

博 士 論 文

アセチルコリン作動性神経機能イメージングのための PET プローブの開発と評価

Development of novel PET probes for cholinergic neuronal imaging

2015 年 3 月

静岡県立大学

大学院薬学研究科

西山 新吾

博 士 論 文

アセチルコリン作動性神経機能イメージングのための PET プローブの開発と評価

本論文は静岡県立大学大学院薬学研究科
博士論文である。

2015 年 3 月

西山 新吾

Development of novel PET probes for cholinergic neuronal imaging

March 2015

Shingo Nishiyama

アセチルコリン作動性神経機能イメージングのための PET プローブの開発と評価

目次

略語一覧	1
構造式一覧	3
緒論	5
第 1 章 ムスカリン性受容体の新規 PET プローブ(+) <i>N</i> -[¹¹ C]methyl-3-piperidyl benzilate の開発	9
1-1 序論	9
1-2 材料と方法	10
1-2-1 実験動物と試薬	
1-2-2 [¹¹ C]標識化合物の合成	
1-2-3 PET 計測	
1-2-4 血漿中代謝物の測定	
1-2-5 ムスカリン性受容体の定量解析	
1-3 結果	12
1-4 考察	17
第 2 章 ムスカリン性受容体に対する親和性の異なる PET プローブ(+) <i>N</i> -[¹¹ C]ethyl-3-piperidyl benzilate と(+) <i>N</i> -[¹¹ C]propyl-3-piperidyl benzilate の開発	21
2-1 序論	21
2-2 材料と方法	21
2-2-1 実験動物と試薬	
2-2-2 [¹¹ C]標識化合物の合成	
2-2-3 PET 計測	
2-2-4 血漿中代謝物の測定	
2-2-5 動態解析	
2-2-6 マイクロダイアリス測定	
2-2-7 [³ H]QNB を用いたラット脳スライスでの親和性測定	
2-2-8 統計解析	
2-3 結果	24
2-4 考察	30

第 3 章	PET によるサル脳の老化によるムスカリン性受容体の変化	33
3-1	序論	33
3-2	材料と方法	34
3-2-1	実験動物と試薬	
3-2-2	[^{11}C]標識化合物の合成	
3-2-3	PET 計測	
3-2-4	血漿中代謝物の測定	
3-2-5	動態解析	
3-2-6	グラフィック解析	
3-2-7	スキッチャードプロット解析	
3-2-8	コルチゾール測定	
3-2-9	マイクロダイアリシス測定	
3-2-10	ワーキングメモリーパフォーマンステスト	
3-2-11	統計解析	
3-3	結果	36
3-4	考察	46
第 4 章	PET によるサル脳のムスカリン性受容体の占有率と認知機能障害の関連性	51
4-1	序論	51
4-2	材料と方法	52
4-2-1	動物と評価系のデザイン	
4-2-2	行動テスト	
4-2-3	[^{11}C] 標識化合物の合成	
4-2-4	PET 計測	
4-2-5	グラフィック解析	
4-2-6	占有率評価	
4-2-7	統計解析	
4-3	結果	54
4-4	考察	60
第 5 章	アセチルコリン小胞トランスポーターを画像化する新規 PET プローブ[^{11}C](<i>R,R</i>)HAPT の開発	63
5-1	序論	63
5-2	材料と方法	64

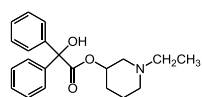
5-2-1	実験動物	
5-2-2	試薬	
5-2-3	分配係数(logD _{7.4})の測定	
5-2-4	アセチルコリン小胞トランスポーター、シグマ-1 受容体に対する親和性	
5-2-5	[¹¹ C]標識化合物の合成	
5-2-6	PET 計測	
5-2-7	動態解析	
5-2-8	グラフィック解析	
5-2-9	統計解析	
5-3	結果	67
5-4	考察	73
総括		77
謝辞		79
引用文献		81
主要論文目録		95

略語一覧

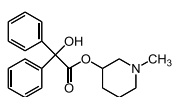
(-)-FEOBV	(2)-(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-trans-2-hydroxy-3-(4-phenylpiperidino)-5-(2-fluoroethoxy)-1,2,3,4-tetralin
(+)-spiro-FBT	(+)-p-fluorobenzyl spirotrozamicol
(<i>R,R</i>)HAPT	(<i>R,R</i>)trans-8-methyl-2-hydroxy-3-[4-[2-aminophenyl]piperiziny]- tetralin
3-EPB	<i>N</i> -ethyl-3-piperidyl benzilate
3-MPB	<i>N</i> -methyl-3-piperidyl benzilate
3-PPB	<i>N</i> -propyl-3-piperidyl benzilate
4-EPB	<i>N</i> -ethyl-4-piperidyl benzilate
4-MPB	<i>N</i> -methyl-4-piperidyl benzilate
4-PPB	<i>N</i> -propyl-4-piperidyl benzilate
ACh	acetylcholine; アセチルコリン
AChE	acetylcholinesterase; アセチルコリンエステラーゼ
ACTH	adrenocorticotrophic hormone; 副腎皮質刺激ホルモン
AD	alzheimertype dementia; アルツハイマー型認知症
B.B.B.	blood-brain barrier; 血液脳関門
BP	binding potential; 結合能
BP _{ND}	binding potential non-displaceable; プローブ結合定数
CBF	cerebral blood flow; 脳血流量
ChAT	choline acetyltransferase; コリンアセチル転移酵素
CMR _{glc}	cerebral metabolism of glucose; 脳ブドウ糖代謝率
CNS	central nervous system; 中枢神経系
DMF	<i>N,N</i> -dimethylformamide
DMS	delayed matching to sample; 遅延見合わせ
DVR	distribution volume ratio; 分布体積比
ECD	electrochemical detector; 電気化学検出器
ECF	extracellular fluid; 細胞外液
FBMV	4-(4-fluoro-benzoyl)-7-hydroxy-6-(4-phenyl-iperidin-1-yl)-octahydro-benzo[1,4]oxazine
FMV	(1 <i>R</i> ,2 <i>R</i> ,4 <i>S</i>)-4- (Fluoromethyl)-2-(4-phenylpiperidin-1-yl)cyclohexanol
FWHM	full width at half maximum; 半値全幅
GC	gas chromatography; ガスクロマトグラフィー
HI	hydroiodic acid
HPLC	high performance liquid chromatography; 高速液体クロマトグラフィー
I.V.	intravenous; 静脈内投与

IC ₅₀	50% inhibition; 50%阻害濃度
ITI	inter trial interval; 試行間間隔
LiAlH ₄	lithium aluminum hydride
logD _{7.4}	distribution coefficient; 分配係数
mACh	muscarinic cholinergic ; ムスカリン性神経
mAChR	muscarinic cholinergic receptor; ムスカリン性受容体
MP4A	<i>N</i> -methyl-4-piperidyl acetate
MRI	magnetic resonance imaging; 核磁気共鳴画像法
ODR	oculomotor delayed response; 遅延反応課題
OM	orbitomeatal; 眼窩外耳孔
OMV	(-)- <i>o</i> -[11C]methylvesamicol
PET	positron emission tomography; ポジトロン断層画像撮影法
PMOD	pixel-wise kinetic modeling; ピクセル動態モデリング解析
QNB	quinuclidinyl benzilate
rCBF	regional cerebral blood flow; 局所脳血流量
RIA	radioimmunoassay; 放射性免疫測定法
RLS	reference tissue-based linear least-squares; 参照組織ベースの最小二乗法
ROI	regions of interest; 関心領域
RT	reaction time; 反応時間
S/N	signal-to-noise; 信号/雑音
SA4503	1-(3,4-dimethoxy-phenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine
SPECT	single photon emission computed tomography; シングルフォトン断層撮影法
TAC	time activity curves; 時間放射能曲線
T-DMS	titration version of the DMS; 滴定型遅延見合わせ課題
THF	tetrahydrofuran
TLC	thin layer chromatography; 薄層クロマトグラフィー
TRB	tropanyl benzilate
VACht	vesicular acetylcholine transporters; アセチルコリン小胞トランスポーター
VGS	visually-guided saccade; 視覚誘導性衝動性眼球運動
Vt	total distribution volume; 総分布体積

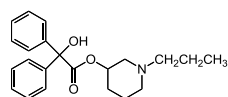
構造式一覽



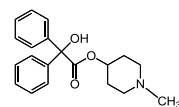
3-EPB



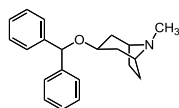
3-MPB



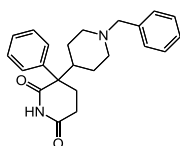
3-PPB



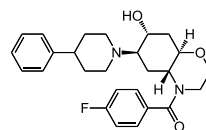
4-MPB



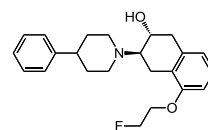
Benztropine



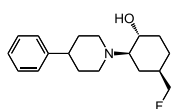
Dexetimide



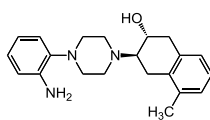
FBMV



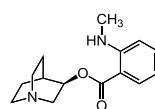
FEOBV



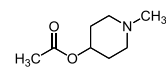
FMV



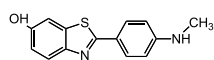
HAPT



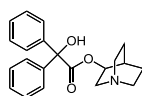
Me-QAA



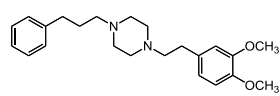
MP4A



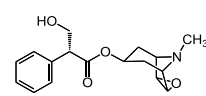
PIB



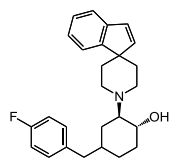
QNB



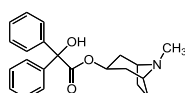
SA4503



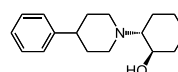
scopolamine



Spiro-FBT



TRB



Vesamicol

緒論

2014年度 内閣府・高齢社会白書によると、2013年10月1日現在、日本の総人口は1億2,730万人で、2011年より3年連続で減少した。一方65歳以上の高齢者人口は、過去最高の3,190万人(前年3,079万人)となり、総人口に占める割合(高齢化率)も25.1%(前年24.1%)と過去最高となった。また、高齢者人口のうち、「65-74歳人口」は1,630万人で総人口に占める割合は12.8%、「75歳以上人口」は1,560万人で、総人口に占める割合は12.3%であった(Figure 1)。

2012年1月に国立社会保障・人口問題研究所が公表した「日本の将来推計人口」における出生中位・死亡中位推計結果より、今後も高齢者人口は増加し2020年ではおよそ3,600万人に、2040年に3,800万人のピークに達し、その後減に転じて行くと予想されている。高齢者人口のうち、65-74歳の人口は2040年くらいにピークとなり、その後は減少に転ずる一方、75歳以上の人口は増加を続け、2050年には2,400万人に達すると見積もられている。また、高齢化に伴い平均寿命も伸び続け、2012年の男性の平均寿命79.9歳が2060年には84.2歳に、また女性では86.4歳が90.9歳になると見込まれている。日常生活に制限のない健康寿命をみると、2001年から2010年に増加しているが、その増加は平均寿命より少なくなっている。平均寿命と健康寿命の差が疾病等を患った不健康な期間で、2001年から2010年に男性で8.67年から9.13年に増加、女性で11.3年から12.7年に増加しており、今後も平均寿命が延びていくとともに、健康な期間だけでなく不健康な期間がさらに延びていくことが予想される。

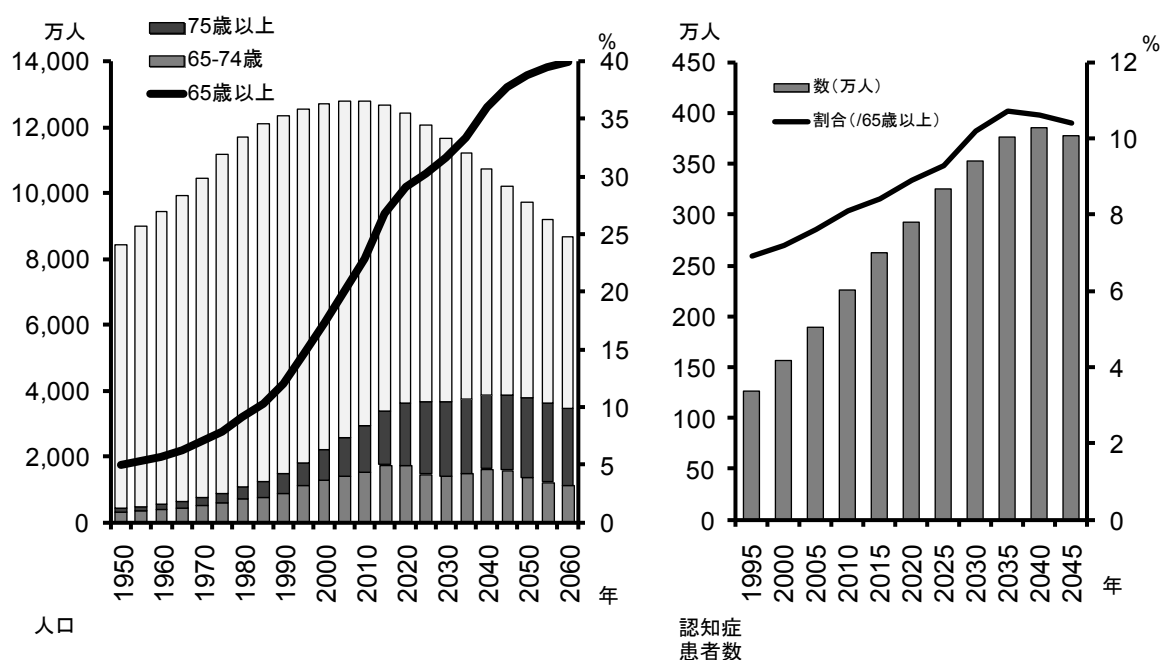


Figure 1 高齢者人口と高齢化率の推移と将来の推計(A)。認知症患者数と高齢者に対する認知症患者割合の推移と将来の推計(B)。

超高齢社会を迎え、今後、高齢者における様々な疾病が大きな社会問題となることが予想され、特にアルツハイマー型認知症(AD)に代表される認知症に対する不安が増大していると考えられる。認知症患者は1995年にはおよそ126万人で65歳以上の高齢者の6.9%であったが、2030年には350万人に達し、高齢者人口の10%に達すると予想されている(厚生労働省ホームページ)。認知症には、多彩な認知の欠損があり、記憶障害以外に、失語、失行、失認、遂行機能障害のうちのひとつが含まれている。認知症の原因としてはADが最も多いとされるが、様々な疾患が認知症の原因になりえる。

記憶と認知機能において、中枢アセチルコリン(ACh)神経系も重要な役割を担っている。ACh神経系シナプスの概略をFigure 2に示した。生合成されたAChは、トランスポーターによりシナプス小胞に蓄えられる。神経刺激により終末よりAChが放出され、シナプス後膜にある受容体に結合し、刺激が伝達される。ACh受容体は大まかにムスカリン性受容体(mAChR)、およびニコチン性受容体に分けられる。シナプス間隙の遊離のAChは速やかに代謝されていく。

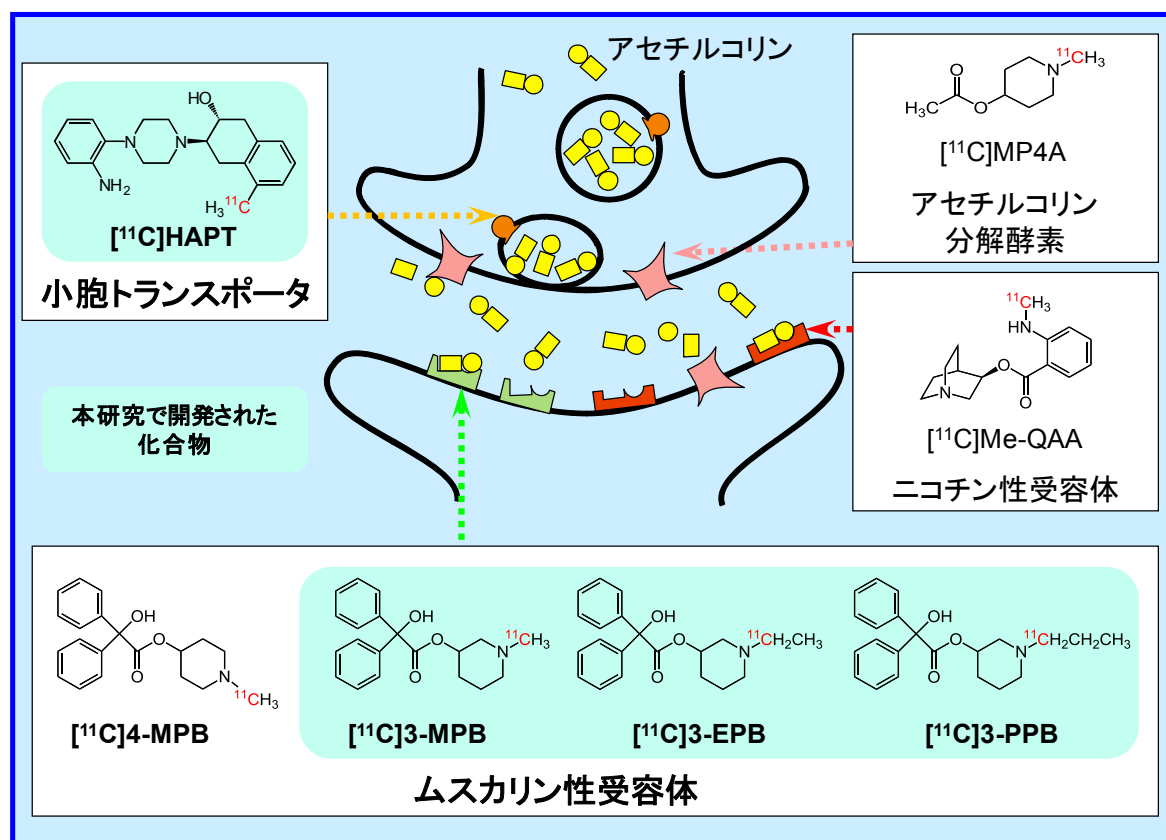


Figure 2 アセチルコリン神経系の概略と、特異的な PET プローブ

ポジトロン(陽電子)断層撮影法(Positron Emission Tomography, PET)は核医学的イメージング技術の一種であり、その計測の原理を Figure 3 に示す。ポジトロン放出核種により標識された薬剤(プロー

ブ)を生体内に投与すると、プローブは全身に分布する。ここでプローブに親和性の高い組織や細胞が存在すると、特異的な分布が生じる。ポジトロン放出核種から放出されたポジトロンは、近傍の電子と衝突し、180 度方向に一对の消滅 γ 線を生じさせる。体外にリング状に配置した放射線検出器に同時に入射してきた放射線を計測し、コンピュータで処理することにより、PET プローブの体内での分布を、体外から非侵襲的に3次元的に画像化することができる。ポジトロン放出核種としては、主に ^{11}C (半減期 20.4 分)、 ^{13}N (半減期 9.97 分)、 ^{15}O (半減期 2.03 分)、 ^{18}F (半減期 110 分)が用いられている。これらの核種は、超短半減期であるため附設するサイクロトロンにて産生される。サイクロトロンで産生されたポジトロン放出核種は、化学形が CO_2 、 NO_x 、 O_2 、 F といった単純な形で得られ、これらを用いて目的とするPETプローブを短時間で合成・精製する必要がある。合成された PET プローブは生体に投与され、生体内で、そのプローブの持つ生理的・生化学的・薬理的・神経化学的な特性を反映した生体内動態・分布を示す。

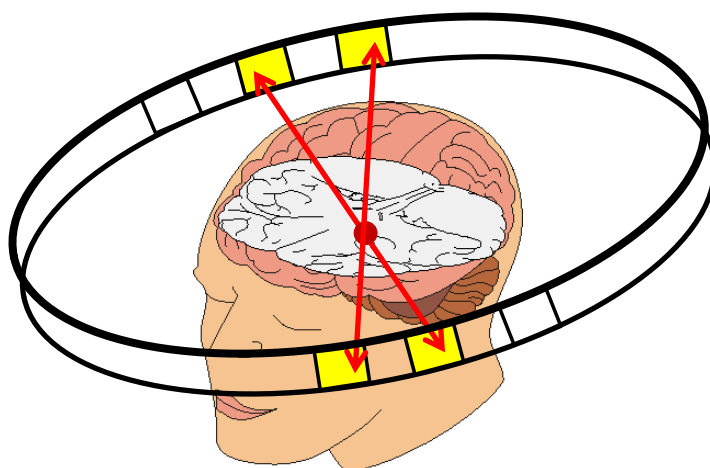


Figure 3 PET 計測の原理;体内のポジトロン放出核種から放出されたポジトロンは、近傍の電子と衝突し、180 度方向に一对の消滅 γ 線を生じさせる。体外にリング状に配置した放射線検出器に同時に入射してきた放射線を計測し、コンピュータで処理することにより、PET プローブの体内での分布を3次元的に画像化することができる。

PET は以下の点が優れている。1)測定は非侵襲的であり、ポジトロン放出核種が短半減期であることから、同一個体で繰り返しPET計測を行うことができる。例えば半減期 20 分の ^{11}C PET プローブでは、1 日に複数回計測できることから、同一個体で被験薬のないコントロール、被験薬を投与したときの状態を比較することができる。2)高比放射能の PET プローブを合成することが可能であるため、従来の放射性標識化合物では困難であった *in vivo* 脳内受容体占有率等の薬理的パラメータを求めることが可能である。3)動物を対象とした前臨床試験から、ヒトを対象とした臨床試験まで同じ手法で評価することが可能である。

本研究では、ACh 作動性神経機能を評価する新規 PET プローブの開発、およびムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) と記憶機能との関連性に関して検討を行った。ACh 神経と、記憶・学習の関

係を明らかにする目的で、前半では mAChR の PET プローブの開発を行った。既存の mAChR PET プローブ N - $[^{11}\text{C}]$ methyl-4-piperidyl benzilate ($[^{11}\text{C}]$ 4-MPB) は、脳への集積が低く、解離定数が小さく PET 計測の短い時間内に平衡に達しないため、解析が困難であることから、新規に $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-MPB とその光学異性体 $[^{11}\text{C}]$ (-)-3-MPB を開発し、 $[^{11}\text{C}]$ 4-MPB を対象として $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-MPB の mAChR への親和性を評価した。 $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-MPB には光学異性体が存在するため、同時に光学異性体の $[^{11}\text{C}]$ (-)-3-MPB についても合成し、評価を行った(第1章)。mAChR への結合能が適切に高いプローブは受容体の評価に適する一方、適切に結合能の低いプローブは内在性の ACh と競合するため、内在性の ACh の量を反映した動態を示す可能性がある。第2章では、これらを考慮して結合能の異なる PET プローブを得るために、(+)- N - $[^{11}\text{C}]$ ethyl-3-piperidyl benzilate ($[^{11}\text{C}]$ (+)-3-EPB)、(+)- N - $[^{11}\text{C}]$ propyl-3-piperidyl benzilate ($[^{11}\text{C}]$ (+)-3-PPB)を開発し、評価を行った。第3章では、mAChR の老化に伴う変化を、若齢および老齢サル脳で $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-MPB、 $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-PPB を用いて評価した。続く第4章では、脳内 mAChR を阻害することにより、サルに一時的に記憶障害を引き起こす薬剤としてスコポラミンを用い、mAChR 占有率と認知機能障害との関係を $[^{11}\text{C}]$ (+)-3-MPB を用いて評価した。アセチルコリン作動性神経のプレシナプス終末を直接画像化する PET プローブの開発がまだまだ続いている状態であることから、アセチルコリン小胞トランスポーター (VACHT) が、コリン神経終末のプレシナプスのマーカーとなると考えた。VACHT 選択的 PET プローブは AD の診断に大変有用であると考えられることから、第5章では、C-11 標識 (R,R)trans-8-methyl-2-hydroxy-3- [4-[2-aminophenyl]piperiziny]-tetralin ($[^{11}\text{C}]$ (R,R)HAPT) 、とその光学異性体 $[^{11}\text{C}]$ (S,S)HAPT を VACHT 選択的 PET プローブとして開発し評価した。

第1章 ムスカリン性受容体の新規 PET プローブ(+) N -[^{11}C]methyl-3-piperidyl benzilate の開発

1-1 序論

神経変性疾患は、神経系とそれに付随する中枢神経系の特定の酵素活性や特定の受容体機能の選択的な障害によって引き起こされる。例えば、中枢性ムスカリン性アセチルコリン(mACh)神経系は、記憶・学習・判断等の認知機能において重要な役割を果たしている。薬理学的手法により、mAChR の特異的阻害薬であるスコポラミン投与は、ヒトにおいて一時的な記憶障害を引き起こし(Collerton, 1986)、一方でタクリンやフィゾスチグミン等のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)阻害薬は、記憶機能を賦活することが判明している(Honer et al., 1987; Sitaram et al., 1978)。AD では、神経原線維錯綜と老人斑の存在が神経病理学的な特徴であるが(Katzman, 1986; Selkoe, 1990)、前頭葉のACh 作動性神経系の喪失、海馬のACh 作動性神経系の機能低下、大脳皮質でのコリンアセチル変換酵素の欠損等が起こり、これらのACh 作動性神経系の異常の程度と認知症の程度は良く一致していることが知られている(Hohmann et al., 1988; Perry, 1986)。mACh 神経系の異常は、ハンチントン舞踏病(Enna et al., 1976; Wastek and Yamamura, 1978)、特発性失調症(Fahn, 1983)、パーキンソン病(Ruberg et al., 1982)、統合失調症(Tandon and Greden, 1989)等の多くの中枢性疾患とも関係がある。

PET は、これまで主にドパミン神経系(Volkow et al., 1996)における神経伝達物質受容体の神経解剖学および機能評価の研究に広く用いられてきたが、ACh 作動性神経系に関しても[^{11}C]スコポラミン(Vora et al., 1983; Mulholland et al., 1988b; Frey et al., 1992)、[^{11}C]デキセチミド(Dannals et al., 1988)、[^{11}C]キヌクリジルベンジレート(QNB)(Prenant et al., 1989)、[^{11}C]ベンズトロピン(Dewey et al., 1990b)、[^{11}C]トロパニルベンジレート(TRB)(Mulholland et al., 1992; Koeppe et al., 1994)等のmAChR 用の[^{11}C]標識化合物が開発された(Maziere, 1995)。さらに、これら標識化合物を用いて、老化に伴うmAChR の変化を定量的に検出する試みも行われた(Dewey et al., 1990b; Suhara et al., 1993; Lee et al., 1996)が、上記のmAChR 標識化合物は、いずれも脳への移行性が比較的低く、mAChR からの解離速度が遅いため、生体脳のmAChR のPET による評価には限界があると言われている。すなわち、結合部位からの解離速度が遅い標識化合物では、ポジトロン核種の短い半減期によって制限を受ける限られた計測時間(半減期20分のC-11で最大90分)内に平衡に達することができないため、平衡状態から算出する解析が困難であり、更に脳血流量の変化により受容体への結合が影響を受けてしまう事も報告されている(Koeppe et al., 1994)。より速い脳内動態特性を目指して、Mulholland ら(1988a)は新規mAChR アンタゴニストの標識化合物 N -[^{11}C]methyl-4-piperidyl benzilate (以下、[^{11}C]4-MPB、Figure 4)を開発して、実験動物(Buck et al., 1996)およびヒト(Zubieta et al., 1998)で評価した。その結果、前述したmAChR 標識化合物よりも動態特性(脳への移行性、解離速度)が改善する事を見出したが、まだ定量解析には不十分であった。

そこで、PET 計測に適した更なる脳内動態特性の改良を目的として、 N -[^{11}C]Methyl-3-piperidyl benzilate (以下、[^{11}C]3-MPB、Figure 4) (Takahashi et al., 1997, 1999; Tsukada et al., 2001)が開発された。

この化学構造は不斉炭素を含むため、活性型の $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ と不活性型の $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ の2つの光学異性体が存在する。活性型の $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ は、ラット脳組織ホモジネートを用いた *in vitro* 結合実験において、前述した $[^{11}\text{C}]\text{-}4\text{-MPB}$ より mAChR への親和性が低く、生体ラット脳における *in vivo* 評価で mAChR から $[^{11}\text{C}]\text{-}4\text{-MPB}$ より早い解離を示す事が判明した (Takahashi et al., 1997)。本研究では、ヒトを対象にした臨床応用へのトランスレーションを考慮して、アカゲサル脳の mAChR を対象にして、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ と $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ を $[^{11}\text{C}]\text{-}4\text{-MPB}$ との比較と共に評価を試みた。

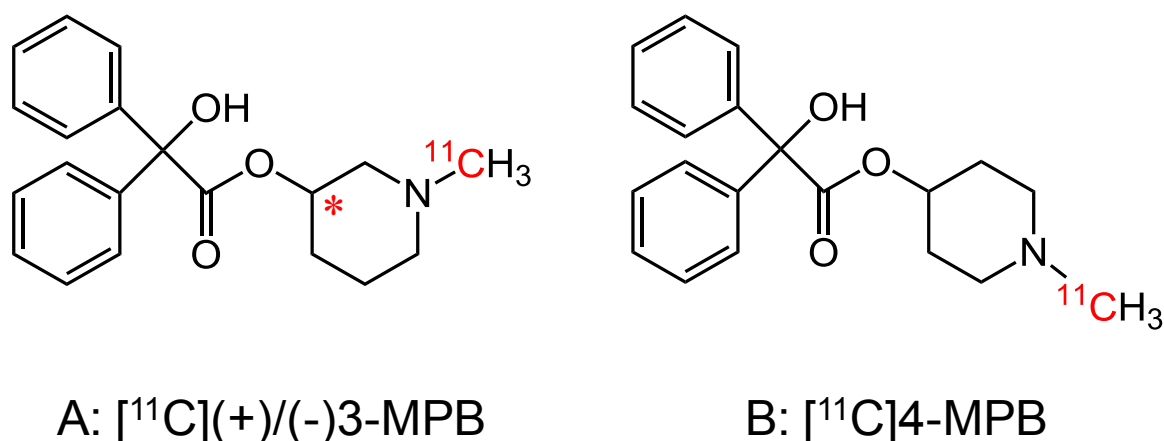


Figure 4 Chemical structures of $[^{11}\text{C}]\text{-}3\text{-MPB}$ (A) and $[^{11}\text{C}]\text{-}4\text{-MPB}$ (B). $[^{11}\text{C}]\text{-}3\text{-MPB}$ provided two stereoisomers; the active form $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ and inactive form $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$.

1-2 材料と方法

1-2-1 実験動物と試薬

PET 実験に 5 匹の体重 4-6kg の若齢雄性アカゲザル (*Macaca mulatta*) を用いた。実験動物は米国の国立衛生研究所および浜松ホトニクス中央研究所のガイドラインに沿って扱った。週に 2 度以上、イスに座る訓練を 3 ヶ月以上受けた個体を PET 計測に用いた。PET と核磁気共画像法 (magnetic resonance imaging; MRI) で眼窩外耳孔 (orbitomeatal; OM) 面に平行な同一の平面画像が得られるように、特別にデザインしたヘッドホルダーを用いて MRI 画像を得た。モンキーチェアに固定するために、少なくとも PET 実験開始 1 ヶ月前にペントバルビタール麻酔下で、固定用アクリルプレートを頭蓋骨に取り付ける手術を行った (Onoe et al., 1994)。

スコポラミン臭素酸塩は、杏林製薬(株)(東京)から購入した。 $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ ・ $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ の標準品である $(+)\text{-}3\text{-MPB}$ ・ $(-)\text{-}3\text{-MPB}$ 、および前駆体である $(+)\text{-}3\text{-PB}$ ・ $(-)\text{-}3\text{-PB}$ は、既報の方法により合成した (Takahashi et al., 1999)。 $[^{11}\text{C}]\text{-}4\text{-MPB}$ の標準品である 4-MPB および前駆体の 4-PB は、既報の方法により合成した (Mulholland et al., 1988a)。

1-2-2 $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の合成

ポジトロン放出核種である炭素 11 (C-11) は、浜松ホトニクス PET センター内のサイクロトロン (HM-18、住友重機械工業(株)、大阪、日本)を用い、 $^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$ 核反応により産生され、 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ の化学形で得た。 $[^{11}\text{C}]\text{CO}_2$ をターゲットより 400 ml/min で $-15\text{ }^\circ\text{C}$ にボルテックススクーラーにて冷却した 0.5 ml の 0.1 M $\text{LiAlH}_4/\text{THF}$ 反応液に吹き込んだ。続いて 400 ml/min の N_2 ガス気流下、 $120\text{ }^\circ\text{C}$ に加熱し、THF を留去した。THF 留去後、HI を添加し、 N_2 気流下 (50 ml/min) $120\text{ }^\circ\text{C}$ にて、 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルを得た。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ は、各々の脱メチル前駆体と $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルとの N -メチル化反応で得た。それぞれの標識化合物の放射化学的純度は 99%以上、比放射能は $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ で 61.7-92.4 GBq/ μmol 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ で 60.0-79.5 GBq/ μmol 、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ で 34.4-75.9 GBq/ μmol であった。品質検査に合格している事を確認した後、0.22 μm のフィルター濾過を行って PET 計測に用いた。

1-2-3 PET 計測

データは、断層面の空間分解能 2.6 mm、軸方向の空間分解能 3.6 mm、31 断層の同時データ収集の性能を有する動物用高分解能 PET カメラ (SHR-7700、浜松ホトニクス(株)、浜松) (Watanabe et al., 1997)を用いて収集し、Hunning 4.5 mm フィルターを用いた、Filtered back-projection 法を用いた画像再構成を行った。

一晩絶食させた後、覚醒状態のカニクイザルを OM 面が平行になるようにモンキーチェアに固定した。標識化合物を投与するために、カニューレを後部の脛骨静脈へ挿入し、動脈血を採取するために別のカニューレを反対の足の大腿動脈に挿入した。実験動物への刺激を低減するため、PET 計測は薄明かりの下で行った。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ または $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ (100-120MBq/kg) を、後部の脛骨静脈カニューレより投与して、10 秒間計測を 6 回、30 間計測を 6 回、1 分間計測を 12 回、3 分間計測を 25 回の計 91 分間の PET データ収集を行った。標識化合物投与 60-91 分後の画像データを積算して、関心領域 (ROI: Region of interest) 設定用の PET 画像とした。Figure 5 で示すように、ROI は各々のアカゲザル脳の MRI より設定し、ROI の放射能動態を算出した。

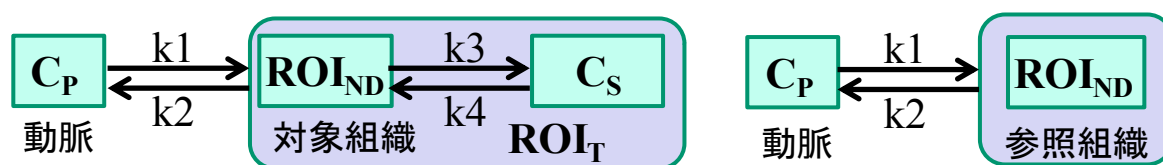
1-2-4 血漿中代謝物の測定

脳への標識化合物の入力関数を測定するために、血漿中の代謝物解析を行った (Nishiyama et al., 2001, Tsukada et al., 2001)。標識化合物投与の 10 秒後から 66 秒まで 8 秒毎、続いて 96、156、246、336 秒後、更に 20、30、45、60、75 および 90 分後に動脈血を採取した。採取した血液を遠心分離し、血漿の重量を測定し、放射能を測定した。代謝分析のために、血漿に同量のメタノールを加えて遠心分離後、上清を薄層クロマトプレート (TLC) (AL SIL G/UV, Whatman, Kent, England) 上の原点にスポットして、ethylene dichloride : diethyl ether : ethanol : triethylamine = 20 : 20 : 1 : 1 を用いて展開した。薄層ク

ロマトグラフィー上の未変化体と代謝物の放射能をイメージングプレート(BAS-1500 MAC、富士フイルム、東京)で読み取り、それぞれの採血時刻で血漿中の全放射能(代謝物+未代謝物)に対する未代謝物の放射能の比率を算出した。

1-2-5 ムスカリン性受容体の定量解析

ローガンプロット解析では、以下のコンパートメントモデルおよび方程式に基づき、分布体積として表される遊離受容体濃度を一次関数の傾きで表すことができる(Logan et al., 1990)。



$$\int_0^T ROI(t)dt / ROI(T) = K \int_0^T Cp(t)dt / ROI(T) + C$$

ROI(T)とCp(T)が時刻Tにおける組織内放射能と動脈血の血漿放射能を表し、Kは傾きでCはY軸の接点である。標識化合物が受容体に対して可逆的な結合を示す場合は、ローガンプロットはある時間以降に定常状態における分布容量と等しい傾き(K)の線形になる。小脳(K(CE))のKと各々のROI(K(ROI))のKの比は、脳内mAChRの分布を表している。

パトラックプロット解析では、以下の方程式に基づき、非可逆的コンパートメントにおける標識化合物の正味の集積を算出した(Patlak et al., 1983)。

$$\int_0^T ROI(t)dt / Cp(T) = K \int_0^T Cp(t)dt / Cp(T) + C$$

ROI(T)とCp(T)が時刻Tにおける組織内放射能と動脈血の血漿放射能を表し、Kは傾きを表し、CはY軸の接点である。傾き(K)は $K1k3/(k2+k3)$ と等しい。解離定数(k4)は、計測の間においては無視できると仮定する。Patlakの傾きは、血液脳関門(B.B.B.)透過定数(K1とk2)によって影響され、結合定数(k3)には規定されない(Patlak et al., 1983)。

1-3 結果

$[^{11}C]3\text{-MPB(A)}$ と $[^{11}C]4\text{-MPB(B)}$ の化学構造をFigure 4に示す。 $[^{11}C]3\text{-MPB}$ の化学構造に不斉炭素を含むため、2つの立体光学異性体が存在する。

Figure 5のA-Cは、覚醒アカゲザル脳のMRIと $[^{11}C](+)\text{3-MPB}$ 、 $(-)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}C]4\text{-MPB}$ の投与60から91分後のPET積算画像である。 $[^{11}C](+)\text{3-MPB}$ の脳内配布は、線条体で最も高く、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬と視床で中程度、橋より低く、小脳で最も低かった(Figure 5A)。 $[^{11}C]4\text{-MPB}$ の脳内分布は $[^{11}C](+)\text{3-MPB}$ のそれとほとんど同じであったが、 $[^{11}C](+)\text{3-MPB}$

の脳内集積は $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ 集積より高かった (Figure 5A、C)。これに対して、 $[^{11}\text{C}](-)3\text{-MPB}$ は脳の全ての部位において $[^{11}\text{C}](+)3\text{-MPB}$ および $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ より低い放射能集積を示した (Figure 5B)。

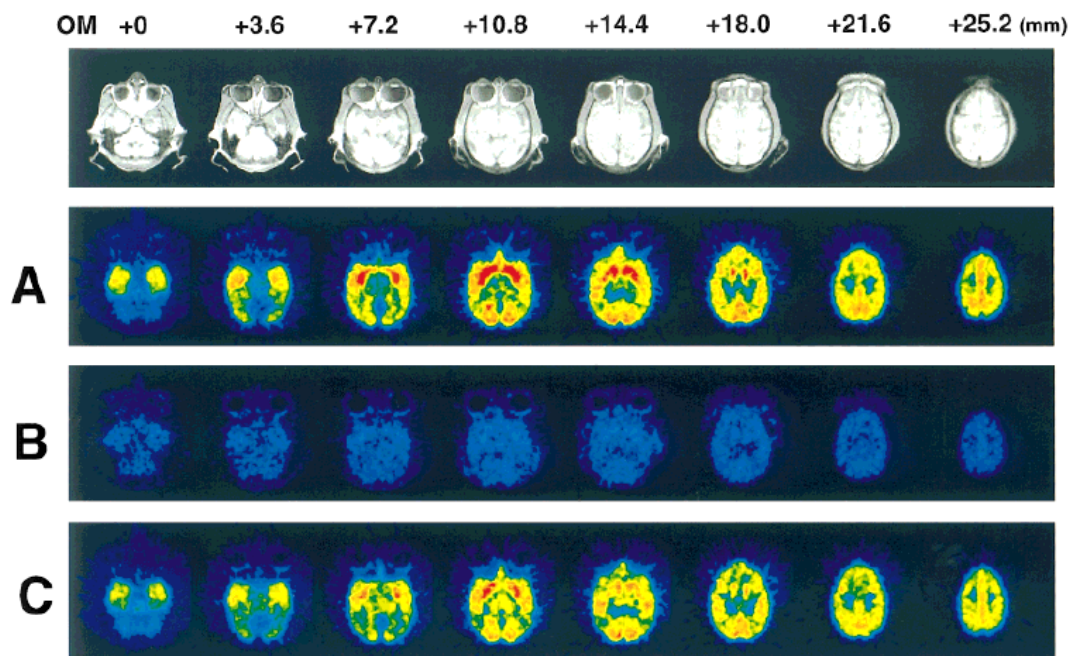


Figure 5 MRI and PET images of $[^{11}\text{C}](+)3\text{-MPB}$ (A), $[^{11}\text{C}](-)3\text{-MPB}$ (B) and $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ (C) in the monkey brain. MR images of monkeys were obtained with a Toshiba MRT-50A/II (0.5T). PET data were collected in the conscious state with a high-resolution PET scanner (Hamamatsu SHR-7700) with a transaxial resolution of 2.6 mm (FWHM) and a center-to-center distance of 3.6 mm. Each PET image was generated by summation of image data from 60 to 91 min post-injection. The stereotactic coordinates of PET and MRI were adjusted based on the orbitomeatal (OM) line.

$[^{11}\text{C}](+)3\text{-MPB}$ の脳内動態は、投与のおよそ 40 分後に前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、および帯状回で放射能集積の最大値を示し、視床と橋では投与 30 分後で最大値に達した (Figure 6A)。線条体、海馬では、投与のおよそ 60 分後が集積の最大であった (Figure 6A)。mAChR の存在量が無視できる程低いために対照領域とした小脳では、投与 10 分後に最大値を示し、その後は単調減少を示した (Figure 6A)。対照的に、 $[^{11}\text{C}](-)3\text{-MPB}$ の脳内動態は、線条体、海馬、大脳皮質を含む全ての領域において、 $[^{11}\text{C}](+)3\text{-MPB}$ の小脳の動態 (Figure 6A) と類似した投与 10 分後に最大値を示す動態であった (Figure 6B)。一方、 $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ の脳への集積は、視床、橋および小脳以外の全ての領域で、投与 91 分後まで増加した (Figure 6C)。 $[^{11}\text{C}](+)3\text{-MPB}$ の脳内動態では、投与の 91 分以内に特異的結合のピークが得られ (Figure 6D)、 $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ のでは、投与の 91 分後までに特異的結合のピークが得られず、時間とともに徐々に増加した (Figure 6F)。

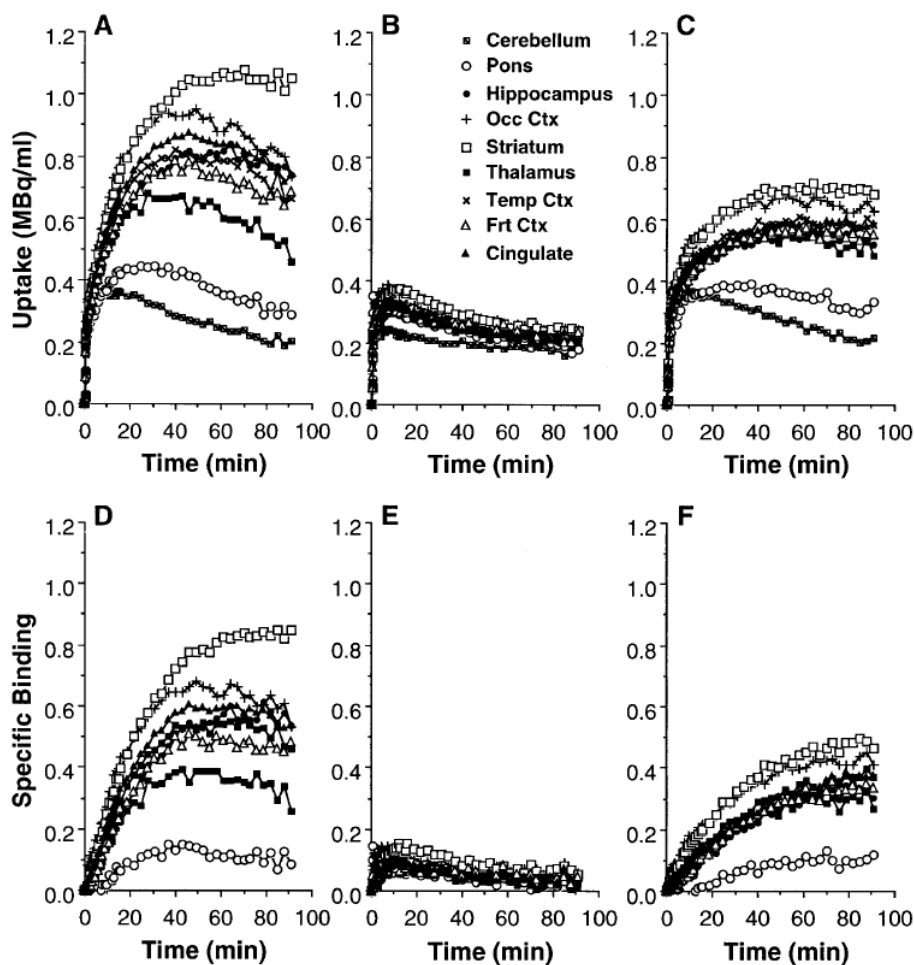


Figure 6 Time-activity curves of [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C]-3-MPB (B), [^{11}C]4-MPB (C), specific binding of [^{11}C](+)-3-MPB (D), [^{11}C]-3-MPB (E), and [^{11}C]4-MPB (F) in the conscious state. PET scans were performed as shown in the legend of Figure 5. Regions of interest (ROIs) were identified according to MRI of the each animal. Curves of specific binding of [^{11}C](+)-3-MPB, [^{11}C]-3-MPB and [^{11}C]4-MPB were determined by the subtraction of radioactivity in the cerebellum from that in each region.

mAChR のアンタゴニストであるスコポラミン (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) を、標識化合物投与の 30 分前に前投与すると、[^{11}C](+)-3-MPB と [^{11}C]4-MPB の脳内取り込みが、小脳以外の全ての領域で完全に阻害された (Figure 7A, C)。また、標識化合物投与 40 分後にスコポラミン (50 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.v.) を投与すると、小脳以外の全ての領域で [^{11}C](+)-3-MPB と [^{11}C]4-MPB の脳内取り込みの顕著な置換が観察された (Figure 7D, F)。一方、[^{11}C]-3-MPB では投与前、投与後のスコポラミン投与による影響は、いずれの領域においても認められなかった (Figure 7B, E)。

血漿において、各々の [^{11}C] 標識化合物は投与 30 秒以内にピークを示し、その後速やかに減少した (Figure 8A-C)。TLC による代謝物分析において、各々の [^{11}C] 標識化合物は原点に残る非常に極性の高い代謝物に徐々に代謝される事が判明し、投与 60 分後における全放射能 (未変化体+代謝物) に対

する $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ の未変化体の割合は、各々32.6+3.0、39.7+7.6 と6.2+1.3 %であった (Figure 8A-C、挿入図)。

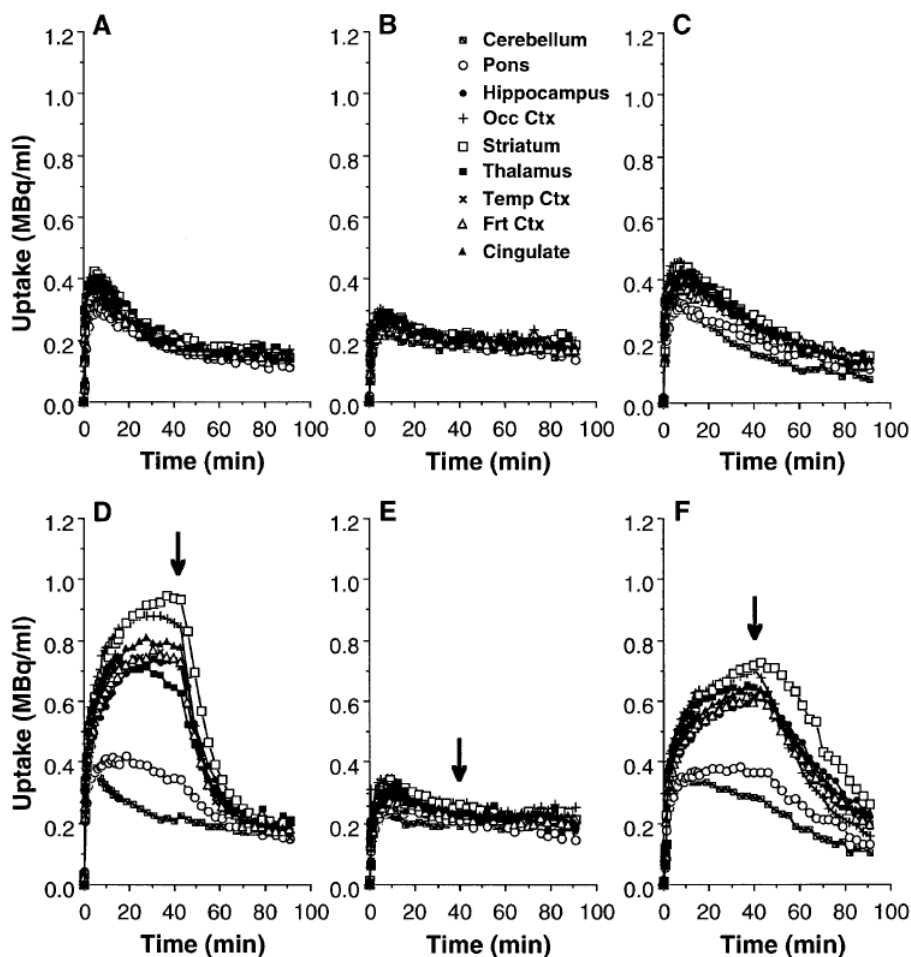


Figure 7 Effects of scopolamine on time-activity curves of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (A and D), $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ (B and E) and $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ (C and E) in the conscious state. The monkeys were intravenously administered 50 $\mu\text{g/kg}$ of scopolamine 30 min before (A, B and C) or 40 min after (D, E and F) the injection of $[^{11}\text{C}]$ labeled compounds, and PET scans were performed as described in the legend of Figure 7. Regions of interest (ROIs) were identified according to MRI of each animal.

代謝比率 (Figure 8A-C) から計算した未変化体の $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の入力関数を用いた Patlak plot 解析において、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ は全ての領域で線形回帰曲線が得られ (Figure 9A)、既報のヒトを対象にした解析結果と良く一致していた (Zubieta et al., 1998)。一方、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は Patlak plot 解析において、後半で傾き=0となる非線形の曲線が得られた (Figure 9B)。これは、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の mAChR からの解離速度定数 (k_4) が無視できないことを意味する。Logan plot 解析では、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は全ての領域で線形回帰曲線を示した (Figure 9C)。

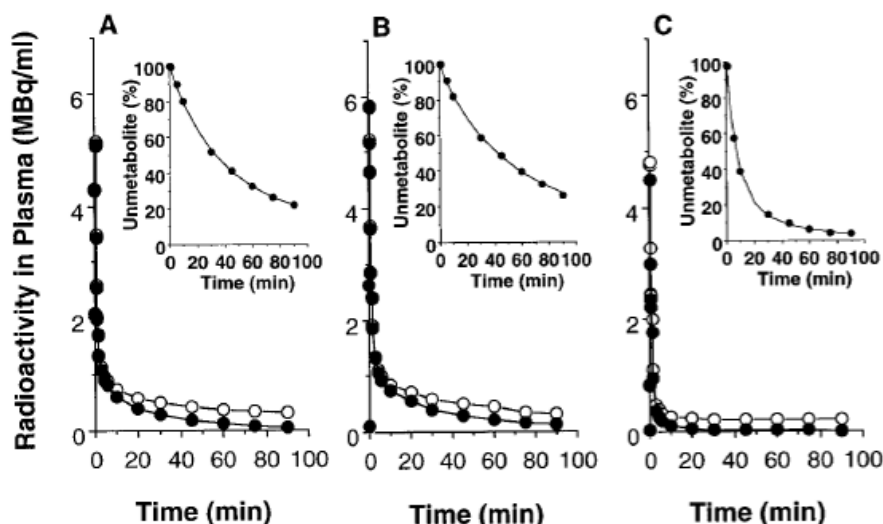


Figure 8 Time-activity curves of radioactivity in arterial plasma after injection of [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C]-3-MPB (B) and [^{11}C]4-MPB (C) in a representative monkey treated with saline in the conscious state. Total radioactivity (open circles) and unmetabolized (closed circles) [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C]-3-MPB (B) and [^{11}C]4-MPB (C) are shown. The ratio of radioactivity in the unmetabolized fraction of each ligand to that in total plasma (metabolite plus unmetabolized) was analyzed using TLC and phosphoimaging plate. Unmetabolized [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C]-3-MPB (B) and [^{11}C]4-MPB (C) were calculated by correction of total radioactivity with the ratios of unmetabolized ligands at each time point as shown in the insets.

Table 1 において、mAChR の存在が無視できる対照領域としての小脳に対する各々の領域における [^{11}C](+)-3-MPB の Logan plot の傾きの比、および [^{11}C]4-MPB の Patlak plot の傾きの比は、*in vitro* 解析により求められた mAChR の存在量 (B_{\max}) のデータ (Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986) と良く相関していた。

Table 1 Reginal uptake and receptor-related parameters of [^{11}C](+)-3-MPB and [^{11}C]4-MPB in the monkey brain under concious state.

Region	[^{11}C](+)-3-MPB		[^{11}C]4-MPB		In vitro B_{\max} (ratio to cere) ²
	Uptake value (ratio to cere) ¹	Logan slope (ratio to cere)	Uptake value (ratio to cere) ¹	Patlak slope (ratio to cere)	
Pons	1.74 \pm 0.11	1.62 \pm 0.22	1.86 \pm 0.06	1.72 \pm 0.43	2.8
Thalamus	3.31 \pm 0.28	4.27 \pm 0.94	3.50 \pm 0.30	3.62 \pm 0.11	3.5
Frontal cortex	4.53 \pm 0.37	4.81 \pm 0.48	3.58 \pm 0.38	3.52 \pm 0.25	7.4
Temporal cortex	4.82 \pm 0.49	5.07 \pm 0.50	3.76 \pm 0.43	3.73 \pm 0.29	8.0
Occipital cortex	5.56 \pm 0.49	5.83 \pm 0.64	4.22 \pm 0.89	4.21 \pm 0.56	9.4
Cingulate gyrus	4.85 \pm 0.28	5.19 \pm 0.58	3.67 \pm 0.32	3.62 \pm 0.27	4.4
Hippocampus	4.84 \pm 0.34	5.65 \pm 0.62	3.48 \pm 0.21	3.43 \pm 0.21	5.5
Striatum	6.67 \pm 0.74	8.05 \pm 0.97	4.32 \pm 0.37	4.08 \pm 0.14	16.0

¹Uptake values of [^{11}C]labeled ligands at 60–91 min postinjection expressed to the cerebellum.

²In vitro equilibrium [^3H]QNB binding (Lin et al., 1986; Snyder et al., 1975) expressed relative to the cerebellum.

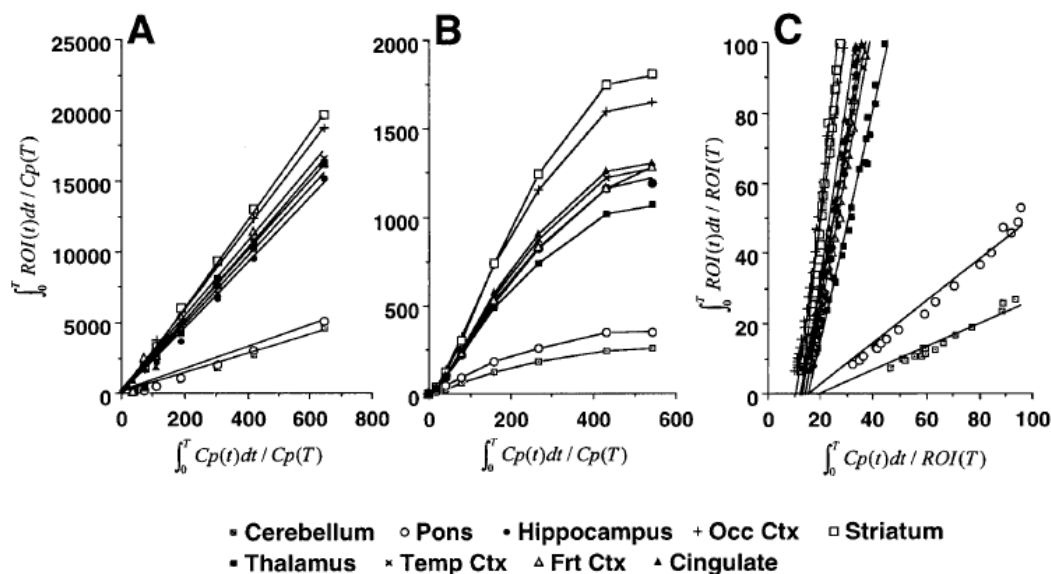


Figure 9 Patlak plot analysis of $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ (A) and $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ (B), and Logan plot analysis $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ (C) in ROIs of the brain of a representative monkey treated with saline in the conscious state. Analysis was performed on the regional time-activity data over 15 to 91 min after injection of $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ or $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$. ROI(T) represents the radioactivity in each ROI at time-T as shown in Figure 8, and Cp(T) represents the plasma radioactivity at time-T shown in Figure 10.

1-4 考察

本章では、新規 mAChR 標識化合物である $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ とその立体異性体 $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ を、高分解能動物用 PET を用いて覚醒アカゲザルの脳を対象にして脳内分布と動態解析を行って評価した、世界初の研究結果を示した。

覚醒アカゲザルへの $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ の静脈投与により、これら標識化合物は血液脳関門を通過して脳内への迅速な取り込みを示し、初期の集積は局所脳血流量を反映した拡散によるものであった。投与 60-91 分後の PET 画像では、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ 集積は線条体で最も高く、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬で中程度、視床と橋で低く、小脳が最も低かった。小脳を除いて、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ の脳内集積は、標識化合物投与 30 分前の mAChR のアンタゴニストであるスコポラミン投与によって完全に阻害され、標識化合物投与 40 分後に投与したスコポラミンの投与により顕著に低下した。これらの結果は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ の脳内への集積が、mAChR に特異的であることを示している。一方、 $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ の分布は脳の全ての領域で低く、それはスコポラミンの前投与によって観察された $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ の分布と全く同一であった。これらの結果は、 $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ の分布は、非特異的結合と遊離画分を示すものであることを示唆している。もし、活性型である $[^{11}\text{C}](+)\text{-}3\text{-MPB}$ の非特異的結合と遊離画分の脳内動態が不活性型である $[^{11}\text{C}](-)\text{-}3\text{-MPB}$ と全く同じであれば、活性型および不活性型の $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物を用いた 2 回の PET 計測で、*in vivo*での脳内 mAChR の定量的解析が可能であ

るが、期待に反して小脳への集積が $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ と $[^{11}\text{C}](-)\text{-3-MPB}$ で完全に同一でなかった。結合能と薬理学的効果で相違を示した QNB の 2 つの光学異性体のデータから推測されるように (Lowy et al., 1976)、血漿中から血液脳関門を通しての脳への輸送の違いが原因であろうと考えられる。

$[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ と比較して、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ は *in vitro* 実験で得られた mAChR が高密度で存在する領域 (Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986) おいて、放射能の集積が高かった。投与 60 から 91 分後において、小脳に対する $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ の集積の比率は線条体で 6.67、前頭葉皮質で 4.53、側頭葉皮質で 4.82、後頭葉皮質で 5.56、海馬で 4.84、帯状回で 4.85 であり、その全ての比は $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ の比 (4.32、3.58、3.76、4.22、3.48、3.67) より高かった。ヒトの臨床研究において、投与後 60 分後の小脳に対する線条体への集積比は、 $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{TRB}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{スコポラミン}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{ベンズトロピン}$ で各々 2-3、3.3、1.71、1.53 であった (Suhara et al., 1993; Koeppe et al., 1994; Frey et al., 1992; Dewey et al., 1990a)。これらの結果との比較から、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ はヒトの脳で高い集積が得られると予想される。投与 1 時間後から後の後半の集積画像が、*in vivo* における標識化合物と神経受容体の結合を反映した値であると仮定すると、この方法は動脈採血による代謝物解析を必要としないという優位性を持つ事となり、様々な仮定に基づく複雑な計算をすることなく、結合能を画像化できると考えられる。また、定量解析のために使われる動脈血解析による入力関数の誤差は、*in vivo* 解析における受容体結合を不正確にする可能性が高くなる。本研究の結果は、各々の領域の小脳に対する集積比の順序が、*in vitro* 解析での受容体密度 (B_{max}) とほぼ一致していた (Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986)。

各々の $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の血漿中放射能の解析では、静脈内投与のおよそ 30 秒後にピークに達して、その後速やかに減少した。代謝物分析では、各々の $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物は血液脳関門を透過することができない非常に極性の高い代謝物に徐々に代謝することを示した。投与 60 分後の未変化体は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ が $32.6 \pm 3.0 \%$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{-3-MPB}$ が $39.7 \pm 7.6 \%$ であった。対照的に、 $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ は、血漿中で非常に早く代謝され、投与 60 分後では $6.6 \pm 1.0 \%$ しか残っていなかった。サルにおける $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](-)\text{-3-MPB}$ の未変化体の比率はラットの値より低かったが (Takahashi et al., 1997)、これらの 2 つの化合物はサルの血漿中で比較的安定であった。脳へのより高い集積、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ の血漿中での安定性は、PET を用いたサル・ヒト脳を対象にした mAChR の定量解析に有効である。

これまではポジトロン放出核種 (たとえば ^{11}C の $T_{1/2} = 20.4$ 分) の短い半減期のために、解離速度が遅く平衡に数時間から数日を要する化合物による、mAChR の *in vivo* 解析は困難であった。そのうえ、受容体からのプローブの解離が血中からのクリアランス率より遅いならば、真の平衡は投与後のどの時間においても得ることができない (Koeppe et al., 1994)。PET 計測に用いられる $[^{11}\text{C}]$ 標識受容体プローブの解離定数 (K_D) 値は、nM オーダーでなければならない (Comer and Maziere, 1982)。 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ による *in vitro* での評価では、mAChR への (+)3-MPB の親和性は比較的弱い ($K_i = 1.71 \text{ nM}$) 事が判明し、4-MPB より 3.3 倍、スコポラミンおよび (+)-2-TRB より 8.5 倍低かった (Takahashi et al., 1999)。(−)3-MPB は (+)3-MPB より 83.6 倍低い親和性であった。これら *in vitro* 解析の結果は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ が例えばドパミン D_2 受容体計測に用いる $[^{11}\text{C}]\text{ラクロプライド}$ と同様、PET 計測時間内に結合が平衡に達する比較的弱

い親和性を示す化合物であることを意味し、このことから $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は PET を用いた脳内 mAChR 計測に有効であると考えられる。実際、ラット脳の $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の *in vivo* 評価の結果では、大脳皮質と線条体の動態でピークを示し(Takahashi et al., 1997)、この章でも $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ とは異なり、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の各領域における特異的結合の動態が、投与 91 分後までの PET 計測時間以内でピークに達することを示した。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の mAChR への可逆的結合性は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ のローガンプロット解析の結果は直線を示し、パトバックプロット解析では全ての脳の領域で非線形の曲線を示した事からも、確認された。これらの結果は、新規 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は霊長類の脳内 mAChR の評価に有効な $[^{11}\text{C}]$ 標識 PET プローブであることを示唆するものであった。

本章では、覚醒アカゲザルを対象とした PET 計測を用いて、新規 mAChR の標識化合物である $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ とその光学異性体 $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ の脳内動態および血漿中代謝の評価結果を示した。これらの結果は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ が従来報告されていた mAChR の標識化合物(例えば $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]$ スコポラミン)より適切な性質を有する $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物であることを示唆するものであった。

第2章 ムスカリン性受容体に対する親和性の異なる PET プローブ(+)N-[¹¹C]ethyl-3-piperidyl benzilate と(+)N-[¹¹C]propyl-3-piperidyl benzilate の開発

2-1 序論

本研究では N-[¹¹C]methyl-3-piperidyl benzilate ([¹¹C]3-MPB) を開発した(Takahashi et al., 1997, 1998; Tsukada et al., 2001)。その化学構造が不斉炭素を含んでいるため、2つの光学異性体、すなわち活性体である[¹¹C](+)3-MPB および不活性体である[¹¹C](-)3-MPB が存在する。これまでの研究では、*in vitro* 結合実験において活性型の 3-(+)MPB は 4-MPB より中枢性 mAChR への親和性が低いことが示されており (Takahashi 1998)、生きたラット(Takahashi et al., 1997) およびサル(Tsukada et al., 2001) 脳において受容体より速く解離することが示されている。本研究では [¹¹C](+)3-MPB および[¹¹C]4-MPB の速度定数の差は、受容体に対する親和性の差によっていると推測した。実際、最近の研究では 3-PB および 4-PB の N-置換基のアルキル鎖の長さが *in vitro* において影響を与えたり、抗コリン効果に影響を与える (Baumgold et al., 1997; Tejani-Butt et al., 1990)。さらに 4-PB の N-ethyl 化により得られる N-[¹¹C]ethyl-4-piperidyl benzilate ([¹¹C]4-EPB) は[¹¹C]4-MPB よりサル脳において速い消失速度を示した (Nishiyama et al., 2000)。

本研究では (+) 3-piperidyl benzilate ((+)3-PB)を[¹¹C]ethylation および[¹¹C]propylation でそれぞれ標識した(+)N-[¹¹C]ethyl-3-piperidyl benzilate ([¹¹C](+)3-EPB) および(+)N-[¹¹C]propyl-3-piperidyl benzilate ([¹¹C](+)3-PPB) をムスカリン性コリン受容体用 PET プローブとして開発し、高解像度動物 PET カメラ(Hamamatsu SHR-7700)(Watanabe et al., 1997) を用い、サル脳内分布および動態を [¹¹C](+)3-MPB と比較して評価を行った。

平行して、(+)3-MPB、(+)3-EPB、(+)3-PPB およびそれらの不活性な異性体(-)3-MPB、(-)3-EPB、(-)3-PPB と[³H]QNB をラット脳スライスを用いてムスカリン性コリン受容体への親和性を求めた。さらに、AChE 阻害により認知機能を増加させるドネペジル(アリセプト、Sugimoto et al., 1992)のこれら3つのプロブの結合に対する影響を、PET とマイクロダイアリスを組み合わせて測定した。

2-2 材料と方法

2-2-1 実験動物と試薬

PET 実験に 5 匹の体重 4-6kg の若齢成体雄性アカゲザル(*Macaca mulatta*)を用いた。飼育管理および頭部定位固定の方法は 1-2-1 と同様に行った。

日本 SLC (Hamamatsu, Japan) から購入した雄性の Sprague Dawley ラット(250-280g)を、食物と水を自由に摂取することが可能なケージに個々に収容し、飼育した。ラットを、12 時間の明/暗サイクル(午前 7:30 点灯)の下で飼育した。ラットは、英国の生物学会の Use of Living Animals in Scientific

Investigations (2nd Ed)、および浜松ホトニクス中央研究所のガイドラインに従って飼育し実験に用いた。

[¹¹C](+)-3-MPB、[¹¹C](+)-3-EPB、[¹¹C](+)-3-PPB の前駆体である (+)-3-piperidyl benzilate ((+)-3-PB) は既報の方法(Takahashi et al., 1998) により合成した。ドネペジル は既報の方法(Sugimoto et al., 1992)により合成した。(+)3-MPB、(-)-3-MPB、(+)-3-EPB、(-)-3-EPB、(+)-3-PPB、(-)-3-PPB はそれぞれ対応する前駆体(+)-3-PB または (-)-3-PB の *N*-methylation, *N*-ethylation または *N*-propylation により合成した。 [³H]QNB (1.11 TBq/mmol) は NEN (Boston, MA, USA)より購入した。Atropine は Sigma (St. Louis, MO)より購入した。

2-2-2 [¹¹C]標識化合物の合成

[¹¹C](+)-3-MPB は 1-2-2 と同様の方法で、[¹¹C](+)-3-EPB または [¹¹C](+)-3-PPB は 2-2-2 と同様の方法で得た(Figure 10, Långström et al., 1986; Ishiwata et al., 1999; Nishiyama et al., 2000)。

[¹¹C]alkyl (+)-3-PB の化学的、放射化学的純度は、カラム(Finepak SIL C18-S, 4.6 mm in inner diameter x 150 mm in length, Jasco, Tokyo, Japan)、ポンプ (CCPS, Tosoh, Tokyo, Japan)、UV 検出器 (UV-8020, Tosoh, Tokyo, Japan)、放射能検出器 (RLC-700, Aloka, Tokyo, Japan)の機器構成で、移動相に CH₃CN / 30mM CH₃COONH₄ / CH₃COOH (350 / 650 / 2)、流速 1 ml/min. の HPLC システムで求めた。

標識体の脂溶性を求めるためにすでに報告された方法(Mukherjee et al., 1990)により分配係数を求めた。Octanol (2 ml) と 0.066M phosphate-buffer, pH 7.4 (2 ml) 3 分間攪拌した。10μL のそれぞれの標識化合物を加え、さらに 3 分間攪拌した。その後 5 分間遠心分離し、それぞれの放射能を測定した。そしてそれぞれの標識化合物の分配係数である logD_{7.4} を求めた。

2-2-3 PET 計測

PET 計測は 1-2-3 と同様の方法で行い、データを収集した。

生理食塩液、ドネペジル 50 または 250 mg/kg の投与量で [¹¹C]標識化合物投与 45 分前に静脈投与した。

2-2-4 血漿中代謝物の測定

動脈血を、標識化合物投与後に 10 秒から 66 秒まで 8 秒ごと、続いて 96、156、246、336 秒、その後 20、30、45、60、75 および 90 分後に得た。その後の処理は 1-2-4 と同様の方法にて行った。ただし、移動相に [¹¹C](+)-3-MPB には A (ethylene dichloride : diethyl ether : ethanol : triethylamine = 20 : 20 : 1 : 1)、[¹¹C](+)-3-EPB には B (ethylene dichloride : diethyl ether : ethanol = 20 : 20 : 1)、[¹¹C](+)-3-PPB には C (ethylene dichloride : diethyl ether : ethanol = 40 : 40 : 1) を用いた。

2-2-5 動態解析

入力関数として、代謝物補正を行った動脈血血漿とそれぞれの ROI の動態から、3-コンパートメントモデルを用いて最小二乗法で速度係数 (k_1 , k_2 , k_3 , k_4) を求め、同時に小脳の K_1/k_2 比も求めた (Huang et al., 1986)。各々の ROI の mAChR への標識プローブの結合定数 (BP) は、 k_4 値 (解離速度) に対する、 k_3 値 (結合速度) のから求めた (Tsukada et al., 2001b, c)。

2-2-6 マイクロダイアリシス測定

既報の方法 (Nishiyama et al., 2001) に従って、個々の MRI 画像よりアクリル製プレートに沿ってガイドカニューレを硬膜下 (2mm, A:48mm, L:14.5mm) に挿入した。覚醒下のサルを、イスに座らせ、ガイドカニューレに沿って前頭葉にメンブランの直径 250 μm 、長さ 2mm のマイクロダイアリシスプローブ (Eicom A-I-08-02, エイコム, 東京、日本) を挿入した。プローブに 2×10^{-6} M のフィズスチグミン硫酸塩を含むリンゲル液 (147 mM NaCl, 3.4 mM CaCl_2 and 4 mM KCl) を 5 ml/min の流速で流し、15 分ごとに 75 μl のサンプルを得た。ACh 濃度を、固定化酵素反応基を用いたカラム (Eicompak AC-Gel, 6 x 15 mm, エイコム, 東京、日本)、電気化学検出器 (EICOM ECD-100, エイコム, 東京、日本) から構成される HPLC (EICOM EP-10, エイコム, 東京、日本) システムを用いて測定した。挿入したプローブの位置を確認する目的で、実験終了時に 5 μl のチャイナインクをプローブ内に注入した。実験終了後動物をペントバルビタールの過剰投与によって実験殺して、脳を素早く取り出し、クライオスタットを用い冠状面の方向にカットし、挿入されたプローブの位置を視覚的に確認した。

2-2-7 [^3H]QNB を用いたラット脳スライスでの親和性測定

ラットをハロタン (0.06 vol.%) で麻酔し断頭し、素早く脳を取り出した。凍らせた組織をクライオスタット (CM3000, Leica Microsystems, Nussloch, Germany) を用い、ブレグマの -2.3 から -2.8 mm を 10 μm の厚さで冠状面の方向にスライスし、冷却したスライド上に移した。スライスされた組織の保存は -80 $^{\circ}\text{C}$ で行い、乾燥した室温でも用いることが出来る。

組織を [^3H]QNB (final concentration; 1.2 nM) が 0.1 から 1000 nM となるように、トリス塩酸緩衝液 (20 mM Tris-HCl, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 0.001 % ascorbic acid, pH 7.4) 内で 25 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分インキュベーションした。非特異的結合は、1 mM アトロピンを加えることで求めた。2 分間の冷却した緩衝液でのリンスを 2 回することでインキュベーションを終了とし、4 $^{\circ}\text{C}$ に冷却した蒸留水にそっと浸し、50 $^{\circ}\text{C}$ に加熱したホットプレート上でスライドを素早く乾燥した。標識された組織を 3 日間フォスフォイメージングプレート (TR-2040, Fuji Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) で感光した。イメージデータを BAS-2500 (Fuji Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて解析を行った。それぞれ $n=3$ で結果を求めた。

ROI をラット脳解剖図 (Paxinos and Watson, 1986) を元に左右新皮質から求め、それぞれの半球から得られた ROI の集積量 ($\text{counts}/\text{mm}^2$) を求めた。バックグラウンドを差し引いて得られた単位画素あたりの放射能を [^3H]-calibration scales ([^3H]micro-scale, Amersham, St. Louis, MO) を用いて正規化した。

[³H]QNB の特異的結合は、トータル結合と非特異的結合より求めた。特異的結合はそれぞれのプローブの濃度から 50%阻害(IC₅₀)を求めることで得て、Cheng and Prusoff equation (Cheng and Prusoff, 1973)を用いてさらに阻害速度(K_i)へ変換した。それぞれ n=3 から求めた。

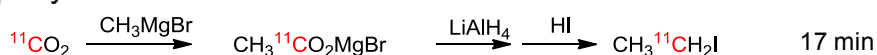
2-2-8 統計解析

結果を平均 ± SD で表す。比較は、両側ステューデント *t* 検定を用いた。5%未満 (p<0.05) の危険率を、統計的に有意であるとした。

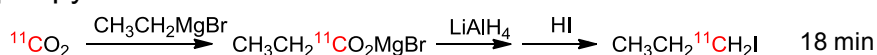
[¹¹C]Methyl iodide



[¹¹C]Ethyl iodide



[¹¹C]Propyl iodide



[¹¹C]Alkylation

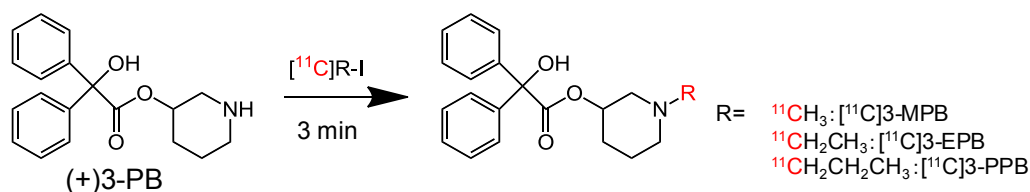


Figure 10 Radiochemical syntheses of [¹¹C]methyl, [¹¹C]ethyl and [¹¹C]propyl iodides (A), and labeling of (+)-*N*-[¹¹C]methyl-3-piperidyl benzilate ((+)-3-MPB), (+)-*N*-[¹¹C]ethyl-3-piperidyl benzilate ((+)-3-EPB) and (+)-*N*-[¹¹C]propyl-3-piperidyl benzilate ((+)-3-PPB) (B).

2-3 結果

すでに報告されているようにグリニャール試薬による反応で [¹¹C]ヨウ化メチルが副生成物として産生され(Långström et al., 1986; Ishiwata et al., 1999; Nishiyama et al., 2000)、これは [¹¹C]ヨウ化エチル、 [¹¹C]ヨウ化プロピルより反応性が高く、 [¹¹C]エチル化、 [¹¹C]プロピル化の反応を阻害する。本研究ではガスクロマトグラフィー(GC)を用い [¹¹C]ヨウ化エチル、 [¹¹C]ヨウ化プロピルを精製し(Ishiwata et al., 1999; Nishiyama et al., 2000)、これを(+)-3-PB の [¹¹C]エチル化、 [¹¹C]プロピル化の反応に用いた(Figure 10)。前駆体の [¹¹C]アルキル化反応の後、 [¹¹C](+)-3-EPB または [¹¹C](+)-3-PPB を分取用 HPLC にて精製した(それぞれの保持時間は 12.8 分または 14.6 分)。前駆体の(+)-3-PB は 5.4 分に溶出され、標識化合物と

分離できた。分析 HPLC において $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ または $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の保持時間はそれぞれ 6.4 分、8.9 分であった(Figure 11)。

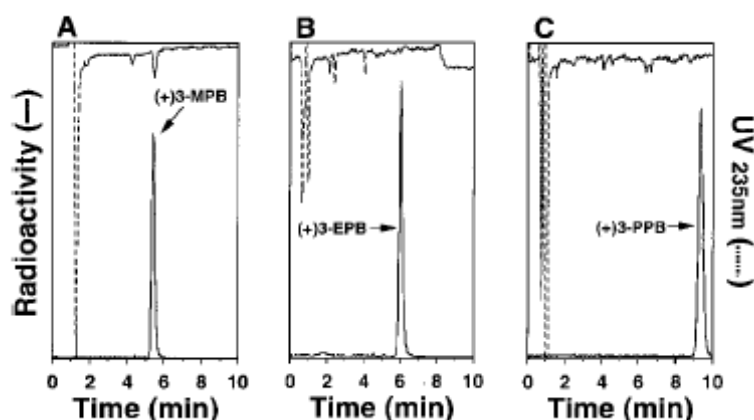


Figure 11 Analytical profiles of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (A), $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ (B) and $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ (C)..

了した。放射化学的純度は 99%以上で、比放射能は合成終了時において 34.1 ($[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$) または 66.3 GBq/ μmol ($[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$) であった(Table 2)。これらの比放射能はよく用いられる $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (67.4 GBq/ μmol)に匹敵する値であった。これら新しく合成された化合物の比放射能は *in vivo* での mAChR 結合を評価するのに十分高い値であった。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の分配係数(log $D_{7.4}$)はそれぞれ 1.53、1.68、2.37 であった。

Table 2 Labeling of (+)3-PB with $[^{11}\text{C}]$ methyl-, $[^{11}\text{C}]$ ethyl- and $[^{11}\text{C}]$ propyl iodides.

		$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$	$[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$	$[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$
Elution time on preparative column	(min)	(7.1) ^b	12.8	14.6
Elution time on analytical column	(min)	5.4	6.5	8.9
Yield from $[^{11}\text{C}]$ alkyl iodide	(%)	70	38	32
Radioactivity yield ^a	(MBq)	2,710	309	395
Specific radioactivity ^a	(GBq/ μmol)	67.4	66.3	34.1
Radiochemical purity ^a	(%)	>99	>99	>99
Lipophilicity	(log P)	1.53	1.68	2.37

^aData obtained at EOS.

^b $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ were analyzed by analytical HPLC with $\text{CH}_3\text{CN}/30\text{ mM CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ (500/500/5).

Figure 12 に $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (A)、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ (B)、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ (C)のサル脳の典型的な MRI と PET の画像を示す。PET 画像は覚醒下における標識化合物投与後 60-91 分までの画像を加算平均したものである。これら 3 つの標識化合物剤の脳内分布は線条体、後頭葉皮質に高く、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬に中程度、小脳で低かった(Figure 12A-C)。この結果は *in vitro* アッセイで得られた mAChR 濃度(Bmax)とよく一致していた(Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986)。前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、および帯状回での $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 放射能集積の最大値は、投与の 40 分後に得られた(Figure 13A)。線条体と海馬では集積の最大値は 55 分であった(Figure 13A)。Figure 13A-C が示すよう

に ^{11}C アルキル基が長くなるに従ってピークの時間が前方にシフトした(投与後のピーク時間は $^{11}\text{C}(+)\text{3-PPB} < ^{11}\text{C}(+)\text{3-EPB} < ^{11}\text{C}(+)\text{3-MPB}$ の順)。対照領域である小脳では、受容体濃度が低く、放射能動態ではそれぞれのプローブにおいて 10 分以内にピークがあり、その後徐々に減少していった(Figure 13A-C)。血漿中ではそれぞれの ^{11}C 標識化合物の放射能は静脈へのボラス投与後 30 秒でピークに達し速やかに消失した(Figure 14A-C)。TLC による代謝物分析では、それぞれの ^{11}C 標識化合物は徐々に TLC 原点に残る非常に水溶性の高い代謝物に代謝され、未代謝物の割合は投与後 60 分において $^{11}\text{C}(+)\text{3-PPB}$ (移動相 A における $R_f=0.72$)は $31.0 \pm 4.6\%$ 、 $^{11}\text{C}(+)\text{3-EPB}$ (移動相 B における $R_f=0.60$)は $33.2 \pm 7.6\%$ 、 $^{11}\text{C}(+)\text{3-MPB}$ (移動相 C における $R_f=0.70$)は $33.5 \pm 1.3\%$ であった(Figure 14A-C)。 ^{11}C 標識化合物の入力関数は、得られた未変化体の割合から計算して求めた(Figure 14A-C)。

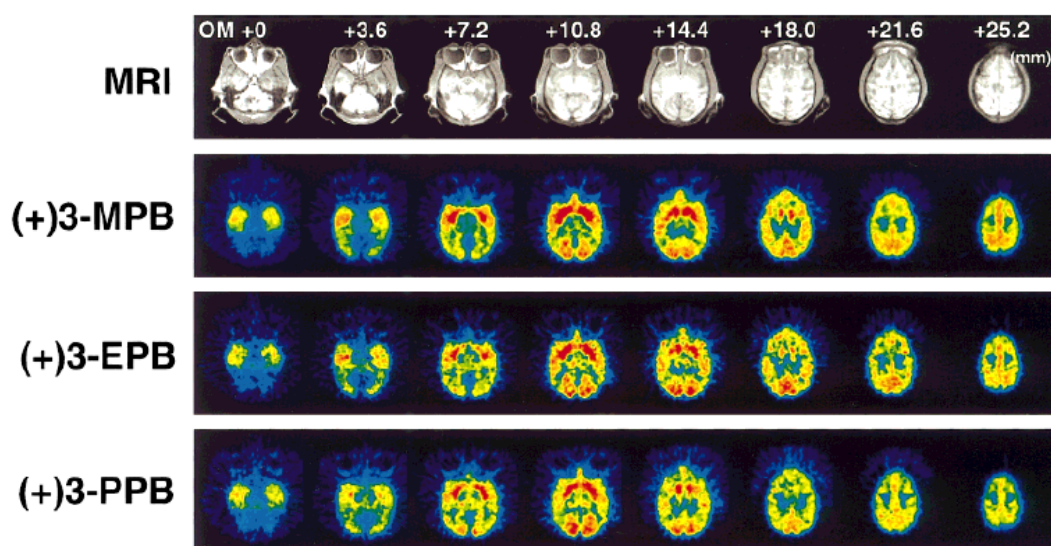


Figure 12 MRI and PET images of $^{11}\text{C}(+)\text{3-MPB}$ (A), $^{11}\text{C}(+)\text{3-EPB}$ (B) and $^{11}\text{C}(+)\text{3-PPB}$ (C). MR images of monkeys were obtained with a Toshiba MRT-50A/II (0.5T). PET data were collected in the conscious state with a high-resolution PET scanner (Hamamatsu SHR-7700) with transaxial resolution of 2.6 mm (FWHM) and a center-to-center distance of 3.6 mm. PET scans were performed for 91 min, and each PET image was generated by summation of image data from 60 to 91 min post-injection.

^{11}C アルキル基の長さの違いは、3 コンパートメント速度解析においても見られた。すなわち長い ^{11}C アルキル基のものは低い親和性 BP で(Figure 15)、おもに速い解離常数(k_4)によるものである(データは示していない)。

$^{11}\text{C}(+)\text{3-MPB}$ 、 $^{11}\text{C}(+)\text{3-EPB}$ 、 $^{11}\text{C}(+)\text{3-PPB}$ の動態に対する内因性 ACh の影響の評価するため、脳内で特異的に ACh 代謝酵素を阻害する薬物であるドネペジル(Sugimoto et al., 1992)を、 ^{11}C 標

識化合物を投与する 45 分前に前投与した。マイクロダイアリシスでは 50 または 250 mg/kg のドネペジル
の投与量で前頭葉の細胞外 ACh 濃度が投与量依存的に増加した (Figure 16)。ドネペジルの前投与は
[¹¹C](+)-3-MPB の皮質において放射能動態に影響を与えず、mACh 作動神経の豊富な領域において結
合 (BP = k_3/k_4) の著しい変化は見られなかった (Figure 17A)。受容体の豊富な領域における
[¹¹C](+)-3-EPB の結合はドネペジルによるコリン代謝酵素阻害によって顕著ではないが減少した
(Figure 17B)。ドネペジルの投与は、ムスカリン性コリン作働性神経受容体の豊富な皮質領域の
[¹¹C](+)-3-PPB の結合を著しく減少させた (Figure 17C)。

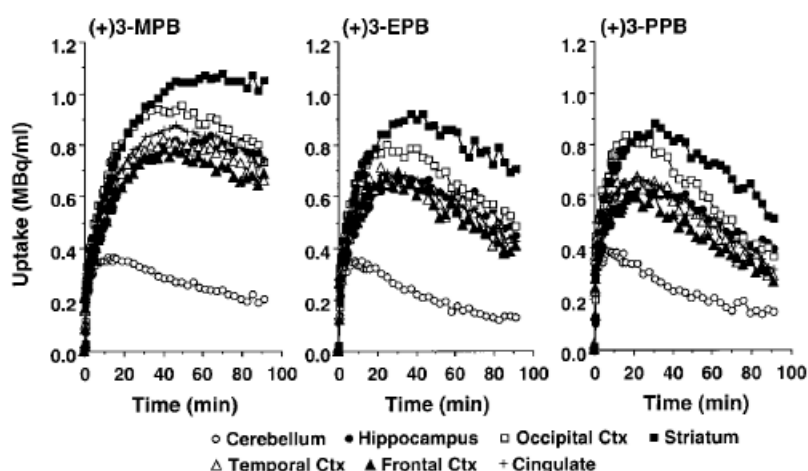


Figure 13 Time-activity curves of [¹¹C](+)-3-MPB (A), [¹¹C](+)-3-EPB (B) and [¹¹C](+)-3-PPB (C) in the conscious monkey brain. PET scans were performed as described in the legend of Figure 14. Regions of interest (ROIs) were identified according to MRI of each animal.

ラット脳スライスを用いた mACh 作働性神経受容体の *in vitro* での [³H]QNB (1.2 nM) との競合的分
析において、(+)-3-MPB、(+)-3-EPB、(+)-3-PPB およびその光学異性体である (-)-3-MPB、(-)-3-EPB、
(-)-3-PPB の IC₅₀ および K_i を求めた。異なったインキュベーション時間から、ラット脳新皮質部位への
[³H]QNB の結合は経時的に増加し、30 分で平衡に達した (Figure 18A)。それ故競合実験にはインキュ
ベーションの時間を 30 分とした。N-アルキル PB の中で、ラット脳内の新皮質において (+)-3-MPB が
mAChR への最も高いアフィニティーを示し (K_i = 1.69 nM)、(+)-3-EPB は中間で (12.9 nM)、(+)-3-PPB は
最も低い (47.53 nM) であった (Figure 18B、Table 2)。対照的に (-)-3-MPB、(-)-3-EPB、(-)-3-PPB は受容
体への親和性は大変低く (1000 nM 以上) であり、活性型である (+) 体に対して 2 桁以上低かった
(Figure 18B、Table 2)。(−)-3-PPB は 1000 nM まで [³H]QNB の特異的結合を阻害しなかった
(Figure 18B)。

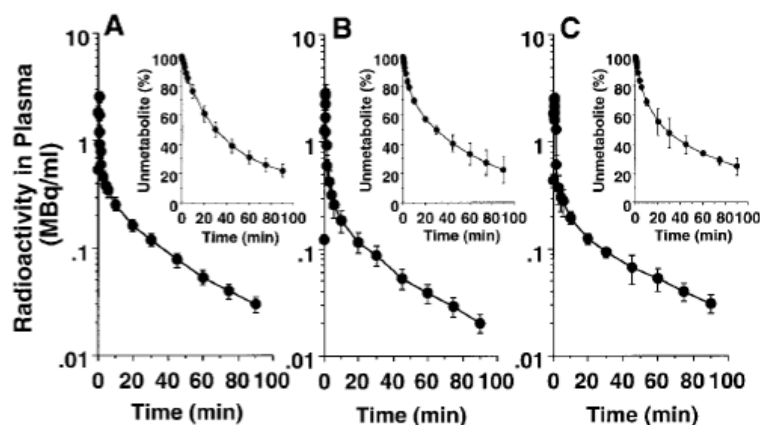


Figure 14 Time-activity curves of radioactivity in arterial plasma after injection of [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C](+)-3-EPB (B) and [^{11}C](+)-3-PPB (C) in conscious monkeys. Unmetabolized [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C](+)-3-EPB (B) and [^{11}C](+)-3-PPB (C) in plasma are shown. The ratios of radioactivity in the unmetabolized fraction of each ligand to that in total plasma (metabolized plus unmetabolized) were analyzed using TLC and a phosphoimaging plate at each time point as shown in the insets.

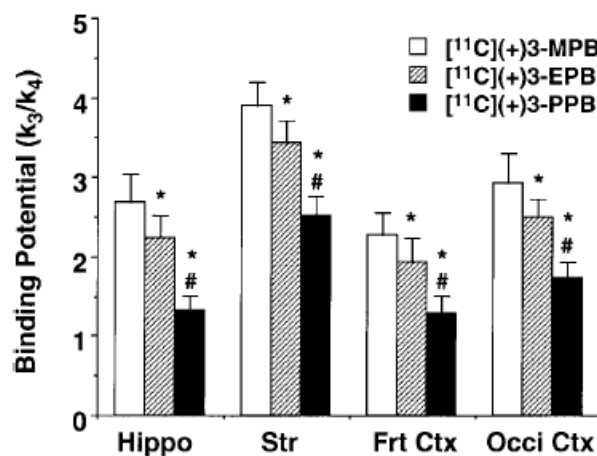


Figure 15 Effects of *N*-[^{11}C]alkyl chain length on the binding potential ($\text{BP} = k_3/k_4$) of *N*-alkyl substitutions of [^{11}C](+)-3-MPB in the cortical regions of the conscious monkey brain. The time-activity curves of unmetabolized [^{11}C](+)-3-MPB, [^{11}C](+)-3-EPB and [^{11}C](+)-3-PPB in arterial plasma were used as input functions into the brain, and the three-compartment model was fitted to the time-activity curve of specific binding in each region. The binding potential was calculated as the ratio of the association rate (k_3) to the dissociation rate (k_4). Data are expressed as means \pm SD for five animals. * $P < 0.05$ vs. [^{11}C](+)-3-MPB, # $P < 0.05$ vs. [^{11}C](+)-3-EPB.

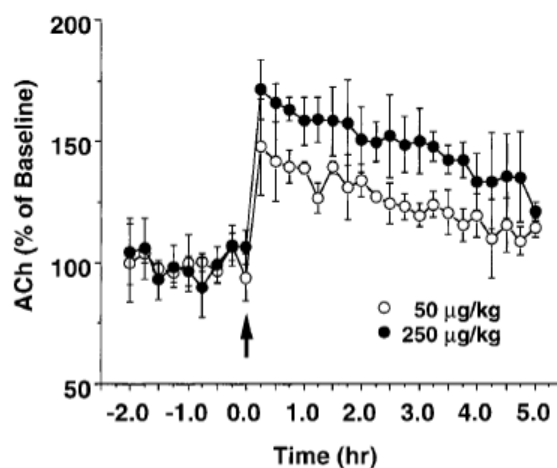


Figure 16 Effects of donepezil on the acetylcholine concentration in the extracellular fluid (ECF) of the frontal cortex. A microdialysis probe was inserted into the frontal cortex (A: 48 mm, L: 14.5 mm, 2 mm below the dura matter) according to the individual MR images via the guide cannula. The probe was perfused with Ringer's solution containing 2×10^{-6} M physostigmine sulfate at a rate of 5 μ l/min. Samples were collected every 15 min, and the content of acetylcholine was measured by HPLC consisting of an immobilized enzyme reactor, a column and an ECD. Aricept was systemically administered at doses of 50 and 250 μ g/kg at time-0 indicated by the arrow. Data are presented as % of "baseline", which was the averaged acetylcholine level before administration of donepezil.

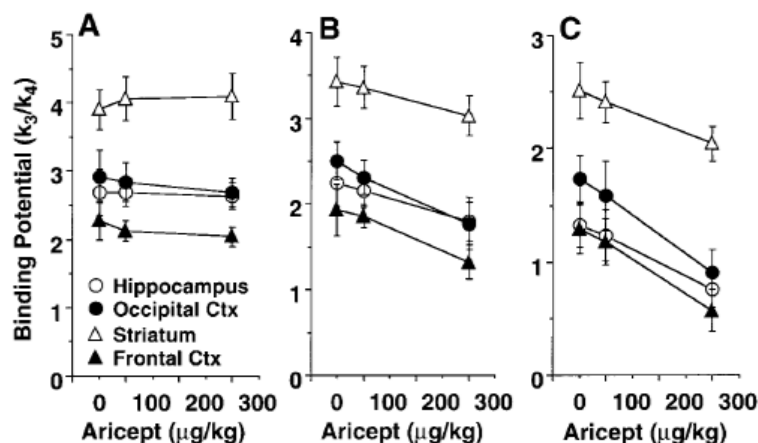


Figure 17 Dose effects of cholinesterase inhibition by donepezil on the binding potential ($BP = k_3/k_4$) of [^{11}C](+)-3-MPB (A), [^{11}C](+)-3-EPB (B) and [^{11}C](+)-3-PPB (C) in the cortical regions of the conscious monkey brain. The time-activity curves of unmetabolized [^{11}C](+)-3-MPB, [^{11}C](+)-3-EPB and [^{11}C](+)-3-PPB in arterial plasma were used as input functions into the brain, and the three-compartment model was fitted to the time-activity curve of specific binding in each region. The binding potential was calculated as the ratio of the association rate (k_3) to the dissociation rate (k_4). Data are expressed as means \pm SD for five animals per treatment condition.

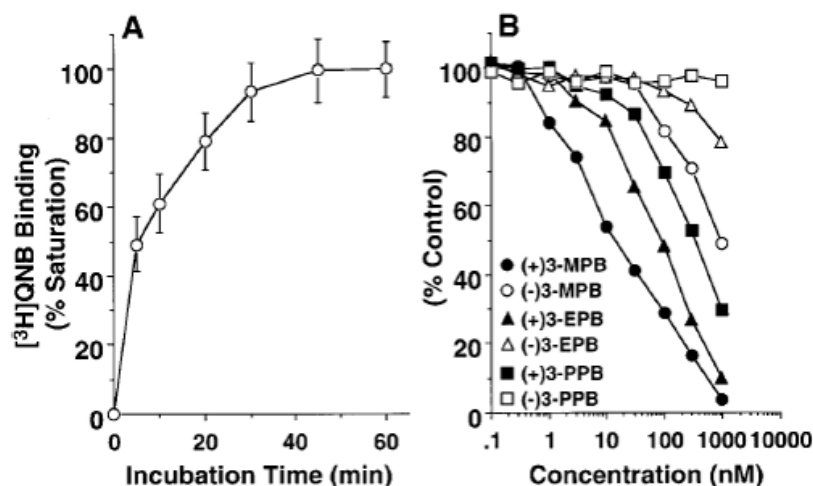


Figure 18 Time course of specific binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ (A), and inhibition of specific binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ by (+)3-MPB, (+)3-EPB, (+)3-PPB and their inactive enantiomers (-)3-MPB, (-)3-EPB and (-)3-PPB (B) in the neocortex of the rat brain. A; Brain slices were incubated with $[^3\text{H}]\text{QNB}$ for 5, 10, 20, 30, 45 and 60 min at 25 °C. B; Incubation was performed with varying amounts of each ligand from 0.1 to 1000 nM for 30 min at 25 °C. Nonspecific binding at each time point was determined by adding 1 μM atropine. Specific binding of $[^3\text{H}]\text{QNB}$ estimated as the difference between total binding and nonspecific binding at each point was plotted against incubation time (A), and concentrations of each compound to determine the 50 % inhibition (IC_{50}) values (B).

2-4 考察

本研究は高分解能 PET を用いて覚醒下のヒト以外の霊長類脳における新規 mAChR プローブ $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の分布と動態を評価した最初のレポートである。加えて、mAChR プローブ $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (Takahashi et al., 1997, 1998; Tsukada et al., 2000d) を対照にして、AChE 阻害薬であるドネペジルによって高められた内因性 ACh と $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物との相互作用について有用なデータを示した。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ をサルに静脈投与すると、直ちに血液-脳関門を通過して脳内に取り込まれ、初期は脳血流量に依存した拡散の形式に従う。後半 60-91 分の加算平均された PET 画像では、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の分布はほぼ同じ傾向を示し、線条体に最も高く、後頭葉皮質に高く、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬に中程度、小脳に低かった。これらの結果は $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ より長いアルキル鎖を有する $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ が *in vivo* における脳内 mAChR への結合特性を保持していることを示している。M₁ 受容体は線条体に高く、皮質に中程度、視床に低く、小脳にもっとも低く、M₂ 受容体は線条体、皮質、視床に均一に分布している (Li et al., 1991; Wall et al., 1991; Flynn and Mash, 1993)。PET 計測によって得られた $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の皮質における分布は M₁ 受容体の分布に類似していた。しかしながら、ヒト mAChR サブタイプを示す CHO-K1 培養細胞を用いた *in vitro* における実験では、(+)-3-MPB は M₁、

M₂ 受容体への選択性を示さなかった (Sihver et al., unpublished data)。mAChR の定量的解析をするために、動脈採血によって得られた血漿中のそれぞれの [¹¹C] 標識化合物の放射能動態を得た。それぞれの [¹¹C] 標識化合物の血漿中の総放射能のカーブから、静脈内ボラス投与 30 秒後にピークが得られ、その後急速に減少していった。それぞれの [¹¹C] 標識化合物の代謝物分析において、血液-脳関門を通過することが出来ないと予想される水溶性の非常に高い代謝物に徐々に代謝されていった。投与後 60 分の末代謝物は [¹¹C](+)3-MPB が 31.0 ± 4.6 %、[¹¹C](+)3-EPB が 33.2 ± 7.6 %、[¹¹C](+)3-PPB が 33.5 ± 1.3% であった。このことは 3 つの化合物は血漿中で安定であることを示唆している。脳への速い取り込み、[¹¹C](+)3-MPB、[¹¹C](+)3-EPB、[¹¹C](+)3-PPB の血漿中での安定性から、サルおよびヒトの *in vivo* における PET 計測で mAChR の定量的解析が可能であることを示唆している。

[¹¹C](+)3-EPB、[¹¹C](+)3-PPB の放射能動態では受容体に富んだ部位である皮質において [¹¹C](+)3-MPB よりも速い時間にピークが得られ、かつ消失速度も速かった。しかし、これらプローブの脳内での速度論的特性はいくつかの要因によって決定づけられる。すなわち、血漿中、組織内での安定性、血漿タンパク質への結合性、脂溶性 (logD_{7.4})、血液脳関門の透過性、受容体への親和性であり、特に受容体への親和性が重要な要素である。下記に示すように、いくつかの中間的親和性の化合物 (例えば [¹⁸F]FP-TZTP, K_i = 2.20 nM または [¹¹C]4-EPB, K_i = 2.32 nM) は PET スキャンの間、平衡に達したままである (Carson et al., 1998, Nishiyama et al., 2000)。

動脈血の代謝物分析により補正された放射能動態を入力関数とした 3-コンパートメントモデルを用いた解析は、長い [¹¹C] アルキル鎖ほど親和性 (BP=k₃/k₄) が小さくなり、主に結合定数 (k₃) よりむしろ解離定数 (k₄) が増加することを表している。大脳皮質部位でのこれら PB の順位 ([¹¹C](+)3-MPB > [¹¹C](+)3-EPB > [¹¹C](+)3-PPB) は、[³H]QNB とラット脳スライスを用いた *in vitro* の実験の結果と一致していた。この順位 ([¹¹C](+)3-MPB > [¹¹C](+)3-EPB > [¹¹C](+)3-PPB) は、先に示した *in vitro* によって求められた受容体濃度 (B_{max}) とよく相関していた (Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986)。すでに得られている [¹¹C](+)3-MPB の結果 (Tsukada et al., 2000d)、および [¹¹C](+)3-EPB、[¹¹C](+)3-PPB の小脳への集積の比率の順位は、*in vitro* ですでに得られている受容体濃度 (B_{max}) (Snyder et al., 1975; Lin et al., 1986) と関係していると示唆している。しかし、プローブの取り込み、排出、加えて局所的な受容体への結合を考慮すると、遅い時間での取り込み (集積) は *in vitro* で得られている B_{max} (Frey et al., 1992) と区別できないことを示唆している。このように、[¹¹C](+)3-MPB、[¹¹C](+)3-EPB、[¹¹C](+)3-PPB を *in vivo* で測定すると大脳皮質と小脳は 3-4 倍の取り込みの違いに対して、*in vitro* では 30 倍も異なっている。それ故、標識化合物による速度論的解析は、はっきりとした受容体のダイナミックレンジの増加を表していると考えられる。

これまで報告されてきた [¹¹C] 標識化合物では、PET 計測において mAChR の定量的解析を行うのは困難である。というのは、ゆっくりとした解離定数のため数時間から数日にかけての平衡時間があるためである (Koeppe et al., 1994)。加えて、血中からの消失速度より解離定数が遅いと、投与後に正しい平衡を得ることが出来ない (Koeppe et al., 1994)。[¹¹C] 標識化合物の解離定数 (K_D) は *in vivo* PET 計測において 1nM オーダーであるべきである (Comer and Maziere, 1982)。[³H]QNB を用いた *in vitro* での結果

では、(+)-3-MPB ($K_i = 1.69\text{nM}$) の mAChR への親和性は中間的であり、4-MPB の 1/3.3、スコポラミンおよび(+)-2-TRB の 1/8.5 である (Takahashi et al., 1998)。 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ のアルキル鎖の異なった $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ は受容体に対する (K_i) は 12.9 および 47.53nM である。 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ の放射能動態は受容体に富んだ大脳皮質部位で $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ より速いピークと速い消失を示し、*in vitro* の結果で得られた mAChR への低い親和性を反映している。さらに、受容体に対するもっとも高い親和性を示す $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ の Logan プロット解析 (Logan et al., 1990) は直線を示し、Patlak プロット解析 (Patlak et al., 1983) では大脳のすべての領域において直線が得られなかった (Tsukada et al., 2000d)。 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ は可逆タイプの脳内結合を示し、霊長類の脳内 mAChR の PET 用 $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物に適切であると考えられる。

興味深いことに $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ の *N*-アルキル異性化により受容体への親和性を低下させることは、AChE 阻害剤であるドネペジルの投与により、増加する内因性 ACh 濃度に対する感受性を示すことができる。このように、投与量依存的にドネペジルが細胞外の ACh 濃度を増加させると、*in vivo* においてプローブと受容体の結合が最も減少するのは $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ で、中程度の減少は $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ であり、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ では顕著な減少が見られなかった。先の $[^{18}\text{F}]\text{FP-TZTP}$ の報告 (Carson et al., 1998) で述べられているように、これらの結果は $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ といった受容体への低い親和性の化合物と PET との融合は、非侵襲性の ACh の放出をモニターする有用な手段であると示唆している。この 10 年、シナプス間隙における内因性神経伝達物質と標識化合物との相互作用は、特にドーパミン神経において (for review, see Laruelle, 2000) PET/SPECT を用いて研究されてきた。このように、神経伝達物質 (dopamine) の変化は、それら受容体 (dopamine D2 受容体) に中程度の親和性を有する標識化合物 ($[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$) を用いて PET にて非侵襲的に計測を行ってきた。この測定は、プローブの受容体に対する親和性が中程度であるとき、神経伝達物質と標識化合物が受容体への結合で競合するという原理に基づいている。しかしながら、PET で得られた $[^{11}\text{C}]\text{raclopride}$ の結合の交換は、シナプス内の安定的なドーパミンの量に単純に規定されないことを示してきた; すなわちドーパミンの放出と取り込み速度のダイナミックなバランスを表している (Tsukada et al., 1999a, 2000a, b)。*in vivo* での競合的手法を用いることにより神経伝達物質の量の変化の評価をすることが可能かどうか明らかにするためには、さらに実験が必要である。

以上より、この研究において mAChR プローブである $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ と比較しながら $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ と高分解能 PET を用い覚醒下サル脳内の動態、血漿代謝物の特徴を表すことが出来た。 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-EPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ は現在主に使われている $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}]\text{scopolamine}$ といった $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物より定量的 mAChR を評価するのにより適した PET 用標識化合物であることが示唆された。特に、PET を用いて内因性 ACh とプローブと受容体との結合の相互作用を評価する上では、mAChR への親和性が低い $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ が適していると考えられる。

第3章 PETによるサル脳の老化によるムスカリン性受容体の変化

3-1 序論

AD は、神経原線維錯綜と老人斑の存在によって神経解剖学的に特徴づけられている(Katzman, 1986, Selkoe, 1990)。前頭葉における ACh 作動性神経の喪失、海馬における ACh 作動性神経の活性低下、大脳皮質での ChAT の活性低下等の ACh 作動性神経の異常は、認知症の程度とよく相関している(Hohmann et al., 1988, Perry, 1986)。mACh 神経系の異常は、ハンチントン舞踏病(Enna et al., 1976, Wastek and Yamamura, 1978)、特発性失調症(Fahn, 1983)、パーキンソン病(Ruberg et al., 1982)精神分裂症(Tandon and Greden 1989)等の他の中枢性神経機能障害でも報告されている。脳の mAChR の非侵襲的計測は、これらの疾患の診断や治療薬の効果判定に貢献できると期待される。

従来までに、PET 用中枢性 mAChR 標識化合物(Vora et al., 1983, Dannals et al., 1988, Mulholland et al., 1988a, b, 1992, Prenant et al., 1988, Dewey et al., 1990a, b, Takahashi et al., 1997, 1998, nishiyama et al., 2000, 2001)、ニコチン性標識化合物(Horti et al., 1997, 1998a, b, Sihver et al., 1999, Ding et al., 1999)がいくつか開発されてきた。受容体結合活性に加えて、AChE 活性をポジトロン標識 ACh 類似体(Irie et al., 1994, 1996)および AChE 阻害薬(Planas et al., 1994, De vos et al., 2000)により評価することも可能となっている。VAcHT 用ポジトロン標識化合物はベサミコール誘導体として開発されてきた(Widen et al., 1992, Ingvar et al., 1993, Mulholland et al., 1993, Efange et al., 1994)。これらの PET 用標識化合物は、患者の中枢神経障害の診断に有用なツールである。さらに、非侵襲画像化技術の応用は、近年前臨床および臨床における薬剤開発に利用し始めた。

そこで本研究では N - $[^{11}\text{C}]\text{Methyl-3-piperidyl benzilate}$ ($[^{11}\text{C}]\text{3-MPB}$)を開発した(Takahashi et al., 1997, 1999, Tsukada et al., 2001)。ラット脳組織ホモジェネートを用いた *in vitro* 結合実験で、活性型の $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ より中枢性 mAChR への親和性が低く、ラット(Takahashi et al., 1997)とサル(Tsukada et al., 2001)の生きた脳での *in vivo* での結果から、受容体からの比較的速い解離を示した。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ を用いて、生きたサル脳で mAChR の加齢による変化を評価した。これらの標識化合物の分布と動態を、高解像度動物用 PET カメラ(Hamamatsu SHR-7700)(Watanabe et al., 1997)を用いて測定した。mAChR 結合に対するコルチゾールの影響を、脳内 mAChR への $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結合パラメータと血中ホルモン濃度の関係から評価した。また、若齢および老齢サルの中枢性 ACh 作動性神経系における AChE 阻害薬であるドネペジル(アリセプト, Sugimoto et al., 1992)の作用を評価した。ドネペジルによる AChE 阻害の程度を N - $[^{11}\text{C}]\text{methyl-4-piperidyl acetate}$ ($[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$, Irie et al., 1994, 1996)と PET を用いて、マイクロダイアリス方法と同様に評価した。mAChR 結合に対しての ACh 増加の影響を、mAChR に対する結合親和性が比較的 low、シナプス内の ACh レベルに感度良く反応する $(+)\text{N}-[^{11}\text{C}]\text{propyl-3-piperidyl benzilate}$ ($[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$)を用いて PET で評価した(Nishiyama et al., 2001)。*in vivo* での受容体結合への麻酔薬の影響を最小にするため(Onoe et al., 1994, Tsukada et al., 1999b, 2000a, b)、既報の方法(Tsukada et al., 1999a, b, 2000a-c, 2002, Tsukada, 2002)に基づいて覚醒サルを

用いた。PET とマイクロダイアリシスによる神経化学的解析に加えて、ワーキングメモリーによる認知機能に対する AChE 阻害の影響を、眼球運動を指標にした遅延反応タスク(Inoue et al., 2003)により評価した。ここで示される評価システムは、薬を開発する上で有用な方法であると考えられる。

3-2 材料と方法

3-2-1 実験動物と試薬

PET 実験に 7 匹の若齢成体(5.9 ± 1.8 歳)および 5 匹の若齢成体(5.2 ± 1.1 歳)、7 匹の老齢(19.0 ± 3.3 歳)および 5 匹の老齢(20.3 ± 2.6 歳)の雄性アカゲザル(*Macaca mulatta*)を用いた。飼育管理および頭部定位固定の方法は 1-2-1 と同様に行った。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の前駆体とその標品は、すでに報告された方法(Takahashi et al., 1999) により合成した。 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の前駆と標品は、ABX (Dresden, Germany)より購入した。ドネペジルは、既報の方法(Sugimoto et al., 1992)により合成した。

3-2-2 $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の合成

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は 1-2-2 と同様の方法で得た。 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ (Irie et al., 1994) は 1-2-2 と同様の方法、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ (Nishiyama et al., 2000, 2001) は 2-2-2 と同様の方法で得た。

3-2-3 PET 計測

PET 計測は 1-2-3 と同様の方法で行い、データを収集した。生理食塩溶液または 50、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量のドネペジルを標識化合物投与の 45 分前に静脈投与した。それぞれの標識化合物(100-120 MBq/kg)を、後部の脛骨静脈カニューレより投与した。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の PET 計測は 10 秒フレームを 6 枚、30 秒フレームを 6 枚、1分フレームを 12 枚、3 分フレームを 25 枚、トータル 91 分で行い、標識化合物投与後 60-91 分のデータを積算して PET 画像とした。 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の PET 計測は 10 秒フレームを 6 枚、30 秒フレームを 6 枚、1分フレームを 12 枚、3 分フレームを 16 枚、トータル 64 分で行い、標識化合物投与後 35-64 分のデータを積算して、PET 画像とした。ROI を各々のサル脳の MRI 画像から設定し、ROI の放射能動態を得た。

3-2-4 血漿中代謝物の測定

血漿中代謝物の測定は 1-2-4 と同様の方法で行った。

3-2-5 動態解析

血漿中代謝物の測定は 1-2-4 と同様の方法で行った。ただし、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ では移動相に ethylene dichloride : diethyl ether : ethanol = 40 : 40 : 1 を用いて展開した。

入力関数として、代謝物補正を行った動脈血血漿とそれぞれの ROI の放射能から、3-コンパートメントモデルを用いて最小二乗法で速度係数(k1、k2、k3、k4)を求め、同時に小脳の K1/k2 比も求めた(Huang et al., 1986)。各々の ROI の mAChR への標識プローブの結合定数(BP)は、k4 値(解離速度)に対する、k3 値(結合速度)から求めた(Tsukada et al., 2001b, c)。

AChE を介する^{[11]C}MP4A の代謝速度(k3)は、動脈血採血を行わずに求めることができる、参照組織ベースの線形最小二乗法(RLS)解析法を用いて算出した(Nagatsuka et al., 2001)。線条体を参照領域とし、この領域は、AChE 活性が高いため、PET 計測の間血漿入力関数の生物学的積分を反映する。k3 は Blomqvist の RLS 解析法を用いて算出した。

3-2-6 グラフィック解析

ローガンプロットによる解析を 1-2-5 と同様に行った。

3-2-7 スキャッチャードプロット解析

^{[11]C}(+)-3-MPB の *in vivo* 結合パラメータ(Bmax と Kd)に対して加齢が影響を及ぼすか飽和実験を行った(Farde et al., 1989、Tsukada et al., 1996、2000b)。^{[11]C}(+)-3-MPB を、無担体または、担体(+)-3-MPB (3-300 µg/kg)と共にサルに投与した。小脳の^{[11]C}(+)-3-MPB の総放射能は、各々の ROI の遊離の標識プローブ濃度 (F)とした。各 ROI の特異的結合(B)は、F を差し引いて求めた。曲線 B を 3 次指数関数に適用し、ピークに達する時刻を求めた(Farde et al., 1989)。この時点における B と F 値を、B に対して B/F の比をプロットして求めるスキャッチャード解析により求めた(Scatchard, 1949)。 *in vivo* における Bmax と Kd 値は、LIGAND ソフトウェア(Munson and Rodbard, 1980)を使用して求めた。

$$\int_0^T ROI(t)dt / ROI(T) = K \int_0^T Cp(t)dt / ROI(T) + C$$

3-2-8 コルチゾール測定

いずれの薬剤も投与されていない最初の PET 計測(10:30 am)の直前に、若齢および老齢サルから採取した血漿サンプルからコルチゾールの濃度を分析した。コルチゾールレベルは、サルのコルチゾールに特異的な抗体(TFB、東京日本)を使用した標識免疫検定法(RIA)によって測定した。分析の感度は、20 nM であった。

3-2-9 マイクロダイアリス測定

マイクロダイアリス測定は 2-2-6 と同様の方法で行った。

3-2-10 ワーキングメモリーパフォーマンステスト

運動を指標にした遅延反応タスク(oculomotor delayed response; ODR)において、短い試技(ITI)の後、小さな赤い点(直径の 0.1°)を、各々のサルの顔から 57 cm 前に置かれた 15 インチの CRT モニタ

(PC-KM153R、NEC、東京、日本)の中央の固定点として表示した。サルは、固定点を凝視し続けなければならない。サルの水平および垂直の目の位置を、赤外線カメラモニタリングシステム(X-Y Tracer C3162、浜松ホトニクス、浜松、日本)によって、60 Hzの周波数で採取した。サルが1秒間凝視した後、赤い円(直径の0.5°)を8つの所定の位置の一つにランダムにターゲットキューとして100 ms(キュー期間)表示した。その離心率は固定点から5°であった。サルは、キュー期間と以降の0.5-10秒の遅延期間の固定点を凝視し続けなければならない。遅延期間の後、固定点は消され、サルはターゲットキューが表示された位置に視点を移さなければならない。サルが500ミリ秒以内に正しい位置に視点を移したとき、1滴の水を報酬として与えた。視覚的に導かれた眼球移動タスク(visually-guided saccade; VGS)において、短いITIの後、固定点をCRTモニタの中央表示した。サルは、固定点を凝視しなければならない。サルが1秒間凝視した後、固定点を消し、そして、ターゲットキューを8つの位置の一つに表示した。ターゲットキューが表示されたとき、サルは500ミリ秒以内にターゲットキューに視点を移動しなければならない。ODRとVGSタスクを20回行い、20回の平均値をデータ解析に用いた。

タスクに対してコリン分解酵素阻害効果を評価するために、生理食塩水または50、250 μ g/kgドネペジルをタスク開始30分前に、静注投与した。この評価において、キュー表示と眼球移動のタイミングは、8秒に固定した。

3-2-11 統計解析

結果を平均 \pm SD で表す。比較は、両側スチューデント t検定を用いた。5%未満($p < 0.05$)の危険率を、統計的に有意であるとした。

3-3 結果

Figure 19 は、覚醒下における若齢および老齢サル脳の典型的なMRIと $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ のPET画像である。PET画像は、60-91分までの積算画像である。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の脳内配布は、若齢および老齢いずれにおいても、線条体で最も高く、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬、視床で中程度、橋で低く、小脳で最も低かった(Figure 19)。

若齢サルにおいて、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の脳内動態では、投与のおよそ40分後に前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、帯状回で放射能の最大の集積を示し、視床と橋では投与後30分で最大値に達した(Figure 20A)。線条体、海馬では、投与のおよそ60分後に最大の集積を示した(Figure 20A)。低い受容体密度のため参照領域とした小脳では、投与後10分で最大値を示し、経時的に減少が続いた(Figure 20A)。老齢サルにおいて、線条体、皮質領域の $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の動態は、若齢サルに比べ早い時間に最大値に達し、若齢サルより早い消失を示した(Figure 20A、B)。一方小脳では、若齢と老齢に差が見られなかった(Figure 20A、B)。

血漿において、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 全放射能は、急速静脈投与後30秒で最大値となり、その後速やか

に減少した (Figure 21B)。代謝物解析より $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は、TLC 上で原点に残る非常に極性の高い代謝物に徐々に代謝されることが示された。未変化体 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ ($\text{rf} = 0.72$) の放射能 (未変化体+代謝物) に対する比は、投与後 60 分において若齢で 32.6 ± 3.0 、老齢で 42.0 ± 8.6 であった (Figure 21A、B、挿入図)。未変化 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の入力関数は、代謝比と全放射能より算出した (Figure 21A、B)。

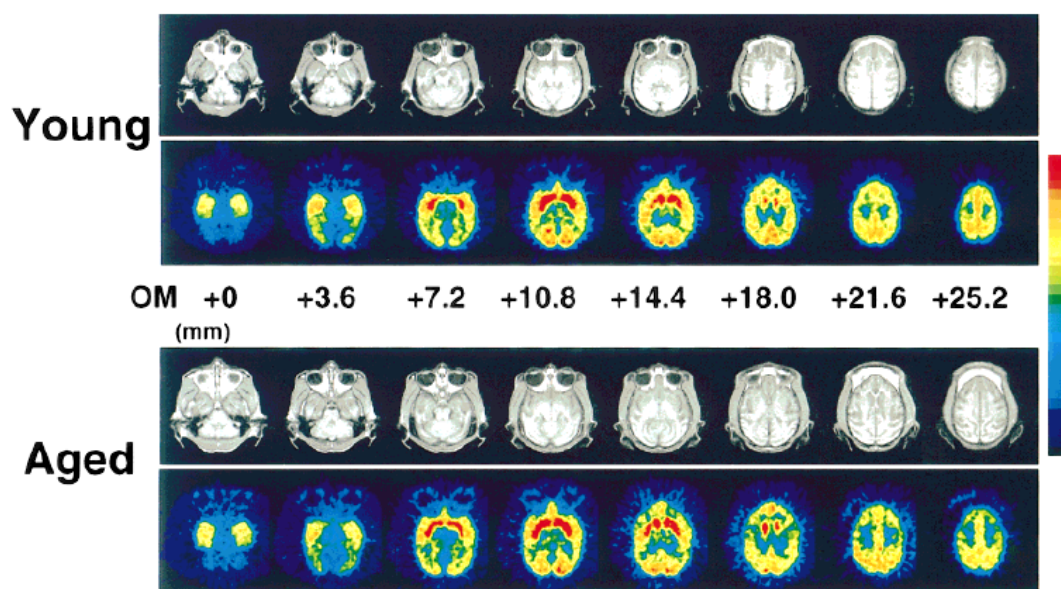


Figure 19 MRI and PET images of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ in the young (A) and aged (B) monkey brains. MR images of monkeys were obtained with a Toshiba MRT-50A/II (0.5T). PET data were collected in the conscious state with a high-resolution PET scanner (Hamamatsu SHR-7700) with a transaxial resolution of 2.6 mm (FWHM) and a center-to-center distance of 3.6 mm. Each PET image was generated by summation of image data from 60 to 91 min post-injection. The stereotactic coordinates of PET and MRI were adjusted based on the orbitomeatal (OM) line.

代謝物補正を行った動脈血血漿を入力関数として、3-コンパートメントモデルを使用して求めた $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の動態解析では、若齢サルにおける結合能 $\text{BP}(=k_3/k_4)$ は、線条体で最も高く、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬、視床で中程度、橋で低く、小脳で最も低かった (Figure 22A)。Figure 22B で示すように、動脈血を入力に用いるローガンプロット解析では、若齢サルにおいて以前に報告した結果 (Tsukada et al., 2001) と同様な集積の度合いであった。

動脈血を入力関数とした 3-コンパートメントモデルを使って解析を行うと、*in vivo* における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結合は側頭葉皮質、前頭葉皮質、線条体で加齢による大きな変化が見られた (Figure 22A)。若齢に比べ老齢の小脳の BP が高かった (Figure 22A)。グラフィックローガンプロット解析では、全ての領域で *in vivo* における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結合は低かった (Figure 22B)。

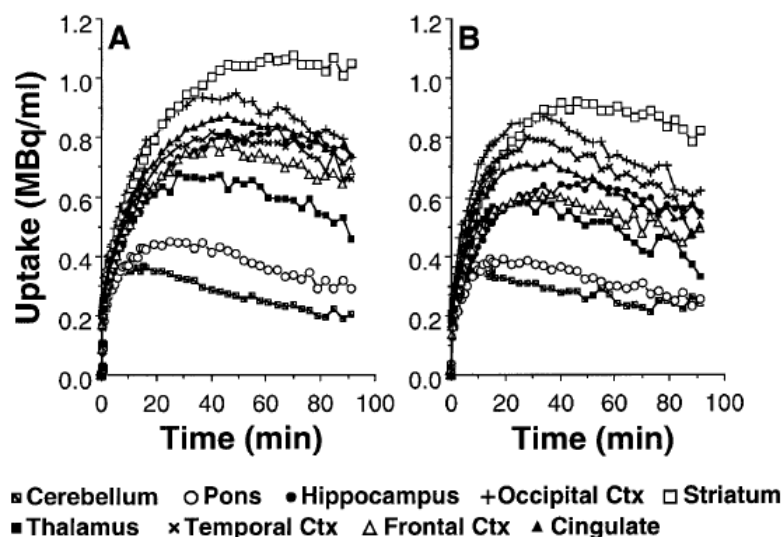


Figure 20 Time-activity curves of $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ in the brains of young (A) and aged (B) monkeys. PET scans were performed as described in the legend of Figure 21. Regions of interest (ROIs) were identified according to MRI of the each animal.

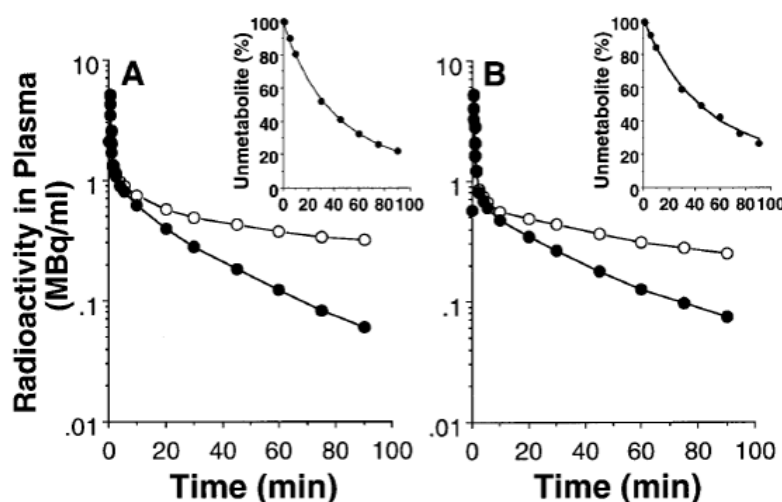


Figure 21 Time-activity curves of radioactivity in arterial plasma after injection of $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ in young (A) and aged (B) monkeys. Total radioactivity (open circles) and unmetabolized (closed circles) $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ are shown. The ratio of radioactivity in the unmetabolized fraction of each ligand to that in total plasma (metabolite plus unmetabolized) was analyzed using TLC and a phosphoimaging plate. Unmetabolized $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ was calculated by correction of total radioactivity with the ratios of unmetabolized ligands at each time point as shown in each inset.

in vivo における $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ 結合のスキッチャード解析において、B 値が最大値であったとき、B と F の平衡定数を求めた。各 ROI の遊離標識プローブ濃度(F)は、小脳における標識プローブ濃度に相当するとし、各 ROI の特異的結合(B)は、各 ROI の総放射能から小脳の放射能を引くことによって計算

した。若齢および老齢サルにおける線条体、前頭葉皮質、側頭葉皮質の集積の最大は、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 投与後 60、45、45 分であった (Tsukada et al., 2001)。スキッチャードプロット解析では、若齢および老齢いずれも全ての領域で $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は直線を示した (Figure 23)。老齢サルは若齢サルと比較して全ての領域でX軸との交点の値が低く、それは mAChR の最大結合部位 (Bmax) の加齢による低下を示している (Figure 23)。対照的に、全ての領域において直線の傾きに若齢と老齢で有意差が見られず、mAChR 親和性 (1/Kd) には、加齢による変化が無いことを示唆している (Figure 23)。

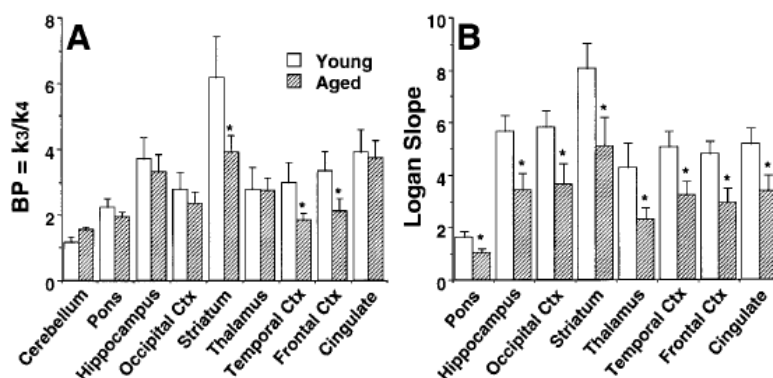


Figure 22 Age-related changes in cerebral muscarinic cholinergic receptor binding *in vivo* as measured with $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ based on a three-compartment model with metabolite-corrected plasma time-activity curve (A) and graphical Logan plot analysis (B). Data represent means \pm SD for seven animals per group. *; $P < 0.05$ vs. young animals.

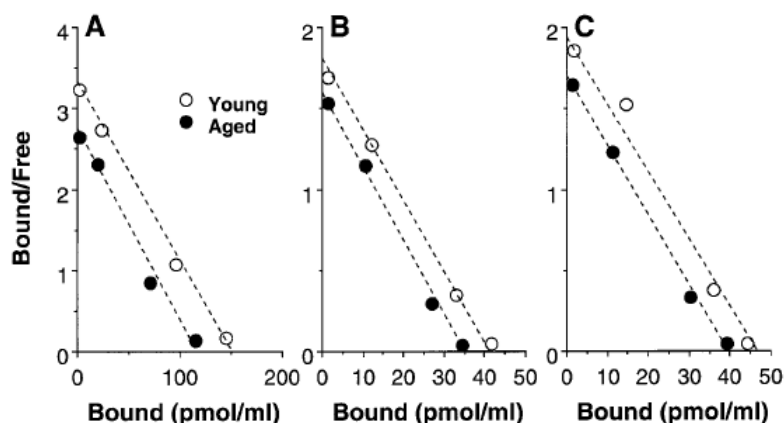


Figure 23 Scatchard plot analysis of *in vivo* binding of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ in the striatum (A), frontal (B) and temporal (C) cortices of young (open circles) and aged (closed circles) monkeys. Monkeys were injected $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ under carrier-free condition or with various doses of carrier $(+)\text{3-MPB}$ ranging from 3 to 300 $\mu\text{g/kg}$. The total radioligand concentration in the cerebellum was used as the free radioligand concentration ("Free") in the striatum. Specific binding ("Bound") was defined as radioactivity in each ROI reduced with Free. The values for "Bound" and "Free" were used in a Scatchard analysis where the ratios "Bound/Free" were plotted against "Bound".

コルチゾールの濃度評価では、血漿中のグルココルチコイドストレスホルモンであるコルチゾールの濃度が、若齢サル (659.5 ± 97.3 nM) と比較して老齢サル (913.2 ± 111.4 nM) で高いことを示した。脳での $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ 結合にコルチゾールの影響を評価するために、海馬と前頭葉皮質の $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の BP を各動物の血漿コルチゾール濃度に対してプロットした。コルチゾール濃度と $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の BP 間の逆相関関係は海馬 ($r^2=0.746$) で観察され (Figure 24A)、前頭葉皮質では相関関係が見られなかった (Figure 24B)。

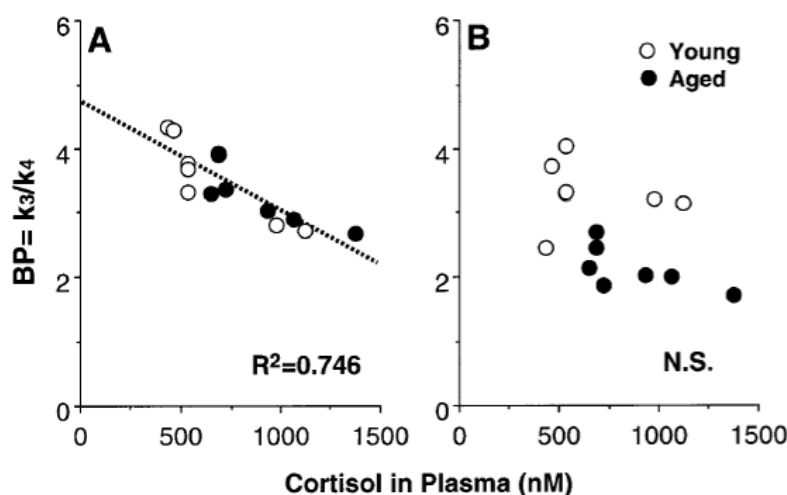


Figure 24 Relationship between cortisol level and $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ binding in the hippocampus (A) and frontal cortex (B) of the monkey brain. Plasma samples were obtained just before the start of PET scan, and cortisol levels were determined by radioimmunoassay (RIA) using an antibody specific for monkey cortisol. Binding potential ($\text{BP} = k_3/k_4$) in the cortical regions was plotted against plasma cortisol level of each animal. N.S.: not significant.

Figure 25 は、若齢サル脳の典型的な MRI と $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ (Figure 25A) および $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ (Figure 25B) の PET 画像である。PET 画像は、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ では投与後 35-64 分まで、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ では投与後 60-91 分までの積算画像である。 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の脳内分布は、線条体と視床が高く、小脳で中程度、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質で低かった (Figure 25A)。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の集積は線条体が高く、後頭葉皮質、側頭葉皮質、前頭葉皮質、海馬、視床が中程度、小脳が低かった (Figure 25B)。

Figure 26A で示すように、若齢動物の線条体の $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ は投与後 20 分まで集積し、その後 PET 計測が終了するまで平衡であった。前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質の新皮質では、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の集積は投与後 5 分以内にピークに達し、10 分以降は平衡であった。50 および 250 $\mu\text{g/kg}$ のドネペジルの静脈投与によって、線条体で用量依存的に $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の平衡時のレベル増加した (Figure 26B, C)。一方、新皮質では $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ のピークのレベルがドネペジルの投与量の増加により上昇したが、平衡レベルはわずかに低下した (Figure 26B, C)。

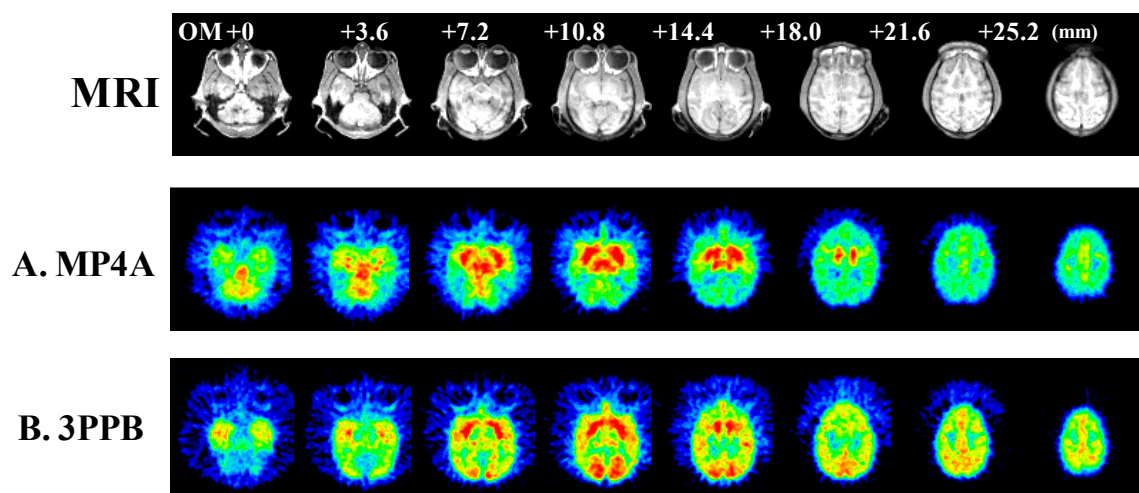


Figure 25 Typical MRI and PET images of $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ (A) and $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ (B) in the brain of a conscious young monkey. MR images of monkeys were obtained with a Toshiba MRT-50A/II (0.5T). PET data were collected in the conscious state with a high-resolution PET scanner (Hamamatsu SHR-7700) with transaxial resolution of 2.6 mm (FWHM) and a center-to-center distance of 3.6 mm. PET scans were performed for 64 min and 91 min in $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ and $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$, respectively. PET images were generated by summation of image data from 35 to 64 min and from 60 to 91 min post-injection in $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ and $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$, respectively.

$[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の参照組織ベースの解析法では、 k_3 値によって表される AChE 活性が、Figure 26A で 3 つの領域での平衡レベルが同程度であったように、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質の値は同じだった (Figure 27)。ドネペジルの投与により、新皮質における $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値は、投与量に依存して減少し、これらの領域で AChE 活性の低下が示唆された。

皮質におけるドネペジルによる AChE 活性の低下はマイクロダイアリス分析にもよっても確認でき、若齢サル脳で前頭葉皮質の細胞外液の ACh 濃度が投与量に依存して増加した (Figure 28)。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の放射能動態では、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質で放射能集積の最大が投与後 20 分であった (Figure 29A)。線条体、海馬では、投与後 30-35 分が蓄積の最大値であった (Figure 29A)。受容体密度が低い参考領域とした小脳では、各々のプローブの動態は投与後 10 分でピークに達し、その後経時的に減少した (Figure 29A-C)。Figure 29A-C で示すように、ドネペジルの投与により、それぞれの領域のピークに達する時間が早い時間にシフトし、脳からの消失速度も速くなった。

代謝補正を行った動脈血漿を入力関数として用いた動態解析において、50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量のドネペジルが *in vivo* における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の受容体結合能 ($\text{BP} = k_3/k_4$) を減らす傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった (Figure 30)。250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量のドネペジルでは、全ての領域において $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の BP が著しく減少した (Figure 30)。

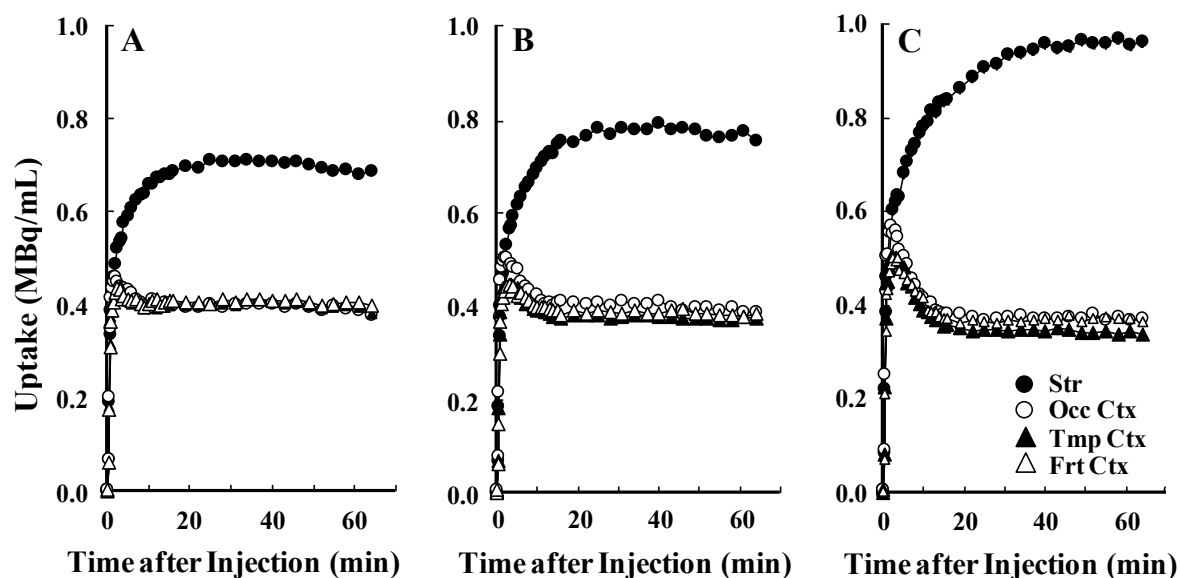


Figure 26 Effects of donepezil on time-activity curves of [^{11}C]MP4A in the brain of a conscious young monkey. Saline (A), donepezil at doses of 50 $\mu\text{g/kg}$ (B) or 250 $\mu\text{g/kg}$ (C) was intravenously administered 30 min before [^{11}C]MP4A injection. PET scans were performed as described in the legend for Figure 27. Regions of interest (ROIs) were identified according to the MRI of each animal.

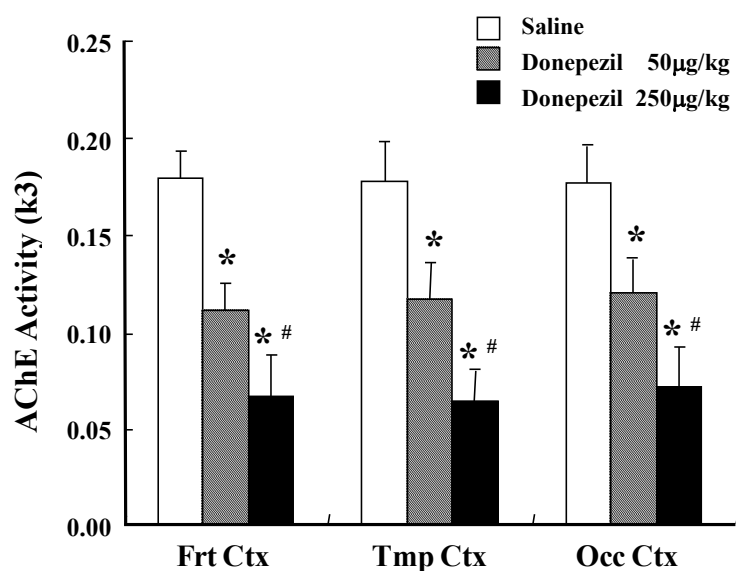


Figure 27 Dose effects of donepezil on AChE activity (k_3) as measured by [^{11}C]MP4A in the cortical regions of conscious young monkeys. Reference tissue-based linear least squares (RLS) analysis without arterial blood sampling was used to calculate k_3 . For this analysis, the striatum was used as a reference tissue. Data are expressed as means \pm SD for five animals per treatment condition. *, $P < 0.05$ vs. respective saline control. #, $P < 0.05$ vs. respective “Donepezil” at a dose of 50 $\mu\text{g/kg}$.

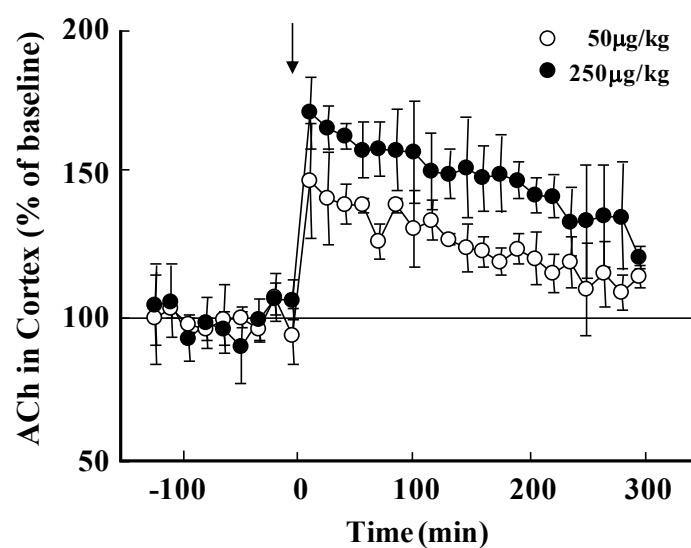


Figure 28 Effects of donepezil on acetylcholine concentration in the extracellular fluid (ECF) of the frontal cortex of conscious young monkeys. A microdialysis probe was inserted into the frontal cortex (A: 48 mm, L: 14.5 mm, 2 mm below the dura matter) according to the individual MR images via the guide cannula. Donepezil was systemically administered at doses of 50 and 250 µg/kg at time-0 indicated by the arrow. Data are presented as % of the "baseline", which was the averaged acetylcholine level before administration of donepezil. Data are expressed as means \pm SD for five animals.

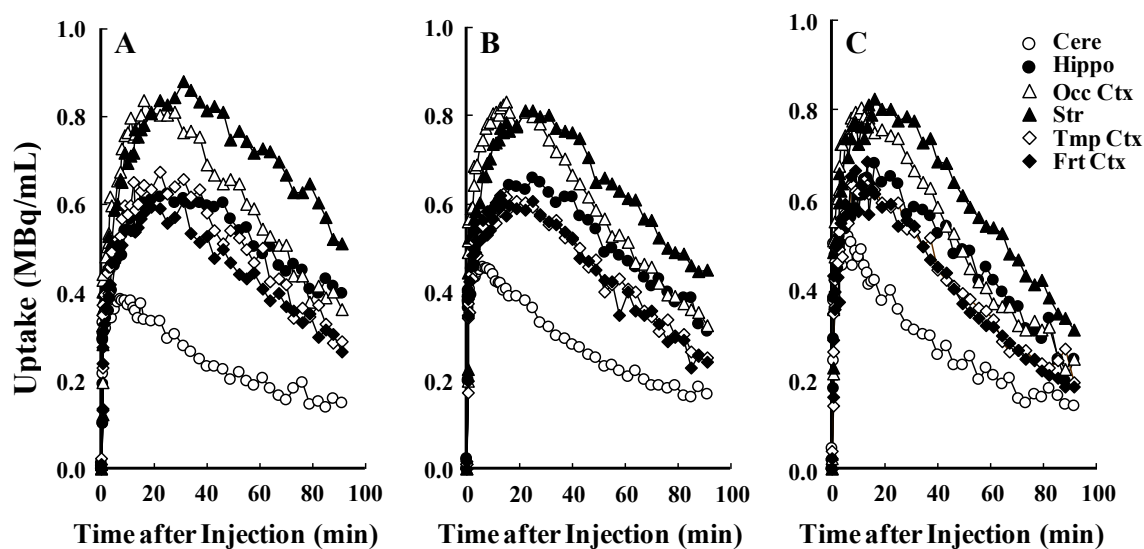


Figure 29 Effects of donepezil on time-activity curves of $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ in the brain of a conscious young monkey. Saline (A), donepezil at doses of 50 µg/kg (B) or 250 µg/kg (C) were intravenously administered 30 min before $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-PPB}$ injection. PET scans were performed as described in the legend for Fig. 25. Regions of interest (ROIs) were identified according to the MRI of each animal.

老齢サルにおける $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値で表される皮質のAChE活性が、若齢サルとほぼ同じであった(Figure 27、31A)。対照的に、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ で評価されるmAChR結合は、全ての領域で加齢に伴って減少した(Figure 30、31B)。ドネペジル(50 および 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$)の静脈投与で、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値が投与量依存的に減少し(Figure 31A)、250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の投与量で *in vivo*における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の受容体結合能($\text{BP}=k_3/k_4$)が著しく減少した(Figure 31B)。これらは老齢サルにおいてもドネペジルがAChE阻害を誘発していることを示唆している。これらの変化は若齢サルにおいても基本的に類似した傾向を示したが(Figure 27、30)、それぞれ値の大きさの低下の度合いは若齢サルより小さかった(Figure 27、30、31)。

Figure 32A で示すように、ODR タスクによって評価されるワーキングメモリのパフォーマンスが加齢に伴って低下し、8 秒の遅延時間での正答率は若齢サルで 70 %、老齢サルで 40%であった。対照的に、VGS タスクによる動作能力は、若齢サルと老齢サルの間で有意差がなかった(Figure 32A)。老齢サルの低下したワーキングメモリのパフォーマンスは、ドネペジルの投与により、容量依存的に著しく改善した(Figure 32B)。若齢サルでは、ドネペジルにより、ワーキングメモリのパフォーマンスに若干の改善が見られたが統計的に有意ではなかった。

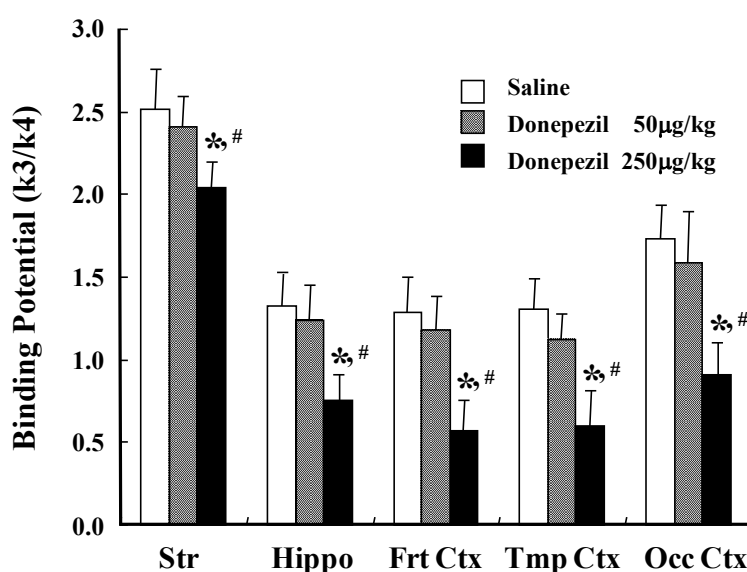


Figure 30 Dose effects of donepezil on muscarinic cholinergic receptor binding ($\text{BP} = k_3/k_4$) as measured by $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ in the cortical regions of conscious young monkeys. The time-activity curves of unmetabolized $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ in arterial plasma were used as input functions into the brain, and a three-compartment model was fitted to the time-activity curve of specific binding in each region. The binding potential was calculated as the ratio of the association rate (k_3) to the dissociation rate (k_4). Data are expressed as means \pm SD for five animals per treatment condition. *; $P < 0.05$ vs. respective saline control. #; $P < 0.05$ vs. respective “Donepezil” at a dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

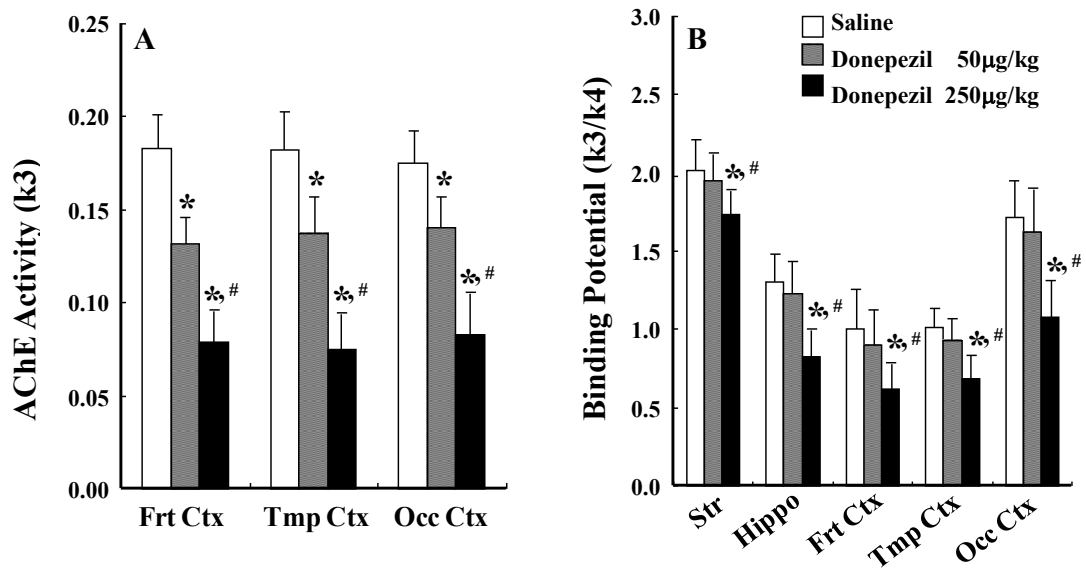


Figure 31 Effects of donepezil on AChE activity (k_3) as measured by [^{11}C]MP4A (A) and muscarinic cholinergic receptor binding ($\text{BP} = k_3/k_4$) as measured by [^{11}C](+)-3-PPB (B) in the cortical regions of conscious aged monkeys. The values of k_3 and BP were calculated as shown in Figure 30 and 32. Data are expressed as means \pm SD for five animals per treatment condition. *; $P < 0.05$ vs. respective saline control. #; $P < 0.05$ vs. respective “Donepezil” at a dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

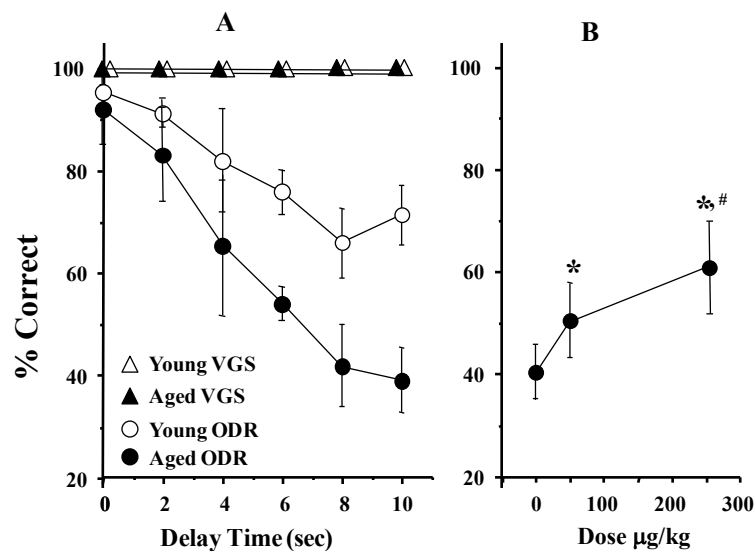


Figure 32 Effects of aging on working memory performance (A) and restoration of the age-related impairment of working memory performance with donepezil (B). Working memory performance was evaluated in combination with ODR and VGS tasks. The delay time was fixed as 8-sec in study B. Saline (Dose = 0), or donepezil at doses of 50 or 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ was intravenously administered 30 min before the start of session. Data are expressed as means \pm SD for five animals. *; $P < 0.05$ vs. respective saline control. #; $P < 0.05$ vs. respective “Donepezil” at a dose of 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

3-4 考察

本研究は、新規 mAChR プローブ [^{11}C](+)3-MPB をヒト以外の霊長類の脳を対象にして覚醒下で高分解能 PET を用いた加齢による mAChR の変化、同じ個体での皮質の AChE 活性、mAChR 結合、認知機能に対するドネペジルによる AChE 阻害の影響をを評価した初めての研究である。脳の AChE 活性は、[^{11}C]MP4A を用いた PET 計測とマイクロダイアリシスによって解析した。mAChR 結合は、内因性神経伝達物質と外因性の標識化合物との競合理論に基づいて [^{11}C](+)3-PPB を用いて評価した。認知機能は、ODR タスクを用いてワーキングメモリのパフォーマンスとして解析した。

若齢および老齢サルいずれにおいても、投与後 60-91 分の PET の加算画像で、[^{11}C](+)3-MPB の集積は線条体で最も高く、後頭葉皮質で高く、側頭葉皮質、前頭葉皮質、帯状回、海馬で中程度、視床、橋で低く、小脳が最も低かった。[^{11}C]4-MPB と比較して、若齢サルと同様に老齢サルで [^{11}C](+)3-MPB は *in vitro* で mAChR 濃度の高い領域 (Snyder et al., 1975, Lin et al., 1986) への高い集積を示した (Tsukada et al., 2001)。これらの結果は、mAChR 密度の高い領域で、小脳に対する高い集積の [^{11}C](+)3-MPB が、非常に高い雑音に対する信号 (S/N) 比であるため、脳内 mAChR の加齢による変化を検出する有効な方法であることが示唆された。また各領域の小脳に対する集積の度合いが、*in vitro* での結果 (Snyder et al., 1975, Lin et al., 1986) と同様、受容体密度 (Bmax) とほぼ一致していたことを示した (Tsukada et al., 2001)。[^{11}C](+)3-MPB の簡略化した取り込み比率方法において、mAChR の加齢による低下が示された。しかし、受容体への有効性に加えてプローブ輸送と排出の要因のため、遅い時間での集積(または分布)が *in vitro* で示された受容体濃度 Bmax (Frey et al., 1992) と異なっていたことが示された。そこで 3-コンパートメントモデルを用いた動態解析により、ダイナミックレンジが改善されたかを評価した。

[^{11}C](+)3-MPB の血漿中の全放射能は、静脈内への急速投与のおよそ 30 秒後にピークに達し、その速やかに減少した。若齢および老齢サルいずれも、代謝物解析において以前の報告 (Tsukada et al., 2001) と同様、[^{11}C](+)3-MPB は非常に極性が高く、血液脳関門を通過できない代謝物に徐々に代謝されることが示された。老齢動物は、若齢動物より [^{11}C](+)3-MPB の代謝がわずかに遅かった。動脈血を入力関数とした 3-コンパートメントモデルに基づいた動態解析において、BP (= k_3/k_4) は側頭葉皮質、前頭葉皮質、線条体で [^{11}C](+)3-MPB 結合の加齢による相違が見られた。皮質と線条体の mAChR の減少が、霊長類脳での *in vitro* の結果 (Rinne 1987, Wenk et al., 1989, Wagster et al., 1990) と一致していた。結合能 (BP = k_3/k_4) が受容体濃度 (Bmax) と親和性 (1/Kd) の乗数より導き出されるため、どのパラメータが老化とともに変化するか明らかにすることはできなかったが、*in vivo* スキャッチャード解析から、加齢による受容体結合の低下は、受容体親和性の変化ではなく Bmax の減少が原因であることが示された。後述するように、あるプローブは、脳血流 (CBF) への高い依存性のため、mAChR 結合の減少が観察されるかもしれない。受容体結合の減少と対照的に、覚醒サル脳の [^{15}O]H₂O を用いた CBF の結果 (Tsukada et al., 未発表) と同様、[^{18}F]FDG (Cross et al., 2000) によるブドウ糖代謝 (CMRglc) でも加齢による全体的な量的低下を示した。これらの結果は [^{11}C](+)3-MPB の BP が加齢による mAChR 部位特異的变化があることを

示唆し、CBF と CMRglc の加齢による全体的な変化に影響を受けなかったことを示唆している。

mAChR が AD で著しい減少が見られる海馬において (Flynn et al., 1995)、老化により著しい減少が見られず、これはヒトによる結果 (Court et al., 1997) と一致していた。海馬は通常、グルコルチコイド放出をコントロールする視床下部下垂体からの ACTH 放出を抑制する。障害のある海馬機能はグルコルチコイドストレスホルモン循環過分泌症の増加を誘発する。これまでにサル脳、特にグルコルチコイド受容体の豊富な海馬 (McEwen et al., 1986) において、血漿コルチゾールレベルの加齢による増加、更にはコルチゾール濃度とセロトニントランスポーターとの間の逆の相関関係があることを示した (Kakiuchi et al., 2001)。本研究の結果では、海馬において $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の BP の加齢による著しい減少を示さなかった。しかし、前頭葉皮質ではなく、海馬において $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の血漿コルチゾール濃度と BP 間の逆の相関関係を示した。mACh 神経系とグルコルチコイドストレスホルモンの間の相互作用が不明なままであるが、本研究の結果は、セロトニン系だけでなく mACh 神経系と関連がある障害を持った海馬機能が、コルチゾール過分泌症に関連していることを示唆した。

Wenk (1989) らは、サル脳の前頭葉皮質の mAChR の *in vitro* において M1 サブタイプ受容体ではなく M2 受容体に結合の減少が見られることを報告している。mAChR サブタイプ発現ヒト CHO-K1 クローン細胞では、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は M1 と M2 受容体サブタイプに対して選択性が見られなかったことから、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は、*in vivo* での mAChR の加齢による変化の検出能が低いかもしれない。ROI の小脳に対する傾きの比によって決定される結合パラメータを求める $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ のグラフィックローガンプロット解析では、全ての領域で mAChR 結合の減少が見られた。解析法間の理由が不明なままであるが、老齢が若齢に比べ小脳の BP が若干高い値を示したのは、報告されている結果 (Lee et al., 1996) と若干矛盾がある。

これまでの PET を用いたヒト脳 mAChR の加齢による変化を推定するためには限られた数の実験であったため、矛盾する結果が報告されたと考えられる。非特異結合と遊離標識化合物の対照領域としての小脳と比較して算出すると、 $[^{11}\text{C}]$ ベンズトロピン (Dewey et al., 1990b) と $[^{11}\text{C}]4\text{-MPB}$ (Suhara et al., 1993) で測定したヒト脳においては、全ての領域において mAChR の加齢による減少が見られた。しかし、 $[^{11}\text{C}]\text{TRB}$ の動脈血サンプリングを用いた動態解析法によるヒトの計測では、老化により脳 mAChR 結合には減少傾向が見られ、小脳では増加傾向があったと報告されている (Lee et al., 1996)。種固有性 (サル対ヒト)、解析に使用される標識化合物の違いの影響を除外することができないが、老化による受容体結合の皮質と小脳での相反する変化は、以前の報告 (Dewey et al., 1990b, Suhara et al., 1993) より、むしろ mAChR の損失が本質的であったと考えられる。

これまでではポジトロン放出核種 (たとえば ^{11}C の $T_{1/2} = 20.4$ 分) の短い半減期のために、プローブの解離が遅く、平衡に達するのに数時間から数日必要な化合物による mAChR の *in vivo* 解析で、PET を用いた評価は困難であった。そのうえ、受容体からのプローブの解離が血中からのクリアランス率より遅いならば、本当の平衡は投与後のどの時間においても得ることができないと考えられる (Koeppe et al., 1994)。 $[^{11}\text{C}]$ 標識受容体プローブの解離定数 (KD) 値が、*in vivo* 解析における PET 計測では、nM オーダーでな

ければならない(Comer and Maziere, 1982)。 $[^3\text{H}]\text{QNB}$ による我々の *in vitro* での評価では、mAChR への (+)3-MPB の親和性 ($K_i=1.71\text{nM}$) は、比較的弱く、4-MPB より 3.3 倍低かった(Takahashi et al., 1999、Nishiyama et al., 2000、2001)。さらにまた、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の脳内動態および特異的結合が $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ と異なって、覚醒サルへの投与後 PET 計測時間の 91 分以内にピークに達することを示した(Tsukada et al., 2001)。3-コンパートメントモデルを用いた動態解析では、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ より $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の解離速度定数(k_4)が小さいことから、PET 計測時間内で平衡に達することを示した(Tsukada et al., 2001)。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ のこれらの特性は、mAChR への低い親和性を表していると考えられる。これらの結果から、新規 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は霊長類の脳内 mAChR の評価に有効な $[^{11}\text{C}]$ 標識 PET プローブであることが示唆された。

ACh の類似体 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ は、その高い脂溶性のため、自由に血液脳関門(B.B.B.)を通過することができる。化合物は脳内で AChE によって加水分解され、親水性代謝物となり非可逆的にトラップされることにより、AChE 活性の分布が反映していされる(Irie et al., 1994、1996)。本検討では動脈血採血なしで、参照組織ベースの線形最小二乗法(RLS)解析法を適用した(Nagatsuka et al., 2001)。PET 計測の間血漿入力関数の積分値を示すことから、この解析に線条体を参照領域として用いた。この領域の非常に高い AChE 活性のため、この領域に分布する $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の全てがトラップされると仮定した。ドネペジルが静注投与されると、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の線条体領域への集積は用量依存的に増加し、血流から脳へ入力機能関数の増加を示した。ドネペジルにより 1) 血中 AChE 阻害による $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ 代謝阻害、および 2) AChE 阻害による脳血流量(rCBF)の増加に伴った $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の取り込み(k_1)の上昇により、入力関数が増加したと考えられる。実際、血漿サンプルの TLC 分析を用いた予備実験では、血中 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の代謝速度が対照動物よりドネペジルを投与した動物の方が非常に遅かった。さらに、 $[^{15}\text{O}]\text{H}_2\text{O}$ を用いたサル脳の PET 計測で、ドネペジルにより rCBF が増加したことを示した(Tsukada et al., 1997、2000c)。 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の上昇した入力関数は、線条体だけでなく、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質で見られ、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の投与直後に高いピークを示した。これら領域の $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の平衡レベルは生理食塩投与とドネペジル投与でほとんど同じ値を示し、ドネペジルによる AChE 活性の容量依存的低下を示唆した。線条体への入力関数の増加皮質領域の平衡レベルが不変であったことに基づく動態解析から、ドネペジルにより $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値が低下し、これは皮質領域での AChE 活性に相当する。

減少した $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値が実際に AChE の低下を反映するという事実は、マイクロダイアリシスから直接得られる証拠によって確かめられた。前頭葉皮質から得られる ECF 中の ACh 濃度は、若齢サルにおいてドネペジルの用量に依存して増加した。限られた数のため、およそ 20 才までよく飼育された健康な老齢アカゲザルを得ることが非常に難しく、マイクロダイアリシスは老齢サル以外の若齢サルを用いて行った。しかし、老齢サルにおいてもドネペジルが AChE 活性を阻害し、皮質領域で ACh 濃度を増加させることが推測できる。報告にあるように、脳内の AChE の活動レベルは、ヒトにおいて生理的な通常の老化現象による影響を受けない(Namba et al., 1998)。本検討の結果も老齢サル脳で AChE 活性の低下が見られず、ヒトの結果と一致していた。

近年、*in vivo* におけるプローブによる受容体結合の測定は、薬理学的手法を用いた神経系間の相互作用と同様に、神経伝達物質の機能的な反応を評価するために、多くの関心がもたれてきた (Laruelle, 2000)。計測の原則は、受容体へのプローブの親和性中程度であれば、神経伝達物質が受容体上でプローブと競合するという仮定に基づく (Dewey et al., 1993, Innis et al., 1992, Koepp et al., 1998, Seeman et al., 1989, Tsukada et al., 1999a, 2000a, b, 2002)。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の動態は、受容体密度の高い皮質において、既に報告されている mAChR 標識化合物 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ (Mulholland et al., 1988a) や $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (Takahashi et al., 1997, 1998, Tsukada et al., 2001c) より放射能のピークが早く、消失速度も速かった。血中や組織内での安定性、タンパク結合、脂溶性 ($\log D_{7.4}$)、B.B.B の透過性、ターゲット分子 (受容体) への特異性等、標識化合物の様々な性質が *in vivo* における結合速度に影響を与えるが、受容体への親和性が最も重要である。実際、 $[^{11}\text{C}]\text{4-MPB}$ と $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は受容体への結合能が高いため、AChE 阻害による ACh の増加による置換が起こらない (Nishiyama et al., 2001)。一方、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ は親和性が低いため、ドネペジル投与による ACh の増加に対して反応し、BP の減少を示した。比較的多くの ACh の遊離を計測するためには、プローブと神経伝達物質との競合を検出する必要があるが、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ が *in vivo* における AChE 阻害により誘発された ACh 作動性神経伝達系の変化を検出できる有用なプローブであることが示唆された。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結果 (Tsukada et al., 2001b) と同様、側頭葉皮質、前頭葉皮質、線条体で $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ 結合に部位特異的、加齢による変化が見られた。皮質、線条体における mAChR 結合の低下は、霊長類脳の *in vitro* の結果と一致していた (Rinne, 1987, Wenk et al., 1989, Wagster et al., 1990)。中枢神経系における mACh 作動性神経伝達が、記憶と認知機能で重要な役割を果たしている。ヒトによる薬理学的手法において、学習と記憶機能で中枢性 ACh 作動性神経系の重要性が示されている (Collerton, 1986)。実際、老齢サルは皮質の ACh 作動性神経伝達が低下し、ODR タスクの能力が加齢により低下した。対照的に、VGS タスクによる運動能は、若齢サルと老齢サルの間で有意差がなかった。このことは老齢サルの ODR タスク能が低下したのは、ワーキングメモリー能力の低下に起因すると示唆された。さらに、ドネペジルによる AChE 阻害によって増加した ACh が、容量依存的に障害を受けたワーキングメモリーの能力を復活させた。mACh 作動性神経伝達が記憶と認知機能で重要な役割を有し、老化により障害を受けた機能が AChE 阻害によって部分的に回復することができるという仮説を支持することができた。

AChE 活性のベースラインが類似しており、AChE 活性が低下していないことを示唆しているが、ドネペジル投与により若齢サルと老齢サルとの間で異なった結果を示した。すなわち、若齢サルが老齢サルより $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の k_3 値が大きく減少した。加えて、ドネペジルによる $[^{11}\text{C}](+)\text{3-PPB}$ の減少は老齢サルが若齢サルのそれより低かった。これは、 $[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$ の解析から、老齢サルではドネペジルによる AChE 抑制が小さく、ACh 増加の程度が低かったことを示唆している。老齢サルを用いた最近の研究でも、中枢神経系において老齢サルが薬剤に対しての反応が鈍いという類似した傾向が示された (Harada et al., 2002a, b, Kakiuchi et al., 2001, Tsukada et al., 2001a, 2002)。

本研究では、高解像度 PET を用いた覚醒サル脳で新規 mAChR プローブ [^{11}C](+)-3-MPB の動態解析により、大脳皮質の mAChR の加齢による変化を示した。これらの結果と以前の結果 (Tsukada et al., 2001) から、 [^{11}C](+)-3-MPB が PET による脳の mAChR の定量化のために適切な [^{11}C] 標識プローブであることを示唆された。マイクロダイアリシスと行動認知タスクとを組み合わせた PET 計測技術が、動物の生きた脳での薬物の作用機序を明らかにするのに、非常に有用な方法であることが示唆された。

第4章 PETによるサル脳のムスカリン性受容体の占有率と認知機能障害の関連性

4-1 序論

中枢神経系における mAChR の神経伝達は、注意、ワーキングメモリーを含むヒトの認知機能を担っている (Collerton, 1986; Hasselmo and Stern, 2006; Kobayashi et al., 2002; Sellin et al., 2008)。非選択的 mAChR のアンタゴニストであるスコポラミンは、一過性の記憶障害を誘発する ((Broks et al., 1988; Drachman, 1977; Edginton and Rusted, 2003; Green et al., 2005; Potter et al., 2000; Rasmusson and Dudar, 1979; Robbins et al., 1997; Rusted and Warburton, 1988)。ヒトにおいてスコポラミンによって誘発された記憶障害はフィズチグミンといった AChE 阻害薬により改善される (Honer et al., 1988; Mewaldt and Ghoneim, 1979; Prohovnik et al., 1997; Sitaram et al., 1978)。動物実験においてもスコポラミンは、用量依存的に学習障害を誘発させた (Aigner and Mishkin, 1986; Bartus and Johnson, 1976; Hardman and Limbird, 1996; Hudzik and Wengner, 1993; Plakke et al., 2008; Spinelli et al., 2006; Tafe et al., 1999, 2002)。

ACh 神経の投射は主に2つの部位に局在している (Mesulam et al., 1983, 1984)。1つは前脳基底で海馬や新皮質に投射している (Mesulam et al., 1983, 1986)。もう1つは脳幹で視床に投射している (Mesulam et al., 1983)。多くの注意・記憶に関する研究はACh神経の前脳基底に焦点が当てられている (Collerton, 1986; Hasselmo and Stern, 2006; Sellin et al., 2008) が、脳幹のコリン神経としての重要な役割は、注意・学習・記憶であると報告されている (Kobayashi et al., 2002; Kozak et al., 2005; Pare and Steriade, 1990; Vogt et al., 1991; Gabriel, 1993; Mitchell et al., 2002; Rostron., 2008)。

アルツハイマー病の中枢性 mAChR の異常は、記憶障害の程度とよく相関している (Höhlmann et al., 1998; Perry et al., 1986; Terry and Buccafusco, 2003)。中枢性 mAChR の減少は、AD だけでなく (Rinne et al., 1985; Reinikainen et al., 1987)、ハンチントウ病 (Enna et al., 1976; Lange et al., 1992; Wastek and Yamamura, 1978)、パーキンソン病 (Ahlskog et al., 1991)、統合失調症においても見られる (Crook et al., 2000; Dean et al., 2002; Zavitsanou et al., 2004)。いくつかの mAChR アゴニストは AD (Bodick et al., 1997; Cacamo et al., 2009; Langmead et al., 2008)、統合失調症 (Raedler et al., 2003; Sellin et al., 2008; Shekhar et al., 2008) の認知機能を改善する。

サルの遅延見合わせ課題 (DMS) は認知機能改善薬の薬効評価に用いられる手法の1つである (Bartus and Johnson, 1976; Hampson et al., 2009; Penetar and McDonough, 1983)。一般的な DMS は、サンプル画像を短時間示し、一旦サンプル画像を消し、一定時間後にサンプル画像と他の図形を同時に示し、動物が正しい図形を選択する課題であり、動物が正解すると報酬を得ことができる。従来の DMS は、テストする全ての動物に対して画像を消している遅延時間に同じ時間を設定していたが、記憶機能に関してはそれぞれの個体によって異なるといった問題点があった。それぞれの個体の記憶能力に沿った遅延時間を設定することが、薬剤の効果をより適切に検出するのに適している (Buccafusco et al., 1995)。滴定型 DMS (T-DMS) では、それぞれの個体の能力により遅延時間を変える。すなわち、正解時には遅

延時間をのばし、不正解時には遅延時間を短くすることにより、それぞれの個体の能力にあった遅延時間を設定することができる (Buccafusco et al., 2002, 2003; Hudzik and Wengner, 1993)。

本研究では、スコポラミンにより誘導される記憶機能障害の程度と、mAChRs 受容体占有率との関係をサル (*Macaca mulatta*) を用いて評価した。mAChRs 受容体占有率は、覚醒下において高分解能動物用 PET カメラ (PET; Tsukada et al., 2001b, c) で [^{11}C](+)3-MPB を用いて PET 計測した。記憶障害の程度は、個体の能力にあわせた遅延時間を設定できる T-DMS で評価した。

4-2 材料と方法

4-2-1 動物と評価系のデザイン

実験には 3 頭の雄性アカゲザル (*Macaca mulatta*; 5–6 歳) 体重 4–5kg を使用した。サルは米国の国立衛生研究所および浜松ホトニクス中央研究所のガイドラインに沿って扱った。スコポラミン臭化水素酸塩は杏林製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。スコポラミンの投与量 (0.01 and 0.03 mg/kg, i.m in 0.1 mL/kg.) は、同様のサルの実験 (Aigner and Mishkin, 1986; Bartus and Johnson, 1976; Hudzik and Wenger, 1993; Spinelli et al., 2006) に従った。

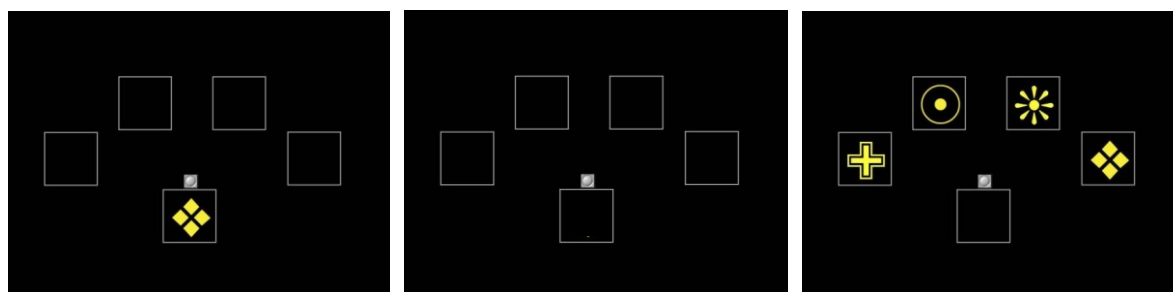
始めに、ビークルとして生理食塩、およびサンプルとしてスコポラミン 0.01、0.03 mg/kg の筋肉注射にて投与し、投与前、投与 2、6、24、48 時間後に T-DMS を行うことにより記憶機能の評価した。ビークル、スコポラミンのそれぞれの投与量による T-DMS は 1 週間のインターバルで 2 回ずつ実施した。ビークルとスコポラミンの投与順は、均衡のとれるように行った。続いて、覚醒下で [^{11}C](+)3-MPB を用いて mAChR 占有率の PET 計測をスコポラミン投与前、投与 2、6、24、48 時間後に行った。3 頭のサルで 30 回の PET 計測を行った。それぞれのサルは 0.01、0.03 mg/kg の投与量で、5 つのポイント (スコポラミン投与前、2、6、24、48 時間後)、計 10 回の PET 計測を行った。1 頭のサルにつきスコポラミン 0.01、0.03 mg/kg 投与量でそれぞれ 2 回ずつ T-DMS 試験を行い、PET 計測はスコポラミン 0.01、0.03 mg/kg 投与量を 1 回ずつ行った。

4-2-2 行動テスト

T-DMS は Buccafusco ら, (2002, 2003) の方法に従った。8 色、8 つの形状で 64 種の異なった見本で行った。図形は黒の背景に示され、サルはタッチスクリーンの画面をタッチすることができる。それぞれの図形のサイズは 6 cm² である。1 セッションは、32 回の課題で構成されており、1 セッションの中で各の形の見本が 4 回現れるようになっている。1 回の課題では、見本図形と選択図形と同じ色である。1 回の課題では、タッチスクリーンの下部に白丸がスタートキューとして表示されてから開始される。サルはスタートキューが表示されて 5 秒以内にタッチし、スタートしなければならぬ。タッチするとスタートキューは赤い固定ポイントにかわる。サルが 1 秒ボタンを押すと赤い固定ポイントは消え、見本図形が 300 ミリ秒表示される。遅延時間後、見本図形 1 つ含む 4 つの選択図形がアーチ状に表示される。サルが見本図形と同じ

ものを5秒以内にタッチして正解すると、報酬として水(0.2 mL)が与えられる。一番最初の課題では、スタートキュー後の見本図形を表示し、遅延時間なしに選択図形を表示する。正解すると、2回目の課題は遅延時間を1秒長くする。これをサルが間違えるまで続ける。間違えて選択すると100 Hzのビープ音を5秒、紫の大きな四角形の表示をエラーとして示す。間違った選択をした場合、遅延時間を1秒減らす。反応時間として、選択図形が表示されたら、画面にタッチするまでの時間を記録する。最後の10回の遅延時間の平均を、記憶指数とする。サルは32回の課題の1セッションを1日に8セッション行った。1セッション7-10分で、セッション間のインターバルは3分で行った。サルには、薬剤を投与される1年以上前から十分トレーニングを行った。記憶障害は以下の式で定義した。記憶指数(前)、(後)はビークル、スコポリン投与の前後を示す。

$$\text{記憶障害(\%)} = [1 - \text{記憶指数(後)} / \text{記憶指数(前)}] * 100$$



4-2-3 $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の合成

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ は 1-2-2 と同様の方法で行った。この実験ではそれぞれの標識化合物の放射化学的純度が 99 %以上、比放射能は $83.0 \pm 25.6 \text{ GBq}/\mu\text{mol}$ (mean \pm S.D)、投与量としては $4.4 \pm 1.9 \mu\text{g}$ (mean \pm S.D) であった。サルへの静脈投与の前に薬剤溶液を $0.22 \mu\text{m}$ 孔のフィルターで滅菌濾過した。

4-2-4 PET 計測

PET 計測は 1-2-3 と同様の方法で行い、データを収集した。過剰な採血を避ける目的で、動脈採血は行わなかった。

定量解析は、小脳を参照領域に設定しローガンプロットから結合能 (BPND) を算出した (Yamamoto et al., 2010)。

$[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ (200 MBq/kg body weight) を投与し、91 分の PET 計測を行った。それぞれのサルへの投与量は、 270.5 ± 28.9 , 299.1 ± 31.2 , $263.3 \pm 18.5 \text{ MBq/kg}$ (mean \pm S.D.) であった。投与後 28-40 分から加算画像をもとめ、MRI 画像に PET 画像を重ね合わせた。

ワーキングメモリーは、前頭皮質後部 (Funahashi et al., 1989; Owen, 2000; Sawaguchi et al., 1991)、中側頭皮質 (Tang et al., 1997; Turchi et al., 2005)、側頭葉 (Chafee and Goldman-Rakic, 1998)、後頭葉 (Supér et al., 2001)、海馬 (Hannula et al., 2006)、視床 (Mitchell et al., 2002)、脳幹 (Inglis et al.,

2001)、線条体(Kitabatake et al., 2003)といった多くの部位に、影響を与えている。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結合は、上記 8 つの部位で計算し、ROI は MRI 画像から求めた。

4-2-5 グラフィック解析

ローガン解析では、pixel-wise kinetic modeling (PMOD) ソフトウェア(PMOD Group, Zurich, Switzerland)を用いて定量解析した。この方法は既にこれまでの研究で(Yamamoto et al., 2010)評価されている。ローガン解析は以下の式で示されるように、distribution volume ratio (DVR)を求めることができる。

$$\int_0^T ROI_{tar}(t)dt / ROI_{tar}(T) = DVR[\{\int_0^T ROI_{ref}(t)dt + ROI_{ref}(T)/k_2\} / ROI_{tar}(T)] + C$$

ROI_{tar} 、 ROI_{ref} は、ターゲット、および参照領域の T 時刻における放射能を示し、DVR は傾き、 k_2 は参照領域からの消失速度を表す。先に報告(Yamamoto et al., 2010)されている 0.31 を k_2 値に用いた。C は Y 軸切片。DVR はターゲットと参照領域の分布体積比。DVR -1 は組織内の非解離型放射性ブローブ (ND)と特異的結合との平衡定数である BP_{ND} より算出した(Innis et al., 2007)。PET 計測では始めの 15 分以降のデータを用いて解析した。(Tsukada et al., 2001c)。 BP_{ND} の分布は PMOD ソフトウェアを用いて算出した。

4-2-6 占有率評価

スコポラミンによる BP_{ND} の低下率(%)より占有率を求めた。 $m\text{AChR}$ 占有率は次式で、 $BP_{ND\text{pre}}(\text{ROI})$ 、 $BP_{ND\text{post}}(\text{ROI})$ は BP_{ND} のスコポラミン投与前と後の値である。

$$\text{Occupancy}(\%) = [1 - BP_{ND\text{post}}(\text{ROI}) / BP_{ND\text{pre}}(\text{ROI})] \times 100$$

4-2-7 統計解析

データは mean \pm SD を示し、Bonferroni 比較に従った二元配置分散分析にて解析を行った。有意差レベルは $P < 0.05$ とした。

4-3 結果

Figure 33a は T-DMS の結果で、スコポラミンの投与前、0.01、0.03 mg/kg 投与 2 時間後におけるの 1 つのセッションのトライアルナンバーと遅延時間をプロットした典型的なものである。薬剤投与前をコントロールとした。コントロール時のそれぞれのサルの記憶指数は、 21 ± 2.4 、 21 ± 2.2 、 18 ± 2.2 秒であった。スコポラミンにより用量依存的に最大遅延時間は減少した。3 頭のサルの一時的な記憶障害を Figure 33b に示した。ピークルでは記憶指数や反応時間には影響が見られなかった。記憶障害の最大はスコポラミン投与 2 時間後で、用量依存的であった。記憶障害は投与 6 時間後まで見られ、24 時間後

には回復した。スコポラミンは反応時間には影響を与えなかった。

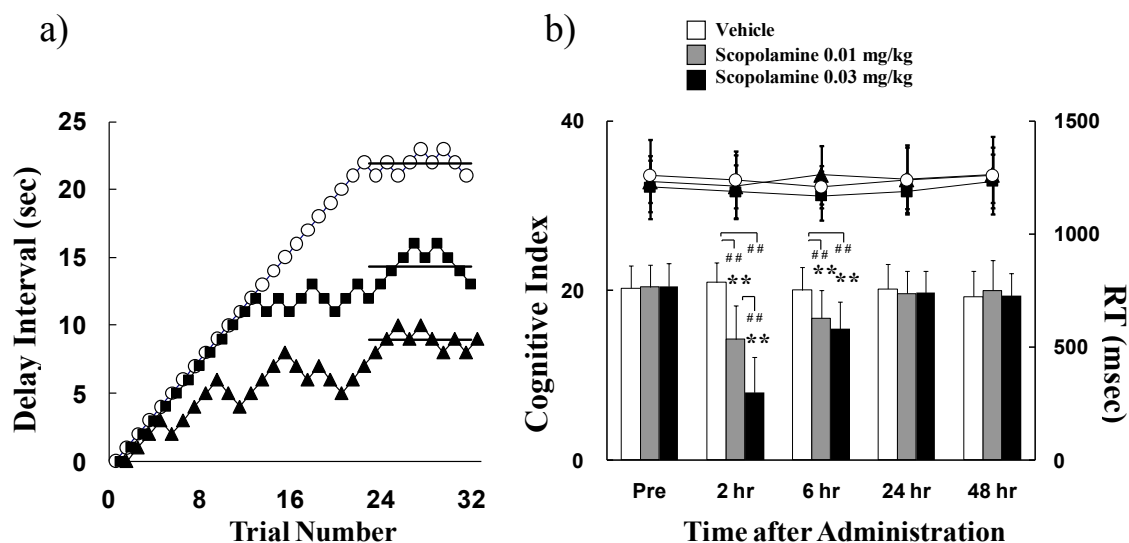


Figure 33 Effects of scopolamine on the titration-delayed match to sample (T-DMS) task. (a) Typical changes in the delay interval were plotted against the trial number in one session pre- and 2 hr post-scopolamine in doses of 0.01 and 0.03 mg/kg. (b) Time course of the cognitive index and reaction time (RT) following vehicle or scopolamine. Open circles correspond to pre-scopolamine or post-vehicle. Closed squares and closed triangles correspond to scopolamine in doses of 0.01 and 0.03 mg/kg, respectively. Statistical differences were established using two way repeated measures ANOVA ($P < 0.05$) with dose and time post scopolamine as factors. The Bonferroni test confirmed a significant difference at **, $P < 0.01$ compared to baseline at each dose, at #, $P < 0.01$ comparison at each time point. The data in Fig. 1(b) are mean \pm S.D.

参照領域との比較によるローガン解析から、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の BP_{ND} 分布の典型的なものを Figure 34 に示した。スコポラミン投与前の $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の BP_{ND} は、線条体に最も高く、続いて大脳皮質、海馬、視床、脳幹の順であった。The distribution pattern of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の分布は我々の以前示した結果 (Nishiyama et al., 2001; Tsukada et al., 2001b, c) と一致していた。スコポラミン投与前と比較して、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の結合は、小脳以外の全ての部位において、用量依存的にスコポラミン投与 2-6 時間で減少した。投与前のレベルに戻るまで 48 時間要した。ROI より求めた BP_{ND} は時間放射能曲線 (TAC) から求めた BP_{ND} と大変よく相関していた ($\text{TAC}, y=0.98x+0.02, r=0.999, P < 1.0 \times 10^{-7}$)。

スコポラミン投与前後について、 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の 7 つの ROI の TAC を Figure 35 に示す。 $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の集積の度合いは、全ての計測において、線条体>皮質>視床、脳幹>小脳の順であった。スコポラミン投与前では、線条体での TAC は、放射能投与後 50-60 で最大で、皮質、海馬では 30-40 分、視床、脳幹では 20-30 分、小脳では 10 分であり、経時的に減少していった。小脳を除いて、スコポラミン投与 2、6 時間で用量依存的に $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の集積が阻害された。TAC における最大になる時間は、用量依存的にスコポラミン投与 2、6 時間で前にシフトした。これらの効果は小脳では見られなかった。線

条体、皮質、海馬、視床における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の集積はスコポラミン投与 24 時間後にはほぼ回復し、48 時間でコントロールレベルまで回復した。脳幹における $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ の投与前レベルまでの回復は 24 時間であった。

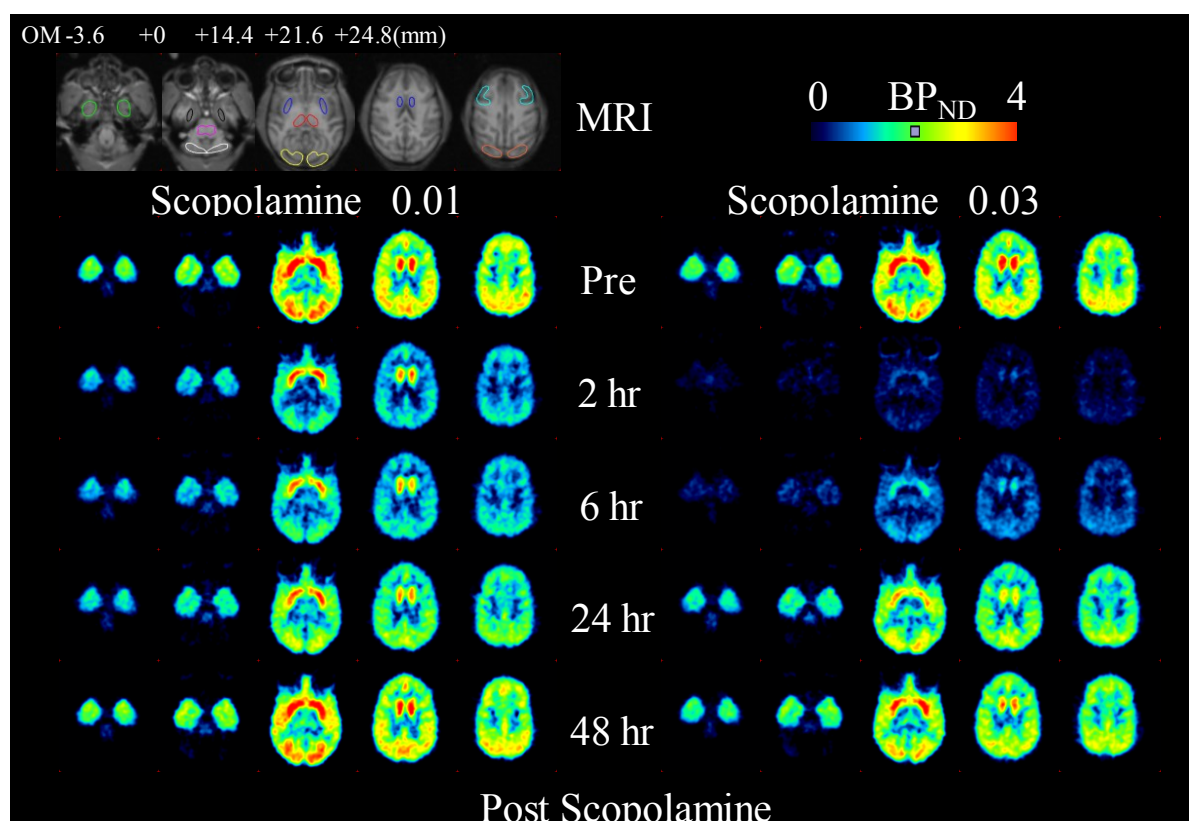


Figure 34 Typical MRI and parametric PET images of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ binding in monkey brain. For each group, five transverse slices referenced to the orbital meatal (OM) line plane at -3.6, +0, +14.4, +21.6, and +24.8 mm are shown. Each ROIs of dorsolateral prefrontal cortex (light blue), inferior temporal cortex (green), parietal cortex (orange), occipital cortex (yellow), hippocampus (black), thalamus (red), brainstem (purple), striatum (blue), and cerebellum (white) were superimposed on the MRI image. Parametric maps of BP_{ND} of $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ were calculated by the Logan plot reference tissue method. Cerebellum was used as the reference region.

mAChR 占有率の一時的変化を Figure 36 に示す。背外側前頭前野、下側頭回、頭頂葉、後頭葉、海馬といった前脳への刺激部位への占有率がほぼ同じであるので、まとめて皮質とした。各のサルの BP_{ND} 値と mAChR 占有率を Table 3 に示した。スコポラミン投与 2 時間で占有率は用量依存的であった。占有率は皮質が最も高かった。皮質、視床、線条体で用量依存的占有は 6 時間後まで見られたが、脳幹では見られなかった。11-24%の占有率は、スコポラミン投与 24 時間後まで皮質、視床、線条体で見られたが、脳幹では見られなかった。皮質、視床、線条体ではスコポラミン投与 48 時間で占有がなくなった。

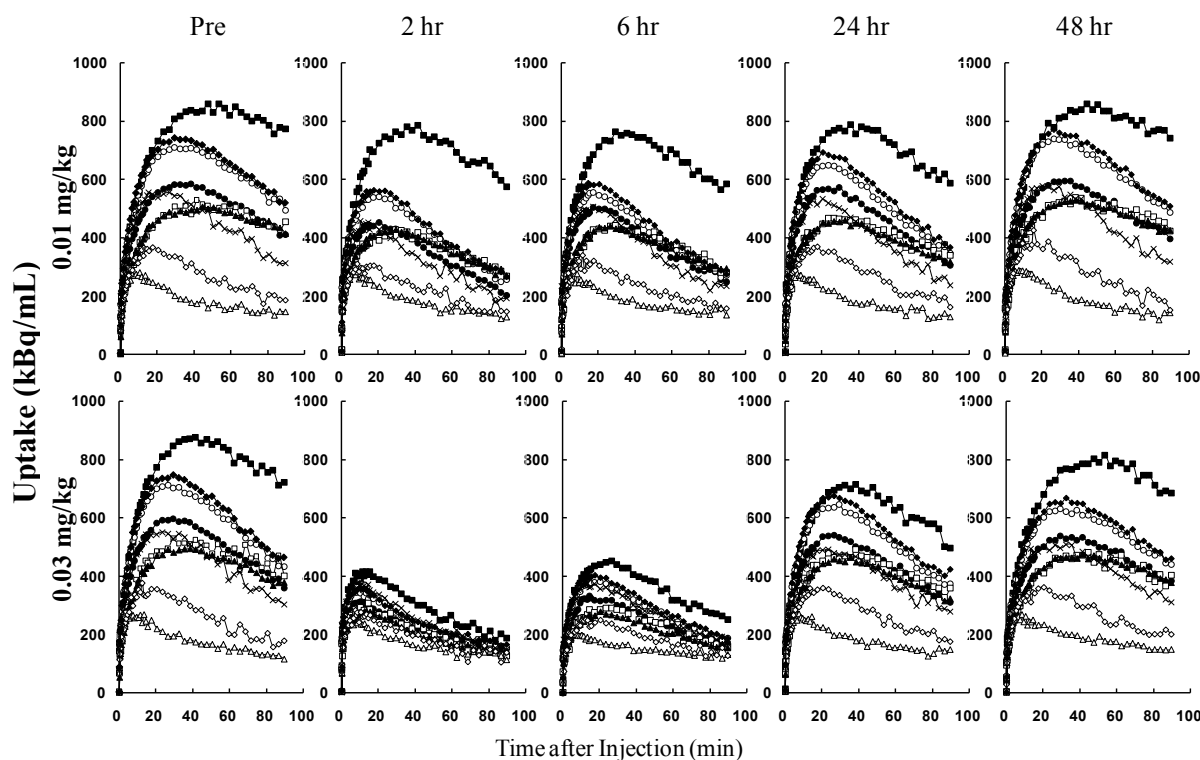


Figure 35 Effects of scopolamine on time-activity curves of $[^{11}\text{C}](+)\text{-3-MPB}$ distribution in monkey brain. Typical time-activity curves (TAC) pre-, 2, 6, 24 and 48 post-scopolamine in doses of 0.01 and 0.03 mg/kg are shown. Regions of interests (ROIs) were identified according to the MRI of each monkey. The following regions are included: dorsolateral prefrontal cortex (●), parietal cortex (○), striatum (■), hippocampus (□), inferior temporal cortex (▲), occipital cortex (◆), brainstem (◇), thalamus (×), and cerebellum (△).

0.01、0.03 mg/kg 投与時のそれぞれの部位における mAChR 占有率と記憶障害との相関関係を Figure 37 に示す。2、6 時間(直線)、2、6、24、48 時間(波線)から得られる回帰直線は、すべての脳の部位で mAChR 占有率と記憶障害との間で正の相関関係が見られ、脳幹 (Figure 37c) がもっとも高い相関関係を示した。2、6 時間(直線)の傾きは、線条体を除く皮質、視床、脳幹で 2、6、24、48 時間(波線)より急勾配であった。他は 24 ポイントのデータがあり皮質では 23 ポイント (Figure 37a) であるが、 $(x, y) = (69, 24)$ において 2 つの直線が交差した。

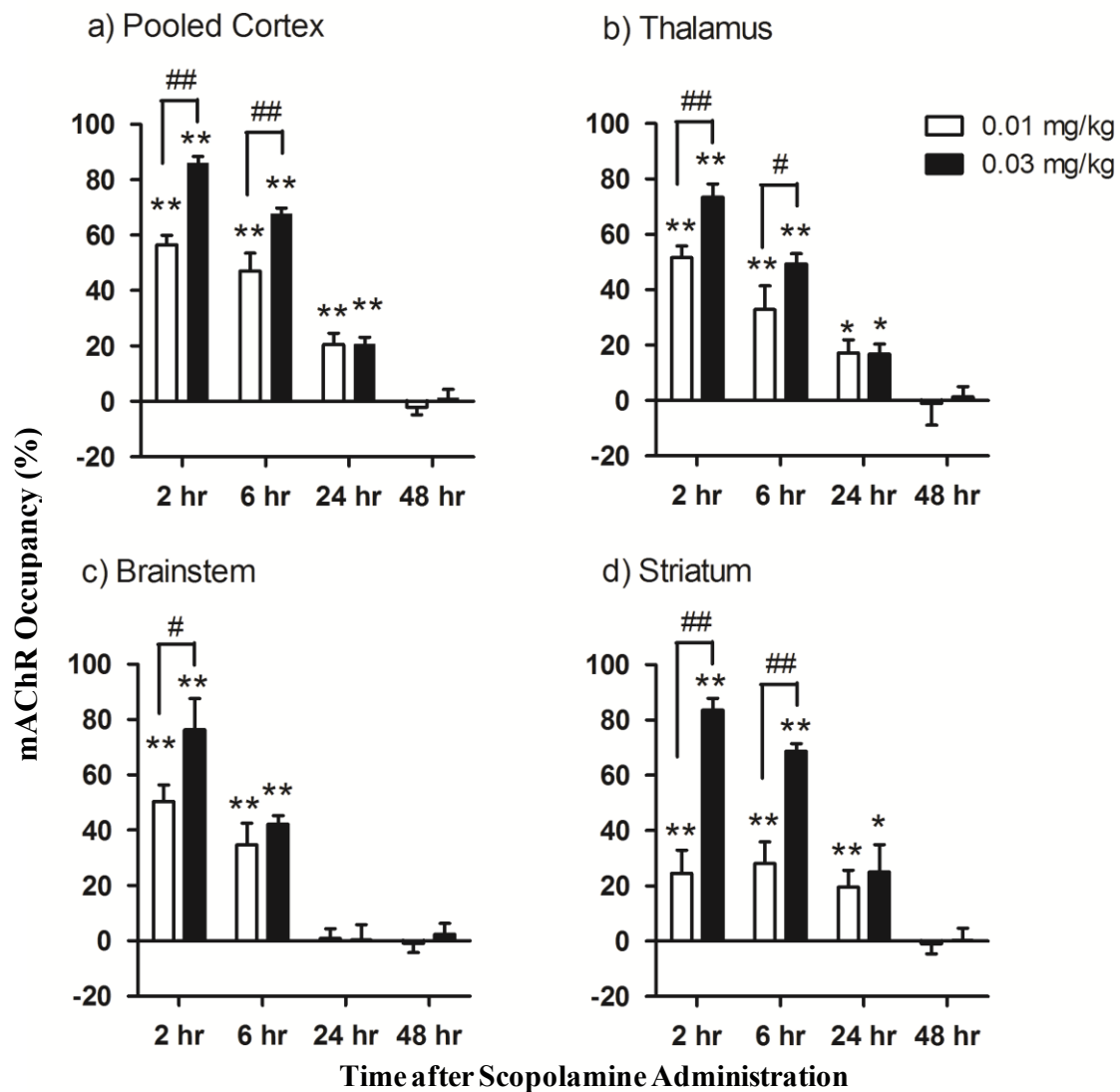


Figure 36 Temporal changes in mAChR occupancy following scopolamine administration. The brain regions are: pooled cortex (a), thalamus (b), brainstem (c), and striatum (d). Statistical differences were established using two-way repeated measures ANOVA ($P < 0.05$) with dose and time post scopolamine as factors. Bonferroni tests confirmed a significant difference at *, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ compared to post 48 hr scan. Bonferroni tests also confirmed significant differences at each time point at #, $P < 0.05$ and ##, $P < 0.01$. Values are mean \pm S.D.

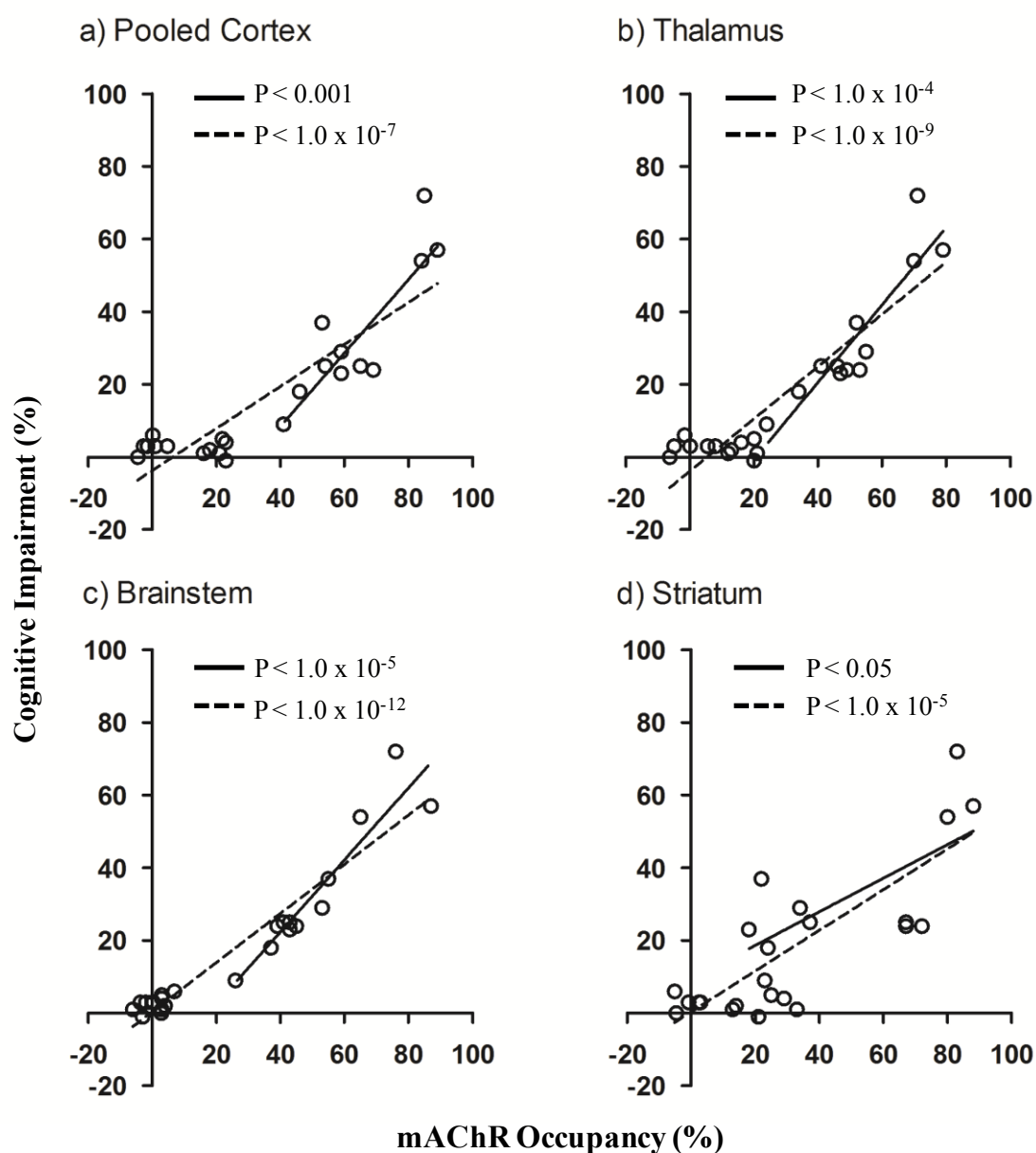


Figure 37 Relationship between the each mAChR occupancy and cognitive impairment. The brain regions include: pooled cortex (a), thalamus (b), brainstem (c), and striatum (d) were assessed by using of data obtained from 2 and 6 hr post-scopolamine administration in doses of 0.01 and 0.03 mg/kg. Regression line was drawn through the data points of 2 and 6 hr (solid line), and 2, 6, 24, and 48 hr (dashed line).

Table 3 BP_{ND} value and mAChR occupancy in each monkey.

	Pooled cortex		Thalamus		Brainstem		Striatum	
	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg	0.01 mg/kg	0.03 mg/kg
BP _{ND} (Occupancy (%))								
Monkey A								
Pre	2.29	2.22	1.49	1.58	0.47	0.47	4.05	4.11
2 hr	1.08 (53%)	0.33 (85%)	0.72 (52%)	0.45 (71%)	0.21 (55%)	0.11 (76%)	3.17 (22%)	0.71 (83%)
6 hr	1.24 (46%)	0.69 (69%)	0.98 (34%)	0.81 (49%)	0.30 (37%)	0.26 (45%)	3.08 (24%)	1.35 (67%)
24 hr	1.75 (23%)	1.77 (21%)	1.19 (20%)	1.25 (21%)	0.49 (-3%)	0.50 (-6%)	3.22 (21%)	2.77 (33%)
48 hr	2.27 (1%)	2.26 (-1%)	1.57 (-5%)	1.50 (6%)	0.48 (-2%)	0.47 (0%)	3.95 (3%)	3.99 (3%)
Monkey B								
Pre	3	3.08	1.89	1.72	0.71	0.77	5.5	5.54
2 hr	1.24 (59%)	0.49 (84%)	0.84 (56%)	0.51 (70%)	0.34 (53%)	0.27 (65%)	3.63 (34%)	1.12 (80%)
6 hr	1.38 (54%)	1.08 (65%)	1.12 (41%)	0.93 (46%)	0.42 (41%)	0.44 (43%)	3.46 (37%)	1.81 (67%)
24 hr	2.33 (22%)	2.37 (23%)	1.52 (20%)	1.44 (16%)	0.69 (3%)	0.74 (3%)	4.12 (25%)	3.95 (29%)
48 hr	3.08 (-3%)	3.08 (0%)	1.74 (8%)	1.74 (-2%)	0.74 (-4%)	0.71 (7%)	5.54 (-1%)	5.82 (-5%)
Monkey C								
Pre	1.87	2.11	1.09	1.21	0.37	0.37	3.63	3.34
2 hr	0.77 (59%)	0.24 (89%)	0.58 (47%)	0.26 (79%)	0.21 (43%)	0.05 (88%)	2.97 (18%)	0.39 (88%)
6 hr	1.10 (41%)	0.66 (69%)	0.83 (24%)	0.56 (53%)	0.28 (26%)	0.23 (39%)	2.78 (23%)	0.94 (72%)
24 hr	1.57 (16%)	1.73 (18%)	0.96 (12%)	1.05 (13%)	0.36 (3%)	0.36 (4%)	3.15 (13%)	2.88 (14%)
48 hr	1.95 (-5%)	2.01 (5%)	1.16 (-6%)	1.21 (0%)	0.36 (3%)	0.37 (0%)	3.79 (-5%)	3.25 (3%)

4-4 考察

本研究では、ムスカリンシステムと記憶が深く関わり合っていることを示してきた。中枢 mAChR の占有率とスコポラミンによる記憶障害と一時的な関係は、PETと覚醒サルによる T-DMS を用いて評価した。スコポラミンは、用量依存的に投与後 2 時間で mAChR を占有した。記憶も同じ時間で用量依存的に著しく障害された。スコポラミンによる記憶障害は、6 時間まで持続し、投与前の状態まで完全に回復するのに 24 時間以上かかった。しかしながら、スコポラミンによる mAChR 占有は脳幹を除くほとんどの部位において 24 時間後でも残っていた。T-DMS による記憶の成績は、コントロール、スコポラミンによる低下、スコポラミン投与 24 時間後の回復 (Figure 33b) で 3 頭のサルで同様の結果であった。スコポラミン投与前と 2 時間後における行動学的データは、Hudzik and Wengner, 1993 の結果と一致していた。本研究ではスコポラミンは simultaneous matching accuracy task (the delay interval = 0 sec) でも低下し、異なった結果であった。Hudzik and Wenger は最初のトライアルで 3 秒の遅延を導入し、別のトライアルで simultaneous matching task を行った。彼らの simultaneous matching accuracy task は、本研究の最初の遅延反応課題のトライアルに相当する。我々が用いたサルはスコポラミン投与後でも最初のトライアルは失敗しなかった。Buccafusco et al., 2002 による報告では、若い大人のサルで最大の遅延時間は 35-48 秒であった。我々のサルの最大遅延時間は、そこまで長くはなかった。我々の実験では正解が 25 % (4 つの選択肢) に対して彼らは 50% (2 つの選択肢) であったことが、1 つの理由の可能性もある。本研究では若干の違いがあるため、本 T-DMS は、スコポラミンによる記憶障害を評価するには、もっとも適していると考えられる。

ワーキングメモリーは、はっきりした神経網が仲介しており、視床-皮質-線条体、海馬-皮質への投影が、もっとも重要である (Floresco et al., 1999)。視床、皮質、線条体、海馬は、コリン神経による入力に

より刺激される (Mesulam et al., 1983; Warren et al., 2005)。視床 (Mitchell et al., 2002)、前頭皮質 (Broersen et al., 1994; Herremans et al., 1996)、海馬 (Ohno et al., 1992) へのスコポラミンの部分的投与、線条体のコリン神経の乖離 (Kitabatake et al., 2003) は、ワーキングメモリーの障害を引き起こす。本研究では、これらの結果と一致した結果が得られた。しかし、記憶障害の程度は、脳幹の mAChR ともっとも関連していることが示唆された。脳幹は主に前脳基底と同様に視床を刺激し、動作のコントロール (腕の動作: Matsumura et al., 1997、眼の動き: Kobayashi et al., 2002)、注意力 (Kobayashi et al., 2002; Kozak et al., 2005; Rostron et al., 2008)、モチベーション (Bechara et al., 1989; Stefurak and Kooy, 1994) を行う部位の一つでもある。脳幹のコリン神経の障害は、注意力の欠損 (Inglis et al., 2001)、モチベーションの低下 (Steckler et al., 1994) を誘発する。Steckler et al. は、モチベーションの低下はワーキングメモリーに間接的に影響を与えていると示唆している。スコポラミンによる記憶障害は、ワーキングメモリーの損傷よりむしろ動作、注意力、モチベーションの低下によると考えらえる。線条体における mAChR の 80 以上の占有率は、動作に対して重要な調整をしていることを示唆しており (Alexander and Crutcher, 1990)、スコポラミン 0.03 mg/kg の投与 2 時間後に見られた。しかし、スコポラミン投与後で反応時間には影響を与えていなかった (Figure 33b) 高いレベルでのムスカリン神経のブロックでも、動作への影響が少ない (Miller and Hiley, 1974) ことと、一致する。mAChR のブロックは、線条体 DA 神経の DA₁、DA₂ 受容体の形質変化を促進し (Tsukada et al., 2000, 2001a)、ドーパミン受容体の阻害によって誘導された動作損傷を改善させる (Haraguchi et al., 1997)。本研究では記憶障害は、動作損傷に起因しないことが示された。本研究でサルは、スコポラミンの大投与量 0.03 mg/kg においても短遅延時間でのトライアルで、ミスをしなかった (Figure 33a)。このことは注意力は損傷されず、モチベーションも低下しないことを示唆している。スコポラミンによる記憶障害は、動作、注意力、モチベーションと関連せず、ワーキングメモリーと関連する。脳幹でのコリン神経は、ワーキングメモリーとしての重要な部位であることが示唆された。

mAChRs (M₁₋₅ receptors) のサブタイプは分子クローニング法によって同定された (Kubo et al., 1986)。M₁、M₂、M₄ 受容体は、脳の中の部位により異なった割合で支配している。免疫組織的定量解析で M₁、M₂、M₄ 受容体の割合は、皮質、海馬でそれぞれ 60、20、20% であり、線条体では 30、20、50 % (Flynn et al., 1995) であった。CHO-K1 細胞からのクローニング、ヒト受容体における (+)3-MPB の K_i 値は、M₁ から M₅ の順に 1.34、1.17、2.82、1.76、5.91 nM であった (Unpublished data)。我々の結果では、スコポラミンによる mAChR 占有は、皮質において主に M₁ 受容体を、線条体では M₄ 受容体を占有し、非選択的 mAChR アンタゴニストとしてふるまった。記憶機能における M₁/M₄ 受容体のアゴニストの治療効果が、AD、統合失調症 (Bodick et al., 1997; Shekhar et al., 2008) 患者で認められた。本研究の結果もこれらの結果と一致した。M₂ 受容体は視床で約 50%、脳幹で約 80 % と優位で、他のサブタイプは、視床、脳幹で 20 % 以下である (Levey et al., 1991) ことから、視床、脳幹での mAChR 占有は、主に M₂ 受容体占有であることを示唆している。

ワーキングメモリーに関して、皮質、海馬における M₂ 受容体の重要性は、薬理学的、遺伝学的研究によって示された。薬理学的研究では、M₂ 受容体アンタゴニストが ACh の放出を増加させ、老齢ラット

の記憶パフォーマンスを改善したことを示した (Quirion et al., 1995; Rowe et al., 2003; Vannucchi et al., 1997)。一方、M₂ 受容体の遺伝子欠損によりワーキングメモリーの障害が見られた (Bainbridge et al., 2008; Seeger et al., 2004; Tzavara et al., 2003)。M₂受容体機能の重要性は、記憶におけるコリン神経を最適な状態に維持することである (Bainbridge et al., 2008) ことが、ワーキングメモリーにおける M₂ 受容体のブロック、遺伝子欠損からわかった。Bainbridge et al. は、M₂ 受容体アンタゴニストによる Ach 放出が、減少したコリン神経に効果的であることを示した。コリン神経が低下しているとき、遺伝子欠損による M₂ 受容体喪失は、Ach 過剰を来し、記憶機能に有害な結果をもたらす。我々の本研究は、これらの結果をさらに拡大し、ワーキングメモリーにおける視床、脳幹の M₂ 受容体が重要であることを示唆した。この解釈は、選択的 M₂ 受容体アンタゴニストと、M₂ 受容体 PET プローブ [¹⁸F]FP-TZTP (Podruchny et al., 2003) を正常動物を使って、実験することにより示すことができると考えている。

視床、脳幹の M₂ 受容体ブロックによる Ach の遊離は、[¹¹C](+)3-MPB 結合に影響を与えていることを示唆している。これはマイクロダイアリスの結果より、脳幹においてスコポラミンにより Ach の遊離が見られた (Baghdoyan et al., 1998) ことから考えられる。しかし、2 章で示したとおり、[¹¹C](+)3-MPB は内因性 ACh と競合しないことを示した。

記憶パフォーマンスは、スコポラミン投与 24、48 時間後では傷害されていなかった。皮質、視床、脳幹それぞれの mAChR 占有と記憶障害の回帰直線において、2、6 時間のポイントで求めたものと、2、6、24、48 時間のポイントで求めた結果より、閾値が存在することが示された。この解釈は、我々の先の研究 (Tsukada et al., 2000b) で、老齢サル (19.0 ± 3.3 歳)、若齢サル (5.9 ± 1.8 歳) を用い [¹¹C](+)3-MPB の PET 測定と、動脈採血による Logan 解析から求めた前頭葉、側頭葉、後頭葉、海馬、視床、脳幹の BP_{ND} の 30-40 % 減少と一致している。老齢サル (20.3 ± 2.6 歳) にワーキングメモリーのパフォーマンス低下が見られ、AChE 阻害薬であるドネペジルでパフォーマンスに改善が見られた (Tsukada et al., 2004)。本研究とあわせて考えると、スコポラミンは、老化した脳と同程度、または多くの mAChR を占有し記憶障害を引き起こしていると考えられる。mAChRs 占有が記憶障害を引き起こす閾値を詳細に調査する必要がある。

5-1 序論

AD は、アミロイド-βが凝集した老人斑の存在、およびタウ繊維異常沈着による神経原線維凝集によって神経病理学的に特徴づけられており(Katzman, 1986, Selkoe, 1990)、^[11C]PIB (Klunk et al., 2004)、^[11C]PBB3 (Maruyama et al., 2013)の PET 計測により画像化されている。

一方、核医学分野において、コリン神経のプレシナプス終末を直接画像化することが、いまだ挑戦が続いている状態である。コリン神経のパラメータの中で、中枢神経(CNS)における Ach 小胞トランスポーター(VAChT)が、コリン神経終末のプレシナプスのマーカーとなると考えた。VAChT はグリコプロテインで Ach プレシナプス小胞膜にあり、あらたに生合成された Ach を細胞質から小胞内に取り込む。2-(4-phenylpiperidino)cyclohexanol (ベサミコール) は、VAChT に高い親和性を有する (Bahr and Parsons, 1986; Marshall and Parsons, 1987)。ベサミコールは VAChT のベサミコール受容体と Ach と非競合的に結合し、コリン神経終末の評価に有用性を有している (Prior et al., 1992)。ChAT と VAChT のタイトな機能的リンクは、正常と病態を調整している (Giboureau et al., 2010)。

AD ではプレシナプスの変性が起こると言われていることから、プレシナプスの VAChT 選択的 PET プローブは AD の診断に大変有用であり、CNS の VAChT を画像化する PET プローブが開発されている (for review, see Giboureau et al., 2010)。(+) - *p*-^[18F]Fluorobenzyl spirotrozamicol ((+) - ^[18F]spiro-FBT)は、ラット脳においてコリン神経終末に適度に集積するが、その代謝が早いことから、サル脳においては適した集積を示していない (Efange et al., 1999)。(1*R*,2*R*,4*S*)-4-(^[18F]Fluoromethyl)-2-(4-phenylpiperidin-1-yl)cyclohexanol (^[18F]FMV)は、ラットにおいて脳へ早く高く集積するが、消失が遅いため平衡に達するのに 70 分かかる (Widen et al., 1992)。ベサミコールのプレ投与により^[18F]FMV の脳への集積は減少するが、集積した放射能は、ベサミコールのポストシナプス投与によっても置換できず、これは非可逆的結合を示している (Widen et al., 1992)。この著者らは局在による脳血流の影響のため VAChT の定量化は難しいと結論している。

ベサミコールは VAChT に結合する一方、シグマ受容体 (Efange et al., 1995; Custers et al., 1997; Shiba et al., 2006)、非小胞性ベサミコール結合タンパク質 (Hicks et al., 1991)に結合することが知られている。VAChT 結合の特異性を上げるため、(-) - *σ*-^[11C]methylvesamicol ((-) - ^[11C]OMV)が開発され、覚醒サル脳に対して主に VAChT 結合であったが、シグマ-1 受容体への結合を無視することができなかった (Kawamura et al., 2006)。対照的に、(2)-(2*R*,3*R*)-trans-2-hydroxy-3-(4-phenylpiperidino)-5-(2-^[18F]fluoroethoxy)-1,2,3,4-tetralin ((-) - ^[18F]FEOBV)の脳内分布は、げっし動物においてハロペリドール、(+)-3-PPP の前処置により若干の変化が見られ、他のベサミコール類似化合物と異なり、(-) - ^[18F]FEOBV はドーパミン受容体やシグマ-1 受容体と *in vivo* で結合しないことが示された (Mulholland et al., 1998)。しかし(-) - ^[18F]FEOBV は、大変遅い動態のためマウス脳線条体において疑似平衡に達するのに 180 分要し (Mulholland et al.,

1998)、麻酔下サルの上肢では 90 分以内に疑似平衡に達しなかった (Kilbourn et al., 2009)。遅く、非可逆的動態は、生体の定量的分子イメージングには適していない (Farde et al., 1989; Koeppe et al., 1994; Logan et al., 1994)。対照的に 4-(4-[¹⁸F]fluoro-benzoyl)-7-hydroxy-6-(4-phenyl-piperidin-1-yl)-octahydro-benzo[1,4]oxazine ([¹⁸F]FBMV)は、PET による定量的 VAcHT 計測にもっとも適している (Sorger et al., 2009)。これは血液脳関門を素早く通り、VAcHT cDNA 遺伝子導入 PC12 細胞を用いて確定した VAcHT に高親和性で選択的に早く結合し、かつ、可逆的動態を示した (Sorger et al., 2009)。*in vivo*で [¹⁸F]FBMV の VAcHT に対する非特異的結合が PET プローブとして一つの不安要素である。ラットとブタ脳の、上肢、視床、皮質といった VAcHT の多い部位への集積において、ベサミコールによってラットでは完全に、ブタ上肢では 60%程度阻害された (Sorger et al., 2009)。ヒト脳以外の霊長類を用いて、臨床的に有用性があることをさらに示す必要がある。

本研究では、霊長類において、VAcHT に高い親和性を有した VAcHT の PET プローブとして C-11 標識(*R,R*)-trans-8-methyl-2-hydroxy-3-[4-[2-aminophenyl]piperiziny]-tetralin ([¹¹C](*R,R*)-HAPT) とその光学異性体 [¹¹C](*S,S*)-HAPT を覚醒下サルの上肢の PET 計測を行い、評価した。VAcHT およびシグマ-1 に対する (*R,R*)-(*S,S*)-HAPT の親和性と選択性はラット脳を用いて評価した。これらの標識化合物の分布と動態の解析は PET スキャナー (Hamamatsu SHR-7700) (Watanabe et al., 1997)を用いて行った。*in vivo*において麻酔の影響が最少になるように、報告された方法 (Tsukada et al., 2000; 2001a, b)に従って、覚醒サルの上肢の計測を行った。In vivo における [¹¹C](*R,R*)-HAPT の特異性は VAcHT アンタゴニストである (−)-vesamicol、シグマ-1 受容体アゴニストである 1-(3,4-dimethoxy-phenethyl)-4-(3-phenylpropyl)piperazine (SA4503) (Matsuno et al., 1996)を前投与することにより評価した。

5-2 材料と方法

5-2-1 実験動物

PET 実験に 5 頭の体重 4-6 kg の若齢成体雄性アカゲザル (*Macaca mulatta*)を用いた。飼育管理および頭部定位固定の方法は 1-2-1 と同様に行った。すべてのサルはペントバルビタールで麻酔下で、3D-Spoiled Gradient Echo (SPGR)を用いて、3.0 T MR 装置 (Signa Excite HDxt 3.0 T, GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)にて、連続的 ((176 slices with a 256 x 256 image matrix, slice thickness/spacing of 1.4/0.7 mm, TE: 3.4-3.6 ms, TR: 7.7-8.0 ms, TI: 400 ms, and flip angle, 15 deg) MRI を得た。

5-2-2 試薬

Tris(dibenzylideneacetone)dipalladium(0)、tri-*o*-tolylphosphine、tetrahydrofuran (THF)、*N,N*-dimethylformamide (DMF)、(−)-vesamicol、(+)-pentazocine、haloperidol は

Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI)、Potassium carbonate、hydroiodic acid (HI) は Nacalai Tesque (Kyoto, Japan)、Lithium aluminum hydride (0.1 M in tetrahydrofuran: 0.1 M LiAlH₄/THF) は ABX Advanced Biochemical Compounds (Radeberg, Germany)、¹¹C] (*R,R*), (*S,S*)HAPT の前駆体と標準品は Nard Institute Ltd. (Amagasaki, Japan)、SA4503 は M's Science Corporation (Kobe, Japan)、³H]Aminobenzovesamicol、³H]pentazocine は PerkinElmer Life & Analytical Sciences (Boston, MA)より購入した。

5-2-3 分配係数(logD_{7.4})の測定

およそ 3 mg のラセミ体の HAPT を 750 μ L のオクタノールに溶解し、250 μ L ずつ 3 等分した。0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を 250 μ L 加え、5 分間攪拌した。9,510 g、5 分の遠心分離後、2 層に分けた。オクタノール層は CH₃CN で 10 倍希釈し、HPLC を用いて化合物の濃度を測定した。logD_{7.4} をオクタノール/緩衝液の対数値として求めた。

5-2-4 アセチルコリン小胞トランスポーター、シグマ-1 受容体に対する親和性

(*R,R*)、(*S,S*)HAPT の VACHT、シグマ-1 受容体に対する親和性は、報告された方法 (Shiba et al., 2006) を若干修正し、ラット脳組織膜を用いて平衡結合アッセイにて求めた。

VACHT 結合アッセイは、10%DMSO を含む 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い、脳膜組織のタンパク質 (5 mg) を含み、³H]aminobenzovesamicol (4.82 nM)、および各濃度の (*R,R*)、(*S,S*)HAPT を添加し 25 °C で 60 分インキュベートして行った。シグマ受容体をマスクするために 100 nM haloperidol を添加した。また、非特異的結合を求める際には、10 μ M の (-)-vesamicol を添加して行った。

シグマ-1 受容体のアッセイは、10%DMSO を含む 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) を用い、脳膜組織のタンパク質 (5 mg) と ³H]pentazocine (3.80 nM) と各濃度の化合物を 25 °C で 60 分インキュベートして行った。非特異的結合を求める際には、10 μ M (+)-pentazocine を添加した。

インキュベーションの後、真空フィルターシステム (M-30R, Brandel, Gaithersburg, MD) through glass-fiber filters (GF/C, Whatman, Kent, UK) にて、グラスフィルター (GF/C, Whatman, Kent, UK) でろ過し、結合した放射能/遊離の放射能の比を求めた。フィルターは 3 ml の氷冷 50 mM Tris/HCl 緩衝液 (pH 7.4) で 3 回リンスし、フィルターの放射能は液体シンチレーションカウンター (3100, PerkinElmer, Shelton, CT) にて測定した。特異的結合を化合物の濃度に対してプロットし、50 %阻害 (IC₅₀) 濃度を求めた。この値から、Cheng and Prusoff 式 (Cheng and Prusoff, 1973) に従い阻害定数 (K_i) を求めた。

5-2-5 $[^{11}\text{C}]$ 標識化合物の合成

$[^{11}\text{C}](R,R)$ 、 (S,S) HAPT は前駆体と palladium(0)錯体存在下での高速メチル化反応 (Doi et al., 2009) にて標識した。 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルを 1-2-2 と同様の方法で得、 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチルをあらかじめ 4.6 mg (5.0 μmol) の tris(dibenzylideneacetone)dipalladium、6.2 mg (20.4 μmol) の tri-*o*-tolylphosphine の溶解した 0.3 ml DMF を封入した反応器に導入した。 $[^{11}\text{C}]$ ヨウ化メチル捕集後、2 mg (4.5 μmol) の前駆体と 1.4 mg (10.1 μmol) の potassium carbonate を含んだ 0.3 mL DMF を反応器に導入した。70 °C、5 分反応し、固体不純物を除去するために反応液をガラスフィルターに通し、HPLC システムに導入した。分離 HPLC システムは、Megapak SIL C18-10 カラム (7.6 mm x 250 mm, Jasco, Tokyo, Japan)、PU-980 ポンプ (Jasco, Tokyo, Japan)、UV-970UV 検出器 (Jasco, Tokyo, Japan)、S-1729 固体放射能検出器 (Ohyokoken Kogyo, Fussa, Japan) を用いた。溶媒は $\text{CH}_3\text{CN}/30 \text{ mM } \text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ (450/550/2) を用い、流速 6 ml/min にて分取し、溶媒除去後 3 mL の生理食塩溶液に溶解した。

$[^{11}\text{C}](R,R)$ 、 (S,S) HAPT の化学的、放射化学的分析は以下の HPLC システムにて行った。Finepak SIL C18-S カラム (4.6 mm x 150 mm, Jasco, Tokyo, Japan)、CCPM ポンプ (Tosoh, Tokyo, Japan)、UV-8010 UV 検出器 (Tosoh, Tokyo, Japan)、RLC-700 放射能検出器 (Aloka, Tokyo, Japan) を用いた。溶媒は $\text{CH}_3\text{CN}/30 \text{ mM } \text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}$ (500/500/2) を用い、流速 2 ml/min にて分析した。

$[^{11}\text{C}](R,R)$ 、 (S,S) HAPT の光学純度は以下の HPLC システムにて行った。Chirobiotic V カラム (4.6 mm x 250 mm, Astec, NJ, USA)、DP8020 ポンプ (Tosoh, Tokyo, Japan)、UV-8020 UV 検出器 (Tosoh, Tokyo, Japan)、TCS-713 放射能検出器 (Aloka, Tokyo, Japan) を用いた。溶媒は $\text{CH}_3\text{OH}/\text{CH}_3\text{COOH}/(\text{C}_2\text{H}_5)_3\text{N}$ (1000/0.3/0.1) を用い、流速 1 ml/min にて分析した。

5-2-6 PET 計測

PET 計測は 1-2-3 と同様の方法で行い、データを収集した。

$[^{11}\text{C}](R,R)$ または (S,S) HAPT 投与後 60-91 分のデータを積算して、10 ヶ所 (小脳、海馬、扁桃、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、視床、被殻、尾状核、帯状回) の ROI を BrainMaps.org (Jones et al., 2011) を参照に、MRI 画像上にマニュアルで設定した。MRI 上の ROI を、PET 画像に重ねあわせ、ROI ごとの TAC を求め、動態解析に用いた。解析は PMOD ソフトウェア (PMOD Technologies Ltd., Zurich, Switzerland) を用いて行った。

阻害実験では、VACHT アンタゴニストである (-)-vesamicol (1 mg/kg) を $[^{11}\text{C}](R,R)$ HAPT 投与 30 分前に、シグマ-1 受容体アゴニストである SA4503 (0.1 mg/kg) を $[^{11}\text{C}](R,R)$ HAPT 投与 10 分前に投与した。

5-2-7 動態解析

脳への $[^{11}\text{C}]$ (*R,R*)、または (*S,S*)HAPT の入力関数を測定するために、動脈血を、トレーサー投与後に 8 秒から 64 秒まで 8 秒ごと、続いて 90、150 秒、その後さらに 4、6、10、20、30、45、60、75 および 90 分後に得た。遠心分離し血漿を得、重量を測定し、放射能を測定した。代謝分析のために、血漿にエタノール (サンプル/エタノール=1/2) を加え、遠心分離し、上清を薄層クロマトプレート (AL SIL G/UV, Whatman, Kent, England)、移動相に dichloromethane:diethyl ether:triethylamine = 100:40:1 を用いて展開した。薄層クロマトグラフィー上の未変化体と代謝物の放射能をイメージングプレート (FLA-7700, Fuji Film Co. Ltd., Tokyo, Japan) で読み取り、それぞれの採血時刻で血漿中全放射能 (代謝物+未代謝物) に対する未代謝物の比率を算出した。

5-2-8 グラフィック解析

ローガン解析では、pixel-wise kinetic modeling (PMOD) ソフトウェア (PMOD Group, Zurich, Switzerland) を用いて定量解析した。代謝補正した動脈血を入力関数とした time-activity カーブを用いて、 $[^{11}\text{C}]$ (*S,S*)、(*R,R*)HAPT のトータルディストリビューションボリューム (V_t) を求めた。ローガンプロットは、1-2-5 の方程式に基づいた。

5-2-9 統計解析

データは mean \pm SD を示し、両側スチューデント *t* 検定にて比較を行った。統計的を 5% ($P < 0.05$) とした。

5-3 結果

HAPT は分子内に不斉炭素が 2 つ存在することから 4 つの異性体が存在することになる。本研究では、ベサミコールより誘導される構造を有する (*R,R*)、(*S,S*) 異性体を選し、合成した (Figure 38A)。VACHT およびシグマ-1 受容体に対する K_i 値を算出するために、ラット脳ホモジネートを用いた *in vitro* での (*R,R*)、(*S,S*)HAPT の IC_{50} を求めた。VACHT に対して (*R,R*)HAPT ($K_i = 27.5 \text{ nM}$) は (*S,S*)HAPT ($K_i = 699 \text{ nM}$) より非常に高い親和性を示した。一方、シグマ-1 受容体に対してどちらも大変低い親和性 ($K_i > 1000 \text{ nM}$) であった。HAPT の $\log D_{7.4}$ は 3.47 であった。

Figure 38B は $[^{11}\text{C}]$ methylation による $[^{11}\text{C}]$ HAPT 合成法である。Figure 39 は、化学的、放射化学的分析の結果を示し、 $[^{11}\text{C}]$ (*R,R*)HAPT が (A)、 $[^{11}\text{C}]$ (*S,S*)HAPT が (B) である。(C) は光学分析の結果を示している。最終製品の放射能は $[^{11}\text{C}]$ (*R,R*)HAPT が 1.80 GBq、 $[^{11}\text{C}]$ (*S,S*)HAPT が 1.98 GBq であり、比放射能はそれぞれ 86、60 GBq/ μmol であった。光学純度は $[^{11}\text{C}]$ (*R,R*)、(*S,S*)HAPT ともに 100% であった (C)。

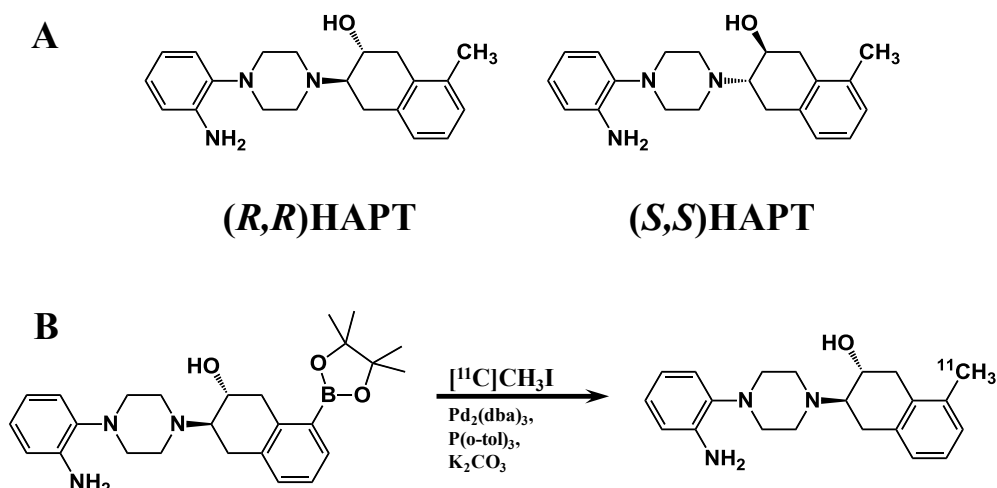


Figure 38 Chemical structures of (*R,R*)HAPT and (*S,S*)HAPT (A) and radiochemical syntheses of [^{11}C](*R,R*)HAPT (B).

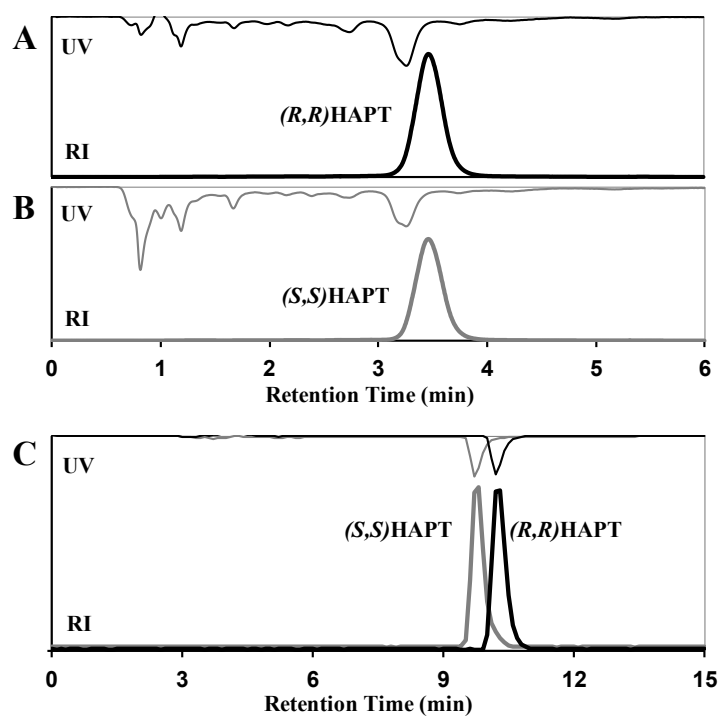


Figure 39 Chemical, radiochemical, and enantiomeric purity analyses of [^{11}C](*R,R*)HAPT (A, C) and [^{11}C](*S,S*)HAPT (B, C).

Figure 40 は、典型的な MRI 画像と、覚醒サルにおける [^{11}C](*R,R*)、(*S,S*)HAPT の PET 画像である。PET 画像は代謝補正した血漿を入力関数として用いたローガングラフィックプロットで得られた画像である。 [^{11}C](*R,R*)HAPT の分布は、被殻で最も高く、尾状核で高く、視床、扁桃体で中程度、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、帯状回、海馬で低く、小脳が最も低かった (Figure 40A)。対照的に

[^{11}C] (*S,S*)HAPT のレベルは全ての部位において [^{11}C] (*R,R*)HAPT より低かった (Figure 40B)。

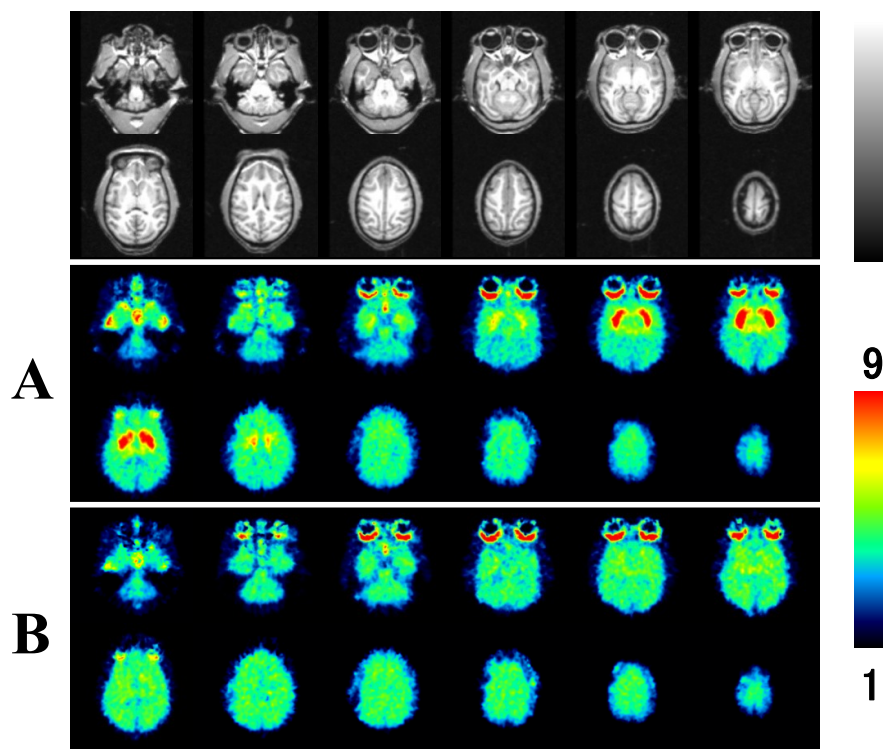


Figure 40 Typical MRI and PET images of [^{11}C] (*R,R*)HAPT (A) and [^{11}C] (*S,S*)HAPT (B). PET scans were performed for 91 min, and each PET image was generated using a Logan graphical plot with metabolic-corrected plasma input.

小脳における [^{11}C] (*R,R*)、(*S,S*)HAPT の time-activity カーブは、ほとんど同じで、投与後 10 分で最大となり、時間とともに減少していった (Figure 41A および B)。被殻への [^{11}C] (*R,R*)HAPT の集積は投与後 20 分で最大となり、その後徐々に減少した (Figure 41A)。一方、 [^{11}C] (*S,S*)HAPT の TAC は全ての部位でほとんど同じで、線条体、皮質においてでさえ低く、小脳と同様に投与後 10 分でピークとなり減少していった (Figure 41B)。

血漿において、 [^{11}C] (*R,R*)、(*S,S*)HAPT の総放射能は、投与後 30 秒でピークを示し、その後急速に減少した (Figure 41C and D)。TLC による代謝物解析では [^{11}C] (*R,R*)、(*S,S*)HAPT は徐々に原点に残る (データは示していない) 極性の高い代謝物に代謝された。 [^{11}C] (*R,R*)HAPT は徐々に代謝され、未代謝物の割合は 45 分で 34 %、90 分で 24 %であった (Figure 41C, inset)。 [^{11}C] (*S,S*)HAPT の未代謝物の割合は 45 分で 24 %、90 分で 21 %であった (Figure 41D, inset)。

VACHT に対する [^{11}C] (*R,R*)、(*S,S*)HAPT の定量解析を、代謝補正した血漿を入力関数としたローガングラフィック解析により求めた。 [^{11}C] (*R,R*)HAPT の V_t 値は被殻で最も高く、尾状核で高く、視床、扁桃体で中程度、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、帯状回、海馬で低く、小脳が最も低かった

(Figure 42)。一方 $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ の V_t 値は、全ての部位でほとんど同じで、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ より低かった(Figure 42)。

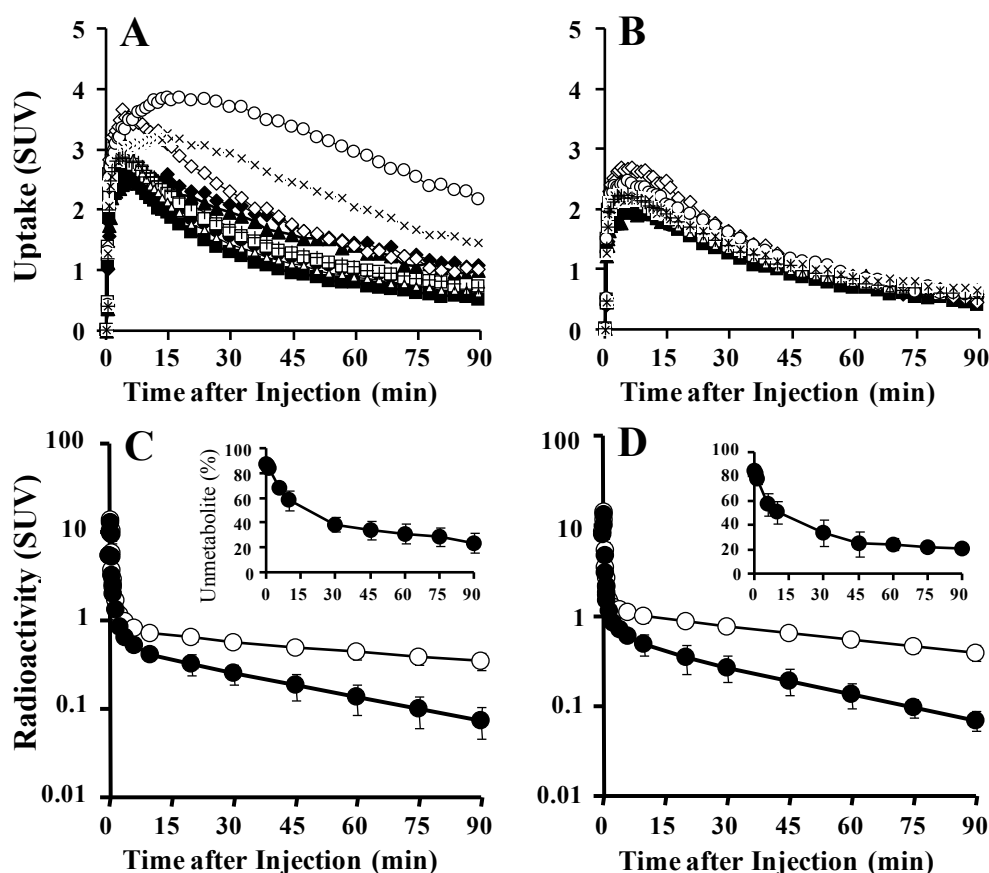


Figure 41 Time-activity curves of $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ (A and C) and $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ (B and D) in the brain (A and B) and arterial plasma (C and D) of monkey in a conscious state. PET scans were performed as shown in the legend for Fig. 3. A and B: Regions of interest (ROIs) were identified according to MRI of each animal. The following regions are included: hippocampus (\blacktriangle), amygdala (\blacklozenge), frontal cortex (\bullet), temporal cortex (\square), occipital cortex (\triangle), thalamus (\diamond), putamen (\circ), caudate (\times), cingulate ($+$), and cerebellum (\blacksquare). C and D: Total radioactivity (\circ) and the unmetabolized level (\bullet) of $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ (C) and $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ (D) were shown. Unmetabolized $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ (inset of C) and $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ (inset of D) were calculated as the ratios of unmetabolized to total radioactivity at each time point.

VACHT の特異的阻害剤である(-)-vesamicol を 1 mg/kg で 30 分前に前投与することにより、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の VACHT 結合は小脳を除いた全ての部位において完全に阻害した(Figure. 44B, and 45)。vesamicol の前投与により TAC は全ての部位でほとんど同じで、線条体、皮質においても低く、投与後 10 分でピークとなり減少していった(データは示していない)。対照的にシグマ-1 アゴニストである SA4503 の 0.1 mg/kg の 10 分前の前投与によっても、分布(Figure 43C)、 V_t 値(Figure 44)にほとんど変化が見られなかった。

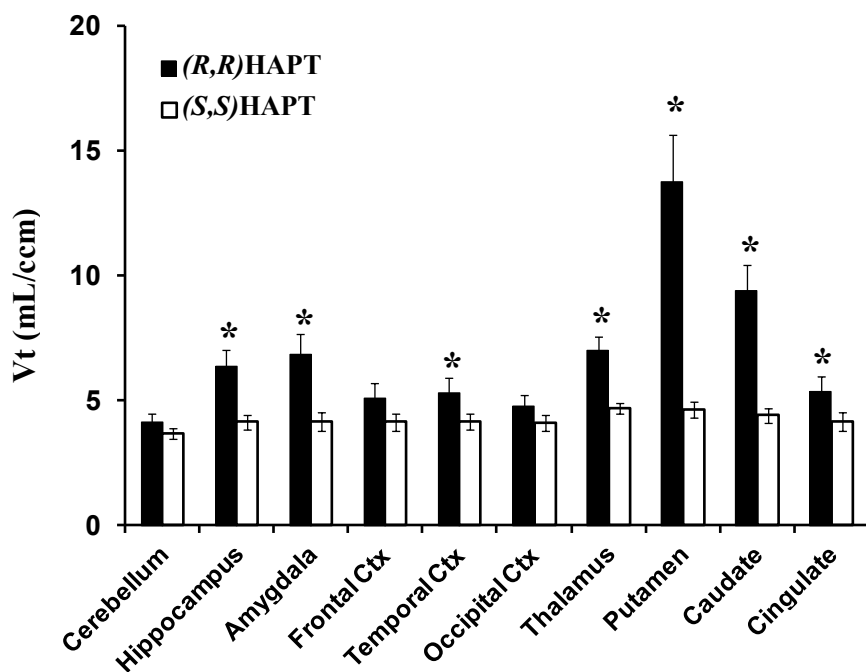


Figure 42 Distribution volumes (V_t) of [^{11}C] (R,R) and (S,S)HAPT to VAcHT in the monkey brain in a conscious state. The time-activity curves of unmetabolized [^{11}C] (R,R) and (S,S)HAPT in arterial plasma were used as input functions in the brain. The binding potential was calculated by graphical Logan plot analysis. Data are presented as means \pm SD for three animals per group. * $P < 0.05$ vs. (S,S) isomer.

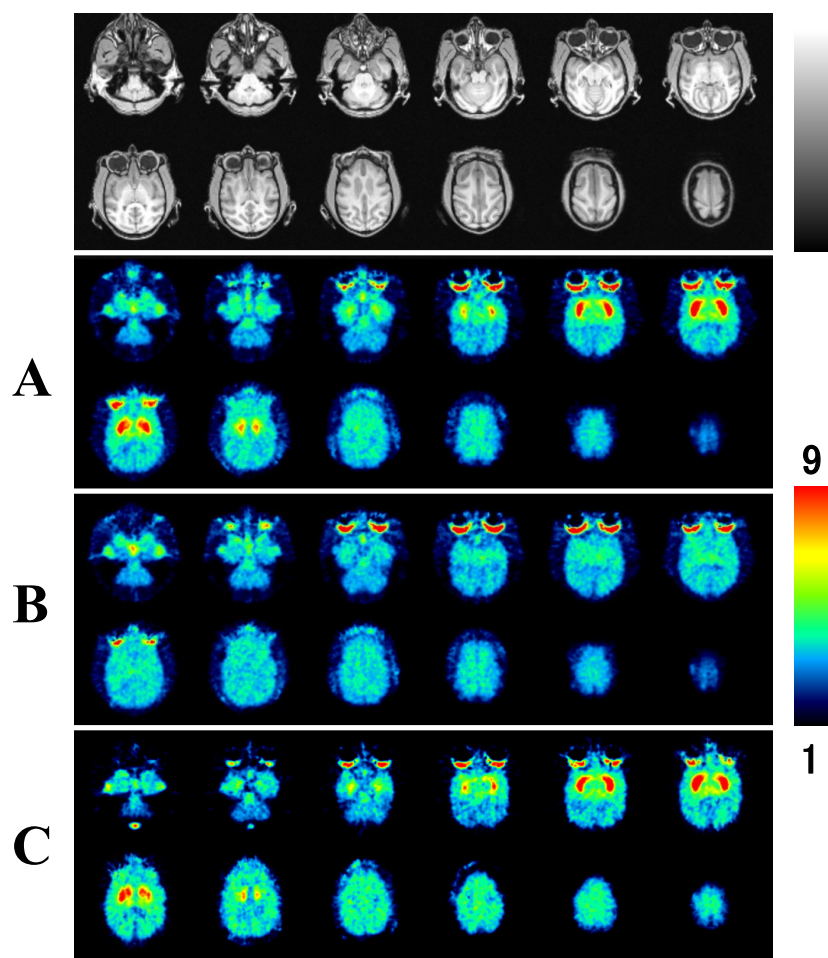


Figure 43 Effects of (-)-vesamicol and SA4503 on the binding of [^{11}C](*R,R*)HAPT in the monkey brain in a conscious state. Vehicle (A) or (-)-vesamicol (B) at a dose of 1 mg/kg was administered for 30 min prior to [^{11}C](*R,R*)HAPT injection. SA4503 (C) at a dose of 0.1 mg/kg was administered for 10 min prior to [^{11}C](*R,R*)HAPT injection. Each PET image was generated using a Logan graphical plot with metabolic-corrected plasma input.

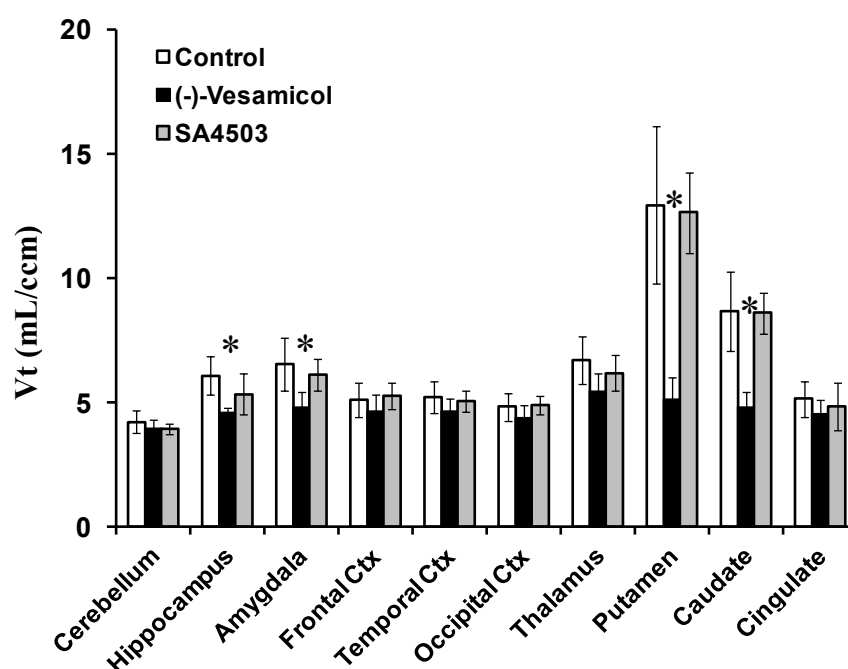


Figure 44 Effects of (-)-vesamicol and SA4503 on the distribution volumes (V_t) of [^{11}C](*R,R*)HAPT in the monkey brain in a conscious state. Vehicle or (-)-vesamicol at a dose of 1 mg/kg was administered for 30 min prior to [^{11}C](*R,R*)HAPT injection. SA4503 at a dose of 0.1 mg/kg was administered for 10 min prior to tracer injection. The time-activity curves of metabolic-corrected radioactivity in arterial plasma were used as input functions in the brain. The binding potential was calculated by graphical Logan plot analysis. Data are presented as means \pm SD for three animals per group. * $P < 0.05$ vs. vehicle.

5-4 考察

本研究は、VACHTのPETプローブ [^{11}C](*R,R*)、(*S,S*)HAPTをヒト以外の霊長類の脳を対象にして無麻酔下で高分解能PETを用いた脳内分布と動態解析を行って評価した最初の研究である。

(*R,R*)、(*S,S*)HAPTは光学異性体であり、そのVACHTに対する親和性が大きく異なるため、 C-11 標識(*R,R*)、(*S,S*)HAPTの光学純度が本研究で重要な要素となってくる。放射化学的収量と同様に光学純度も標識反応の条件によって影響され、合成時の副生成物の混入も、投与前にチェックしなければならない。palladium(0)錯体を用いた高速[^{11}C]methylation反応(Doi et al., 2009)による標識を確立することができ、[^{11}C](*R,R*)、(*S,S*)HAPTの光学純度も100%であることが、光学分析カラムを用いて確認できた。

VACHTは線条体(尾状核、被殻)に高く、小脳に少ない(Efange et al., 1995)。小脳にVACHTが少ないことは、VACHTのPETの解析する上で、この部位が参照領域に適していることを示唆している(Gilmore et al., 1996; Weihe et al., 1996)。覚醒サルへの静脈投与により、[^{11}C](*R,R*)、(*S,S*)HAPTは血液脳関門を通過し、脳への早い移行を示し、その初期の脳への移行は拡散による分布パターンであった。[^{11}C](*R,R*)HAPT各部位における放射能の分布は、被殻で最も高く、尾状核で高く、視床、扁桃体

で中程度、前頭葉皮質、側頭葉皮質、後頭葉皮質、帯状回、海馬で低く、小脳が最も低かった。血漿において、各標識体の総放射能は、投与後 30 秒でピークを示し、その後急速に減少した。代謝物解析では各標識体は徐々に代謝され、極性の高い代謝物に代謝され、それは、血液脳関門を通過して、脳に取り込まれることができないと考えられる。代謝補正した血漿を入力関数に用いたローガングラフィック解析でも、被殻が最も高い V_t 値を示し、尾状核で高く、小脳が最低値であり、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ が VACht の豊富な部位に分布していることが示された。一方、 $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ は、どの特異的分布パターンを示さない拡散による分布パターンで、いずれの部位においても経時的に速やかに消失した。

小脳を除き、 VACht の特異的アンタゴニストであるベサミコールの前投与により、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の集積は、特に線条体において完全に阻害され、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ への集積は、 VACht のへの結合を反映していることを示唆している。放射性ベサミコール誘導体が、 VACht だけでなくシグマ-1 受容体へ結合しているという報告がある (Efange et al., 1995; Shiba et al., 2006)。実際 (-)-vesamicol でさえ VACht とシグマ-1 受容体への結合能は、それぞれ $K_i = 4.4, 73.8 \text{ nM}$ である (Shiba et al., 2006)。シグマ-1 受容体特異的阻害剤による $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ 集積に関してもサルを用いて評価した。シグマ-1 受容体アゴニストである SA4503 ($K_i = 50.2 \text{ VACht}, 4.4 \text{ nM V sigma-1 receptors}$) (Shiba et al., 2006) のプレ投与によっても、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の PET 画像、解析結果に変化が見られず、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ は VACht 特異的な PET プローブであることが示唆された。加えて、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ はサル脳の全ての部位において投与後 30 分以内に疑似平衡を示し、対照的に $[^{18}\text{F}]\text{FMV}$ (Widen et al., 1992)、(-)- $[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ (Kilbourn et al., 2009)、(-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMV}$ (Kawamura et al., 2006; Shiba et al., 2009) では 90 分以内に平衡に達していない。大変遅い解離定数をもつ PET プローブによる定量解析において、平衡に達するのに数時間かそれ以上必要 (Koeppe et al., 1994) であることを示唆している。加えて、もしプローブのターゲット分子からの解離定数が血液よりの消失より遅い場合、後投与によって正しい平衡が得られない (Koeppe et al., 1994) ことを示唆している。さらに、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の可逆的な動態は、脳血流量の変化に対して有利である (Farde et al., 1989; Logan et al., 1994)。これらをまとめると、可逆的動態を示す $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ は、PET を用いた VACht の定量的解析において $[^{18}\text{F}]\text{FMV}$ (Widen et al., 1992)、(-)- $[^{18}\text{F}]\text{FEOBV}$ (Mulholland et al., 1998; Kilbourn et al., 2009)、(-)- $[^{11}\text{C}]\text{OMV}$ (Kawamura et al., 2006; Shiba et al., 2009) より優れた、有用性のある PET プローブであると考えられる。

VACht の PET プローブの概念として以下を満たす必要がある。1) *in vivo* と同様 *in vitro* においても VACht に特異性を有する; 2) 適切な $\log D_{7.4}$; 3) 血漿中からの早いクリアランスと安定性; 4) 脳への高い集積; 5) 脳内での高い代謝安定性; 6) 脳からのゆっくりとした消失を伴った適切な保持 (Waterhouse, 2003)。 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ は 1) *in vivo* と *in vitro* においても VACht に特異性はシグマ-1 受容体の 2 オーダー高かった; 2) $\log D_{7.4}$ は 3.47 と PET プローブとして適した値であった; 3) 血漿より早いクリアランスを示し、90 分後における未代謝体は 24% であった; 4) ピーク時刻におけ SUV 値は 2 かそれ以上であった; 6) PET 計測時間内にピークを示す可逆的動態を示した。

しかし 5)の高い脳内での代謝安定性は示していないが、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ は他の条件を満たした VACHT の理想的な PET プローブであると考えられる。

$[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ の脳の全ての部位への集積は、ほとんど同じで、その分布パターンは、(-)-vesamicol のプレ投与による $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の分布パターンとほぼ同じであった。これらの結果は、 $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ の分布は非特異的結合と遊離のプローブ分画を反映していると考えられる。もし、 $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ の TAC が $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ の非特異的結合と、遊離のプローブ分画に完全に位置するのであれば、mAChR の標識化合物(+)*N*- $[^{11}\text{C}]$ methyl-3-piperidyl benzilate ($[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$) とその光学異性体である $[^{11}\text{C}](-)\text{3-MPB}$ で報告された (Tsukada et al., 2001b) のと、同様に、活性型と、不活性型の化合物で 2 回 PET 計測を行うことによって、動脈採血を行わずに VACHT の定量的解析を行うことができることを示唆している。

AD 患者の症状は老人斑や、神経原線維凝集といった特徴よりも、神経、シナプスの脱落と、より強い相関があると言われている (Dournaud et al., 1995; Gomez-Isla et al., 1997)。MCI の期間の後の AD の状態は、老人斑の沈着、神経原線維凝集がプラトーに達したものと一致していない。これは、 $[^{11}\text{C}]\text{PIB}$ の計測と、記憶テストまたは $[^{18}\text{F}]\text{FDG}$ による神経の機能不全を計測したものが一致していないことからわかる (Edison et al., 2007; Furst et al., 2012)。対照的にヒトや霊長類におけるワーキングメモリーを含む記憶機能に、中枢神経の ACh 神経の障害が影響を与えていることが、PET を用いた研究により示されている。ACh 神経の中で、mAChR の減少がアルツハイマー型認知症に特徴的である (Terry and Buccafusco, 2003)。これまでに覚醒サルにおいて $[^{11}\text{C}](+)\text{3-MPB}$ を用いて mAChR の加齢による変化を報告した (Tsukada et al., 2001a; Tsukada et al., 2001b)。老齢サルのワーキングメモリーのパフォーマンスは (Tsukada et al., 2004)、若齢正常サルに mAChR 特異的阻害剤であるスコボラミンを投与して障害した場合 (Yamamoto et al., 2011) と類似していた。げっ歯類の動物において、若齢動物は、脱分極により誘発された ACh の量は老齢に比べ非常に多かった (Pedata et al., 1985; Consolo et al., 1986)。これらの結果は、ACh 遊離の減少が、正常の老化や AD におけるコリン神経の機能不全機序の 1 つであることを示している。これら神経学的知見より、AD 治療法の一つとして、脳内コリンを増加させる薬剤が用いられる。ACh エステラーゼ (AChE) 阻害により認知機能を改善する Donepezil の投与は、ACh 類似化合物である *N*- $[^{11}\text{C}]$ methyl-4-piperidyl acetate ($[^{11}\text{C}]\text{MP4A}$) の皮質における取り込みを、用量依存的に減少させる。これは AChE の抑制により、コリン神経が活性化されることを示唆している。Donepezil によるコリン神経の活性化は、老齢サルで低下したワーキングメモリーのパフォーマンスを改善した (Tsukada et al., 2004)。コリン神経の小胞には、コリン神経終末の ACh の遊離をコントロールするタンパク質として VACHT がある。

VACHT-PET は、神経学的研究において、mAChR に加え AD 治療薬の評価に有用であることが示唆されている。(+) -4- $[^{18}\text{F}]\text{fluorobenzyltrozamicol}$ ((+) - $[^{18}\text{F}]\text{FBT}$) (Efang et al., 1994) を用いたヒト以外の霊長類での唯一の PET 研究では、VACHT レベルが 10-37 歳の加齢に従い低下し (Voytko et al., 2001)、VACHT 活性が年齢に相関して変化することが示された。(+) - $[^{18}\text{F}]\text{FBT}$ はシグマ受容体

への結合により、選択性が低く、非特異的結合が許容できる範囲でないため、臨床的に VACHT のイメージングに適していないと報告している (Tu et al., 2009)。

本研究では、高分解能 PET カメラを用い、VACHT プローブ $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ 及びその光学異性体 $[^{11}\text{C}](S,S)\text{HAPT}$ の脳内動態、血漿代謝物の性質を覚醒サルで評価した。本研究により、 $[^{11}\text{C}](R,R)\text{HAPT}$ は VACHT の定量と活性に有用な PET プローブであることが示唆された。

総括

本研究では、ACh 作動性神経機能を評価する新規 PET プローブの開発、およびムスカリン性アセチルコリン受容体(mAChR)と老化、記憶機能との関連性に関して検討を行った。

PET プローブの開発では半減期が 20.4 分の ^{11}C を用いての標識合成の検討を行った。半減期が 20.4 分と短いことから、標識合成時間が長くなることにより、生産量(放射能)の低下、比放射能の低下がおこる。そのため PET プローブの標識合成は、できるだけ短時間で行う必要がある。一方で半減期が短いことから、物理的半減期、生物学的半減期により PET プローブ投与後 2.5 時間後には次の投与が可能で、1 日で複数回 PET 計測を行うことができる。第 4 章での PET 計測では投与前、投与 2 時間後、6 時間後の計測は 1 日で行った。第 5 章での阻害剤負荷でも、1 日でコントロールを 1 回目、阻害剤負荷を 2 回目に行った。

PET プローブは、サイクロトロンでの核反応終了後 30-45 分で最終薬剤として提供することができた。一般的には、 ^{11}C 標識は短時間で標識合成を行うために ^{11}C ヨウ化メチルによる、*N*-, *O*-メチル化反応を行っている。本研究では、 ^{11}C ヨウ化メチルより反応性の乏しい ^{11}C ヨウ化エチル、 ^{11}C ヨウ化プロピルによる標識合成を行った。 ^{11}C ヨウ化エチル、 ^{11}C ヨウ化プロピルによる標識合成は ^{11}C CO₂ とグリニャール試薬との反応を 1 段階追加し、さらにガスクロマトグラフィーによる ^{11}C ヨウ化メチルとの分離を行ってから、アルキル化反応を行い ^{11}C (+)-3-EPB と ^{11}C (+)-3-PPB を得た。これら反応ステップの追加によっても、メチル化による標識合成の総合成時間に 12-15 分の追加の 45 分以内で行うことができた。 ^{11}C (+)-3-EPB、 ^{11}C (+)-3-PPB の最終生産量は低下したものの、PET 計測に必要な放射能を得ることができた。また、*N*-アルキル化反応に対して、C-C 結合を形成するスティール反応を行って ^{11}C HAPT の標識合成を行った。*N*-エチル、*N*-プロピル化反応、C-C 結合を形成する標識合成を導入できたことにより、今後開発できる PET プローブの分子構造に対する応用範囲が広がったことが示唆された。

第 1 章では、新規ムスカリン性アセチルコリン神経受容体プローブである ^{11}C (+)-3-MPB とその光学異性体 ^{11}C (-)-3-MPB を、 ^{11}C 4-MPB を対照として無麻酔のアカゲザル脳で PET 解析により評価した。ムスカリン性アセチルコリン神経受容体阻害剤であるスコポラミンの投与によって、小脳以外の全ての部位で ^{11}C (+)-3-MPB と ^{11}C 4-MPB の放射能集積は減少したことから、 ^{11}C (+)-3-MPB と ^{11}C 4-MPB はムスカリン性アセチルコリン神経受容体に特異的に結合していることが示唆された。特に ^{11}C (+)-3-MPB は PET 計測時間内に集積のピークが見られ、可逆的にムスカリン受容体と結合していることが示唆された。これは ^{11}C の半減期が 20 分と短いことから限られた PET 計測時間で解析を行うことにより適した PET プローブであることが示唆された。

第 2 章では、新規の脳内ムスカリン性アセチルコリン神経受容体 PET プローブ ^{11}C (+)-3-EPB と ^{11}C (+)-3-PPB を開発し ^{11}C (+)-3-MPB と比較した。 ^{11}C (+)-3-MPB と比較して ^{11}C (+)-3-EPB と ^{11}C (+)-3-PPB の放射能動態は早い時間に集積のピークがみられ、解離も早く、速度解析では、長い ^{11}C アルキル鎖で標識されたものほど低い親和性(BP=k₃/k₄)であった。アセチルコリン分解酵素阻害剤であるドネペジルの投与により、 ^{11}C (+)-3-PPB の受容体への結合は内因性アセチルコリンと競合して低

下した。内因性神経伝達物質の変化を、PET を用いた *in vivo* での評価が可能であることが示唆された。

第 3 章では、ムスカリン性アセチルコリン受容体の老化に伴う変化を、無麻酔若齢および老齢サル脳を PET プローブ [^{11}C] (+)3-MPB を PET を用いて比較することで評価した。受容体結合は、若齢サルに比べ老齢サルで特定領域における減少が見られた。また、無麻酔の若齢および老齢サル脳を対象にして、脳内アセチルコリン作動性神経系に対する、ドネペジルによる、急性アセチルコリン分解酵素 (AChE) 阻害の影響を検討した。眼球運動を指標にした遅延反応タスクによる評価では、老齢サルは若齢サルと比較してワーキングメモリ機能が低下しており、またワーキングメモリーの機能低下はドネペジルによる AChE 阻害によるコリン作動性神経系の促進のために部分的に改善された。

第 4 章では、脳内ムスカリン受容体 (mAChR) を阻害することにより、遅延反応課題のトレーニングを施されたサルに一時的に記憶障害を引き起こす薬剤としてスコポラミンを用い、中枢性 mAChR 占有率と認知機能障害との関係を調べた。mAChR に特異的に結合する放射性薬剤 [^{11}C] (+)3-MPB を用いた PET 計測を、スコポラミン 0.01、および 0.03 mg/kg の投与前、2、6、24 時間後に計測を行った。mAChR 占有率は、スコポラミン投与後 2 時間で最大となった。記憶障害はスコポラミン与 24 時間後に消失したが、前頭葉、視床において mAChR 占有率が 11-24 % 残っていたおり、脳幹では残っていなかった。これらの結果から、スコポラミンによる mAChR 占有が記憶障害を引き起こし、ワーキングメモリーは脳幹のコリン神経が関わっていたことが示唆された。

第 5 章では、 ^{11}C [(R,R)HAPT とその光学異性体 ^{11}C [(S,S)HAPT をアセチルコリン神経のプレシナプスに局在する小胞トランスポーター (VACht) を画像化する新規 PET プローブとして開発した。 ^{11}C [(R,R)HAPT の放射能動態は、尾状核と被殻では、投与後 20 分でピークを示し、それ以外の部位では 5 分以内にピークが得られた。 ^{11}C [(R,R)HAPT の分布は、被殻が最も高く、尾状核で高く、扁桃核、海馬、視床で中程度、帯状回、前頭葉、後頭葉で低く、小脳が最も低かった。一方、 ^{11}C [(S,S)HAPT の放射能動態と分布は、特異的集積が見られなかった。VACht のアゴニストである (-)-vesamicol (1 mg/kg) により、 ^{11}C [(R,R)HAPT の集積は、小脳を除き全ての部位で阻害され、一方 sigma-1 受容体アゴニストである SA4503 (0.1 mg/kg) では阻害されなかったことから、 ^{11}C [(R,R)HAPT は sigma-1 受容体へは結合せず、VACht に結合していると示唆された。 ^{11}C [(R,R)HAPT は、生きた脳における VACht の非侵襲的に定量できる PET プローブであることが示唆された。

以上より、本研究では、ACh 作動性神経機能を評価する新規 PET プローブの開発、およびムスカリン性アセチルコリン受容体 (mAChR) と老化、記憶機能との関連性を示すことができた。さらに VACht の PET を開発することができた。

謝辞

本研究においてご指導を賜りました静岡県立大学薬学研究院 奥直人教授に心より感謝申し上げます。
また、有益なご指導とご助言を賜りました静岡県立大学薬学研究院 菅敏幸教授、武田厚司教授、尾上誠良教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、終始有益なご助言とご討論を頂きました浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センター長 塚田秀夫博士に深く感謝いたします。

さらに、研究の遂行にあたり技術的支援および有益なご討論を頂きました浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET センターの 垣内岳春博士、大庭弘行博士、原田典弘博士、山本茂幸博士、福元大氏、浜松ホトニクス株式会社 中央研究所 PET 医療グループ 佐藤謙吾氏に深くお礼申し上げます。

第1章の遂行にあたり、有益なご助言を頂きました理化学研究所 ライフサイエンス技術基盤研究センター 高橋和弘博士に感謝いたします。

第4章の遂行にあたり、有益なご助言を頂きました Michigan 大学 Edward F Domino 教授に感謝いたします。

引用文献

- Ahlskog JE, Richelson E, Nelson A, Kelly PJ, Okazaki H, Tyce GM, van Heerden JA, Stoddard SL, Carmichael SW. 1991. Reduced D2 dopamine and muscarinic cholinergic receptor densities in caudate specimens from fluctuating parkinsonian patients. *Ann Neurol* 30: 185–191.
- Aigner TG, Mishkin M. 1986. The effects of physostigmine and scopolamine on recognition memory in monkeys. *Behav Neural Biol* 45: 81–87.
- Alexander GE, Crutcher MD. 1990. Functional architecture of basal ganglia circuits: neural substrates of parallel processing. *Trends Neurosci* 13: 266–271.
- Baghdoyan HA, Lydic R, Fleegal MA. 1998. M2 muscarinic autoreceptors modulate acetylcholine release in the medial pontine reticular formation. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 1446–1452.
- Bahr BA, Parsons SM. 1986. Acetylcholine transport and drug inhibition kinetics in Torpedo synaptic vesicles. *J Neurochem* 46: 1214–1218.
- Bainbridge NK, Koselke LR, Jeon J, Bailey KR, Wess J, Crawley JN, Wrenn CC. 2008. Learning and memory impairments in a congenic C57BL/6 strain of mice that lacks the M2 muscarinic acetylcholine receptor subtype. *Behav Brain Res* 190: 50–58.
- Bartus RT, Johnson HR. 1976. Short-term memory in the rhesus monkey: disruption from the anti-cholinergic scopolamine. *Pharmacol Biochem Behav* 5: 39–46.
- Baumgold J, Abood LG, Aronstam R. 1977. Studies of the relationship of binding affinity to psychoactive and anticholinergic potency of a group of psychotomimetic glycolates. *Brain Res* 124: 331–340.
- Bechara A, van der Kooy D. 1989. The tegmental pedunculopontine nucleus: a brain-stem output of the limbic system critical for the conditioned place preferences produced by morphine and amphetamine. *J Neurosci* 9: 3400–3409.
- Bodick NC, Offen WW, Levey AI, Cutler NR, Gauthier SG, Satlin A, Shannon HE, Tollefson GD, Rasmussen K, Bymaster FP, Hurley DJ, Potter WZ, Paul SM. 1997. Effects of xanomeline, a selective muscarinic receptor agonist, on cognitive function and behavioral symptoms in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 54: 465–473.
- Broersen LM, Heinsbroek RP, de Bruin JP, Joosten RN, van Hest A, Olivier B. 1994. Effects of local application of dopaminergic drugs into the dorsal part of the medial prefrontal cortex of rats in a delayed matching to position task: comparison with local cholinergic blockade. *Brain Res* 645: 113–122.
- Broks P, Preston GC, Traub M, Poppleton P, Ward C, Stahl SM. 1988. Modelling dementia: effects of scopolamine on memory and attention. *Neuropsychologia* 26: 685–700.
- Buccafusco JJ, Jackson WJ, Gattu M, Terry AV Jr. 1995. Isoarecolone-induced enhancement of delayed matching to sample performance in monkeys: role of nicotinic receptors. *Neuroreport* 6: 1223–1227.
- Buccafusco JJ, Terry AV Jr, Goren T, Blaugrun E. 2003. Potential cognitive actions of (n-propargyl-(3r)-aminoindan-5-yl)-ethyl, methyl carbamate (tv3326), a novel neuroprotective agent, as assessed in old rhesus monkeys in their performance of versions of a delayed matching task. *Neuroscience* 119: 669–678.
- Buccafusco JJ, Terry AV Jr, Murdoch PB. 2002. A computer-assisted cognitive test battery for aged monkeys. *J Mol Neurosci* 19: 179–185.
- Buck A, Mulholland GK, Papadopoulos SM, Koeppe RA, Frey KA. 1996. Kinetic evaluation of positron-emitting muscarinic receptor ligands employing direct intracarotid injection. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 1280–1287.

- Caccamo A, Fisher A, LaFerla FM. 2009. M1 agonists as a potential disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 6: 112–117.
- Carson RE, Kiesewetter DO, Jagoda E, Der MG, Herscovitch P, Eckelman WC. 1998. Muscarinic cholinergic receptor measurements with [^{18}F]FP-TZTP: control and competition studies. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 1130-1142.
- Chafee MV, Goldman-Rakic PS. 1998. Matching patterns of activity in primate prefrontal area 8a and parietal area 7ip neurons during a spatial working memory task. *J Neurophysiol* 79: 2919–2940.
- Cheng YC, Prusoff WH. 1973. Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22: 3099-3108.
- Collerton D. 1986. Cholinergic function and intellectual decline in Alzheimer's disease [Review]. *Neuroscience* 19: 1-28.
- Comer D, Maziere M. 1982. An approach for the study of specific binding in vivo using positron computed tomography. In: Kuhl DE, editor. *Radionuclide Imaging*. New York: Pergamon Press P 263.
- Consolo S, Wang J-X, Fiorentini F, Vezanni A, Ladinsky H. 1986. In vivo and in vitro studies on the regulation of cholinergic neurotransmission in striatum, hippocampus, and cortex of aged rats. *Brain Res* 347: 212-218.
- Court JA, Lloyd S, Johnson M, Griffiths M, Birdsall NJM, Piggott MA, Oakley AE, Ince PG, Perry EK, Perry RH. 1997. Nicotinic and muscarinic cholinergic receptor binding in the human hippocampal formation during development and aging. *Develop Brain Res* 101: 93-105.
- Crook JM, Tomaskovic-Crook E, Copolov DL, Dean B. 2000. Decreased muscarinic receptor binding in subjects with schizophrenia: a study of the human hippocampal formation. *Biol Psychiatry* 48: 381–388.
- Cross DJ, Minoshima S, Nishimura S, Noda A, Tsukada H, Kuhl DE. 2000. Three-dimensional stereotactic surface projection analysis of macaque brain PET: development and initial applications. *J Nucl Med* 41: 1879-1887.
- Custers FG, Leysen JE, Stoof JC, Herscheid JD. 1997. Vesamicol and some of its derivatives: questionable ligands for selectively labelling acetylcholine transporters in rat brain. *Eur J Pharmacol* 338: 177-183.
- Dannals RF, Långström B, Ravert HT, Wilson AA, Wagner HN. 1988. Synthesis of radiotracers for studying muscarinic cholinergic receptors in the living human brain using positron emission tomography: [^{11}C]dextetide and [^{11}C]levetide. *Appl Radiat Isot* 39: 291-295.
- De Vos F, Santens P, Vermeirsch H, Dewolf I, Dumont F, Slegers G, Dierckx RA, De Reuck J. 2000. Pharmacological evaluation of [^{11}C]donepezil as tracer for visualization of acetylcholinesterase by PET. *Nucl Med Biol* 27: 745-747.
- Dean B, McLeod M, Keriakous D, McKenzie J, Scarr E. 2002. Decreased muscarinic1 receptors in the dorsolateral prefrontal cortex of subjects with schizophrenia. *Mol Psychiatry* 7: 1083–1091.
- Dellu F, Mayo W, Cherkaoui J, Le Moal M, Simon H. 1991. Learning disturbances following excitotoxic lesion of cholinergic pedunculo-pontine nucleus in the rat. *Brain Res* 544: 126–132.
- Dewey SL, MacGregor RR, Brondie JD, Bendriem B, King PT, Volkow ND, Schlyer DJ, Fowler JS, Wolf AP, Gatley SJ, Hitzemann R. 1990a. Mapping muscarinic receptors in human and baboon brain using [N-11C-methyl]benztropine. *Synapse* 5: 213-223.
- Dewey SL, Smith GS, Logan J, Brodie JD, Fowler JS, Wolf AP. 1993a. Striatal binding of the PET ligand

¹¹C-raclopride is altered by drugs that modify synaptic dopamine levels. *Synapse* 13: 350-356.

Dewey SL, Volkow ND, Logan J, MacGregor RR, Fowler JS, Schlyer DJ, Bendriem B. 1990b. Age-related decrease in muscarinic cholinergic receptor binding in the human brain measured with positron emission tomography (PET). *J Neurosci Res* 27: 569-575.

Ding YS, Molina PE, Fowler JS, Logan J, Volkow ND, Kuhar MJ, Carroll FI. 1999. Comparative studies of epibatidine derivatives [¹⁸F]NFEP and [¹⁸F]N-methyl-NFEP: kinetics, nicotine effect, and toxicity. *Nucl Med Biol* 26: 139-148.

Doi H, Ban I, Nonoyama A, Sumi K, Kuang C, Hosoya T, Tsukada H, Suzuki M. 2009. Palladium(0)-mediated rapid methylation and fluoromethylation on carbon frameworks by reacting methyl and fluoromethyl iodide with aryl and alkenyl boronic acid esters: useful for the synthesis of [¹¹C]CH₃-C and [¹⁸F]FCH₂-C-containing PET tracers. *Chem Eur J* 15: 4165-4171.

Dournaud P, Delaere P, Hauw JJ, Epelbaum J. 1995. Differential correlation between neurochemical deficits, neuropathology, and cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 16: 817-823.

Drachman DA. 1977. Memory and cognitive function in man: does the cholinergic system have a specific role? *Neurology* 27: 783-790.

Edgington T, Rusted JM. 2003. Separate and combined effects of scopolamine and nicotine on retrieval-induced forgetting. *Psychopharmacology* 170: 351-357.

Edison P, Archer HA, Hinz R, Hammers A, Pavese N, Tai YF, Hotton G, Cutler D, Fox N, Kennedy A, Rossor M, Brooks DJ. 2007. Amyloid, hypometabolism, and cognition in Alzheimer disease: An [¹¹C]PIB and [¹⁸F]FDG PET study. *Neurology* 68: 501-508.

Efange SMN, Mach RH, Khare A, Michelson RH, Nowak PA, Evora PH. 1994. p-[¹⁸F]Fluorobenzyltrozamicol ([¹⁸F]FBT): molecular decomposition-reconstruction approach to vesamicol receptor radioligands for positron emission tomography. *Appl Radiat Isot* 45: 465-472.

Efange SMN, Mach RH, Smith CR, Khare AB, Foulon C, Akella SK, Childers SR, Parsons SM. 1995. Vesamicol analogues as sigma ligands. Molecular determinants of selectivity at the vesamicol receptor. *Biochem Pharmacol* 49: 791-797.

Efange SMN, Nader MA, Ehrenkaufer RL, Khare AB, Smith CR, Morton TE, Mach RH. 1999. (+)-p-[¹⁸F]fluorobenzylspirotrozamicol [(+)-[¹⁸F]spiro-FBT]: synthesis and biological evaluation of a high-affinity ligand for the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). *Nucl Med Biol* 26: 189-192.

Enna SJ, Bennett Jr JP, Bylund DB, Snyder SH, Bird ED, Iversen LL. 1976. Alterations of brain neurotransmitter receptor binding in Huntington's chorea. *Brain Res* 116: 531-537.

Enna SJ, Bird ED, Bennett JP Jr, Bylund DB, Yamamura HI, Iversen LL et al 1976. Huntington's chorea. Changes in neurotransmitter receptors in the brain. *N Engl J Med* 294: 1305-1309.

Everitt BJ, Robbins TW. 1997. Central cholinergic systems and cognition. *Annu Rev Psychol* 48: 649-684.

Fahn S. 1983. High dosage anticholinergic therapy in dystonia. *Neurology* 33: 1255-1261.

Farde L, Eriksson L, Blomqvist G, Halldin C. 1989. Kinetic analysis of central [¹¹C]raclopride binding to D₂-dopamine receptors studied by PET - a comparison to the equilibrium analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 9: 696-708.

Floresco SB, Braakma DN, Phillips AG. 1999. Thalamic-Cortical-Striatal Circuitry Subserves Working Memory during Delayed Responding on a Radial Arm Maze. *J Neurosci* 19: 11061-11071.

- Flynn DD, Ferrari-DiLeo G, Mash DC, Levey AI. 1995. Differential regulation of molecular subtypes of muscarinic receptors in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 64: 1888-1891.
- Flynn DD, Mash DC. 1993. Distinct kinetic binding properties of N-[3H]-methylscopolamine afford differential labeling and localization of M1, M2, and M3 muscarinic receptor subtypes in primate brain. *Synapse* 14: 283-293.
- Frey KA, Koeppe RA, Mulholland GK, Jewett D, Hichwa R, Ehrenkaufer RLE, Carey JE, Wieland DM, Kuhl DE, Agranoff BW. 1992. In vivo muscarinic cholinergic receptor imaging in human brain with [¹¹C]scopolamine and positron emission tomography. *J Cereb Blood Flow Metab* 12: 147-154.
- Funahashi S, Bruce CJ, Goldman-Rakic PS. 1989. Mnemonic coding of visual space in the monkey's dorsolateral prefrontal cortex. *J Neurophysiol* 61: 331-349.
- Furst AJ, Rabinovici GD, Rostomian AH, Steed T, Alkalay A, Racine C, Miller BL, Jagust WJ. 2012. Cognition, glucose metabolism and amyloid burden in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 33: 215-225.
- Giboureau N, Som IM, Boucher-Arnold A, Guilleaume D, Kassiotis M. 2010. PET radioligands for the vesicular acetylcholine transporter (VACHT). *Curr Top Med Chem* 10: 1569-1583.
- Gilmor ML, Nash NR, Roghani A, Edwards RH, Yi S, Hersch SM, Levey AI. 1996. Expression of the putative vesicular acetylcholine transporter in rat brain and localization in cholinergic synaptic vesicles. *J Neurosci* 16: 2179-2190.
- Gomez-Isla T, Hollister R, West H., Mui S, Growdon JH, Petersen RC, Parisi JE, Hyman BT. 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 41: 17-24.
- Green A, Ellis KA, Ellis J, Bartholomeusz CF, Ilic S, Croft RJ, Phan KL, Nathan PJ. 2005. Muscarinic and nicotinic receptor modulation of object and spatial n-back working memory in humans. *Pharmacol Biochem Behav* 81: 575-584.
- Hermann C, Antuono P, Coyle JT. 1998. Basal forebrain cholinergic neurons and Alzheimer's disease. In: Iversen LL, Iversen SD, Snyder SD, editors. *Psychopharmacology of the aging Nervous System*. New York: Plenum p 69-106.
- Hampson RE, España RA, Rogers GA, Porrino LJ, Deadwyler SA. 2009. Mechanisms underlying cognitive enhancement and reversal of cognitive deficits in nonhuman primates by the ampakine CX717. *Psychopharmacology* 202: 355-369.
- Hannula DE, Tranel D, Cohen NJ. 2006. The long and the short of it: relational memory impairments in amnesia, even at short lags. *J Neurosci* 26: 8352-8359.
- Harada N, Nishiyama S, Fukumoto D, Kakiuchi T, Tsukada H. 2002a. Age-related changes in the striatal dopaminergic system in the living brain: a multiparametric PET study in conscious monkeys. *Synapse* 45: 38-45.
- Harada N, Ohba H, Nishiyama S, Sato K, Kakiuchi T, Tsukada H. 2002b. Age differences of phosphodiesterase type-IV and its functional response to dopamine D1 receptor modulation in the living brain: a PET study in conscious monkeys. *Synapse* 44: 139-145.
- Haraguchi K, Ito K, Kotaki H, Sawada Y, Iga T. 1997. Prediction of drug-induced catalepsy based on dopamine D1, D2, and muscarinic acetylcholine receptor occupancies. *Drug Metab Dispos* 25: 675-684.
- Hardman JG, Limbird LE. 1996. Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill: New York. pp 149-150.
- Hasselmo ME and Stern CE. 2006. Mechanisms underlying working memory for novel information. *Trends*

Herremans AH, Hijzen TH, Welborn PF, Olivier B, Slangen JL. 1996. Effects of infusion of cholinergic drugs into the prefrontal cortex area on delayed matching to position performance in the rat. *Brain Res* 711: 102–111.

Hicks BW, Rogers GA, Parsons SM. 1991. Purification and characterization of a nonvesicular vesamicol-binding protein from electric organ and demonstration of a related protein in mammalian brain. *J Neurochem* 57: 509–591.

Höhhmann C, Antuono P, Coyle JT. 1998. Basal forebrain cholinergic neurons and Alzheimer's disease. In: Iversen LL, Iversen SD, Snyder SD, editors. *Psychopharmacology of the aging nervous system*. New York: Plenum. P 69–106.

Honer WG, Prohovnik I, Smith G, Jarvis L. 1987. Cortical effects of scopolamine compared to Alzheimer's disease. *J Cereb Blood Flow Metab* 7: S387.

Honer WG, Prohovnik I, Smith G, Lucas LR. 1988. Scopolamine reduces frontal cortex perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 8: 635–641.

Horti A, Scheffel U, Stathis M, Finley P, Ravert HT, London ED, Dannals RF. 1997. Fluorine-18-FPH for PET imaging of nicotinic acetylcholine receptors. *J Nucl Med* 38: 1260–1265.

Horti AG, Scheffel U, Kimes AS, Musachio JL, Ravert HT, Mathews WB, Zhan Y, Finley PA, London ED, Dannals RF. 1998b. Synthesis and evaluation of N-[¹¹C]methylated analogues of epibatidine as tracers for positron emission tomographic studies of nicotinic acetylcholine receptors. *J Med Chem* 41: 4199–4206.

Horti AG, Scheffel U, Koren AO, Ravert HT, Mathews WB, Musachio JL, Finley PA, London ED, Dannals RF. 1998a. 2-[¹⁸F]Fluoro-A-85380, an in vivo tracer for the nicotinic acetylcholine receptors. *Nucl Med Biol* 25: 599–603.

Huang SH, Barrio J, Phelps M. 1986. Neuroreceptor assay with positron emission tomography; equilibrium versus dynamic approach. *J Cereb Blood Flow Metab* 6: 515–521.

Hudzik TJ, Wenger GR. 1993. Effects of drugs of abuse and cholinergic agents on delayed matching-to-sample responding in the squirrel monkey. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 120–127.

Inglis WL, Olmstead MC, Robbins TW. 2001. Selective deficits in attentional performance on the 5-choice serial reaction time task following pedunclopontine tegmental nucleus lesions. *Behav Brain Res* 123: 117–131.

Ingvar M, Stone-Elander S, Rogers GA, Johansson B, Eriksson L, Parsons SM, Widen L. 1993. Striatal D2/acetylcholine interaction: PET studies of the vasamicol receptor. *Neuroreport* 4: 1311–1314.

Innis RB, Cunningham VJ, Delforge J, Fujita M, Gjedde A, Gunn RN, Holden J, Houle S, Huang SC, Ichise M, Iida H, Ito H, Kimura Y, Koeppe RA, Knudsen GM, Knuuti J, Lammertsma AA, Laruelle M, Logan J, Maguire RP, Mintun MA, Morris ED, Parsey R, Price JC, Slifstein M, Sossi V, Suhara T, Votaw JR, Wong DF, Carson RE. 2007. Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands. *J Cereb Blood Flow Metab* 27: 1533–1539.

Innis RB, Malison RT, AL-Tikrite M, Hoffer PB, Sybirska EH, Seibyl JP, Zoghbi SS, Baldwin RM, Laruelle M, Smith EO, Charney DS, Heninger G, Elsworth JD, Roth RH. 1992. Amphetamine-stimulated dopamine release compete in vivo for [¹²³I]IBZM binding to the D2 receptor in nonhuman primates. *Synapse* 10: 177–184.

Irie T, Fukushi K, Akiyama Y, Tamagami H, Nozaki T. 1994. Design and evaluation of radioactive analogues for mapping brain acetylcholinesterase (AChE) in vivo. *Nucl Med Biol* 21: 801–808.

Irie T, Fukushi K, Namba H, Iyo M, Tamagami H, Nagatsuka S, Ikota N. 1996. Brain acetylcholinesterase

activity: validation of a PET tracer in a rat model of Alzheimer's disease. *J Nucl Med* 37: 649-655.

Ishiwata K, Ishii S, Shinoda M, Maekawa S, Senda M. 1999. Automated synthesis of radiochemically pure ^{11}C -labeled ethyl, propyl and butyl iodides. *Appl Radiat Isot* 50: 693-697.

Jack CR Jr, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ. 2013. Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 12: 207-216.

Jones EG, Stone JM, Karten HJ. 2011. High-resolution digital brain atlases: a Hubble telescope for the brain. *Ann NY Acad Sci* 1225 S1: E147-E159.

Kakiuchi T, Nishiyama S, Sato K, Ohba H, Nakanishi S, Tsukada H. 2000. Age-related reduction of [^{11}C]MDL100,907 binding to central 5-HT_{2A} receptors: PET study in the conscious monkey brain. *Brain Res* 883: 135-142.

Kakiuchi T, Tsukada H, Nishiyama S, Ohba H, Sato K, Harada N. 2001. Effects of aging on serotonin transporter availability and its response to fluvoxamine in the living brain: PET study with [^{11}C](+)-McN5652 and [^{11}C](−)-McN5652 in conscious monkeys. *Synapse* 40: 170-179.

Katzman R. 1986. Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 314: 964-973.

Kawamura K, Shiba K, Tsukada H, Nishiyama S, Mori H, Ishiwata K. 2006. Synthesis and evaluation of vesamicol analog (−)-o-[^{11}C]methylvesamicol as a PET ligand for vesicular acetylcholine transporter. *Ann Nucl Med* 20: 417-424.

Kilbourn MR, Hockley B, Lee L, Sherman P, Quesada C, Frey KA, Koeppe RA. 2009. Positron emission tomography imaging of (2R,3R)-5-[^{18}F]fluoroethoxybenzovesamicol in rat and monkey brain: a radioligand for the vesicular acetylcholine transporter. *Nucl Med Biol* 36: 489-493.

Kitabatake Y, Hikida T, Watanabe D, Pastan I, Nakanishi S. 2003. Impairment of reward-related learning by cholinergic cell ablation in the striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 7965–7970.

Klunk WE, Engler H, Nordberg A, Wang Y, Blomqvist G, Holt DP, Bergstrom M, Savitcheva I, Huang GF, Estrada S, Ausen B, Debnath ML, Barletta J, Price JC, Sandell J, Lopresti BJ, Wall A, Koivisto P, Antoni G, Mathis CA, Langstrom B. 2004. Imaging brain amyloid in Alzheimer's disease with Pittsburgh Compound-B. *Ann Neurol* 55: 306-319.

Kobayashi K, Inoue O, Watanabe Y, Onoe H, Långström B. 1995. Difference in response of D₂ receptor binding between ^{11}C -N-methylspiperone and ^{11}C -raclopride against anesthetics in rhesus monkey brain. *J Neural Transm* 100: 147-151.

Kobayashi Y, Inoue Y, Yamamoto M, Isa T, Aizawa H. 2002. Contribution of pedunculopontine tegmental nucleus neurons to performance of visually guided saccade tasks in monkeys. *J Neurophysiol* 88: 715–731.

Koepp MJ, Gunn RN, Lawrence AD, Cunningham VJ, Dagher A, Jones T, Brooks DJ, Bench CJ, Grasby PM. 1998. Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature* 393: 266-268.

Koeppe RA, Frey KA, Mulholland GK, Kilbourn MR, Buck A, Lee KS, Kuhl DE. 1994. [^{11}C]Tropanyl benzilate binding to muscarinic cholinergic receptors: methodology and kinetic modeling alterations. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 85-99.

Kozak R, Bowman EM, Latimer MP, Rostron CL, Winn P. 2005. Excitotoxic lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus in rats impair performance on a test of sustained attention. *Exp Brain Res* 162: 257–264.

- Kubo T, Fukuda K, Mikami A, Maeda A, Takahashi H, Mishina M, Haga T, Haga K, Ichiyama A, Kangawa K. 1986. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. *Nature* 323: 411–416.
- Långström B, Antoni G, Gullberg P, Halldin C, N_gren K, Rimland A, Sv_rd H. 1986. The synthesis of l-11C-labeled ethyl, propyl, butyl and isobutyl iodides and examples of alkylation reactions. *Appl Radiat Isot* 37: 1141-1145.
- Långström B, Antoni G, Gullberg P, Halldin C, N_gren K, Rimland A, Sv_rd H. 1986. The synthesis of l-11C-labeled ethyl, propyl, butyl and isobutyl iodides and examples of alkylation reactions. *Appl Radiat Isot* 37: 1141-1145.
- Lange KW, Javoy-Agid F, Agid Y, Jenner P, Marsden CD. 1992. Brain muscarinic cholinergic receptors in Huntington's disease. *J Neurol* 239: 103–104.
- Langmead CJ, Watson J, Reavill C. 2008. Muscarinic acetylcholine receptors as CNS drug targets. *Pharmacol Ther* 117: 232–243.
- Laruelle M. 2000. Imaging synaptic neurotransmission with in vivo binding competition techniques: a critical review. *J Cereb Blood Flow Metab* 20: 423-451.
- Lee KS, Frey KA, Koeppe RA, Buck A, Mulholland GK, Kuhl DE. 1996. In vivo quantification of cerebral muscarinic receptors in normal human aging using positron emission tomography and [¹¹C]tropanyl benzilate. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 303-310.
- Levey AI, Kitt CA, Simonds WF, Price DL, Brann MR. 1991. Identification and localization of muscarinic acetylcholine receptor proteins in brain with subtype-specific antibodies. *J Neurosci* 11: 3218–3226.
- Li M, Yasuda RP, Wall SJ, Wellstein A, Wolfe BB. 1991. Distribution of m2 muscarinic receptors in rat brain using antisera selective for m2 receptors. *Mol Pharmacol* 40: 25-35.
- Lin SC, Olson KC, Okazaki H, Richelson E. 1986. Studies on muscarinic binding sites in human brain identified with pirenzepine. *J Neurochem* 26: 274-279.
- Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wang GJ, Ding YS, Alexoff DL. 1996. Distribution volume ratios without blood sampling from graphical analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab* 16: 834–840.
- Logan J, Fowler JS, Volkow ND, Wolf AP, Dewey SL, Schlyer DJ, MacGregor RR, Hitzemann R, Bendriem B, Gatley SJ, Christman DR. 1990. Graphical analysis of reversible radioligand binding from time-activity measurements applied to [N-11C-methyl]-(-)-cocaine PET studies in human subjects. *J Cereb Blood Flow Metab* 10: 740-747.
- Logan J, Volkow ND, Fowler JS, Wang G-J, Dewey SL, MacGregor R, Schlyer D, Gatley SJ, Pappas N, King P, Hitzemann R, Vitkun S. 1994. Effects of blood flow on [¹¹C]raclopride binding in the brain: model simulations and kinetic analysis of PET data. *J Cereb Blood Flow Metab* 14: 995-1010.
- Lowy K, Abood LG, Raines H. 1976. Behavioral effects and binding affinities of two stereoisomeric psychotomimetic glycolates. *J Neurosci Res* 2: 157-165.
- Marshall IG, Parsons SM. 1987. The vesicular acetylcholine transport system. *Trends Neurosci* 10: 174-177.
- Maruyama M, Shimada H, Suhara T, Shinotoh H, Ji B, Maeda J, Zhang MR, Trojanowski JQ, Lee VMY, Ono M, Masamoto K, Takano H, Sahara N, Iwata N, Okamura N, Furumoto S, Kudo Y, Chang Q, Saido TC, Takashima A, Lewis J, Jang MK, Aoki I, Ito H, Higuchi M. 2013. Imaging of tau pathology in a tauopathy mouse model and in Alzheimer patients compared to normal controls. *Neuron* 79: 1094-1108.

- Matsumura M, Watanabe K, Ohye C. 1997. Single-unit activity in the primate nucleus tegmenti pedunculopontinus related to voluntary arm movement. *Neurosci Res* 28: 155–165.
- Matsuno K, Nakazawa M, Okamoto K, Kawashima Y, Mita S. 1996. Binding properties of SA4503: a novel and selective α_1 receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1996;306: 271-279.
- Maziere M. 1995. Cholinergic neurotransmission studies in vivo using positron emission tomography or single photon emission computerized tomography. *Pharmacol Ther* 66: 83-101.
- McEntee WJ, Crook TH. 1991. Serotonin, memory, and the aging brain. *Psychopharmacology* 103: 143-149.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. 1983. Cholinergic innervation of cortex by the basal forebrain: cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the rhesus monkey. *J Comp Neurol* 214: 170–197.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Levey AI, Wainer BH. 1984. Atlas of cholinergic neurons in the forebrain and upper brainstem of the macaque based on monoclonal choline acetyltransferase immunohistochemistry and acetylcholinesterase histochemistry. *Neuroscience* 12: 669–686.
- Mesulam MM, Mufson EJ, Wainer BH. 1986. Three-dimensional representation and cortical projection topography of the nucleus basalis (Ch4) in the macaque: concurrent demonstration of choline acetyltransferase and retrograde transport with a stabilized tetramethylbenzidine method for horseradish peroxidase. *Brain Res* 367: 301–308.
- Mewaldt SP, Ghoneim MM. 1979. The effects and interactions of scopolamine, physostigmine and methamphetamine on human memory. *Pharmacol Biochem Behav* 10: 205–210.
- Miller RJ, Hiley CR. 1974. Anti-muscarinic properties of neuroleptics and drug-induced Parkinsonism. *Nature* 248: 596–597.
- Mitchell AS, Dalrymple-Alford JC, Christie MA. 2002. Spatial working memory and the brainstem cholinergic innervation to the anterior thalamus. *J Neurosci* 22: 1922–1928.
- Mukherjee J., Perry B. D. and Cooper M. 1990. Fluorinated benzamide neuroleptics, 1. Radiosynthesis of (S)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]-5-(2-[F18]-fluoroethyl)-2-methoxybenzamide: A potential fluorine-18 labeled PET radiotracer for dopamine D-2 receptors. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* 28: 609-616.
- Mulholland GK, Jewett DW, Otto CA, Kilborn MR, Sherman PS, Kuhl DE. 1988a. Synthesis and regional brain distribution of [C-11]N-methyl-4-piperidyl benzilate ([C-11]NMPB) in the rat. *J Nuc Med* 29: 768.
- Mulholland GK, Jewett DW, Toorongian SA. 1988b. Routine synthesis of N-[¹¹C-methyl] scopolamine by phosphate mediated reductive methylation with [¹¹C]formaldehyde. *Appl Radiat Isot* 39: 373-379.
- Mulholland GK, Jung YW, Wieland DM, Kilbourn MR, Kuhl DE. 1993. Synthesis of [¹⁸F]fluoroethoxy-benzovesamicol, a radiotracer for cholinergic neurons. *J Labeled Comp Radiopharm* 33: 583-591.
- Mulholland GK, Otto CA, Jewett DW, Kilborn MR, R. Koeppe RA, Petry NA, Carey JE, Atkinson ER, Archer S, Frey KA, Kuhl DE. 1992. Synthesis, rodent biodistribution, dosimetry, metabolism and monkey images of carbon-11-labeled (+)-2-tropanyl benzilate: a central muscarinic receptor imaging agent. *J Nucl Med* 33: 423-430.
- Mulholland GK, Wieland DM, Kilbourn MR, Frey KA, Sherman PS, Carey JE, Kuhl DE. 1998. [¹⁸F]fluoroethoxy-benzovesamicol, a PET radiotracer for the vesicular acetylcholine transporter and cholinergic synapses. *Synapse* 30: 263-274.

Munson PJ, Rodbard D. 1980. LIGAND: a versatile computerized approach for the characterization of ligand binding systems. *Anal Biochem* 107: 220-239.

Nagatsuka S, Fukushi K, Shinotoh H, Namba H, Iyo M, Tanaka N, Aotsuka A, Ota T, Tanaka S, Irie T. 2001. Kinetic analysis of [^{11}C]MP4A using a high-radioactivity brain region that represents an integrated input function for measurement of cerebral acetylcholinesterase activity without arterial blood sampling, *J Cereb Blood Flow Metab* 21: 1354-1366.

Namba H, Iyo M, Shinotoh H, Nagatsuka S, Fukushi K, Irie T. 1998. Reserved acetylcholinesterase activity in aged cerebral cortex. *Lancet* 351: 881-882.

Nishiyama S, Sato K, Harada N, Kakiuchi T, Takahashi K, Tsukada H. 2000. Development and evaluation of muscarinic cholinergic PET ligands N-[^{11}C]ethyl-4-piperidyl benzilate and N-[^{11}C]propyl-4-piperidyl benzilate: A PET study in comparison with N-[^{11}C]methyl-4-piperidyl benzilate in the conscious monkey brains. *Nuc Med Biol* 27: 733-740.

Ohno M, Yamamoto T, Watanabe S. 1992. Effects of intrahippocampal injections of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and scopolamine on working and reference memory assessed in rats by a three-panel runway task. *J Pharmacol Exp Ther* 263: 943-950.

Onoe H, Inoue O, Suzuki K, Tsukada H, Ito T, Magata N, Watanabe Y. 1994. Ketamine increases the striatal N-11C-methylspiperone binding in vivo: positron emission tomography study using conscious rhesus monkey. *Brain Res* 663: 191-198.

Owen AM. 2000. The role of the lateral frontal cortex in mnemonic processing: the contribution of functional neuroimaging. *Exp Brain Res* 133: 33-43.

Patlak C, Blasberg RG, Fenstermacher JD. 1983. Graphical evaluation of blood-to-brain transfer constants from multiple-time uptake data. *J Cereb Blood Flow Metab* 3: 1-7.

Paxinos G, Watson C, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 2nd Edition, Academic Press, NY., 1986.

Pedata F, Slavikova J, Kotas A, Pepeu G. 1985. Acetylcholine release from rat cortical slices during postnatal development and aging. *Neurobiol Aging* 4: 31-35.

Penetar DM, McDonough JH Jr. 1983. Effects of cholinergic drugs on delayed match-to-sample performance of rhesus monkeys. *Pharmacol Biochem Behav* 19: 963-967.

Perry EK, Court MA, Piggott MA, Perry MA. 1994. Cholinergic component in dementia and normal aging. Huppert FA, O'Connor DW, eds. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Perry EK. 1986. The cholinergic hypothesis - ten years on [Review]. *Br Med Bull*. 42: 63-69.

Plakke B, Ng CW, Poremba A. 2008. Scopolamine impairs auditory delayed matching-to-sample performance in monkeys. *Neurosci Lett* 438: 126-130.

Planas AM, Crouzel C, Hinnen F, Jobert A, Ne F, Di Giamberardino, Tavitian B. 1994. Rat brain acetylcholinesterase visualized with [^{11}C]physostigmine. *Neuroimage* 1: 173-180.

Podruchny TA, Connolly C, Bokde A, Herscovitch P, Eckelman WC, Kiesewetter DO, Sunderland T, Carson RE, Cohen RM. 2003. In vivo muscarinic 2 receptor imaging in cognitively normal young and older volunteers. *Synapse* 48: 39-44.

Potter DD, Pickles CD, Roberts RC, Rugg MD. 2000. Scopolamine impairs memory performance and reduces frontal but not parietal visual P3 amplitude. *Biol Psychol* 52: 37-52.

- Prenant C, Barre L, Crouzel C. 1989. Synthesis of n.c.a. [^{11}C]QNB. *J Labelled Compd Radiopharm* 26: 199-201.
- Prior C, Marshall IG, Parsons SM. 1992. The pharmacology of vesamicol: an inhibitor of the vesicular acetylcholine transporter. *General Pharmacol* 23: 1017-1022.
- Prohovnik I, Arnold SE, Smith G, Lucas LR. 1997. Physostigmine reversal of scopolamine-induced hypofrontality. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 220-228.
- Prohovnik I, Perl DP, Davis KL, Libow L, Lesser G, Haroutunian V. 2006. Dissociation of neuropathology from severity of dementia in late-onset Alzheimer disease. *Neurology* 66: 49-55.
- Quirion R, Wilson A, Rowe W, Aubert I, Richard J, Doods H, Parent A, White N, Meaney MJ. 1995. Facilitation of acetylcholine release and cognitive performance by an M(2)-muscarinic receptor antagonist in aged memory-impaired. *J Neurosci* 15: 1455-1462.
- Raedler TJ, Knable MB, Jones DW, Urbina RA, Gorey JG, Lee KS, Egan MF, Coppola R, Weinberger DR. 2003. In vivo determination of muscarinic acetylcholine receptor availability in schizophrenia. *Am J Psychiatry* 160: 118-127.
- Rasmusson DD, Dudar JD. 1979. Effect of scopolamine on maze learning performance in humans. *Experientia* 35: 1069-1070.
- Reinikainen KJ, Riekkinen PJ, Halonen T, Laakso M. 1987. Decreased muscarinic receptor binding in cerebral cortex and hippocampus in Alzheimer's disease. *Life Sci* 41: 453-461.
- Rinne JO, Laakso K, Lönnberg P, Mölsä P, Paljärvi L, Rinne JK, Säkö E, Rinne UK. 1985. Brain muscarinic receptors in senile dementia. *Brain Res* 336: 19-25.
- Rinne JO. 1987. Muscarinic and dopaminergic receptors in the aging human brain. *Brain Res* 404: 162-168.
- Robbins TW, Semple J, Kumar R, Truman MI, Shorter J, Ferraro A, Fox B, McKay G, Matthews K. 1997. Effects of scopolamine on delayed-matching-to-sample and paired associates tests of visual memory and learning in human subjects: comparison with diazepam and implications for dementia. *Psychopharmacology* 134: 95-106.
- Rostron CL, Farquhar MJ, Latimer MP, Winn P. 2008. The pedunclopontine tegmental nucleus and the nucleus basalis magnocellularis: do both have a role in sustained attention? *BMC Neurosci* 9:16.
- Rowe WB, O'Donnell JP, Pearson D, Rose GM, Meaney MJ, Quirion R. 2003. Long-term effects of BIBN-99, a selective muscarinic M2 receptor antagonist, on improving spatial memory performance in aged cognitively impaired rats. *Behav Brain Res* 145: 171-178.
- Ruberg M, Ploska A, Javoy-Agid F, Agid Y. 1982. Muscarinic binding and choline acetyltransferase activity in parkinsonian subjects with reference to dementia. *Brain Res* 232: 129-139.
- Rusted JM, Warburton DM. 1988. The effects of scopolamine on working memory in healthy young volunteers. *Psychopharmacology* 96: 145-152.
- Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. 1991. D1 dopamine receptors in prefrontal cortex: involvement in working memory. *Science* 251: 947-950.
- Scatchard G. 1949. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 51: 660-672.
- Seeger T, Fedorova I, Zheng F, Miyakawa T, Koustova E, Gomez J, Basile AS, Alzheimer C, Wess J. 2004. M2 muscarinic acetylcholine receptor knock-out mice show deficits in behavioral flexibility, working memory, and hippocampal plasticity. *J Neurosci* 24: 10117-10127.

Seeman P, Guan HC, Niznik HB. 1989. Endogenous dopamine lowers the dopamine D2 receptor density as measured by [3H]raclopride: implications for positron emission tomography of the human brain. *Synapse* 3: 96-97.

Selkoe DJ. 1990. Deciphering Alzheimer's disease: the amyloid precursor protein yields new clues. *Science* 248: 1058-1060.

Sellin AK, Shad M, Tamminga C. 2008. Muscarinic agonists for the treatment of cognition in schizophrenia. *CNS Spectr* 13: 985-996.

Shekhar A, Potter WZ, Lightfoot J, Lienemann J, Dubé S, Mallinckrodt C, Bymaster FP, McKinzie DL, Felder CC. 2008. Selective muscarinic receptor agonist xanomeline as a novel treatment approach for schizophrenia. *Am J Psychiatry* 165: 1033-1039.

Shiba K, Nishiyama S, Tsukada H, Ishiwata K, Kawamura K, Ogawa K, Mori H. 2009. The potential of (-)-o-[¹¹C]methylvesamicol for diagnosing cholinergic deficit dementia. *Synapse* 63: 167-171.

Shiba K, Ogawa K, Ishiwata K, Yajima K, Mori H. 2006. Synthesis and binding affinities of methylvesamicol analogs for the acetylcholine transporter and sigma receptor. *Bioorg Med Chem* 14: 2620-2626.

Sihver W, Fasth KJ, Horti AG, Koren AO, Bergström M, Lu L, Hagberg G, Lundqvist H, Dannals RF, London ED, Nordberg A, Långström B. 1999. Synthesis and characterization of binding of 5-[⁷⁶Br]bromo-3-[[2(S)-azetidiny]methoxy]pyridine, a novel nicotinic acetylcholine receptor ligand, in rat brain. *J Neurochem* 73: 1264-1272.

Sitaram N, Weingartner H, Gillin JC. 1978. Human serial learning: enhancement with arecoline and choline and impairment with scopolamine. *Science* 201: 274-276.

Snyder SH, Chang KJ, Kuhar MJ, Yamamura HI. 1975. Biochemical identification of the mammalian muscarinic cholinergic receptor. *Feder Proc* 34: 1919-1021.

Sorger D, Scheunemann M, Vercouillie J, Großmann U, Fischer S, Hiller A, Wenzel B, Roghani A, Schliebs R, Steinbach J, Brust P, Sabri O. 2009. Neuroimaging of the vesicular acetylcholine transporter by a novel 4-[¹⁸F]fluoro-benzoyl derivative of 7-hydroxy-6-(4-phenyl-piperidin-1-yl)-octahydro-benzo[1,4]oxazines. *Nucl Med Biol* 36: 17-27.

Spinelli S, Ballard T, Feldon J, Higgins GA, Pryce CR. 2006. Enhancing effects of nicotine and impairing effects of scopolamine on distinct aspects of performance in computerized attention and working memory tasks in marmoset monkeys. *Neuropharmacology* 51: 238-250.

Steckler T, Keith AB, Sahgal A. 1994. Lesions of the pedunculopontine tegmental nucleus do not alter delayed non-matching to position accuracy. *Behav Brain Res* 61: 107-112.

Stefurak TL, van der Kooy D. 1994. Tegmental pedunculopontine lesions in rats decrease saccharin's rewarding effects but not its memory-improving effect. *Behav Neurosci* 108: 972-980.

Sugimoto H, Iimura Y, Yamanishi Y, Yamatsu K. 1992. Synthesis and anti-acetylcholinesterase activity of 1-benzyl-4-[5,6-dimethoxy-1-indanon]-2-yl]methyl piperidine hydrochloride (E2020) and related compounds. *Bioorg Med Chem Lett* 8: 871-876.

Suhara T, Inoue O, Kobayashi K, Suzuki K, Tateno Y. 1993. Age-related changes in human muscarinic acetylcholine receptors measured by positron emission tomography. *Neurosci Lett* 149: 225-228.

Supér H, Spekreijse H, Lamme VA. 2001. A neural correlate of working memory in the monkey primary visual cortex. *Science* 293: 120-124.

- Taffe MA, Weed MR, Gold LH. 1999. Scopolamine alters rhesus monkey performance on a novel neuropsychological test battery. *Brain Res Cogn Brain Res* 8: 203–212.
- Taffe MA, Weed MR, Gutierrez T, Davis SA, Gold LH. 2002. Differential muscarinic and NMDA contributions to visuo-spatial paired-associate learning in rhesus monkeys. *Psychopharmacology* 160: 253–262.
- Takahashi K, Murakami M, Miura S, Iida H, Kanno I, Uemura K, Ido T. 1997. Radiosynthesis and biodistribution of [^{11}C]3NMPB enantiomers in rats for studying muscarinic cholinergic receptors using PET. *J Labelled Compds Radiopharm* 40: 613–615.
- Takahashi K, Murakami M, Miura S, Iida H, Kanno I, Uemura K. 1999. Synthesis and autoradiographic localization of muscarinic cholinergic antagonist (+)N-[^{11}C]methyl-3-piperidyl benzilate as a potent radioligand for positron emission tomography. *Appl Radiat Isot* 50: 521–525.
- Takechi H, Onoe H, Imamura K, Onoe K, Kakiuchi T, Nishiyama S, Yoshikawa E, Mori S, Kosugi T, Okada H, Tsukada H, Watanabe Y. 1994. Brain activation study by use of positron emission tomography in unanesthetized monkey. *Neurosci Lett* 182: 279–282.
- Tandon R, Greden JF. 1989. Cholinergic hyperactive and negative schizophrenic symptoms: a model of dopaminergic/cholinergic interactions in schizophrenia. *Arch Gen Psychiatry* 46: 745–753.
- Tang Y, Mishkin M, Aigner TG. 1997. Effects of muscarinic blockade in perirhinal cortex during visual recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12667–12669.
- Tejani-Butt SM, Luthin GR, Wolfe BB, Brunswick DJ. 1990. N-substituted derivatives of 4-piperidinyl benzilate: affinities for brain muscarinic acetylcholine receptors. *Life Sci* 47: 841–848.
- Terry AV Jr, Buccafusco JJ. 2003. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and their implications for novel drug development. *J Pharmacol Exp Ther* 306: 821–827.
- Tsukada H, Harada N, Nishiyama S, Ohba H, Kakiuchi T. 2000. Cholinergic neuronal modulation alters dopamine D2 receptor availability in vivo by regulating receptor affinity induced by facilitated synaptic dopamine turnover: positron emission tomography studies with microdialysis in the conscious monkey brain. *J Neurosci* 20: 7067–7073.
- Tsukada H, Harada N, Nishiyama S, Ohba H, Sato K, Fukumoto D, Kakiuchi T. 2000a. Ketamine decreased striatal [^{11}C]raclopride binding with no alterations in static dopamine concentrations in the striatal extracellular fluid in the monkey brain: multi-parametric PET studies combined with microdialysis analysis. *Synapse* 37: 95–103.
- Tsukada H, Harada N, Ohba H, Nishiyama S, Kakiuchi T. 2001a. Facilitation of dopaminergic neural transmission does not affect [(11)C]SCH23390 binding to the striatal D(1) dopamine receptors, but the facilitation enhances phosphodiesterase type-IV activity through D(1) receptors: PET studies in the conscious monkey brain. *Synapse* 42: 258–265.
- Tsukada H, Kakiuchi T, Ando I, Ouchi Y. 1997a. Functional activation of cerebral blood flow abolished by scopolamine is reversed by cognitive enhancers associated with cholinesterase inhibition: A PET study in unanesthetized monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* 281: 1408–1414.
- Tsukada H, Kakiuchi T, Ando I, Shizuno H, Nakanishi S, Ouchi Y. 1997b. Regulation of cerebral blood flow response to somatosensory stimulation through the cholinergic system: A PET study in unanesthetized monkey brain. *Brain Res* 749: 10–17.
- Tsukada H, Kakiuchi T, Nishiyama S, Ohba H, Harada N. 2001a. Effects of aging on 5-HT1A receptors and their

functional response to 5-HT_{1A} agonist in the living brain: PET study with [carbonyl-¹¹C]WAY-100635 in conscious monkeys. *Synapse* 42: 242-251.

Tsukada H, Kreuter J, Maggos CE, Unterwald EM, Kakiuchi T, Nishiyama S, Futatsubashi M, Kreek MJ. 1996. Effects of binge pattern cocaine administration on dopamine D₁ and D₂ receptors in the rat brain: an in vivo study using positron emission tomography. *J Neurosci* 16: 7670-7677.

Tsukada H, Nishiyama S, Kakiuchi T, Ohba H, Sato K, Harada N, Nakanishi S. 1999b. Isoflurane anesthesia enhances the inhibitory effects of cocaine and GBR12909 on dopamine transporter: PET studies in combination with microdialysis in the monkey brain. *Brain Res.* 849: 85-96.

Tsukada H, Nishiyama S, Kakiuchi T, Ohba H, Sato K, Harada N. 1999a. Is synaptic dopamine concentration the exclusive factor which alters the in vivo binding of [¹¹C]raclopride?: PET studies combined with microdialysis in conscious monkeys. *Brain Res* 841: 160-169.

Tsukada H, Sato K, Kakiuchi T, Nishiyama S. 2000c. Age-related impairment of coupling mechanism between neuronal activation and functional cerebral blood flow response was restored by cholinesterase inhibition: PET study with microdialysis in the awake monkey brain. *Brain Res* 857: 158-164.

Tsukada T, Miyasato K, Kakiuchi T, Nishiyama S, Harada N, Domino EF. 2002b. Comparative effects of methamphetamine and nicotine on the striatal [¹¹C]raclopride binding in unanesthetized monkeys. *Synapse* 45: 207-212.

Tsukada T. 2002a. Animal PET for brain research - from receptor binding to second messenger system -, in: M. Senda, Y. Kimura, and P. Herscovitch (Eds), *Brain Imaging Using PET*, Academic Press, San Diego, pp. 201-206.

Tu Z, Efange SM, Xu J, Li S, Jones LA, Parsons SM, Mach RH. 2009. Synthesis and in vitro and in vivo evaluation of ¹⁸F-labeled positron emission tomography (PET) ligands for imaging the vesicular acetylcholine transporter. *J Med Chem* 52: 1358-1369.

Turchi J, Saunders RC, Mishkin M. 2005. Effects of cholinergic deafferentation of the rhinal cortex on visual recognition memory in monkeys. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 2158-2161.

Tzavara ET, Bymaster FP, Felder CC, Wade M, Gomeza J, Wess J, McKinzie DL, Nomikos GG. 2003. Dysregulated hippocampal acetylcholine neurotransmission and impaired cognition in M₂, M₄ and M₂/M₄ muscarinic receptor knockout mice. *Mol Psychiatry* 8: 673-679.

Vannucchi MG, Scali C, Kopf SR, Pepeu G, Casamenti F. 1997. Selective muscarinic antagonists differentially affect in vivo acetylcholine release and memory performances of young and aged rats. *Neuroscience* 79: 837-846.

Volkow ND, Fowler JS, Gatley SJ, Logan J, Wang GJ, Ding YS, Dewey S. 1996. PET evaluation of the dopamine system of the human brain. *J Nuc Med* 37: 1242-1256.

Vora MM, Finn RD, Boothe TE. 1983. [N-methyl-¹¹C]scopolamine: Synthesis and distribution in rat brain. *J Labelled Compd Radiopharm* 20: 1229-1234.

Voytko M, Mach RH, Gage HD, Ehrenkaufer RL, Efange SM, Tobin JR. 2001. Cholinergic activity of aged rhesus monkeys revealed by positron emission tomography. *Synapse* 39: 95-100.

Wagster MV, Whitehouse PJ, Walker LC, Kellar KJ, Price DL. 1990. Laminar organization and age-related loss of cholinergic receptors in temporal neocortex of rhesus monkey. *J Neurosci* 10: 2879-2885.

Wall SJ, Yasuda RP, Hory F, Flagg S, Martin BM, Ginns, EI, Wolfe BB. 1991. Production of antisera selective

for m1 muscarinic receptors using fusion proteins: distribution of m1 receptors in rat brain. *Mol Pharmacol* 39: 643-649.

Warren NM, Piggott MA, Perry EK, Burn DJ. 2005. Cholinergic systems in progressive supranuclear palsy. *Brain* 128: 239-249.

Wastek GJ, Yamamura HI. 1978. Biochemical characterization of the muscarinic cholinergic receptor in human brain: alterations in Huntington's disease. *Mol Pharmacol* 14: 768-780.

Watanabe M, Okada H, Shimizu K, Omura T, Yoshikawa E, Kosugi T, Mori S, Yamashita T. 1997. A high resolution animal PET scanner using compact PS-PMT detectors. *IEEE Trans Nucl Sci* 44: 1277-1282.

Waterhouse RN. 2003. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. *Mol Imaging Biol* 5: 376-389.

Weihe E, Tao-Cheng J-H, Schafer MK-H, Erickson JD, Eiden LE. 1996. Visualization of the vesicular acetylcholine transporter in cholinergic nerve terminals and its targeting to a specific population of small synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3547-3552.

Wenk GL, Pierce DJ, Struble RG, Price DL, Cork LC. 1989. Age-related changes in multiple neurotransmitter systems in the monkey brain. *Neurobiol Aging* 10: 11-19.

Widen L, Eriksson L, Ingvar M, Parsons SM, Rogers GA, Stone-Elander S. 1992. Positron emission tomographic studies of central cholinergic nerve terminals. *Neurosci Lett* 136: 1-4.

Yamamoto S, Ohba H, Nishiyama S, Takahashi K, Tsukada H. 2010. Validation of reference tissue model of PET ligand [¹¹C](+)-3-MPB for the muscarinic cholinergic receptor in the living brain of conscious monkey. *Synapse* 65: 548-551.

Yamanishi Y, Ogura H, Kosasa T, Araki S, Sawa Y, Yamatsu K. 1990. Inhibition action of E2020, a novel acetylcholinesterase inhibitor, on cholinesterase: comparison with other inhibitors. In: Nagatsu T, editor. *Basic, Clinical, and Therapeutic Aspects of Alzheimer's and Parkinson's Disease*, Vol. 2. New York: Plenum Press. p. 409-413.

Zavitsanou K, Katsifis A, Mattner F, Huang XF. 2004. Investigation of m1/m4 muscarinic receptors in the anterior cingulate cortex in schizophrenia, bipolar disorder, and major depression disorder. *Neuropsychopharmacology* 29: 619-625.

Zubieta JK, Koeppe RA, Mulholland GK, Kuhl DE, Frey KA. 1998. Quantification of muscarinic cholinergic receptors with [¹¹C]NMPB and positron emission tomography: method development and differentiation of tracer delivery from receptor binding. *J Cereb Blood Flow Metab* 18: 619-631.

主要論文目録

Development of Novel PET Probe [^{11}C](*R,R*)HAPT and its Stereoisomer [^{11}C](*S,S*)HAPT for Vesicular Acetylcholine Transporter Imaging: A PET Study in Conscious Monkey.

Nishiyama S, Ohba H, Kobashi T, Nakamasu Y, Nakao H, Ogata T, Kitashoji T, Tsukada H.

Synapse 68;2014:283-292.

Muscarinic Receptor Occupancy and Cognitive Impairment: A PET Study with [^{11}C](+)-3-MPB and Scopolamine in Conscious Monkeys.

Yamamoto S, Nishiyama S, Kawamata M, Ohba H, Wakuda T, Takei N, Tsukada H, Domino EF.

Neuropsychopharmacology 36;2011:1455-1465.

Effects of Acute Acetylcholinesterase Inhibition on the Cerebral Cholinergic Neuronal System and Cognitive Function: Functional Imaging of the Conscious Monkey Brain Using Animal PET in Combination with Microdialysis.

Tsukada H, Nishiyama S, Fukumoto D, Ohba H, Sato K, Kakiuchi T.

Synapse 52;2004:1-10.

Age Differences in Muscarinic Cholinergic Receptors Assayed with (+)- N -[^{11}C]Methyl-3-piperidyl Benzilate in the Brains of Conscious Monkeys.

Tsukada H, Kakiuchi T, Nishiyama S, Ohba H, Sato K, Harada N, Takahashi K.

Synapse 41;2001:248-257.

Evaluation of PET Ligands (+)- N -[^{11}C]Ethyl-3-piperidyl Benzilate and (+)- N -[^{11}C]Propyl-3-piperidyl Benzilate for Muscarinic Cholinergic Receptors: A PET Study with Microdialysis in Comparison with (+)- N -[^{11}C]Methyl-3-piperidyl Benzilate in the Conscious Monkey Brain.

Nishiyama S, Tsukada H, Sato K, Kakiuchi T, Ohba H, Harada N, Takahashi K.

Synapse 40;2001: 159-169.

Evaluation of Novel PET Ligands (+)- N -[^{11}C]Methyl-3-piperidyl Benzilate ([^{11}C](+)-3-MPB) and its Stereoisomer [^{11}C](−)-3-MPB for Muscarinic Cholinergic Receptors in the Conscious Monkey Brain: A PET Study in Comparison with [^{11}C]4-MPB.

Tsukada H, Takahashi K, Miura S, Nishiyama S, Kakiuchi T, Ohba H, Sato K, Hatazawa J, Okudera T.

Synapse 39;2001: 182-192.