

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19300158

研究課題名（和文） 高磁場 MR 装置を用いたパーキンソン病の画像診断法の開発

研究課題名（英文） Development of diagnostic methods for Parkinson disease using high fielded magnetic resonance imaging

研究代表者

遠山 育夫 (TOOYAMA IKUO)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・教授

研究者番号：20207533

研究成果の概要（和文）：本研究では、7 テスラ高磁場 MR 装置を用い非放射性フッ素 ( $^{19}\text{F}$ ) を標的にしたフッ素核磁気共鳴画像法 ( $^{19}\text{F}$ -MRI) によるパーキンソン病の画像診断法の開発を行った。まず  $^{19}\text{F}$ -DOPA および  $^{19}\text{F}$  を含むドパミン神経関連化合物について検討した結果、 $^{19}\text{F}$ -DOPA で最も高い S/N 比が得られた。次に、培養細胞実験を行い PC12 細胞内に取り込まれた  $^{19}\text{F}$ -DOPA の画像化に成功した。さらに動物実験を行い、6-OHDA 投与パーキンソンモデルラットの腹腔内に  $^{19}\text{F}$ -DOPA 後、線条体に取り込まれた  $^{19}\text{F}$ -DOPA の画像化に成功した。本研究の結果は、高磁場 MR 装置を用いたパーキンソン病の画像診断法開発の重要な基礎データを提供している。

研究成果の概要（英文）：We examined the feasibility of high fielded MRI, particularly  $^{19}\text{F}$ -MRI, for the diagnosis of Parkinson disease using PC12 cells and 6OH-dopamine treated rats. We measured  $^{19}\text{F}$ -NMR signals in the homogenates of rat brain and several agents such as 6- $^{19}\text{F}$ -fluoro-L-DOPA ( $^{19}\text{F}$ -DOPA) and chemicals that are involved in the activity of dopamine neurons. Among them,  $^{19}\text{F}$ -DOPA showed the best signal to noise ratio. When  $^{19}\text{F}$ -DOPA was added into culture medium of PC12 cells, MR images of  $^{19}\text{F}$ -DOPA in about 50 mg of PC12 cells were successfully detected. When we measured the brain from 6-OH-dopamine treated rats that received intra-peritoneal injection of  $^{19}\text{F}$ -DOPA, MR images of  $^{19}\text{F}$ -DOPA in the striatum were successfully detected by 10 hours measurements of 7-tesla MRI. This study gives us the fundamental data for the development of diagnostic methods for Parkinson disease using high fielded MRI.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008 年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,300,000	3,990,000	17,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：パーキンソン病、核磁気共鳴、診断薬、フッ素MR画像法

### 1. 研究開始当初の背景

わが国では、高齢化社会の進展によりアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経難病患者数が増加しており、その解決は大きな社会的課題である。これまでこれらの神経変性疾患の原因は不明で治療法もなかったが、近年、分子遺伝学をはじめとする学問の進歩により、ようやく根本治療法が開発されようとしている。これら治療法を生かすためには、早期に確実に病気を診断する診断技術が強く求められている。なかでも核磁気共鳴画像法(MRI)は、ヒトにやさしい低侵襲的な医療として、市民の期待も高まっている。一般の病院に普及しているMR画像装置は1-3テスラのものが一般的であるが、研究分野ではここ2、3年の間に急速に高磁場化が進んでおり、7-11テスラの動物実験用MR画像装置が導入されている。

高磁場MR装置を用いると、従来のプロトンMR画像のみならず、フッ素や炭素などのMR画像化が可能になる。なかでもフッ素MR画像法は、比較的感度が高く、フッ素原子が体内にほとんど存在しないため、フッ素原子を含む良質の診断薬を合成できれば、感度よくMR画像化することができる。

近年、放射性フッ素( $^{18}\text{F}$ )で標識されたDOPA( $6\text{-}^{18}\text{F}\text{-fluoro-L-DOPA}$ ;  $^{18}\text{F}\text{-DOPA}$ )が、ポジトロン断層法(PET)を用いた画像解析における脳内ドパミン神経活性の評価やパーキンソン病の診断において注目されている。しかしながら、PETでは、放射線を用いることによる放射線被曝や、サイクロトロンを用いて使用直前に放射性化合物を合成する必要があるなどの問題点が挙げられる。そこで、放射性同位元素 $^{18}\text{F}$ の代わりに安定同位元素 $^{19}\text{F}$ を用いることにより、PETに代わる(あるいは補う)安全な次世代の分子イメージング法となる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、7テスラ高磁場MR装置を用い非放射性フッ素( $^{19}\text{F}$ )を標的にしたフッ素核磁気共鳴画像法( $^{19}\text{F}\text{-MRI}$ )によるパーキンソン病の画像診断法の開発のための基盤的技術を開発することである。

そのために以下の点を明らかにした。

(1)  $^{19}\text{F}\text{-DOPA}$  および  $^{19}\text{F}$  を含むドパミン神経関連化合物の  $^{19}\text{F}\text{-MRI}$  プローブとしての有用性を明らかにする。

(2) 細胞内に取り込まれた  $^{19}\text{F}\text{-DOPA}$  が

$^{19}\text{F}\text{-NMR}$  および  $^{19}\text{F}\text{-MRI}$  により検出可能であるか、PC12細胞を用いて明らかにする。

(3) 神経毒6-hydroxydopamine (6-OHDA) をラット左黒質に微量注入し、半側性PDモデル動物を作製し、 $^{19}\text{F}\text{-NMR}$  および  $^{19}\text{F}\text{-MRI}$  により検出する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬

使用した薬物および入手先は、次のとおりである。6-Hydroxydopamine (6-OHDA; Sigma, St Louis, MO, USA)、DOPA (Sigma)、 $^{19}\text{F}\text{-DOPA}$  (Advanced Biochemical Compounds, Radeberg, Germany)、 $3\text{-}^{19}\text{F}\text{-fluoro-L-tyrosine}$  ( $^{19}\text{F}\text{-L-tyrosine}$ ; 東京化成工業, 東京)、 $3\text{-}^{19}\text{F}\text{-fluoro-DL-tyrosine}$  ( $^{19}\text{F}\text{-tyrosine}$ ; SynQuest, Alachua, FL, USA)、GBR13069 dihydrochloride (GBR13069; Tocris Cookson Inc., Ellisville, MO, USA)、GBR12909 dihydrochloride (GBR12909; Tocris Cookson Inc.),  $3\alpha\text{-bis-(4-fluorophenyl) methoxytropine hydrochloride}$  ( $3\alpha\text{-bis-FPMT}$ ; Tocris Cookson Inc.), flupenthixol (Sigma)、fenfluramine (Sigma)、haloperidol (Sigma)、benseraside (Sigma)、ネンブタール (Abbott, Abbot Park, IL, USA)、dihydroxybenzylamine (DHBA; Sigma)。

#### (2) 培養細胞

培養細胞は、神経細胞のモデル株として広く用いられているラット副腎髄質由来親クロム性細胞腫PC12細胞を用いた。培養条件は $37^{\circ}\text{C}$ 、95% air-5%  $\text{CO}_2$ とし、100 mm径のポリスチレン培養皿(IWAKI, 東京)を用い、ペニシリン 100 unit/mL およびストレプトマイシン 100  $\mu\text{g/mL}$ を含むDMEMに、 $56^{\circ}\text{C}$ 、30 minで非動化したウシ胎児血清(fetal bovine serum)を10%となるように、同様に非動化したウマ血清(horse serum)を5%となるように添加した培養液中で培養した。

#### (3) 実験動物

実験動物は、Wistar系雄性ラット(体重280g、清水実験材料、京都)を使用した。動物は $21^{\circ}\text{C}$ の恒温において飼育し、水やえさは自由に摂取させた。照明は12時間サイクルとした(8:00~20:00)。動物実験は、動物実験に関する指針(日本実験動物学会)、およ

び滋賀医科大学の動物実験に関する指針に従った。

#### (4) ラット脳中化合物の $^{19}\text{F}$ -NMR 測定

ラットにネンブタール (50 mg/kg i. p.) を腹腔内投与した後、深麻酔下で開胸し、左心耳より経心的に 10 mM phosphate buffered saline (pH 7.4, PBS) を用いて灌流を行った。灌流後、脳を速やかに摘出した。

$^{19}\text{F}$ -DOPA、 $^{19}\text{F}$ -tyrosine、ドパミン  $\text{D}_2$  受容体遮断薬 haloperidol、ドパミントランスポーター阻害薬 GBR13069、GBR12909、3  $\alpha$ -bis-FPMT、非選択的ドパミン受容体遮断薬 flupenthixol、セロトニン放出薬 fenfluramine の計 8 種の  $^{19}\text{F}$ -標識されたドパミン神経系に作用する薬物をスクリーニングに用いた。水溶液サンプルは、それぞれの化合物の最終濃度が 1 mM となるように MilliQ Water を用いて調製した。脳ホモジネート溶液サンプルはラット前脳 1 g に対して PBS (-) 2 mL を加え、破砕機を用いてホモジナイズし、脳ホモジネート溶液を作製した。次に、4 mM の濃度に調製しておいたそれぞれの化合物の水溶液に対して 3 倍量の脳ホモジネート溶液を加え、最終薬物濃度 1 mM となるように脳ホモジネートサンプルを調製した。サンプル体積は 400  $\mu\text{L}$  とした。

NMR 装置 (JNM-GX270, JEOL, 東京) および F/H probe (F/H (5) GX270, JEOL) を用いて  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルの解析を行った。解析ソフトは、Alice2 (JEOL) を用いた。 $^1\text{H}$  を対象とした NMR ( $^1\text{H}$ -NMR) の標準物質である diphenylether ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_6\text{H}_5$ ) および  $^{19}\text{F}$ -NMR の標準物質として hexafluorobenzene ( $\text{C}_6\text{F}_6$ ) を用いて装置の調整を行い、 $\text{C}_6\text{F}_6$  の  $^{19}\text{F}$ -NMR シグナルケミカルシフトを -163 ppm と設定した。15 分間の解析を行い、S/N 比は、化合物間の  $^{19}\text{F}$ -NMR シグナル強度の目安としてピーク高さ/ノイズ高さより求めた。 $^{19}\text{F}$ -MRI 検出化合物のスクリーニングでは、15 分の解析時間で行った。

#### (5) PC12 細胞に取り込まれた化合物部の $^{19}\text{F}$ -NMR 測定

細胞内における  $^{19}\text{F}$ -NMR シグナルを検出できるか検討するために、PC12 細胞を用いて解析を行った。100 mm 径のポリスチレン培養皿でコンフルエントに達した PC12 細胞に、5 mM となるように DMEM に溶解した  $^{19}\text{F}$ -DOPA を処置し、37°C で 30 min 培養した。培養後の細胞は、上清回収後に十分量の PBS (-) を用いて 3 回洗浄し、新たな PBS (-) で培養皿 3 枚分の細胞を回収した。続いて、遠心処理を行い、細胞を集める際に用いた PBS (-) を回収した。その後、新たに 400  $\mu\text{L}$  の PBS (-) を加え細胞 2500 万個/400  $\mu\text{L}$  となるように細胞懸濁液を作製し、 $^{19}\text{F}$ -NMR サンプルとした。

また、 $^{19}\text{F}$ -tyrosine においても同様の処置を行い、細胞懸濁液を調製した。

7-テスラ MR 装置 (Unity Inova; Varian, Palo Alto, CA) を用いて 1 時間で解析を繰り返す、それぞれの解析データを重ねることで画像化を試みた。なお、洗浄に用いた PBS (-) を解析し、シグナルが検出されないことを確認した。

#### (6) パーキンソン病モデルラット (6-OHDA モデル) の作製

Wistar 系雄性ラットをネンブタール (50 mg/kg i. p.) 深麻酔下で脳定位装置に固定した。6-OHDA (8  $\mu\text{g}$ ) をラット脳地図に従い黒質 (冠矢交差から尾側へ 4.8 mm、外側へ 1.8 mm、硬膜下 7.8 mm) へマイクロインジェクションした。投与後 5 分間静置し、その後ゆっくりとシリンジを引き上げた。縫合は 4 号の医療用絹製縫合糸で行い、麻酔から覚醒するまで監視を行った。6-OHDA モデルラット作製より 10 日後において benserazide 前処置後 DOPA 投与により傷害側への旋回運動が認められることを確認し、さらに 7 日後において、benserazide 前処置の後に  $^{19}\text{F}$ -DOPA、 $^{19}\text{F}$ -L-tyrosine (10 mg/kg i. p.) をそれぞれ投与し、投与後 1 時間における傷害側への回転数を計測した。

作製した 6-OHDA モデルラットに benserazide 投与 15 分後において、 $^{19}\text{F}$ -DOPA (10 mg/kg i. p.) を腹腔内投与した。 $^{19}\text{F}$ -DOPA 投与後 30 分において、断頭により安楽死後ラット左右線条体を摘出した。摘出したラット脳を 7-テスラ MR 装置 (Unity Inova; Varian, Palo Alto, CA) を用いて 1 時間で解析を繰り返す、それぞれの解析データを重ねることで画像化を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) $^{19}\text{F}$ -NMR による $^{19}\text{F}$ -MRI 検出化合物のスクリーニング

脳内において、 $^{19}\text{F}$ -MRI により画像化可能な化合物を選定するために、MRI と同じ原理であり、より高分解能とされている NMR を用いて、 $^{19}\text{F}$  を含むドパミン神経関連化合物のスクリーニングを行った。分子内  $^{19}\text{F}$  が 1~3 個の  $^{19}\text{F}$ -DOPA、 $^{19}\text{F}$ -tyrosine、haloperidol、GBR13069、GBR12909、3  $\alpha$ -bis-FPMT、flupenthixol、および fenfluramine、計 8 種の化合物を用いて水溶液中、ラット脳ホモジネート中における  $^{19}\text{F}$ -NMR スペクトルの変化を解析した。その結果、ラット脳内では用いた全ての化合物において著しい S/N 比の低下が認められた。また、水溶液中において分子内に含む  $^{19}\text{F}$  数が多い化合物が高い S/N 比を示したものの、ラット脳ホモジネート中においては、分子内  $^{19}\text{F}$  数が少ない  $^{19}\text{F}$ -DOPA およ

び<sup>19</sup>F-tyrosineが他の化合物と比較して高いS/N比を示した(図1)

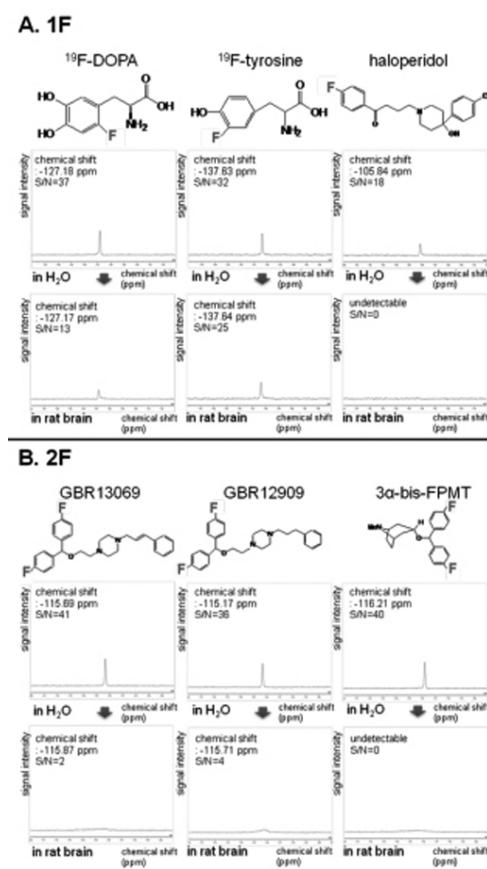


図1. 主な化合物の<sup>19</sup>F-NMRシグナル

主な化合物について、分子内<sup>19</sup>F数、つまり<sup>19</sup>F1個(A)、<sup>19</sup>F2個(B)にグループ分けした。それぞれの化合物において上段が水溶液中、下段がラット脳ホモジネート中での<sup>19</sup>F-NMRスペクトルを示している。

### (2) 培養細胞内における<sup>19</sup>F-DOPA検出と画像化

細胞内に取り込まれた<sup>19</sup>F-DOPAが<sup>19</sup>F-NMRにより検出可能であるか、PC12細胞を用いて検討を行った。<sup>19</sup>F-DOPAを処置し、十分に洗浄後、回収したPC12細胞を<sup>19</sup>F-NMRを用いて解析したところ、60分の解析時間により<sup>19</sup>F-DOPAの<sup>19</sup>F-NMRシグナルが検出された。

(図2A)。また、細胞回収の際に用いたPBS(-)を解析したところ、<sup>19</sup>F-DOPAのシグナルは検出されなかった(図2B)。PC12細胞内に取り込まれた<sup>19</sup>F-DOPAの検出が<sup>19</sup>F-NMRにより可能であることが示された。

そこで、7テスラMR画像装置を用いてPC12細胞内<sup>19</sup>F-DOPAの画像化を試みた。MRIにおける<sup>19</sup>F-NMRを検出したところ、約90分の解析時間により<sup>19</sup>F-DOPAのシグナルが認められた。また、<sup>19</sup>F-CSIを用いて撮像したところ、

10時間の解析時間により<sup>19</sup>F-DOPAの画像が得られた。<sup>1</sup>H-MRIおよび<sup>19</sup>F-CSIの重ね合わせ像より<sup>19</sup>F-DOPAはNMR測定チューブから検出された(図3)。

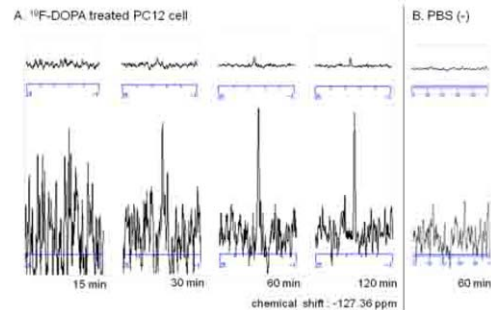


図2<sup>19</sup>F-NMRによるPC12細胞内<sup>19</sup>F-DOPA信号  
<sup>19</sup>F-DOPA処置PC12細胞における<sup>19</sup>F-NMRスペクトル(A)。<sup>19</sup>F-DOPA処置後、細胞を回収に用いたPBS(-)の<sup>19</sup>F-NMRスペクトル(B)。下段は、上段の<sup>19</sup>F-NMRスペクトルの拡大図。

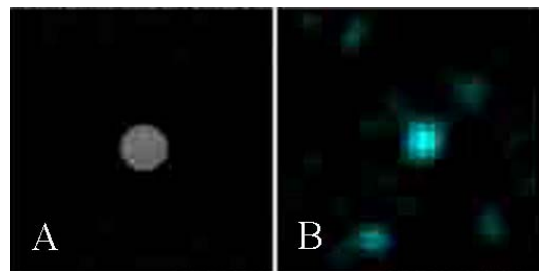


図3.<sup>19</sup>F-MRIによるPC12細胞内<sup>19</sup>F-DOPAの画像化

NMR測定管PBS(-)の<sup>1</sup>H-MRI像(A)とMRIにおける<sup>19</sup>F-DOPAの<sup>19</sup>F-NMR画像(B)。両者はよく一致する。

### (3) 6-OHDAモデルラット線条体における<sup>19</sup>F-DOPA画像化

神経毒6-hydroxydopamine(6-OHDA)をラット左黒質に微量注入し、半側性PDモデル動物を作製した。<sup>19</sup>F-DOPAを6-OHDAラット腹腔内投与後、線条体を切り出し、<sup>19</sup>F-DOPAに固有なケミカルシフトを対象とした<sup>19</sup>F-CSIを用いて撮像したところ、10時間の解析時間により、正常側にのみ<sup>19</sup>F-DOPAの画像が得られた(図4)。

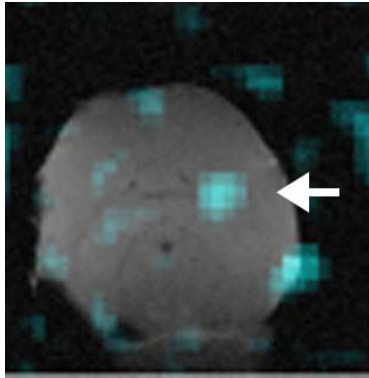


図 4 6-OHDA  
モデルラット摘出脳における脳内<sup>19</sup>F-DOPAの  
画像化

正常側にのみ画像信号を検出 (矢印)

以上の結果より、<sup>19</sup>F-MRI により <sup>19</sup>F-DOPA が細胞内および脳組織内において検出できるという性質が認められた。また、線条体の傷害により集積性・蓄積性が異なることが認められことから、<sup>19</sup>F-DOPA が線条体ドパミン神経活性の評価において有用な化合物であることが示された。しかしながら、実用化に関しては、課題も明らかになった。とくに測定に長時間を要することから、臨床応用に関しては、更なる高感度化が不可欠である。今回用いた MRI 装置は 7 テスラ実験動物用 MRI であったが、さらに高磁場を照射可能な装置も次々に開発されている。このような装置や測定方法の改良を含め、さらなる研究の継続が必要である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- 1) Amatsubo T, Morikawa S, Taguchi H, Tooyama I: Amyloid Imaging Using High-Field Magnetic Resonance. Magn Resn Med Sci (in press) (査読無) .
- 2) Abdelalim EM, Tooyama I: NPR-C is expressed in the cholinergic and dopaminergic amacrine cells in the rat retina. Peptides 31: 180-183, 2010 (査読有) .
- 3) Yanagida T, Tsushima J, Kitamura Y, Yanagisawa D, Takata T, Shibaike T, Yamamoto A, Taniguchi T, Yasui H, Morikawa S, Inubiushi T, Tooyama I, Agira H: Oxidative stress induction of DJ-1 protein in reactive astrocytes scavenges free radicals and reduces cell injury. Oxid Med Cell Longev. 2: 36-42, 2009(査読有).

- 4) Amatsubo T, Morikawa S, Matsuda K, Inubushi T, Urushitani M, Taguchi H, Shirai N, Hirao K, Kato M, Morino K, Kimura H, Nakano I, Yoshida C, Okada T, Sano M, Tooyama I: Trifluoromethoxy -benzylated ligands improve amyloid detection in the brain using <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging. Neurosci Res. 63: 76-81, 2009 (査読有) .
- 5) Morikawa S, Inubushi T, Morita M, Murakami K, Masuda C, Maki J, Tooyama I: Fluorine-19 Fast Recovery Fast Spin Echo Imaging for Mapping of 5-Fluorouracil. Magn Resn Med Sci 6: 235-240, 2008 (査読有) .

[学会発表] (計 4 件)

- 1) 遠山育夫、小田恵輔、柳沢大治郎、高田和幸、北村佳久、谷口隆之、森川茂廣、犬伏俊郎: パーキンソン病モデルラットにおける fluoro-dopa の MR 画像 第 5 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 2010 年 5 月 22 日-23 日 大津市.
- 2) 雨坪知音、森川茂廣、松田敬子、田口弘康、白井伸明、平尾浩一、遠山育夫: Trifluoromethoxy-benzylated 化合物と脳組織の相互作用による <sup>19</sup>F シグナル強度の変化 第 3 回日本分子イメージング学会総会・学術集会 2008 年 5 月 22 日-23 日 さいたま市.
- 3) Tomone Amatsubo, Shigehiro Morikawa, Keiko Matsuda, Toshiro Inubushi, Makoto Urushitani, Hiroyasu Taguchi, Nobuaki Shirai, Koichi Hirao, Masanari Kato, Kyuya Morino, Hirohiko Kimura, Ichiro Nakano, Chikako Yoshida, Takashi Okada, Mitsuo Sano, Ikuo Tooyama: Interaction of the brain tissues with trifluoromethoxy-benzylated ligands for amyloid detection using <sup>19</sup>F magnetic resonance imaging. 第 10 回国際アルツハイマー病会議 (ICAD2008) 2008 年 7 月 26 日~8 月 1 日 米国シカゴ市.
- 4) Makoto Urushitani, Chiaki Masuda, Hiroyasu Taguchi, Shigehiro Morikawa, Toshiro Inubushi, Nobuaki Shirai, Koichi Hirao, Ikuo Tooyama: MR tracking of transplanted neural cells using fluorinated poly-L-lysine-CF<sub>3</sub>. 第 37 回北米神経科学会議 (Neuro2007) 2007 年 11 月 3 日~11 月 7 日 米国サンディエゴ市.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

遠山 育夫 (TOOYAMA IKUO)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・  
教授

研究者番号：20207533

### (2) 研究分担者

田口 弘康 (TAGUCHI HIROYASU)

滋賀医科大学・分子神経科学研究センター・  
特任教授

研究者番号：90102912

### (3) 連携研究者

犬伏 俊郎 (INUBUSHI TOSHIRO)

滋賀医科大学・MR医学総合研究センター・  
教授

研究者番号：20213142