

《原 著》

¹²⁵I-Iomazenil (Ro 16-0154) と in vivo Autoradiography による ベンゾジアゼピン受容体イメージングの研究

小田野行男* 中島 孝** 宮下光太郎**** 高橋 直也*
 藤田 基*** 成富 博章**** 古沢 哲哉* 林 茂信***
 酒井 邦夫*

要旨 砂ネズミを対象に、中枢性ベンゾジアゼピン受容体 antagonist である ¹²⁵I-Iomazenil (Ro 16-0154) を静注して in vivo autoradiography を作成し、その経時的な分布と局在を検討した。また flumazenil (Ro 15-1788) の前投与により ¹²⁵I-Iomazenil の集積が阻害されるかどうかを検討した。¹²⁵I-Iomazenil を静注して得られる初期像は脳血流分布を表し、120 分以降の画像が、ベンゾジアゼピン受容体の分布と局在をよりよく反映すると考えられた。¹²⁵I-Iomazenil は、大脳皮質（特に IV 層と VI 層）、淡蒼球、海馬、扁桃、視床、視床下部、黒質、小脳皮質など、ベンゾジアゼピン受容体の局在する部位に著明に集積した。線条体への集積は少なかった。

¹²⁵I-Iomazenil の集積は flumazenil の前投与により阻害され、中枢性ベンゾジアゼピン受容体に特異的に結合することが証明された。¹²³I で標識した ¹²³I-Ro 16-0154 は、SPECT 用放射性リガンドとしての有用性が期待される。

(核医学 30: 761-767, 1993)

I. はじめに

細胞膜表面の受容体（レセプター）に特異的に結合するような放射性リガンドを投与して、体外からイメージングする方法をレセプター・イメージング（またはレセプター・マッピング）という¹⁾。ベンゾジアゼピン誘導体は中枢神経に作用して催眠作用や抗けいれん作用などをあらわすが、このレセプター・イメージングが、PET や SPECT によって試みられている。SPECT 用の放射性リガン

ドには、¹²³I-Iomazenil (Ro 16-0154) が用いられる。その全身分布と脳内への取り込みは Beer²⁾ が、ラットを用いた in vivo 実験によって報告している。しかしこれまで、¹²³I (または ¹²⁵I)-Iomazenil の脳内分布と局在を in vivo autoradiography を用いてその詳細を検討した報告は見られない。すなわちこの放射性リガンドを静注して得られる画像が、ベンゾジアゼピン受容体の分布に一致するかどうかの検討がまだなされていない。

そこでこの研究では、砂ネズミに ¹²⁵I で標識した Iomazenil (¹²⁵I-Ro 16-0154) を静注して in vivo autoradiogram を作成し、以下の 3 点について検討した。

(1) ¹²⁵I-Iomazenil は中枢性ベンゾジアゼピン受容体の分布と局在を反映するか。

(2) Ro 15-1788 (flumazenil) の前投与により ¹²⁵I-Iomazenil の結合は阻害されるか。

* 新潟大学医学部放射線科

** 国立療養所犀潟病院神経内科

*** 同 精神科

**** 国立循環器病センター脳血管内科

受付：5年2月4日

最終稿受付：5年5月6日

別刷請求先：新潟市旭町通1-757 (〒951)

新潟大学医学部放射線科

小田野 行 男

(3) ベンゾジアゼピン受容体イメージングのための最適撮像時間はいつか。

II. 対象と方法

実験には 65–80 g の成熟雄砂ネズミを用いた。1.5% ハロセンと 70% 笑気、30% 酸素の混合ガスによる麻酔下に砂ネズミを開腹し、大腿静脈に polyethylene tube (PE-10) を挿入して血管を確保した。平均手術時間は 15 分で、手術終了後に閉腹して plaster cast により下肢を固定した。麻酔が完全に覚醒してから 2 時間後に放射性リガンドを静注した。

1) ^{125}I -Iomazenil の静注

Iomazenil の分布と局在を in vivo 実験で検討する場合には、半減期の短い ^{123}I よりも、長半減期の ^{125}I の方が取り扱いの上で都合がよい。そこで ^{125}I -Iomazenil を用いて以下のような手順で実験を行った。

^{125}I -Iomazenil (日本メジフィジックス社より提供。specific activity 81.4 TBq/mmol) 1.85 MBq/50 μl /匹を、確保した大腿静脈のカテーテルより緩徐に静注した。注入には専用の注入器 (Hamilton 社) を用い、静注後に 20 μl の生理的食塩水にてフラッシュした。 ^{125}I -Iomazenil を静注して、5 分、60 分、120 分、180 分後の 4 つの時点で砂ネズミ (それぞれ n=3) を断頭した。速やかに全脳を摘出し、ドライ・アイスにて -50°C に冷却したイソペンタン液に入れ瞬時に凍結した。

2) Flumazenil による競合阻害実験

Iomazenil がベンゾジアゼピン受容体に特異的に結合しているかどうかを見るためには、競合試薬を投与して Iomazenil の結合が阻害されるかどうかを確認する必要がある。そこであらたに 120 分と 180 分の砂ネズミに対して、 ^{125}I -Iomazenil を静注する 15 分前に、競合試薬として非放射性の flumazenil (50 μg /50 μl /匹) をあらかじめ静注しておき、阻害実験を行った。

なお以上の実験を通じて、 ^{125}I -Iomazenil の受容体への結合は温度の影響を受けやすいことが報告されている^{9,12)}ので、RI 静注から断頭までの

間、保温器を用いて砂ネズミの体温を 37±1°C に保った。

3) Autoradiography と定量化

Autoradiography は、凍結した全脳をクライオスタット (New England 社) にて、厚さ 20 μm の冠状切片をつくり、スライドグラス上に固定し、X 線フィルム (フジ MI-NC) に曝射して作成した。露光時間には約 1.5~2 週間かけた。作成した autoradiogram は濃度計 densitometer (Konica PDA-15) を用いて解剖学的部位の濃度を測定し、autoradiography 用スケール (Autoradiographic [I-125] Micro-Scale, アマシャム・ジャパン) を用いて定量化した。その後、線条体の放射能で各領域の放射能を除することにより %Dose/mg tissue をもとめ、時間放射能曲線を作成して比較検討した。

III. 結 果

Figure 1 に対象とした砂ネズミの ^{125}I -Iomazenil 静注 5 分、60 分、120 分後における経時的な画像を示す。静注 5 分の画像 (初期像) では、大脳皮質、線条体、淡蒼球、視床、海馬、扁桃および小脳など血流の豊富な領域にび漫性の集積が見られる。60 分後の画像では、線条体の放射能が低下し、大脳皮質、扁桃、海馬、小脳皮質などの集積が明瞭になった。また白質の放射能もより低下した。120 分後の画像 (後期像) では、線条体の集積はさらに低下し、大脳皮質、扁桃、海馬などの集積がさらに明瞭になった。

Figure 2 に 180 分後の画像と、Young ら³⁾によって報告されたベンゾジアゼピン受容体分布のシーマ (一部改変) を示す。白質や線条体における放射能の低下のために 120 分後の画像よりもいっそう明瞭になった。大脳皮質 (とくに IV 層と VI 層)、淡蒼球、側坐核、扁桃、海馬、視床、視床下部、黒質、小脳皮質 (分子層) などベンゾジアゼピンの受容体分布領域に著明に集積している。また競合阻害試薬として flumazenil を投与した 180 分後の画像を Fig. 2 右に示す。上記のそれぞれの領域で ^{125}I -Iomazenil の集積がきわめて低く

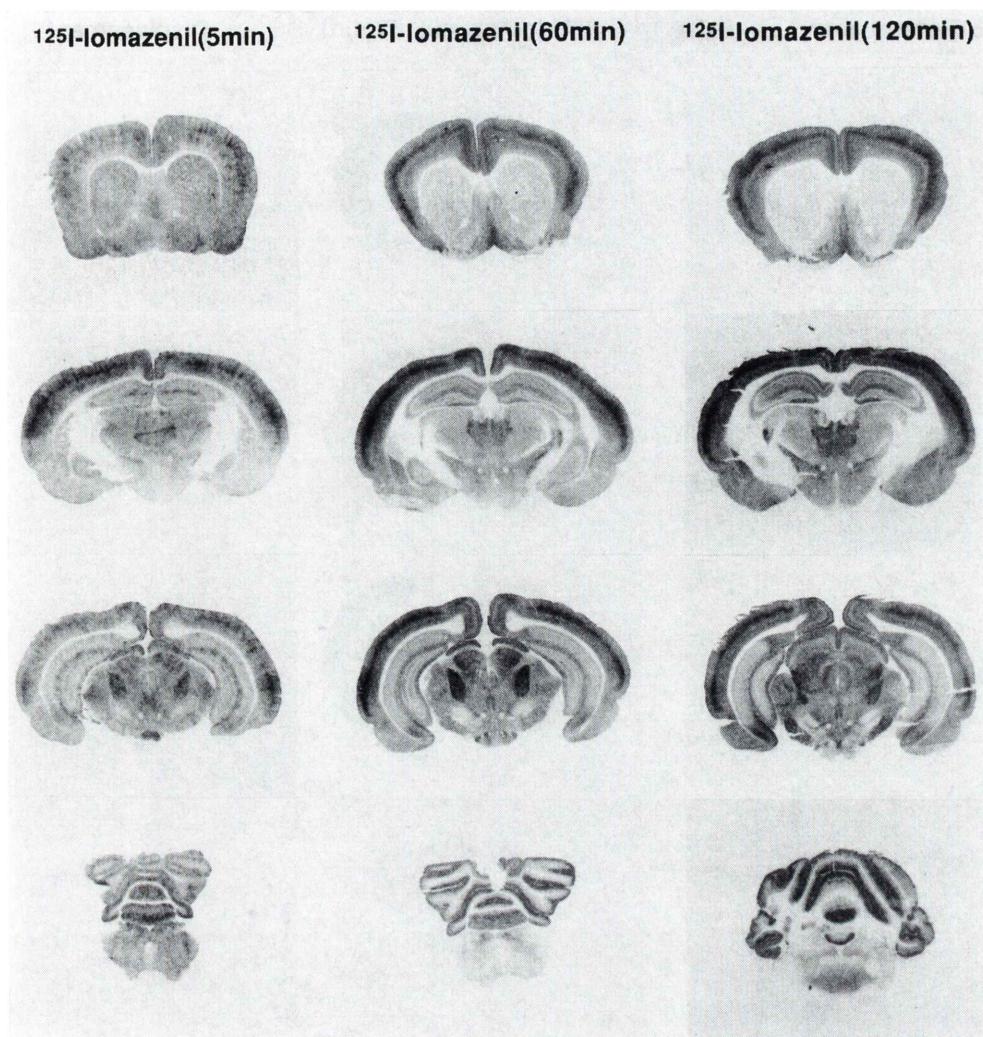


Fig. 1 Autoradiograms of gerbils at 5 min, 60 min and 120 min after i.v. administration of ^{125}I -lomazenil. Initial uptake of tracer at 5 min is similar to the distribution of rCBF. High uptake areas are observed in the cerebral cortex, amygdala, thalamus, substantia nigra and cerebellar cortex on 120 min images.

なり、flumazenil によって結合が阻害されることが示された。なお flumazenil を投与した 120 分後の画像も同様に結合が阻害された。

Figure 3 はそれぞれの領域の経時的な ^{125}I -lomazenil の放射能を線条体のそれで規準化した時間放射能曲線(平均値)である。静注 5 分では、大脳皮質、線条体、扁桃、海馬、視床および小脳における放射能は一塊となっており、ほとんど差

が見られない。静注 60 分でしだいに分離し、120 分から 180 分では、大脳皮質の放射能が最も高く、次いで黒質、扁桃、海馬の順に増加した。一方、小脳や視床の放射能は漸次低下した。

IV. 考 察

ベンゾジアゼピン誘導体は中枢神経に作用して、抗不安作用、抗けいれん作用、静穏作用、催眠作

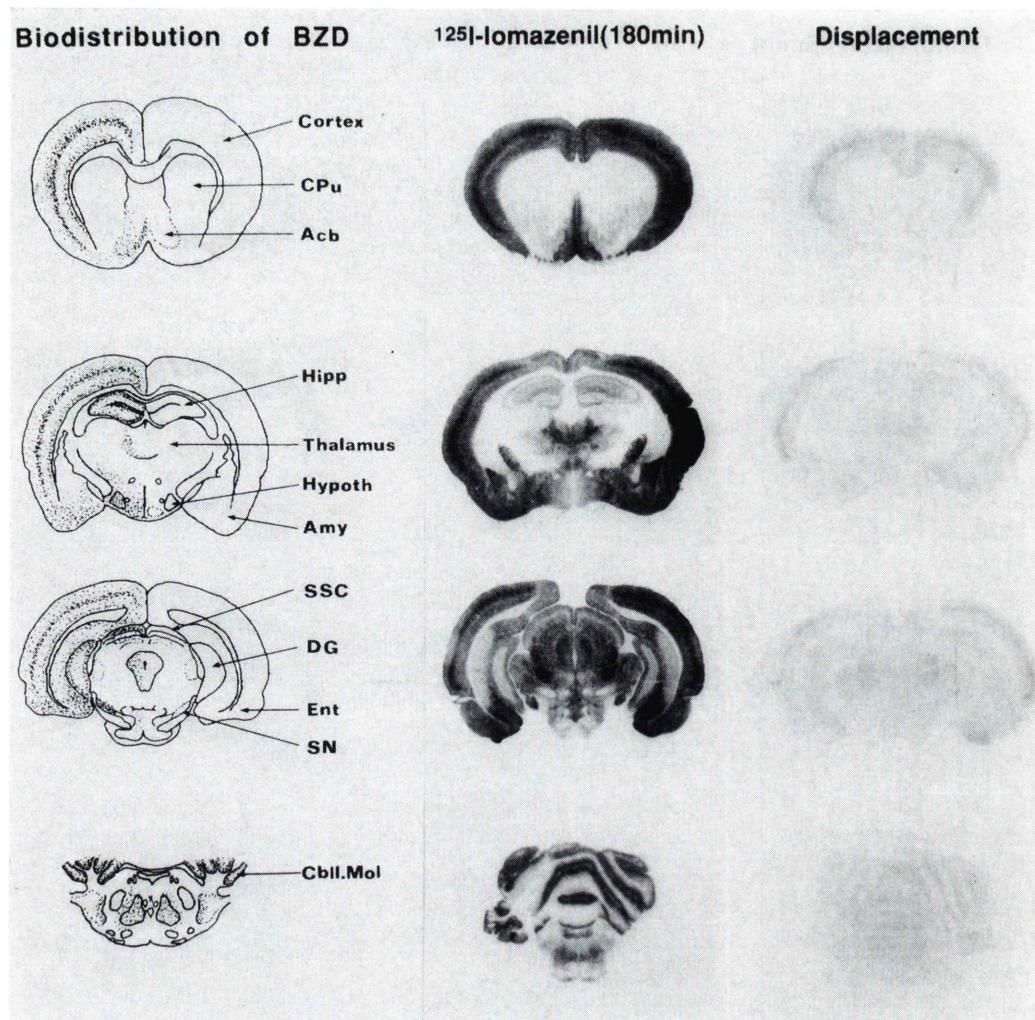


Fig. 2 Schematic mapping of benzodiazepine receptors (Left) modified from Young, W.S.: reference 3) and autoradiograms of gerbil at 180 min after injection of ^{125}I -lomazenil (Middle) and images blocked by flumazenil (Right). High activity is observed in the cerebral cortex (laminae IV and V), entorhinal cortex (Ent), accumbens nucleus (Acb), hippocampus (Hipp; especially in the molecular cell layer), dentate gyrus (DG), amygdala (Amy), thalamus (Th), hypothalamus (Hypoth), superior layer of superior colliculus (SSC), substantia nigra (SN), and molecular cell layer of cerebellum (Cbll.Mol). CPu=caudate-putamen.

用および筋弛緩作用などを示す薬剤として、臨床に広く用いられている。脳内にはベンゾジアゼピン受容体(レセプター)があり、これに選択的に結合する薬剤(放射性リガンド)を投与することにより、体外からのイメージングが可能である。こ

れまで ^{11}C -標識リガンドとPETを用いてヒト脳でのイメージングが行われ⁴⁾、肝性脳症⁵⁾、てんかん⁶⁾、Friedreich ataxia⁷⁾などの診断に応用されている。一方、SPECTによるベンゾジアゼピン受容体のイメージング薬剤には ^{123}I -lomazenil (Ro

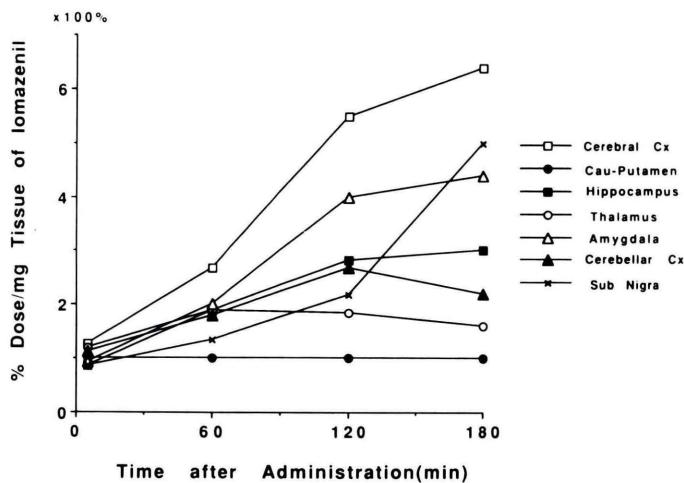


Fig. 3 Time activity curves of ¹²⁵I-Iomazenil concentration (% dose/mg tissue) in the cerebral cortex, amygdala, hippocampus, cerebellar cortex, thalamus and caudate-putamen. Radioactivity in these areas was normalized by that in the caudate-putamen. Note relative high uptake in the cerebral cortex, substantia nigra (Sub Nigra) and amygdala from 120 to 180 min, and lower concentration in the caudate-putamen.

16-0154) があり^{2,8,9)}、てんかん焦点の診断に関する報告^{10,11)}がなされている。

ベンゾジアゼピン受容体には中枢性のもの (central type) と末梢性のもの (peripheral type) がある。¹²³I-Iomazenil は中枢性のベンゾジアゼピン受容体に競合的に結合する antagonist である^{2,12)}。ラットにおけるベンゾジアゼピン受容体は、これまで in vitro autoradiography および in vitro binding assay によって、大脳皮質、扁桃、海馬、視床下部、淡蒼球、黒質、小脳皮質などに多く分布していることが報告されている^{3,13,14)}。われわれの砂ネズミの検討では、¹²⁵I-Iomazenil はこれらの領域に一致して著明に集積していた。ベンゾジアゼピン受容体の分布には種特異性があることが指摘されており³⁾、その判定には注意を要するが、¹²⁵I-Iomazenil を静注して 120 分以降に得られる画像は、おおむねベンゾジアゼピン受容体の分布画像としてよいと考えられる。

さらに、非放射性の flumazenil をあらかじめ投与しておくと、¹²⁵I-Iomazenil の結合は著しく阻害された。これは、¹²⁵I-Iomazenil が放射性リガ

ンドとしてベンゾジアゼピン受容体と特異的に結合していることを示している。

また、¹²⁵I-Iomazenil 静注 5 分後には線条体をはじめ血流の豊富な領域に放射能がみられること、および Hoell ら¹⁵⁾や Beer ら¹⁶⁾の ^{99m}Tc-HMPAO SPECT の比較データとから、早期画像は脳血流分布を反映するものと思われた。

¹²⁵I-Iomazenil の集積を経時的にみると、大脳皮質、扁桃、黒質、海馬などのベンゾジアゼピン受容体の多く存在する領域の放射能は時間とともに増加し、受容体の少ない視床や線条体では漸減した。Beer ら²⁾は、ラットを用いて ¹²³I-Iomazenil の静注直後から 60 分までの脳/血液比を求め、60 分値が最高を示したと述べている。われわれの検討でも 60 分の画像は確かにベンゾジアゼピン受容体分布に一致した画像であった。だが、静注して 60 分よりも 120 分以降の画像(後期像)の方が、線条体などの受容体の少ない領域における放射能が減少して、よりコントラストが明瞭になった。すなわち 120 分以降の画像がベンゾジアゼピン受容体の分布と局在をより正確にかつ鮮明にあらわ

すと考えられる。

以上、¹²⁵I-Iomazenil は、中枢性のベンゾジアゼピン受容体に特異的に結合すると考えられる。¹²³I で標識した ¹²³I-Iomazenil は、ベンゾジアゼピン受容体イメージングのための SPECT 用放射性リガンドとして、その有用性が期待される。

V. 結論

¹²⁵I-Iomazenil (Ro 16-0154) を砂ネズミに静注して in vivo autoradiogram を作成・検討することにより、以下のような結論を得た。

1) ¹²⁵I-Iomazenil は、大脳皮質(特に IV 層と VI 層)、淡蒼球、側坐核、海馬、扁桃、視床、視床下部、黒質、小脳皮質(分子層)など、これまでベンゾジアゼピン受容体の局在が報告されている部位に著明に集積した。

2) 120 分以降の画像が、ベンゾジアゼピン受容体の分布と局在をよりよく反映した。

3) ¹²⁵I-Iomazenil の集積は flumazenil の静注投与によって阻害され、ベンゾジアゼピン受容体に特異的に結合することが示された。

4) ¹²⁵I-Iomazenil を静注してえられる初期像は、脳血流分布を反映すると考えられた。

本研究の遂行にあたり、多大なご助力を賜った新潟大学医療技術短期大学部診療放射線技術学科 栢森 亮医学博士、金山 勝三助教授、ならびに日本メジフィジックス株式会社に、深く感謝の意を表する。

文献

- 1) 小田野行男：脳の神経伝達物質受容体のイメージング——PET と SPECT における理論と実際——。臨床放射線 **37**: 533-543, 1992
- 2) Beer HF, Blauenstein PA, Hasler PH, Delaloye B, Riccabona G, Bangerl I, et al: In vivo and in vitro evaluation of iodine-123-Ro 16-0154: A new imaging agent for SPECT investigations of benzodiazepine receptors. J Nucl Med **31**: 1007-1014, 1990
- 3) Young WS, Kuhar MJ: Radiohistochemical localization of benzodiazepine receptors in rat brain. J Pharmacol Exp Ther **212**: 337-346, 1980
- 4) Shinotoh H, Yamasaki T, Inoue O, Itoh T, Suzuki K, Hashimoto K, et al: Visualization of specific binding sites of benzodiazepine in human brain. J Nucl Med **27**: 1593-1599, 1986
- 5) Samson Y, Bernau J, Pappata S, Chavoix C, Baron JC, Maziere MA: Cerebral uptake of benzodiazepine measured by positron emission tomography in hepatic encephalopathy. New Engl J Med **316**: 414-415, 1987
- 6) Savic I, Persson A, Roland P, Pauli S, Sedvall G, Widen L: In-vivo demonstration of reduced benzodiazepine receptor binding in human epileptic foci. Lancet **15** (Oct): 863-866, 1988
- 7) Chavoix C, Samson Y, Pappata S, Prenant C, Maziere M, Seck A, et al: Positron emission tomography study of brain benzodiazepine receptors in Friedreich's ataxia. Can J Neurol Sci **17**: 404-409, 1990
- 8) McBride BJ, Baldwin RM, Kerr JM, Wu J-L: A simple method for the preparation of ¹²³I and ¹²⁵I labeled iodobenzodiazepines. Appl Radiat Isot **42**: 173-175, 1991
- 9) Innis R, Zoghbi S, Johnson E, Woods S, Al-Tikriti M, Baldwin R, et al: SPECT imaging of the benzodiazepine receptor in non-human primate brain with [¹²³I]Ro 16-0154. Eur J Pharmacol **193**: 249-252, 1991
- 10) Huffelen AC, Isselt JW, Veelen CWM, Rijk PP, Bentum AME, Dive D, et al: Identification of the side of the epileptic focus with ¹²³I-Iomazenil SPECT. Acta Neurochir Suppl **50**: 95-99, 1990
- 11) Bartenstein P, Ludolph A, Schober O, Lottes G, Scheidhauer K, Sciuk J, et al: Benzodiazepine receptors and cerebral blood flow in partial epilepsy. Eur J Nucl Med **18**: 111-118, 1991
- 12) Johnson EW, Woods SW, Zoghbi S, McBride BJ, Baldwin RM, Innis RB: Receptor binding characterization of benzodiazepine radioligand ¹²⁵I-Ro 16-0154: potential probe for SPECT brain imaging. Life Sci **47**: 1535-1546, 1990
- 13) d'Argy R, Person A, Sedvall G: A quantitative cerebral and whole body autoradiographic study of a intravenously administrated benzodiazepine antagonist ³H-Ro 15-1788 in mice. Psychopharmacol **92**: 8-13, 1987
- 14) Mohler H, Okada P: Benzodiazepine receptor: demonstration in the central nervous system. Science **198**: 849-851, 1977
- 15) Hoell K, Deisenhammer E, Dauth J, Loeffler W, Carmann H, Schubiger A: SPECT mapping of human brain benzodiazepine receptors. J Nucl Med **29**: 759, 1988
- 16) Beer HF, Blauenstein PA, Hasler PH, Schubiger PA, Deisenhammer E, Delaloye, et al: First studies in humans with an I-123 labelled benzodiazepine, A receptor binding tracer. Eur J Nucl Med **14**: 251, 1988

Summary

In Vivo Autoradiographic Benzodiazepine Receptor Imaging with ^{125}I -Iomazenil (Ro 16-0154)

Ikuro ODANO*, Takashi NAKAJIMA**, Kohtaroh MIYASHITA****,
Naoya TAKAHASHI*, Motoi FUJITA***, Hiroaki NARITOMI****,
Tetsuya FURUSAWA*, Shigenobu HAYASHI*** and Kunio SAKAI*

*Department of Radiology, Niigata University School of Medicine

**Department of Neurology, National Saigata Hospital

***Department of Psychiatry, National Saigata Hospital

****Department of Neurovascular, National Cardiovascular Center

The biodistribution of ^{125}I -Iomazenil (Ro 16-0154), a benzodiazepine receptor antagonist, was examined using in vivo autoradiography of gerbil brain. ^{125}I -Iomazenil was administrated i.v. into male gerbils, and autoradiography was prepared from coronary sections of the animals decapitated at 5, 60, 120 and 180 min after injection. Initial uptake images (5 min) of ^{125}I -Iomazenil were thought to show blood flow distribution. On the images obtained 120–180 min after administration, high activity of ^{125}I -Iomazenil was observed in the cerebral cortex, amygdala, hippocampus, globus

pallidus, thalamus, hypothalamus, superior colliculus, substantia nigra and cerebellar cortex in the areas of which benzodiazepine receptor concentration was reported to be high. However, low activity was observed in the caudate-putamen. Accumulation of ^{125}I -Iomazenil was blocked by pre-administration of flumazenil. ^{123}I -Ro 16-0154 has a high potentiality for benzodiazepine receptor mapping by SPECT.

Key words: ^{125}I -Iomazenil (Ro 16-0154), Benzodiazepine receptor, Receptor mapping, Autoradiography.