

アルツハイマー病診断薬 Single Photon Emission
Computed Tomography (SPECT) 用 amyloid- β
リガンドに関する実験的研究

2014年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

陳 忠正

目次

Abbreviation list	3
緒言	4
図表	9
第1章 SPECT用リガンド開発候補品のA β 凝集体への親和性と 脂溶性の検討	
1. 背景と目的	12
2. 材料および方法	13
3. 結果	16
4. 考察	17
小括	18
図表	20
第2章 正常ラットでのDRM106の体内動態および脳内移行性の検討	
1. 背景と目的	23
2. 材料および方法	23
3. 結果	26
4. 考察	27
小括	29
図表	30

第 3 章	AD モデルマウスにおける DRM106 のオートラジオ	
	グラフィックによる脳内 A β の確認	
1.	背景と目的	37
2.	材料および方法	38
3.	結果	41
4.	考察	42
小括		43
図表		44
第 4 章	AD モデルマウスにおける SPECT 像と PET 像との比較	
1.	背景と目的	49
2.	材料および方法	50
3.	結果	53
4.	考察	54
小括		55
図表		56
総括		66
謝辞		69
参考文献		70
Summary		77

Abbreviation list

A β : Amyloid beta

AD: Alzheimer's disease

APP: Amyloid precursor protein

ARG: Autoradiography

B_{max}: Maximum specific binding

BP: Binding potential

eq.: equation

FSB: (E,E)-1-fluoro-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene

HPLC: High performance liquid chromatography

IC₅₀: Half maximal inhibitory concentration

IMPY: 2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodo-imidazo[1,2-*a*]pyridine)

IP: Imaging plate

K_d: Dissociation constant

logD_{7.4}: Distribution coefficient, measure of lipophilicity at pH 7.4

MRI: Magnetic resonance imaging

PiB: Pittsburgh compound B

PET: Positron emission tomography

RI: Radioisotope

SPECT: Single photon emission computed tomography

Tg: Transgenic

緒言

平成24年度厚生労働省の概況によると、日本では、女性の平均寿命は89歳、男性は80歳を越え、世界一の長寿命国となっている。また、65歳以上の高齢者人口が総人口の20%を占める超高齢化社会を迎えており、世界的にも老年人口の割合は7%を超え、高齢化が進行しつつある（www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life13）。

国際アルツハイマー協会の報告（<http://www.alz.co.uk/research/files/WorldAlzheimerReport-Japanese.pdf>）では、2010年に世界の認知症患者数は3,560万人に達し、今後20年毎に倍増すると予測されている。2013年厚生労働省研究班の発表では、日本の65歳以上の高齢者の約15%（約462万人）が認知症に罹患していた（<http://www.mhlw.go.jp/stf/kaiken/daijin/0000024488.html>）。

認知症とは、高次脳機能が後天的な器質的損傷によって低下し、日常生活に支障をきたすものである。これは、記憶障害や言語障害のみならず、理解力、判断力といった認知機能や人格変化を伴う疾患である。今後、少子高齢化社会を迎えるにあたり、認知症患者の増加は家族・介護者の経済的負担、医療介護サービスの不足といった社会的問題をきたすと考えられる。それゆえ、認知症の早期診断は、病態の進行を遅らせる医学的処置が行えること、および患者自身と家族が適切な社会的対応をとることができるので、重要な課題となっている。

認知症の分類として、アルツハイマー型認知症（Alzheimer's disease: AD）、血管性認知症、レピー小体型認知症および前頭葉側頭葉変性症があげられるが、そのうち、約70%がADによるものである。ADは、1）神経細胞へのamyloid- β （A β ）凝集体の蓄積、2）脳の神経原線維変化

と神経細胞死， 3) 脳の神経細胞の脱落といった病理学的特徴を示す進行性の神経変性疾患であり¹⁾，患者の認知機能は進行性に侵されていく。ADの発症機序については未解明な部分が多いが，アミロイドカスケード仮説に代表されるメカニズムに基づいて様々な診断・治療法の研究が行われている。

アミロイドカスケード仮説とは，A β の前駆物質であるAPP (amyloid precursor protein) が β セクレターゼによる切断を受け，その後さらに， γ セクレターゼにより切断を受けることで産生される。切断で生じたA β のC末端には多様性があり，40個アミノ酸からなるA β (1-40) と，42個アミノ酸からなるA β (1-42) が知られている。家族性ADにおいて，APP 遺伝子や γ セクレターゼ遺伝子の変異，さらにはAPP遺伝子の重複によって A β 全体の産生，特にA β (1-42) の産生が増加することが示されている。A β がどのように神経伝達障害・神経細胞死を引き起こしているのかについては未だ不明な点が多いが，数個のA β モノマーが重合したオリゴマーやA β 凝集体の毒性および過剰リン酸化タウタンパク質の凝集体の蓄積が直接的な細胞毒性を示すことや，ミクログリアの活性化による炎症反応を介した障害も考えられている(Fig.1)。また，A β 変異遺伝子を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) マウスにおいても，老人斑の蓄積や認知機能障害といったAD様の症状がみられる¹⁵⁾。

脳の A β 凝集体沈着は，非可溶性 A β の凝集体であり，主として β シート構造で構成されている。まず数個のモノマー不溶性 A β 蛋白を重合してオリゴマー状となる。さらにオリゴマー間の凝集で線維状となり，線維状 A β は平面構造から β シートの形成によって立体構造の A β 凝集体として神経細胞外に蓄積する。

AD と AD 以外の認知症を見分けるため、脳内に蓄積した A β 凝集体を確認する必要がある。しかし、ヒトの生体脳組織を生検して試料とする病理学的診断は困難である。最近、特異的バイオマーカーとして、脳脊髄液中 A β (1-42) の低下および総タウやリン酸化タウ蛋白の増加が有効な指標として注目されている³⁴⁾。しかし、脳脊髄液の採取は患者への侵襲性が大きい。一方、非侵襲的な手法として、magnetic resonance imaging (MRI) があるが、AD 患者の脳室拡大や脳の萎縮を観察することができるものの、脳の形態変化を示さない初期段階では診断できない。また、AD 患者での楔前部および帯状回後部の血流や糖代謝の低下に着目して、single photon emission computed tomography (SPECT) による脳血流量の測定や、脳糖代謝の測定の¹⁸F-fluorodeoxyglucose を用いた positron emission tomography (PET) 診断が利用されているが、いずれも血管性認知症など他の認知症との区別ができず、特異性がない。

2012年開催された国際アルツハイマー病会議（バンクーバー，カナダ）では、A β 凝集体の沈着を非侵襲的に把握できれば、ADの発症を5年間遅らせ、患者数を半減することが可能であると発表しており、早期診断法の確立が望まれている（Fig.2）。

核医学検査は、放射性同位元素（radioisotope：RI）を用いた画像診断である。この分野ではアミロイドイメージングとして PET が先行しており、トレーサーとして¹¹Cの報告がある^{9, 13, 14, 18, 23, 25, 30)}。しかし、¹¹Cの半減期は20分間で、陽電子を発生させるサイクロトロン装置が必要である。そのため、使用できる施設が制限される。このような状況下、2012年と2013年に、半減期110分の¹⁸Fのリガンドが開発され³⁶⁾、florbetapir^{3, 7, 12)}（Amyvid, Eli Lilly and Company, 米国）と

flutemetamol³³⁾ (Vizamyl, GE Healthcare, 米国) が、それぞれ米国食品医薬品局 (FDA) によって承認された。さらに、2014 年には florbetaben (Neuraceq, Piramal Imaging, スイス) が第 3 の PET トレーサーとして承認され、¹⁸F-AZD4694 (NAV4694, Navidea Biopharmaceuticals, アイランド) ⁸⁾ と東北大学が開発した ¹⁸F-BF-227 ¹⁰⁾ も注目されている。なお、日本においては、現在 ¹⁸F-florbetapir の製造法のみが薬事承認されている (<http://www.hitachi.co.jp/New/cnews/month/2014/09/0908.pdf>)。

一方、SPECT用A β トレーサーの多くは¹²³Iであり、その物理学的半減期は13時間と長い。国内では、PET装置は2014年現在485台が稼働しているのに対し、SPECT装置は1,600台が稼働している (新医療, 2014, 41, 156-167)。一般的に、SPECTトレーサーの製造コストが低いため、発展途上国にはSPECTが適する。

獣医学領域においては、2009年2月の獣医療法施行規則の改正によって、犬、猫および馬について、SPECT核種のテクネチウム-99m (^{99m}Tc; 半減期6時間) が使用可能となった。しかし、飼育者の外部被曝防止のため、検査後24から48時間の被検動物の隔離が義務づけられている。将来的には、老齢犬の痴呆症に対して、アミロイドイメージングが新たな診断のツールになる可能性がある。

PET用A β 診断薬には、ベンゾチアゾール (benzothiazole) 構造を有するチオフラビン T (thioflavine T, ThT) があり、ThTは β シート構造のA β 凝集体と結合することが知られている。しかし、RI標識化合物が血液脳関門を通過するためには、ThTは血液脳関門をほとんど通過できない欠点がある。そこで、ピッツバーグ大学はThTの母核を持つ¹¹C-Pittsburgh compound B (¹¹C-PiB)を開発し、脳移行性を可能にした。

一方、SPECT用リガンド化合物として、ジフェニル-1,3,4-オキサジ

アゾール (1,3,4-DPOD) 誘導体³⁵⁾, オーロン誘導体²⁶⁾, 1,4-ジフェニルトリアゾール誘導体³²⁾, ピリジルベンゾフラン誘導体^{6,31)}, イミダゾ[1,2-*a*]ピリジン誘導体が報告されている^{20, 21, 37)} (Fig.3)。それらの中で, 唯一臨床試験まで進んでいたのは 6-iodo-2-(4'-dimethylamino-)phenyl-imidazo[1,2-*a*]pyridine (IMPY) であった²⁹⁾。しかし, IMPY は臨床試験で, AD 患者と健常人の区別ができなかったため, その後の開発が中止された²²⁾。

本研究では, 脳内 A β 凝集体に親和性を持つ imidazopyridine 誘導体を基本構造とした化合物に着目し, A β の脳内分布を検出するための SPECT 用リガンドの開発を目的として, 以下 4 章に亘り検討を加えた。

第 1 章では, SPECT 用リガンド開発候補品である DRK092, DRM101, DRM102, DRM105 および DRM106 の A β 凝集体への親和性および脂溶性を *in vitro* 系で IMPY と比較した。

第 2 章では, A β 親和性と脂溶性が優れた DRM106 について, ¹²⁵I で標識体を用いて, 正常ラットでの体内組織分布および脳組織ホモジネート後の抽出液の代謝活性物を調べた。

第 3 章では, AD 病モデル Tg (+) マウスを用いて, ¹²⁵I で標識した DRM106 の脳内 A β 凝集体への集積性について, オートラジオグラムで検討した。

第 4 章では, Tg (+) マウスを用いて, ¹²³I-DRM106 の SPECT 像を, 先行する ¹¹C-PiB の PET 像と比較した。

以上の研究を通じて, A β 凝集体に特異的に集積する新たな SPECT 用リガンドとしての有望な開発候補品の選出を試みた。

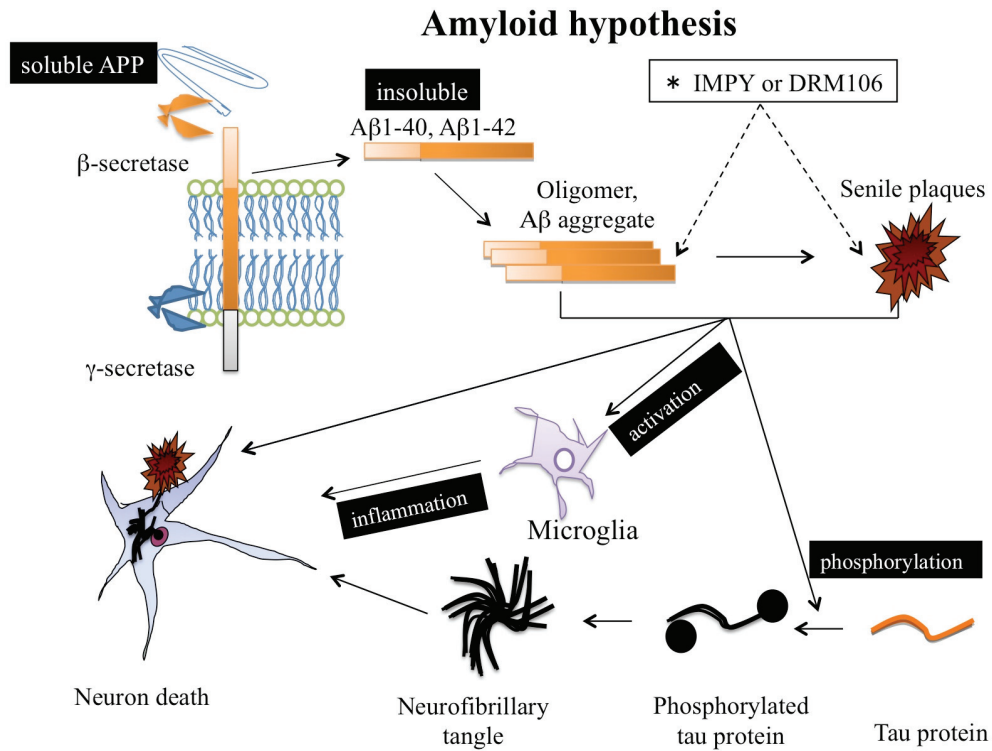


Fig. 1. Proposed hypothesis of Aβ causing the neurotransmission failure and neuronal cell death is still unclear. Aβ oligomer, Aβ aggregates plaques plus hyper-phosphorylated tau proteins, as well as microglia activated neuronal inflammation exhibit direct neuron toxicity.

* : binding site of IMPY or DRM106.

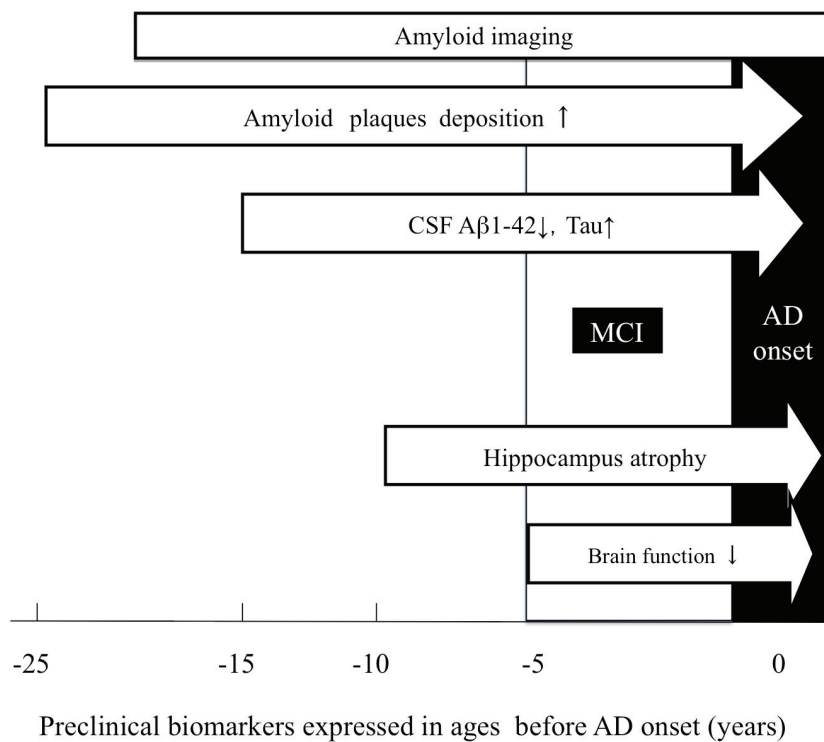


Fig. 2. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the AD before onset to dementia: *In vivo* non-invasive detection of A β deposition by amyloid imaging is important for early diagnosis and medical intervention for AD at a mild cognitive impairment (MCI) prodromal stage, since A β deposition has been already accumulating in the brain for 25 years prior to AD onset. CSF: cerebrospinal fluid

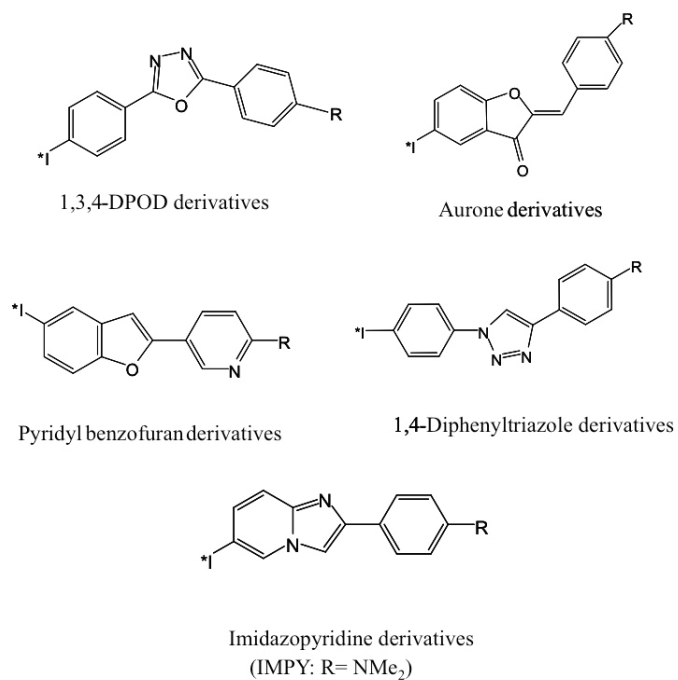


Fig. 3. Chemical structures of radio-iodinated ligands for amyloid imaging with SPECT. *I represents radioactive iodine.

第 1 章 SPECT 用リガンド開発候補品の A β 凝集体への親和性と脂溶性の検討

1. 背景および目的

^{123}I 標識放射性医薬品に適した SPECT 用化合物の物理・化学的特性として、1) 脳内 A β 凝集体への親和性が高いこと、2) 適宜な脂溶性による血液脳関門通過性があること、3) 非特異的な結合が低いこと、が挙げられる。緒言で述べたごとく、先行していた IMPY は健常人と AD 患者での区別ができなかったため、IMPY が有する imidazopyridine 骨格 (Fig. 3) に着目し、これを修飾することにより、上記コンセプトを満たす化合物の探索を行った。本研究では新規の 5 化合物 (Table 1) を合成し、A β 凝集体への親和性と pH7.4 における脂溶性の分配係数 ($\log D_{7.4}$) を *in vitro* 系で IMPY と比較した。新規化合物の A β 親和性は、IMPY の A β (1-40) 凝集体に対する結合の half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) で評価した。また、有望候補化合物の解離定数 (K_d : Dissociation constant) および特異的結合の総受容体濃度 (B_{max} : Maximum specific binding) を求めた。なお、脂溶性の分配係数は 2 から 3.5 の範囲で血液脳関門の透過性が高いことがわかっている。

親和性の指標として IC_{50} および K_d を用いた理由を、以下に説明する。放射性同位元素標識 IMPY と A β (1-40) 凝集体の結合部位に対して、競合する新規化合物を加えると、新規化合物も同様に A β (1-40) 凝集体と結合する性質を持つ。その場合、非 RI 標識の IMPY より少量で IC_{50} が得られた化合物は IMPY と比べ高い A β (1-40) 凝集体の親和性を有することとなる。これは、あくまで新規化合物と IMPY との優劣を示したものであり、本来の A β (1-40) 凝集体との親和性を示すも

のではないが、スクリーニングされた新規化合物を RI 標識することなく、多数の検体を調べることができるため、新薬の探索研究で汎用されている手法である。さらに、結合力の指標として、結合定数の逆数である解離定数 K_d と B_{max} を求めた。ここから計算された binding potential ($BP = B_{max} / K_d$) が化合物の受容体に対する真の親和性の指標である。

2. 材料および方法

2.1. 被検化合物

下記に示す imidazopyridine 骨格を有する 5 種の開発候補品は、富士フイルム RI ファーマ株式会社（東京）で合成された（Table 1）。

① 5-[4-(6-Iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenyl]-1,3-oxazole (DRK092)

② 2-[4-(6-Iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)phenyl]-1,3-thiazole (DRM101)

③ 3-[4-(6-Iodoimidazo[1,2-*a*]pyridin-2-yl)]-1,2,4-oxadiazole (DRM102)

④ 6-Iodo-2-[4-(1*H*-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)phenyl]imidazo[1,2-*a*]pyridine (DRM105)

⑤ 6-Iodo-2-[4-(1*H*-3-pyrazolyl)phenyl]imidazo[1,2-*a*]pyridine (DRM106)

また、比較のために IMPY

2-(4'-dimethylaminophenyl)-6-iodo-imidazo[1,2-*a*]pyridine を使用した。

なお、IMPY の ^{125}I 標識体は、何れも富士フイルム RI ファーマ株式会社で作成され、純度 95% 以上、比放射能 81.4 GBq/mmol であった。

2.2. A β (1-40) 凝集線維に対する IC $_{50}$ の測定

ヒト型合成 A β (1-40) (株式会社ペプチド研究所, 大阪) 凝集線維の作製は、10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, PBS 粉末「ニッスイ」,

日水製薬株式会社，東京）中に最終濃度100 mMになるようにA β (1-40)を溶解し，振盪しながら4日間 37°Cでインキュベートさせた後，A β (1-40)凝集線維の溶液を4°Cで保存した。使用直前に，凝集線維溶液をPBSで200倍希釈し，500 nMのA β (1-40)水溶液を作製した。このA β (1-40)水溶液100 μ lを900 μ lの1%のエタノール，20 mMのアスコルビン酸および¹²⁵I-IMPY (0.1 nM)を含有したPBSと混合してトレーサー溶液にした。被検化合物は，最終濃度0.06 nMから1000 nMまで8段階(各n=3)に希釈，添加後この混合液を37°Cで3時間反応した。GF/Bガラス繊維濾紙(Whatman, NJ)を装着したBrandel cell harvester (Mode M-24R, Biomedical Research. Lab., Gaithesburg, MD)を用いて吸引濾過した。試料を吸引濾過したガラス繊維濾紙に，氷冷した0.1 mMのアスコルビン酸を含有した2.0 mlのPBSで3回洗浄濾過した後， γ カウンター(Wallac Wizard 1480; PerkinElmer Wallac Inc, Turku, Finland)を用いて¹²⁵I測定用レンジ(35.5 keV; 幅16.1~74.6 keV)に合わせて1分間測定した。得られた計数から，GrahPad Prism (GraphPad Software, version 4.0, San Diego, CA, USA)を用いたスキッチャード分析によりIC₅₀求めた²⁷⁾。また，非特異的抑制(0%)と最大抑制(100%)はそれぞれ被検化合物の溶媒と非標識IMPY(500 nM)の添加より求めた(n=3)。

¹²⁵I-IMPYに対するIC₅₀の測定は，タンパク質がヒト型合成A β (1-40)を，KdとBmaxの測定には，A β (1-40)およびA β (1-42)(株式会社ペプチド研究所，大阪)を用いた。

2.4. 分配係数logD7.4の測定

LombardoおよびKernsら^{15, 23)}の方法に従い，UV検出器(2487 Dual λ , Waters Corporation, Milford, MA)を装着した高速液体クロマトグラ

フィー装置 (HPLC, Waters Corporation, Milford, MA) を用いた。20 mM 4-morpholinepropanesulfonic acid [MOPS (pH7.4)] 溶媒でメタノール (キシダ化学, 東京) の濃度を60から85%まで段階的に調整し, 移動相を流速1.0 ml/minで測定した。各試料を10 μ l注入し, 試料の保持時間 (t_R) とカラム通過開始時間 (t_0) から eq. 1を用いてキャパシティブアクター (k%) を求めた¹⁷⁾。

$$k\% = (t_R - t_0) / t_0 \quad \dots \quad (\text{eq. 1})$$

被検体およびIMPYの各メタノール濃度のキャパシティブアクターの対数值 ($\log k\%$) からメタノール 0% 濃度まで直線で外挿による $\log k_w$ が得られた。Lombardoらの文献で使用された薬物より19種類を選んで標準参考化合物とした^{16, 24)}。それぞれの $\log k_w$ 値を再度測定し, その $\log k_w$ 値と文献の $\log D_{7.4}$ 値を使用して, 相関式, eq. 2を作成した。この式を使用して新規被検化合物の $\log k_w$ 値に基づいて $\log D_{7.4}$ を算出した (Fig. 4.)。

$$y = 0.9477x + 0.1072 \quad \dots \quad (\text{eq. 2})$$

2.5. DRM106のA β (1-40) およびA β (1-42) 凝集線維におけるKd 値とBmax値

A β (1-40) および A β (1-42) は, それぞれ 20 mM PBS で最終濃度 100 mM になるように溶解し, 振盪しながら 4 日間 37°C でインキュベートして, A β (1-40) 凝集体溶液および A β (1-42) 凝集体溶液を得て, 4°C に保存した。使用時に PBS で 200 倍 希釈してそれぞれ A β (1-40) および A β (1-42) 水溶液を作製した。ガラスチューブにそれぞれの A β 水溶液を 200 μ l, ¹²⁵I-DRM106 溶液を 100 μ l (20 kBq) および PBS を 500 μ l に, 100% 結合阻害試料とし DRM106 20 μ M を 100 μ l,

試料として DRM106 を 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78, 0.39 および 0.2 nM, また 100% 結合試料として DRM106 を含まない PBS を 100 μ l と混合した。各検体の総量を PBS で 1.0 ml に調製し, 37°C で 1 時間インキュベートした。各試料は, GF/B ガラス繊維濾紙を装着した Brandel cell harvester (Model M-24R) を用いて吸引濾過した。さらに, ガラス繊維濾紙を 0.1 mM のアスコルビン酸を含有した 2.0 ml の氷冷した PBS で 3 回 洗浄濾過した後, γ カウンター (Wallac Wizard 1480) を用いて ^{125}I 測定用レンジで 1 分間測定した。得られた計数値から, 飽和曲線と Scatchard plot は GrahPad Prism Ver.4.00 (GraphPad Software) を用いた非線形最小二乗法 (Levenberg-Marquardt method) により, K_d 値および B_{max} 値を求めた²⁷⁾。

2.6. 統計解析

各実験は母集団となる溶液が1つのみであったため, 統計解析は実施しなかった。

3. 結果

3.1. $A\beta$ (1-40) 凝集線維に対する IC_{50} の測定と分配係数 $\log D_{7.4}$

算出した $A\beta$ (1-40) 線維に対する各被検化合物と IMPY の IC_{50} と $\log D_{7.4}$ を Table 1 に示す。 IC_{50} 値は, DRM092 (1.08 nM) > **DRM106 (1.86 nM)** > IMPY (2.93 nM) > DRM102 (4.13 nM) > DRM101 (6.87 nM) > DRM105 (744.9 nM) の順であった。

$\log D_{7.4}$ 値は, IMPY (4.03) > DRK092 (3.64) > **DRM106 (3.20)** > DRM101 (3.06) > DRM102 (3.12) > DRM105 (1.73) の順であった。

3.2. DRM106のA β (1-40) およびA β (1-42) 凝集線維における Kd 値と Bmax値

上記結果を基に DRM106 を取り上げ、A β (1-40) および A β (1-42) 凝集線維での Kd 値および Bmax 値を求めた (Table 2)。A β (1-40) 凝集線維の高親和性部位では、Kd 値および Bmax 値はそれぞれ 1.5 nmol/L および 4.3 pmol/nmol, 低親和性部位では 140.3 nmol/L および 163.0 pmol/nmol を示した。また、A β (1-42) 凝集線維の高親和性部位では 10.1 nmol/L および 34.3 pmol/nmol, 低親和性部位では 289.4 nmol/L および 339.4 pmol/nmol であった。

4. 考察

SPECT 用の放射性医薬品は、標的臓器への集積性が高いことと非標的領域およびその他の臓器に集積せずに速やかに排泄されることが望まれる。これまで、脳内 A β 凝集体を画像化する目的で、ThT 類似化合物の imidazopyridine 誘導体 IMPY を ¹²³I で標識し、AD 患者で臨床試験が行われた。しかし、臨床試験では、有効性が示されなかった。その理由として、A β 凝集体の親和性が不十分であったことと、脂溶性が高すぎたためと考えられた。親和性が弱いと標的の A β 凝集体との結合が弱く、画像撮影前に脳内から消失することになる。また、脂溶性が高くなると脳移行性の問題と脳白質のミエリン鞘に集積しやすいため、非特異的な結合が高く、十分なコントラストが得られない。さらに、脂溶性が高すぎても低くすぎても脳内移行性が低下する傾向がある。logD7.4 値は 2.0-3.5 の範囲内が望ましいと考えられている。

以上の知見を基に、IMPY を対照化合物とし、A β 線維対親和性の維

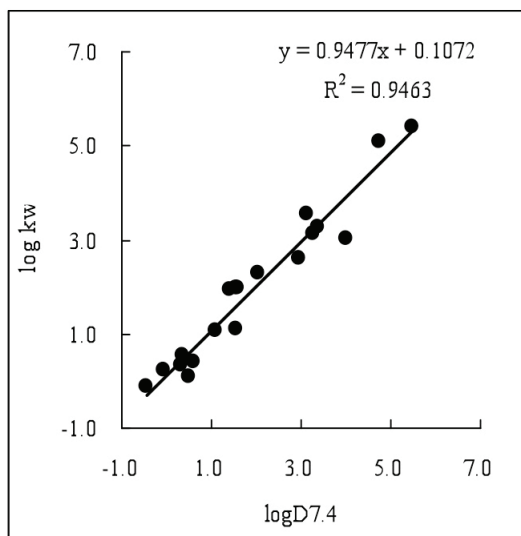
持・向上および脂溶性の調整を目的とした誘導体合成を行った。すなわち、IMPYの末端フェニル基4位の側鎖に非環状置換基であるdimethylamino基を、その側鎖の炭素原子を5員環含窒素複素環基として環状に固定することにより、A β 線維親和性の維持、向上と分子の脂溶性の調整を行った。5種のimidazopyridine誘導体を設計・合成し、そのA β 線維の親和性および脂溶性を評価した。その結果、5種のimidazopyridine誘導体は、すべての対照とする化合物であるIMPYより脂溶性が低下し、DRK092 (3.64) と DRM105 (1.73) 以外の3化合物のlogD_{7.4}値は、目的とした2.0-3.5の良好な脂溶性の範囲内であった。また、A β 線維親和性はDRM105 (IC₅₀=744.87)を除き、良好な親和性を示し、特にDRK092とDRM106は、IMPYよりも高いA β 線維親和性を示した。一方、DRM105のA β 線維親和性の大幅な低下は、他の4種の含窒素複素環基が弱塩基性を示す5員環含窒素複素環基であるのに対し、DRM105の持つ5-テトラゾリル基はカルボン酸等価体と呼ばれる酸性基であることがその理由であると考察された。A β 線維親和性がIMPYの1.7倍を示し、logD_{7.4}値が3.2とIMPYより低値であった。

IMPYのA β (1-40)に対するK_dとB_{max}は、それぞれ1.14 nmol/Lと0.14 pmol/nmolと報告されている⁵⁾。この数値から、IMPYのBPは0.122に対し、DRM106のBP (2.874)よりも、23.6倍高かった。このことから、DRM106はA β 凝集体の親和性および脂溶性から、リガンドとしての候補品の特性を有すると考えられた。

小括

SPECT用リガンド開発候補品を選抜するために、DRK092, DRM101,

DRM102, DRM105 および DRM106 を取り上げ, A β 凝集体への親和性および脂溶性を *in vitro* 系で, 先行している IMPY と比較した。その結果, DRM106 は 5 つの開発候補品の中で最も候補品としての特性を有すると考えられた。



Reference compounds	$\log D_{7.4}$	$\log kw$
Acetaminophen	0.51	0.0747
Allopurinol	-0.44	-0.1317
Antipyrin	0.38	0.5226
Bifonazole	4.77	5.0725
Caffein	-0.07	0.2357
Chloramphenicol	1.55	1.0958
Chlorpheniramine	1.41	1.9185
Cimetidine	0.35	0.3104
Clonidine	0.62	0.3833
Clozapine	3.13	3.5425
Haloperidol	2.98	2.6033
Hydrocortisone	1.55	1.9840
Naphthalene	3.37	3.2694
Prednisolone	1.6	1.9691
Risperidon	2.04	2.2814
Teststeron	3.29	3.1135
Triphenylene	5.49	5.4051
Wafarine	1.12	1.0590
β -estradiol	4.01	3.0185

Fig. 4. Standard curve for estimation of $\log D_{7.4}$ (left panel) and $\log D_{7.4}$ of the reference compounds (right panel). The partition coefficients were determined experimentally according to an HPLC method (Lombardo, 2001) previously published.

Table 1. The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of candidate compounds for binding of ^{125}I -IMPY to synthetic human Ab (1-40) fibril and their lipophilic parameter (logD).

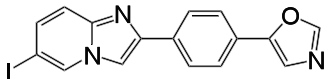
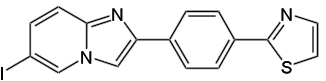
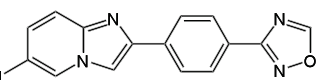
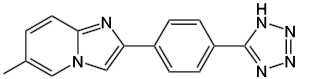
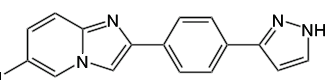
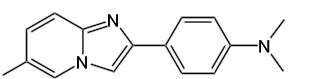
Compounds	Chemical Structure	IC_{50} (nM)	logD (pH 7.4)
DRK092		1.08	3.64
DRM101		6.87	3.06
DRM102		4.15	3.12
DRM105		744.87	1.73
DRM106		1.86	3.20
IMPY		2.93	4.03

Table 2. Dissociation constant (Kd) and maximum binding (Bmax) of ¹²⁵I-DRM106 binding to Aβ(1-40) and Aβ(1-42) fibrils

Fibrils	High affinity binding site		Low affinity binding site	
	Kd	Bmax	Kd	Bmax
	nmol/L	pmol/nmol	nmol/L	pmol/nmol
Aβ(1-40) fibrils	1.5 ± 0.04	4.3 ± 1.04	140.3 ± 36.59	163.0 ± 9.56
Aβ(1-42) fibrils	10.1 ± 5.08	34.3 ± 22.76	289.4 ± 344.50	339.4 ± 268.50

Data from 4 independent experiments with each experiment was run triplicate; mean ±SD

第 2 章 正常ラットでの DRM106 の体内動態および脳内移行性の検討

1. 背景および目的

第 1 章において、SPECT 用リガンドの候補品として、A β 凝集体への親和性および脂溶性における *in vitro* 系の結果から、imidazopyridine 誘導体 DRM106 を選抜した。DRM106 の物理化学的性状を Table 3 に示した。また、リガンドの物理・化学的特性に加えて、残留性、代謝物の生成や安全性にも注意を払う必要がある。IMPY のマウスにおける体内動態は、脳において 2 分で 2.88%ID、30 分で 0.26%ID であり、良好な脳移行性とクリアランスが知られている³⁷⁾。しかし、IMPY は脳内代謝物があり、リガンドとして課題が残る⁴⁾。また、IMPY のラット単回毒性試験の成績では、臨床予想用量 20 $\mu\text{g}/\text{man}$ (60 kg) の約 1,000 倍用量 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ においても、毒性は認められなかった³⁾。一方で、候補品 DRM106 では、生体の標的臓器である脳への移行性、脳クリアランスや脳以外の臓器への非特異的な集積については不明な点が多い。

本章では、正常の雌雄ラットに ¹²⁵I-DRM106 を単回静脈内投与し、経時的に試料を採取して、全身臓器・組織への分布を検討した。その後、脳への移行性を解析した。さらに、脳組織を採取し、脳における DRM106 代謝物の有無を調べた。

2. 材料および方法

2.1. 使用動物

7 週齢の雄雌 Sprague-Dawley (SD) ラットを各 30 匹購入 (日本チャールス・リバー株式会社, 横浜) し、1 週間の馴化後に実験に供した。

飼育期間中，限界濾過フィルターした水道水と放射線滅菌したゲッ菌類用飼料（FR-2，株式会社フナバシファーム，千葉）を自由に摂取させた。本実験の動物実験プロトコールは，富士フイルム RI ファーマ株式会社動物実験委員会に承認された（倫 071004）。

2.2. ^{125}I -DRM106 投与液の調整

^{125}I -DRM106 は 40 mM アスコルビン酸(キシダ化学)および 0.05 w/v% Tween80 (キシダ化学) 含有生理食塩液で 0.37 MBq/rat (1.85 MBq/kg, 投与液量 200 μL) になるように調整した。投与量は，予備試験の結果を基に設定した。使用した ^{125}I -DMR106 の比放射能は 81.4 MBq/nmol, 放射線化学純度は 95% 以上のものを使用した。

2.3. 実験方法

雌雄ラット ($n = 3$) の尾静脈内に ^{125}I -DMR106 を 0.37 MBq/rat (1.85 MBq/kg) の割合で投与し，投与 2, 5, 15 および 30 分後と 1, 2, 4, 8, 24 および 48 時間後にイソフルラン（フォーレン，アボットジャパン，東京）麻酔下で断頭放血した。全血および尿を採取し，その後，甲状腺，脳，眼球，ハーダー腺，皮膚，胸腺，心臓，肺，肝臓，脾臓，膵臓，胃，小腸，大腸上部，大腸下部，副腎，腎臓，脂肪，精巣，精巣上体，卵巣，子宮，骨，（大腿部）筋肉および膀胱を摘出し，重量（甲状腺は除く）を電子天秤（PG-802，メトラー・トレド株式会社，東京）で測定した。

各試料の放射能は， γ カウンター（Wallac Wizard 1480）を用いて ^{125}I 測定用レンジで 1 分間測定し，各臓器の ^{125}I -DMR106 の組織内放射能濃度（%ID/g）を下記 eq. 4 で算出した。

$$\%ID/g = \text{試料のカウント数} / \text{投与した総カウント数} / \text{試料の重量 (g)} \\ \times 100 \quad \dots \quad (\text{eq. 4})$$

各臓器の ^{125}I -DMR106 組織内放射能分布率 (%ID) は eq. 5 で算出した。

$$\%ID = \text{全試料のカウント数} / \text{投与した総カウント数} \\ \times 100 \quad \dots \quad (\text{eq. 5})$$

2.4. 脳での DMR106 の代謝物の検討

ラット脳組織を採取 (0.3 g) し、ガラスホモジナイザーに入れ、組織湿重量に対して 2 倍量の 40 mmol/L アスコルビン酸 (キシダ化学) 0.1w/v% Tween80 (キシダ化学) 含有生理食塩液 (光製薬, 東京) を添加し、均一になるまでホモジナイズした。このホモジネートから 50 μL を取り、Mini-Uniprep フィルタチューブ (Whatman Inc. NJ, 米国) に入れ、アセトニトリル (キシダ化学) 50 μL を添加し攪拌した。フィルタチューブのプランジャーを押してサンプルをろ過し、チャンバー部分に濾液を回収した。濾液に飽和アスコルビン酸エタノール (キシダ化学) 溶液 25 μL を添加し混和した。逆相シリカゲル薄層クロマトグラフィー用プレート (Whatman Inc. NJ) の端から 2 cm の位置に鉛筆で原線を記し、各サンプル 10 μL を原線上に等間隔に塗布した。風乾したプレートを展開用容器に入れ、薄層クロマトグラフィー展開溶媒メタノール/水 (80:20) 溶液約 15 cm 展開した。展開に要した時間は 78 分であった。展開を終了したプレートを取り出し、風乾してサラップで覆った。プレートを薄膜フィルム (クレラップ, 株式会社ク

レハ、東京)で覆い BAS-MS2340 イメージングプレート (IP; 富士フィルム) と 39 日間露光した。IP は BAS-1800 画像解析システム (富士フィルム) を用いて解像度 200 mm で読み込んだ。

3. 結果

3.1. ^{125}I -DRM106 の組織内放射能濃度 (%ID/g) および組織内放射能分布率 (%ID)

雄性ラットの結果を Table 4 および 5 に, 雌性ラットの結果を Table 6 および 7 に示した。特に血液および脳中放射能濃度の結果は Fig.5 に示した。脳中放射能濃度 (Fig.5, lower panel) は, 雄性で 0.453%ID/g, 雌性で 0.532%ID/g と最も高値を示し, その後速やかに減少した。投与 30 分後に, 雄性は 0.08%ID/g, 雌性は 0.09%ID/g で, 速やかに脳から消失した。甲状腺, ハーダー腺, 眼球および皮膚には投与後, 速やかに放射能が分布した。ハーダー腺は, 雌雄ラットともに投与後 5 分, 雄性で 0.699%ID/g, 雌性で 1.15%ID/g, 最多の放射能集積を示したが, 1 時間後に雄性で 0.076%ID/g, 雌性で 0.108%ID/g, 最初の 1 割まで低下した。また, 脳と比較してやや高い放射能濃度を示した。眼球の放射能の集積は投与 2 分後の雄性で 0.183%ID/g, 雌性で 0.203%ID/g を示し, その後速やかに消失したが, 脳の放射濃度よりやや高かった。甲状腺には, 雌雄ともに投与後 30 分後より緩やかに放射能分布率が増加し, 48 時間後でも, 雄性で 0.586%ID, 雌性で 0.326%ID が示された。皮膚への放射能は, 投与直後から高い集積を示して, その後緩やかに消失したが, 48 時間後でも雄性で 0.0421%ID/g, 雌性で 0.0243%ID/g と他の頭頸部組織に比べて高い濃度の残留が認められた。

肝臓の放射能集積は投与 5 分後が最も高く, 雄性で 2.81%ID/g, 雌

性で 3.32 %ID/g であった。その後、速やかに消失した。胃への集積は、雄性で投与 30 分後に 0.729%ID/g, 雌性ラットで投与 2 時間後に 1.2%ID/g で最高の分布率となり、その後緩やかに減少した。小腸への放射能の集積は、投与 2 時間後まで上昇し、雄性で 12.2%ID/g, 雌性で 15.5%ID/g であった。その後比較的緩やかに消失した。大腸上部への放射能の集積は投与 4 時間後に雄性ラットで 11.2%ID/g, 雌性で 14.5%ID/g, 大腸下部への放射能の集積は投与 8 時間後に雄性ラットで 15.2%ID/g, 雌性で 16.1%ID/g と最も高値を示した。

副腎, 腎臓, 生殖器, 膀胱, 心臓, 肺, 脾臓, 膵臓, 骨, 筋肉及び脂肪組織には投与後速やかに放射能が分布し, その後速やかに消失した。放射能濃度が高い組織は無かった。

^{125}I -DRM106 投与した後 48 時間の蓄尿で尿中へ排泄率を, 雄性では 13.2%ID, 雌性では 13.4%ID であった。性差はみられなかった。

血液中放射能濃度 (Fig.5, upper panel) は, 投与 2 分後で最も高値を示し, 雄性で 0.350% ID/g, 雌性で 0.561%ID/g であった。その後の消失は, 最初の 1 時間で速やかであり, その後は緩やかで, 二相性を示した。

3.2. 脳での DRM106 の代謝物の検討

雄性の脳の代謝物解析結果を Fig.6 に示した。2 時間まで代謝物の存在を示唆する副バンドは観察されず, 120 分で検出限界以下となった。

4. 考察

^{125}I -DRM106 の血液放射能濃度は, 雌雄ともに投与後 1 時間後まで急速に低下し (分布相), その後緩やかに低下 (排泄相) するという 2 相

性のパターンを示した。このことから、 $^{125}\text{I-DRM106}$ の排泄は投与 24 時間前後と考えられた。なお、性差は見られなかった (Fig. 5)。

$^{125}\text{I-DRM106}$ は血液脳関門から脳に通過しやすく、2 分で最高の集積を示したが、蓄積性はなく速やかに脳から消失した。この特性は脳に $\text{A}\beta$ 凝集体が沈着していれば、 $\text{A}\beta$ を画像化するためのコントラストが得やすいと考えられた。また、薄層クロマトグラフィーの結果から $^{125}\text{I-DRM106}$ 以外の副バンドがなかったため、 $^{125}\text{I-DRM106}$ の脳内代謝物は生成されないと考えられた (Fig. 6)。

甲状腺には、やや高い分布が見られた。甲状腺はイオン化ヨウ素を取り込み T_3 や T_4 の合成を行っている。そのため、 $^{125}\text{I-DRM106}$ の代謝過程で遊離されたイオン化 ^{125}I が甲状腺細胞に能動的に取込まれたと推察された。

頭部では、ハーダー腺、眼球、付随筋肉や皮膚の放射線集積が脳の画質に影響を与えるため、これらの組織への集積は好ましくない。今回得られた結果を基にすると、投与 1 時間後には、いずれの組織からもほぼ消失したことから、画像への影響は少ないと考えられた。なお、肝臓の臓器濃度の低下に伴い小腸と大腸の臓器濃度が増加し、尿中排泄は 13%ID 前後であることから、 $^{125}\text{I-DRM106}$ の大部分は、肝臓からの胆汁を経由して糞中に排泄されると考えられた。

ハーダー腺については、ヒトでは存在しない臓器であるため、その意味については不明である。

また、前臨床毒性データは本文中には示していないが、 DRM106 の安全性薬理試験では、ラットに対して $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ の単回静脈内投与（臨床予想最大投与量 $6 \text{ ng}/\text{kg}$ の 4,165 倍）においても、中枢神経系の異常は認められず、 $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ （臨床予想最大投与量の 833 倍）の静脈内投与

において呼吸系と心血管系には影響が認められなかった。したがって、DRM106 は生体のコアバッテリー機能には影響しなかった。さらに、DRM106 の一般毒性試験では、ラットの単回投与と 28 日反復投与を何れも 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ においても、異常な病変を認めなかった。イヌの単回投与 (25 $\mu\text{g}/\text{kg}$) と 28 日反復投与 (5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) においても、著明な変化は観察されなかった。

以上、 ^{125}I -DRM106 のラット体内動態の成績から甲状腺への分布がみられるものの、その他臓器に異常な集積はみられなかった。

小括

DRM106 の生体内分布を調べるために、正常 SD ラットを用いて ^{125}I -DRM106 を単回静脈内投与し、経時的に体内分布および脳代謝活性を調べた。その結果、DRM106 の良好な脳移行と速やかなクリアランスが示された。また、脳内代謝解析では DRM106 の代謝物は認められなかった。さらに、その他の臓器に異常な集積を認めなかった。

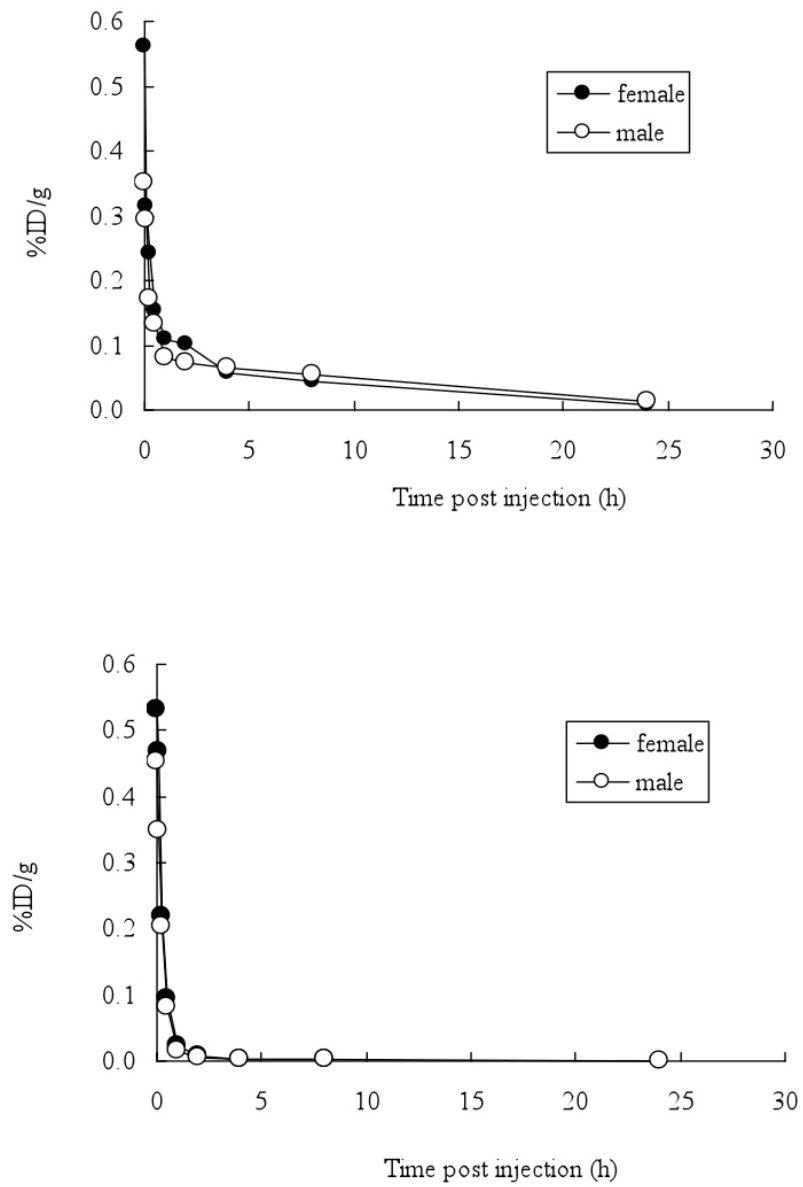


Fig. 5. Radioactivity levels in blood (upper panel) and the brain (lower panel) of normal female and male SD rats given intravenously ^{125}I -DRM106. Values represent the mean of 3 rats.

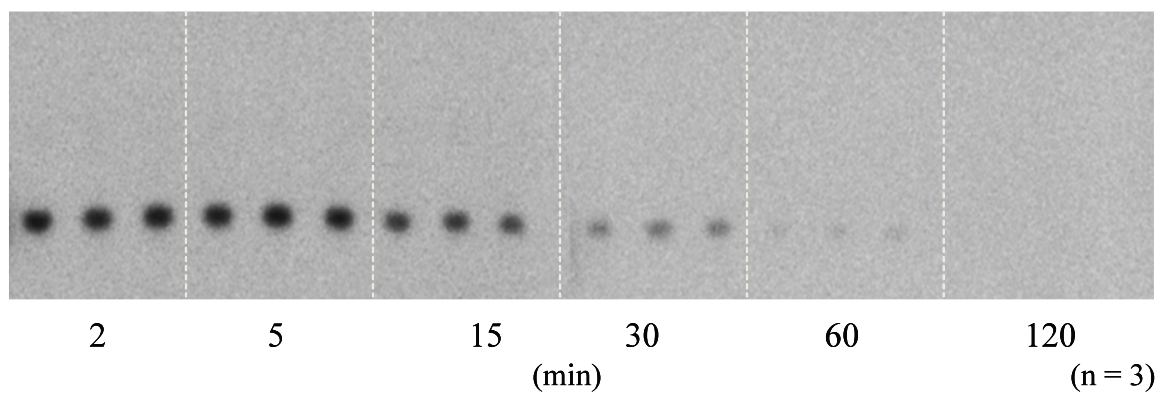


Fig. 6. Metabolic stability of DRM106 in normal male SD rats. The brain samples were collected at scheduled time points after i.v. injection of ^{125}I -DRM106. Thin-layer chromatography analysis clearly demonstrated that no overt metabolite was observed in the brain at 120 min later.

Table 3. Physiochemical properties of DRM106.

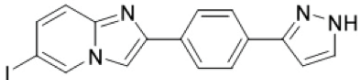
Compound name	(¹²³ I) DRM106
Chemical formula	C ₁₆ H ₁₁ ¹²³ IN ₄
Chemical name	6-iodo-2-[4-(1H-3-pyrazolyl)phenyl]imidazo[1,2-a]pyridine (¹²³ I)
Chemical structure	
Molecular weight	382.19
Appearance	crystalline powder or crystals of white to pale yellow
Melting point	289.5 °C
Solubility	sparingly soluble in the N, N- dimethylformamide, acetic acid and dimethyl sulfoxide, and practically insoluble in ethanol (99.5) and water.

Table 4. Biodistribution of ^{125}I -DRM106 in normal male SD rats calculated in tissue weight concentration.

Organ	% ID/g tissue (Mean of 3 heads)*									
	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Blood	0.350	0.293	0.172	0.133	0.081	0.073	0.065	0.054	0.012	0.007
Thyroid	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Brain	0.453	0.348	0.203	0.080	0.016	0.006	0.004	0.003	0.001	0.000
Eyeball	0.183	0.119	0.078	0.048	0.024	0.018	0.014	0.017	0.007	ND
Harderian gland	0.614	0.699	0.535	0.292	0.076	0.048	0.039	0.042	0.016	0.011
Skin	0.224	0.211	0.194	0.146	0.117	0.145	0.139	0.144	0.064	0.042
Thymus	0.279	0.292	0.234	0.135	0.043	0.024	0.018	0.015	0.004	0.001
Heart	0.645	0.351	0.171	0.079	0.038	0.030	0.024	0.018	0.005	0.002
Lung	0.840	0.562	0.277	0.142	0.067	0.054	0.041	0.036	0.008	0.005
Liver	1.560	2.810	1.600	0.890	0.150	0.062	0.041	0.039	0.010	0.009
Spleen	0.511	0.428	0.226	0.099	0.038	0.029	0.026	0.024	0.009	0.005
Pancreas	0.849	0.504	0.231	0.111	0.038	0.029	0.026	0.020	0.005	0.001
Stomach	0.308	0.306	0.457	0.729	0.451	0.808	0.465	0.364	0.142	0.033
Small intestine	0.554	1.510	4.880	7.790	9.700	12.200	3.280	0.249	0.037	0.011
Colon upper	0.153	0.149	0.103	0.085	0.065	0.169	11.200	11.700	0.263	0.085
Colon lower	0.348	0.371	0.152	0.106	0.039	0.031	0.077	15.200	0.009	0.150
Adrenal gland	2.590	1.740	0.679	0.266	0.049	0.036	0.023	0.026	ND	ND
Kidney	2.240	1.360	0.910	0.549	0.184	0.090	0.053	0.072	0.008	0.005
Fat	0.179	0.255	0.250	0.144	0.026	0.009	0.007	0.013	0.001	ND
Epididymis	0.133	0.161	0.178	0.141	0.065	0.035	0.024	0.023	0.005	0.003
Testis	0.156	0.174	0.171	0.123	0.060	0.035	0.026	0.025	0.005	0.002
Bone	0.217	0.165	0.090	0.052	0.028	0.027	0.023	0.021	0.005	0.001
Muscle	0.422	0.200	0.102	0.045	0.015	0.012	0.009	0.009	0.002	ND
Bladder	0.258	0.351	0.317	0.435	0.199	0.146	0.086	0.098	0.004	ND

*: Data of 2 min group was 2 heads, --- : without data, ND : undetectable

Table 5. Biodistribution of ^{125}I -DRM106 in normal male SD rats.

Organ	% ID (Mean of 3 heads)*									
	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Blood	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Thyroid	0.0754	0.0453	0.0395	0.0655	0.0865	0.205	0.332	0.786	0.512	0.586
Brain	0.858	0.634	0.382	0.152	0.0285	0.0112	0.00678	0.00524	0.00193	0.000811
Eyeball	0.0514	0.0327	0.0219	0.0144	0.00624	0.00521	0.00369	0.00432	0.00167	ND
Harderian gland	0.179	0.195	0.162	0.0778	0.0204	0.0138	0.0113	0.0121	0.00422	0.00259
Skin	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Thymus	0.146	0.161	0.162	0.0879	0.027	0.0159	0.0100	0.00770	0.00199	0.000422
Heart	0.560	0.278	0.147	0.0643	0.035	0.0291	0.0197	0.0182	0.00443	0.00208
Lung	1.03	0.601	0.312	0.155	0.074	0.0630	0.0499	0.0360	0.00894	0.00623
Liver	15.7	28.6	17.2	9.47	1.45	0.527	0.400	0.300	0.100	0.0603
Spleen	0.319	0.278	0.157	0.0685	0.0281	0.0168	0.0145	0.0137	0.00484	0.00276
Pancreas	0.417	0.317	0.0999	0.0545	0.0213	0.0165	0.0144	0.0103	0.00262	0.000446
Stomach	0.925	0.971	1.18	1.64	1.48	1.50	0.913	0.687	0.313	0.0551
Small intestine	4.75	12.3	42.5	65.8	81.8	81.9	23.4	1.52	0.262	0.0596
Colon upper	0.744	0.797	0.565	0.392	0.371	0.794	59.7	53.2	1.13	0.221
Colon lower	0.311	0.259	0.189	0.103	0.0586	0.0458	0.125	28.6	0.00609	0.103
Colon	1.05	1.06	0.753	0.494	0.43	0.840	59.8	81.8	1.14	0.324
Adrenal gland	0.113	0.0725	0.0337	0.0122	0.0023	0.00168	0.00111	0.00161	ND	ND
Kidney	4.50	2.82	1.89	1.15	0.377	0.18	0.109	0.150	0.0170	0.00936
Fat	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Epididymis	0.0927	0.106	0.0960	0.0901	0.0513	0.0250	0.0193	0.0170	0.00362	0.00204
Testis	0.365	0.363	0.382	0.287	0.138	0.0846	0.0560	0.0593	0.0119	0.00518
Bone	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Muscle	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Bladder	0.0205	0.0326	0.0347	0.0401	0.0160	0.0195	0.00603	0.00843	0.00109	ND
Urine	0.00285	0.00829	0.0125	0.0647	0.0552	1.50	4.53	7.10	13.0	13.2

*: Data of 2 min group was 2 rats, --- : without data, ND : undetectable

Table 6. Biodistribution of ^{125}I -DRM106 in normal female SD rats calculated in tissue weight concentration.

Organ	% ID/g tissue (Mean of 3 heads)*									
	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Blood	0.561	0.313	0.240	0.154	0.110	0.101	0.0576	0.0433	0.00741	ND
Thyroid	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Brain	0.532	0.467	0.219	0.0931	0.0234	0.00829	0.00373	0.00249	ND	ND
Eyeball	0.203	0.163	0.086	0.0454	0.0310	0.0269	0.0154	0.0118	ND	0.00414
Harderian gland	0.840	1.15	0.668	0.360	0.108	0.0885	0.0326	0.0409	0.0193	0.0112
Skin	0.272	0.302	0.218	0.153	0.123	0.116	0.0746	0.0776	0.0162	0.0243
Thymus	0.414	0.419	0.269	0.150	0.0574	0.0378	0.0182	0.0146	0.000974	ND
Heart	0.823	0.472	0.194	0.0989	0.0523	0.0409	0.0211	0.0161	0.00360	ND
Lung	1.13	0.776	0.299	0.155	0.0786	0.0844	0.0360	0.0279	0.00562	0.00299
Liver	2.92	3.32	2.10	0.747	0.230	0.0902	0.0448	0.0310	0.0105	0.00656
Spleen	0.801	0.684	0.236	0.107	0.0490	0.0418	0.0219	0.0178	0.00406	ND
Pancreas	1.01	0.668	0.245	0.123	0.0481	0.0385	0.0198	0.0172	0.00262	0.00170
Stomach	0.408	0.394	0.6	0.624	0.951	1.20	0.588	0.324	0.0248	0.0224
Small intestine	0.964	2.70	7.77	10.6	12.8	15.5	1.96	0.189	0.0283	0.00609
Colon upper	0.190	0.205	0.135	0.0853	0.0759	0.128	14.5	11.7	0.542	0.114
Colon lower	0.296	0.444	0.206	0.113	0.0536	0.0464	0.335	16.1	0.463	0.0534
Adrenal gland	3.80	2.46	0.671	0.267	0.0986	0.0719	0.0457	0.0407	0.0389	0.0104
Kidney	2.55	1.94	0.944	0.627	0.22	0.129	0.0482	0.0443	0.00839	0.00450
Fat	0.250	0.375	0.289	0.172	0.0419	0.0154	0.00398	0.00289	ND	ND
Ovary	0.904	0.749	0.337	0.180	0.0777	0.0572	0.0315	0.0238	ND	ND
Uterus	0.607	0.479	0.223	0.129	0.0789	0.0799	0.0468	0.0534	0.00692	ND
Bone	0.272	0.225	0.101	0.0604	0.0392	0.0363	0.0199	0.0165	ND	ND
Muscle	0.482	0.345	0.104	0.0475	0.0199	0.0152	0.00826	0.00616	ND	ND
Bladder	0.431	0.430	0.394	0.728	0.235	0.255	0.0800	0.0729	ND	ND

*: ---: without data, ND: undetectable

Table 7. Biodistribution of ^{125}I -DRM106 in normal female SD rats.

Organ	% ID (Mean of 3 heads)*									
	2 min	5 min	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Blood	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Thyroid	0.0670	0.0481	0.0252	0.0381	0.0646	0.154	0.174	0.111	0.257	0.326
Brain	0.930	0.820	0.384	0.160	0.0409	0.0146	0.00639	0.00428	ND	ND
Eyeball	0.0489	0.0422	0.0202	0.0108	0.00761	0.00676	0.00393	0.00298	ND	0.00103
Harderian gland	0.195	0.198	0.127	0.0806	0.0216	0.0191	0.00697	0.00874	0.0038	0.00241
Skin	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Thymus	0.234	0.171	0.124	0.0752	0.0288	0.0156	0.00786	0.0073	0.000625	ND
Heart	0.543	0.314	0.136	0.0723	0.0347	0.0301	0.0142	0.0103	0.00256	ND
Lung	1.03	0.642	0.260	0.132	0.0806	0.098	0.0332	0.0266	0.00523	0.00293
Liver	21.9	24.3	15.7	5.56	1.57	0.587	0.310	0.223	0.0891	0.0560
Spleen	0.358	0.262	0.103	0.0506	0.0238	0.0188	0.00994	0.00772	0.00187	ND
Pancreas	0.504	0.296	0.107	0.0616	0.0228	0.018	0.0103	0.00998	0.00139	0.00102
Stomach	1	1.21	1.32	1.34	1.35	1.74	0.888	0.699	0.117	0.0736
Small intestine	6.25	18.1	51.0	68.5	82.6	83.4	12.2	1.20	0.204	0.0443
Colon upper	0.859	0.856	0.520	0.345	0.329	0.494	71.6	55.8	3.40	0.546
Colon lower	0.339	0.341	0.166	0.0841	0.0658	0.0469	0.443	28.6	0.720	0.0994
Colon	1.20	1.20	0.686	0.429	0.395	0.541	72.1	84.3	4.12	0.645
Adrenal gland	0.172	0.114	0.0273	0.0118	0.00434	0.00404	0.00225	0.00210	0.00227	0.000572
Kidney	3.97	3.04	1.46	0.986	0.347	0.210	0.0776	0.0709	0.0133	0.00717
Fat	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Ovary	0.105	0.0713	0.0373	0.0204	0.00882	0.00703	0.00367	0.00279	ND	ND
Uterus	0.182	0.163	0.0910	0.0528	0.0244	0.0248	0.0162	0.0224	0.00312	ND
Bone	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Muscle	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----
Bladder	0.0288	0.0302	0.0278	0.0406	0.0156	0.0150	0.00622	0.00565	ND	ND
Urine	ND	0.00384	0.0306	0.0103	0.0147	1.87	5.08	7.78	8.91	13.4

*: ----: without data, ND: undetectable

第3章 ADモデルマウスにおける DRM106 のオートラジオグラフィによる脳内 A β の確認

1. 背景と目的

前 1-2 章において、候補品 DRM106 は、*in vitro* 系で優れた A β 凝集体への親和性および適切な脂溶性を示し、かつ *in vivo* 系では正常ラット脳への良好な移行性、クリアランスおよび安定性を示すことを明らかにした。

本章では、薬効薬理研究の一環として、加齢により脳内に A β 凝集体が沈着する AD モデルである PS-1ki/JU-Tg2576 (Tg) マウスを取り上げ、¹²⁵I-DRM106 を投与後、オートラジオグラフィ (ARG) により *ex vivo* 系で A β 凝集体の沈着を描出することを試みた。その後、ARG の大脳皮質/線条体コントラストを算出した。また、撮影の至適時間を把握するため、投与後の経時的な変化も調べた。さらに、ARG で使用した脳切片の A β 沈着を Congo-red 染色で確認した。

本研究で用いた Tg マウスは、スウェーデンの家族性 AD 患者から発見されたアミロイドタンパクの前駆体の変異体 (Lys670→Asn, Met671→Leu) を C57BL/6 マウスに導入したもので、米国 Mayo 財団で作出されたものである。まず、C57BL/6J×SJL の F1 世代 (B6SJL F1) と交配繁殖後、さらに JU 系 (JU/Ct-C,A) マウスと 29 世代以上の戻し交配して、変異 A β の APP (先駆蛋白) を JU マウスにヘテロで持つ個体 (JU-Tg2576 マウスと称する) を維持した。JU-Tg2576 マウスは、温順な性格と体型が大きく、日常管理と実験がし易くなるだけでなく、産仔数が多い利点がある。一方、AD 患者から得られる遺伝子変異として、A β の C 末端側の切り出しに関わるとされる酵素 presenilin-1 (PS-1)

の変異体 (Ile213→Thr) があり, これを gene-targeting により knock-in した動物に PS-1ki マウスがある²⁸⁾。すでに, A β -APP 変異体と PS-1 の変異体によるダブルトランスジェニック動物では, 脳内 A β 沈着が加速化されることが証明されており, また A β 発現量が増加することも判明している^{21, 28)}。これらデータを基に, 使用した PS-1ki/JU-Tg2576 Tg [Tg (+)] マウスは, 雄性 JU-Tg2576 マウスと変異 PS-1ki のホモ遺伝子を持つ雌性マウスと交配 (F₁) して作出した。評価には ARG 像, ARG の大脳皮質線条体コントラストおよび A β と特異的に反応する Cong-red 染色を用いた。

2. 材料および方法

2.1. 使用動物

19 ヶ月齢 雌性 PS-1ki/JU-Tg2576 [Tg (+)] マウス (第一三共, 東京) と対照としてアミロイド沈着の無い同腹の雄性 Tg (-) マウスを導入し, 用いた (n = 4)。一般的に, Tg (+) 動物のアミロイド発現量は雌性に多いことがわかっているため, 雌性を使用した。飼育期間中, マウスは限界濾過水道水と放射線照射飼料 (FR-2, 株式会社フナバシファーム, 千葉) を自由に摂取させた。本実験のプロトコールは, 富士フィルム RI ファーマ動物実験委員会で承認された (倫 050208)。

2.2. ¹²⁵I-DRM106 投与液の調整

¹²⁵I-DRM106 (富士フィルム RI ファーマ) の物理化学的性状および溶解法は, ラットの項 (第 2 章“2.2.”) で記述した方法と同様である。投与量は, 予備試験の結果を基に 1.3 MBq/mouse (投液量 200 μ L) に設定した。¹²⁵I-DRM106 の放射性化学純度は 95% 以上であった。

2.3. 脳切片での ARG の作製

^{125}I -DRM106 の 1.3 MBq/mouse を Tg (+) および Tg (-) マウスに単回静脈内投与し，投与 1，2，5 および 8 時間後にハロタン（フローセン，武田薬品工業株式会社，大阪）の深麻酔下で断頭放血致死させた（ $n = 1$ ）。脳を摘出し，海馬を横断した脳冠状断ブロックを包埋（Tissue-Tec[®]O.C.T. Compound Sakura Finetechnical，東京）して，ドライアイスとヘキサン（関東化学，東京）で凍結した。凍結切片をクリオスタット（クリオトーム FSE; Thermo Fisher Scientific Inc, MA, USA）で 15 μm に薄切し，スライドガラスに貼り付け，風乾後，スライドガラスに貼り付いた脳切片を薄膜フィルムで覆い，イメージングプレート（IP，MS2340，富士フイルム株式会社）と 19 日間露光した。露光した IP を，FLA-3000G 画像解析システム（GE Healthcare UK, Amersham Place, England）により 50 μm の分解能で ARG を読み取った。同様に，スライドガラスに貼り付いた脳切片を薄膜フィルムで覆い，X 線フィルム（BioMax MS，コダック合同会社，東京）に 19 日間露光し，自動現像装置（FPM100；富士フイルム，東京）にて現像した。露光時間については予備検討の結果から設定した。その後，使用した脳切片を Congo-red で染色した。

2.4. ARG の大脳皮質/線条体コントラストの算出

イメージングプレート（IP）で得られた ARG からアミロイド凝集体が沈着する大脳皮質およびアミロイド凝集体が沈着しない線条体に関心領域を設定した（Fig. 7）。各関心領域の面積（ mm^2 ）あたりの PSL（photostimulated luminescence）については，各関心領域の値からパッ

クグラウンドの値を引いて求めた。真の放射能濃度 $\{(P-BG) / \text{mm}^2\}$ については、個々の動物の大脳皮質の値を線条体の値で除して、大脳皮質線条体の放射能比を算出した。

$$\text{放射能比} = \text{大脳皮質の放射能濃度} / \text{線条体の放射能濃度} \quad \dots (\text{eq. 6})$$

さらに、視覚的評価は、X線フィルムの ARG を用い、Congo-red 染色像との一致性を 4 段階 (excellent, good, fair, poor) で評価した。

2.5. Congo-red 染色

オートラジオグラフィーに使用した脳切片を 10%中性緩衝ホルマリン液で 5 分間固定し、直ちにリン酸緩衝液 (PBS) に 20 秒間漬け洗浄した。その後、Congo-Red 媒染液 (80%エタノール 1000 mL に塩化ナトリウム 20.0 g を過飽和させて、フィルター濾過後、濾液を 0.1%水酸化ナトリウム液で pH 10.06 に調整) に 20 分間浸漬し、Congo-Red 染色液 (Congo-Red 0.60 g を 500 mL の 80% エタノールで溶解し、よく攪拌してから、塩化ナトリウム 7.50g を添加し、15 時間混和した。この溶液をフィルター濾過し、濾液を 0.1%水酸化ナトリウム溶液で pH 10.06 に調整) に 20 分間染色した。さらに、70%エタノールに 20 秒間漬けてから、95%エタノールに 3 分間ずつ合計 3 回浸し脱色した。最後に、キシレンに 5 分間ずつ合計 3 回漬けたのち、カバーガラスで脳切片を封入し鏡検した。なお、使用した中性緩衝ホルマリン液、塩化ナトリウム、水酸化ナトリウム、エタノールおよびキシレン (キシダ化学)、PBS (日水製薬, 東京) と Congo-red (Aldrich Chemical Company,

WI, 米国) を用いた。

3. 結果

3.1. 脳切片での ARG

$^{125}\text{I-DRM106}$ を投与した Tg (+) および Tg (-) のイメージングプレートでの ARG を Fig.8 に示した。 $^{125}\text{I-DRM106}$ による Tg (+) マウスの A β 凝集体沈着像が 1 時間から 8 時間まで強く描出され, A β 凝集体の沈着部位と明瞭なコントラストを呈した。A β 凝集体が沈着されていない線条体部位および Tg (-) マウスの脳内には, 異常な放射能の集積が観察時間を通してみられなかった。

3.2. ARG の大脳皮質/線条体コントラスト比

大脳皮質対線条体比を eq. 6 の式で求め, Table 8 に示した。Tg (+) における放射能比は, 1 時間で 4.66 となった後, 2 時間から 8 時間まで 10 前後を維持し, Tg (-) マウスでは 1 前後の活性比で維持された。

3.3. Congo-red 染色像

Tg (+) および Tg (-) の X 線フィルムの ARG および Congo-red 染色像を Fig. 9 に示した。Tg (+) の ARG は, Congo-red 染色における A β 凝集体の沈着によく一致していた。

3.4. 視覚的評価

X 線フィルムの ARG 画像 (Fig. 9) を視覚的に評価した結果を Table 9 に示す。 $^{125}\text{I-DRM106}$ 投与後, 1, 2, 5 および 8 時間の何れの時点に,

ARG 画像は、Congo-red 染色像とよく一致した。投与後 1 時間に脳梁付近の白質に非特異的な集積を認めたものの、2 時間以降では消失した。

4. 考察

本章では、IMPY のアミロイドイメージングに関する既報で用いられていた Tg マウス²¹⁾を使用した。¹²⁵I-DRM106 を Tg (+) および Tg (-) マウスに単回静脈内投与し、経時的に ARG を作成するとともに、同一切片を用いて Congo-red 染色を行った。Tg (+) マウスの A β 凝集体陽性分布と Congo-red 染色の陽性分布は非常に一致していた。対照の Tg (-) マウスの脳に非特異的な結合は、観察されなかった。

ARG 画像の定量評価に大脳皮質/線条体を用いたことで、A β 凝集体が多く存在する大脳皮質と、ほとんど沈着しない線条体の A β 凝集体の分布比によって、客観的な評価が可能であった。*Ex vivo* 試験結果から、概ね大脳皮質/線条体が 2 以上であれば、*in vivo* の評価においても A β 凝集体のコントラストが得られると考えられており、今回の比 (1 時間で 4.66, 2 時間から 8 時間まで 10 前後を維持) は、*in vivo* 評価に十分耐える結果であったと考えられた。

¹²⁵I-DRM106 を投与した Tg (+) マウスでは、投与後 8 時間まで高いコントラストが得られたことから、SPECT の撮像可能な時間が確保されたと考えられた。さらに、大脳皮質対線条体比から投与後 1 時間の早い時点から SPECT の撮影が可能であることも明らかとなった。ただし、*in vivo* SPECT 像の撮影に際しては、¹²⁵I-DRM106 の ¹²⁵I を ¹²³I (半減期 13 時間) に置換する必要がある。*Ex vivo* 実験で使用した ¹²⁵I の半減期が 60 日に対し、¹²³I の半減期は 13 時間であるため、A β 凝集体で

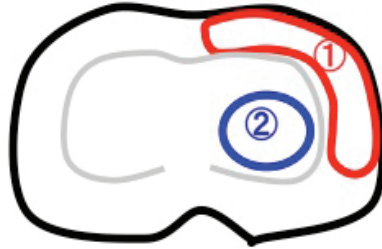
の放射能活性は短くなり、撮影適期は早いと考えられた。

以上の結果を考慮すると、A β 凝集体での放射能活性が弱くなる前に、かつ非特異的な結合が少ない時点には、*in vivo* SPECT 像の最適撮像時間（投与後 1-2 時間）と考えられた。

なお、A β 凝集体の染色には Congo-red を使用したが、Congo-red 染色は水溶性が高く、染色操作が容易である。色素は蛍光染色と比べて感度が低いため thioflamine S や (E,E-1-fluoro-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy)styrylbenzene (FSB) の蛍光染色に代替されつつあるが、反応が容易という利点がある。

小括

DRM106 の A β 凝集体描出能を評価するため、¹²⁵I で標識した DRM106 を AD モデルである雌性 Tg (+) マウスと陰性対照として同腹の雄性 Tg (-) マウスに静脈内投与後、A β 凝集体への集積性について ARG で解析した。その結果、Tg (+) マウスの ARG は Congo-red 染色とよく一致した。このことから、DRM106 は脳の A β 凝集体に特異的に集積することが示された。



Scheme of brain cortical area

①: cerebral cortex

②: striatum

Fig. 7. Scheme showing the method for quantitative analyses of radioactivity of cortical area in a brain coronal section. Amyloidosis-associated accumulations of ^{125}I -DRM106 radioactivity were estimated as a photostimulated luminescence (PSL) per mm^2 for the ratios of cerebral cortex to striatum. ① cerebral cortex, ② striatum

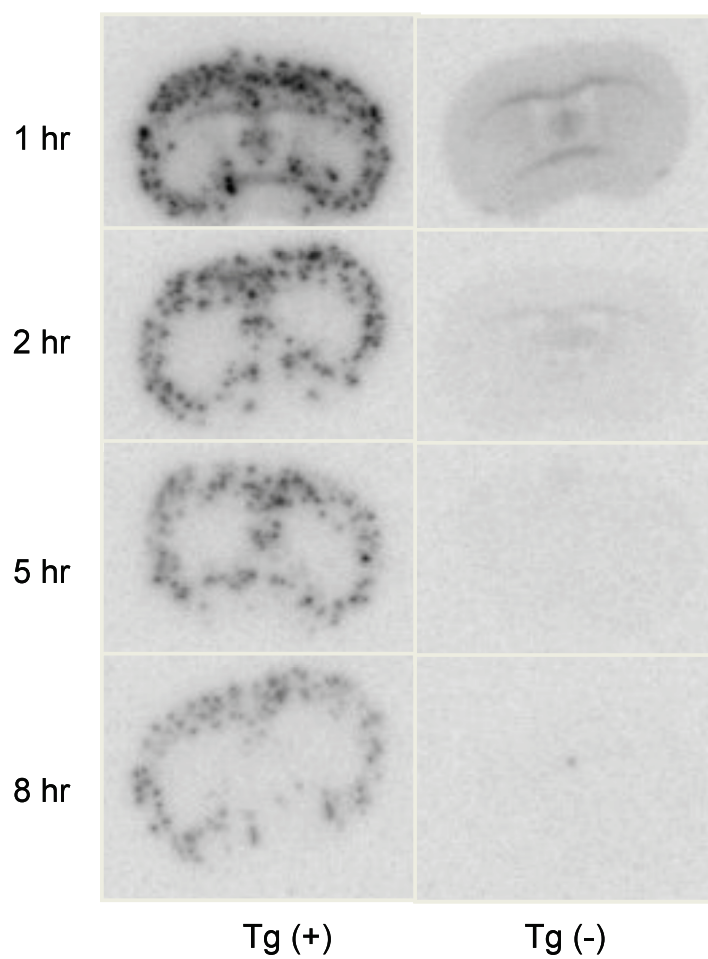


Fig. 8. Representative imaging plate autoradiograms in the brain of a 19-month-old female PS-1ki/JU-Tg2576 (Tg+) or age-matched male non-Tg [Tg (-)] mouse receiving a bolus injection of 1.3 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 via the tail vein. The animals were euthanized at 1, 2, 5, and 8 hr post-injection, and the brains were immediately removed for autoradiography analysis.

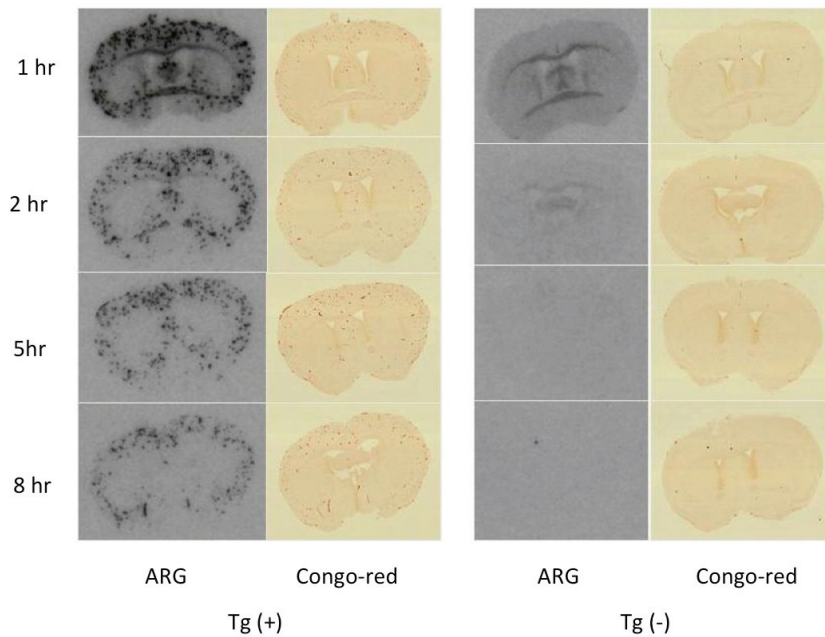


Fig. 9. X-ray film autoradiograms (left panel) of ^{125}I -DRM106 with Congo-red staining (right panel) in the brain of a 19-month-old female Tg (+) or age-matched male Tg (-) mouse receiving a bolus injection of 1.3 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 via the tail vein. The animals were euthanized at 1, 2, 5, and 8 hr post-injection, and the brains were immediately removed. The coronal images (approximately 0.2 mm anterior to the bregma) were performed, and the same brain sections were stained with Congo red after autoradiography. ^{125}I -DRM106 radioactivity accumulations in A β plaques were consistent with Congo red staining.

Table 8. Ratio of ^{125}I -DRM106 radioactivity in the cerebral cortex to striatum areas of a Tg (+) or Tg (-) mice (n = 1 for each time point) receiving a bolus injection of 1.3 MBq/mouse via the tail vein. The animals were euthanized at 1, 2, 5, and 8 hr post-injection, and the brains were immediately removed.

Post administration (hr)	Tg (+)	Tg (-)
1	4.66	0.72
2	10.35	0.81
5	9.75	1.01
8	11.67	0.96

Table 9. X-ray film ARG and Congo-red images that shown in Figure 8 were visually evaluated in grading as excellent , good, fair and poor rating scale.

Post administration (hr)	Tg (+)	Tg (-)
1	good	good
2	excellent	excellent
5	excellent	excellent
8	excellent	excellent

第 4 章 AD モデルマウスにおける SPECT 像と PET 像との比較

1. 背景と目的

緒言で述べたごとく、A β 凝集体の核医学イメージング研究は、PET が先行している。これまでの研究では、トレーサーとして、通常 ^{11}C が用いられてきたが、半減期が 20 分間と短く、また陽電子を発生させるサイクロトロン装置が必要で、使用できる施設が限定されている。通常、臨床における PET の放射性核種には、半減期 110 分間の ^{18}F が汎用されてきた。しかし、Good Manufacturing Practice において出荷前にエンドトキシン検査が要求されるため、製造から出荷までの時間を要し、供給できる範囲が狭くなる。一方、SPECT で使用されるヨウ素トレーサーは、物理学的半減期が比較的長く（13 時間）、装置も広く普及していることから、SPECT 用診断薬の方が PET 用診断薬よりも汎用性は高い。

PET 用 A β 診断薬には、ベンゾチアゾール構造を有するチオフラビン母核とした ^{11}C -PiB があり、脳移行も良好である。一方、 ^{123}I -SPECT 用 A β リガンド化合物とし、唯一臨床試験まで進んだのは IMPY²⁹⁾ であるが、AD 患者の正常部位と A β 凝集体を区別ができず、開発は中止された²²⁾。第 3 章において、 ^{123}I -DRM106 は、AD モデルである PS-1ki/JU-Tg2576 [Tg (+)] マウスにおいて、正常部位と A β 凝集体とを区別することができることが判明した。

そこで、本章では、Tg (+) および Tg (-) マウスを用いて、同一個体で ^{123}I -DRM106 の SPECT 像と ^{11}C -PiB の PET 像の画像を比較した。また、脳切片を作製し、FSB 染色による A β 凝集体への沈着を確認した。

2. 材料および方法

2.1. 使用動物

28 ヶ月齢雌雄 Tg2576 [Tg (+)] マウス (Taconic Farms, NY, 米国) と対照としてアミロイド沈着の無い同腹の雄性 Tg (-) マウスを用いた (n = 2)。個体 ID 番号は、下記のとおりである。

雌性 Tg (+) マウス: 1-2

雄性 Tg (+) マウス: 3-4

雄性 Tg (-) マウス: 5-6

飼育期間中、マウスは、限界濾過水道水と放射線照射飼料 (FR-2, 株式会社フナバシファーム, 千葉) を自由に摂取させた。本実験のプロトコールは、富士フイルム RI ファーマ動物実験委員会に承認された (倫 121008, 倫 121105)。

2.2. ^{123}I -DRM106 と ^{11}C -PiB の投与液の調整

^{123}I -DRM106 (富士フイルム RI ファーマ) は、0.9% (v/v) ベンジルアルコール (キシダ化学) と 0.09 v/v% 塩酸 (キシダ化学) 含有生理的食塩液で 714 GBq/ μmol になるように調製した。投与量は、予備試験を基に 340-350 MBq/mouse (投液量 800 μL) に設定した。使用した ^{123}I -DRM106 の放射性化学純度は、95%以上であった。

^{11}C -PiB (放射線医学総合研究所) は、0.3% tween80 (キシダ化学) 含有生理的食塩水で 291 GBq/ μmol になるように調製した。投与量は、予備試験の結果を基に 30.0 ± 6.8 MBq/mouse (投液量 200 μL) に設定した。使用した ^{11}C -PiB の放射性化学純度は、95%以上であった。

2.3. ^{123}I -DRM106 および ^{11}C -PiB を用いての撮像

最初に、 ^{11}C -PiB を用いて PET 撮影するため、動物を 1.5% (v/v) イソフルラン (エスカイン, ファーザー, 東京) 麻酔下, 30 G の歯科用注射針 (テルモ, 東京) を尾静脈内に留置し, ポリエチレンチューブ (PE 10, 夏目製作所, 東京) を介して 1 ml 29 G マイJECTター注射器 (テルモ) より ^{11}C -PiB を投与した。micro PET の focus 220 animal scanner (Siemens Medical Solutions, Malvern, PA, 米国) を用いて投与直後から 60 分間撮影した。全ての撮像画像の中から, 20-50 分の冠状断像および矢状断像を 0.5 mm ボクセル 3D に再構成した。その像を PMOD® image analysis software (PMOD Group, Zurich, スイス) を用いて厚さ 0.5 mm の脳 MRI テンプレートに重ね合わせてフュージョン画像を作成した。全ての検査が終了後, 動物は覚醒させた。

PET 撮像 1 ヶ月後, 同一マウスを用いて ^{123}I -DRM106 の SPECT 撮像を実施した。PET 実験と同様に, 確保された尾静脈の投与ラインより ^{123}I -DRM106 を投与した。SPECT 像は, 小動物用 SPECT 装置 (Inveon™ platform, Siemens Medical Solutions USA, Knoxville, TN, 米国) を用い, 検出器に直径 1.0 mm の 5 穴マルチピンホールコリメータを装着し, 回転半径が 30 mm で, step-and-shoot モードで 4°ずつ 360°を 90 個 (45 x 2) に分割して撮影した。また, ^{123}I のエネルギーに合わせてウインドウ幅を 159 keV の 20% とし, 投与直後から最初の 60 分間までに 1 画像を 20 秒間, 60 分以降は 1 画像を 40 秒間測定した。同一の条件で画像を比較する目的で, 撮像時間中の ^{123}I の物理学的半減期を, 半減期補正ソフト (Daemon Research Image processor, 富士フィルム RI ファーマ) を用いて補正した。画像合成は ^{123}I -DRM106 投与終了後 20-35, 40-55, 60-90, 95-125, 130-160 分の 0.5 mm ボクセル 3D 再

構成された冠状断像と矢状断像を PMOD® image analysis software (PMOD Group, Zurich, Switzerland)を用いてマウスの脳 0.5 mm 厚 MRI テンプレートに、フュージョン画像を作成した。

^{123}I - DRM106 の SPECT 像および ^{11}C - PiB の PET 像の大脳皮質(高 A β 凝集体分布域) と小脳 (低 A β 凝集体分布域) との比を求め SPECT 像 と PET 像の放射能比の相関性を評価した。

2.4. SPECT 撮像後の脳切片の作製

脳内に A β 凝集体の存在を確認するため、第 3 章で実施した脳切片の作製を行った。まず、SPECT 撮像後、動物はイソフルラン深麻酔下で断頭放血致死させた。脳の両半球中心部から矢状断に包埋し、ドライアイスとヘキサンで凍結した。なお、以降の作成手順は、第 3 章“2.3.”に準じて行った。

2.5. FSB 染色

A β 凝集体の高感度蛍光染色剤 FSB (同仁化学研究所, 熊本) を使用した。1%FSB (1 mg /100 μl DMSO) に、エタノールを加えて、0.001% FSB 溶液を調整した。脳切片をこの染色液内に 30 分間浸し、直ちに飽和炭酸リチウム水溶液 (キシダ化学) に浸した後、50%エタノールにて軽く洗った。この切片を BZ-9000 蛍光顕微鏡 (キーエンス, 大阪) 下で UV 光 (励起波長 $\lambda_{\text{ex}}=390$ nm, 蛍光波長 $\lambda_{\text{em}}=511$ nm) で観察した。

なお、視覚的評価は、 ^{11}C -PiB の PET 像、 ^{123}I -DRM106 の SPECT 像における FSB 組織染色像との類似性を 4 段階 (excellent, good, fair, poor) で実施した。

2.6. 統計解析

計数値は平均値で表し，SPECTとPETの相関性は，Pearsonのパラメトリック検定で相関係数 (r) を求め， $P < 0.05$ で有意差ありと判断した。

3. 結果

3.1. ^{123}I -DRM106 を用いての SPECT 画撮像

Tg (+) および Tg (-) マウスに ^{123}I -DRM106 を静脈内投与した場合の代表的冠状断像を Fig.10 に，矢状断像を Fig.11 に示した。

両画像とも Tg (+) と Tg (-) マウスの脳から放射能が徐々に消失していた。投与後 60-90 分に非特異的な結合が washout され，画像から Tg (+) マウスと Tg (-) マウスの区別が可能であった。

3.2. 個体別の ^{11}C -PiB の PET 像， ^{123}I -DRM106 の SPECT 像および FSB 組織染色像

個体別の投与後 60-90 分の PET 像，SPECT 像および FSB 染色像を Fig.12-17 に示した。

Tg (+) マウスの各個体は，PET 像および SPECT 像とも FSB 組織染色像の大脳皮質と海馬に一致した画像が得られた。しかし，Tg (-) マウスでは全ての個体で陽性描出は観察されなかった。視覚的の評価結果を Table 10 に示した。何れの個体においても， ^{11}C -PiB の PET 像と ^{123}I -DRM106 の SPECT 像は，FSB 染色の A β 凝集部位とよく一致した。

3.3. ^{123}I -DRM106 の SPECT 像および ^{11}C -PiB の PET 像の相関性

同一個体における SPECT 像の脳皮質・海馬対小脳の放射能比と同一領域の PET 像の binding potential との相関を Fig.18 に示した。PET 像と SPECT 像の相関係数 $r = 0.95$ ($P < 0.01$) で高い相関性が示された。

4. 考察

SPECT 用放射性リガンド候補品 ^{123}I -DRM106 の撮像と ^{11}C -PiB を用いた PET 像が同様の画像を描出できるか、Tg (+) および Tg (-) マウスの同一個体を用いて比較した。その後、FSB 組織染色を作成し A β 凝集体への沈着の確認を行った。

本研究で使用した Tg (+) マウスの A β 凝集体密度は、12 ヶ月齢から AD 様アミロイドの沈着が病理組織学的に確認されており¹⁵⁾、ヒトの AD 患者の脳に見られるものと同様のレベルである。したがって、AD モデルとして、広く使用されている。一方で、 ^{11}C -PiB の PET 像では、脳内 A β 凝集体の結合部位 [A $\beta_{\text{N3 (PE)}}$] が少ないとの報告¹⁹⁾もある。

今回の実験結果 (Fig. 12-17) では、Tg (+) マウスでの ^{11}C -PiB の PET 像および ^{123}I -DRM106 の SPECT 像は、何れも脳皮質 A β 凝集体に高い放射能の蓄積が描出された。一般的に通常飼育された非 Tg マウスの平均寿命は生後 24 ヶ月とされており、脳内に A β 凝集体が出現する時期に死亡が多発する。今回の実験では、28 ヶ月齢の老齢 Tg (+) マウスを使用したため、PiB との結合部位 [A $\beta_{\text{N3 (PE)}}$] が相対的に増えたと考えられた²⁵⁾。また、今回使用した ^{11}C -PiB の比放射能は、291 GBq/ μmol と高品質の標識体であり、このことが A β 凝集体の検出能に

寄与した可能性が考えられた²⁵⁾。また、視覚的評価では、PET 像 SPECT 像のいずれも、FSB 染色とよく一致した。ただし、今回の実験は、脳切片の厚さが 16 μm に対して、PET 像と SPECT 像のスライス厚が 0.5 mm であったことについては、考慮に入れておくべきである。

また、SPECT 像と PET 像における大脳皮質と小脳の放射能比は、高い相関 ($r = 0.95, P < 0.01$) が認められ、いずれの画像も、Tg (+) と Tg (-) マウスの A β の集積の違いを反映したと考えられた。

以上、¹²³I-DRM106 の SPECT 検査は ¹¹C-PiB をトレーサーとして利用した PET 検査と同等の A β 凝集体の検出能を有すると考えられた。

小括

¹²³I-DRM106 を用いた SPECT 像と ¹¹C-PiB を用いた PET 像を比較する目的で、同一のモデル動物を用いて A β 凝集体の描出能を評価した。Tg (+) マウスではいずれの画像も大脳皮質に分布する A β 凝集体が描出されたが、Tg (-) マウスでは描出されなかった。また、SPECT 像と PET 像における大脳皮質と小脳の放射能比は、高い相関が認められ、SPECT と PET のいずれの画像も、Tg (+) と Tg (-) マウスの A β 凝集体の集積の違いを反映した。このことから、このことから、¹²³I-DRM106 (SPECT) と ¹¹C-PIB (PET) は、同程度に A β 凝集体を検出できることが示唆された。以上の研究から、DRM106 は SPECT 用リガンドとして有望な開発候補品であると考えられた。

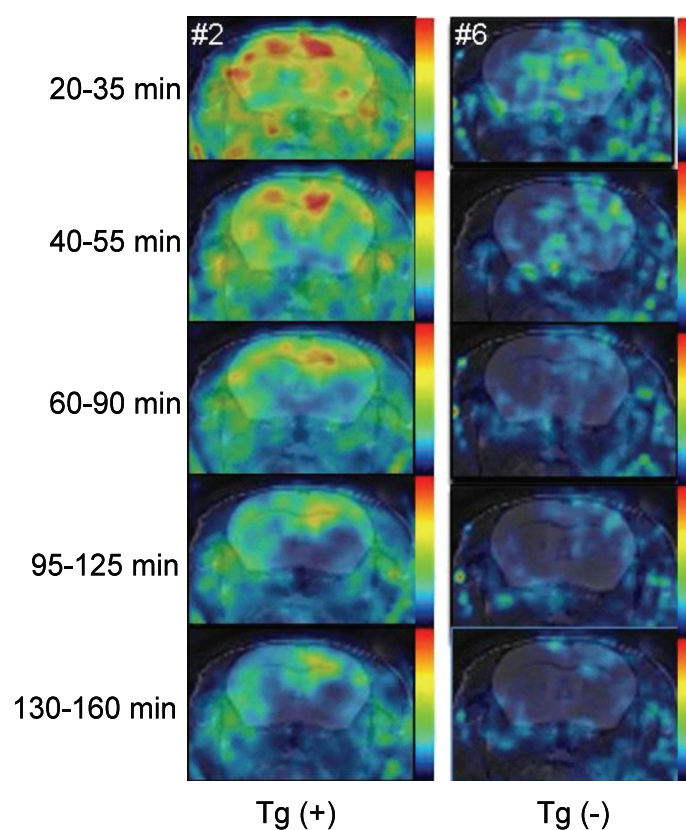


Fig. 10. Representative coronal SPECT images of ^{123}I -DRM106 on MRI templates in a 28-month-old Tg (+) (#2, left panels) or age-matched Tg (-) mouse (#6, right panels) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 via the tail vein. The upper to lower panels were shown as time-dependent washout radioactivity from the brain. The respective panels represent coronal images at 2 mm posterior to the bregma.

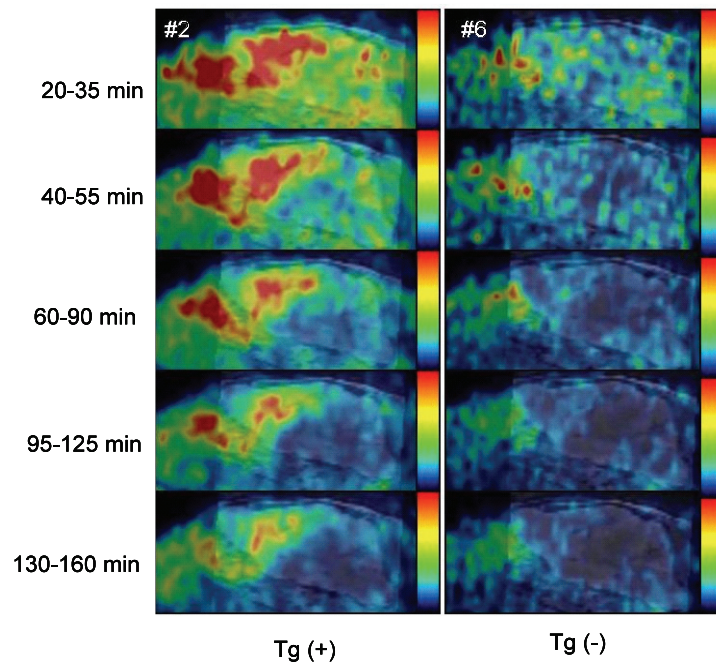


Fig. 11. Representative sagittal SPECT images of ^{125}I -DRM106 on MRI templates in a 28-month-old Tg (+)(#2, left panels) or age-matched Tg (-) mouse (#6, right panels) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 via the tail vein. The upper to lower panels were shown as time-dependent washout radioactivity from the brain.

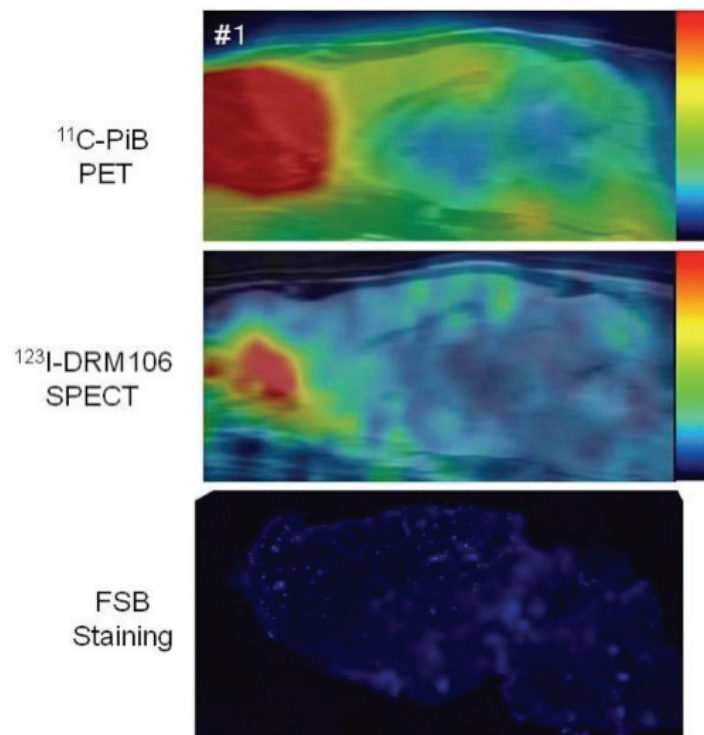


Fig. 12. Sagittal ^{11}C -PiB PET image (upper panel), ^{123}I -DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a female 28-month-old Tg (+) mouse (#1) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ^{11}C -PiB via the tail vein.

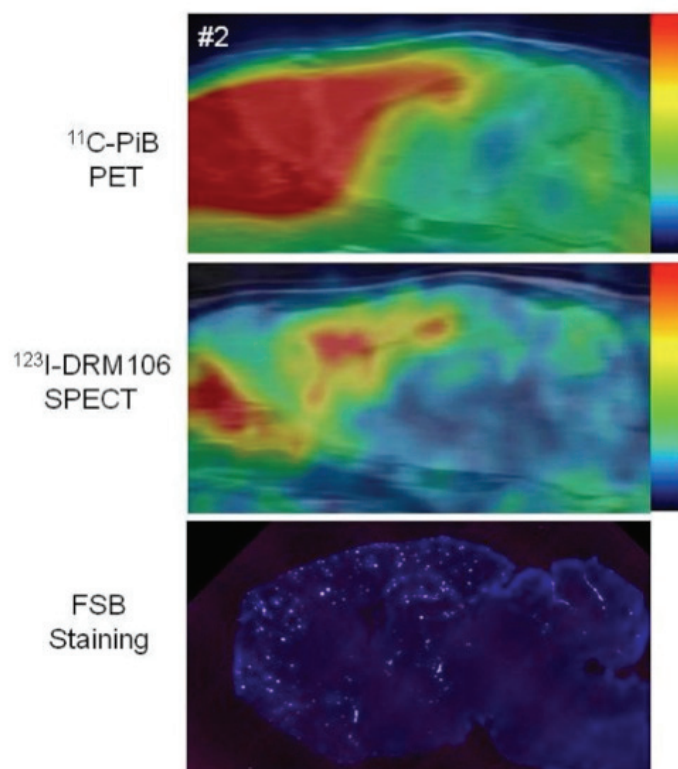


Fig. 13. ¹¹C-PiB PET image (upper panel), ¹²³I-DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a female 28-month-old Tg (+) mouse (#2) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ¹²⁵I-DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ¹¹C-PiB via the tail vein.

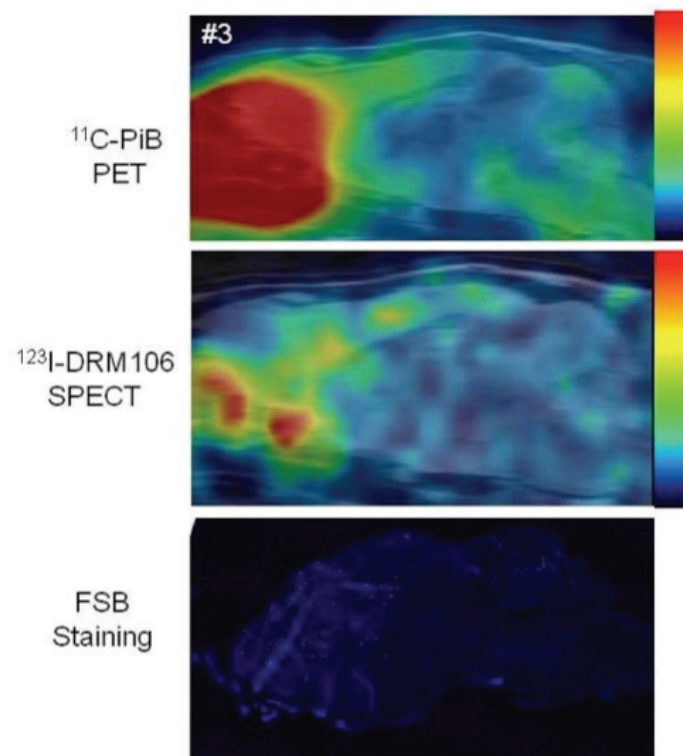


Fig. 14. ¹¹C-PiB PET image (upper panel), ¹²³I-DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a male 28-month-old Tg (+) mouse (#3) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ¹²⁵I-DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ¹¹C-PiB via the tail vein.

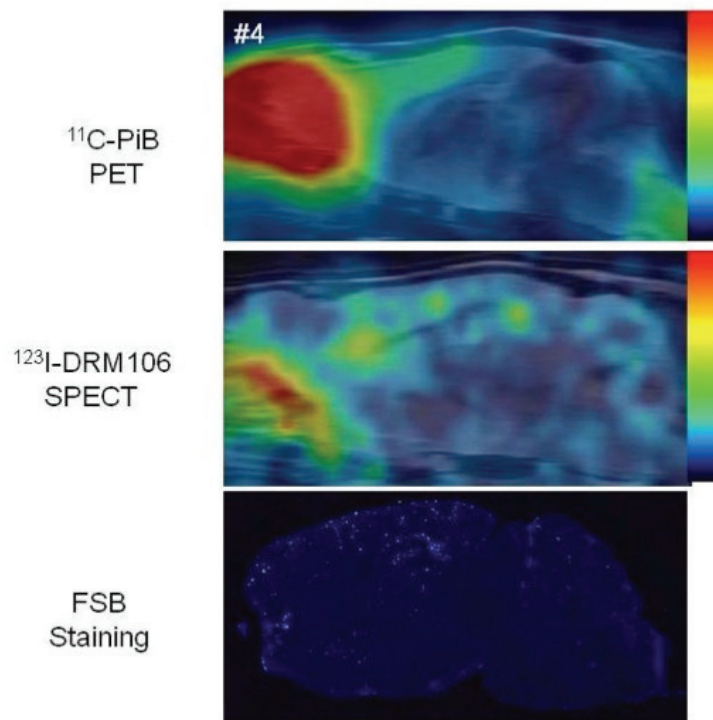


Fig. 15. ^{11}C -PiB PET image (upper panel), ^{123}I -DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a male 28-month-old Tg (+) mouse (#4) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ^{125}I -DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ^{11}C -PiB via the tail vein.

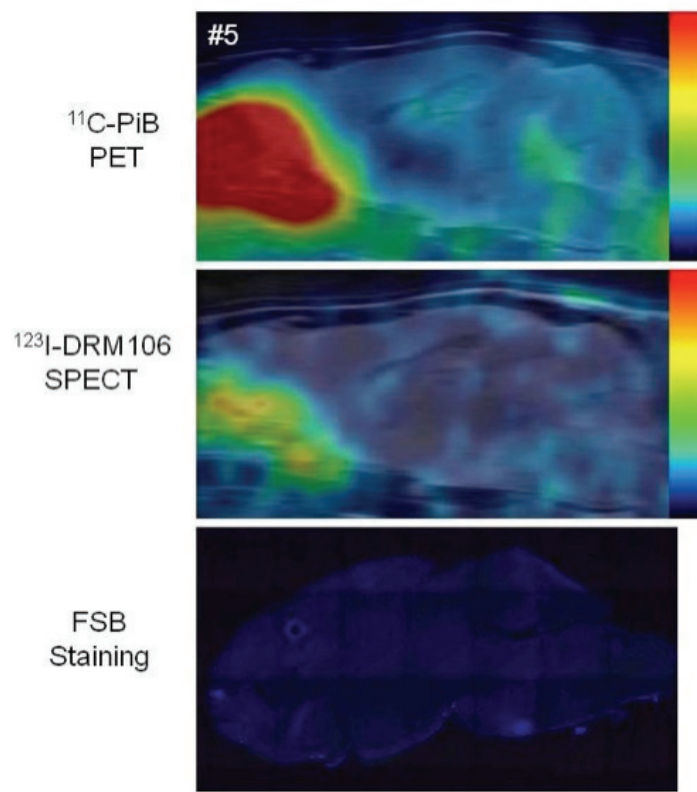


Fig. 16. ¹¹C-PiB PET image (upper panel), ¹²³I-DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a male 28-month-old Tg (-) mouse (#5) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ¹²⁵I-DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ¹¹C-PiB via the tail vein.

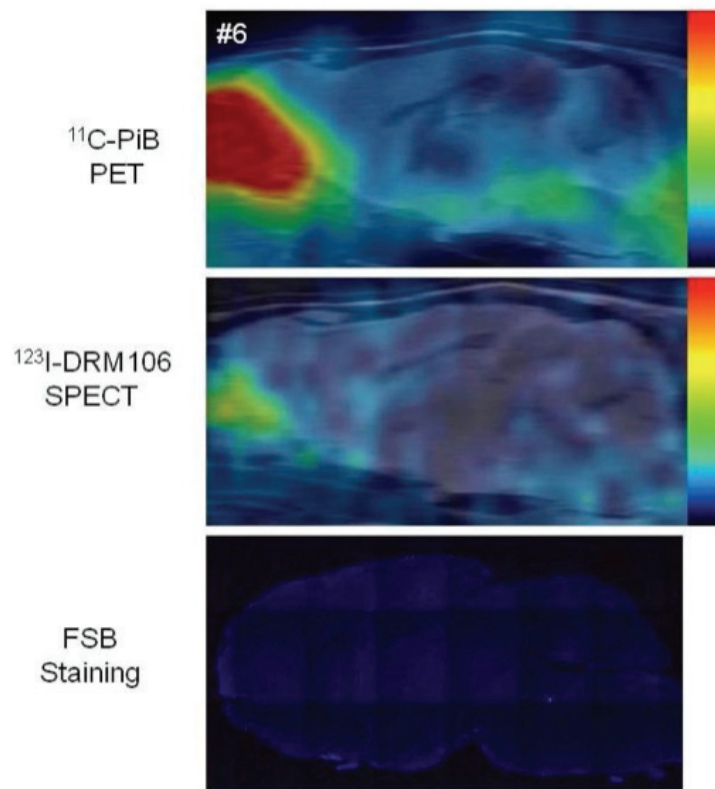


Fig. 17. ¹¹C-PiB PET image (upper panel), ¹²³I-DRM106 SPECT image (middle panel) and FSB staining (lower panel) in a male 28-month-old Tg (-) mouse (#6) receiving a bolus injection of 340-350 MBq/mouse of ¹²⁵I-DRM106 and 30.0 ± 6.8 MBq/mouse of ¹¹C-PiB via the tail vein.

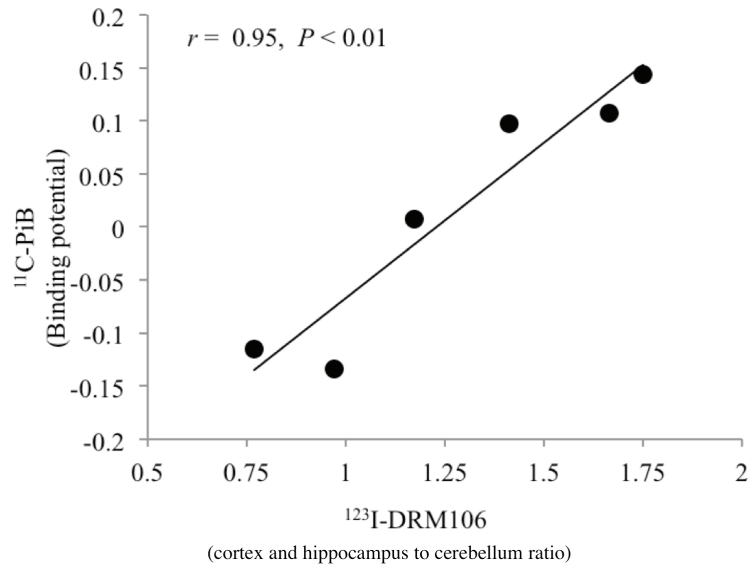


Fig. 18. Correlation of the binding between ^{123}I -DRM106 SPECT and ^{11}C -PiB PET. The data of individual mouse ($n = 6$), which received both ^{11}C -PiB and ^{123}I -DRM106, were used for correlation analysis.

Table 10. *In vivo* of ^{11}C -PiB PET and ^{123}I -DRM106 SPECT imaging of radioactivity accumulation in A β plaques were compared with the same brain section that was stained with FSB. Visually evaluated in grading as excellent , good, fair and poor rating scale for the degree of consistency.

Animal No.	^{11}C -PiB PET	^{123}I -DRM106 SPECT
1	excellent	excellent
2	excellent	excellent
3	excellent	excellent
4	excellent	excellent
5	excellent	excellent
6	excellent	excellent

総括

認知症とは、高次脳機能が後天的な器質的損傷によって低下し、日常生活に支障をきたす疾患で、日本では高齢化に伴い増加している。現在、65歳以上の日本人の15%、462万人が認知症に罹患しており、その70%がアルツハイマー病（AD）によると考えられている。ADの早期診断は、病態の進行を遅らせる医療処置が行えることや患者自身と家族が適切な社会的対応をとることが可能になることから、喫緊の課題になっている。ADは、神経細胞への amyloid- β ($A\beta$) の蓄積が神経病理学的変化の特徴の一つであるが、脳組織を試料とするため生前の確定診断は不可能である。そのため、蓄積した $A\beta$ を非侵襲的に把握することができれば、ADを早期に診断することができると考えられる。ADの核医学診断には ^{11}C -Pittsburgh compound B を用いた positron emission tomography (PET) が先行している。しかし、多くの PET 用トレーサーは物理学的半減期が短く、装置も高価であるため充分普及しているとはいえない。一方で、single photon emission computed tomography (SPECT) で使用されるヨウ素トレーサー (^{123}I) は、物理学的半減期が比較的長く（13時間）、装置も普及していることから、SPECTで $A\beta$ を特異的に描出するリガンドが開発できれば臨床診断における有用性は高いと考えられる。

そこで本研究では、脳内 $A\beta$ 凝集体に親和性を持つ imidazopyridine 誘導体を基本構造とした化合物に着目し、 $A\beta$ 凝集体の脳内分布を検出するための SPECT 用リガンドの開発を目的として、以下4章に亘り検討を加えた。

第1章では、SPECT 用リガンドを選抜する目的で、開発候補品

DRK092, DRM101, DRM102, DRM105 および DRM106 に対して, A β への親和性および脂溶性 (logD7.4) を *in vitro* 系で検討した。その結果, A β 凝集体親和性および脂溶性から, DRM106 は 5 つの開発候補品の中で最も候補品としての特性を有すると考えられた。

第 2 章では, 第 1 章で選抜された DRM106 の体内動態と脳移行性を調べるために, 正常な Sprague-Dawley ラットを用いて ¹²⁵I で標識した DRM106 (0.37 MBq/rat) の体内組織分布および脳組織の代謝活性を検討した。すなわち, 静脈内投与 2, 5, 15, 30 分, 1, 2, 5, 8, 24 および 48 時間後に各組織の放射能濃度 (%ID/g), 組織内放射能分布率 (%ID) および脳内代謝物の thin layer chromatography パターンを調べた。その結果, DRM106 の良好な脳移行性と速やかなクリアランスが示された。また, 脳内代謝解析では, DRM106 の脳内代謝物は認めなかった。

第 3 章では, DRM106 の A β 凝集体描出能を評価するため, AD モデルの雌性 Tg (+) マウスと陰性対照として同腹の雄性 Tg (-) マウスを用いて, ¹²⁵I で標識した DRM106 (1.3 MBq/mouse) 静脈内投与後の A β 凝集体への集積性について autoradiogram で解析した。その結果, Tg (+) マウスの autoradiogram は Congo-red 染色とよく一致した。このことから, DRM106 は脳の A β 凝集体に特異的に集積することが示された。

第 4 章では, ¹²³I-DRM106 を用いた SPECT 像と ¹¹C-PiB を用いた PET 像を比較する目的で, 同一のモデル動物を用いて A β 凝集体の描出性を評価した。SPECT 像は, ¹²³I で標識した DRM106 (345 MBq/mouse) をトレーサーとして実験動物用 SPECT 装置で撮影した。また, PET 画像是 ¹¹C-Pittsburgh compound B (30 MBq/mouse) をトレーサーとして,

実験動物用 PET 装置で撮影した。その結果, Tg (+) マウスではいずれの画像も大脳皮質に分布する A β 凝集体が描出されたが, Tg (-) マウスでは描出されなかった。また, SPECT 像と PET 像における大脳皮質と小脳の放射能比は, 高い相関 ($r = 0.95, P < 0.01$) が認められ, SPECT と PET のいずれの画像も, Tg (+) と Tg (-) マウスの A β 凝集体の集積の違いを反映した。このことから, ^{123}I -DRM106 (SPECT) と ^{11}C -PIB (PET) は, 同程度に A β 凝集体を検出できることが示唆された。

以上の研究から, imidazopyridine 誘導体を基本構造とした DRM106 は, A β 凝集体に特異的に集積する新たな SPECT 用リガンドとして有望な開発候補品であると結論する。

謝辞

本稿を終えるにあたり，本論文のご高閲およびご指導を賜った帯広畜産大学 山田 一孝教授に謹んで感謝の意を表します。また，本論文作成に対し，ご助言，ご指導頂きました帯広畜産大学 佐々木 直樹准教授，岩手大学 古濱 和久教授，東京農工大学 下田 実教授，岐阜大学 海野 年弘教授に深謝いたします。さらに，学術論文執筆にあたり終始ご指導いただいた独立行政法人 放射線医学総合研究所 季 斌主任研究員，東北大学 山口 敏朗博士，独立行政法人 医薬基盤研究所 中山 敦博士，富士フイルム RI ファーマ株式会社 笠原 裕行博士，坂東和則博士，佐野 浩亮博士にお礼申し上げます。また，A β リガンドを提供いただいた富士フイルム RI ファーマ株式会社，AD モデル動物を提供いただいた第一三共株式会社にお礼申し上げます。

参考文献

1. Braak, H., Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl)*. 82, 239-259.
2. Camus, V., Payoux, p., Barre, L., Desgranges, B., Voisin, T., Tauber, C., La Joie, R., Tafani, M., Hommet, C., Chetelat, G., Mondon, K., de La Sayette, V., Cottier, J. P., Beaufils, E., Ribeiro, M. J., Gissot, V., Vierron, E., Vercoillie, J., Vellas, B., Eustache, F., Guilloteau, D. (2012). Using PET with 18F-AV-45 (florbetapir) to quantify brain amyloid load in a clinical environment. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 39, 621-631.
3. Chang, K. W., Chen, C. C., Lee, S. Y., Wang, H. E. (2009). Acute toxicity of two Alzheimer's disease radiopharmaceuticals: FDDNP and IMPY. *Drug Chem. Toxicol.* 32, 429-437.
4. Chen, C. J., Bando, K., Ashino, H., Taguchi, K., Shiraishi, H., Shima, K., Fujimoto, O., Kitamura, C., Mastushima, S., Uchida, K., Nakahara, Y., Kasahara, H., Minamizawa, T., Jiang, C., Suhara, T., Higuchi, M., Yamada, K., Ji, B. (2014). Synthesis and biological evaluation of novel radioiodinated imidazopyridine derivatives for amyloid- imaging in Alzheimer disease. *Bioorg. Med. Chem.* 22, 4189-4197.
5. Chen, C. J., Bando, K., Ashino, H., Taguchi, K., Shiraishi, H., Shima, K., Fujimoto, O., Kitamura, C., Morimoto, Y., Kasahara, H., Minamizawa, T., Jiang, C., Zhang, M. R., Suhara, T., Higuchi, M., Yamada, K., Ji, B. (2014). Biological evaluation of the radioiodinated imidazo[1,2-*a*] pyridine derivative DRK092 for

- amyloid- β imaging in mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 581, 103-108.
6. Cheng, Y., Ono, M., Kimura, H., Ueda, M., Saji, H. (2012). Technetium-99m labeled pyridyl benzofuran derivatives as single photon emission computed tomography imaging probes for beta-amyloid plaques in Alzheimer's brains. *J. Med. Chem.* 55, 2279-2286.
 7. Choi, S. R., Golding, G., Zhuang, Z., Zhang, W., Lim, N., Hefti, F., Benedum, T. E., Kilbourn, M. R., Skovronsky, D., Kung, H. F. (2009). Preclinical properties of 18F-AV-45: a PET agent for Abeta plaques in the brain. *J. Nucl. Med.* 50, 1887-1894.
 8. Cselényi, Z., Jönhagen, M. E., Forsberg, A., Halldin, C., Julin, P., Schou, M., Johnström, P., Varnäs, K., Svensson, S., Farde, L. (2012). Clinical validation of 18F-AZD4694, an amyloid-beta-specific PET radioligand. *J. Nucl. Med.* 53, 415-424.
 9. Engler, H., Forsberg, A., Almkvist, O., Blomquist, G., Larsson, E., Savitcheva, I., Wall, A., Ringheim, A., Langstrom, B., Nordberg, A. (2006). Two-year follow-up of amyloid deposition in patients with Alzheimer's disease. *Brain.* 129, 2856-2866.
 10. 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. (2013). A 18F-labeled BF-227 derivative as a potential radioligand for imaging dense amyloid plaques by positron emission tomography. *Mol. Imaging Biol.* 15, 497-506.

11. Hampel, H., Wilcock, G., Andrieu, S., Aisen, P., Blennow, K., Broich, K., Carrillo, M., Fox, N. C., Frisoni, G. B., Isaac, M., Lovestone, S., Nordberg, A., Prvulovic, D., Sampaio, C., Scheltens, P., Weiner, M., Winblad, B., Coley, N., Vellas, B. (2011). Biomarkers for Alzheimer's disease therapeutic trials. *Prog. Neurobiol.* 95, 579-593.
12. Hsiao, I. T., Huang, C. C., Hsieh, C. J., Hsu, W. C., Wey, S. P., Yen. T. C., Kung, M. P., Lin K. J. (2012). Correlation of early-phase 18F-florbetapir (AV-45/Amyvid) PET images to FDG images: preliminary studies. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 39, 613-620.
13. Ikonomic, M. D., Klunk, W. E., Abrahamson, E. E., Mathis, C. A., Price, J. C., Tsopelas, N. D., Lopresti, B. J., Ziolk, S., Bi, W., Paljug, W. R., Debnath, M. L., Hope, C. E., Isanski, B. A., Hamilton, R. L., DeKosky, S. T. (2008). Post-mortem correlates of *in vivo* PiB-PET amyloid imaging in a typical case of Alzheimer's disease. *Brain.* 131, 1630-1645.
14. Ito, H., Shinotoh, H., Shimada, H., Miyoshi, M., Yanai, K., Okamura, N., Takano, H., Takahashi, H., Arakawa, R., Kodaka, F., Ono, M., Eguchi, Y., Higuchi, M., Fukumura, T., Suhara, T. (2014). Imaging of amyloid deposition in human brain using positron emission tomography and 18F-FACT: comparison with 11C-PIB, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 41, 745-754.
15. Kawarabayashi, T., Younkin, L. H., Saido, T. C., Shoji, M., Ashe K. H., Younkin, S. G. (2001). Age-dependent changes in brain, CSF, and plasma amyloid (beta) protein in the Tg2576 transgenic mouse model

- of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 21, 372-381.
16. Kerns, E. H., Di, L., Petusky, S., Kleintop, T., Huryn, D., McConnell, O., Carter, G. (2003). Pharmaceutical profiling method for lipophilicity and integrity using liquid chromatography–mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 791, 381-388.
17. Kessler, R. M., Ansari, M. S., de Paulis, T., Schmidt, D. E., Clanton, J. A., Smith, H. E., Manning, R. G., Gillespie, D., Ebert, M. H. (1991). High affinity dopamine D2 receptor radioligands. 1. Regional rat brain distribution of iodinated benzamides. *J. Nucl. Med.* 32, 1593-1600.
18. Klunk, W. E., Engler, H., Nordberg, A., Wang, Y., Blomqvist, G., Holt, D. P., Bergstrom, M., Savitcheva, I., Huang, G. F., Estrada, S., Ausen, B., Debnath, M. L., Barletta, J., Price, J. C., Sandell, J., Lopresti, B. J., Wall, A., Koivisto, P., Antoni, G., Mathis, C. A., Langstrom, B. (2004). Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann. Neurol.* 55, 306-319.
19. Klunk, W. E., Lopresti, B. J., Ikonovic, M. D., Lefterov, I. M., Koldamova, R. P., Abrahamson, E. E., Debnath, M. L., Holt, D. P., Huang, G.F., Shao, L., DeKosky, S. T., Price, J. C., Mathis, C. A. (2005). Binding of the positron emission tomography tracer Pittsburgh compound-B reflects the amount of amyloid-beta in Alzheimer's disease brain but not in transgenic mouse brain. *J. Neurosci.* 25, 10598-10606.
20. Kung, M. P., Hou, C., Zhuang, Z. P., Zhang, B., Skovronsky, D., Trojanowski, J. Q., Lee, V. M., Kung, H. F. (2002). IMPY: an

- improved thioflavin-T derivative for in vivo labeling of beta-amyloid plaques, *Brain Res.* 956, 202-210.
21. Kung, M. P., Hou, C., Zhuang, Z. P., Cross, A. J., Maier, D. L., Kung, H. F. (2004). Characterization of IMPY as a potential imaging agent for beta-amyloid plaques in double transgenic PSAPP mice. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 31, 1136-1145.
22. Kung, M. P., Weng, C. C., Lin, K. J., Hsiao, I. T., Yen, T. C., Wey, S. P. (2012). Amyloid plaque imaging from IMPY/SPECT to AV-45/PET. *Chang. Gung. Med. J.* 35, 211-218.
23. Leinonen, V., Alafuzoff, I., Aalto, S., Suotunen, T., Savolainen, S., Nagren, K., Tapiola, T., Pirttila, T., Rinne, J., Jaaskelainen, J. E., Soininen, H., Rinne, J. O. (2008). Assessment of beta-amyloid in a frontal cortical brain biopsy specimen and by positron emission tomography with carbon 11-labeled Pittsburgh Compound B. *Arch. Neurol.* 65, 1304-1309.
24. Lombardo, F., Shalaeva, M. Y., Tupper, K. A., Gao, F. (2001). ElogD_{oct}: a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *J. Med. Chem.* 44, 2490-2497.
25. Maeda, J., Ji, B., Irie, T., Tomiyama, T., Maruyama, M., Okauchi, T., Staufenbiel, M., Iwata, N., Ono, M., Saido, T. C., Suzuki, K., Mori, H., Higuchi, M., Suhara, T. (2007). Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J. Neurosci.* 27,10957-10968.
26. Maya, Y., Ono, M., Watanabe, H., Haratake, M., Saji, H., Nakayama,

- M. (2009). Novel radioiodinated aurones as probes for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in the brain. *Bioconjug. Chem.* 20, 95-101.
27. Motulsky H. (2003). Analyzing data with GraphPad Prism. *GraphPad Software, Inc.*; 81-96.
28. Nakano, Y., Kondoh, G., Kudo, T., Imaizumi, K., Kato, M., Miyazaki, J. I., Tohyama, M., Takeda, J., Takeda, M. (1999). Accumulation of murine amyloidbeta42 in a gene-dosage-dependent manner in PS1 'knock-in' mice. *Eur. J. Neurosci.* 11, 2577-2581.
29. Newberg, A. B., Wintering, N. A., Plossl, K., Hochold, J., Stabin, M. G., Watson, M., Skovronsky, D., Clark, C. M., Kung, M. P., Kung, H. F. (2006). Safety, biodistribution, and dosimetry of 123I-IMPY: a novel amyloid plaque-imaging agent for the diagnosis of Alzheimer's disease. *J. Nucl. Med.* 47, 748-754.
30. Okello, A., Koivunen, J., Edison, P., Archer, H. A., Turkheimer, F. E., Nagren, K., Bullock, R., Walker, Z., Kennedy, A., Fox, N. C., Rossor, M. N., Rinne, J. O., Brooks, D. (2009). Conversion of amyloid positive and negative MCI to AD over 3 years: an 11C-PIB PET study. *Neurology.* 73, 754-760.
31. Ono, M., Cheng, Y., Kimura, H., Watanabe, H., Matsumura, K., Yoshimura, M., Iikuni, S., Okamoto, Y., Ihara, M., Takahashi, R., Saji, H. (2013). Development of novel 123I-labeled pyridyl benzofuran derivatives for SPECT imaging of beta-amyloid plaques in Alzheimer's disease. *PLoS One.* 8, e74104.
32. Qu, W., Kung, M. P., Hou, C., Oya, S., Kung, H. F. (2007). Quick

- assembly of 1,4-diphenyltriazoles as probes targeting beta-amyloid aggregates in Alzheimer's disease. *J. Med. Chem.* 50, 3380-3387.
33. Snellman, A., Rokka, J., Lopez-Picon, F. R., Eskola, O., Wilson, I., Farrar, G., Scheinin, M., Solin, O., Rinne, J. O., Haaparanta-Solin, M. (2012). Pharmacokinetics of [18F]flutemetamol in wild-type rodents and its binding to beta amyloid deposits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 39, 1784-1795.
34. Sunderland, T., Linker, G., Mirza, N., Putnam, K. T., Friedman, D. L., Kimmel, L. H., Bergeson, J., Manetti, G. J., Zimmermann, M., Tang, B., Bartko, J. J., Cohen, R. M. (2003). Decreased beta-amyloid1-42 and increased tau levels in cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer disease. *J. Am. Med. Assoc.* 289, 2094-2103.
35. Watanabe, H., Ono, M., Ikeoka, R., Haratake, M., Saji, H., Nakayama, M. (2009). Synthesis and biological evaluation of radioiodinated 2,5-diphenyl-1,3,4-oxadiazoles for detecting beta-amyloid plaques in the brain. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 6402-6406.
36. Zhang, W., Kung, M. P., Oya, S., Hou, C., Kung, H. F. (2007). 18F-labeled styrylpyridines as PET agents for amyloid plaque imaging. *Nucl. Med. Biol.* 34, 89-97.
37. Zhuang, Z. P., Kung, M. P., Wilson, A., Lee, C. W., Plossl, K., Hou, C., Holtzman, D. M., Kung, H. F. (2003). Structure-activity relationship of imidazo[1,2-a]pyridines as ligands for detecting beta-amyloid plaques in the brain. *J. Med. Chem.* 46, 237-243.

Summary

Dementia is defined generally as a symptom for higher-order brain dysfunction which is severe enough to interfere with daily life. At present in Japan, the number of patients with dementia increases with age. Approximately 15% of Japanese over 65-years-old, 4.62 million people, are considered to suffer from dementia. Of this population, Alzheimer's disease (AD) accounts for approximately 70%. An early diagnosis for AD is extremely important, because its pathological progression can be delayed by appropriate medical interventions, and the social activity between patients and their families can be enhanced or improved. Confirming the deposition of amyloid- β ($A\beta$) is thought to be one of the neuropathological AD hallmarks, but it is difficult to detect cerebral $A\beta$ deposition non-invasively in the living subjects. Positron emission tomography (PET) and single photon emission computed tomography (SPECT) are paid most attention clinically as novel nuclear medicine. Although PET using ^{11}C -labeled Pittsburgh compound B (^{11}C -PiB) as a tracer has been successfully employed in clinical trials, it has a shortened physical half-life with an expensive appurtenance. Meanwhile, an iodine-labeled (^{123}I) SPECT tracer possesses a long physical half-life (13 hr), and SPECT scanners have been widely used. If a specific $A\beta$ ligand for SPECT can be found, it would be a useful tool for diagnosing AD. In this research, the author tried to discover a SPECT ligand agent having a high affinity to cerebral $A\beta$ deposition among the imidazopyridine derivatives as follows.

In chapter 1, the affinity to A β fibrils and lipophilicity of 5 candidate (DRK092, DRM101, DRM102, DRM105, DRM106) compounds for SPECT were examined in an *in vitro* system. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the binding affinity to A β (1-40) fibril was evaluated. Taken together, these results, suggested that DRM106 was a promising candidate for the amyloid- β ligand for detecting cerebral A β aggregation.

In chapter 2, the biodistribution and metabolism of DRM106 in the brain were assessed using 30 each healthy male and female SD rats respectively, given intravenous ¹²⁵I-labeled DRM106 (0.37 MBq/rat). In the biodistribution study, the radioactivity in the brain was measured at 2, 5, 15, and 30 min and 1, 2, 5, 8, 24 and 48 hr post-injection by a gamma counter. To assess effects on brain metabolism, cerebral homogenates were prepared and analyzed with thin layer chromatography for detecting metabolites. The results showed an excellent brain uptake and clearance of DRM106, no metabolites in the brain were observed at any of the sampling points.

In chapter 3, the A β disposition of DRM106 was examined by autoradiogram using the AD model with female Tg (+) mice and littermate male Tg (-) mice given intravenous ¹²⁵I-DRM106 (1.3 MBq/mouse). The accumulation of radioactivity only in Tg (+) mice was completely consistent with A β plaques to the specific A β Congo-red stain.

In chapter 4, SPECT images with DRM106 were compared to PET images with ¹¹C-PiB (30 MBq/mouse) in Tg (+) mice and littermate Tg (-) mice given intravenous ¹²³I-DRM106 (345 MBq/mouse). SPECT images were obtained by SPECT scanner for small animals, and PET images were performed by MicroPET. Both DRM106 and PiB depicted higher

accumulation in the cerebral A β aggregation region of Tg (+) mice, but not in Tg (-) mice. Quantitative analysis for A β detection between SPECT and PET revealed a strong correlation ($r = 0.95$, $P < 0.01$), implying that SPECT imaging with ^{123}I -DRM106 is almost as good as PET imaging with ^{11}C -PiB for the detectability of A β aggregates.

In conclusion, imidazopyridine core structure DRM106 makes it a promising SPECT candidate specifically binding to cerebral A β aggregates.