

## 平成 29 年度 ONSA 奨励賞（小林正和氏）受賞内容の紹介

金沢大学 小林氏は ONSA 奨励賞を受賞し、本来ならば平成 30 年 1 月 22 日のシンポジウムにて講演の予定であったが、大学での業務のため不可能であった。また現在長期外国出張中で、今年度の研究会やシンポジウムでの講演もできないため、それに代えて本稿を寄稿していただいた。

### 静注用放射性酸素-15 と持続注入法を組み合わせたラットの脳循環代謝測定法の開発

国立大学法人 金沢大学 医薬保健研究域附属健康増進科学センター 助教 小林正和

#### 1. はじめに

様々な脳疾患の診断に用いられる放射性同位元素（RI）を利用した脳循環代謝測定は、放射性  $^{15}\text{O}$  標識ガス等を用いたポジトロン CT（PET）検査で臨床使用されている。本法の歴史は半世紀近くになり、1970 年に、米国ワシントン大学の Ter-Pogossian らが、 $^{15}\text{O}$  標識酸素 ( $^{15}\text{O}_2$ ) をヘモグロビン（赤血球）に結合させ、動脈内投与する方法により世界で初めて脳局所の酸素代謝がヒトで測定可能となった[1]。彼らが開発した方法では、患者本人からの採血により血液を採取し、 $^{15}\text{O}_2$  ガスの単純なバブリングにより 37 MBq/mL の標識効率が得られたと報告されている。同時に  $\text{H}_2^{15}\text{O}$ 、 $\text{C}^{15}\text{O}$  を用いた測定も行われており、ほぼ現在の  $^{15}\text{O}$  ガス PET による脳循環代謝検査と同様の RI 検査が行われていた[1-4]。その後、1970 年代中盤から、酸素代謝測定は  $^{15}\text{O}_2$ 、 $\text{C}^{15}\text{O}_2$  を一定濃度の希ガスとして吸入させる定常法が主流となり[5]、赤血球に  $^{15}\text{O}_2$  ガスを標識して血管内投与する Ter-Pogossian らの手法は用いられなくなった。1980 年には Frackowiak らが、ガス定常吸入法による脳血流酸素代謝定量法の基礎を完成させ[6]、その後更に様々な補正法が加えられ、現在本邦で最も一般的かつ信頼性の高い PET を用いた脳循環代謝測定法が確立された。しかし、患者の呼吸状態に測定結果が影響され、PET 管理区域での非密封 RI の取り扱い規制等による放射性ガスの厳しい使用制限等様々な理由により、脳酸素代謝測定を実施する施設は年々減少している。臨床上  $^{15}\text{O}$  ガス PET 検査の有用性は十分に認識されており、更なる  $^{15}\text{O}$  ガス PET 検査の普及のためには、放射性薬剤合成や画像解析等の簡便化かつ取り扱いが容易な放射性薬剤による検査法の開発が望まれている。また、この測定法を実験動物に適用する場合には、動物の呼吸状態や、気道に存在する高放射能  $^{15}\text{O}$  ガスにより測定結果が影響される等の問題があり、脳血管障害の病態解明に関する基礎研究が妨げられていた。我々は、これらの問題を解決するために静注用  $^{15}\text{O}$  標識人工赤血球を開発した。この薬剤の注入法には、1 回注入法と持続注入法があり、我々は動物の生理状態を変化しない持続注入法を選択したが、従来の持続注入法では小動物に対する薬剤注入液量が多くなるという問題が考えられたため、液量を少なくする小動物用持続注入法を新たに考案した。本研究では、 $^{15}\text{O}$  ガス標識人工赤血球と動物用持続注入法を組み合わせることで、小動物を用いる基礎研究に適した脳循環代謝測定法を確立した。

#### 2. 方法と結果

##### 2-1. $^{15}\text{O}$ ガス標識に用いた人工赤血球

PET を用いた脳循環代謝測定法は、① $^{15}\text{O}$  標識一酸化炭素 ( $\text{C}^{15}\text{O}$ ) ガス、② $^{15}\text{O}$  標識二酸化炭素 ( $\text{C}^{15}\text{O}_2$ ) ガス又は  $^{15}\text{O}$  標識水 ( $\text{H}_2^{15}\text{O}$ )、③ $^{15}\text{O}_2$  ガスの 3 種類の各  $^{15}\text{O}$  標識薬剤投与後の動脈血中放射能と、脳画像上の局

所放射能の測定値を組み合わせることにより、脳循環代謝を正確に定量化できる。前述したように、 $C^{15}O$  ガスと  $^{15}O_2$  ガスの取り扱いが薬剤合成者及び医療従事者や動物実験者において煩雑なために、薬剤合成が簡便かつ取り扱いが容易な注射剤となる  $^{15}O$  ガス標識法を考案した。さらに、ヒトの脳酸素代謝率測定への臨床応用も考慮に入れ、人工赤血球を用いた静注用  $^{15}O$  標識ヘモグロビン含有リポソーム粒子 (hemoglobin-containing liposome vesicles; HbV) を開発した[7]。

この人工酸素運搬体として、ヘモグロビン重合体が既に市販されており、本研究に従事していた当時は、米国 OPK Biotech 社が動物用医薬品として Oxyglobin®、ヒト用酸素運搬製剤として Hemopure® を製造販売していた。いずれもウシ (bovine) の赤血球から作られた製剤であり、BSE 問題のため輸入等に関しては極めて制限が厳しい。国内での人工酸素運搬体開発はテルモ社、早稲田と慶應義塾大学の共同研究グループが行っており、輸血用あるいは脳梗塞時等の臨床治療薬としての利用が検討されている。しかし、いずれも一般臨床使用には至っておらず研究開発段階である [8-10]。我々は後者が開発した HbV を用いて [11]、 $^{15}O$  ガス標識 HbV による脳循環代謝測定への応用を試みた。HbV は直径 250-280 nm のリポソーム内にヒト・ヘモグロビンが充満された製剤で、ヒト赤血球と比較すると極めて小さい (図 1)。

## 2.2 $^{15}O$ 標識 HbV の合成法

脳循環代謝測定に用いられている  $^{15}O$  ガスとして、 $C^{15}O_2$  ガス、 $^{15}O_2$  ガスと、 $C^{15}O$  ガスの 3 種類存在するが、 $C^{15}O_2$  ガスは注射剤の  $H_2^{15}O$  により代替されるため、 $^{15}O_2$  ガスと  $C^{15}O$  ガスの注射剤化を試みた。特に、 $^{15}O_2$  は脳局所酸素代謝測定のために非常に重要であ

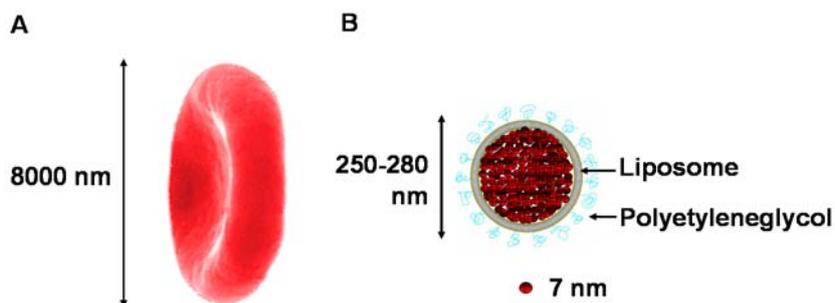


図 1 ヒト赤血球(A)と人工赤血球 HbV(B)の形状及びサイズ。

り、高い標識率と放射性濃度を必要とした。我々は当初、Ter-Pogossian らがヒト赤血球を用いて行った単純なバブリング法を用いて、 $^{15}O_2$  ガスと HbV の標識を試みた結果、40 MBq/mL 程度の標識率であった。ヒトの臨床 PET 検査に利用可能となる標識率を考慮に入れると 140 MBq/mL 程度の標識率が必要であったため、単純なバブリング法を用いた  $^{15}O$  ガス標識より、標識率を 3 倍以上向上させる必要があった。この問題を解決する方法として、HbV を封入したバイアル内に還元剤である L-cysteine を加えて前処理することと、バブリングの際にヒトの手で攪拌するのではなく、ボルテックス・ミキサーを使って攪拌することにした [7]。  $^{15}O$  ガス

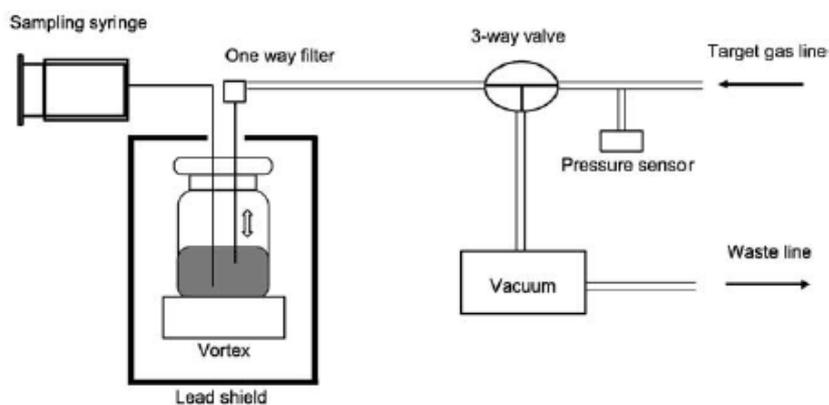


図 2  $^{15}O$  標識 HbV の合成法の概観図。

標識の前日に約 3 mM の L-cysteine をバイアル内に加えておき、標識当日には  $^{15}\text{O}_2$  と HbV をボルテックス・ミキサーで攪拌しながらバブリングすることで、約 200 MBq/mL の標識率を有する  $^{15}\text{O}_2$  標識 HbV ( $^{15}\text{O}_2$ -HbV) が得られた。その結果、 $^{15}\text{O}$  の約 2 分の半減期や自動投与装置へのセットアップ時間等を考慮しても、臨床 PET 検査も行えるに十分な標識率と放射性濃度が得られることに成功した。また、 $\text{C}^{15}\text{O}$  標識 HbV ( $\text{C}^{15}\text{O}$ -HbV) も同様な方法で、必要な放射性濃度を得た。

### 2.3 $^{15}\text{O}_2$ -HbV を用いた小動物用持続注入法

$^{15}\text{O}$  標識薬剤を生体内に注入する手法として、1 回注入法と持続注入法があり、前者の場合は、各  $^{15}\text{O}$  標識薬剤の撮像中に、1 匹の動物から放射能を測定可能な量の動脈血を頻回に採取する必要があるため、動物の生理状態を変化させる恐れがあるとともに画像解析法も複雑であるため、数回の動脈採血で測定可能であり、画像解析も簡単な後者の持続注入法を選択した。しかし、従来の持続注入法では動物に対する薬剤注入量が多くなる問題が考えられたため、注入量を少なくする小動物用持続注入法を新たに考案した(図 3)。この注入プログラムを実現するために、多段階に超低速から超高速まで可変可能なシリンジポンプを必要としたため、実験用機器メーカーのメルクエスト社と共同開発した。

$^{15}\text{O}_2$ -HbV の持続注入プログラム(図 3)において、①は、シリンジポンプから動物の尾静脈までをつなぐカテーテル内の dead volume 補正用プログラム部である。②は、動物体内で画像化に必要な最低限の放射能 20 MBq に達する  $^{15}\text{O}_2$ -HbV の一回注入プログラム部である。③は、動物に投与された 20 MBq という放射能を体内で一定にするために、 $^{15}\text{O}$  の放射能減衰に伴って  $^{15}\text{O}_2$ -HbV の薬剤注入量を増加させるプログラム部であり、曲線の方程式は  $v = 117 \cdot \exp(\gamma \cdot t \cdot 10^{-2})$  となった。このプログラムを用いて、小

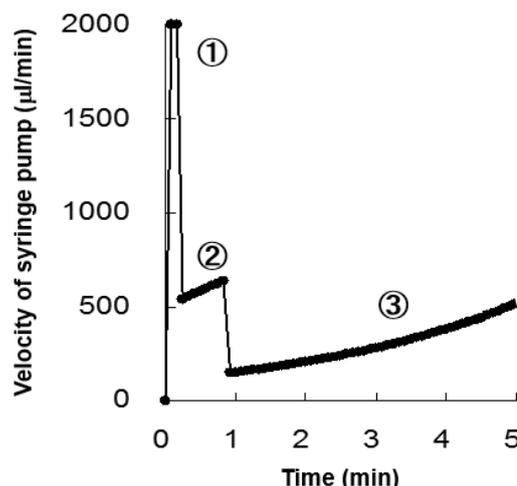


図 3  $^{15}\text{O}_2$ -HbV の持続注入プログラム。

動物に  $^{15}\text{O}_2$ -HbV を注入する前に、シリンジポンプ上に配置したシリンジとドーズメータをカテーテルでつなぎ、このプログラムの動作確認を行った結果、シリンジポンプ稼働 1 分で放射能が 20 MBq に達し、6 分まで定常状態を維持した(日本国特許、PET 薬剤送出装置およびその作動方法、特許第 5360466 号)。

### 2.4 $^{15}\text{O}_2$ -HbV の持続注入を用いたラット脳酸素代謝測定法

我々が開発した  $^{15}\text{O}_2$ -HbV と小動物用持続注入法を組み合わせることで、ラットにおける脳循環代謝測定を行った。正常ラットと脳梗塞モデルラット各々 10 匹を使用して、静注用  $\text{C}^{15}\text{O}$ -HbV、 $\text{H}_2^{15}\text{O}$ 、静注用  $^{15}\text{O}_2$ -HbV の順番でラットに注入し、浜松ホトニクス社製小動物用陽電子断層撮像装置 SHR-41000 を用いて撮像した。 $\text{H}_2^{15}\text{O}$  と  $^{15}\text{O}_2$ -HbV の注入には、シリンジポンプを用いた小動物用持続注入法(図 3)を使用し、各撮像中に、数回の動脈採血により血漿中放射能を測定した。また、それらの撮像中に動脈血中ガス濃度値を測定した。全脳および局所脳領域の画像上の集積放射能を得た後、従来から確立されている持続注入法による公式[6, 12]に各測定値を代入し、全脳及び局所脳領域の脳循環代謝測定値を算出した。

小動物持続注入法の有用性は、正常ラットに  $H_2^{15}O$  あるいは静注用  $^{15}O_2$ -HbV 注入後、血漿内放射能と脳画像上の放射能濃度を測定し、両者とも定常状態に達していることを確認することで判断できる。本研究では、注入 1 分後に血漿内放射能が約 150 kBq/mL で定常状態となり、注入 2 分後に全脳放射能濃度が約 130 kBq/mL で定常状態に達した。また、正常ラットに各  $^{15}O$  標識薬剤を投与した脳画像は非常に鮮明であった(図 4)。その全脳の脳循環代謝測定値は、脳血流量 CBF が  $54.3 \pm 2.0$  (mL/100 g/min)、酸素代謝率 OEF が  $0.56 \pm 0.04$ 、脳酸素消費量  $CMRO_2$  が  $6.2 \pm 0.4$  (mL/100 g/min)、脳血液量 CBV が  $4.9 \pm 0.4$  (mL/100 g) となり、バラツキが少なく安定した結果が得られ、報告されていたラット脳血流代謝測定結果とほぼ一致していた。また、左脳の脳梗塞モデルラットに関しても、鮮明な画像が得られ(図 5)、梗塞領域の各測定値は正常領域と比べて著しく低下した。さらに、前頭皮質、感覚運動皮質、線条体及び視床等の局所脳領域の測定値も脳循環代謝評価に十分な精度で得られた。

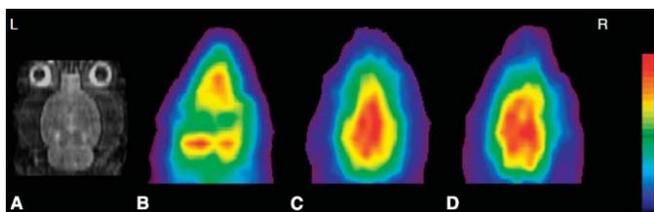


図 4 正常ラットの MRI (A)、 $C^{15}O$ -HbV (B)、 $H_2^{15}O$  (C) と  $^{15}O_2$ -HbV (D) の画像。

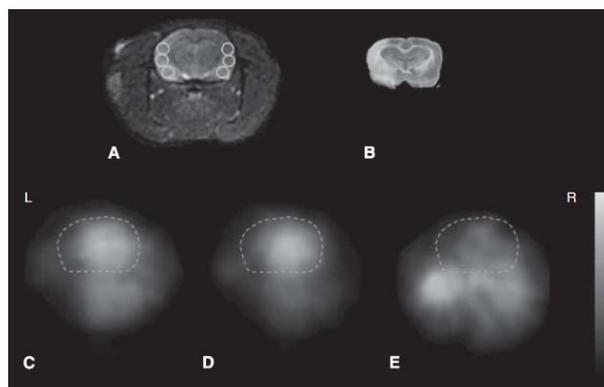


図 5 脳梗塞モデルラットの MRI (A)、TTC 染色 (B)、 $H_2^{15}O$  (C)、 $^{15}O_2$ -HbV (D) と  $C^{15}O$ -HbV (E) の画像。

### 3. まとめと今後の展望

現在の PET 検査の主流は、 $2-[^{18}F]$ fluoro-2-deoxy-D-glucose ( $^{18}F$ -FDG) を用いた腫瘍診断であるが、 $^{15}O$  薬剤を用いた PET による脳循環代謝測定法という非常に古典的かつ重要な手法において、我々は  $^{15}O_2$ -HbV と動物用持続注入法を組み合わせた脳循環代謝測定法を開発した。この方法は、低侵襲かつ簡便に小動物の酸素代謝率や脳酸素消費量を安定して得られる有用な手法であり、脳研究の更なる発展に寄与する。また、無菌環境下で簡便に高比放射能での  $^{15}O_2$ -HbV や  $C^{15}O$ -HbV が標識・合成できれば、ヒトの臨床 PET 検査に十分応用が可能となり、一般 PET 施設での普及が見込まれる。また、虚血性疾患では梗塞を含む病変部における血管径の変化が予想され、図 1 に示した生体内の赤血球と HbV とのサイズの違いが、 $^{15}O_2$ -HbV を用いた PET による脳酸素代謝画像に反映されるのであれば、より微小な末梢血管が支配する脳領域の情報を取得できる可能性があるため、今後の脳虚血性疾患の基礎研究において、非常に興味深い測定法に成り得ると期待される。

### 参考文献

- [1] M.M. Ter-Pogossian MM, J.O. Eichling, D.O. Davis, M.J. Welch, J. Clin. Invest. 49 (1970) 381-391.
- [2] M.J. Welch, M.M. Ter-Pogossian, Radiat. Res. 36 (1968) 580-587.
- [3] M.M. Ter-Pogossian, J.O. Eichling, D.O. Davis, M.J. Welch, J.M. Metzger, Radiology 93 (1969) 31-40.

- [4] C.C Carter, J.O. Eichling, D.O. Davis, M.M. Ter-Pogossian, *Neurology* 22 (1972) 755-762.
- [5] M.E. Raichle, R.L. Grubb RL Jr, J.O. Eichling, M.M. Ter-Pogossian MM, *J. Appl. Physiol.* 40 (1976) 638-640.
- [6] R.S. Frackowiak, G.L. Lenzi, T. Jones, J.D. Heather, *J. Comput. Assist. Tomogr.* 4 (1980) 727-736.
- [7] V.N. Tiwari, Y. Kiyono, M. Kobayashi, T. Mori, T. Kudo, H. Okazawa, Y. Fujibayashi, *Nucl. Med. Biol.* 37 (2010) 77-83.
- [8] A.T. Kawaguchi, D. Fukumoto, M. Haida, Y. Ogata, M. Yamano, H. Tsukada, *Stroke* 38 (2007) 1626-1632.
- [9] H. Komatsu, T. Furuya, N. Sato, K. Ohta, A. Matsuura, T. Ohmura, S. Takagi, M. Matsuura, M. Yamashita, M. Itoda, J. Itoh, H. Horinouchi, K. Kobayashi. *Neurosci. Lett.* 421 (2007) 121-125.
- [10] A.T. Kawaguchi, M. Haida, M. Yamano, D. Fukumoto, Y. Ogata, H. Tsukada. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332 (2010) 429-436.
- [11] H. Sakai, H. Horinouchi, Y. Masada, S. Takeoka, E. Ikeda, M. Takaori, K. Kobayashi, E. Tsuchida. *Biomaterials* 25 (2004) 4317-4325.
- [12] A.A. Lammertsma, T. Jones. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3 (1983) 416-424.

### (一社) 大阪ニュークリアサイエンス協会の主な事業について

ONSAは現在様々な分野で役立っている放射線利用技術に関する、より現場的な情報交換と大阪府立大学地域連携研究機構・放射線研究センターに設置されている放射線施設の産業界への有効利用促進を二つの柱とし、加えて放射線科学についての一般社会への知識普及を目的として下記の活動を行っています。

**1. 情報交換の場としての研究会等：①放射線科学研究会（年3回程度）**

②UV/E B研究会（年3回程度）

③放射線利用総合シンポジウム（年1回）

④見学会（年2回程度）

その他、放射線研究センターの研究分野に関わりの深いテーマの研究会を随時企画しています。

**2. 利用推進の対象とする放射線施設：総計約4PBq（～10万キュリー）のコバルト60ガンマ線源、エネルギーが4～15MeVおよび500keVの2種の電子線加速器。当協会では、ガンマ線照射とそれにかかわる業務のほか、共同研究等の斡旋や仲介ならびに広報活動を行っています。**

**3. 委託調査・研究などの受け入れ。受託実績：日本原子力研究所（現日本原子力研究開発機構）、核燃料サイクル開発機構（現日本原子力研究開発機構）、宇宙開発事業団（現宇宙航空研究開発機構）、非破壊検査㈱等。**

**4. 「みんなのくらしと放射線」知識普及実行委員会委員：委員会は大阪府立大学に事務局において「みんなのくらしと放射線」展（年1回）を行っています。ONSAは構成団体の一員として活動しています。**

**5. 大阪ニュークリアサイエンス協会賞（ONSA賞、ONSA奨励賞）の贈呈：放射線及び放射性同位元素に関わる優れた研究に対しONSA賞、ONSA奨励賞を贈ります。**

**6. 技術相談：放射線量測定、核種同定、放射線照射などの相談受付と実施機関のご紹介を致します。**