

《技術報告》

[¹²⁵I]IBZM のラット線条体への集積性および 非標識リガンドの影響

石川 演美* 中村 俊彦** 泉二奈緒美*** 佐藤 始広*
武田 徹* 呉 勁* 重松 昭世***

要旨 ドーパミン D₂ レセプターに高い親和性と特異性を持つ [¹²⁵I]IBZM を合成、標識し、ラットに投与して線条体への集積をイメージングプレートによるオートラジオグラフィを用いて経時的に検討した。 [¹²⁵I]IBZM は血液脳関門を通過して広く脳内に分布したが、線条体以外の部位からは速やかに洗い出され、線条体に高い集積が認められた。 [¹²⁵I]IBZM 投与後の 6 時間までの線条体／大脳皮質集積比の回帰式は直線で、線条体および大脳皮質からの洗い出しはそれぞれ一定と考えられた。 [¹²⁵I]IBZM 投与の 2 時間前に非標識リガンド (2 mg/kg) にて前処置した群では 48.8% の集積阻害が認められた。 また 15 日前より投薬し、4 日前より休止した群では集積亢進の傾向があったが有意の差は見られなかった。 放射性ヨード標識された IBZM は線条体の機能状態や向神経薬の効果を評価する手段になると考えられた。

(核医学 32: 81-86, 1995)

I. はじめに

生体における脳の活動性の評価は局所脳血流 SPECT が開発されて以来、脳血管障害、痴呆、変性疾患などについて多数の臨床検討が行われて多くの知見が得られた。 さらに最近では、従来 PET にて行われてきた研究に基づいて神経レセプターの SPECT によるイメージングも可能となり、すでにベンゾジアゼピンやドーパミンについては臨床研究も報告され、神経伝達物質の動向に基づいた神経活動状態が次第に明らかにされつつある¹⁻³⁾。 これらのうち、放射性ヨードで標識されたヨードベンズアミド (IBZM) はドーパミン D₂

受容体に対する特異性に優れており、親和性も高く、向神経薬による結合阻害を示すなど優れたドーパミン D₂ レセプターイメージング剤のひとつとして注視されている。 われわれはこのヨード標識 IBZM の線条体集積性および非標識ベンズアミド (BZM) による影響についてラットを用いて基礎的検討を行った。

II. 材料と方法

1. [¹²⁵I]IBZM の準備

(S)-(-)-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidiny)methyl]-2-hydroxy-6-methoxybenzamide (BZM) はすでに報告されている方法に準じて 2-aminomethyl-1-ethylpyrrolide および 2,6-dimethoxybenzoic acid を出発物質として合成した^{4,5)}。 最終標品は黄色粘稠な液体で、光学的旋光度計および NMR にて旋光度および構造を確認した。 高速液体クロマトグラフィ (HPLC) では 1 ピークを呈し、経日変化を認めず、安定した物質であった。 HPLC のカラムは

* 筑波大学臨床医学系 ** 筑波大学医科学修士
*** 生体科学研究所
受付：6 年 6 月 23 日
最終稿受付：6 年 10 月 25 日
別刷請求先：茨城県つくば市天王台 1-1-1 (☎ 305)
筑波大学臨床医学系

石川 演美

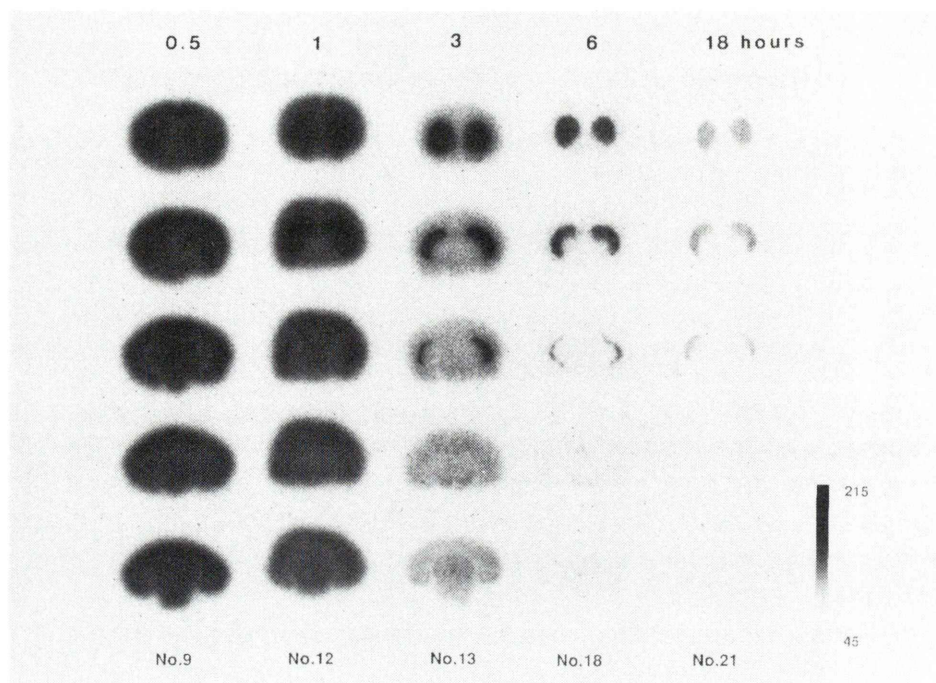


Fig. 1 Autoradiograms of the coronal sections at the five levels of the rat brain were obtained at 0.5, 1, 3, 6, and 18 hours postinjection of ^{125}I -iodobenzamide.

Table 1 In vivo binding PSL ratio of striatum-to-cortex

Group	Time (hour)	N	In vivo binding PSL ratio striatum/cortex
A	0.5	3	2.12 ± 0.59
	1	3	3.19 ± 0.25
	3	3	$7.44 \pm 1.55^*$
	6	3	14.36 ± 1.67
	18	3	(26.14 ± 13.59)
B	3	3	8.40 ± 0.59
C	3	3	3.84 ± 0.96

(mean \pm s.d.)

(PSL: photo-stimulated luminescence)

(group: see the legend of Fig. 3)

Waters C18 カラム (8 mm \times 15 cm), 移動相にはアセトニトリル:pH 7.0 燐酸バッファー=70:30を用いた。 ^{125}I 標識は過酸化水素法にて行い, HPLCにて標識化合物と遊離のヨードおよび非標識 BZM との分離を行った。放射化学的収率

85.6%, 比放射能 13.2 MBq/ μg (358 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)であった。標識化合物 [^{125}I]IBZM には燐酸緩衝液を加え, 品質保存のため酸化防止剤を少量添加した。

2. 脳線条体集積性の検討

[^{125}I]IBZM の脳線条体への集積性および非標識 BZM の影響を検討するため, 体重 230–260 g, 6 週齢の SD 系ラットを使用して検討した。ラットは A 群; 無処置で経時的に集積を観察する群, B 群; 非標識 BZM を [^{125}I]IBZM 投与の 4, 10, 15 日前に 2 mg/kg の非標識 BZM を投与し機能的耐性を期待した群, および C 群; [^{125}I]IBZM 投与の 2 時間前に同量の非標識 BZM を静脈内に投与した結合阻害群, の 3 群に分けた。各群にはそれぞれ 3 匹ずつのラットを使用した。

方法はラットの尾静脈より [^{125}I]IBZM (2.96 MBq (80 μCi)/0.04 ml/head) を投与後, 経時的に屠殺して脳を摘出し, 速やかに凍結した。A 群では [^{125}I]IBZM 投与の 0.5, 1, 3, 6, 18 時間後に, B 群および C 群では 3 時間後に屠殺した。摘出したラッ

S/C ratio

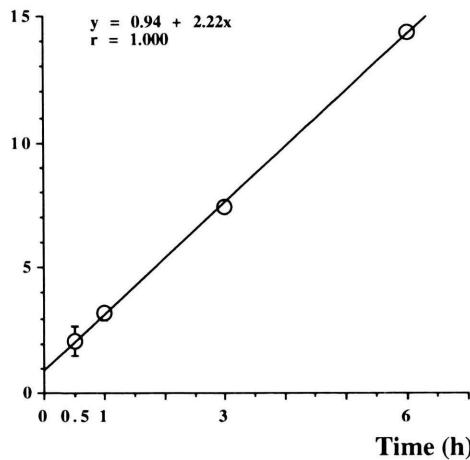


Fig. 2 Regression curve generated from the averaged striatum-to-cortex ratio between 0.5-hour and 6-hour. The striatum-to-cortex ratio increased markedly with time.

S/C ratio

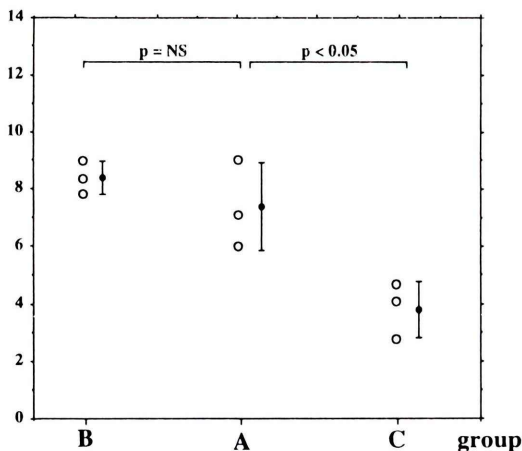


Fig. 3 Comparison of the striatum-to-cortex ratio in the rat brain 3-hour after administration of ¹²⁵I-iodobenzamide. group A: non-treated rats, group B: pretreated rats with cold benzamide (2 mg/kg) 4, 10 and 15 days before intravenous injection of the radioligand, group C: pretreated rats with cold benzamide (2 mg/kg) at 2 hours prior to administration of the radioligand.

ラジオグラフィ (ARG)を行い、富士フィルム社製 BAS2000 にて画像処理した。

線条体集積性の評価は線条体と前頭葉に矩形の関心領域 (ROI) を設定して、大脳皮質の PSL (photo-stimulated luminescence) に対する左右線条体の単位面積当たりの平均 PSL の比 (S/C 比) で検討した。単位面積は 1 mm² である。

III. 結 果

無処置で線条体への集積を経時的に観察した A 群において、[¹²⁵I]IBZM は速やかに血液脳関門を通過して脳全体に分布したが、時間経過とともに大脳皮質の集積は減少し、高密度にドーパミン D₂ レセプターが存在する線条体の集積が明らかとなった。集積分布は線条体の尾状核、被殻に多く、淡蒼球にはやや少なかった。このほか一部では嗅球、黒質にも軽度の集積が認められた (Fig. 1)。大脳皮質に対する線条体集積比 (S/C 比) の平均値±標準偏差は 30 分後 2.12±0.59, 1 時間後 3.19±0.25, 3 時間後 7.44±1.55 で、観察した 18 時間まで S/C 比はさらに著明になった。18 時間像では大脳皮質の集積は僅少で、大脳の輪郭を認めることができなかった。したがって大脳皮質部の計測値がきわめて小さいため、この時間における S/C 比は標準偏差が大きく、信頼できる結果にはならなかった。この 18 時間値を除いた S/C 比の時間毎平均値の回帰直線式は $y = 2.22x + 0.94$ ($r = 1$) となり、良好な直線関係を認めた (Table 1, Fig. 2)。

B 群の 3 時間後の S/C 比は 8.40±0.59 で対照群の S/C 比 (7.44±1.55) に比べ集積亢進の傾向がみられたが、t 検定にて有意の差は証明されなかった。これに対し、C 群の 3 時間後の S/C 比は 3.84±0.96 で、平均 48.4% の明らかな結合阻害が証明された ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

IV. 考 察

IBZM には光学異性体が存在し、(S)-(-)-IBZM のみがドーパミン D₂ レセプターに高い特異性を示し、親和性も強く、セロトニン S₂ レセプター

ト脳は前頭部より 5 スライスの冠状断とし、イメージングプレート法 (IP 法) で 2 時間のオート

との結合を示さず、優れたドーパミンレセプター・イメージング剤である⁴⁻⁶⁾。この放射性ヨード標識には過酢酸法が高い放射化学的収率、高い放射化学純度および室温で反応時間も短時間で可能であるため、最良の方法とされているが、薬品の取り扱いがやや困難である。本研究の標識には過酸化水素法が用いられたが、反応温度を 100°C、反応時間を 30 分にした場合はほぼ同等の放射化学収率、放射化学純度でヨード標識が可能である⁷⁾。しかし今回得られた標識化合物はやや不安定で、標識 10 日後には 80% の解離が認められ、保存法の改善が必要と考えられた⁸⁾。

ラット脳のドーパミン D₂ レセプターの分布に関しては [¹²⁵I]ヨードスルピリドを用いた詳細な研究がなされている⁹⁾。これによるとドーパミン D₂ レセプターの大多数は尾状核にあるが、そのほか被殻、黒質、嗅球に証明されている。しかし選択されるラジオリガンドによって集積部位にはすこしずつ差異が見られている¹⁰⁾。IBZM は大脳皮質や小脳においては非特異的結合を示さず、セロトニンレセプター S₂ との結合もないとされている。本研究では計測を目的として IP 法による ARG を行ったため形態的観察は十分ではない。IP 法はフィルム法に比し露光時間を著しく短縮でき、放射線量計測の信頼性も高いため、最近では ARG の主流となっている¹¹⁾。ドーパミン D₂ レセプターの定量的検討には使用されるラジオリガンドの種類、投与量、投与後の測定時間によって変化し、また臨床的には被検者の年齢、性別などによる差異も認められている^{2,12)}。現在、臨床および動物実験における脳内ドーパミン D₂ レセプター定量には特異的結合のすくない小脳、後頭葉または前頭葉皮質を対照部位として線条体の集積比で半定量的評価法が用いられている。Singhaniyom らはラットにおいて大脳皮質の集積に対する線条体の集積比をフィルム法とマイクロ濃度計を用いて測定し、30 分値で 3.95 と比較的高い集積を認めている。著者らの S/C 比 30 分値はこれに比し低かったが、これは計測方法の差異による可能性が考えられる¹¹⁾。また *exo vivo* 法による検討

では 60 分値で平均値 2.19 とする報告も見られている⁸⁾。また脳内に取り込まれた IBZM は線条体および大脳皮質からそれぞれ一定速度で洗い出しされるとされているが、今回の S/C 比-時間回帰直線式はそれを支持するひとつの所見と考えられる。しかし IBZM 投与初期においては線条体と大脳皮質とでは集積のピーク時間に差異があるため、健常人に [¹²⁵I]IBZM を投与し、ダイナミック SPECT を行った臨床研究にて Seibyl らは数十分後に特異的結合のピークを観察している。ラットにおいても IBZM 投与 60 分後に特異的結合のピークがあるとされており、60 分前後が半定量測定に適当な時間と考えられる⁸⁾。

非標識リガンドにより [¹²⁵I]IBZM の線条体集積がいかに変化するかを観察するため、ふたつの方法でモデルを作成した。まず、非標識 BZM で [¹²⁵I]IBZM 投与の 2 時間前に前処置し、薬剤性結合阻害を試みた C 群では平均 48.4% の高度の集積阻害を認めた。これは [¹²⁵I]IBZM によって線条体レセプター密度の評価の可能性を示唆していると考えられる。しかしイメージングのみではこの集積減少を視覚的に指摘するのは困難であった。また用いた非標識 BZM の薬効については十分には解明されていないため、用法、用量についてハロペリドールなど既知の薬剤と比較するなど、さらに検討が必要である。すでに Brücke らは臨床例において S/C 比と向神経薬依存性との相関を認めており、今後はさらに詳しく検討されると考えられる²⁾。

またドーパミンレセプターの薬剤耐性をみるために [¹²⁵I]IBZM 投与の 15 日前より非標識 BZM にて処置した B 群では、線条体の集積亢進の傾向を認めた。t-検定にて有意差は証明されなかったが、前処置の期間が短かったためと考えられた。使用する薬剤、投与期間、動物種、投与方法などの点についてさらに検討の余地があるが、IP 法を用いた ARG はこれらの機能的耐性についても高い感度で検出可能な測定法であると考えられた。

V. 結 語

1. S-(-)- $[^{125}\text{I}]\text{IBZM}$ のラット線条体への集積性について検討した。

2. IBZM は血液脳関門を速やかに通過し、脳内に広く分布したが、時間経過とともに非または低結合部から洗い出され、線条体のみに高く集積した。

3. 非標識 BZM にて有意の結合障害が認められ、ドーパミン D_2 レセプター密度測定の可能性が示唆された。

4. 長期、断続的に非標識 BZM を投与した群では集積亢進の傾向が見られたが、今回の方法では有意差が認められなかった。

文 献

- 1) Abi-Dargham A, Laruelle M, Seibyl J, Rattner Z, Baldwin RM, Zoghbi SS, et al: SPECT measurement of benzodiazepine receptors in human brain with iodine-123-iomazenil: kinetics and equilibrium paradigms. *J Nucl Med* **35**: 228–238, 1994
- 2) Brücke T, Podreka I, Angelberger P, Wenger S, Topitz A, Küfferle B, Müller Ch, et al: Dopamine D_2 receptor imaging with SPECT: studies in different neuropsychiatric disorders. *J Cereb Blood Flow Metab* **11**: 220–228, 1991
- 3) Kuhl DE, Koeppe RA, Fessler JA, Minoshima S, Ackermann RJ, Carey JE, et al: In vivo mapping of cholinergic neurons in the human brain using SPECT and IBVM. *J Nucl Med* **35**: 405–410, 1994
- 4) de Paulis T, Kumar Y, Johansson L, Råmsby S, Florvall L, Hall H, et al: Potential neuroleptic agents. 3. chemistry and antidopaminergic properties of substituted 6-methoxysalicylamides. *J Med Chem* **28**: 1263–1269, 1985
- 5) Kung HF, Kasliwal R, Pan S, Kung M-P, Mach RH, Guo Yu-Zhi: Dopamine D_2 receptor imaging radiopharmaceuticals: synthesis, radiolabeling, and in vitro binding of (R)-(+)- and (S)-(-)-3-iodo-2-hydroxy-N-[(1-ethyl-2-pyrrolidinyl)methyl]benzamide. *J Med Chem* **31**: 1039–1043, 1988
- 6) Singhaniyom W, Tsai YF, Brücke T, McLellan CA, Cohen RM, Kung HF, et al: Blockade of in vivo binding of I-125-labeled 3-iodobenzamide (IBZM) to dopamine receptors by D_2 antagonist and agonist. *Brain Research* **453**: 393–396, 1988
- 7) Kung M-P, Kung HF: Peracetic acid as a superior oxidant for preparation of $[^{125}\text{I}]\text{IBZM}$: a potential dopamine D_2 receptor imaging agent. *J Labeled Compd Radiopharm* **27**: 513–519, 1989
- 8) 松村 要, 外山 宏, 中島弘道, 市瀬正則, 倉見美規, 中川 毅, 他: SPECT によるドーパミン D_2 受容体画像化, 定量化のための I-125-IBZM の合成とラット脳内動態. *核医学* **31**: 513–519, 1994
- 9) Bouthenet ML, Martres MP, Sales N, Schwartz JC: A detailed mapping of dopamine D_2 receptors in rat central nervous system by autoradiography with I-125-iodosulpiride. *Neuroscience* **20**: 117–155, 1987
- 10) Welch MJ, Kilbourn MR, Mathias CJ, Mintun MA, Raichle ME: Comparison in animal models of F-18-spiroperidol and F-18-haloperidol: potential agents for imaging the dopamine receptor. *Life Science* **33**: 1687–1693, 1989
- 11) Miyahara J: Visualizing things never seen before the imaging plate: a new radiation image sensor. *Chemistry Today* Oct 1989 (no. 223): 30–36, 1989
- 12) Seibyl JP, Woods SW, Zoghbi SZ, Baldwin RM, Dey HM, et al: Dynamic SPECT imaging of dopamine D_2 receptors in human subjects with iodine-123-IBZM. *J Nucl Med* **33**: 1964–1971, 1992

Summary

A Fundamental Study on Accumulation of [125 I]IBZM in the Rat Striatum and on Effect of Non-Labeled Ligand

Nobuyoshi ISHIKAWA*, Toshihiko NAKAMURA*, Naomi MOTOJI**, Motohiro SATOU*, Tohoru TAKEDA*, Jin WU* and Akiyo SHIGEMATSU**

**Institute of Clinical Medicine, Tsukuba University*

***Institute of Whole Body Metabolism*

Iodo-125-labeled iodobenzamide ([125 I]IBZM) is used as a specific binding radioligand to dopamine D₂ receptors with high affinity and selectivity. The radioligand was homogeneously distributed in the whole brain initially after administration, and rapidly washed out from the dopamine receptor-poor area followed by persistent retention in the striatum. Regression curve generated from striatum/cortex PSL ratio indicated the constant washout rate from striatum

and cortex respectively. In the pretreated rat by cold benzamide (2 mg/kg), the accumulation of the radioligand was significantly suppressed in the striatum (48.8%). Iodine-125-labeled iodo-benzamide has the promise for investigation of dopamine D₂ receptors in the living brain.

Key words: IBZM, Dopamine receptor, Imaging plate, Autoradiography.