
原 著

全身性アミロイドーシス検索薬 ^{125}I -EISB の研究 ～最適反応時間および安定性の検討～

柏昂希*, 副島彩花**, 松永浩文***, 山下太郎****, 富吉勝美*****

Study of ^{125}I -EISB for Detecting Systematic Amyloidosis ～Evaluation for optimal synthesis time and stability of ^{125}I -EISB～

Koki Kashiwa*, Ayaka Soejima**, Yoshifumi Matsunaga***, Taro Yamashita****, Katsumi Tomiyoshi*****

Abstract: 1-(2-methyl-ethoxy)-2,5-bis(styryl) benzene (EMSB) is newly synthesized and reacted with ^{125}I with Kripffix222 to obtain 1-(^{125}I -ethoxy)-2,5-bis(styryl) benzene (^{125}I -EISB) which is a new amyloid imaging probe that can image amyloid by Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT). The purpose of study is to determine the optimal synthesis time and clarify stability of ^{125}I -EISB in saline and human serum, respectively. We synthesized ^{125}I -EISB and injected ^{125}I -EISB into saline and human serum. We used high performance liquid chromatography (HPLC) to acquire radiochemical purity of ^{125}I -EISB. We assess changes of radiochemical purity of ^{125}I -EISB over time. As a result, high radioactive purity $95.88 \pm 3.19\%$ was obtained in 10 minutes by our synthesis and the radiochemical purity was $97.83 \pm 1.40\%$ ($n=6$) applying our purification system. Radiochemical purity 24 hours later was $94.01 \pm 2.09\%$ after injecting in saline. That was $94.23 \pm 1.20\%$ after injecting in human serum. From these results, optimal synthesis time was determined 10 minutes and radiochemical purity of ^{125}I -EISB was stably maintained in saline and human serum, respectively.

Key words: systematic amyloidosis, radiochemical yield, stability, SPECT

受付日 2017 年 11 月 13 日 採択日 2018 年 2 月 2 日

*熊本大学大学院保健学教育部 **熊本大学医学部保健学科 ***熊本大学大学院薬学教育部

****熊本大学医学部付属病院 *****熊本大学大学院生命科学研究部

投稿責任者: 富吉勝美 ktomiyo@kumamoto-u.ac.jp

I. はじめに

アミロイドーシスは繊維構造をもつ不溶性蛋白であるアミロイドが、臓器沈着することによって機能障害を引き起こす疾患の総称として定義される^{1,2)}。アミロイドーシスは、全身性諸臓器にアミロイドが沈着する全身性アミロイドーシスと、ある臓器に局限した沈着を示す限局性アミロイドーシスに大別される²⁾。

アルツハイマー病のような脳の限局性アミロイドーシスでは、脳生検自体の侵襲性が高く、出血などのリスクとなり得ることから生検による診断は

不適切である場合が多い³⁾。このため、アルツハイマー病の患者と健常者の鑑別だけでなく、認知機能障害が発現する前の早期診断が可能である ^{11}C -Pittsburgh compound B (^{11}C -PIB) に代表されるような核医学検査は、診療戦略を立てるうえで有用なエビデンスを提供する技術である⁴⁻⁶⁾。一方、全身性アミロイドーシスの確定診断は生検による²⁾。全身性アミロイドーシスが疑われる場合、アミロイド沈着の検出感度と安全性を総合的に判断したうえで、生検部位を決定する²⁾。アミロイドは病理学的に congo red 染色で赤橙色に染まり、偏光顕微鏡下で緑色の偏光を呈する物質として同定される^{1,7)}。生

検部位としては、アミロイドが沈着している消化管、皮膚、腹壁脂肪があるが、侵襲性が高く生検をためらう腎や心臓にもアミロイドが存在することがある²⁾。さらに、congo red 染色は偏光顕微鏡下で検討しても、陽性なのか陰性なのか正確に判断しかねる場合があり、早期診断も困難である^{1,7)}。したがって、Positron Emission Tomography (PET) や Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT) により全身性アミロイドーシスを画像化できれば、in vivo で非侵襲的にアミロイドの蓄積量およびその空間的分布を評価可能な客観的診断法となる可能性が高く²⁾、早期診断や治療経過のモニタリングが可能になると考える。

これまでに、安東らにより、Congored 誘導体で毒性・発がん性などの問題が少ない、アミロイド診断薬(trans,trans)-1-bromo-2,5-bis-(3-hydroxycarbonyl-4-hydroxy) styrylbenzene (BSB) が開発され、シンチグラフィとしてアミロイド沈着の検出に有用である可能性を示した^{6,7)}。さらに、中園らにより、BSB の誘導体として 1-Methoxy-2,5-bis (styryl) benzene (MSB) が開発された⁸⁾。MSB は様々なアミロイドの検出に有用であることが示され、組織化学検査のみならず、全身のアミロイドを検出するのに有用な PET 薬剤になることが示唆された⁸⁾。また、MSB に放射性化合物を標識するための脱離基を付加した 1-(2-mestyl-ethoxy) -2,5-bis (styryl) benzene (EMSB) が合成された⁸⁾。

これまで congo red 誘導体でスチリルベンゼン骨格を有する様々なアミロイド検出薬が開発されており⁶⁻⁹⁾、EMSB の脱離基であるメシル基を放射性ヨウ素に置換した 1-(I-ethoxy)-2,5bis (styryl) benzene (EISB) も同様にスチリルベンゼン骨格を持つためアミロイドに対し親和性を有すると推測され、SPECT 検査によるアミロイド診断薬となると考えられる。

しかしながら、EISB を安定供給するための最適反応時間の検討は成されていない。さらに血液中での EISB の安定性評価は今後の臨床試験のために重要な検討項目である。EISB に用いる放射性ヨウ素の候補には¹²³I (半減期 13 時間, γ 線 energy: 159keV) , ¹²⁵I (半減期 60 日, 特性 X 線 energy: 27.5 keV k_{α} , 31keV k_{β}) が挙げられるが、¹²³I は半減期が短いため、

動物実験等には適していない。このため、これらの検討を行うには、¹²⁵I による EISB 合成が最適である。

本研究の目的は、EMSB に ¹²⁵I を標識合成する際の最適反応時間の決定すること、得られた 1-(2-¹²⁵I-ethoxy)-2,5bis (styryl) benzene (¹²⁵I-EISB) の血液中での化学的安定性の評価を行うことである。

II. 方法および材料

2-1 使用薬品

標識合成に使用した薬品はシアン化メチル(アセトニトリル, ナカライ), 4,7,13,16,21,24-Hexaoxa-1,10-diazabicyclo [8.8.8] hexacosane (Kryptofix222, Sigma-Aldrich) とした。Kryptofix222 は使用容量が 0.25mg/mL となるようにアセトニトリルに溶解して用いた。分取精製で用いた薬品はアセトニトリル, 無水エタノール (ナカライ) および Tween80 (Wako) とした。

2-2 使用機器

合成には、ヒーター(Electrothermal)とオイルバス(OS-180 ADVANTEC)を用いた。

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 分析には Alliance HPLC system (e2695 Separations Module, Waters) , RI 検出器にはラジオ HPLC アナライザー-Model Ramona Star-(エムエス株式会社), フラクションコレクタには Waters Fraction Collector III (Waters)を用いた。

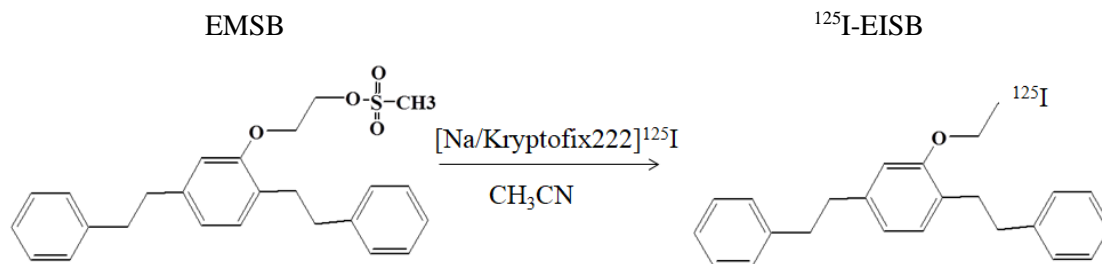
2-3 前駆物質

標識化合物 ¹²⁵I-EISB の前駆物質として用いた EMSB (分子式: C₂₅H₂₄O₄S, 分子量: 420.52) は、熊本大学薬学部創薬基盤分子設計学教室で合成されたものを使用した。

2-4 標識合成

反応式を Fig. 1 に示すごとく、Kryptofix222 を用いて、EMSB のメシル基と ¹²⁵I の求核置換反応により ¹²⁵I-EISB を得た。

Na¹²⁵I (PerkinElmer, Inc.) に相間移動触媒である Kryptofix222 を 200 μ L 加え、ヒーターを用いて 100°C

Fig. 1 ¹²⁵I-EISB 標識合成の化学反応式

で加熱乾固させた。さらに無水アセトニトリルを 200 μ L 加え、同様に 100 $^{\circ}$ C で加熱し、共沸乾燥させた。500 μ L の EMSB を加え密封し、オイルバス内でシリコンオイル (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) を 180 $^{\circ}$ C に加熱し、その中に浸すことで密封反応させた。密封反応の際の反応時間を 5 分、10 分、15 分、20 分と変化させ、標識合成時の最適反応時間を求めた。

2-5 分取精製

分取精製には、簡便かつ短時間できるよう、Sep-Pak C18 (Waters) カートリッジを用いて固相抽出による分取精製を行った。

標識反応後の ¹²⁵I-EISB 溶液を流速 6mL/min で HPLC 分析し、フラクションコレクタである Waters Fraction Collector (Waters) を用いて 0~20 分まで 1 分間ごとに採取し、分析結果と照らし合わせ、¹²⁵I-EISB が含まれている溶液を Sep-Pak C18 に通し、¹²⁵I-EISB を保持した。その後、無水エタノール 2mL を Sep-pak C18 に通し ¹²⁵I-EISB を溶離させた。界面活性剤である Tween80 (100 倍希釈) を 500 μ L 加え、100 $^{\circ}$ C で加熱しエタノールを蒸発させ、生理食塩水を加えた。

その後、ラジオ HPLC アナライザー分析にて放射能を測定した。分析時の溶離液にはアセトニトリルと蒸留水を 80 : 20 の割合で混合したものを用い、流速は 1mL/min とした。また、カラムには Wakosil-II 5C18AR (内径 4.6mm \times 長さ 250mm) (Wako) を用いた (Table 1)。放射化学的純度は式(1)を用いて算出した。

Table 1 分取精製及び生理食塩水投与後の HPLC 分析条件

カラム	Wakosil-II 5C18AR (内径 4.6mm \times 長さ 250mm) (Wako)
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 (80/20)
流速	1mL/min
検出器	ラジオ HPLC アナライザー (Model Ramona Star) (エムエス株式会社)
保持時間	20~22 分

放射化学的純度

$$= \frac{\text{目的の化合物の化学形の放射能}}{\text{全体の放射能}} \times 100[\%] \quad (1)$$

¹²⁵I-EISB がカラムに導入されてから溶出されるまでの時間 (保持時間) は、熊本大学薬学部創薬基盤分子設計学教室で合成及び核磁気共鳴により同定された ¹²⁷I-EISB と同条件で HPLC 分析することで同定した。

ヨウ化ナトリウム (¹²³I 及び ¹³¹I) カプセルの純度試験¹⁰⁾を参考に ¹²⁵I-EISB 以外の放射能が総放射能の 5% 以下であることを品質管理基準として設定した。

2-6 安定度の測定

¹²⁵I-EISB の血中での安定度を評価するために *in vitro* で生理食塩水中和とヒト血清中における ¹²⁵I-EISB の放射化学的純度を経時的に測定した。

生理食塩水およびヒト血清に品質管理基準を満たした ¹²⁵I-EISB を加え、37 $^{\circ}$ C で 24 時間インキュベートし、経時的に HPLC 分析を行った。分取精製時と同様に式(1)を用いて放射化学的純度の算出を行い、安定性を検討した。

生理食塩水における HPLC 分析条件は分取精製時と同様とした。また、ヒト血清における HPLC 分析条件は、溶離液は同じくアセトニトリルと蒸留水を 80:20 で混合したものを用いて、流速は 5mL/min とした。生理食塩水と比べて血液中では、ヒト血清中に含まれる蛋白により内圧上昇があるため、カラムには Wakosil-II 5C18HG (内径 10.0mm×長さ 300mm) (Wako)を用いた (Table2)。放射化学的純度計算は、分取精製後と同様とした。

Table2 ヒト血清投与後の HPLC 分析条件

カラム	Wakosil-II 5C18HG (内径 10.0mm×長さ 300mm) (Wako)
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 (80/20)
流速	5mL/min
検出器	ラジオ HPLC アナライザー (Model Ramona Star) (エムエス株式会社)
保持時間	29~31 分

III. 結果

3-1 標識合成

Fig. 2 は、反応時間と放射化学的純度の関係を示しており、横軸が反応時間、縦軸が放射化学的純度である。Table3 は反応温度 180°Cでの各反応時間における放射化学的純度を示している。反応時間 10 分で 95.88±3.19%の最も高い放射化学的純度を示し、

その後 20 分までは緩やかに 93.78±2.51%に減少した。

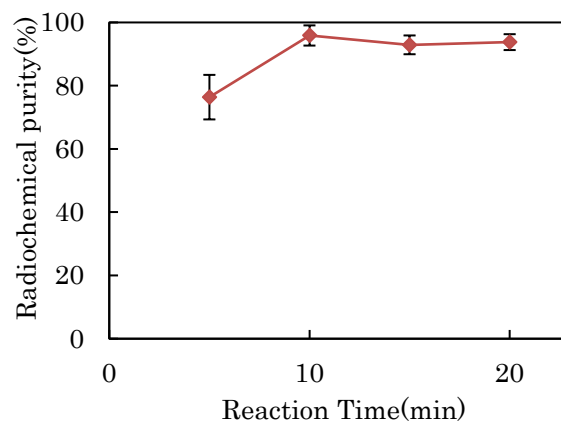


Fig. 2 反応時間と ¹²⁵I-EISB 放射化学的純度の関係 (n=3)

Table3 反応時間による放射化学的純度の比較

反応時間(分)	5	10	15	20
放射化学的純度(%)	76.38	95.88	92.92	93.78
	±7.04	±3.19	±2.97	±2.51

3-2 分取精製

Fig. 3 は、分取精製後の HPLC 分析結果を示し、横軸が保持時間を表し、縦軸は RI 検出器の応答を表す。分取精製により ¹²⁵I-EISB の放射化学的純度は、97.83±1.40% (n=6) であった。¹²⁵I-EISB 以外の放射能は総放射能の 5%以下であり、品質管理基準を満たした。

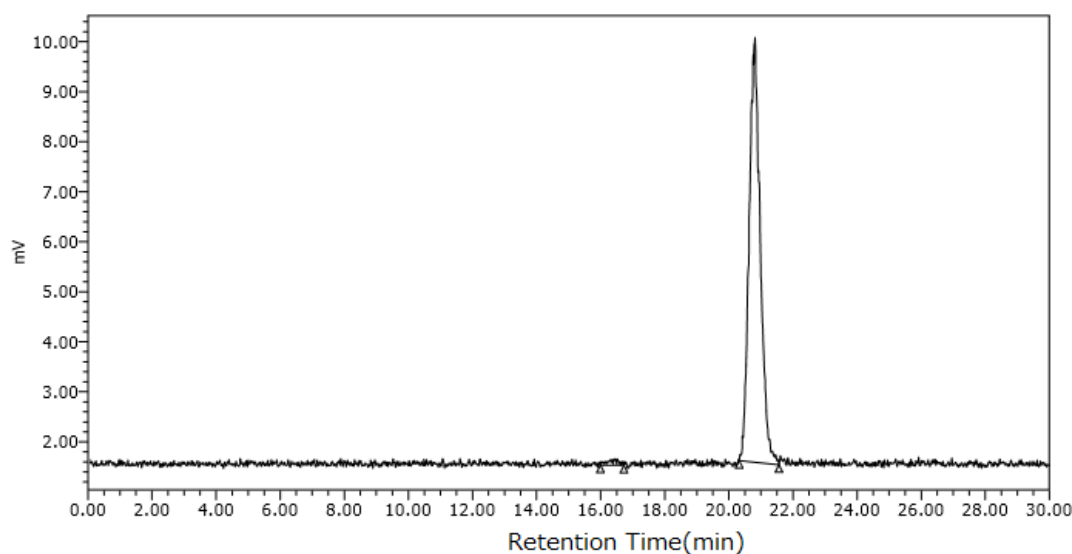


Fig. 3 ¹²⁵I-EISB 分取精製後の HPLC 分析結果

3-3 生理食塩水中における安定度

Fig. 4 は生理食塩水中での時間経過による放射化学的純度の関係を示し、横軸が生理食塩水に ^{125}I -EISB を投与してからの経過時間を示す。 ^{125}I -EISB の放射化学的純度は、生理食塩水に投与直後 $96.13 \pm 2.31\%$ 、30 分後 $96.04 \pm 2.20\%$ 、1 時間後 $96.36 \pm 2.54\%$ 、2 時間後 $96.23 \pm 2.77\%$ 、6 時間後 $95.89 \pm 2.32\%$ 、12 時間後 $94.97 \pm 2.46\%$ 、24 時間後 $94.01 \pm 2.09\%$ であり、24 時間経過後でわずか 2% 程度の減少であった (各時間において $n=3$)。

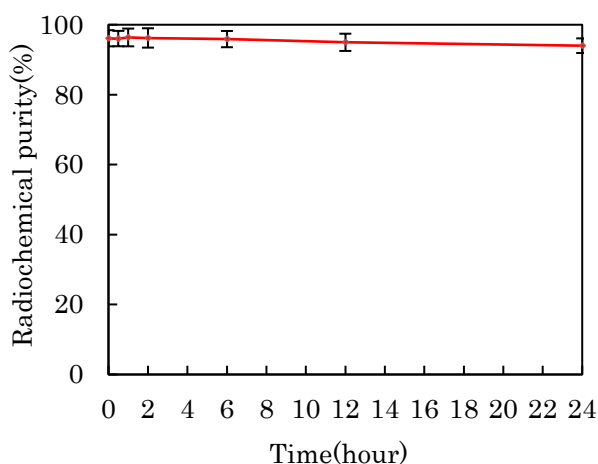


Fig. 4 生理食塩水中における ^{125}I -EISB の放射化学的純度の関係 ($n=3$)

3-4 ヒト血清中における安定度

Fig. 5 はヒト血清中での時間経過による放射化学的純度の関係を示し、横軸がヒト血清に ^{125}I -EISB を投与してからの経過時間、縦軸が ^{125}I -EISB の放射化学的純度を表す。 ^{125}I -EISB の放射化学的純度は、ヒト血清に投与直後 $96.34 \pm 0.41\%$ 、3 時間後 $95.91 \pm 0.59\%$ 、6 時間後 $95.85 \pm 0.72\%$ 、12 時間後 $95.05 \pm 0.63\%$ 、24 時間後 $94.23 \pm 1.20\%$ であり、生理食塩水中と同等であった (各時間において $n=3$)。

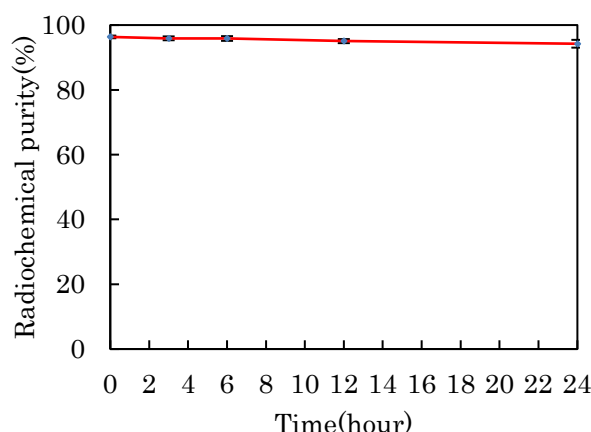


Fig. 5 ヒト血清中における ^{125}I -EISB の放射化学的純度の関係 ($n=3$)

IV. 考察

本研究では、EMS のメシル基と ^{125}I の求核置換反応により ^{125}I -EISB を得るための最適反応時間を実験的に決定した。反応時間 10 分で放射化学的純度は $95.88 \pm 3.19\%$ と最も高い値を示し、その後 20 分までは緩やかに $93.78 \pm 2.51\%$ に減少した (Fig. 2, table 3)。このことから、反応時間は 10 分が最適であると考えられた。

生理食塩水中とヒト血清中での ^{125}I -EISB の化学的安定性評価では、いずれも良好な安定度を示した (Fig. 4, 5)。放射性標識化合物を有効に利用するためには、分解が起こる前に使用される必要がある。少なくとも、24 時間以内であれば、分解の少ない ^{125}I -EISB の使用が可能であると考えられる。

標識化合物の分解の原因には、壊変による分解やエネルギー吸収による分解、化学的原因による分解がある^{11,12)}。放射性標識化合物のエネルギーの吸収による分解は、吸収されやすい β 線が最も大きいとされる^{10,11)}。本研究では、軌道電子捕獲核種である ^{125}I を使用しており、 β 線放射がないことから、エネルギーの吸収による分解は極めて小さいと考える。一方、化学的原因による分解は光や酸素、温度、微生物などの原因により分解が促進されるが、体温を想定した 37°C でインキュベートした環境で生理食塩水やヒト血清中での分解が見られなかったこ

とから、 ^{125}I -EISB は体内においても化学的に安定であることが予想される。

マウス等を用いて非臨床試験を行うには、体内における代謝などによる生物学的安定性を評価する必要がある¹³⁾。さらに、放射性ヨウ素の標識化合物の安定性を評価する上で重要となるのは、標識化合物の放射化学的純度の低下よりは、標識化合物から遊離されるヨウ化物の量である¹⁰⁾。本研究では、*in vitro* における生理食塩水中とヒト血清中での化学的安定性しか評価しておらず、代謝等による生物学的安定性については実施していない。代謝による分解を評価するためには、*in vivo* での評価が必要となるため、今後はマウスなどを用いて投与後経時的に採血や採尿を行い、化学分析等を行うことでさらに詳しい評価を行う必要がある。さらに、臨床応用に向け、生物学的安定性が確認された後、マウス等を用いた非臨床試験により ^{125}I -EISB の体内動態試験を行う必要がある。

V. 結語

EMSBB のメシル基と ^{125}I の求核置換反応により ^{125}I -EISB を得るための最適反応時間は 10 分であり、生理食塩水とヒト血清中における ^{125}I -EISB は精製後 24 時間までは安定であったことから、体内においても ^{125}I -EISB は化学的に安定であることが予想された。今後、*in vivo* で生物学的安定性の評価を行う必要がある。

参考文献

- 山田正仁：アミロイドーシス UPDATE, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2010.
- 山田正仁：アミロイドーシス診療のすべて, 医歯薬出版株式会社, 東京, 2011.
- Y. Ando, et al: A novel tool for detecting amyloid deposits in systemic amyloidosis *in vitro* and *in vivo*. *Lab. Invest.* 83 (12): 1751-1759, 2003.
- Mathis CA, et al: Synthesis and evaluation of ^{11}C -labeled 6-substituted 2-arylbenzothiazoles as amyloid imaging agents. *J Med Chem.* 46: 2740-2754. 2003.
- Klunk WE, et al: Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh compound-B. *Ann Neurol.* 55:306-319, 2004.
- Serdons K, et al: Synthesis of ^{18}F -labelled 2-(4'-fluorophenyl)-1,3-benzothiazole and evaluation as amyloid imaging agent in comparison with [^{11}C]PIB. *Bioorg Med Chem Lett* 19:602-605, 2009.
- 安東由喜雄：全身性アミロイドーシスの新たな診断法. 同仁ニュース. 104: 1-5, 2002.
- Nakazono M, et al: Novel styrylbenzen derivatives for detecting amyloid deposits. *Clinica Chimica Acta.* 436: 27-34, 2014.
- Z.P. Zhuang, et al. Radioiodinated Styrylbenzenes and Thioflavins as Probes for Amyloid Aggregates. *J. Med. Chem.* 44 (12), 1905-14, 2001.
- 日本放射性医薬品協会：放射性医薬品基準解説書. 124-145. 日本放射性医薬品協会, 2016.
- 花田博之：放射化学（放射線技術学シリーズ）. 101-102. オーム社, 東京, 2008.
- Bayly, R. J, et al: stability and storage of compounds labeled with radioisotopes. *Journal of Labelled Compounds*, Vol.2, No.1; 1966.
- 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会：医薬品非臨床試験ガイドライン解説 2010, 薬事日報社, 東京, 2010.