

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2011年5月5日(05.05.2011)



(10) 国際公開番号

WO 2011/052760 A1

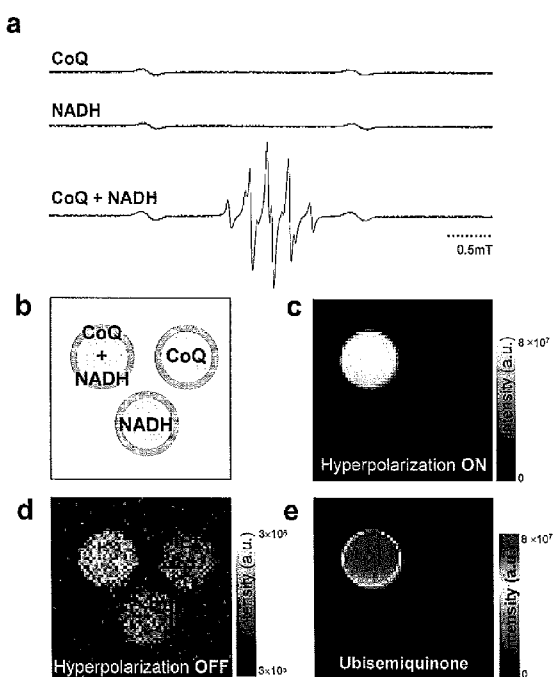
- (51) 国際特許分類:  
A61B 5/055 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/069386
- (22) 国際出願日: 2010年10月29日(29.10.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
61/256,059 2009年10月29日(29.10.2009) US
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 国立大学法人九州大学 (Kyushu University, National University Corporation) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 Fukuoka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 内海英雄 (UTSUMI, Hideo) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 兵藤文紀 (HYODO, Fuminori) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 市川和洋 (ICHIKAWA, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒8128581 福岡県福岡市東区箱崎六丁目10番1号 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).
- (74) 代理人: 矢口太郎, 外 (YAGUCHI, Taro et al.); 〒1020082 東京都千代田区一番町2-2-1 一番町セントラルビル8階 恵泉国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア

[続葉有]

(54) Title: METHOD FOR DETECTING ENDOGENOUS BIOMOLECULE

(54) 発明の名称: 生体内因性分子の検出方法

[図4]



(57) Abstract: Provided is a method for the real-time visualization of an endogenous biomolecule to clarify the mechanisms of various diseases and enable diagnosis and treatment of these diseases. Specifically provided is a novel method for visualizing an endogenous biomolecule by using a magnetic resonance method (including Overhauser MRI and the electron spin resonance method). The aforesaid visualization method, whereby an endogenous biomolecule is visualized on a real-time basis, comprises: a step for treating a living organism to be examined by a magnetic resonance method and thus acquiring data of the endogenous biomolecule; a step for processing the data of the endogenous biomolecule thus obtained to give imaging data; and a step for displaying the imaging data thus obtained.

(57) 要約: 【課題】 様々な疾病においてそのメカニズムの解明や診断・治療を可能とするために、生体内因性分子をリアルタイムで視覚化する方法を提供する。【解決手段】 本発明は磁気共鳴法(オーバーハウザーMRIや電子スピン共鳴法を含む)を用いて生体内因性分子を視覚化する新規方法を提供する。すなわち、本発明の画像化方法は、生体内因性分子をリアルタイムで画像化するための方法であって、測定対象となる生体に磁気共鳴法を適用して生体内因性分子の情報を得る工程と; 前記得られた生体内因性分子の情報を処理して画像化情報を得る工程と; 前記得られた画像化情報を表示する工程と、を含む。

WO 2011/052760 A1

(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ 添付公開書類:  
(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG) — 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

## 明 細 書

### 発明の名称：生体内因性分子の検出方法

#### 技術分野

[0001] 本発明は、生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応をリアルタイムで検出する方法に関し、より詳細には、オーバーハウザーMRI法又は電子スピン共鳴（EPR）法を用いた生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応の検出方法に関する。

#### 背景技術

[0002] ユビキノン（CoQ）、ビタミンK、アスコルビン酸又はフラビンアデニンジヌクレオチド（flavin adenine dinucleotide、FAD）等のラジカル中間体を形成する、すなわちフリーラジカルを有する生体内因性分子（物質）は、生体内で恒常性の維持（ホメオスタシス）のため重要な役割を担っている。特にユビキノンはすべての細胞が持つミトコンドリアの内膜や原核生物の細胞膜に存在する電子伝達体の1つであり、ミトコンドリア機能の保持に深く関与する。このため、ユビキノンは細胞内のミトコンドリア機能の改善、抗酸化効果、抗アルドステロン効果が期待され心機能補助役等としても用いられている。

[0003] ユビキノンはミトコンドリア呼吸鎖I～IIIにおいてQサイクルと呼ばれる電子の授受に関わる分子であり、電子伝達系において呼吸鎖複合体IとIIIの電子を仲介し、その代謝過程でセミキノンフリーラジカルを生成する。このようなフリーラジカルは生体レドックス反応に関係する。生体レドックス反応とは、酸化還元反応を介した生理機能発現及びそれに伴う活性種産生、産生された活性種と生体分子との代謝・反応の全体を表す概念であり、多くの生理現象やがん・糖尿病をはじめとする生体レドックス疾患に密接に関与することが示唆されている。

[0004] 従って、ユビキノン等の生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応の挙動、状態を直接視覚化する方法があれば、様々な疾病において、生体内因性分

子の情報から病気のメカニズム解明や診断・治療が可能となると考えられる。

[0005] このような生体内の画像化をおこなう方法としては、従来よりX線CTやPET CT、磁気共鳴(MRI)等があり、空間情報の画像化を行う形態画像化が主として行われてきたが、近年は形態画像化に加え、生体内の機能・現象を可視化する、機能画像化が行われるようになってきた。

[0006] 例えば、摘出臓器から調製した溶液中に生成するフリーラジカルを電子スピン共鳴法等で計測し、そのスペクトル波形・強度変化から機能解析をした例がある。この方法は、試験管レベルでの解析はできるものの、疾病に生体内物質がいつ、どこで、どのように関与するかを知ることはできなかった。

[0007] また、生体内の酸化還元反応を検出・解析する方法としては、合成ニトロキシルラジカル化合物をプローブとして体内に投与し、当該化合物の酸化還元反応を指標に検出・解析する方法が知られている。しかし、この方法では、生体内の酸化還元反応を合成ニトロキシルラジカル化合物の反応を指標に検出・解析することができるが、生体内分子の酸化・還元反応を直接的に検出・解析しているわけではなかった。

## 先行技術文献

### 非特許文献

[0008] 特許文献1: Non-invasive monitoring of redox status in mice with dextran sodiumsulphate-induced colitis. Yasukawa K, Miyakawa R, Yao T, Tsuneyoshi M, Utsumi H. Free Radic Res. 2009 May;43(5):505-13.

非特許文献2: In vivo detection of free radicals induced by diethylnitrosamine in rat liver tissue. Yamada K, Yamamiya I, Utsumi H. Free Radic Biol Med. 2006 Jun 1;40(11):2040-6.

非特許文献3: Application of in vivo ESR spectroscopy to measurement of cerebrovascular ROS generation in stroke. Yamato M, Egashira T, Utsumi H. Free Radic Biol Med. 2003 Dec 15;35(12):1619-31.

## 発明の概要

## 発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明は、前述の問題を解決し、様々な疾病においてそのメカニズムの解明や診断・治療を可能とするために、生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応をリアルタイムで視覚化する方法を提供することをその課題とする。

## 課題を解決するための手段

- [0010] 具体的には、本発明は磁気共鳴法（オーバーハウザーMRI（OMRI）や電子スピン共鳴法を含む）を用いて生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応を視覚化する新規検出方法を提供する。すなわち、本発明の検出方法は、生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応をリアルタイムで検出するための方法であって、測定対象となる生体に磁気共鳴法を適用して生体内因性分子の情報を得る工程と；前記得られた生体内因性分子の情報を処理して画像化情報を得る工程と；前記得られた画像化情報を表示する工程と、を含むものである。

- [0011] また、本発明の検出方法において用いる前記磁気共鳴法としては、OMRI法または電子スピン共鳴法等を挙げることができる。これらの磁気共鳴法を用いることで、より正確な計測画像を得ることができる。

- [0012] また、本発明の検出方法の画像化対象となる前記生体内因性分子としては、例えばユビキノン、ビタミンK、アスコルビン酸又はFADを挙げることができる。さらに、本発明において、フリーラジカルを有する生体内因性物質であれば画像化の対象となりうる。これらの生体内因性分子を画像化できるということは、様々な疾病においてそれらの分子が関与する生体機能を直接描写しそのメカニズムの解明や診断・治療を可能とするという観点から重要である。

- [0013] さらに、本発明の検出方法の対象となる生体内因性分子は、生体外から生体内に取り込まれるものであってもよい。

## 発明の効果

- [0014] 本発明の検出方法によって生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応をリアルタイムで画像化することができるようになり、生体内因性分子であるユ

ビキノ由来のセミキノラジカルのオーバーハウザーMRIを用いた画像化を世界で初めて実現した。特にユビキノに関しては、ユビセミキノラジカルを内因性のプローブ（造影剤）としてマウス直腸内より投与した場合、時間と共にユビセミキノラジカルが減少することを示した。一方、溶液の状態ではユビセミキノラジカルは安定であったことから、投与したユビセミキノラジカルは生体内反応を経て消失したことが明らかとなった。

[0015] また、塞性動脈硬化症の動物モデルであるマウス下肢虚血モデルにユビセミキノンをプローブとして応用した場合、対称肢（正常側）に比べユビセミキノンの消失が有意に抑制されたことから本プローブが病態をモニターできることを示した。

[0016] これらの結果より、本法は生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応を直接視覚化するだけでなく、生体内因性分子そのものも視覚化できる可能性が示唆された。また内因性物質であるユビキノンを造影剤として活用するので、造影剤の毒性という観点からも劇的な改善が期待される。

[0017] さらに、本発明の検出方法を用いてFADセミキノラジカルのOMRI画像を得ることに成功した。FADは生体内の様々な臓器において電子伝達体として活用されていることから、FADを生体プローブとして活用することで生体内因性分子を用いたレドックス可視化への応用が期待できる。

### 図面の簡単な説明

[0018] [図1] 図1 aは、ユビキノンの酸化還元反応スキームを、図1 bはユビセミキノラジカルのEPRスペクトルを、図1 cはユビセミキノラジカルのDNPスペクトルを、それぞれ示す図である。

[図2] 図2 aは、ユビセミキノラジカル産生におけるユビキノンの濃度依存性を示すグラフ及び各濃度におけるユビセミキノンのEPRスペクトルを、図2 bはユビセミキノラジカル産生におけるpH依存性及びそれぞれのpHにおけるユビセミキノンのEPRスペクトルを示す図である。

[図3] 図3 a～dは、OMRIによるユビセミキノラジカルのインビトロ分子イメージングを、図3 eはEPR照射の有無による信号強度の違いを示す

図である。

[図4] 図4 aはコエンザイムQ-0 (CoQ0)、NADH及びCoQ0とNADHの混合物のEPRスペクトルを、図4 b~eはユビセミキノラジカルの分子イメージングを示す図である。

[図5] 図5 a~dは、ユビセミキノラジカルのインビボ分子イメージングを示す図を、図5 eは盲腸におけるOMRIシグナルの経時変化を示すグラフである。

[図6] 図6 aはFADのセミキノン体のOMRI画像を示す図であり、図6 bはFAD濃度とFADセミキノラジカル濃度の関係を示すグラフである。

[図7] 図7は、閉塞性動脈硬化症の動物モデルであるマウス下肢虚血モデルのユビセミキノプローブを用いた解析結果を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0019] 以下に、本発明を詳細に説明する。まず、本発明における生体内因性分子とは、生体内で恒常性の維持（ホメオスタシス）のため重要な役割を担い、ラジカル中間体を形成する分子（物質）であって、元々生体内に存在するものをいう。具体的には、ユビキノン、ビタミンK、アスコルビン酸、フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）、ビタミンB<sub>2</sub>等を挙げることができる。

[0020] これら生成されるラジカルは不対電子を有し常磁性であり、生体レドックス反応に関係する。この生体レドックス反応とは、酸化還元反応を介した生理機能発現及びそれに伴う活性種産生、産生された活性種と生体分子との代謝・反応の全体を表す概念であり、多くの生理現象やがん・糖尿病をはじめとする生体レドックス疾患に密接に関与することが示唆されている。したがって、生体レドックス状態の可視化は低侵襲的な疾患機序解析あるいは新規治療薬の開発に新しい方法論を提供しうる。

[0021] 本発明の検出方法により、前記生体内因性分子の機能画像としてのレドックス動態画像、代謝画像などの生体機能画像や、形態画像としての組織画像（<sup>13</sup>C、<sup>1</sup>H、<sup>31</sup>P核等）などのずれのない正確な計測画像を得ることがで

きる。

[0022] 本発明にいて用いる磁気共鳴法は一般的な磁気共鳴法であり、測定対象物に外部から電磁波又は振動磁場を加えると、特定の周波数に対して一種の共鳴を起こして電磁波が強く吸収される現象（磁気共鳴）を利用して、共鳴吸収の起こる周波数や吸収の波形から物質内部の電子や原子核の状態を測定する方法である。このような磁気共鳴法の具体例としては、磁気共鳴映像（MRI）法、オーバーハウザーMRI（OMRI）法、核磁気共鳴（NMR）法、電子スピン共鳴（EPR）法、等を挙げることができる。前記各種磁気共鳴法の測定条件は、それぞれの測定法に一般的に用いられる条件の範囲で適宜選択することができる。

[0023] 係る磁気共鳴法による画像化のための装置としては、例えば国際公開公報 WO 2010/110384号に開示されている装置、すなわち、「計測対象物の磁気共鳴を励起させるための磁場を発生させる磁場発生手段と、計測対象物または磁場発生手段を移動させることにより計測対象物を磁場発生手段の磁場中を移動させる移動手段と、移動手段による移動中に停止することなく、計測対象物の磁場発生手段に対する移動方向  $y$  およびこの移動方向  $y$  に対して直交する方向  $x$  のいずれか一方または両方に傾斜磁場を掛けて位相エンコードおよび周波数エンコードのいずれか一方または両方により、計測対象物中の計測画像信号を得る計測手段と、計測画像信号に対し、 $y$  方向の移動の影響を補正した補正画像信号を得る補正手段と、を有する装置」を用いることができる。

[0024] ここで、前記磁場発生手段は、所定の大きさを発生させる第1の磁場発生手段と、この第1の磁場発生手段の磁場とは異なる大きさの磁場を発生させる第2の磁場発生手段とを有するものであり、前記移動手段は、計測対象物または前記第1および第2の磁場発生手段を移動させることにより、計測対象物を第1および第2の磁場発生手段の磁場中を順に移動させるものであってもよい。

[0025] また、前記移動手段は、計測対象物または第1および第2の磁場発生手段



を回転移動させることにより、計測対象物を第1および第2の磁場発生手段の磁場中を順に通過させる回転移動手段であってもよい。

[0026] このように磁場発生手段を移動する計測対象物に適用することで生体内因性分子の情報を得ることができる。ここで、例えば、レドックス動態画像を得るためには、第1または第2の磁場発生手段の一方は核磁気共鳴を励起して計測するためのものであり、他方は電子スピン共鳴を励起して計測するためのものであってもよい。これにより、ずれのない正確な生体レドックス動態画像を得ることができる。

[0027] なお、第1および第2の磁場発生手段は、どちらが大きい磁場を発生させるものであっても良いが、第2の磁場発生手段が第1の磁場発生手段の磁場よりも大きい磁場を発生させるものである場合、例えば低磁場である第1の磁場発生手段をOMRIの電子スピン励起装置として用い、高磁場である第2の磁場発生手段をMRIおよびOMRIの外部磁場発生装置として用いることもできる。これにより、第2の磁場発生手段ではMRI画像およびOMRI画像が得られる。

[0028] 一方、第1の磁場発生手段が第2の磁場発生手段の磁場よりも大きい磁場を発生させるものである場合は、例えば高磁場である第1の磁場発生手段をMRIの外部磁場発生装置として用い、低磁場である第2の磁場発生手段をOMRIの外部磁場発生装置として用いることもできる。これにより、第1の磁場発生手段ではMRI画像が得られ、第2の磁場発生手段ではOMRI画像が得られる。

[0029] 前記得られた生体内因性分子の情報を処理して画像化情報を得る工程では、前記得られた生体内因性分子の情報（計測結果）に対し、計測対象物の移動の影響が補正されて補正画像信号が得られる。係る補正信号（画像化情報）は、計測画像信号を $S(k_x, k_y)$ 、補正画像信号（画像化情報）を $S'(k_x, k_y)$ としたとき、式

$$S'(k_x, k_y) = \exp \left[ \frac{i}{2\pi} \gamma G_y^{(n)} \left\{ \frac{v_y}{2} \Delta t_y + v_y t_{y0} \right\} \Delta t_y \right] S(k_x, k_y)$$

(但し、 $k_x$ 、 $k_y$ はx方向およびy方向の空間周波数、 $\gamma$ は磁気回転比、 $G_y^{(n)}$ はn回目の計測における位相エンコードまたは周波数エンコードの傾斜磁場強度、 $v_y$ はy方向の移動速度、 $\Delta t_{y0}$ は位相エンコードまたは周波数エンコードの印加時間、 $t_{y0}$ は位相エンコードまたは周波数エンコードの印加までの時間である。)によって得られるものであってもよい。

[0030] また、計測画像信号を $S(k_x, k_y, k_z)$ 、補正画像信号(画像化情報)を $S'(k_x, k_y, k_z)$ としたとき、式

$$S'(k_x, k_y, k_z) = \exp \left[ \frac{i}{2\pi} \gamma G_y^{(n)} \left\{ \frac{v_y}{2} \Delta t_y + v_y t_{y0} \right\} \Delta t_y \right] S(k_x, k_y, k_z)$$

(但し、 $k_x$ 、 $k_y$ 、 $k_z$ はx方向、y方向およびz方向の空間周波数、 $\gamma$ は磁気回転比、 $G_y^{(n)}$ はn回目の計測における位相エンコードまたは周波数エンコードの傾斜磁場強度、 $v_y$ はy方向の移動速度、 $\Delta t_y$ は位相エンコードまたは周波数エンコードの印加時間、 $t_{y0}$ は位相エンコードまたは周波数エンコードの印加までの時間である。)によって得られるものであってもよい。

[0031] 前記得られた画像化情報はモニター等の表示部に表示され、これにより生体内因性分子そのものや生体内因性分子が関与する反応をリアルタイムで観測することが可能となる。

[0032] 次に、本発明の効果に関して実施例を示して説明する。しかし、本発明は以下に記載された実施例に限定されるものではなく、発明の要旨を変更しない範囲で様々な変更及び修飾等されたものも本発明の範囲に含まれることは言うまでもない。

[0033] [実施例1]

#### ファントム実験

各チューブ(内径4.7mm)に、0、0.5、1、2、4、6、8mM ユビキノン水溶液(pH11.8)(図3a参照)を含む、7本のチューブからなるファントムを使用した。ユビキノン/NADHファントム実験では、両試薬はリン酸緩衝液(PBS)(pH7.4)中に溶解している。ユビ

キノン溶液（終濃度10mM）中にNADH溶液（終濃度50mM）を加え、OMRIイメージングを行った。結果を図4に示す。

[0034] EPRサイクル中における過度な出力の集中を避けるため、フィールドサイクルモードで運転する特注のヒト全身用マグネット（直径79cm、長さ125cm）（フィリップス研究所、ハンブルク）を用いてOMRIの実験を行った。EPR B0は8.1mT、NMR B0は15mTとした。マウス実験用の共鳴装置は625kHzに調整されており、帯域幅は80kHzでNMR送信サドルコイル（直径25cm、長さ23cm）、受信ソレノイドコイル（直径2.5cm、長さ60mm）からなる。また、最大送信出力は250W（ピーク）である。EPRでは、220.6MHzに調整されたサドルコイル（直径13.5cm、長さ23.5cm）とNMRコイルが使用されている。最大送信出力は100Wである。

[0035] MRI用の標準的なグラディエントエコー型シーケンスを用いて、OMRIの実験を行った。フェーズエンコーディングステップには、オーバーハウザー効果（過分極化）を引き起こすFPR飽和パルスが先行した。ある出力における600msのEPRパルスが、この実験に使用された。パルスシーケンスはB0フィールドから開始し8.1mTとし、それはEPR照射に相当した。約200msの間、EPR照射（220.6MHz）が続き、ラジオ周波数（RF）パルスと関連するフィールドグラディエントがオンになる前に、B0フィールドは15mTとなった。イメージは、そのシステムにより実行された標準ソフトウェアを使用してエコーから再構成され、DICOM形式（Digital Imaging and Communications in Medicine）で保存された。OMRIの一般的なスキャン条件は、TEPR×TR×TE=600ms×1200ms×25ms、No. of averages=1、64phase-encoding stepsである。イメージングフィールド（ファントム28mm、生体内48mm）は、64×64サイズである。

[0036] [実施例2]

### 生体内OMRIイメージング

C57BL6マウス（雌、5週齢）は、日本エスエルシー株式会社（浜松、日本）から購入し、実験前に1週間順応させた。マウスはケージ当たり5匹で、温度および概日リズムを調整した室内で、不断給水・給餌で飼育し、実験時に6～8週齢、体重は20～30gだった。全ての手順および動物の取扱いは、九州大学薬学部動物実験倫理委員会により承認されており、九州大学薬学部動物実験ガイドラインに沿って実験を行った。

[0037] マウスは、ウレタン（2g/kg）で麻酔し、胃側を下にして粘着性の皮膚用テープでホルダーに固定した。実験中のマウスの体温は $37 \pm 1^\circ\text{C}$ だった。マウスを共鳴装置に移し、OMRI測定を開始した。下腹部領域のOMRIイメージングは、pH 11.8に調整した8mMユビキノン水溶液（800 $\mu\text{L}$ ）を直腸投与し、その直後に行った。OMRIの条件は以下の通りである。TR、1200ms；TE、25ms；TEPR、600ms；number of phase-encoding gradient steps、64；NEX、4；FOV、48mm $\times$ 48mm；Matrix size、64 $\times$ 64（inplane resolution 0.75mm）；slice thickness、3.0mm；number of average、1、scanning time、79s。OMRIデータは、Image J software package (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) を使用し、解析を行った。

[0038] [実施例3]

フラビンアデニンジヌクレオチド（FAD）のOMRIによる分子イメージング

体内電子伝達体であるフラビンアデニンジヌクレオチド（flavin adenine dinucleotide、FAD）は、いくつかの代謝反応に必要な酸化還元反応の補因子である。FADH<sub>2</sub>はエネルギーキャリアであり、還元された補酵素はミトコンドリアでの酸化的リン酸化の基質として使われる。係るFADをPBS（pH 7.4）に溶解し各濃度のFAD

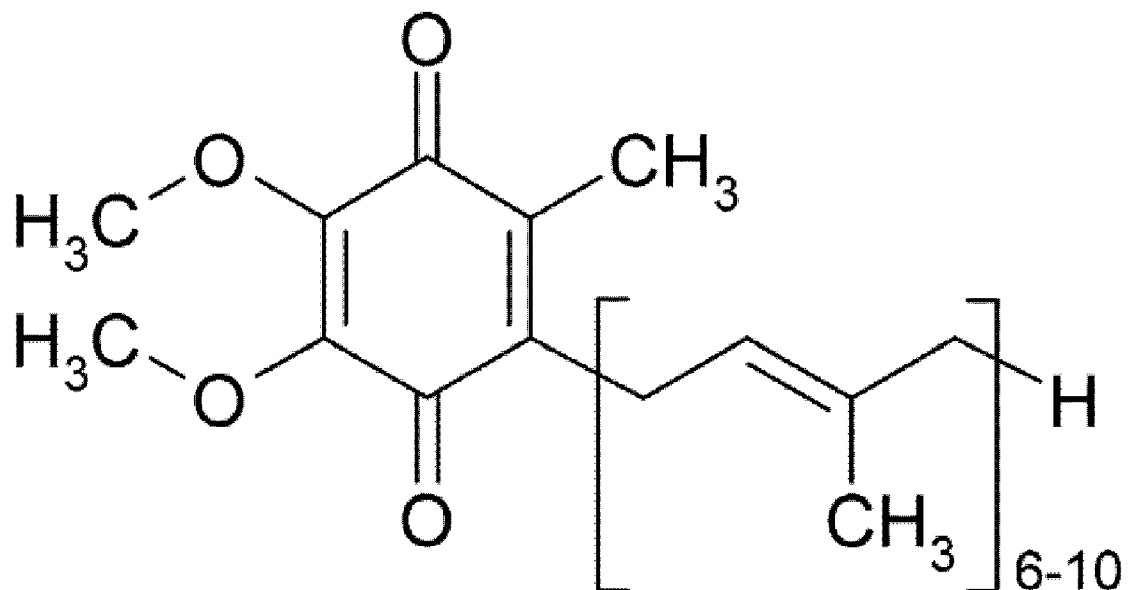
水溶液を調整した。そして、FADの濃度に対して等濃度のNADH水溶液を添加した後、OMRIにより画像化を行った。結果を図6に示す。

[0039] [実施例4]

マウスをイソフルラン麻酔下（2%）、大動脈結紮による右下肢虚血モデルを作成した。OMRI測定は虚血24時間後に行った。対称肢には虚血肢と同様に手術を行ったが、結紮のみ行わなかった。50mMのユビキノン水溶液に100mMのNADHを添加し、10分後の混合液をマウス両肢に200 $\mu$ L筋肉内投与しすぐにOMRI測定を開始した。結果を図7に示す。

[結果]

図1aに、ミトコンドリア呼吸鎖（複合体I）におけるユビキノンの酸化・還元スキームを示す。ユビキノンは、NADHから2つの電子を受け取り、そして電子スピン共鳴スペクトルが検出できるユビセミキノンラジカル形態を介し、ユビキノールに変換される。ユビキノンの酸化還元に関わるベンゾキノン誘導体部位はパラ型に酸素原子が付属しており、C2にはメチル基、C4、C5には酸素原子よりメチル基が付属している。C3にはイソプレン側鎖が付属しており、生体膜中に保持されるべく長い炭素鎖を形成している。構造は以下図の通りである。



[0040] イソプレン側鎖の数（n）は高等動物では10、下等動物では6～9で

あり、イソプレン側鎖が長くなればなるほど黄橙色を呈するようになる。なお  $n = 10$  のユビキノンは「UQ10」と、イソプレン側鎖の数字を示し、化粧品材料として使用されているコエンザイムQ10とはイソプレン側鎖の数が10ということになる。

[0041] 図1bに示すユビセミキノラジカルの電子スピン共鳴スペクトルは、1規定の水酸化ナトリウム水溶液でpH11.8に調整した8mMユビセミキノンにより産生された。前後に検出される電子スピン共鳴スペクトルは、内部標準である1mM 15N-CAT1より産生された。15N-CAT1は、14N-CAT1をベースに合成した。

[0042] 図1cは、ユビセミキノラジカルの動的核分極(DNP)スペクトルを示す。これは、オーバーハウザー効果MRI(OMRI)装置を用いて得られた。掃引幅(Sweep width)は、1.6mTで100ステップのスキヤニングを行った(0.016mT/スキャン)。使用したOMRI装置の電子スピン共鳴照射磁場は7.887mTとした。電子スピン共鳴並びにオーバーハウザー効果MRIの条件は以下の通りである。EPR:マイクロ波強度1mW、変調磁場周波数100kHz、変調磁場振幅0.002mT、照射時間0.03秒、掃引幅5mT、OMRI:TR(繰り返し時間)1200ms、TE(エコー時間)25ms、TEPR600ms。

[0043] ユビセミキノラジカル産生における濃度及びpH依存性を、図2に示す。図2aは、濃度依存性(左)と電子スピン共鳴スペクトル(右)を示しており、これは1規定の水酸化ナトリウム水溶液でpH11.8に調整した8mMユビキノンをを用いて測定した。ユビキノンは、1、2、4、8、12及び20mMに設定した。全ての測定は、要事調整した水溶液を用いて3回繰り返しにて行った。ユビキノンの濃度の増加と比例しユビセミキノンが産生され、濃度依存的な反応であることが示されている。

[0044] 図2bは、pH依存性の分散プロット図である。1規定の水酸化ナトリウム水溶液でpHを9.84、10.8、11.0、11.2、11.5、12.2に調整した8mMユビキノンをから産生されるユビセミキノンの濃度が

示されている（左図）。また、各 pH に調整した後、Xバンド電子スピン共鳴測定を 10 分間実施した結果（右図）、最大シグナル強度は、pH 11.8 に調整されたユビキノロン水溶液で得られた。しかしながら、pH 10.8 以下の条件下では、電子スピン共鳴シグナルは得られなかった。EPR 測定  
の条件は、マイクロ波強度 1 mW、変調磁場周波数 100 kHz、変調磁場  
振幅 0.002 mT、照射時間 0.03 秒、掃引幅 5 mT である。

[0045] 図 3 に、OMRI を用いたユビセミキノロンラジカルのインビトロ分子イメージングの結果を示す。図 3 a は、疑似試料の構成図を示す。数値は、1 規定の水酸化ナトリウム水溶液で pH 11.8 に調整したユビキノロンラジカルの濃度を示している（0.5、1、2、4、6、8 mM）。各ユビキノロンラジカル水溶液はガラスチューブ（直径 4 mm、高さ 30 mm）に注入され測定を行った。

[0046] 図 3 b は、EPR 照射を行った場合（Hyperpolarization ON）、図 3 c は EPR 照射を行っていない場合（Hyperpolarization OFF）における疑似試料の OMRI 画像を示している。EPR 照射が OFF の条件では、OMRI 画像の取得感度が低かったが、EPR 照射を行い、核スピンを増強した OMRI イメージング法（EPR 照射 ON）において、8 mM のユビキノロンから産生されたユビセミキノロンラジカル画像データを取得した。

[0047] 図 3 d は、EPR 照射 ON の画像データと OFF の画像データの差分画像データを示し、図 3 e は EPR 照射の有無による SNR 信号強度の差を示している。以上の結果から、水溶液をアルカリ性に調整することで、ユビセミキノロンラジカルの電子スピン共鳴スペクトル及び OMRI を用いた画像データを取得可能であることを証明した。さらに生体内のレドックス状態を解析するため、電子供与体を用いた測定系を構築した。

[0048] 図 4 に、EPR 及び OMRI を用いた CoQ/NADH システムにおけるユビセミキノロンラジカルのスペクトル分析及び分子イメージングの結果を示す。生体内の pH 条件の下、電子供与体である NADH を添加し産生させた

ユビセミキノラジカルの電子スピン共鳴スペクトルとOMRIを用いてイメージングを行った。

[0049] 図4aは、pH7.4に調整したPBS中に溶解した10mMのコエンザイムQ-0 (Co-Q0; イソプレノ側鎖の数がゼロ)、50mMのNADH、及び10mMのCo-Q-0と50mMのNADHを混合物の電子スピン共鳴スペクトルを示している。また、図4bはユビセミキノラジカルを擬似的に配置した図を示し、係るユビセミキノラジカルに対して、電子スピン共鳴をさせたとき (Hyperpolarization ON) と共鳴させないとき (Hyperpolarization OFF) のOMRI画像がそれぞれ図4c及び図4dである。さらに、図4eはHyperpolarization ONとOFFの差分データにより得られたユビセミキノフリーラジカルの画像データであり、これらの結果から、電子供与体であるNADHを添加した条件において産生されたユビセミキノラジカルの電子スピン共鳴スペクトルとOMRIを用いたイメージングが可能であることを証明した。

[0050] ユビセミキノラジカルを野生型マウスの直腸に投与し、OMRIを用いたインビボイメージングの性能を評価した結果を図5に示す。図5aは、マウスの大腸と盲腸におけるユビセミキノラジカルの代謝動態を示している。また、図5bはマウスのプロトンMRイメージ (生体画像データ) (Hyperpolarization-OFF) を、図5cはプロトンMRイメージとユビセミキノフリーラジカルイメージの融合画像データを、図5dはレドックスマップとMRイメージを、それぞれ示す。レドックスマップは、ユビセミキノフリーラジカル画像データの1ピクセル当たりにおけるユビセミキノフリーラジカル消失速度定数を計算した結果の片対数プロット図である。さらに、図5eは、盲腸におけるOMRIシグナルの経時変化とユビキノ水溶液の安定性に関する片対数プロット図である。

[0051] 大腸と盲腸のOMRIイメージの強度は、ユビセミキノフリーラジカルの消失によって徐々に減少することが示されている (a)。大腸と盲腸にお



けるOMRIイメージの強度は、ユビセミキノフリーラジカルの消失に応じて徐々に減少したが、ユビキノ水溶液の強度は、20分以上も安定であった。これらのデータは、生体内に投与されたユビキノ水溶液から体内でのレドックス反応によりユビセミキノフリーラジカルが産生されその体内動態をイメージングしていることを示している。

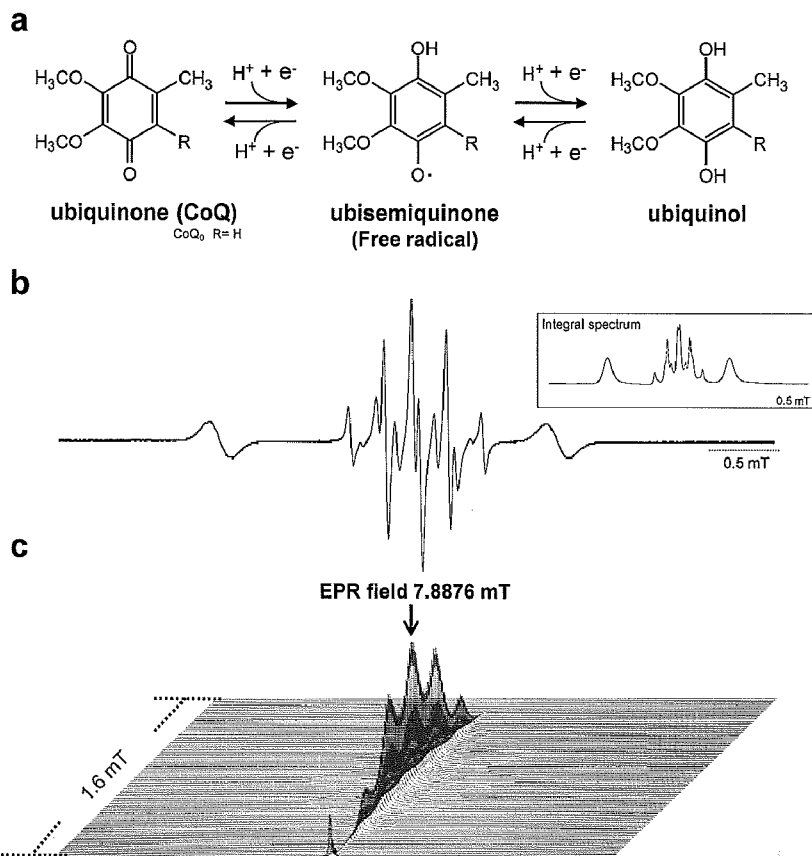
[0052] 図6にフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)のOMRIによる分子イメージングの結果を示す。FADのESRスペクトルの中心磁場をOMRIの電子スピン励起磁場として照射し、FADセミキノラジカルのOMRI画像を得た。10mM~100mMのFAD水溶液を調整し、同様に等モルのNADHを添加しESRで定量を行った結果、図6Bに示すようにFADの濃度依存的にセミキノラジカルが生成することが明らかとなった。FADは生体内における様々な臓器において電子伝達体として機能していることから、FADを生体プローブとして使用することで生体内因性分子を用いたレドックスの可視化が可能となる。

[0053] 図7に閉塞性動脈硬化症の動物モデルであるマウス下肢虚血モデルのユビセキノプローブを用いた解析結果を示す。図7に示されるように、ユビキノプローブ投与後にマウス両肢においてユビセミキノラジカル分布画像を得た。虚血肢における画像強度は対称肢に比べ高かった。それぞれの画像強度の領域を関心領域として選定し、強度の変化をプロットすると虚血肢におけるプローブの消失は対称肢に比べ有意に遅かった。これは虚血による筋組織の障害によりユビキノプローブのラジカル消失能が有意に低下したことを表している。これらの結果から、本プローブは生体組織のレドックス機能障害をモニターできることを示している。

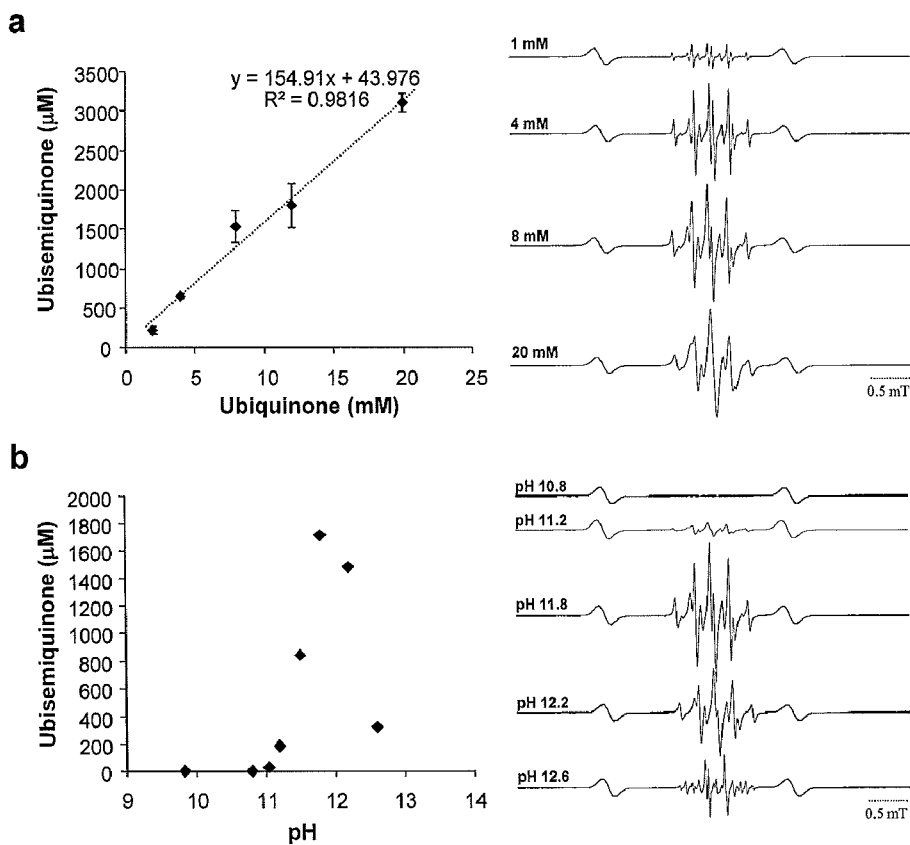
## 請求の範囲

- [請求項1] 生体内因性分子の酸化及び／又は還元反応をリアルタイムで検出するための方法であって、  
測定対象となる生体に磁気共鳴法を適用して生体内因性分子の情報を得る工程と、  
前記得られた生体内因性分子の情報を処理して画像化情報を得る工程と、  
前記得られた画像化情報を表示する工程と、  
を含む検出方法。
- [請求項2] 前記磁気共鳴法がオーバーハウザーMRI法または電子スピン共鳴法のいずれかである、請求項1に記載の検出方法。
- [請求項3] 前記生体内因性分子がフリーラジカルを有するものである、請求項1に記載の検出方法。
- [請求項4] 前記生体内因性分子がユビキノン、フラビンアデニンジヌクレオチド、ビタミンK又はアスコルビン酸である、請求項3に記載の検出方法。
- [請求項5] 生体内因性分子は生体外から生体内に取り込まれるものである、請求項1に記載の検出方法。

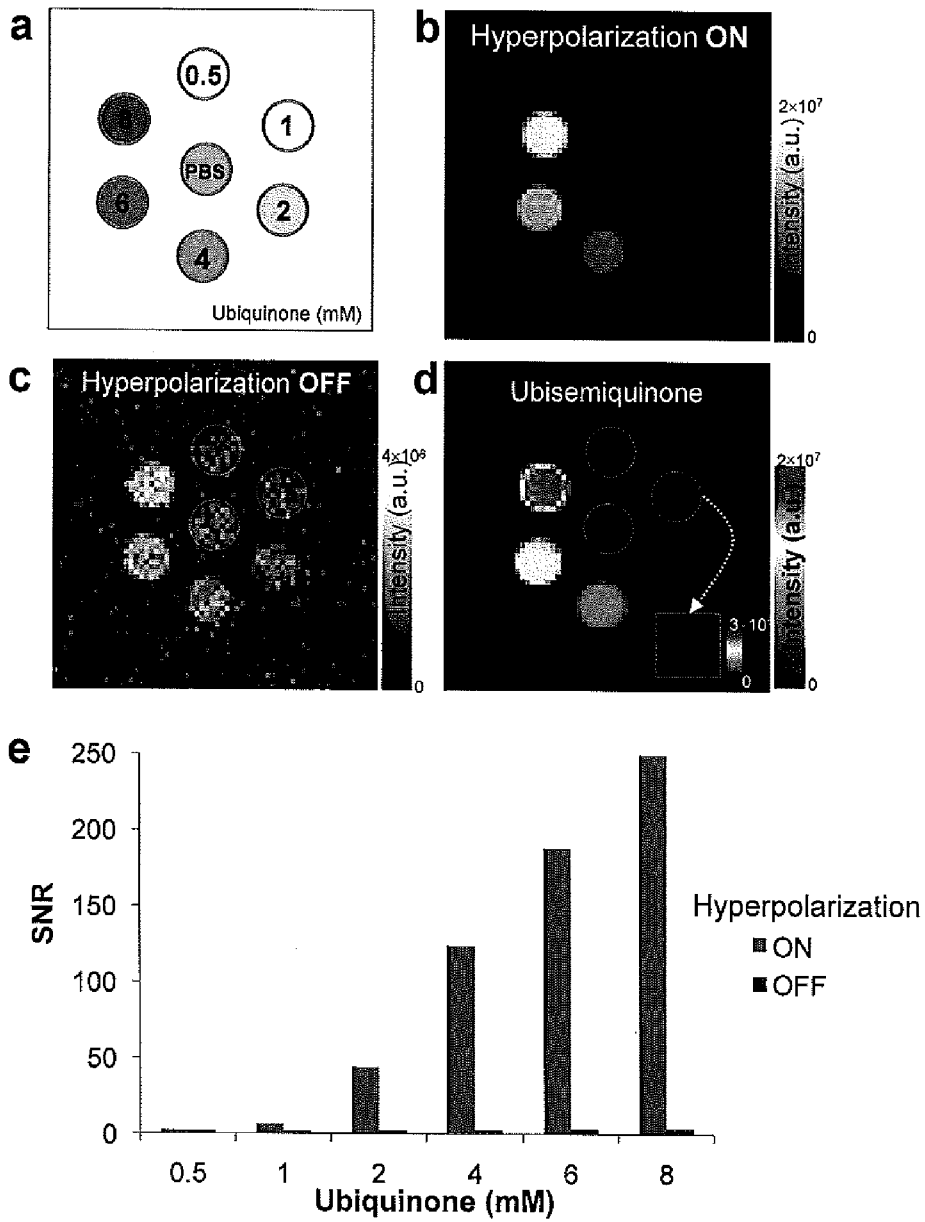
[Fig 1]



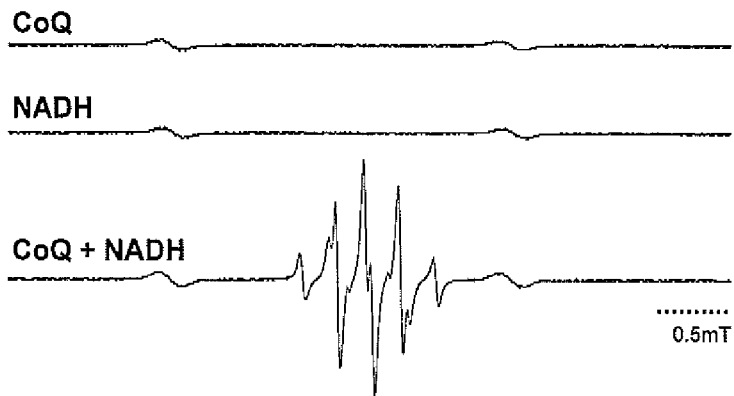
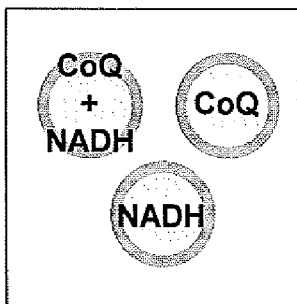
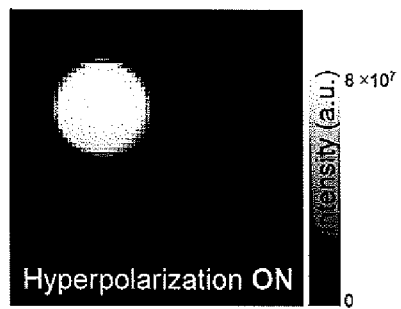
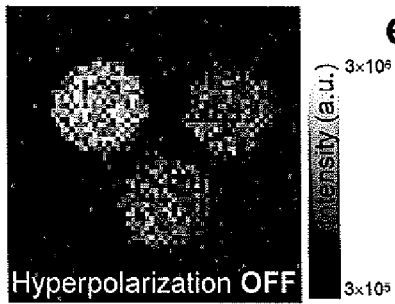
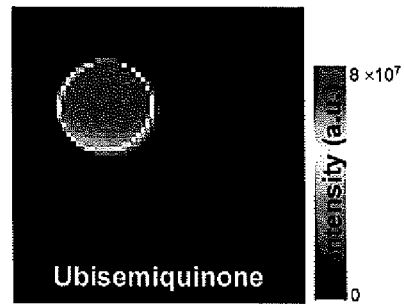
[Fig 2]



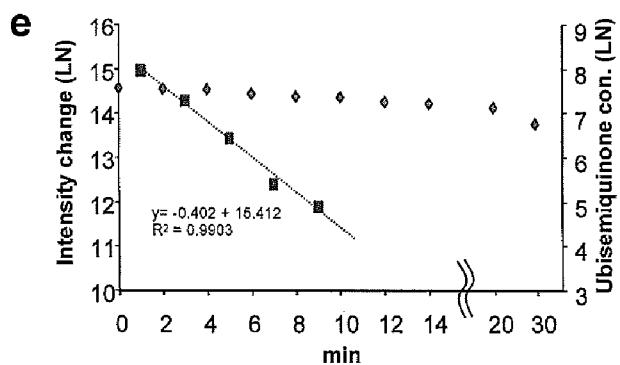
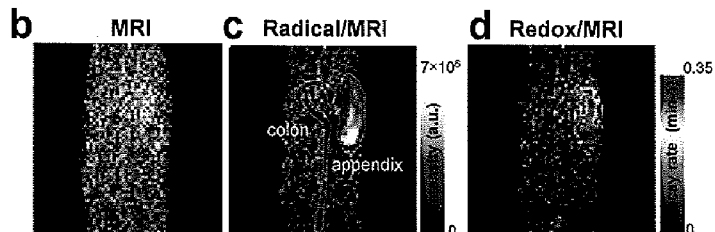
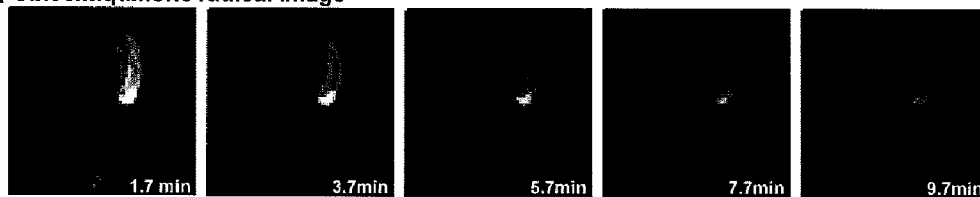
[3]



[圖4]

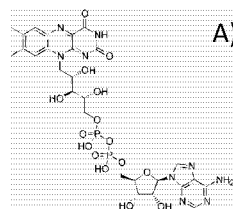
**a****b****c****d****e**

[図5]

**a** Ubisemiquinone radical image

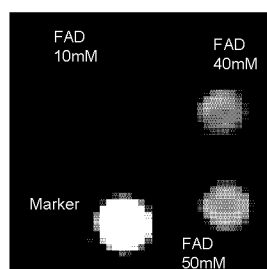
[図6]

## FADのセミキノン体のOMRI画像

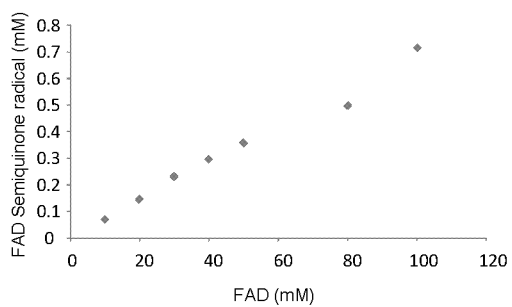


FAD

A)



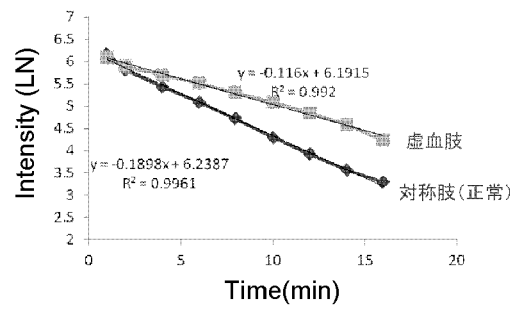
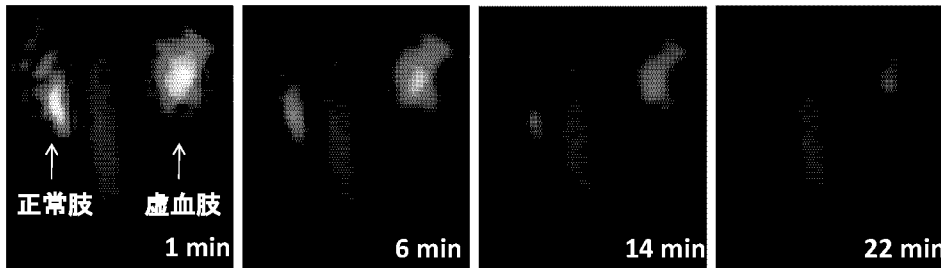
B)



[図7]

## 閉塞性動脈硬化症の動物モデルであるマウス下肢虚血モデルの ユビセミンプローブを用いた解析

ユビセミンプローブ筋肉内投与後(両足の筋肉に各々200uL)のOMRI画像



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/069386

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61B5/055 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61B5/055

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Ken'ichi YAMADA, "Seitainai Redox Hanno no Mushinshu Kaiseki o Mezashita Yugogata ESRI/MRI Sochi no Kaihatsu", Dai 16 Kai Bio Medical Bunseki Kagaku Symposium Koen Yoshishu, 02 August 2003 (02.08.2003), pages 112 to 113	1-3, 5
Y		4
Y	JP 2008-508267 A (GE Healthcare A/S), 21 March 2008 (21.03.2008), paragraphs [0002], [0007] to [0009], [0013], [0025] & EP 1805186 A & WO 2006/011811 A2	4



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
07 December, 2010 (07.12.10)Date of mailing of the international search report  
21 December, 2010 (21.12.10)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61B5/055(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. A61B5/055

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2010年
日本国実用新案登録公報	1996-2010年
日本国登録実用新案公報	1994-2010年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y	山田健一, " 生体内レドックス反応の無侵襲解析を目指した融合型 ESRI/MRI 装置の開発", 第16回バイオメディカル分析化学シンポ ジウム講演要旨集, 2003.08.02, p.112-113	1-3, 5 4
Y	JP 2008-508267 A (ジーイー・ヘルスケア・アクスイェ・セルスカ プ) 2008.03.21, 【0002】、【0007】 - 【0009】、【00 13】、【0025】 & EP 1805186 A & WO 2006/011811 A2	4

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07.12.2010

国際調査報告の発送日

21.12.2010

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号100-8915  
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

大▲瀬▼ 裕久

電話番号 03-3581-1101 内線 3292

2Q

3808