

## 《原 著》

神経情報伝達系イメージング剤： $^{11}\text{C}$  標識ジアシルグリセロール

——院内産生放射性薬剤としての品質および安全性——

藤井 亮*	今堀 良夫**	井戸 達雄***	脇田 員男*
堀井 均*	柳生 武彦*	東 伸郎*	馬淵非砂夫*
大森 義男**	上田 聖**	金綱 隆弘*	

**要旨** 神経情報伝達系イメージング剤として開発された  $^{11}\text{C}$  標識ジアシルグリセロール：1-[1- $^{11}\text{C}$ ]butyryl-2-palmitoyl-rac-glycerol ( $^{11}\text{C}$ -DAG) のポジトロン CT (PET) による臨床応用を行うため、院内産生放射性薬剤としての品質および安全性について検討を行った。結果、 $^{11}\text{C}$ -DAG は注射剤としての製剤化の行程を含め 50 分以内で合成を行うことができた。半減期およびガンマ線のエネルギー測定では、 $^{11}\text{C}$  の物理的性質と一致しており他の異核種の混入は認められなかった。 $^{11}\text{C}$ -DAG の注射剤としての品質検査では、連続して 3 回の合成実験を行い、無菌試験および発熱性物質試験においてすべて陰性であった。ウイスターラットを用いた急性毒性試験では、ラットの状態および各臓器の異常は全く見られず、非放射性の DAG (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) の同時投与においても異常は認められなかった。以上の結果から、 $^{11}\text{C}$ -DAG の院内産生放射性薬剤としての安全性が確認され、今後の PET での臨床応用により、アルツハイマー病等の高次脳機能障害の新たな病態解明に期待がもたれる。

(核医学 32: 191-198, 1995)

## I. はじめに

ジアシルグリセロール (DAG) は、神経情報伝達系において細胞外からのシグナルを細胞内へ伝達する際、セカンドメッセンジャーとして重要な役割を担っている (Fig. 1)。神経細胞では、刺激等にもないシナプス前膜より種々の情報伝達物質が放出され、それらはシナプス後膜の受容体と結合することにより G 蛋白を介してホスホリパー

ゼ C (PL-C) を活性化する。活性化された PL-C は、機能リン脂質であるホスファチジルイノシトールリン酸 (PIPs) からイノシトールリン酸 (IPs) と DAG の 2 つのセカンドメッセンジャーを産生する。IPs は、小胞体の膜に存在する受容体と結合することによって小胞体よりカルシウムを引き出し、細胞内のカルシウム濃度を高める働きをする。一方 DAG は、蛋白質リン酸化酵素 C (PK-C) を活性化することにより種々の機能発現を行うとともに<sup>1-5)</sup>、DAG キナーゼによりリン酸化され再び PIPs として細胞膜に戻ることが知られている (PI 代謝回転)。 $^{11}\text{C}$  標識ジアシルグリセロール：1-[1- $^{11}\text{C}$ ]butyryl-2-palmitoyl-rac-glycerol ( $^{11}\text{C}$ -DAG) は内在性 DAG と同様の挙動を示し、細胞膜内で速やかに DAG キナーゼによるリン酸化過程を経て細胞膜に蓄積される<sup>6,7)</sup>。この“membrane trapping mechanism”の概念に基づき、

\* 西陣病院

\*\* 京都府立医科大学脳神経外科

\*\*\* 東北大学サイクロトロン・RI センター

受付：6 年 8 月 24 日

最終稿受付：6 年 12 月 5 日

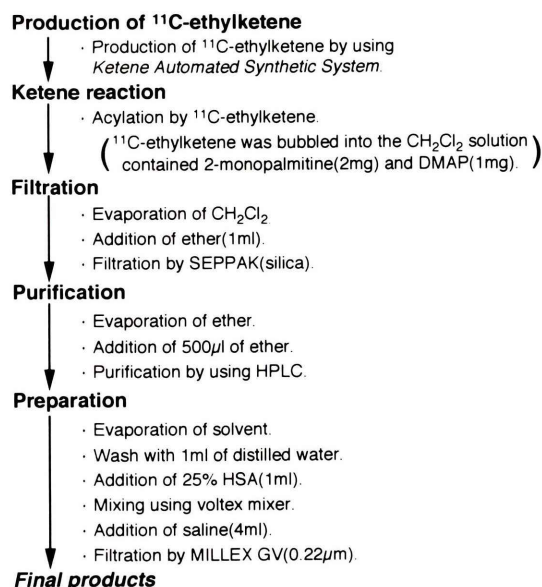
別刷請求先：京都市上京区五辻六軒町

西入ル溝前町 1035 (☎ 602)

西陣病院放射線科 サイクロトロン室

藤 井 亮



Fig. 2 Synthesis procedure of  $^{11}\text{C}$ -DAG.

## 2. 半減期測定

RI キャリブレーター (CRC12, CAPINTEC) により、試料一定量について経時的に放射能を測定した。

## 3. エネルギー測定

マルチチャンネルアナライザー (Series 20, CAMBELLA) および NaI(Tl) シンチレータ (2 m/2, BICRON) により構成されたガンマ線スペクトロメータを、 $^{137}\text{Cs}$  および  $^{60}\text{Co}$  によりエネルギー校正を行い、試料一定量についてガンマ線スペクトルを測定した。

## 4. 放射化学的純度測定

radio-HPLC 法により試験を行った。測定条件は、カラムに Zorbax SIL ( $\phi 4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$ , DuPont) を用い、ヘキサン/イソプロピルアルコール (95 : 5 v/v) を移動相とし、流速 1.2 ml/min でカラム温度は室温で行った。

## 5. 比放射能測定

HPLC 法により紫外吸光測定器 (SPD-6AV, 島津) を検出器とし、1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol (SIGMA) 標準液について UV 吸収特性を測定して最適な UV 波長を決定した後、検量線を作成し

た。次に、一定量の  $^{11}\text{C}$ -DAG について同様な試験を行い、検量線より求めた  $^{11}\text{C}$ -DAG 中に含まれる非放射性 DAG の量と放射能から比放射能を算出した。

## 6. pH 試験

pH 試験紙 (D-5160, MACHEREY-NAGEL) により測定を行った (読み取り精度 : 0.5)。

## 7. 発熱性物質試験

トキシノメーター (2p-201, Wako) を用いてエンドトキシン試験法により行い、0.01 ng/ml を基準値として陰性/陽性の判定を行った。HSA に溶解した状態での検査は HSA がゲル化するため困難なことから、HSA を加える前段階で洗浄に使用した注射用蒸留水について検査を行った。

## 8. 無菌試験

TGC (Thioglycollate) 培地を用い、 $^{11}\text{C}$ -DAG 水溶液を 1 ml 加え 37°C で 2 週間培養後、陽性/陰性の判定を行った。

## 9. 急性毒性試験

ウィスターラット (230 g) を用いて、 $^{11}\text{C}$ -DAG 投与直後から 24 時間ラットの状態を観察した後開腹し、各臓器の異常の有無を調べた (n=3)。また、50  $\mu\text{mol/kg}$  (n=4) および 100  $\mu\text{mol/kg}$  (n=4) の非放射性 DAG を  $^{11}\text{C}$ -DAG と同時投与し、同様にラットの状態異常の有無を調べた。

## 10. 被曝線量の推定

ウィスターラット (230 g; 雄 (n=2), 雌 (n=2)) を用いて、 $^{11}\text{C}$ -DAG 投与後 1 分、5 分、10 分、20 分、60 分について体内分布を測定し、これらのデータをもとに山口らが開発した Medical International Dose Estimation System (MIDES)<sup>(10)</sup> を用いて被曝線量を算出した。

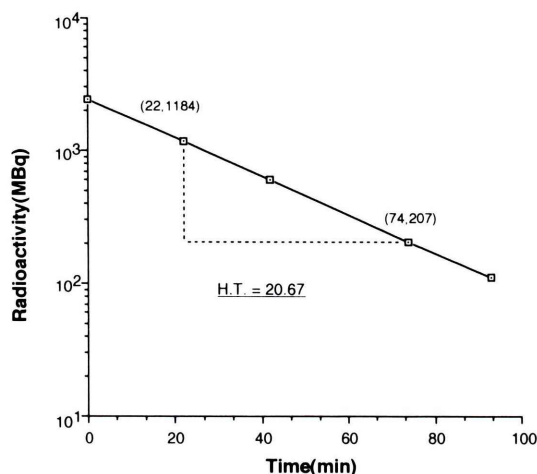
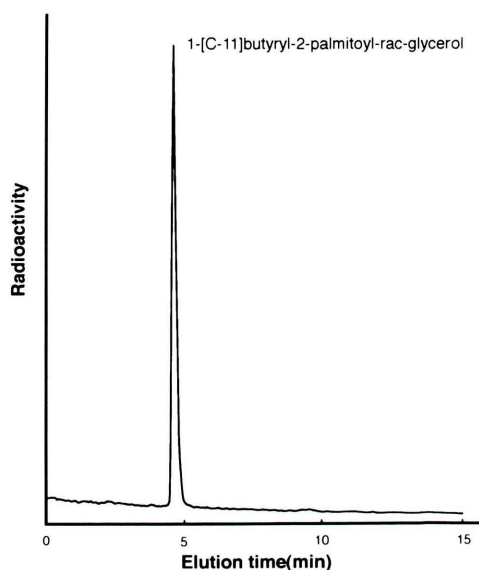
## III. 結 果

$^{11}\text{C}$ -DAG の合成結果および品質検査結果を Table 1 に示す。

1. 照射終了時から  $^{11}\text{C}$ -ethylketene の生成まで約 20 分、 $^{11}\text{C}$ -DAG の分離精製に約 15 分、さらに静注製剤化に 10 分要し、全体で約 45 分で  $^{11}\text{C}$ -DAG の注射剤が得られた。放射化学的収率はケ

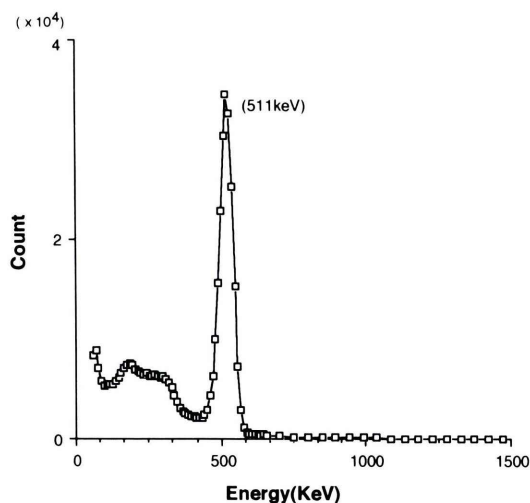
**Table 1** Synthesis and quality check of  $^{11}\text{C}$  labeled diacylglycerol

Hot run No.	Synthesis time (min)	Yield		Purity (%)	Specific activity ( $\text{GBq}/\mu\text{mol}$ )	pH	Bacteria detection (+/-)	Pyrogen test (+/-)
		EOS (MBq)	(%)					
1	43	888	21.1	>98	181	6~7	(-)	(-)
2	45	1088	29.4	>98	272	6~7	(-)	(-)
3	41	770	21.9	>98	233	6~7	(-)	(-)
average	43	915	24.1	>98	229	6~7	all negative	all negative

**Fig. 3** Physical half life time of  $^{11}\text{C}$ -DAG.**Fig. 5** HPLC pattern of  $^{11}\text{C}$ -DAG.

HPLC conditions:

Column ..... Zorbax SIL ( $\phi 4.6 \times 250$  mm)  
 Eluent ..... Hexane/IPA (95/5 v/v)  
 Flow rate ..... 1.8 ml/min  
 Column temp. .... room temperature

**Fig. 4** Gamma-ray spectrum of  $^{11}\text{C}$ -DAG.

テン反応終了後の放射エネルギーに対して約 24% で、純度は 98% 以上であった。

2. 半減期測定の結果を Fig. 3 に示す。この測定結果から得られた本核種の半減期は 20.67 分であった。また、20 分後の放射能残存率は 51.1% であり、指針に示された基準範囲内であった。

3. エネルギー測定の結果を Fig. 4 に示す。この結果より 511 keV にエネルギーピークを認め、他のピークは認められなかった。



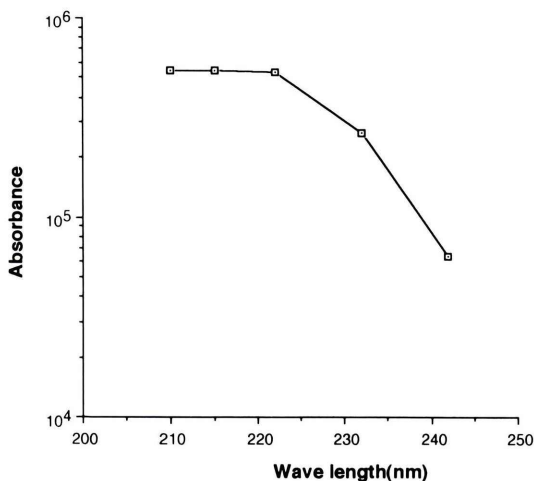


Fig. 6 UV absorption curve of DAG.

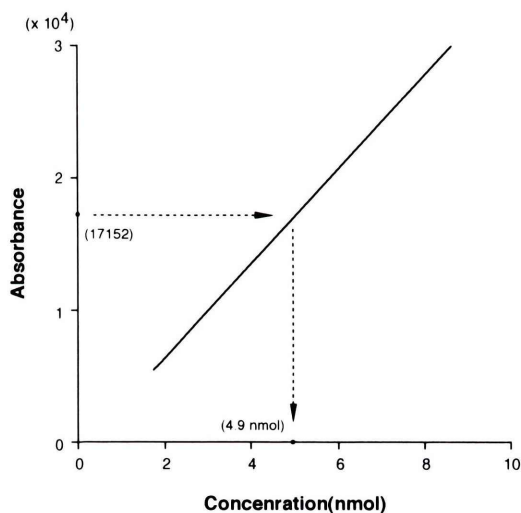


Fig. 7 Calibration curve.

4. radio-HPLC 法による  $^{11}\text{C}$ -DAG の分析結果を Fig. 5 に示す。この結果より放射化学的純度は 98% 以上であった。

5. 1,2-dipalmitoyl-rac-glycerol による UV 特性曲線を Fig. 6 に示す。波長が 220 nm 以上では徐々に感度が低下し、210 nm 以下ではベースラインが不安定で分離能が悪くなることから、それぞれの影響を最も受けにくい波長としてその中間値：215 nm を選択し、再現性も認められた。検量線および 1 回目の合成時の  $^{11}\text{C}$ -DAG の紫外吸

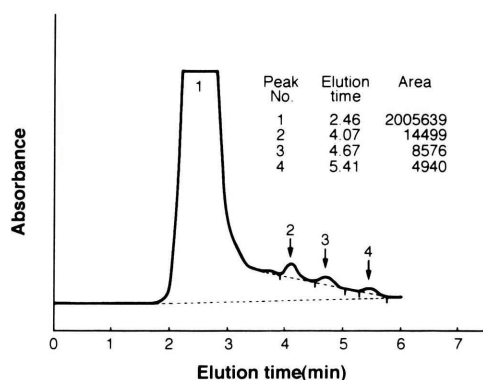


Fig. 8 UV absorbance spectrum of  $^{11}\text{C}$ -DAG.

Carbon-11 labeled DAG was analyzed by UV-VIS photometric detector (SPD-6AV, Shimadzu). The  $^{11}\text{C}$ -DAG (888 MBq) was dissolved in 200  $\mu\text{l}$  of hexane/ether solvent, and the 100  $\mu\text{l}$  was analyzed (wavelength: 215 nm). The peak number 1 is the solvent front. The peak number 2 and 4 are detected as an impurity of solvent. The peak number 3 shows the DAG fraction. In this case, the specific activity was 181 GBq/ $\mu\text{mol}$ .

光測定器による測定結果を Fig. 7, Fig. 8 にそれぞれ示す。Fig. 8 におけるピーク 1 は、溶媒先端であり、ピーク 2 および 4 は分析時における  $^{11}\text{C}$ -DAG を再溶解した際の溶媒中の不純物で、これらは溶媒を変えることにより検出されなかった。したがって、化学的純度は 95% 以上であった。これらの結果から比放射能は 181 GBq/ $\mu\text{mol}$  (4.9 Ci/ $\mu\text{mol}$ ) であった。また、3 回の合成での平均の比放射能は 229 GBq/ $\mu\text{mol}$  (6.2 Ci/ $\mu\text{mol}$ ) であった。

6. pH は 6~7 の範囲内であった。

7. 発熱性物質試験では 3 回とも陰性であった。

8. 無菌試験については 3 回とも陰性であった。

9. 急性毒性試験では、 $^{11}\text{C}$ -DAG 投与後ラットに呼吸、脈拍等の生命徴候に関する変化はみられなかった。24 時間後に開腹し各臓器の異常の有無を調べた結果、点状出血等の所見はみられず、また血液の凝固異常もみられなかった。非放射性の 1-butyl-2-palmitoyl-rac-glycerol を同時投与したラットにおいても上記の異常はみられなかった。

10.  $^{11}\text{C}$ -DAG を投与後、1 分、5 分、10 分、20 分、

**Table 2** Tissue distribution of  $^{11}\text{C}$  labeled diacylglycerol

Organ	Time after I.V. injection				
	1 min	5 min	10 min	20 min	60 min
Brain	0.31 $\pm$ 0.14	0.51 $\pm$ 0.08	0.36 $\pm$ 0.02	0.30 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.04
Heart	1.90 $\pm$ 0.54	1.11 $\pm$ 0.46	0.46 $\pm$ 0.01	0.28 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.04
Lung	5.64 $\pm$ 2.02	1.48 $\pm$ 0.23	1.22 $\pm$ 0.29	0.95 $\pm$ 0.18	0.24 $\pm$ 0.13
Kidney	1.76 $\pm$ 0.25	0.97 $\pm$ 0.20	0.82 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.03
Liver	2.21 $\pm$ 0.39	2.30 $\pm$ 0.63	1.75 $\pm$ 0.71	1.06 $\pm$ 0.41	0.32 $\pm$ 0.20
Pancreas	0.51 $\pm$ 0.37	0.75 $\pm$ 0.23	0.68 $\pm$ 0.08	0.18 $\pm$ 0.10	0.34 $\pm$ 0.20
Spleen	1.19 $\pm$ 0.33	1.70 $\pm$ 0.04	1.72 $\pm$ 0.07	1.20 $\pm$ 0.22	0.23 $\pm$ 0.14
Blood	1.43 $\pm$ 0.59	0.57 $\pm$ 0.20	0.37 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.03	0.21 $\pm$ 0.03

Carbon-11 labeled diacylglycerol was injected through the rat tail vein. The rats were killed at various time intervals. The regional uptake was expressed as the %dose/g. The data was presented as average  $\pm$  s.d. (male:n=2, female:n=2).

**Table 3** Estimation of radiation absorbed dose

Organ	$\mu\text{Gy/MBq(mrad/mCi)}$	Organ	$\mu\text{Gy/MBq(mrad/mCi)}$
Brain	4.2(15.4)	ULI-wall*	1.6(6.0)
Thyroid	2.6(9.9)	LLI-wall*	1.3(4.9)
Lung	7.2(26.7)	Spleen	6.3(23.3)
Kidney	3.8(14.0)	Pancreas	2.4(8.7)
Liver	7.5(27.7)	Testes	2.2(8.0)
STM-wall*	1.7(6.1)	Bladder	1.4(5.0)
SI-wall*	1.5(5.6)	Red marrow	1.2(4.6)
Adrenal	2.9(10.9)	Total body	3.3(12.2)

\*STM-wall:Stomach wall; SI-wall:Small intestine wall; ULI-wall:Upper large intestine wall; LLI-wall:Lower large intestine wall.

60 分における体内分布の測定結果および各臓器の被曝線量評価を Table 2, Table 3 にそれぞれ示す。静注直後は肺、腎臓、肝臓で  $^{11}\text{C}$ -DAG の高い集積が認められたが、比較的早い時期に組織中から排出された。

#### IV. 考 察

$^{11}\text{C}$ -DAG は内在性の DAG と構造上アシル基の長さおよび -sn- と -rac- の違いを有する。しかし、1 位のアシル基が短いため若干脂溶性が低下することから、脳内への非特異的な取り込みが少なくなり、結果的に  $^{11}\text{C}$ -DAG の取り込みの差がより鮮明な画像情報が得られる。また、2 位のアシル基は二重結合を有していないことから血漿板活性化等の悪影響がなく、臨床応用において安全性を有する<sup>11)</sup>。

$^{11}\text{C}$ -DAG は内因性 DAG と同様にリン酸化を受

けて細胞膜にトラップされ、しかも比放射能が高いことから再び PL-C により加水分解される確率は低い。また、PI 代謝回転の動きを反映した細胞膜への蓄積パターンを示すことから、神経の活動状態を把握し得る薬剤である。したがって、 $^{11}\text{C}$ -DAG による PET 検査を行うことにより脳血管障害やアルツハイマー病等の痴呆に伴うシナプス膜の機能的変化、すなわち神経情報伝達系の変化を捉えることが可能であり、シナプス応答からみた高次脳機能障害の病態解析に有用である。 $^{11}\text{C}$ -DAG の合成は、ケテン法を用いることにより製剤化を含め 3 半減期以内で合成が行え、収量も臨床利用に十分な量を安定して供給できるようになった<sup>12-18)</sup>。半減期測定およびガンマ線のエネルギー測定からこの核種は  $^{11}\text{C}$  であることが確認され、しかも異核種の混入は認められなかった。

新規ポジトロン標識薬剤を臨床に用いる場合、

最も重要なのはその安全性である。<sup>11</sup>C-DAG の合成に使用する器具はすべて 220°C で 40 分間乾熱滅菌したものを使用し、HPLC による分離精製段階において 0.2 μm のフィルター (MILLEX FG, MILLIPORE) を通しており、さらに最終段階で同様に 0.22 μm のフィルター (MILLEX GV, MILLIPORE) を通して除菌を行っている。この結果、連続 3 回の合成において発熱性物質試験および無菌試験はすべて陰性で、急性毒性試験でも投与後 24 時間で異常は全く認められなかった。臨床応用において 370 MBq の <sup>11</sup>C-DAG を投与した場合、3 回の比放射能の平均値: 229 GBq/μmol から 1.62 nmol の非放射性 DAG が含まれていることになり、50 kg の成人では 32 pmol/kg になる。この値は急性毒性試験に用いた非放射性 DAG (100 μmol/kg) の  $3 \times 10^{-7}$  以下であることから、<sup>11</sup>C-DAG の急性毒性に対する安全性は百万倍以上である。被曝線量は Table 3 に示す通りである。これらのことから、<sup>11</sup>C-DAG の院内産生放射性薬剤としての品質および安全性において、臨床利用するうえで問題ないことが示された。

<sup>11</sup>C-DAG は、<sup>11</sup>C 標識前駆体である <sup>11</sup>C-ethylketene を用いたケテン法の開発から “membrane trapping mechanism” の概念およびその解析法に至るまで、すべて独自の方法により開発された薬剤である。したがって、その品質および安全性には特に注意をはらった。<sup>11</sup>C-DAG は、神経情報伝達系の活動状態を把握できる今までにない新しい薬剤であり、今後インビボにおける PET での画像解析により、高次脳機能障害の新たな病態解明に期待がもたれる。

謝辞：被曝線量の推定に関しご指導いただきました放医研：山口寛先生に深謝いたします。

## 文 献

- Berridge MJ: Inositol trisphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem J* **220**: 345–360, 1984
- Berridge MJ, Irvine RF: Inositol phosphates and cell signaling. *Nature* **341**: 197–205, 1989
- Kikkawa U, Takai Y, Tanaka T, Miyake R, Nishizuka Y: Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* **258**: 11442–11445, 1983
- Nishizuka Y: The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* **308**: 693–698, 1984
- Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305–312, 1986
- Imahori Y, Fujii R, Ueda S, Matsumoto K, Wakita K, Ido T, et al: Membrane trapping of carbon-11-labeled 1,2-diacylglycerol as a basic concept for assessing phosphatidyl inositol turnover in neurotransmission process. *J Nucl Med* **33**: 413–422, 1992
- Imahori Y, Fujii R, Ueda S, Ohmori Y, Wakita K, Matsumoto K: Phosphoinositide turnover imaging linked to muscarinic cholinergic receptor in the central nervous system by positron emission tomography. *J Nucl Med* **34**: 1543–1551, 1993
- 日本アイソトープ協会医学薬学部会・サイクロترون核医学利用専門委員会：院内サイクロترون放射性薬剤に関する指針. *Radioisotopes* **34**: No. 11, 1984
- 藤井 亮, 今堀良夫, 井戸達雄, 脇田員男, 堀井均, 柳生武彦, 他: 神経情報伝達系イメージング剤：<sup>11</sup>C 標識ジアシルグリセロール——可溶化剤の体内分布に与える影響および被曝線量の推定——. *核医学* **31**: 1503–1510, 1994
- 山口 寛, 西沢かな枝, 丸山隆司, 千葉美津恵, 福久健二郎, 橋詰 雅: 日本人の MIRD 表の作表プログラム. *保健物理* **18**: 43–48, 1983
- Lapetina EG, Reep B, Ganong BR, Bell RM: Exogenous sn-1,2-diacylglycerols containing saturated fatty acids function as bioregulators of protein kinase C in human platelets. *J Biol Chem* **260**: 1358–1361, 1985
- Imahori Y, Fujii R, Ido T, Hirakawa K, Nakahashi H: Positron labeled phorbol ester: synthesis method for “non-carrier added” phorbol 13-[1-<sup>11</sup>C]butyrate using ketene reaction. *J Labelled Compd Radiopharm* **27**: 1025–1034, 1989
- Fujii R, Imahori Y, Ido T, Yagyu T, Horii H, Wakita K, et al: New synthesis system of (C-11)propyl ketene and its reactions with various alcohols. *J Labelled Compd Radiopharm* **29**: 497–505, 1991
- Imahori Y, Fujii R, Ueda S, Ido T, Nishino H, Moriyama Y, et al: No-carrier-added carbon-11-labeled sn-1,2- and sn-1,3-diacylglycerols by [<sup>11</sup>C]propyl ketene method. *J Nucl Med* **32**: 1622–1626, 1991
- Imahori Y, Fujii R, Ueda S: Letters to the Editor; Incorrect naming of a carbon-11-labeled reagent. *J Nucl Med* **33**: 465–466, 1992
- Ohmori Y, Imahori Y, Ueda S, Fujii R, Ido T, Wakita



- K, et al: Protein kinase C imaging using carbon-11-labeled phorbol esters: 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate-20-[1-<sup>11</sup>C]butyrate as the potential ligand for positron emission tomography. *J Nucl Med* **34**: 431-439, 1993
- 17) Fujii R, Imahori Y, Sugawara T, Ido T, Yagyu T, Higashi N, et al: Automated synthetic system of C-11 labeled ethylketene. *J Labelled Compd Radiopharm* **35**: 555-557, 1994
- 18) Fujii R, Imahori Y, Ueda S, Wakita K, Ohmori Y, Higashi N, et al: Synthesis of C-11 labeled ceramide by ketene method. *J Labelled Compd Radiopharm* **35**: 284-286, 1994

## Summary

### Carbon-11 Labeled Diacylglycerol for Signal Transduction Imaging by Positron CT: Evaluation of the Quality and Safety for Clinical Use

Ryou FUJII\*, Yoshio IMAHORI\*\*, Tatsuo IDO\*\*\*, Kazuo WAKITA\*, Hitoshi HORII\*, Takehiko YAGYU\*, Noburo HIGASHI\*, Hisao MABUCHI\*, Yoshio OHMORI\*\*, Satoshi UEDA\*\* and Takahiro KANATSUNA\*

\*Nishijin Hospital

\*\*Department of Neurosurgery, Kyoto Prefectural University of Medicine

\*\*\*Cyclotron and Radioisotope Center, Tohoku University

To elucidate the synaptic transmission in the neural system, we have been developing fundamental studies for intracellular signaling. For clinical application of carbon-11 labeled diacylglycerol (1-[1-<sup>11</sup>C]butyryl-2-palmitoyl-rac-glycerol: <sup>11</sup>C-DAG) using positron emission computed tomography (PET), we evaluated the quality and the safety of <sup>11</sup>C-DAG as the solution for injection. As a result, <sup>11</sup>C-DAG was synthesized within 50 minutes, including the preparation step for injection. The half life time and energy spectrum of <sup>11</sup>C-DAG were the same as the physical character of carbon-11, and other radioisotopes were not detected. In the quality control, <sup>11</sup>C-DAG solution was negative in the examination of bacterial contamination and the

pyrogen test in three successive synthesis procedures. In the acute toxicity test by administration of <sup>11</sup>C-DAG and 100 μmol/kg of non-radioactive DAG to the rat intravenously, the systemic condition of the rat was not changed and no abnormalities were found in any organ 24 hours after administration. These findings indicated the safety of <sup>11</sup>C-DAG solution. Clinical application of <sup>11</sup>C-DAG using positron emission tomography may be useful to elucidate the dysfunction of intracellular signaling in disorders of higher cortical function such as Alzheimer disease.

**Key words:** Carbon-11 labeled diacylglycerol, Second messenger, Positron emission CT, Membrane trapping.