択性を示すことを見出した。

タウ画像化プローブのリード化合物としては、炭素 11 標識体として ^{11}C BF-158 (Fig. 1E) を開発した⁶⁾。BF-158 は、化合物の蛍光性を利用した染色では、老人斑よりも神経原線維変化により高い結合選択性を示し、病変を明瞭に描出できた。標識体を用いた AD 脳組織標本のオートラジオグラフィーでも神経原線維変化が豊富に存在する部位に選択的結合性が確認された。そこで、アミロイド画像化プローブの場合と同じように、2-アリアルキノリンのフッ素 18 標識誘導体 ^{18}F THK-523 (Fig. 1F) を開発評価したところ、本プローブも蛍光染色やオートラジオグラフィーで神経原線維変化に選択的に結合性を示すことが明らかになった⁷⁾。そしてタウ病変を形成するトランスジェニックマウスの小動物 PET 撮像を行ったところ、ワイルドタイプと比較して有意に高い脳内滞留性が認められた (Fig. 3)。臨床レベルでタウ画像化の有用性を明らかにすべく、現在、さらに改良を加えたタウ画像化プローブの開発研究を鋭意進めている。

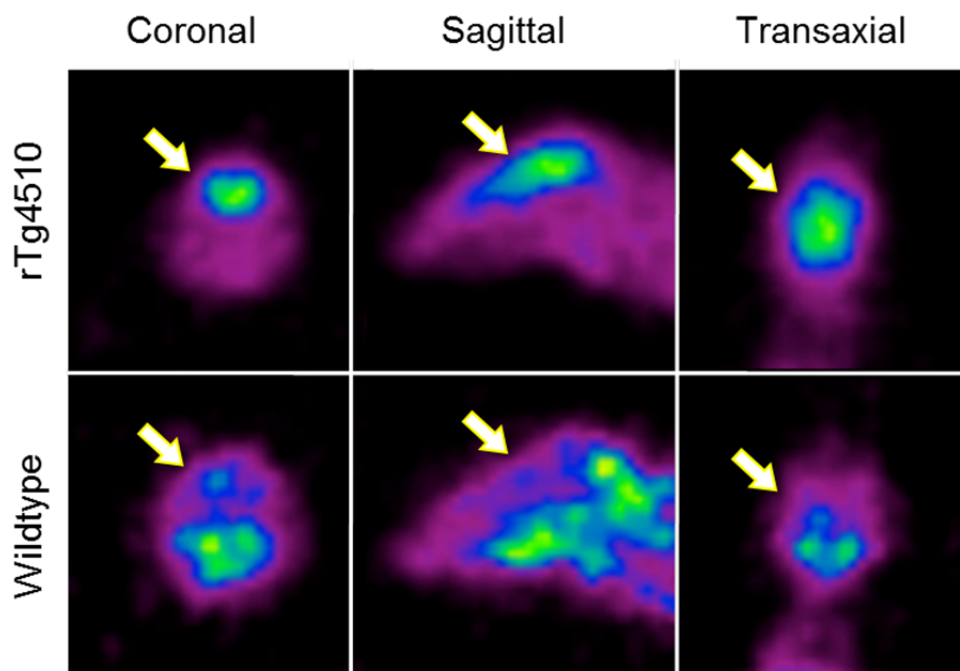


Fig. 3. PET images of the brains of tau transgenic mouse (rTg4510) and wild type one. PET scans were performed 30 min after administration of $[^{18}\text{F}]\text{THK-523}$.

4. おわりに

現在、AD に対する根本治療薬の開発とともに、身体への負担が少なく精度に優れた早期診断法の確立が喫緊の課題となっているが、早期診断法の解決策の一つとしては、PET による AD 病理像の可視化に高い期待が寄せられている。AD 病理像の一つである老人斑に対しては、複数のフッ素 18 標識アミロイド画像化薬剤が臨床試験されており、近い将来、医薬品として上市される見込みが高い。一方、もう一つの病理所見である神経原線維変化については、まだ臨床的に有用性を認められたタウ画像化薬剤はないため、今後その開発研究をさらに促進し、発展させなくてはならない。将来、タウ画像化薬剤も実現し、アミロイド画像化薬剤とともに AD の画期的な早期診断法へと結実して、AD 医療の向上に大きく役立つことを期待する。

引用文献

- 1) Ono M, et al. Nucl. Med. Biol. (2003) 30: 565-571.
- 2) Mathis CA, et al. J. Med. Chem. (2003) 46: 2740-2754.
- 3) Villemagne VL, et al. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging (2012) 39: 209-219.
- 4) Okamura N, et al. J Neurosci. (2004) 24: 2535-2541.
- 5) Kudo Y et al. J. Nucl. Med. (2007), 48: 553-561.
- 6) Okamura N, et al. J Neurosci. (2005) 25: 10857-10862.
- 7) MT Fodero-Tavoletti, et al. Brain (2011) 134: 1089-1100.

8. 放射性臭素標識プローブの開発：診断から治療へ Development of radiobromine labeled probes: from diagnosis to therapy

福井大学高エネルギー医学研究センター
Biomedical Imaging Research Center, University of Fukui

清野 泰、Yasushi Kiyono

1. はじめに

臭素 (Br) の放射性同位体として Br-75、Br-76、Br-77、Br-80、Br-80m、Br-82 の 6 種類が一般的に用いられる同位体である。イメージングの観点からは、Br-76 がポジトロン断層撮像装置 (PET) に適した性質を有している。Br-76 の半減期は 16.2 時間であり、崩壊形式は陽電子崩壊と軌道電子捕獲である。内照射治療に適した同位体としては、Auger 電子を放出する Br-77 がある。Br-77 の半減期は 57 時間で、崩壊形式の大部分が軌道電子捕獲である。この 2 種類の同位体を利用することにより、診断と治療に利用できる同じ化学構造のプローブを開発可能であり、放射性臭素は核医学的に重要な放射性同位体だと考えられる。

本シンポジウムでは、我々が現在取り組んでいる、医療用サイクロトロンを用いた放射性臭素の製造、細胞増殖能イメージングプローブの開発、増殖能の高い腫瘍細胞を標的とした内照射治療への応用について紹介する。

2. 医療用サイクロトロンを用いた放射性臭素の製造

高純度セレン (Se) にプロトンを照射し、放射性臭素を製造することが可能である。Br-77 を例に述べると、タングステンディスク上にセレン化銅 ($^{63}\text{Cu}_2^{77}\text{Se}$) を溶着し、この固体ターゲットにプロトンを照射し、 $^{77}\text{Se} (p,n) ^{77}\text{Br}$ 反応により Br-77 の製造を行っている。固体ターゲットからの Br-77 の抽出は、熱拡散法により行い、最終的にはアンモニア水あるいは純水に溶解した状態で Br-77 を回収可能である (図 1)。回収した Br-77 は、ゲルマニウム半導体検出器により、エネルギースペクトルを解析し、Br-77 であることを確認した。Br-76 についても同様の $^{76}\text{Se} (p,n) ^{76}\text{Br}$ 反応を利用して製造が可能である。

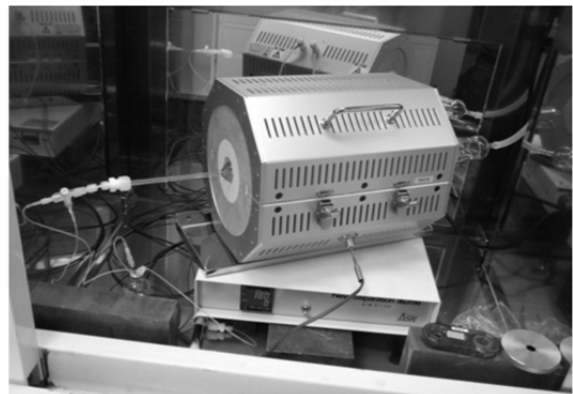


図 1. 放射性臭素抽出装置概観

3. 増殖能イメージングを目的とする放射性臭素標識チミジン誘導体の開発

腫瘍細胞の増殖能評価が分子イメージング手法を用いて非侵襲的に可能となれば、腫瘍の悪性度診断や治療効果判定等の質的診断に有効であると期待されている。このような目的で 3'-deoxy-3'-

[^{18}F]fluoro-thymidine (^{18}F -FLT) が開発され、様々な腫瘍の増殖能評価で大きな成果をあげてきた。しかし、 ^{18}F -FLT は DNA に組み込まれないために、抗癌剤や放射線治療時の DNA 合成と thymidine kinase 1 (TK1) 活性の乖離が見られるような状況では、その増殖能評価が困難な場合がある。そこで、母体化合物として DNA に組み込まれることが報告されている 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を選択し、BrdU の生体内安定性を高めるためにフラノース環の 4'-oxo を 4'-sulfur に置換した放射性臭素標識 5-bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine (BTdU) を開発した (図 2)。

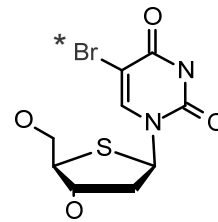


図 2. 放射性臭素標識 5-bromo-4'-thio-2'-deoxyuridine の構造 (*Br は放射性臭素を表す)

放射性臭素標識 BTdU の増殖能イメージングプローブとしての評価は、Br-76 の代わりに、半減期が長く比較的取扱の容易な Br-77 を用いて検討を行った。 ^{77}Br -BTdU の標識合成は、スズ前駆体を合成し、クロラミン T 法により行った。HPLC による精製を行い、放射化学的純度 $40.1 \pm 4.9\%$ 、放射化学的収率 99% 以上で ^{77}Br -BTdU を得た。まず、 ^{77}Br -BTdU が TK の基質になるかを確認するために、L-M 細胞、TK 欠損 L-M (L-M TK(-)) 細胞を用いて、 ^{77}Br -BTdU の細胞取り込み実験を行った。その結果、L-M 細胞では ^{77}Br -BTdU の集積が認められたが、L-M TK(-) 細胞ではほとんど集積が認められず、 ^{77}Br -BTdU が TK の基質であることが示唆された。さらに、L-M 細胞において放射能の 90% 以上が DNA 画分に分布していることが認められた。続いて増殖速度の異なる LL/2 細胞と L-M 細胞の集積を比較すると、増殖速度の速い LL/2 細胞への集積が有意に高かった。次に正常マウスを用いた体内分布実験では、 ^{77}Br -BTdU の集積は、細胞増殖の活発な脾臓、小腸などで高く、肝臓、筋肉などの増殖の活発でない臓器では集積量が少ないことが確認できた。L-M 細胞を移植したモデルマウスにおける検討では、イメージングの指標となる腫瘍・筋肉比および腫瘍・血液比は投与 24 時間後でそれぞれ 12 と 5 となり、イメージングを行うには十分な値を示した。

以上の検討より、放射性臭素標識 BTdU は、腫瘍の増殖能イメージング剤として有望なプローブであることが示唆された。

4. 内照射治療薬剤としての ^{77}Br -BTdU の評価

内照射治療とは、治療用放射性薬剤を体内に投与し、腫瘍に送達することにより、その放射性同位体から放出される放射線によって腫瘍細胞を破壊する治療法である。放射性同位体としては主に β^- 線を放出する核種が用いられている。 β^- 線を放出する放射性薬剤は、腫瘍細胞に蓄積した場合に非常に高い殺細胞効果がある。しかし、正常細胞付近に集積した場合は、 β^- 線の飛程が長いことため周辺の正常細胞にも影響を与えてしまうという問題点がある。そこで飛程の短い Auger 電子放出核種を用いることで、正常細胞への影響をできるだけ少なくした内照射用治療薬剤の開発が可能でないかと考えた。Auger 電子を放出する放射性同位体は様々あるが、Br-77 は、

半減期が約 57 時間と短いことから、副作用が発現した場合には投与を中止することにより、そのコントロールが可能であることなど内照射治療に適した性質を有していると考えられる。さらに極僅かであるが β^+ 線も放出するので、治療に必要な投与量を用いた場合には、PET による大まかな体内分布確認の可能性も有している。

そこで、増殖能イメージングプローブとして開発した放射性臭素標識 BTdU が DNA に組み込まれることから、 ^{77}Br -BTdU が増殖能の高い腫瘍の内照射治療薬剤として有効でないかと考え、その評価を行った。

^{77}Br -BTdU の内照射効果の有無を、様々な放射エネルギーを細胞に投与することにより検討した。また、その内照射効果が放射線特異的かどうかを検討するために非放射性薬剤 BTdU を用い、さらに DNA への集積が必要であるかどうかを検討するために $^{77}\text{Br}^-$ を用いて細胞の生死判定実験を行った。 ^{77}Br -BTdU は放射エネルギー依存的に細胞増殖を抑制する効果があり、1850 Bq/well 以上の放射能で細胞数の有意な減少が認められた。DNA に組み込まれない $^{77}\text{Br}^-$ では、用量依存的な効果は観察されず、 ^{77}Br -BTdU は DNA に組み込まれることにより効果が出ていることを確認できた。非放射性 BTdU 添加でも、細胞増殖抑制は観察されたが、 ^{77}Br -BTdU の方が約 1000 倍低い物質質量から効果が出ていることが確認できた。以上の検討により、 ^{77}Br -BTdU の細胞増殖抑制効果は、DNA に取り込まれた ^{77}Br -BTdU から放出される Auger 電子による内照射効果が主作用であることが示唆された。さらに詳細なメカニズムを検討した結果、 ^{77}Br -BTdU はアポトーシスを誘発していることが確認できた。次に、ヌードマウスの右肩に LL/2 細胞を移植し 10 日間飼育した後に内照射治療実験を行った。治療群には ^{77}Br -BTdU (370 kBq と 3700 kBq) を尾静脈より 1 回投与し、腫瘍体積の変化を観察した。その結果、3700 kBq 投与群では 4 日後にコントロールの 61.2% まで、370 kBq 投与群では 3 日後にコントロール群の 64.1% まで、増殖を抑制していることが示された。また、3 日後においては、コントロール群との比較で、3700 kBq 投与群、370 kBq 投与群において、有意差が認められた。

これらの結果より、 ^{77}Br -BTdU が腫瘍 DNA を標的とする内照射治療用薬剤としての可能性を十分有していることが示された。

5. まとめ

放射性臭素は、固体ターゲットの照射が可能な医療用サイクロトロンで製造可能な放射性同位体であり、プローブ設計をきちんと行うことにより、診断と治療の両方に利用できる魅力的な同位体である。

9. 生体高分子を用いた PET プローブ創製 Preparation of PET Probes utilizing biological macromolecules

理化学研究所分子イメージング科学研究センター
RIKEN Center for Molecular Imaging Science

長谷川 功紀、Koki Hasegawa

1. はじめに

我々の体内の恒常性維持には多くの受容体やトランスポーターが関与している。疾患に罹患すると受容体やトランスポーターの発現が増減し、恒常性維持が困難になる。そこで、その変化を微小な段階から検出することができれば、疾患を早期に診断することができ、また変化を指標として病態の把握も可能となる。これら目的のために多くの PET プローブの研究開発が行われている。そこで最も容易に考えられる PET プローブ候補は、受容体やトランスポーターのリガンドや、それらを認識する抗体である (図 1)。よって受容体のリガンドとなるペプチドや抗体の標識法が盛んに研究されている。我々も現在までにペプチド、抗体を標識法ならびに、疾患モデル動物による PET イメージング研究を行ってきた。今回はその一例を紹介する。

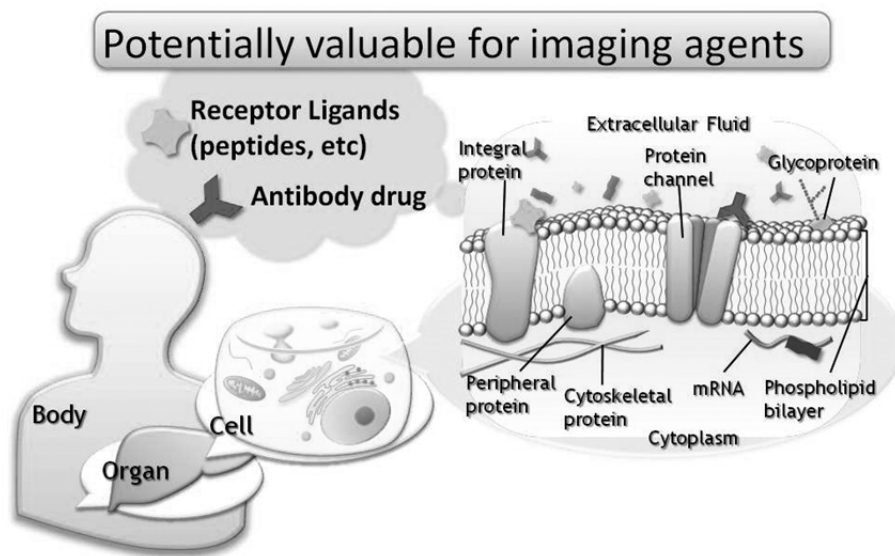


図 1. 生体高分子の PET プローブとしての可能性

2. キレーターを介した生体高分子の標識についての概要

我々の用いている標識法は、生体高分子に DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid) などのキレーターを導入し、そこにポジトロン放出金属核種を標識する方法を採用している。この方法の利点は①標識前の DOTA 導入時点で活性を確認できること、②生体高

分子にキレーターを導入した後に、そこに半減期の異なる金属核種を標識できること、③DOTA や DFO (deferrioxamine) などのキレーターはすでにヒト投与薬剤で用いられており、臨床試験を考慮する際にキレーターの安全性がすでに証明されていることなどが挙げられる。

生体高分子を PET プローブ化する際に重要となるのが標識後の活性である。ペプチドでは活性部位、抗体では抗原認識部位が標識されてしまうと、本来の機能である受容体への結合が阻害されてしまう。そこで化学合成が可能なペプチドであれば、合成の段階で保護基等を駆使し、部位選択的に DOTA などのキレーターを導入する。抗体は分子量が大きく化学合成は不可能であるが、逆に反応部位が多いのでキレーターを非選択的に導入しても活性部位が修飾される可能性は低い。よって1分子あたりのキレーター導入数を制御してやることで活性部位への修飾を回避し、活性の低下を抑えることが可能となる。

3. 標識ペプチドの合成

我々が行ってきたペプチドの PET プローブ化研究を紹介する。現在、短鎖のペプチドであれば固相合成法を用いて比較的簡便に化学合成できる。固相法と DOTA(*t*Bu)₃ を組み合わせて、固相上で部位選択的に DOTA を導入する方法が報告されている¹⁾。我々もこの方法を用いてペプチドの合成を行なった。結果として、この方法では DOTA(*t*Bu)₃ に由来する副生成物を伴うことが判明した。そこで我々は、副生成物を回避するために、保護基の無い DOTA を活性化し、固相上のペプチドに反応させて、DOTA-ペプチドを合成する方法を検討した (図 2)。

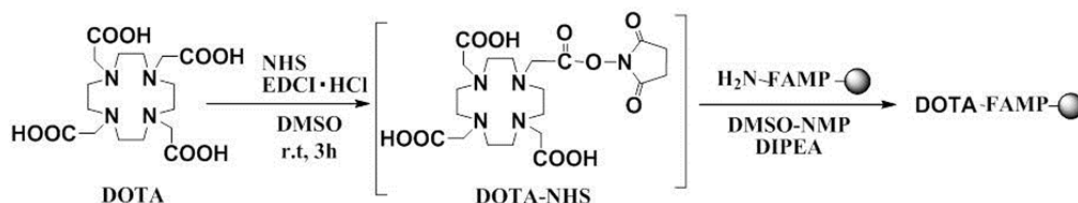


図 2. 無保護 DOTA を用いた固相上でのペプチド修飾反応

固相法に対し液相法では、保護基のない DOTA を水溶液中で活性化させて、ペプチドやタンパク質に導入する方法が報告されている²⁾。しかしこの方法では溶媒に水を用いなければならない制限がある。しかし固相合成法では水を溶媒に用いることが困難なため、有機溶媒を用いる必要がある。そこで我々は DOTA を活性化できる有機溶媒を検討し、その結果、DOTA は DMSO にわずかに溶解、活性化反応が進行することを見出した。この条件をペプチド固相合成法に応用し、モデルペプチドとして 24 残基のペプチド Fukuoka-university apoA-I mimetic peptide (FAMP) を合成した。その結果、DOTA(*t*Bu)₃ を用いた場合と比較して、ほぼ同じ程度の収量で DOTA-FAMP を得ることに成功した。

次に合成したペプチドを用いて標識反応を行った。ペプチドの生物学的半減期は通常短いことから、標識には半減期 68 分の ⁶⁸Ga を用いた。⁶⁸Ga は常法に従い、⁶⁸Ge-⁶⁸Ga ジェネレータか

ら 0.1N 塩酸溶液を用いて溶出し、陰イオン交換カラムを用いて精製した³⁾。DOTA との錯形成反応にはマイクロウェーブ合成装置で 100 度、10 分の加熱を行った⁴⁾。合成後、固相抽出カラムにより遊離の ⁶⁸Ga を除去し、70MBq/nmol の比放射能で ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP を得ることに成功した。

次に PET 撮像を行った。apoA-I は HDL の主要構成成分であり、コレステロール排出を担う ABCA1 トランスポーターに作用する。よって apoA-I 様ペプチドである FAMP はコレステロールが多く沈着している動脈硬化巣への集積性が期待される。そこで動脈硬化モデル動物として、Watanabe heritable hyperlipidemic myocardial infarction-prone rabbit (WHHL-MI) を用いた。正確な血管集積を評価するために、プローブの血液からのクリアランスをまず検討した。プローブ投与後の血液を経時的にサンプリングし、血液からのクリアランスを検討した結果、5 時間で対照となる日本白色ウサギの血中濃度と同程度までクリアランスされることが判った。そこで ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP 投与し 5 時間後に下腹部を撮像した。その結果、健全な日本白色ウサギに比べ WHHL-MI では血管に高いプローブ集積を認めた (図 3)。

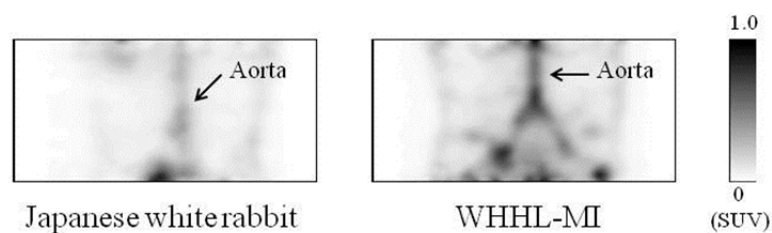


図 3. ⁶⁸Ga-DOTA-FAMP を用いた動脈硬化巣のイメージング

以上の結果から、⁶⁸Ga-DOTA-FAMP は動脈硬化巣の検出に有用である可能性を示すことができた。現在、このプローブは臨床試験に向けて実験を進めている。

4. 標識抗体の合成

次に抗体の PET プローブ化研究を紹介する。キレーター修飾による抗体活性の低下を抑制するためには、キレーター修飾反応条件を制御して、抗体 1 分子へのキレーター修飾個数を制限する必要がある。しかし逆にキレーター数が少なすぎると、比放射能が低下し PET 画像の質が低下する。そこで活性の低下を抑えつつ、高い比放射能を実現する修飾条件を見出す必要がある。

用いた抗体は、乳がんを高発現する HER2 を標的とした抗体医薬である Trastuzumab を選んだ。導入するキレーターとしては DOTA を選び、修飾試薬としてはそのコハク酸イミドエステル体である DOTA-NHS を用いた。反応条件を検討した結果、抗体に対してモル比 100 当量の DOTA-NHS をリン酸バッファー中で反応させることにより、DOTA を抗体 1 分子中 7.8 個導入でき、またその際の親和性は Kd 値 7.8 nM と高く維持できることが判った。

抗体の生物学的半減期が長いので、標識核種としては半減期 12.7 時間の ⁶⁴Cu を選んだ。⁶⁴Cu はサイクロトロンで ⁶⁴Ni にプロトンを照射し製造した⁵⁾。陰イオン交換樹脂で精製し、錯形成反

応に供した。錯形成反応は酢酸バッファー中で、40 度、1 時間反応を行った。反応後、遊離の ^{64}Cu は遠心ろ過フィルターで除去した。その結果、比放射能 $4.0 \text{ MBq}/\mu\text{g}$ で標識を行うことができた。

次に PET 撮像を行った。HER2 を高発現している腫瘍 A431 細胞および対照となる HER2 を発現していない C6 細胞を播種したマウスに ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab を投与し、48 時間後に撮像を行った。その結果、A431 腫瘍に高い集積を確認できた。

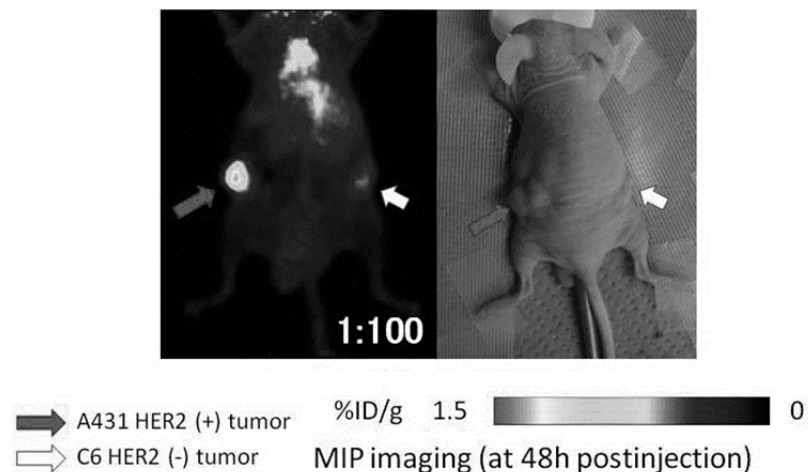


図 4. ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab を用いた HER2 イメージング

以上の結果から、 ^{64}Cu -DOTA-Trastuzumab を用いた PET 撮像で腫瘍細胞の HER2 発現を非侵襲的に評価できることが判った。現在、共同研究先の病院でこのプローブを用いて臨床試験を行っている。

まとめ

今回、ペプチドと抗体という分子量の大きく異なる生体高分子の標識法について紹介を行った。しかしこれはほんの一例であり、まだ標識技術に関して世界では新しいキレーターの開発、核種の製造、部位特異的標識法などが研究されている。今後それらの技術も取り入れ、さらに多くの生体高分子を用いたプローブ開発が行われることを期待している。

参考文献

- 1) Heppeler A, Froidevaux S, Mäcke HR, Jermann E, Béhé M, Powell P, Hennig M, *Chem. Eur. J.* 1999, **5**, pp1974–1981.
- 2) Lewis MR, Raubitschek A, Shively JE, *Bioconjugate Chem.*, 1994, **5** (6), pp 565–576.
- 3) Zhernosekov KP, Filosofov DV, Baum RP, Aschoff P, Bihl H, Razbash AA, Jahn M, Jennewein M, Rösch F, *J Nucl Med.* 2007, **48**, pp1741–1748.
- 4) Velikyan I, Beyer GJ, Långström B, *Bioconjug Chem.*, 2004, **15**(3), pp554-60.
- 5) McCarthy DW, Shefer RE, Klinkowstein RE, Bass LA, Margeneau WH, Cutler CS, Anderson CJ, Welch MJ, *Nucl. Med. Biol.*, 1997,**24**, pp35-43.

10. 金属核種の遠隔製造

Remote production of metallic radioisotopes

放射線医学総合研究所 分子イメージング研究センター

Molecular Imaging Center, National Institute of Radiological Sciences

永津 弘太郎、Kotaro Nagatsu

1. はじめに

核医学では、放射性金属核種を利用したイメージング、並びに治療に向けた研究等が盛んに行われている。利用の多い金属核種として、SPECTにおける Tc-99m (IT、6 h、140 keV)、In-111 (EC、2.8 days、171 keV)、PETでは Ga-68 (β^+ 90%、68 min)、Cu-64 (β^+ 19%、13 h)、Y-86 (β^+ 34%、15 h)、Zr-89 (β^+ 22%、78 h) 等が例として挙げられる。

これらのうち、加速器を利用する PET 用核種の製造では、固体ターゲットへのビーム照射が一般的であるが、その照射と照射後の遠隔回収には課題が存在する。まず照射については、ターゲット物質をビーム軌道上へ自立、即ち固形化させる必要がある。天然同位体ターゲットの場合、市販の金属板等、一定の厚みをもつ固形物が利用できるために大きな問題とはならない。しかし、一般に粉末で供される濃縮同位体を利用する場合には、支持体への電気めっき、熔融や加熱圧縮、あるいは焼結等、何らかの固形化を経て、初めてターゲット物質として扱うことが可能になる。この調製には相当の時間と手間を要するため、当該作業の簡略化は製造負荷の低減に有効と考える。

次いで遠隔化、即ち照射した固体ターゲットの扱いに関しては、ロボティックな機器——“つかむ・はこぶ”といった、手足の動きに相当する装置——が通常採用される。固体ターゲットを照射ポートから外し、ホットセルへ移送する機器がこれに該当し、産業用の汎用ロボットや自家設計装置の他、照射室とホットセルを連結する搬送装置等が具体例として挙げられる (Fig. 1 上)。ホットセル内部でターゲットを分解し、溶解に至るまでの操作に利用するマニピュレータ等も、手動ではあるが遠隔化装置に含まれるといえる。作業者の被ばく低減目的に利用されるこういった重厚長大な装置の導入や維持に起因するコスト、空間の占有等を受け入れられる施設は、そう多くない。これが金属核種の製造を敬遠させる大きな要因の一つと考えられる。

金属核種の製造が、複数の施設で遠隔的に行われていることは事実である。しかしその内容を再評価してみると、上述のような大規模装置の組合せによる“力技”であることが多く、洗練された感に乏しい。C-11 や F-18 標識において、大部分の操作をボタン1つで実行できる自動合成装置の発展と比較すると、未だ大きな改善の余地があるものとする。

上述の通り、ロボットが遂行できる金属核種の遠隔製造であるから、逆説的に言えば、基本的な操作は単純であり、異なる核種の製造においても共通するものである。具体的な工程を順に述べると、(1)ターゲット調製・準備、(2)照射、(3)回収・輸送、そしてホットセルでの(4)ターゲット分解、(5)ターゲット溶解・分離精製である。(5)の分離精製を除き、いわゆる PET 薬剤の標識

に利用される自動合成装置、つまり同機能を実現する構成部品では、これら工程の遠隔化は困難である。当該機器類は気液体を扱う前提で設計されており、流動性の無い固体試料（ターゲット）の制御はできず、事実上不可能といえる。

従って本研究では、金属ターゲットの保持、照射、並びに酸による溶解をターゲット容器内で行うことを試みた。金属核種の溶液を、ホットセルではなくターゲット容器内で得ることにより、製造環境の大幅な簡略化——核種移送を1本の配管経路で行える気液体ターゲット類似の製造系——が期待できる。また、垂直照射法を採用することで、めっき等、難事の多いターゲット調製は行わず、顆粒あるいは粉末状の金属をそのまま照射することを試みた（Fig. 1 下）。

本研究では、 $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ 反応を利用した Zr-89 の製造を通じて、上述の遠隔化構想に関する実証試験を行った。

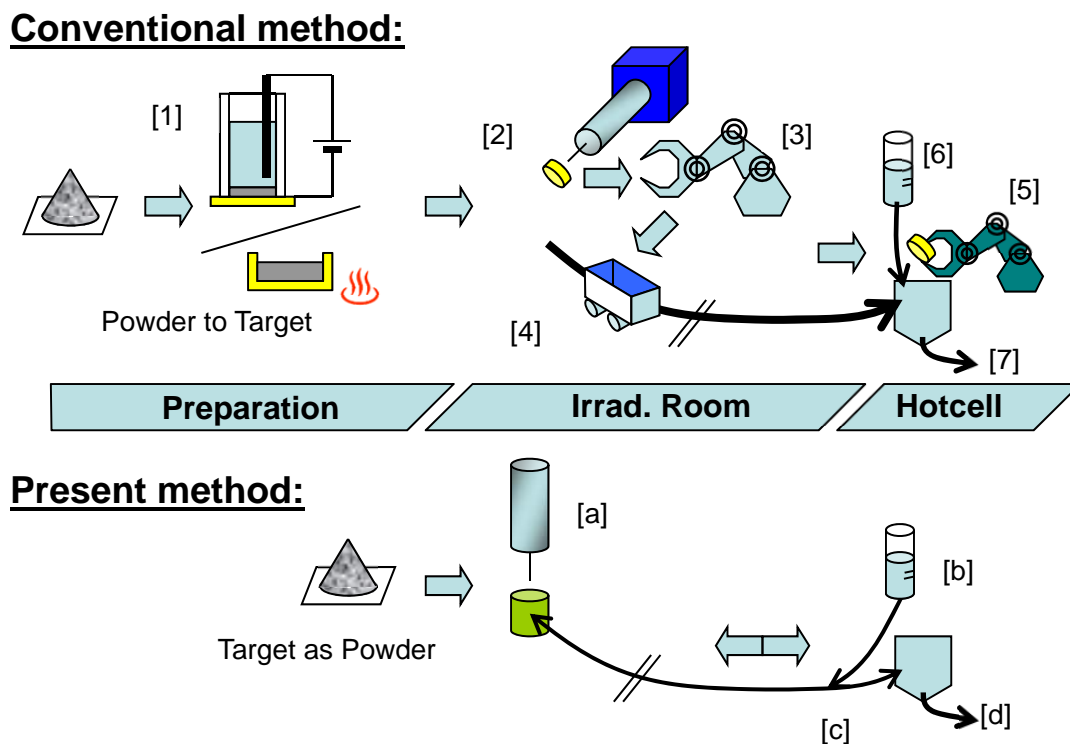


Fig. 1. Remote production of metallic isotopes by conventional and present methods
 [1] Target preparation (solidification); [2] Irradiation; [3] Remote handling; [4] Transport;
 [5] Disassembly; [6] Dissolving; [7] Separation
 [a] Irradiation of powder target and Dissolving; [b] Acid(s); [c] Recovery as solution;
 [d] Separation

2. 方法

アルミナ (Al_2O_3 , 99.6%) を材料に選択し、垂直照射用セラミックターゲット容器を設計した。アルミナは、(a)高温環境で利用できる、(b)耐腐食性、(c)良好な熱伝導性 等、ターゲット容

器に求められる材質特性を持つ。本ターゲット容器は、内部へ通ずるポートを2箇所持ち、上部を耐腐食性に優れる白金箔（30 μm ）で封じる構造とした。イットリウム粉末（NewMet Koch社、40 mesh、800 mg）をターゲット容器へ投入後、軽く左右に振り表面を均すのみで照射準備完了とし、照射ポートへ設置した。

放射線医学総合研究所 AVF-930 サイクロトロンを利用し、垂直照射コースにて陽子ビーム 15.5 MeV（ターゲット上 13.9 MeV）、 $\sim 10 \mu\text{A}$ 、2 \sim 3時間の照射を行った。照射後、ホットセル内に準備した 6 M 塩酸を N_2 圧力によりターゲット容器へ導入し、Y 粉末の溶解を行った。激しい反応の結果あふれ出す溶液は、ターゲット容器近傍に設けたガラス容器へ導き、当該箇所での溶解も許容した。10分の溶解後、He 圧力により溶液をホットセル内回収容器へ移送した。同様に、2 M 塩酸、超純水の導入及び回収を順に行い、粗製 $^{89}\text{Zr}^{4+}$ を遠隔的に回収した（回収完了時、2 M 塩酸 30 mL）。

$^{89}\text{Zr}^{4+}$ は、Sep-pak CM を修飾した hydroxamate column とよばれる陽イオン交換樹脂*1 (15 mg) に捕捉し、 Y^{3+} やその他の雑成分と分離した。塩酸並びに超純水によるカラム洗浄、十分なフラッシングを経て、100 μL のシュウ酸による抽出を行い、 ^{89}Zr oxalate として最終製品を回収した (Fig. 2)。

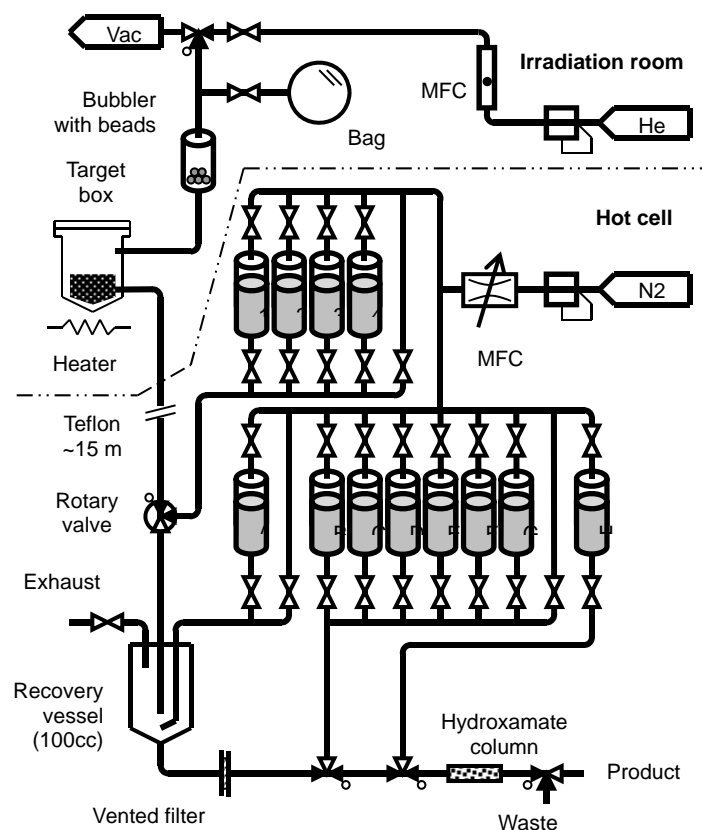


Fig. 2. Schematic diagram of the Zr-89 remote production apparatus.

[1] 6 M HCl, 6 mL, [2] 2 M HCl, 12 mL, [3] Ultrapure water, 12 mL, [4] Ultrapure water, 12 mL, [A] 2 M HCl, 5 mL, [B] CH_3CN , 10 mL, [C] 2 M HCl, 10 mL, [D] 2M HCl, 10 mL, [E] Ultrapure water, [F] reserved, [G] reserved, [H] 1 M oxalic acid, 100 μL

製造終了後、超純水によるターゲット容器内部の洗浄を行い、ターゲット容器に備え付けたヒーターによる加熱並びに真空減圧によって乾燥を行った。以上の手順で、次回製造の準備を完了した。

3. 結果及び考察

Zr-89 の製造結果を表 1 に示す。Zr-89 の照射終了時ターゲット収率は、 57 ± 11 MBq/ μ Ah (1.54 ± 0.29 mCi/ μ Ah、 $n = 10$) であった。 $^{89}\text{Y}(p,n)^{89}\text{Zr}$ 反応の励起関数報告*2 から、本照射条件で予期される Zr-89 のターゲット収率を約 65 MBq/ μ Ah (1.8 mCi/ μ Ah) と見積もり、その約 85% にあたる収率が得られたものと判断した。最大で約 3 割低下した収率の原因は、粉末ターゲットの低かさ密度 (bulk density) あるいはビーム形状の広がり起因したものと考えた。

最終製品の Zr-89 は約 90 μ L という極低容量で遠隔自動的に回収でき、その濃度は約 9.4 GBq/mL (250 mCi/mL) であった。金属核種の標識では高い放射能濃度を必要とするが、その要求に十分応えられる結果であった。

本セラミックターゲット容器は、10 回以上に渡る繰返し製造で問題なく利用でき、現在もその性能を維持している。Fig. 2 に示すとおり本装置は、従前の技術範囲で構成される単純かつ信頼性の高いものであり、様々な金属核種の製造を容易にすることが期待される。

Table 1. Production results of ^{89}Zr by using alumina target vessel and vertical beam ($n = 10$).

Target yield	57 ± 11 (MBq/ μ Ah)*, decay corrected
Product yield at 2.5 h from EOB	47 ± 0.6 (MBq/ μ Ah)*, decay uncorrected
Zr-89 radionuclidic purity	>99.9% at 3 h from EOB
Activity distribution:	in Mean \pm SD(%)
Product	82.8 ± 5.3
Column	3.4 ± 1.1
Vented filter	1.7 ± 0.5
Waste fraction through the column	6.8 ± 6.9
Washout from the target vessel	2.1 ± 1.0
Residual in target vessel	2.0 ± 1.4
Bubbler	1.2 ± 0.5

* $E_p = 13.9$ MeV, nominal 10 μ A, 2 h

4. 結語

垂直照射法、セラミックターゲット容器並びに従来の自動化技術を組み合わせることにより、大掛かりな装置を必要としない金属核種の遠隔製造を実証した。気液体ターゲットを利用する製造に限定されていた配管経由の回収法が、固体ターゲットのそれにも適用できることを示した。特別な固形化作業を必要としない粉末試料の照射が行えたことは、特に濃縮同位体を利用する製

造の簡略化に資するものとする。今後、本機構を応用した多数の金属核種の製造を評価し、同時に利用の拡大を予定したい。

垂直照射法は、研究機関等における特殊なもので、応用性が低いように思われるかもしれない。しかしながら、一般施設においても利用できる可能性が高く、それは縦型の加速箱を持つ (upright 型) 医療用加速器を発展させることで叶うものとする。加速器内部で回転加速する荷電粒子は、磁場や荷電変換膜等によりその進行方向が調整され、照射ポートへ輸送される。当該加速器を正面に見て、上下にビームが回転している状況を想像するとき、ビーム軌道の再設計と照射ポート位置の変更により、任意の接線方向、つまり鉛直方向にもビームが取り出せるように思う。その結果、現在我々が行っている加速器外での電磁石を用いたビームの偏向、即ち“力技”を利用しない垂直ビームが期待でき、上述した粉末ターゲットの利用や製造系の負荷軽減が可能になるほか、医療用加速器の応用性を大幅に上げられるものとする。

本シンポジウムのキーワード“次世代”に関して、ここに示したターゲット容器、照射方法並びに加速器の提案が、様々な放射性核種の容易な提供に繋がり、核医学の発展にわずかでも貢献できれば幸甚である。

参考文献

- 1) Holland, J.P. *et al.* Standardized methods for the production of high specific-activity zirconium-89. *Nucl. Med. Biol.* **36**, 729-739 (2009).
- 2) Steyn, G.F. *et al.* Excitation functions of proton induced reactions on ^{89}Y and ^{93}Nb with emphasis on the production of selected radio-zirconiums. *J. Korean Phys. Soc.* **59**, 1991-1994 (2011).

シンポジウム組織（東北大学分子イメージング研究推進室）

会 長：医学系研究科教授 谷内 一彦（分子イメージング教育コースプログラム代表）

事 務 局：サイクロトロン・RIセンター教授 岩田 錬（シンポジウム企画・編集責任者）

医学系研究科准教授 古本 祥三（シンポジウム企画）