

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6412869号

(P6412869)

(45) 発行日 平成30年10月24日 (2018. 10. 24)

(24) 登録日 平成30年10月5日 (2018. 10. 5)

(51) Int. Cl. F I  
**GO 1 T 1/161 (2006. 01)**  
 GO 1 T 1/161 D  
 GO 1 T 1/161 Z DM

請求項の数 8 (全 23 頁)

|               |                               |           |                                                               |
|---------------|-------------------------------|-----------|---------------------------------------------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2015-527517 (P2015-527517)  | (73) 特許権者 | 392015468                                                     |
| (86) (22) 出願日 | 平成25年8月12日 (2013. 8. 12)      |           | ザ・ジェネラル・ホスピタル・コーポレイ<br>ション                                    |
| (65) 公表番号     | 特表2015-531865 (P2015-531865A) |           | THE GENERAL HOSPITA<br>L CORPORATION                          |
| (43) 公表日      | 平成27年11月5日 (2015. 11. 5)      |           | アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ボ<br>ストン フルーツストリート 55                       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2013/054551             |           |                                                               |
| (87) 国際公開番号   | W02014/028392                 | (74) 代理人  | 100100158                                                     |
| (87) 国際公開日    | 平成26年2月20日 (2014. 2. 20)      |           | 弁理士 鮫島 睦                                                      |
| 審査請求日         | 平成28年7月15日 (2016. 7. 15)      | (74) 代理人  | 100150500                                                     |
| (31) 優先権主張番号  | 61/682, 601                   |           | 弁理士 森本 靖                                                      |
| (32) 優先日      | 平成24年8月13日 (2012. 8. 13)      | (72) 発明者  | ジョルジュ・エル・ファクリ                                                 |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           | アメリカ合衆国 O 2 4 4 6 マサチューセッ<br>ツ州ブルックライン、ステッドマン・スト<br>リート 8 3 番 |
| (31) 優先権主張番号  | 61/783, 468                   |           |                                                               |
| (32) 優先日      | 平成25年3月14日 (2013. 3. 14)      |           |                                                               |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                       |           |                                                               |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ミトコンドリア複合体 I の定量マッピング用システムおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ミトコンドリア複合体 I (MC-I) の発現のインビボアッセイおよび画像化のための方法であって：

組織において MC-I に可逆的に結合する PET リガンドを投与される被験者をポジトロンエミッショントモグラフィー (PET) 画像化システムで画像化し、非一時的コンピューター可読媒体中に被験者の少なくとも 1 つの PET 画像を保管すること；および

MC-I 発現レベルを表す少なくとも 1 つの画像の位置を同定するコンピュータープロセッサを用いて少なくとも 1 つの画像の動態サイン (kinetic signature) を分析し、非一時的コンピューター可読媒体中に同定物 (identifications) を保管すること；

(ここで、MC-I 発現レベルの表現は、PET リガンドと MC-I との間の PET 画像化可能な結合反応に基づく)；を含む方法。

【請求項 2】

方法は、被験者における PET リガンドの存在のレベルを表しているいくつかの画像の部分の動態サインを分析することによって、被験者の血流 (BF) のレベルを計算するコンピュータープロセッサで画像を処理することをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

同定された MC-I 発現レベルおよび計算された心筋血流 (MBF) のレベルの両方を分析し、および評価することをさらに含む、被験者の心筋の虚血および梗塞の少なくとも 1 つの状態を同定するための、請求項 2 に記載の方法。

10

20

## 【請求項4】

BFおよびMC-I発現レベルの計算されたレベルが、コンピューター可読媒体内に保管された動態モデルに基づいて計算される、請求項2に記載の方法。

## 【請求項5】

PETリガンドおよびMC-Iの間の同定された相互作用を分析し、および評価することをさらに含む、代謝性疾患、神経障害、神経筋障害および精神障害の少なくとも1つの状態を同定するための、請求項1に記載の方法。

## 【請求項6】

PETリガンドが、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項7】

BFが、MBFを含む、請求項2に記載の方法。

## 【請求項8】

ミトコンドリア複合体I(MC-I)の発現を画像化するためのシステムであって：ポジトロンエミッショントモグラフィー(PET)撮像装置；

被験者に投与するためのPET放射性トレーサー源；

放射性トレーサーを投与された被験者のPET画像を得るという指示によりプログラムされた、非一時的コンピューター可読媒体を有するプロセッサ；

PET画像を処理し、MC-I発現レベルを表す、PET画像の部分を同定するという指示によりさらにプログラムされたコンピューター可読媒体；

(ここで、MC-I発現レベルの表現は、放射性トレーサーおよびMC-Iの間の画像形成可能な相互作用に基づく)；を含むシステム。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

## 関連出願の相互参照

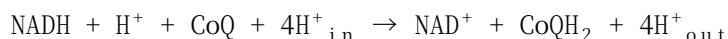
本出願は、2012年8月13日に提出された米国仮特許出願第61/682,601号および2013年3月14日に提出された米国仮特許出願第61/783,468号に基づき、それらの利点を請求し、それらを参照することによって本明細書に援用する。

## 【背景技術】

## 【0002】

エネルギー生産の主要部位として知られているように、ミトコンドリアは、電子伝達の連鎖反応を介して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの還元型(NADH)からアデノシン三リン酸(ATP)を産生するための最終段階として酸化リン酸化を実行する。NADH脱水素酵素またはNADH：ユビキノン酸化還元酵素としても知られるミトコンドリア複合体I(MC-I)は、ミトコンドリアにおける呼吸鎖の4つの膜結合酵素の1つであり、酸化リン酸化を触媒する第一の酵素である。電子伝達鎖には、3つのエネルギー変換酵素：(i) NADH：ユビキノン酸化還元酵素(複合体I)、(ii) 補酵素Q-シトクロムcレダクターゼ(複合体III)および(iii) シトクロムcオキシダーゼ(複合体IV)が存在する。

## 【0003】



## 【0004】

酸化リン酸化の開始剤としての重要な役割に加えて、MC-Iは、細胞にとって有害である活性酸素種の産生の主要部位とも見なされている。

## 【0005】

ミトコンドリアの遺伝性障害は、代謝傷害の最も多い原因であり、五千人に1人の新生児に影響を及ぼし、MC-Iの欠損が最も一般的な理由である。MC-I欠損は、酸化リン酸化の減少を介するか、または活性酸素種による細胞損傷によるかのいずれかにおいて、多くの疾患の原因であると考えられる。一方、MC-Iの機能または発現レベルの異常が、低酸素症または壊死の結果として、いくつかの疾患において見出されている。

## 【0006】

遺伝疾患に加えて、MC-I発現の減少は、パーキンソン病、ハンチントン病、双極性障害および統合失調症などのさまざまな神経障害、神経筋障害および精神障害にも結びつけられている。もう1つの重要な応用分野は、中等度から重度のMC-Iの減少を引き起こすことが知られている疾患である心筋虚血および心筋梗塞におけるMC-I発現の定量である。したがって、MC-Iは、人体内のすべての生体細胞に影響を与える基本的な重要性を有する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現在、MC-I発現レベルまたはその同等物である組織密度を測定するための臨床的に確立されているインビボ非侵襲的方法はない。インビトロアッセイが、このような測定のための現行の標準的実験室方法であり、生検または外科手術を必要とする。しかしながら、この酵素のインビボ定量アッセイが、臨床的に望ましいであろう。したがって、臨床および調査目的でのMC-I発現の非侵襲的定量アッセイおよびマッピング方法が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

発明の概要

本発明は、臨床および調査目的でのMC-I発現の非侵襲的定量アッセイおよびマッピング方法を提供することによって、上記およびその他の欠点を克服する。1つの態様において、システムおよび方法は、ピリダペン（MC-Iインヒビター）の化学的アナログである、<sup>18</sup>F-フルルピリダズ（Flurpiridaz）などのMC-Iリガンドを用いる定量的動的PETによりインビボ測定によって領域的MC-I発現を非侵襲的および定量的にマッピングするために開発されてきた。1つの態様において、システムおよび方法は、心臓PETの分野に適用可能である。この分野において、本発明は、冠動脈疾患(CAD)を評価するのに用いることができる。この点に関して、本発明は、MC-I発現ならびに心筋血流(MBF)の定量マッピングを提供することができる。

【0009】

1つの実施態様において、方法は、ミトコンドリア複合体I(MC-I)の発現のインビボアッセイおよび画像化を提供する。方法は、以下のステップ：(i)生きている被験者の組織においてMC-Iに可逆的に結合するPETリガンドを投与すること；(ii)該被験者をポジトロンエミッショントモグラフィー(PET)画像化システムで画像化し、非一時的コンピューター可読媒体中に被験者の少なくとも1つのPET画像を保管すること；および(iii)MC-I発現レベルを表す少なくとも1つの画像の位置を同定するコンピュータープロセッサを用いて少なくとも1つの画像の動態サイン(kinetic signature)を分析し、非一時的コンピューター可読媒体中に同定物(identifications)を保管すること；(ここで、MC-I発現レベルの表現は、PETリガンドとMC-Iとの間のPET画像化可能な結合反応に基づく)；を含む。

【0010】

1つの態様において、方法は、被験者におけるPETリガンドの存在のレベルを表しているいくつかの画像の部分の動態サインを分析することによって、被験者の血流(BF)のレベルを計算するコンピュータープロセッサで画像を処理することをさらに含む。1つ例において、BFは、MBFである。

【0011】

もう1つの態様において、方法は、同定されたMC-I発現レベルおよび計算された心筋血流(MBF)のレベルの両方を評価することによって、被験者の心筋の虚血および梗塞の状態を同定することをさらに含む。BFおよびMC-I発現レベルの計算されたレベルは、コンピューター可読媒体内に保管された動態モデルに基づいて計算されうる。

【0012】

さらにもう1つの態様において、方法は、PETリガンドおよびMC-Iの間の同定された相互作用に基づいて、代謝性疾患、神経障害、神経筋障害および精神障害の状態を同定することをさらに含む。さらにもう1つの態様において、PETリガンドは、<sup>18</sup>F-フルルピリダズで

ある。

【0013】

第二の実施態様において、システムは、ミトコンドリア複合体I(MC-I)の発現を画像化するために提供される。システムは、以下を包含する：ポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)撮像装置；被験者に投与するためのPET放射性トレーサー源；および放射性トレーサーを投与された被験者のPET画像を得るという指示によりプログラムされた、非一時的コンピューター可読媒体を有するプロセッサ。コンピューター可読媒体は、PET画像を処理し、MC-I発現レベルを表す、PET画像の部分を同定するという指示によりプログラムされる。さらに、MC-I発現レベルの表現は、放射性トレーサーおよびMC-Iの間の画像形成可能な相互作用に基づく。

10

【0014】

もう1つの実施態様において、方法は、ミトコンドリア複合体I(MC-I)の発現を画像化するために提供される。方法は、以下のステップ：(i)MC-Iインヒビターの化学的アナログとして働く放射性トレーサーを投与すること；(ii)ポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)画像化システムによって被験者を画像化して、被験者からPETデータを得ること；(iii)PETデータから被験者の画像を再構成すること；(iv)コンピュータープロセッサで画像を処理して、MC-I発現レベルを表す画像の部分を同定すること；および(v)被験者の画像に基づくMC-I発現レベルの表現およびMC-I発現レベルを表す画像の部分を含む報告を作成すること；を含む。

【0015】

1つの態様において、放射性トレーサーは、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを包含する。もう1つの態様において、方法は、放射性トレーサーの存在のレベルを表している被験者の画像の部分を分析することによって、コンピュータープロセッサで画像を処理して、被験者の血流(BF)のレベルを計算することを含む。1つの例において、報告は、MC-I発現レベルおよびBFのレベルに相関がある被験者の心筋の虚血および梗塞の状態の表示を含む。

20

【0016】

もう1つの態様において、報告は、MC-I発現活性レベルおよびBFレベルの少なくとも1つの定量を包含する。1つの例において、方法は、放射性トレーサーおよびMC-Iの間の同定された相互作用に基づいて、代謝性疾患、神経障害、神経筋障害および精神障害の状態を同定することさらにを含む。さらにもう1つの態様において、放射性トレーサーは、複数の生理的流れの値における統一(unity)に近づく単方向抽出画分(unidirectional extraction fraction)を提供する。

30

【0017】

さらにもう1つの実施態様において、システムは、ミトコンドリア複合体I(MC-I)の発現を画像化するために提供される。システムは、以下を包含する：MC-Iインヒビターの化学的アナログとしてとして働く放射性トレーサーをの一回用量を受けた被験者のポジトロンエミッショントモグラフィ(PET)画像が保管された非一時的記憶媒体；およびプロセッサがPET画像に接近し、PET画像を処理して、MC-I発現レベルを表す、PET画像の部分を同定するという指示によりプログラムされた、非一時的コンピューター可読媒体を有するプロセッサ。

40

【0018】

1つの態様において、システムは、MC-I発現レベルを表す、PET画像の部分を示す画像を提供するための表示部をさらに含む。もう1つの態様において、プロセッサは、PET画像を分析して、動態サインを決定する。さらにもう1つの態様において、プロセッサは、被験者におけるPETリガンドの存在のレベルを表す、PET画像の部分の動態サインを分析することによって、被験者の血流(BF)のレベルを計算する。もう1つの態様において、プロセッサは、PET画像を用いて心筋血流(MBF)を計算し、さらに、同定されたMC-I発現レベルおよび計算されたMBFのレベルの両方を評価することによって被験者の心筋の虚血および梗塞の状態を同定する。

【0019】

50

前述したものおよびその他の本発明の利点は、以下の記載から明らかであろう。該記載は、本発明の一部を形成し、本発明の好ましい実施態様を説明する目的で示される図面について述べられている。しかしながら、このような実施態様は、必ずしも本発明の全範囲を表さず、したがって、請求の範囲および本明細書について本発明の範囲を解釈するために述べてられている。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1A-1B】MC-I定量の概略図である。

【図1C】 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの分子構造を示す。

【図2A】短軸および長軸における心筋の加算画像を示す。

【図2B】GFADSにより誘導された入力関数および血液サンプル(点)およびROIベース入力関数の比較を示すグラフである。

【図3A】2-コンパートメントリバーシブルモデルと一致するサルの実験からの活性データを示すグラフである。

【図3B】実験期間の関数としての推定 $K_1$ によるサル実験からの $K_1$ データを示すグラフである。

【図3C】信頼できる推定のために、より長い時間(60分より長い)がかかることが示された $\text{BP}_p$ によるサル実験からの $\text{BP}$ データを示すグラフである。

【図4A】動的な休息-ストレス試験におけるトレーサー取り込みの動態を示すグラフである。

【図4B】臨床心臓試験における $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの共登録された休息およびストレス画像を示す。

【図5】シミュレーション試験を用いる3つのタイプの心筋における60分および100分試験での推定 $\text{BP}_p$ 比較を示すグラフである。

【図6A】短軸(上列)像および長軸(中列および下列)像における梗塞ブタ $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズのPET画像を示す。矢印は、梗塞の部位を示す。

【図6B】前壁中隔壁における梗塞を確認する、切開で得られた写真を示す(左:心外膜像、右:心外膜像を反転させた心筋)。

【図6C】部分的および完全に梗塞した組織サンプルにおける低減化されたMC-I発現を示すウエスタンブロットを示す。

【図6D】健康(上部パネル)および虚血(下部パネル)心筋における $^8\text{F}$ -フルルピリダズのPETデータへの2組織コンパートメントモデルフィットを示す。結合フィット(右)は、より少ない自由変数を有し、データへのモデルフィットの質において軽微な劣化を示し、それによって、推定パラメーターの分散を低下させる。

【図7】本発明のエミッシェントモグラフィシステムの外略図である。

【図8】本発明によるエミッシェントモグラフィシステムを用いる方法の一例のステップを示すフローチャートである。

【発明を実施するための形態】

【0021】

発明の詳細な記載

1つの実施態様において、記載されたシステムおよび方法は、MC-I発現レベルを測定するためのインビボアッセイの使用を企図する。特定の例が提供されるが、総合的实施は、さまざまな医用画像工学の1つ以上に適合するMC-I標的分子の使用を包含することを企図している。たとえば、1つの実施態様において、方法は、PET画像化用にMC-I標的分子である $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを投与するステップを包含する。しかしながら、MC-I標的分子は、ポジトロンエミッターとして用いることはできず、代わりに、異なるタイプの放射物を放出するか、またはさらに、放射活性を全く提示しないように設計することができる。同様に、MC-I標的分子は、PET画像化用に用いることはできず、むしろ磁気共鳴画像法(MRI)、超音波画像法またはいずれかの他の適当な画像化技術に適合することができる。

【0022】

図7に関して、本発明によるPETシステム(100)は、中心軸もしくはボア(114)の周囲の検出器リングアセンブリ(112)を含む画像化ハードウェアシステム(110)を包含する。市販のオペレーティングシステムを実行する市販のプロセッサを含むオペレーターワークステーション(116)は、画像化ハードウェアシステム(110)のオペレーションをコントロールするためのガントリーコントローラ(120)を有する通信リンク(118)を介して通信を行う。

#### 【0023】

検出器リングアセンブリ(112)は、イベントが起こるときの通信ライン(124)上の光子の検出に応答してシグナルを生成する多数の放射検出器ユニット(122)により形成される。捕捉回路(126)のセットは、信号を受信し、イベント座標(x、y)およびにイベントを引き起こした光子に伴う総エネルギーを示す信号を生成する。これらの信号は、ケーブル(128)を介して、イベントロケータ回路(130)に送られる。それぞれの捕捉回路(126)もまた、相互作用が起こった精密な瞬間を示すイベント検出パルスを生成する。他のシステムは、エネルギーおよびイベント軸を得るために用いた同じ信号からイベントが起こった精密な瞬間に関するこの情報を得ることもできる洗練されたデジタルエレクトロニクスを利用する。

#### 【0024】

いくつかの実施におけるイベントロケータ回路(130)は、捕捉回路(126)によって生成された信号を定期的にサンプリングするデータ捕捉プロセッシングシステム(132)の一部を形成する。データ捕捉プロセッシングシステム(132)は、バックプレーンバス(134)上および汎用通信ネットワーク(118)上の通信をコントロールする汎用コントローラ(134)を包含する。イベントロケータ回路(130)は、各有効イベントに関する情報を、いつそのイベントが起こったか、そしてイベントが検出された場所を精度高く示す一連の数字にする。このイベントデータパケットは、データ捕捉プロセッシングシステム(132)の一部でもある同時検出器(138)に運ばれる。

#### 【0025】

同時検出器(138)は、イベントロケータ回路(130)からイベントデータパケットを受け取り、それらのうちのいずれか2つが同時発生しているかを決定する。同時発生は、多くの因子によって決定される。第一に、各イベントデータパケットにおけるタイムマーカは、所定の時間窓内、たとえば、0.5ナノ秒もしくはピコ秒に至る時間窓内でなければならない。第二に、2つのイベントデータパケットによって示された位置は、スキャナボア(114)内の視野を通過する直線上に存在しなければならない。対にすることができないイベントは、同時検出器(138)から廃棄されるが、同時イベントペアは、位置決定され、同時発生データパケットとして記録される。この同時発生データパケットは、ソーター(140)に提供される。多くの従来型のPET画像化システムにおけるソーターの機能は、を受け取り、同時発生データの効率的貯蔵のために同時発生データパケットからメモリアドレスを生成することである。その意味で、同じ方向( $\theta$ )を指し示し、スキャナの視野(FOV)を通過するすべての投影線のセットは、完全な投影、あるいは「表示(view)」である。特定の投影線とFOVの中心との間の距離(R)は、その投影線をFOV内で位置決定する。ソーター(140)は、この投影線上に位置する2つの検出器でのイベントを示す同時発生データパケットを選別することによって、スキャン中に特定の投影線(R、 $\theta$ )上で起こるすべてのイベントを計数する。同時発生カウントは、たとえば、各軸方向の像面用の、それぞれは、その次元の1つとしての投影角度 $\theta$ と、その他の次元としての距離Rを有する、二次元アレイのセットとして整理される。測定されたイベントのこの $\theta$ バイRマップ( $\theta$  by R map)は、ヒストグラム、またはより一般的には、サイノグラムアレイと呼ばれる。スキャン中に各画像画素位置において起こるイベントの数を示す画像を再構成するために処理されるのが、これらのサイノグラムである。ソーター(140)は、各投影線(R、 $\theta$ )に沿って起こっているすべてのイベントを計数し、それらを整理して画像データアレイにする。

#### 【0026】

ソーター(140)は、画像アレイ(146)に貯蔵されるように、たとえば、通信リンク(144)経由で、画像処理/再構成システム(142)に、画像データセットを提供する。画像アレイ(1

10

20

30

40

50

46)は、画像を再構成する画像プロセッサ(148)によるアクセスのための各データセットを保持する。画像処理/再構成システム(142)は、ワークステーション(116)もしくはその他の通信回線を介して利用可能なワークステーションと、通信する、および／または、一体化される。

#### 【0027】

ミトコンドリア複合体I(MC-I)における欠損は、遺伝的、精神的および心臓疾患の全域に影響を及ぼす一般的な特徴である。非侵襲的アプローチを提供するシステムおよび方法は、インビボMC-I発現レベルを測定することである。1つの態様において、本発明は、痕跡量の $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズなどの放射性核種の静脈内注射を利用する。しかしながら、MC-Iインヒビターであるピリダベン<sup>10</sup>の化学的アナログなどの他の分子が、本明細書に記載するシステムおよび方法の実行において使用されうると思われる。一般に、血管外スペースへの容易なアクセスを獲得し、MC-I複合体に選択的および可逆的に結合する分子は、MC-Iの発現を測定するために用いることができる可能性がある。しかしながら、結合リガンドは、MC-Iアッセイの目的で最適化されうる広範な特性を有する。たとえば、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ結合の動態は、相対的に遅い。測定は、1時間以上かかるかもしれないしたがって、特定の態様において、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズは、ヒトに関する研究に適している。他の態様において、特定のリガンドは、MC-Iアッセイのためのリガンドの有用性とは無関係に、血流剤として有用でありうるが、その逆もまたしかりである。概して、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズは、MC-Iに可逆的に結合する能力を明らかにしている存在する例のリガンドであり、本発明の実行に適した特性をもつ多くの作用剤が製造されうることを予測することができる<sup>20</sup>。さらに、MC-I結合を測定するのに用いることができる分子を設計するための他のメカニズムが見い出される可能性がある。

#### 【0028】

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズは、心筋血流(MBF)を評価するための、現在臨床試験中のPETトレーサーである。本発明は、フルルピリダズが、すべての生理的流れの値において1に近づく単方向抽出画分、およびMC-Iインヒビターであるピリダベン<sup>30</sup>の化学的アナログであるという特性などの多くの重要な動態特性を有することを認識している。現在、第III相試験下にあるフルルピリダズは、見込みのある心臓造影剤とみなされるが、そのMC-I発現の造影／測定のための潜在力は、これまでに発見または利用されていない。

#### 【0029】

本発明の開発において、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ濃度過程の最初の2、3分が、血流単独によって決定されることを示す実験を行った；一方、その、より後の時間経過は、MC-Iへの可逆的結合によって決定され、PET画像化および動態モデリングとともにその結合能の定量マッピングを可能にする。したがって、流れトレーサーとしてのその使用に加えて、MC-I発現の非侵襲的インビボアッセイが開発されうることが決定された。1つの態様において、同じ画像化セッション内で、同じ注入用量のトレーサーを用いて、灌流およびMC-I発現レベルの両方を定量することができる。MC-I発現レベルを非侵襲的に定量する能力は、ミトコンドリア異常に関連するさまざまな疾患の診断、またはこれらの疾患におけるミトコンドリアの病理学的役割の研究に、潜在的に変換されうる。さらに、同じ研究において灌流およびMC-Iの両方を測定することは、慢性心筋虚血を有する患者の冬眠心筋を診断する能力を拡張しうる。<sup>40</sup>

#### 【0030】

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET動的研究は、動態モデリング分析を用いるMC-I発現レベルの正確で精度の高い定量を提供する。MC-Iの結合能がPET研究によって正確にコンピューターで計算されうる状態は、第一セットの実験によって決定されうる。この情報を用いて、最適実験設計を達成するようにPET獲得を最適化することができる。これまでに開発された慢性心筋虚血のブタモデルを用いて、MC-Iおよび心筋血流レベルを変化させ、それぞれインビトロMC-Iアッセイおよびマイスロスフェアに対する直接比較によるPET測定を有効にすることができる。

#### 【0031】

10

20

30

40

50

1つの実施態様において、MBFおよびMC-I活性の両方を定量的にマッピングするための<sup>18</sup>F-フルルピリダズの二重機能を確認することができる。現在、<sup>18</sup>F-フルルピリダズのために行われている大部分の研究は、MBFの半定量的画像化に焦点を当てている。1つの態様において、本明細書において提供されるアプローチは、単一動的スキャンセッション内での灌流およびMC-Iの同時測定に対する<sup>18</sup>F-フルルピリダズの使用をさらに拡張する。動態モデリングおよび図形解析は、データ分析アプローチとして用いることができ、入力関数抽出および必要な研究期間の決定などのこのような分析のための技術的詳細に対処することができる。核医学の分野において、画像化技術は、活性分布の単一写真を撮ることを含むことが多い。特定の実施態様において、本明細書に記載の方法は、時間内に間を置いた複数の画像の獲得、次いで、MC-Iリガンドの動態挙動のモデルに基づく一回以上の計算を含む。

10

#### 【0032】

もう1つの実施態様において、<sup>18</sup>F-フルルピリダズで測定されたMC-I発現レベルは、標準インビトロアッセイによるブタモデルにおいて有効にすることができる。動物モデルにおいて、異なる心筋領域におけるMC-I発現レベルは、低酸素症の異なる度合いによって変更されうる；したがって、MC-I発現レベルのスペクトルは、心臓において作り出される。インビトロ分析を通して、疾患領域ならびに生存可能な心筋においてMC-I発現をアッセイすることができる。次いで、インビボ<sup>18</sup>F-フルルピリダズ試験において得られたこれらの測定を、統計的尺度および試験によって、正確さと精度の観点から評価することができる。MBF定量は、すべての心臓領域において対照流を提供することができる、マイクロスフ

20

#### 【0033】

さらにもう1つの実施態様において、心筋虚血の程度とMC-I発現レベルの間の関係は、定量的に審査することができる。1つの態様において、インビトロアッセイおよび組織学に基づいて、正常、冬眠および梗塞心筋として、心筋サンプルを分類することができる。<sup>18</sup>F-フルルピリダズPETで測定されたMC-I発現レベルを比較し、そのような測定を、これらの3つのタイプの組織を非侵襲的に区別するための可能性のあるツールとして用いることができるかどうかを決定することができる。もう1つの態様において、3つの組織クラスの間を判別する場合に達成されうる判別力を、1) 灌流のみ；2) MC-Iのみ；および3) 灌流とMC-Iの組合せ；を用いて評価することができる。

30

#### 【0034】

図8では、本発明のエミッシェントモグラフィシステムを用いる方法の例のステップを示すフローチャート(200)が提供される。方法(200)のの第一のステップ(202)において、MC-Iを結合するための適当なトレーサー分子(MC-Iリガンド)の用量を投与する。1つの態様において、用量は、ヒト患者などの被験者に投与される。方法(200)の次のステップ(204)において、被験者は、PETシステムなどのエミッシェントモグラフィシステムを用いて画像化される。被験者は、MC-Iリガンドの動態に基づいて、ある時間の間、画像化される。たとえば、MC-Iリガンドが<sup>18</sup>F-フルルピリダズである場合、もし目的が灌流を計算することであるならば、被験者は、投与ステップの最初の2、3分以内に画像化されうる。しかしながら、もしMC-I発現を計算することが望ましいならば、被験者は、より長い時間枠にわたって、あるいは投与ステップ後のより遅い時間から開始されて、画像化されうる。

40

#### 【0035】

方法(200)の次のステップ(206)において、エミッシェントモグラフィシステムによって獲得された1つ以上の被験者の画像は、非一時的コンピューター可読媒体に保管されうる。次いで、方法(200)のステップ(208)において、1つ以上の画像は、たとえば、コンピュータープロセッサによって分析されうる。分析に続いて、ステップ(210)において、1つ以上の計算を行うことができる。計算は、被験者の灌流およびMC-I発現レベルの定量を包含しうる。さらに、方法(200)の任意のステップ(212)において、冬眠心筋、健康心筋および／または虚血心筋として、被験者の心筋を診断することができる。

50

## 【0036】

上記方法(200)において、示した順序で、あるいは方法(200)の成功裏の遂行に適した任意の順序でステップを実行することが可能である。たとえば、ステップ(204)における被験者の画像化は、ステップ(202)におけるMC-Iリガンドの投与の前もしくは同時に行われてよい。もう1つの例において、画像分析のステップ(208)は、ステップ(210)における計算と断続して行うこともできる。多くの例が記載されているが、方法(200)のステップの他の有用な組合せが、可能性があり、かつ予想される。

## 【0037】

MC-I発現レベルを非侵襲的に定量する能力は、ミトコンドリア異常に関連するさまざまな疾患の診断、またはこれらの疾患におけるミトコンドリア病理学的役割の研究に変換することができる。さらに、同じ研究において灌流およびMC-Iの両方を測定することは、慢性心筋虚血を有する患者の冬眠心筋を診断する能力を拡張しうる。

## 【0038】

現在、MC-I発現レベル、または等価的にその組織密度のインビボ非侵襲的測定方法は確立されていない。このような測定のためのインビトロアッセイが、現在の標準的実験室方法であり、生検または外科手術を必要とする。トレーサーである $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ(旧称： $^{18}\text{F}$ -BMS7472158-02)を用いることによって、本発明は、臨床および研究目的でのMC-I発現レベルを定量するための画像化アプローチを提供する。 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズは、ミトコンドリア 複合体I(MC-I)に結合することが明らかにされているピリダベンアナログである。最初は心筋灌流トレーサーとして開発され、それは、いくつかの魅力的な特徴を有している：高い初回通過抽出画分、心筋における長期間保持、および短いポジトロンレンジゆえにサイクロトロンなしでの部位への分配を可能にし、優れた画像品質を生成する $^{18}\text{F}$ -標識。従来、MC-Iに対するトレーサーの親和性は、主として無視されてきた。高い結合親和性を有するMC-Iインヒビターとして、本発明は、MC-I結合能を測定し、MC-I発現レベルを決定するための、その使用を可能にする。例示としての適用として、冠動脈疾患(CAD)および神経精神疾患および遺伝的MC-I欠損が、挙げられる。

## 【0039】

MC-Iにおける急性または慢性のいずれかの虚血性傷害の効果を研究している2、3の報告がある。動物モデルにおいて、誘導された慢性虚血(冬眠心筋の原因であるとも考えられている)を有する動物が、心筋において低下されたMC-I発現レベルを有することが明らかにされている。この現象の背後にある理論は、1)MC-I発現が下方調節されて、代謝の低下を提供するようにエネルギー需要および灌流がこれらの領域において低減化されるので；および2)これらの領域における心筋細胞の画分が、非生存性または瘢痕になるか、虚血性傷害による線維組織になるので、MC-I発現が低減化されることである。ミトコンドリアの総密度は、低減化され、したがって、MC-I発現の低下をもたらす。結果として、疾患心筋におけるMC-I発現の有意な低減化の観察は、このような適用において $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET画像化を用いる可能性を創生する。1つの態様において、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPETの利点は、MC-I発現に加えて、同じ画像化セッション内で灌流が測定されうることであり、そのことは、梗塞に対する、虚血性であるが生存可能な外傷のさらに確定的な診断をもたらす

## 【0040】

ミトコンドリア機能の異常とさまざまな神経精神疾患の間の関連性が、近年の報告において議論されており、依然として活発な調査の主題である。MC-I欠損が、パーキンソン病のドーパミン作動性ニューロン損傷において重要な役割を演じることが明らかにされている。類似のMC-I欠損が、ハンチントン病、アルツハイマー病、ダウン症候群、統合失調症および双極性障害においても見い出されている。近年、MC-I異常とこれらの疾患の間の関連性が発見されたので、これは、本明細書に記載のシステムおよび方法から恩恵を受けることができる可能性がある比較的新しい分野である。生検による場合を除いて、MC-I発現における局所的異常を評価することは現在不可能である。1つの態様において、局所的MC-IアッセイのためのPET画像化技術( $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズは、血液脳関門を通過する)は、

10

20

30

40

50

新たな治療薬を評価する機会を広げ、リー症候群、尿細管性アシドーシスおよび心筋症などのMC-I欠損性疾患の診断および場合により、先行治療管理を補佐する。

#### 【0041】

記載したシステムおよび方法は、MC-I発現レベルを測定するためのインビボおよび非侵襲性技術を提供することによって、科学的小および臨床的意義を有する。PETは、臨床診断および研究のための十分に確立された画像化技術なので、記載された方法は、一態様において、解釈研究および臨床適用にとって大きな可能性を有しうる。もう1つの態様において、MC-I発現に加えて、同じ<sup>18</sup>F-フルルピリダズ研究および動態モデリング分析はまた、組織灌流を定量するのに用いることができる。この特徴は、灌流および代謝情報は、それらを一緒に用いる場合に、診断感度を増大させることが多い心臓への適用にとって特に魅力的である。

10

#### 実施例

#### 【実施例1】

#### 【0042】

単回<sup>18</sup>F-フルルピリダズ PETからMC-I発現レベルを定量する方法：

MC-I発現レベルは、方程式1：

$$\lambda_{MC-I} = \alpha \cdot B_{max}$$

(方程式1)

[式中、 $\alpha$  は、比例定数であり、 $B_{max}$  は、組織中のMC-Iの局所濃度である]

20

を用いて決定することができる。MC-Iに対するフルルピリダズの親和性が、疾患または病的状態において変更されないと仮定して、方程式1は、

$$\lambda_{MC-I} = \alpha' \cdot BP$$

(方程式2)

[式中、

$$\alpha' = \alpha \cdot K_D$$

は、比例定数であり、 $1/K_D$  は、MC-Iに対するリガンド(フルルピリダズ)の親和性であり、BPは、結合能を意味する]

30

と書くことができる。したがって、フルルピリダズ結合能が、MC-Iの発現レベルための代用評価項目として働きうるものが仮定された。

#### 【0043】

初期検証研究および原理の証明のために、慢性ブタ虚血モデルが選択される。Page B、Young R、Iyer VらのPersistent regional downregulation in mitochondrial enzymes and upregulation of stress proteins in swine with chronic hibernating myocardium.

Circ Res. Jan 4 2008; 102 (1) : 103-112に記載されているように、このモデルは、MC-Iの正常な、減少した(虚血)、および非常に低い(梗塞)活性を提供することが明らかにされた。ブタモデルは、ヒトに似たモデルの大きさおよび定量的動的撮像のための適合性などのPET研究のためのさらなる利点を有する。

40

#### 【実施例2】

#### 【0044】

実験計画：

<sup>18</sup>F-フルルピリダズによる心筋血流および結合能の測定は、我々の研究室においてよく理解されており、利用可能な標準的方法によって達成されうる。我々は、フルルピリダズ動態を記載するために、4つのパラメーター( $K_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $k_4$ )、2つの組織コンパートメントモデル(図1A-1B)を用いる。このモデルにおいて、トレーサーは、2つの状態、注射された分子として遊離であるか、または受容体に結合しているかのいずれかでありうる。<sup>18</sup>F-フルルピリダズの場合、これまでの研究は、それが、ミトコンドリア複合体Iに可逆的に結合することを明らかにしており、このことは、本明細書にて提供されるデータによ

50

てサポートされる（実施例3参照）。図1A-1Bに関して、血漿濃度( $C_p$ )および輸送率 $K_1$ の積は、毛細血管の血漿から自由空間（すなわち、自由かつ非特異的結合）にトレーサーを駆動させる力である。概念的には、 $C_F$ は、遊離のフルルピリダズを表し、 $C_B$ は、MC-I複合体に結合しているフルルピリダズを表す。補正（図示せず）は、活性のスピルオーバーに対して行われる。

#### 【0045】

象徴的な意味において、 $K_1$ は血漿から組織への輸送速度、 $FE$ は流れと一方向キャピラリー抽出フラクション $E$ の積、 $k_2$ は組織から血漿への放出をまとめる速度定数である。速度定数 $k_3(k_{on} * B'_{max})$ および $k_4(k_{off})$ は、トレーサーの結合および放出をまとめる記述を提供する。非線形最小二乗により、このモデルは、カニクイザルの心臓における結合の研究において得られたデータの100分間をフィットさせるために用いられた（実施例3参照）。類似のアプローチが、ブタにおける検証研究のために適切であることが予想される。図式的方法は、定量的パラメトリック画像およびヒト研究への将来転換のためにより適しているので、この方法もまた、BPの決定のために研究され、適用されうる。たとえば、以下を検討：Logan J、Fowler JS、Volkow NDら、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. Sep 1990; 10 (5) : 740-747。Y Zhou Y、Ye W、JR、Crabb AH、Hilton J、Wong DF. A consistent and efficient graphical analysis method to improve the quantification of reversible tracer binding in radioligand receptor dynamic PET studies. Neuroimage. Feb 1 2009; 44(3) : 661-670。両方のアプローチのためのソフトウェアプログラムが、開発されている。リアリスティックモンテカルロシミュレーションおよび感受性分析を用いて、 $^{18}F$ -フルルピリダズの所定の用量および研究の実験期間により得られた精度を決定することができる。 $^{18}F$ -フルルピリダズの構造を、図1Cに示す。

#### 【0046】

いくつかの態様において、モデルはさらに開発される。モデリングアプローチは、血液と組織の間を拡散的に交換し、特異的標的部位に可逆的に結合する放射性トレーサーの取り込みおよび保持を記述する2つの組織コンパートメントモデルに基づく（図1A-1B）。この構成において、放射性トレーサーの濃度は、3つの明確に異なる状態において検討される：血漿( $C_p$ )または2つの組織状態の1つ中の濃度、組織液中に自由に懸濁した状態の濃度( $C_F$ )、あるいは標的部位に特異的に結合した状態の濃度( $C_B$ )。4つのパラメーター( $K_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $k_4$ )は、取り込みおよび結合の根拠をなしている生理学的機序を詳述する。 $K_1$ および $k_2$ は、それぞれ、血管系からのトレーサー流入および組織からの再流出の速度（血流に比例）に関する。 $K_1/k_2$ 比は、領域的に変化することが予測されない組織の特性に基づく非特異的取り込みを反映する分配係数 $V_{ND}$ である。トレーサーが標的部位に結合する速度は、 $k_3$ によって関連付けられる。会合性結合の二分子的性質は、 $k_3$ を化合物パラメーター、 $k_{on}$ (リガンドおよび標的部位に特徴的な固有結合速度)と $B_{max}$ (結合部位の密度)の積にする。 $^{18}F$ -フルルピリダズとMC-Iとの間などの可逆的に結合する相互作用のために、特異的に結合したトレーサーの遊離状態への復帰は $k_4$ によって表される。本明細書において、 $k_4$ は、領域間での差異を予測されない固有結合解離定数 $k_{off}$ と同義である。本願発明の心臓への適用において、2つのパラメーター( $f_{LV}$ 、 $f_{RV}$ )は、隣接する左右の心室中の血液プールからのシグナルコンタミネーションからなる。個々の速度定数の組合せは、標的部位にて結合している放射性トレーサーに関して、確固たる情報的に有益なマクロパラメーターを生み出す。これらのマクロパラメーターとして、総分配量( $V_T = [K_1/k_2][1 + k_3/k_4]$ 、組織対血漿中のトレーサー濃度の平衡比)および結合能(BP、標的密度に比例)のいくつかの変数が挙げられる。これらの結果の優れた総括は、Wuら、The Journal of Nuclear Medicine. 1998; 39 : 117-425において提供される。

#### 【0047】

2つの組織コンパートメント的アプローチは、個々の速度定数またはマクロパラメーター、特に $^{18}F$ -フルルピリダズなどの動態が遅い放射性トレーサーに対して、固有または精

10

20

30

40

50

度の高い推定を提供できないことがある。これらの例において、モデルの図式的変換は、偏ることもあるが、より確固たるトレーサー取り込みおよび結合の特徴決定を生み出す。さらに、これらの線形化方法は、計算的に効率的であり、パラメトリック画像の生成のためのピクセル単位の分析を促進することができる。したがって、これらの技術を研究し、偏り／精度の得失評価を評価するのが有利でありうる。結果パラメーターの安定性を改善する、コンパートメントモデル構成内に依然として残っているもう1つのアプローチは、異なる領域間で共通するか、または関連するパラメーターを結合させる「グランドフィット (grand fit)」において多数の領域を同時に分析することである。上述したように、 $K_1/k_2$  比および  $k_4$  は、領域間の生理的変動がわずかしかないか、全くないことが予想され、結合フィッティングについて検討されるであろう。このアプローチは、空間的統一性および結果パラメーターの正確度と精度との間の妥協の仮定の妥当性に関して特徴付けられうる。

10

#### 【0048】

##### 血漿入力関数：

血流およびBPを評価するためのすべての方法は、入力関数の測定の恩恵を受けうる。心筋虚血のブタモデルの選択は、心筋に対する濃度歴、左心室および右心室を、同時かつ非侵襲的に得ることができるという点において、PET画像化にとって有利である。動的PETデータの一般化された因子分析(GFADS)による左右心室についての濃度曲線は、以下の記載のようにして得ることもできる：El Fakhri G, Kardan A, Sitek Aら、Reproducibility and accuracy of quantitative myocardial blood flow assessment with (82)Rb PET : comparison with (13)N-ammonia PET. J Nucl Med. Jul 2009;50(7) : 1062-1071 and El Fakhri G, Sitek A, Guerin B, Kijewski MF, Di Carli MF, Moore SC. Quantitative dynamic cardiac 82Rb PET using generalized factor and compartment analyses. J Nucl Med. Aug 2005;46(8) : 1264-1271。

20

#### 【0049】

1つの態様において、GFADS入力関数は、ノイズに対してロバストであり、スピルオーバーによって最小限しか影響を及ぼされないので、GFADSは、本明細書に記載のシステムおよび方法の実行において有益である。PET動脈濃度を検証するために、および血漿対全血における $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズに対する活性比を決定するために、そして、標識代謝物を特徴付けるために、補足の血液サンプルを用いることが可能である：全血および血漿活性濃度を測定するために、サンプルを秤量し、計数し、次いで沈降させることができる。ヘマトクリットおよび標準血液ガス測定も行なうことができる。限外ろ過によって、ブタごとに、フルルピリダズの遊離画分を決定することができる。血漿代謝物分析を、HPLCによって行うことができる。もし血漿遊離画分がブタ間で一定ならば、BPを、 $\text{BP}_p$ としてコンピューターで計算することができる；別法として、BPを、 $\text{BP}_f$ としてコンピューターで計算することができる。

30

#### 【0050】

##### ブタ心筋において慢性虚血を誘導するための動物の外科的準備：

動物プロトコルは、本明細書に記載のシステムおよび方法の実行に有用でありうる。1つの態様において、モデルの実行のために、いずれかの性別の家畜ブタを用いることができる。気管内挿管および人工呼吸器を一般的麻酔下で行うことができる。挿管および外科手術の前に、チアミラールの静脈内投与によってブタを予め処置することができる。1つの態様において、ハロタン(0.5-1.5 %)および亜酸化窒素(60%)と酸素(40%)の混合物で麻酔を維持することができる。中心血行動態(たとえば、動脈pH、 $\text{pCO}_2$ 、 $\text{pO}_2$ )およびECGを調査し、生理的範囲内に維持することができる。各ブタにおいて、部分的(冬眠心筋を引き起こす)および完全狭窄(梗塞心筋を引き起こす)の両方を誘導することが可能である。冬眠心筋に対して、現像を可能にするための2~4週間経過後に、画像化を行いうる。しかしながら、冬眠状態を達成するためには、より長い時間が必要であり、この場合、動物プロトコルを適切な方法で調節することができる。

40

#### 【0051】

50

冬眠心筋を誘導するために、左前下行（LAD）枝冠動脈の不完全結紮によって部分閉塞性狭窄を作り出すことができる。左第四肋間空間のレベルにて、10-15 cm切開の開胸術を行うことができる。LAD区域において慢性低レベル虚血を誘導するために、LAD動脈の近位第3を部分的に縫合することができる。動脈圧をモニターするために、25ゲージのカニューレを、閉塞より遠位のLAD動脈に置くことができる。LAD区域において、心筋血流を40%に減少させることができる。

#### 【0052】

梗塞心筋を誘導するために、遠位の左回旋（LCX）冠動脈における完全結紮によって、完全狭窄を作り出すことができる。上述の手順と類似の手順を用いることができる。動物の生存を確実にするために、閉塞後、ECGおよび血行動態を注意深くモニターすることがで

10

#### 【0053】

外科手術後、創傷を閉じ、縫合することができる。動物は、外科手術の日に適用され、72時間継続する疼痛管理のために、フェンタニルパッチを受けることができる。1つの態様において、手術直後の期間の後、動物を毎日観察する。もう1つの態様において、動物は少なくとも毎日2回観察され、追加の観察は価値がありうる。一定期間、たとえば、閉塞から2~4週間後に、虚血を確認するために、ブタを $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズで画像化することができる。もし、スキャンがLAD区域内の機能不全領域を示すならば、冬眠心筋が確立され、実際の $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPETを進めることを決定されうる。そうでない場合は、さらなる期間（たとえば、1週間）手順を遅らせることができ、冬眠状態が確認できるまでPETスキャンを繰り返して、心筋を評価することができる。一旦冬眠状態が確立されたら、第2日または7日以内に、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの崩壊を許可するためにブタを画像化することができる。

20

#### 【0054】

##### $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET動物研究のための画像化プロトコル：

すべてのPET研究を、任意の適当な分析方法を用いて行うことができる。たとえば、分析方法の1つとして、ポジトロンエミッショントモグラフィーおよびコンピューター断層撮影法（PET-CT）が挙げられる。PET研究の前に、左第5肋間空間において開胸術を行って、PET研究中のマイクロスフェアの注入のために、左心房にカテーテルを挿入することができる。動物は、10 mCiの $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの注入用量にて120分間の動的PET研究を受けることができる。しかしながら、所望の研究の結果に応じて、研究のための時間枠および $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの用量を変えることができる。カテーテルを介して、左心房に放射性マイクロスフェアを注射して、参照流測定値を提供することができる。PET研究中、参照入力関数の測定のために動脈血サンプルを採取することができる（実施例1の血漿入力関数を参照）。PET研究の終了時に、ブタは屠殺されうる。切除された心臓に、まず、RCAを介してモナストラルブルーを注入して、無傷の心筋を染色し、次いで、心房および右心室を切り取ることができる。切開した心臓を、同じ厚さのスライスになるように心筋を短軸スライスするために（たとえば、8スライス）、主要な垂直長軸-水平長軸に再配向させることができる。各スライスをさらに、インビトロおよびマイクロスフェアアッセイのための良好な精度を提供するのに十分に大きいセクション（たとえば、約25セクション）に分割することができる。各セクションを、トリフェニルテトラゾリウムクロリドで染色し、その虚血状態を特徴付けることができる。マイクロスフェア流の測定のために、ウエルカウンターで組織サンプルを計数することができる。その次に、組織サンプルを、MC-I活性アッセイにおいて用いることができる。ROI分析を用いて、コンパートメント分析のための濃度歴を抽出することができる。ROIは、インビトロ分析に用いた死後スライスセクションによく一致するように描かれうる。1つの態様において、パラメーター $K_1$ 、 $k_2$ 、 $k_3$ 、 $k_4$ およびBPは、PETの最小二乗フィッティングによって測定されうる。しかしながら、他の適当な測定技術を用いることもできる。

30

40

#### 【0055】

この研究のために自動画像表示ソフトウェアは開発されており、標準短軸および長軸表

50

示に心筋を配向させるため、ならびに自動区分け法によって極性マップを生成するために用いることができる。このような自動化のための方法は確立さ r ふえている。これらの方法は、観察者間のばらつきを無くすことができるように、データ解析および測定されたパラメーターの検証において重要でありうる。

#### 【0056】

生化学アッセイによるMC-Iのインビトロ検証：

MC-Iウエスタンブロット分析のために、それぞれ、正常、冬眠および梗塞心筋の組織サンプル(200 mg/サンプル)を単離して、サンプル平均および平均の標準誤差をコンピューターにより計算することができる。1つの態様において、20個の組織サンプルを単離して、統計的に有意な結果を得ることができる。各サンプルの中央部分(たとえば、2x2 mm/サンプル)の病理解析を行なうこともできる。病理解析を簡単に述べると、各サンプルの中央部分を、たとえば、4%パラホルムアルデヒド中で一夜保存し、薄片にし、正常、冬眠および梗塞組織特性の確認のために分析することができる。

#### 【0057】

いくつかの態様において、ウエスタンブロット分析は、定量的および定性的の両方でタンパク質濃度を評価するための有用なツールでありうる。たとえば、組織サンプル(たとえば、200 mg)を、液体窒素でスナップ凍結し、次いで、数体積(たとえば、9)の緩衝液中で、4°Cにてホモジナイズして、組織溶解液を作成することができる。総タンパク質を抽出し、サンプル当たり15 µgに定量し、プロテアーゼインヒビターカクテル錠剤で処理することができる。無傷のMC-I多量体複合体の発現レベル/無傷の15 µgのタンパク質を、4-12% 1-D SDS-PAGE (Novex)によって分析し、PDVF膜に移し、非特異的にブロックし、MC-Iに特異的な8kDaサブユニットに対する一次マウス抗ウシMC-Iモノクローナル抗体(Mitosciences、MS109、TBS中、1:500 希釈、0.1% Tween 20、5% BSA)を用いて、25°Cにて2時間プローブすることができる。しかしながら、MC-Iに結合するいずれかの他の適当なプローブを上記のプローブと置き換えるか、またはそれに加えて用いることができる。1つの態様において、アクチンおよびポーリンは、ミトコンドリアハウスキーピング標準として働くことができ、4 µgの単離されたウシミトコンドリア (Mitosciences、MS802)は、ポジティブコントロールとして働くことができる。膜を、数回洗浄し、ホースラディッシュペルオキシダーゼに複合した二次抗マウス抗体(Amersham Biosciences)で、25°Cにて2時間インキュベートし、洗浄し、ECLウエスタンブロット検出キット(Amersham Biosciences)を用いて展開することができる。いくつかの一次抗MC-I抗体は、ウシ、ヒト、マウスおよびラットMC-Iに対して反応性であり、ブタMC-Iに対しても特異的である。

#### 【0058】

記載されたアプローチは、正常、冬眠および梗塞心筋におけるMC-Iタンパク質発現レベル(すなわち、BMSトレーサー結合部位の数)の定量および比較を可能にしうる。これまでに報告された研究に基づいて、梗塞心筋において70%、および冬眠心筋において20-40%のMC-I 複合体の低減化が予想される。

#### 【0059】

記載された方法は、2つの可能な制限を有しうる。第一に、汚染末梢血は、マイクロスフェア小血管閉塞により完全に除去されることができず、使用した各組織サンプルに対して測定される、心筋血流における差異を考慮することが重要である。それにもかかわらず、これは、マイクロスフェアの量に従属する主な制限ではなく、痕跡量のマイクロスフェアに対する制限よりも少ない。

#### 【0060】

第二に、もし、各心筋組織型におけるMC-I複合体の示差的ウエスタンブロット定量が失敗に終わるならば、各心筋組織サンプルにおける44個の呼吸鎖単位およびMC-Iに特異的な3つのアセンブリ因子の相対的タンパク質発現を、MC-Iライブラリを用いるタンパク質の質量分析を用いて同定することができる。

#### 【0061】

3つの心筋状態(正常、虚血、梗塞)においてMBFおよびMC-I発現を定量的に比較し、臨

10

20

30

40

50

床的に関連のあるタスクのための提案されたアプローチの性能を評価する：

各セグメントの時間-活性曲線を、入力関数が動的シーケンスの一般化された因子解析(GFADS)から抽出され、血漿濃度について補正される、本明細書に記載する2-コンパートメントモデルにフィットさせることができる。パラメーター $K_1$ およびBPを、心筋の各セグメントに対して、コンピューターで計算することができる。PETデータから、問題になっている被験者のそれぞれについての $K_1$ およびBPの約25の値が存在しうる（たとえば、8匹のブタについて約200の値）。マイクロスフェアおよびMC-I活性のインビトロ分析から、対応する約25のMBFの値および約25のMC-I発現レベル/被検者（ブタ）の値が存在しうる。複合のレベルおよび臨床的有意性を上昇させて、数回の分析を行うことができる。

#### 【0062】

1つの可能な分析は、「ウイズイン法 (within method)」である。本明細書において、セグメント条件は、テトラゾリウム染色心筋の目視研究によって、正常、虚血または梗塞として分類されうる。インビトロMC-Iおよび血流アッセイは、別々に比較されうる。統計分析は、カテゴリー変数のブロックおよび条件を現している被験者(ブタ)を用いるブロックデザインに従うことができる。正常、虚血および梗塞値が、有意に相違しうることが予想される。類似の分析が、PET血流およびBPに対して行われうる。

#### 【0063】

第2の可能な分析は、「プール分析 (pooled analysis)」である。この分析において、インビトロ終点は、PET終点に対してプロットされうる。たとえば、対応する変数としてMC-I発現レベルおよびPET BPのウエスタンプロット推定を考慮すると、各被験者(ブタ)における各セグメントは、MC-I発現レベルの測定に寄与する。1つの例において、プロットは、約200の点を含むことができる。データをプールすることによって、条件への分離は重要でなくなる。それにもかかわらず、データは、考慮されるべき個々のサンプル(ブタ)に帰属する差異を考慮して、異なる被験者(ブタ)によって識別されうる。PETおよびインビトロ推定の両方がノイズを有するので、単純な回帰法を使用することができない場合がある；代わりに、総最小二乗アプローチを用いることができる。これらの注意事項にもかかわらず、プロットは、相関関係を示すことができる。1つの可能な結果において、すべての心筋セグメントに対してコンピューターで計算された動的 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET MC-IおよびMBFは、相関分析によってインビトロアッセイおよびマイクロスフェアを用いて得られた測定値と、強くかつ正に相関する。N=200について、 $\alpha=0.05$ に対して89%の統計的検出力を達成するのが望ましい。

#### 【0064】

第3の可能な分析方法は、判別分析を含む。MC-I、またはMBF変数ならびに2つの変数のベクトル、すなわちPETによって測定されたMC-I結合能およびMBF、のいずれかを用いて、正常、冬眠および梗塞心筋間を判別することにおいて達成されうる判別力(discriminant power)を決定するために判別分析を行うことができる：El Fakhri G, Kijewski MF, Albert MS, Johnson KA, Moore SC. Quantitative SPECT leads to improved performance in discrimination tasks related to prodromal Alzheimer's disease. J Nucl Med. Dec 2004;45(12):2026-2031. PETによって達成された判別力、およびインビトロMC-Iアッセイおよびマイクロスフェア測定を用いて達成されうる参照判別力について、比較を行うことができる。

#### 【実施例3】

#### 【0065】

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを用いる霊長類モデルにおける予備研究：

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを用いるサル研究からの予備データに基づいて、MBFおよびBP<sub>p</sub>を評価するためのパラメーター精度を評価した。承認されたIACUCプロトコル下で、microPET P4を用い、4.1-kgのカニクイザルにおいて、100分間の動的 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ研究(1.25 mCi)を行った。

#### 【0066】

microPETプライメート4-リングシステム(P4)は、軸方向長7.8 cm、直径横断視野(FOV)1

10

20

30

40

50

9 cmおよび動物ポート22 cmの動物用PET断層撮影装置である。システムは、それぞれ、直径26cmの32の結晶リングとして配列された、 $2.2 \times 2.2 \times 10 \text{ mm}^3$ のルテニウムオキシオルソシリケート結晶の8 x 8アレイをもつ168の検出モジュールからなる。検出結晶は、長さ10 cmの光ガラスファイババンドルを介してハママツR5900-C8 PS-PMTに連結される。検出器は、3.2 nsのタイミング分解能、26%の平均エネルギー分解能および1.75 mmの平均固有空間分解能を有する。システムは、平面間の隔壁(inter-plane septa)なしで、3Dモードで作動し、リストモードでデータを獲得する。再構築された画像空間分割は、4 cmのラジアルオフセットにおいて中央で1.8 mmから3 mmの範囲である。断層撮影装置は、FOVの中央において、2.25%のピークシステム感度および250-750 keVのエネルギーウィンドウを有する。ノイズ等価カウント率は、代表的目的物サイズに対して100-290 kcpsにおいてピークとなる。

#### 【0067】

図2Aは、短軸および長軸における心筋のまとめられた画像を示す。左心室(LV)および右心室(RV)入力関数をGFADSで抽出した。図2Bは、血液サンプルおよびROIベース入力関数と比較した、GFADS抽出LV入力関数を示す。GFADS入力関数は、GFADSデータとよく整列し、より少ない部分容積効果およびより少ないスピルオーバーからのコンタミネーションを有する。

#### 【0068】

心筋に描かれた対象の領域からの時間-活性曲線を2-コンパートメントモデルにフィットさせた。パラメーターSDは、非線形最小二乗フィッティングから誘導された非対称共分散行列からコンピューターで計算される。推定パラメーターは次のとおりである： $K_1=0.51$  (SD=1.5%)、 $k_2=0.075$  (SD=4.7%)、 $k_3=0.026$  (SD=10.2%)、 $k_4=0.016$  (SD=10.4%)、 $k_3/k_4=1.65$  (SD=4.0%)。図3Aは、フィットされた時間-活性曲線を示す。 $K_1$ および $BP_p$ を推定するために、図3Bにおいて $K_1$ について、図3Cにおいて $BP_p$ についてプロットしたように、1分~100分の範囲の、異なる研究期間を用いた。データの10分間で、 $K_1$ の推定が高い精度を達成しうることが見い出された(SD<10%)。それに対して、BPは、より長い測定期間を必要としうる。

#### 【0069】

モデル選択は、異なるモデル配置による適合度を定量的に評価することによっても試験されている。2-コンパートメント可逆的モデルは、推定するための多くのパラメーター(6つ、LVおよびRVからのスピルオーバー画分を含む)を有するが、2-コンパートメント不可逆的モデル(無視された $k_4$ を用いて推定するための5つのパラメーター)および1-コンパートメントモデル(結合なし、推定するための4つのパラメーター)と比較して、残差を減少させることができる。赤池情報量基準(AIC)およびF-検定を用いて、より複雑なモデルが好ましいか、残差を有意に減少させるかどうかを客観的かつ定量的に決定することができる。結果を表1に示す。

#### 【0070】

表1：3つのモデル構成を用いる適合度の比較

|                   | RMSE | F-比         | AIC比 |
|-------------------|------|-------------|------|
| 2-コンパートメント可逆的モデル  | 1.12 |             |      |
| 2-コンパートメント不可逆的モデル | 1.78 | 28.29*      | 0.83 |
| 1-コンパートメントモデル     | 5.41 | 22.96*<br>* | 0.58 |

#### 【0071】

表1において、RMSEは、データ分散によって近似される加重による加重最小二乗法によって計算される。F-比は、2-コンパートメント可逆的モデルとほかの2つのモデルとの間のF-検定から計算される。臨界値は、それぞれ、4.06 (\*)および3.2 (\*\*\*)である( $\alpha=0$

.05)。F-比が臨界値より大きい場合、より複雑なモデルが好ましく、残差を有意に減少させる。赤池情報量基準(AIC)比は、2-コンパートメント可逆的モデルからのAICと他の2つのモデルからのAICとの間の比から計算される。一方よりも低いAIC比は、より複雑なモデルが好ましいモデルであることを示す。

#### 【0072】

が、最も低い根平均二乗誤差(RMSE)を有し、F-検定およびAICにおける残差を有意に減少させることが見いだされた。すべての3つの基準は、霊長類研究からのデータをフィッティングする場合、結合メカニズムをもつ2-コンパートメントモデルが好ましいことを確認し、このことは、結合が、研究期間が相対的に長い場合に考慮されることが重要な要素であることを示している。

#### 【実施例4】

#### 【0073】

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズを用いる臨床研究におけるMBFについての予備分析：

$^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの臨床試験第II相にある患者のグループにおいて、動態モデリング分析によりMBFをコンピューターで計算した。10人の健康な被験者および6人のCAD患者において、休息およびストレスPET研究を別々に行った(図4A-4B)。臨床試験において、画像法は30分後に終了し、BPの決定は実行できなかった。生存心筋領域および適用可能ならば、休息とストレス研究の間でミスマッチを示す虚血領域にわたって、各被験者に対しMBFを推定した。休息-ストレスおよび健康/虚血心筋について推定したMBFを表2にまとめた。

#### 【0074】

表2：臨床 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズにおける推定MBF (mL/g/分)

|      | 健康な被験者    | 患者における正常な心筋 | 虚血心筋      |
|------|-----------|-------------|-----------|
| 休息   | 0.67±0.01 | 0.73±0.04   | 0.86±0.06 |
| ストレス | 2.84±0.06 | 1.78±0.07   | 0.73±0.07 |

#### 【0075】

残りの研究中、健康心筋および虚血心筋の間で、MBF(t-検定、 $\alpha=0.05$ )において有意な差異はなかった。しかしながら、薬理学的なストレス中、MBFは、健康心筋において3倍以上増加し、虚血領域ではほぼ同じままであった。 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズのための動態モデリングで測定されたMBFは、これまでに報告されたMBFと一致する。これらの研究の短い獲得期間ゆえに、推定BPの満足できる精度は、達成されなかった。 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの動態分析は、臨床心臓PETでのMBFの絶対量測定において、その高いポテンシャルを示す。

#### 【実施例5】

#### 【0076】

BPを測定するための予備的シミュレーション研究：

異なる心筋状態におけるパラメーター精度を評価するためのシミュレーション研究をおこなった。モンテカルロシミュレーションを用いて、正常心筋について $\text{BP}_p=11.3$ 、冬眠心筋について $\text{BP}_p=8.2$ (30%低下)および梗塞心筋について $\text{BP}_p=3.5$ (70%低下)でシミュレーションされた時間-活性曲線を用いるリアリスティック動態PETデータを一般化した。シミュレーションされたノイズフリーサイノグラムデータにポアソン偏差を加え、次いで再構築することによって、50のノイズ・リアライゼーションを繰り返した。60分および100分のデータを用いると、類似の偏りが生み出された(図5)。 $\text{BP}_p$ は、正常領域において過小評価(約-5%)され、梗塞領域において過大評価(約10%)される。この差異は、梗塞心筋における、より低い $k_3$ に起因するといえる；したがって、正確な $\text{BP}_p$ 推定は、より長い研究期間を必要としうる。精度に関して、60分フィットは、正常、冬眠および梗塞心筋において、17.1%、20.4%および15.9%のSDを有するが、100分SDは、それぞれ3.0%、4.7%および7.9%である。これらの予備的データは、3つの虚血状態から推定された $\text{BP}_p$ は、精度において

同じ傾向をたどることを示す。

【0077】

本発明は、1つ以上の好ましい実施態様に関して記載されているが、多くの等価物、変更、変化および修正が、他に特記されない限り、可能であり、本発明の範囲に含まれる。

【0078】

発明概念の1つの態様において、成果は、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズなどの作用剤によるPET画像化に基づいた、ミトコンドリアの領域的分布をマッピングするための技術である。本願明細書に詳述するように、文献調査は、ミトコンドリア機能不全が関連し、この画像化技術が調査または臨床ケアに適用可能である、多くの疾患を見い出している。

【0079】

1つの実施態様において、単一の $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET研究からMC-I発現レベルを定量する方法が提供される。1つの態様において、コンピューターで計算されたMC-I結合能の感度を、研究期間の関数として審査することができる。感度分析に基づいて、臨床的に実行可能であり、MC-I発現の信頼できる定量を提供する実験プロトコルが提供される。

【0080】

もう1つの実施態様において、重篤度の度合いの異なる慢性心筋梗塞のブタモデルを用いて、MC-I発現ならびにMBFを変更することができる。 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPETで測定されたMC-I発現レベルおよびMBFを、それぞれインビトロアッセイおよびマイクロスフェアにおける対照と比較することができる。1つの態様において、慢性虚血は、LADおよびLCX冠動脈領域における部分的および完全閉塞を有するブタ心筋において誘導されて、MC-I発現レベルを変更する。MC-I発現レベルを、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPETおよびインビトロ分析によって定量することができる。もう1つの態様において、 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズPET動態パラメーターからコンピューターで計算されたMC-I発現レベルおよびMBFを、MC-I発現のためのインビトロアッセイおよびマイクロスフェア(MBF)のための対照研究法に対して比較することができる。

【0081】

さらにもう1つの態様において、3つの状態の間で区別するという臨床タスクのために提案しているアプローチを評価するために、MBFおよびMC-I発現の差異を、3つの心筋状態（正常、虚血、梗塞）において比較することができる。 $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ動的PETを用いてコンピューターで計算されたMBFおよびMC-I発現の正確度および精度を、対照インビトロアッセイおよびマイクロスフェアと比較して評価される。

【実施例6】

【0082】

梗塞ブタにおける $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズ心臓PET研究：

上述と同様の手順を用いて、2つの家畜ブタを研究した。各動物を、外科手術的梗塞および合成された前駆体を用いる放射標識された $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズによる動的PET画像化に付した。再構築された画像は、図6Aにおいて明らかなように、頂端-前壁病変などの明らかな心筋梗塞を示したが、そのことは、解剖により裏付けられた（図6Bの写真参照）。ウェスプロットにより、健康な心筋と比較した場合の損傷された組織サンプルにおけるMC-I発現の減少が示された（図6C）。動的PETシリーズにGFADSを適用して、左心室および右心室から曲線を抽出した。予備的サル研究において観察されたように、GFADSによって抽出されたLV曲線は、動脈血サンプルと良好に一致した。PET濃度曲線を、心臓の17の標準セグメントを描いている対象領域における動的PETデータから抽出した。

【0083】

上記の可逆的結合を有する2-組織コンパートメントモデルを用いて、組織曲線を分析した。サル研究と再び同様に、このモデルは、健康な心筋からのデータに非常によくフィットする；さらに、損傷組織におけるフィットもまた、非常に良好であった（図6D）。17のセグメントのフィッティングは、信頼できない推定BPをもたらししたが、 $K_1$ およびマクロパラメーター $V_T$ の値は、ロバストであり（典型的COV<10%、領域によって）、健康組織と比較して損傷組織において著しく減少した。損傷組織において、 $V_T$ の減少（約75%）は、 $K_1$ の

10

20

30

40

50

減少（約50%）よりも大きかった；このことは、 $V_T$ の減少を、灌流がより低くなったことによって完全には説明することができなかったことを示唆している；したがって、MC-Iにおける $^{18}\text{F}$ -フルルピリダズの結合の低下に関連する。

#### 【0084】

領域にわたって結合する $k_4$ を有する2-組織モデルの使用は、個々の速度定数ならびにマクロパラメーターの精度を改善した：外れのBP値も残ったが、 $K_1$ 、 $V_T$ およびBPは、信頼性をもって推定された。 $k_4$ のグローバル値は、非結合フィットで観察された分布と一致した。 $K_1$ 、 $V_T$ およびBPはすべて、健康な組織よりも損傷を受けた組織においてより低かった；より精度の高いBPの推定により明らかとなった特異的結合の減少と一致して、 $V_T$ は再び、 $K_1$ よりも低かった。データへのモデルフィットは、非結合フィットと比較して、大部分の領域において適合度における影響はほとんど知覚できず、非常に良好であった。

#### 【0085】

領域にわたって $V_{ND}=K_1/k_2$ を結合したグランドフィットは、共通 $k_4$ の使用と類似するが、特に虚血および梗塞セグメントにおけるフィットの品質において、いくらか大きい影響をもつ一般的效果を生み出した（図6D）。グローバル $V_{ND}$ は、非結合フィットから得られた値の代表であった。特に、共通 $V_{ND}$ をフィッティングすることは、結合している $k_4$ よりもさらに、BP推定値を標準化した；BP値はロバストであり、損傷組織において90%までの結合減少を示した。 $V_{ND}$ および $k_4$ の両方を結合させるためにグランドフィットを合せることは、1つのパラメーターにおける非結合フィットまたはグランドフィットから得られるものよりもわずかに悪いが、依然として満足できるものであるモデルフィットを生み出した。推定されたパラメーターの精度は、単一の共通パラメーターを結合させる場合に見られる有利な効果以上にさらに改善され、健康、虚血および梗塞組織における領域的 $K_1$ 、 $V_T$ およびBP値間の区別が保持された。結合したパラメーターの使用のせいでパラメーター分散減少は、より短いスキャン期間（たとえば、120分と比較した場合の60分のデータ）を評価した場合にさらに大きかった。この観察は、最適および実用的な実験プロトコルの設計における有望な戦略としてのパラメーター結合を提示する。これらの結果は、(i)虚血のブタモデルを達成する能力、(ii)MC-I発現の定量のためのウエスタンブロッティング、および(iii)2-組織コンパートメントモデル、特に、領域にわたる共通パラメーターを用いるグランドフィットのためのモデルは、単回動的PET研究からの健康組織および損傷組織における局所灌流およびMC-I結合についての情報を提供すること、を実証する。

#### 【0086】

要約すれば、MC-I受容体密度のPET測定は、MC-I密度のインビボアッセイであるとみなすことができる。MC-I密度は、慢性および急性の多くの疾患によって影響を及ぼされる。インビボアッセイには、密度を推定するための、ソフトウェアを含む、分析的な手順などの必要な多くの構成要素がある。該構成要素は、適当な放射性医薬の使用を含む；フルプリダズは、その動態が遅いことから、都合がよいけれども理想的ではない。患者がアッセイに適切な様式でスキャンされ、単一画像ではない、研究室的構成要素もある。さまざまな実施態様は、すべてのこれらの成分を含み、ミトコンドリア活性の非侵襲的定量を可能にする。

#### 【0087】

本明細書に記載の各参考文献は、参照することによって本明細書に援用される。

#### 【0088】

本発明の概念は、特定の実施態様に関して記載されているが、当業者は、本発明の概念の精神から逸脱することなく、さまざまな置換および／または他の変更が実施態様になされうることを理解するであろう。したがって、前述の記載は、例示的であることを意味し、本発明の概念を制限するものではない。

#### 【0089】

多くの例が、本明細書に記載されている。それにもかかわらず、さまざまな修正がなされてもよいことを理解すべきである。たとえば、異なる順序で記載された技術が行われる場合、および／または、記載されたシステム、構造、デバイスまたは回路内の構成要素を

10

20

30

40

50

異なる様式で組み合わせる場合、および／または、他の構成要素もしくはその等価物によって置き換えらるかもしくは補足する場合、適当な結果を達成することができる。したがって、他の実行は、本発明の概念の範囲内にある。

【図 1 A】

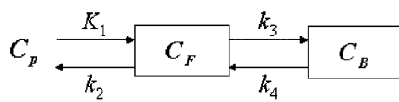


FIG. 1A

【図 1 B】

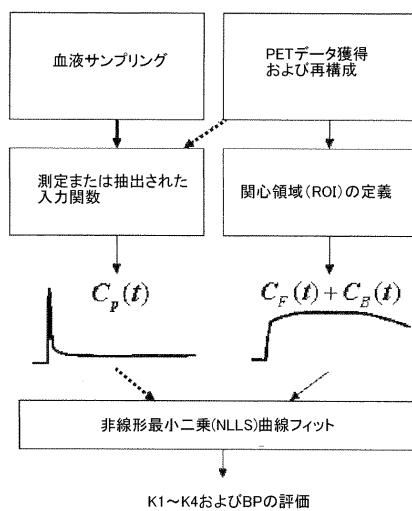


FIG. 1B

【図 1 C】

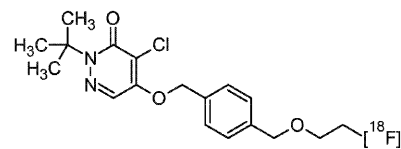


FIG. 1C

【図 2 A】

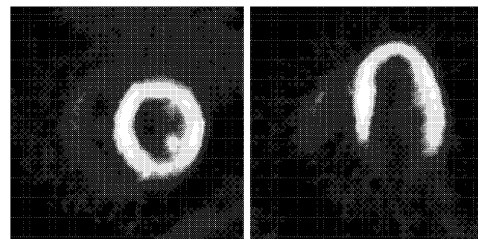


FIG. 2A

【図 2 B】

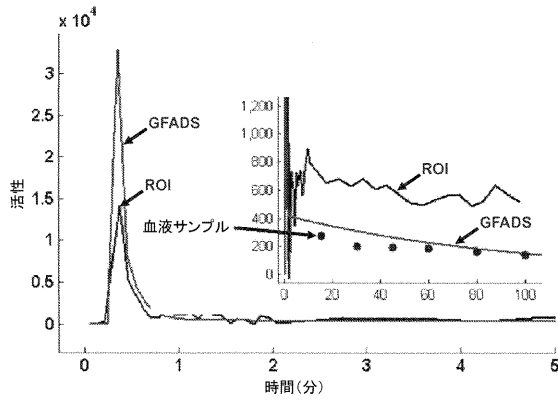


FIG. 2B

【図 3 A】

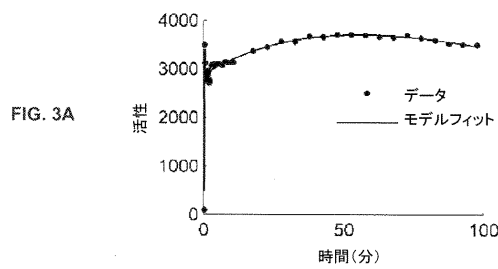


FIG. 3A

【図 3 B】

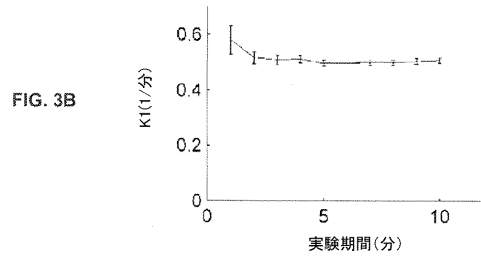


FIG. 3B

【図 3 C】

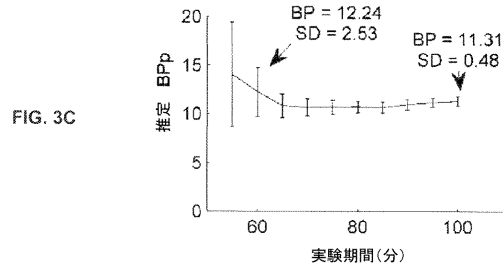


FIG. 3C

【図 4 A】

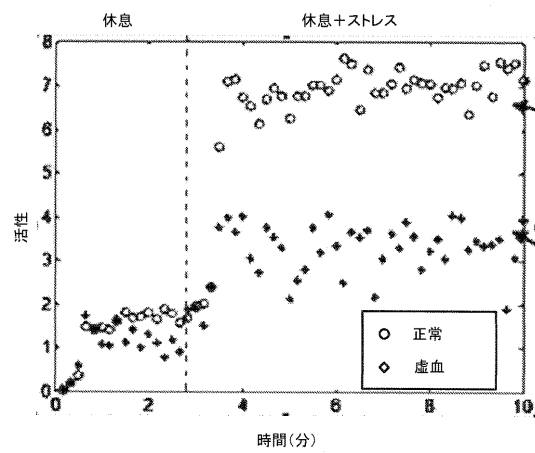


FIG. 4A

【図 4 B】

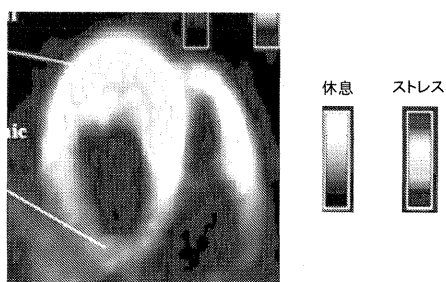


FIG. 4B

【図 5】

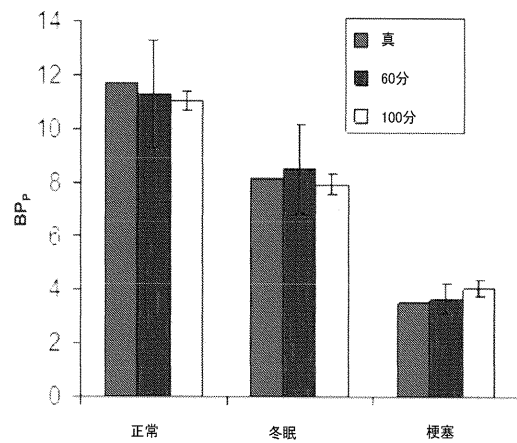


FIG. 5

【図 6 A】

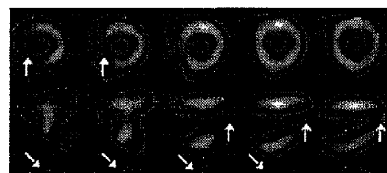


FIG. 6A

【図 6 B】



FIG. 6B

【図 6 C】

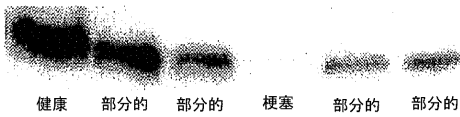


FIG. 6C

【図 6 D】

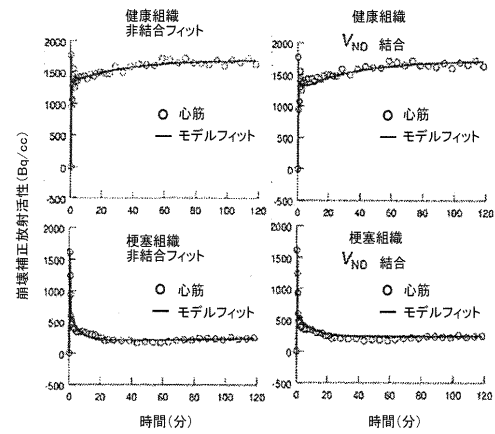


FIG. 6D

【図 7】

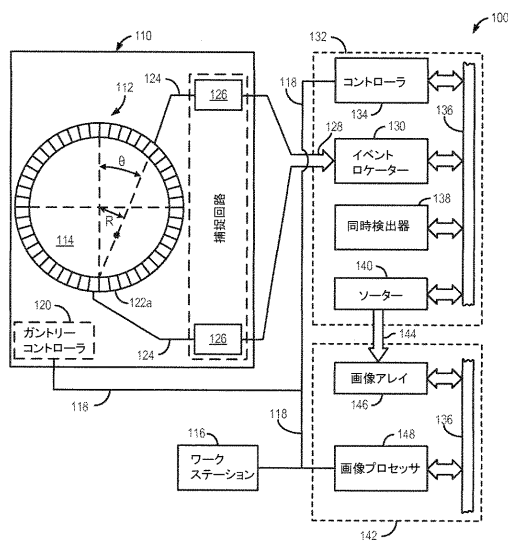


FIG. 7

【図 8】

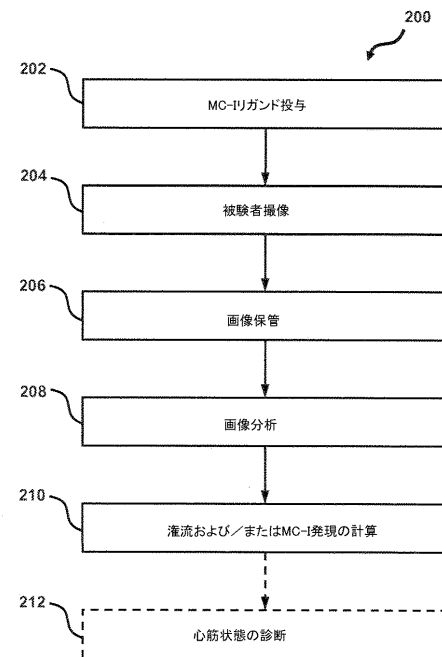


FIG. 8

---

フロントページの続き

(72)発明者 ナサニエル・アルパート

アメリカ合衆国02114マサチューセッツ州ボストン、フルート・ストリート55番

審査官 伊藤 昭治

(56)参考文献 特表2011-513306 (JP, A)

Nathaniel Alpert, Medical Physics, 2012年10月11日, vol.39, No.11, 6609~6620頁, URL, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3482258>

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01T 1/161