

出國報告（出國類別：實習）

瑞典 Karolinska 研究所研習正子放射同位素標幟藥物之應用研究

服務機關：核能研究所

姓名職稱：陳威希 副工程師

派赴國家：瑞典

出國期間：102 年 9 月 29 日~102 年 10 月 26 日

報告日期：102 年 11 月 26 日

摘要

應用 ^{11}C 及 ^{18}F 等正子核種標幟藥物及正子放射斷層掃描於疾病診斷、中樞神經功能評估、藥物研發等研究方向逐漸普及。本所輻射應用科技中心亦積極著力於相關研究，包括迴旋加速器應用生產 ^{18}F 或其它核種， ^{18}F labeled ligands 研究、腦中樞神經單光子放射斷層掃描(SPECT)、正子放射斷層掃描(PET)、核磁共振(MRI)等造影診斷藥物臨床前研究。未來可能的發展方向，包括利用放射核種如 ^{18}F 、 $^{123/124}\text{I}$ 等為示蹤劑，研究標幟藥物進入實驗動物體內之去向及停留時間、代謝排除速率，以為開發治療新藥研究代謝機制的工具之一。筆者配合「本土好發性疾疾病輻射應用及分子影像技術平台」計畫，執行「碳氫同位素標幟藥物於代謝動力學研究應用實習」出國研習，以為上述輻應中心目前及未來數年內將進行的藥物研發任務建立相關能力。

Prof. Christer Halldin 領導瑞典 Karolinska Institute Hospital 神經科學部正子斷層造影中心(PET Center)，以 ^{11}C 及 ^{18}F -ligands 及 PET 影像研究中樞神經系統病變與 biomarkers 功能間關聯性、機轉，開發與臨床驗證 PET 新藥。研究成果發表於重要期刊及國際研討會，皆受到高度肯定，如獲得許多學會研究獎可證明。PET Center 與數家藥物開發公司合作研究新藥中。這些工作內容與本所輻應中心之使命相當契合，因此吸引筆者前往實習。

實習期間，筆者著重於 ^{11}C 及 ^{18}F -ligands 製備、血液中藥物含量測定、microsome 藥物代謝物實驗及分析、標幟藥物及實驗廢棄物管理、利用微胞流動相層析法直接分析血漿中 ^{11}C -ligands 含量等，分別詳述及討論於實習內容。此外，並將此行之體驗心得記錄，與同仁分享。

目 次

摘 要

(頁碼)

一、目 的	1
二、過 程	1
(一) 過程說明	1
(二) 實習單位簡介	3
(三) 實習內容摘要記錄	6
三、心 得	22
四、建 議 事 項	29
五、附 錄	30
附錄一	30
附錄二 Microsome 藥物代謝研究實驗步驟	33
附錄三 PET Center 使用 ^3H 標幟藥物作業實驗室記錄相關表格	35
附錄四 PET Center 研究中藥物資料表	36
六、參 考 文 獻	38

一、目的

本所長期積極推動同位素的生物醫學應用，包括放射同位素用於疾病診斷、放射治療等。疾病診斷方面，又可分為利用伽瑪射線的單光子放射斷層掃描(Single Photon Emission Computed Tomography, SPECT)及正子放射斷層掃描(Positron Emission Tomography, PET)。分別針對同位素核種的生產製備、輻射性質、ligand 對作用標的選擇性與靈敏度的動物實驗、ligand 與 linker 的開發設計與合成製備等技術層面分頭研究發展，期能開發低劑量、高靈敏度與專一性的核醫藥物，以早期診斷、發現病灶、給予有效治療，為國人健康貢獻心力。此外，利用放射同位素的示蹤性，研究藥物在活體之去處、在器官組織停留時間、代謝途徑與排除速率、代謝反應機制等新藥開發過程所關切的問題，是未來同位素應用與藥物研發可能的發展方向。核醫藥物鑑定分析實驗室(以下簡稱本室)肩負本所核醫藥物研發與生產，供應醫院進行 SPECT 或 PET 影像診斷、臨床或臨床前研究之藥物純度、含量與結構分析需求、研究藥物代謝等任務。為精進本實驗室藥物分佈與代謝研究技術能力、應用輻射同位素標幟藥物分析技術、學習正子造影試劑研發與應用之趨勢與經驗等課題，筆者接受本所指派，跨海遠赴瑞典首都斯德哥爾摩，向全球知名 PET 核醫藥物研發機構 Karolinska 大學附設醫院精神科正子研究中心 Prof. Christer Halldin 研究團隊學習 C-11、F-18 等同位素標幟藥物之生產及管理、PET 造影、藥物吸收、分佈、代謝研究方法，應用於核醫藥物、中樞神經藥物研究開發等相關技術。並期待與 Prof. Halldin 建立未來技術交流或合作關係。

二、過程

(一) 過程說明

公差行程摘要：

日期		停留/工作地點與工作內容	
1	9月29~30日	星期日~一	行程:29日由桃園機場搭機經曼谷，於阿姆斯特丹轉機，於30日下午抵達瑞典斯德哥爾摩。

2	10月1日~24日	星期二~四	在 Karolinska Institute，正子電腦斷層研究中心 Halldin 教授實驗室，進行實習研究工作。
3	10月25日~26日	星期五~六	行程:由斯德哥爾摩阿蘭達機場搭機，於阿姆斯特丹轉機，經曼谷於26日下午返抵國門。

1. 102年9月29日-10月1日(週日-週二)

行程由桃園機場出發(華航 CI-65)經曼谷中停、於荷蘭阿姆斯特丹史基普機場轉機往瑞典首都斯德哥爾摩。因班機在曼谷稍有延遲，抵達阿姆斯特丹時比預定時間晚約1小時。原定轉機航班此時剛好起飛，改搭3小時之後的荷航。於瑞典時間9/30傍晚抵達斯德哥爾摩阿蘭達機場，機場待機及飛行時間總計約需24hr以上。機場等待提領行李無所獲，經行李櫃檯電腦查知，我的行李因更換航班差錯，仍留置荷蘭，需待下一班機送抵阿蘭達機場，只得先留下旅館地址，等待第二天送到下榻旅館，成為此行意外插曲，造成許多不便，也獲得經驗：隨身行李應備禦寒衣物。住宿旅館 Metro Hotel，位於市中心南郊的 Hagersten-Liljeholmen 區，距離位於市區北郊的 Karolinska Institute (Solna 校區)約8公里，搭乘捷運及公車約需50分鐘可抵達。Karolinska Institute 是以醫學領域為主的大學，與附設醫院 Karolinska University Hospital 以馬路相隔。由 Halldin 教授領導的正子研究中心位於 Karolinska University Hospital，屬精神科(Psychiatry)，圖1為 Karolinska University Hospital 校園及 Psychiatry 位置。10月1日與 Halldin 教授見面、報到，隨即由實驗室成員帶領認識實驗室環境、設施及人員。準備即將開始在 Halldin 教授主持 PET 研究中心的實習工作。

2. 10月2日~24日(週三-週四)

除瑞典的例假日之外都在 Halldin 教授實驗室共實習17天。分別與 Nahid Amini, Stefan, 賈志勝(Jia)、Sarnyai、Ludqvist、Kaposy 等人討論及實習實驗過程。內容包括迴旋加速器運作、C-11、F-18 標幟藥物化學反應、對獼猴及病患臨床試驗靜脈注射 C-11、F-18 標幟藥物後正子造影及檢體活度量測、腦組織切片及 autoradiography、團隊工作討論、藥物代謝物分析及 H-3 標幟藥物管理操作、防護方法等。學習內容相當充實。

3. 10月25日~26日(週五-週六)

早晨 6 時即離開旅館，搭乘公車、轉接通勤鐵路前往阿蘭達機場報到登機，9:10 準時起飛，經荷蘭阿姆斯特丹轉機，經曼谷中停返抵國門，於 26 日下午結束本次實習之旅。

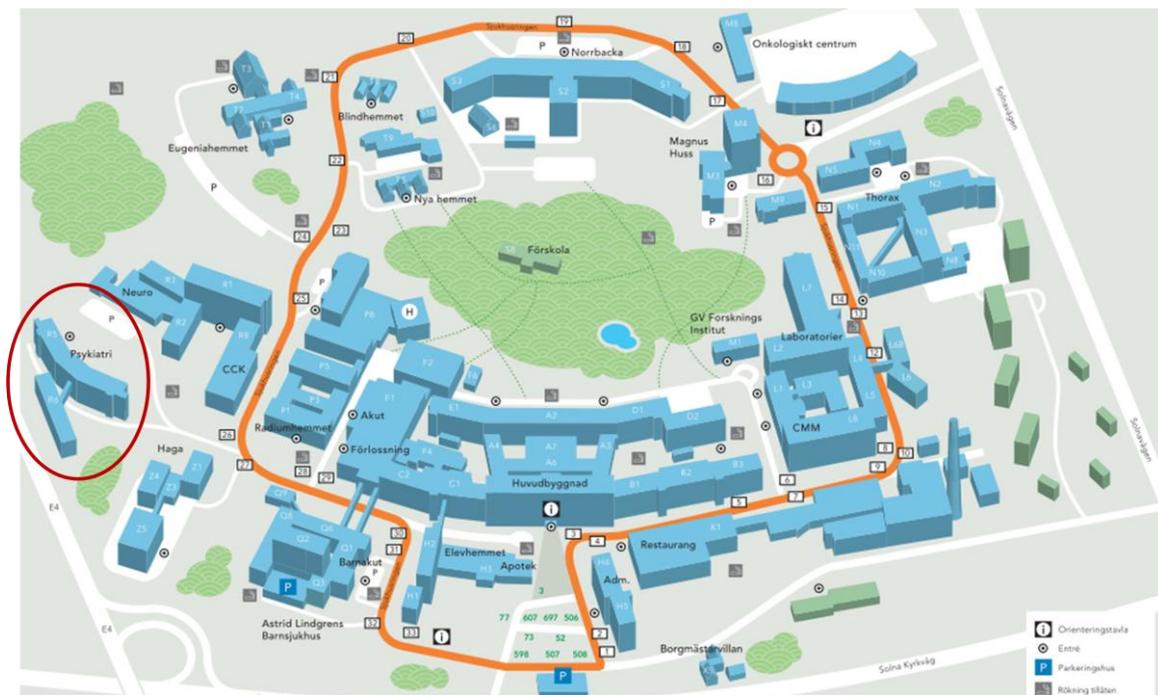


圖 1. Psychiatry 在 Karolinska University Hospital 之位置。

(二) 實習單位簡介

Karolinska Institutet (KI) 是以醫學領域科系為主要的研究大學，位於瑞典首都斯德哥爾摩，主校區及附屬醫院位於 Solna，另有 Huddinge、Danderyd 等二地校(分院)區。是瑞典全國排名首位的大學、全球大學排名為 30~40 名間，也是瑞典醫學研究重鎮，全國醫學研究 40% 以上由 KI 執行，在全球醫學研究亦是頂尖領導者之一。創立於 1810 年，即以訓練醫學人才為目的。1901 年起 KI 就負責諾貝爾生理醫學獎的評選工作。主要附設醫院及相關檢驗研究中心與校園以一路之隔。

本次實習單位 Prof. Christer Halldin 領導的正子放射斷層造影研究中心(Positron Emission Tomography, PET Center)，屬 Karolinska University Hospital 之臨床神經學科精神病學。自 1974 年起即開始發展 PET 技術應用於醫學研究，目前居於世界領導地位。Halldin 同時是醫學放射化學系教授。研究成果非常傑出，獲得許多國際重要科研獎項：四次 Marie Curie 獎(1992, 2001, 2005 及 2009 年)、Heikki Wendelin 獎(2011)、最佳科學論文獎”Springer

Verlag” (1999)、Radioactivity “100 Years” (1998)等。Halldin 教授 2005 年起擔任歐洲核醫學會藥物發展委員會主席。其領導研究團隊發表研究論著累計 800 篇以上，近年每年產出 40~50 篇論文；不僅量多，論文品質佳，每篇平均引用次數達 21 以上。其已建立神經醫學幾項基礎理論、提出開發新 radioligand 必須滿足的要件，包括高親和性、選擇性、合適親脂性、適宜的代謝速率、可逆的與受體結合等。

Prof. Halldin 利用正子標幟的 ligand 具高選擇性、專一性結合於對應受體或轉運體之特性，及正子斷層造影定位高靈敏度與解析度，提供非侵入性、精確的生物、生理功能影像，研究領域專注於發展中樞神經系統(central nervous system, CNS)之新正子放射斷層影像藥物，及由實驗動物影像研究轉譯應用於臨床病患。PET 中樞神經造影藥物關切的重點包括：對目標蛋白具高親合性、選擇性、專一性、親脂性(lipophilicity)、代謝、血腦障蔽(blood-brain barrier, BBB)滲透性等。開發多種對多巴胺、血清素、腎上腺素等激素之受體亞型、轉運體及酵素之 PET radioligands。應用於中樞神經系統異常，如神經精神症狀(neuropsychiatric)、中樞神經退化(neurodegenerative)、神經發炎(neuroinflammatory)、細胞自噬蛋白(autophagy proteins)所導致的精神疾病之臨床診斷。包括阿茲海默(老年失智)症、巴金森氏症、憂鬱症、躁鬱症、癲癇症、精神分裂症(Schizophrenia)等，亦用於藥物成癮等中樞神經功能評估。例如： ^{11}C -Flumazenil 用於癲癇症， ^{11}C -6-OH-BAT-1 用於阿茲海默症、 ^{11}C -raclopride 用於 Dopamine receptor 的造影劑等。

Halldin 教授的另一研究特點，有別於一般實驗室常用的大鼠(rat)、小鼠(mice)或其他動物，其試驗對象包括獼猴、臨床病患等活體，挑戰性更高；並保有猴腦、人腦樣本，可進行冷凍切片、與研發中 radioligand 溶液作用後以 autoradiography 方法獲得 radioligand 在腦組織不同區位結合受體之能力。如圖 2 為博士學位論文「PET Studies of the Serotonin Transporter in the Human Brain」為其中一例。

應用正子標幟 ligand 發展新藥，重要優勢之一在於其為非侵入性檢驗，進行藥物在活體試驗，試驗對象不需犧牲，間隔適當天數後可重複施用試驗藥物，免除更換不同試驗個體間之差異性，也因此特性，得以在獼猴及臨床病患實施研究、取得藥物在體內器官組織

之分佈資訊、藥物對受體之選擇性、可觀察生化分子與活體細胞功能變化相關性。近年，對神經影像的研究風潮更甚以往。Halldin 教授以核子影像醫學技術，整合 PET 及 MRI(磁共振造影, Magnetism Resonance Imaging)影像呈現器官組織立體結構訊息，開發新 radioligand 及中樞神經造影方法於研究腦神經功能。在其創新研究後，PET 與 MRI 成爲分子影像研究者發現生生物質與生物功能相關性的重要工具，藉以診斷病兆或研發新藥。其中，Prof. Halldin 的 PET Center 研究著重於：(1)神經科學基礎研究，(2)活體腦神經轉運體之生化特徵，(3)測試與驗證開發中之中樞神經系統候選藥物，(4)發展新分子影像生物標記，其目的包括①研究疾病相關之病理生理/生化分子之變化，了解疾病發生之生化機制；②呈現疾病之生物標記分子，獲得適用之分子影像診斷藥物；③發展新中樞神經藥物；④可提供臨床醫師追蹤/評估疾病進程、治療成效之得力工具。雖然 Halldin 研究著重於中樞神經系統，但此研究平台亦適用於其他器官病變之顯影診斷與藥物研發。

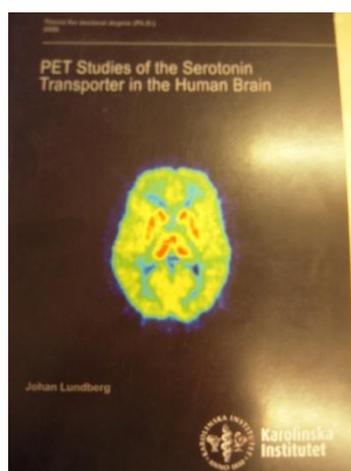


圖 2. 博士學位論文「PET Studies of the Serotonin Transporter in the Human Brain」

Halldin 教授仍與多家藥廠(如 AstraZeneca,Sweden)長期合作研發，藥廠提供研究中藥物及經費，PET 中心提供中樞神經藥物藥效與代謝驗證之研究平台，研發新 PET radioligands 及隨後的測試驗證工作，以生物標記分子影像方法早期診斷神經與精神疾病。證明 ^{11}C 或 ^{18}F -radioligand 可通過 BBB、有效與受體或轉運體蛋白結合、且具專一性、了解該 ligand 在體內吸收分佈等代謝行爲，確認副作用可能性等，則該不具放射性之 ^{12}C -ligand 可爲治療新藥。由近二十餘年全球用於中樞神經正子放射斷層掃描之例行診斷核醫藥物，約 1/3 是 Prof. Halldin 團隊參與研發之成果，可了解其成就斐然。

可用於 PET 造影劑的核種及其性質如表 1 所示。其中，C、N、O 皆為構成生物活性分子之基本元素，以其同位素 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 標幟 ligands 不影響該生物活性分子的性質；但 ^{13}N 、 ^{15}O 受限於半衰期短，標幟 ligands 難以生產及應用。而 ^{11}C -ligands 則用於新藥研究驗證、致病機轉，極少用於臨床例行檢查。而 ^{18}F 半衰期約 110 min，少數具備迴旋加速器的醫學研究中心可自行生產及應用於臨床病兆診斷，臨床最常用的 PET 造影劑即為 ^{18}F -FDG，另有數個 ^{18}F -ligands 進行臨床試驗中，如檢驗阿茲海默症的類澱粉斑塊沉積 PET 造影劑 ^{18}F -AV45 等。其它過渡金屬元素正子輻射核種標幟 ligand 不能代表試驗藥物的生物活性，儘適於作為示蹤劑，不用於治療新藥研究。

表 1. 用於 PET 造影劑的核種及其性質

核種	半衰期 (min)	最大能量(MeV)	水中最大射程 (mm)	製造方法
^{11}C	20.4	0.97	4	Cyclotron
^{13}N	9.96	1.20	5	Cyclotron
^{15}O	2.04	1.74	8	Cyclotron
^{18}F	109.8	0.64	2	Cyclotron
^{62}Cu	9.73	2.92	14	Generator, from ^{62}Zn
^{68}Ga	68.1	1.90	9	Generator, from ^{68}Ge
^{82}Rb	1.3	3.35	17	Generator, from ^{82}Sr

文獻出處: PET for Drug Development and Evaluation, edited by D.Comer (1995), P.26

(三) 實習內容摘要記錄

1. 正子核種標幟藥物之製備與管理

Prof. Halldin 使用 ^{11}C 及 ^{18}F 正子核種標幟藥物進行 PET 造影。由 Kaposy 博士帶領及解說，穿過正子中心的地下室走道，更換專用實驗室衣褲及鞋襪，進入迴旋加速器作業區。H₂ 或 D₂ 氣體在「雙 D 形磁場」中心游離、H⁺ 或 D⁺ 經射頻電場加速、在磁場繞圈，每通過一次 D 型磁場介面，因射頻電場差就獲得加速能量，迴旋半徑增大，最終射向靶 [有 6 個 channel 分別用於製備 ^{11}C (2 個)、 ^{18}F (2 個)、 $^{18}\text{F}_2$ 及 $^{15}\text{O}_2$ (各 1 個)]，迴旋加速器剖面示意圖如圖 3 所示。發生核反應，將靶元素轉換成為正子放射核種。 ^{18}F 核種製備及標幟反應：高能質子射向 H₂¹⁸O [$^{18}\text{O}(\text{p},\text{n})^{18}\text{F}$]，產生 ^{18}F ，在籠狀三級胺 Kryptofix 222 擔任相轉移與催化劑的協助下，與前驅物進行 SN₂ 親核取代反應，產生 ^{18}F 標幟藥物，反應範例如圖 4 所示。 ^{11}C 核種製備：H⁺ 射向 $^{14}\text{N}_2$ [$^{14}\text{N}(\text{p},\alpha)^{11}\text{C}$]。 $^{14}\text{N}_2$ 中若添加 0.1% O₂ 則可產生 $^{11}\text{CO}_2$ ；而

$^{14}\text{N}_2$ 若添加 5% H_2 則產生 $^{11}\text{CH}_4$ 。隨後進行碳化學反應，例如 Grignard reagents、alkyllithiums、lithioisocyanides 等轉化成爲多種 ^{11}C 分子作爲標幟反應試劑之用，如圖 5。

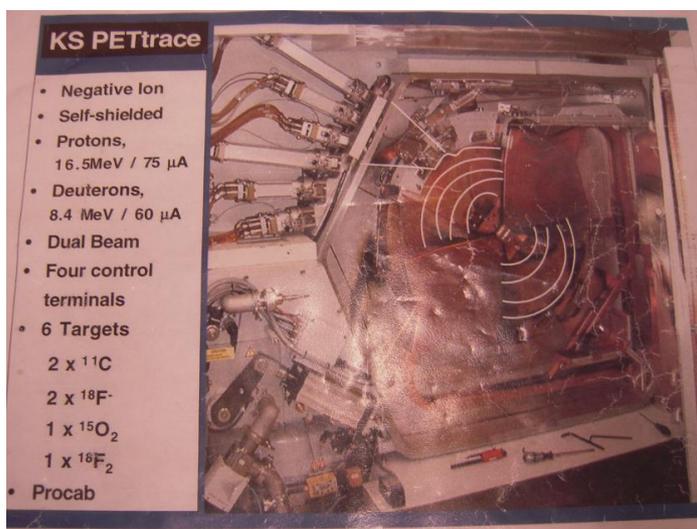


圖 3. 迴旋加速器剖面圖

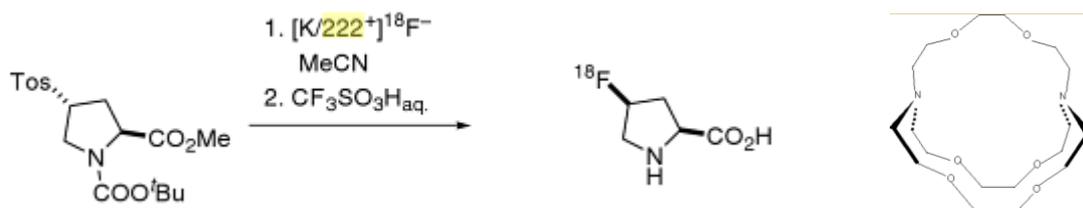


圖 4. (a) ^{18}F 同位素標幟反應之範例 (b) 籠狀三級胺 Kryptofix 222 分子結構

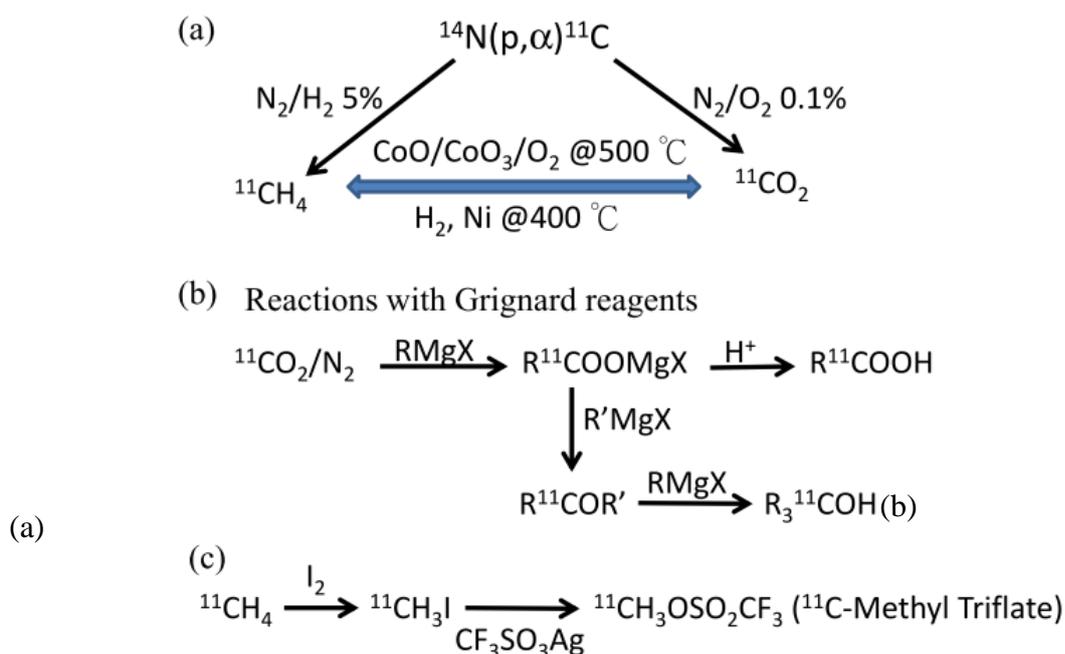


圖 5. ^{11}C 核種製備及 ^{11}C 試劑轉化反應 (a) 核反應生產 ^{11}C (b) $^{11}\text{CO}_2$ 與 Grignard 試劑反應 (c) $^{11}\text{CH}_4$ 碘化及製備 C-11 methyltriflate 試劑反應

獲得 ^{11}C 及 ^{18}F 標幟試劑後，為降低人員輻射劑量不必要的吸收，賈志勝博士解說標幟反應製備 PET 試驗藥物都在連續管路中進行，透過電腦控制閥開關，利用氣體推送反應試劑，裝設感應監測器(包括壓力、溫度、放射活度)，直到完成標幟藥物都不經過人工處理，如圖 6 所示。

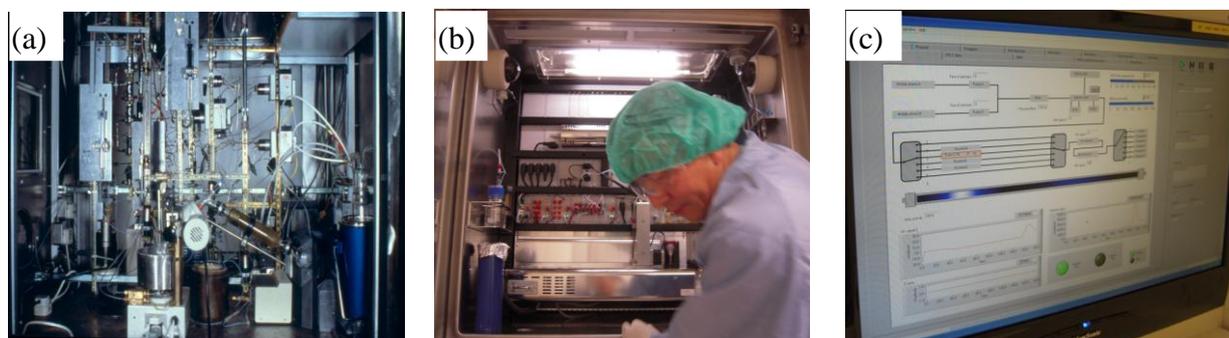


圖 6. (a) 自動化 ^{11}C 標幟藥物反應系統 (b) 賈志勝博士操作 ^{11}C 及 ^{18}F 的化學標幟反應 (c) 電腦監控標幟反應進行

^{11}C -methyltriflate 是多用途的標幟試劑，用於將前驅物加上 $^{11}\text{CH}_3$ ，應用如圖 7。

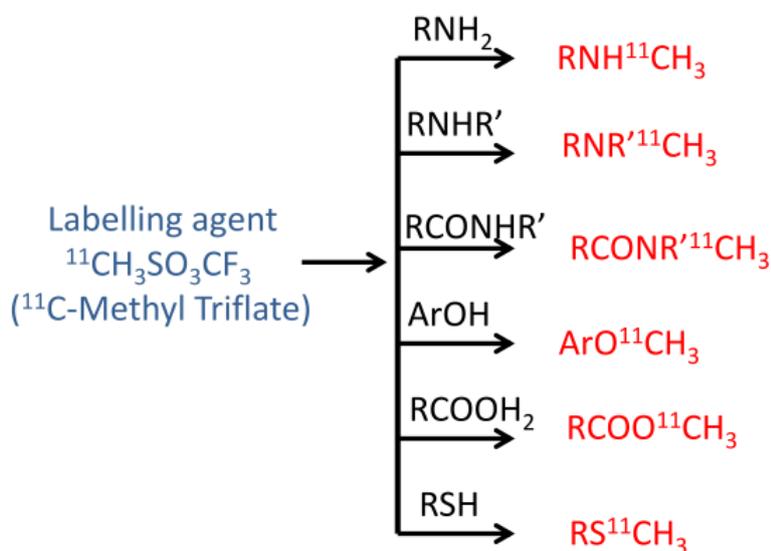


圖 7. ^{11}C -methyltriflate 與前驅物反應完成 ^{11}C 標幟藥物製備

標幟藥物經品管分析(HPLC 純度及放射活度測定)後，置於鉛盒中，通過傳送窗口，如圖 8。準備施用於試驗對象-獼猴或臨床試驗病患正子造影。

^{11}C 、 ^{18}F 半衰期分別約為 20、110 min，故標幟藥物製備反應及分離純化、品管分析都要求快速完成且高產率等，是挑戰關鍵。因此系統設計要求①核種迅速導入合成系統 ②標幟反應時間短、效率高 ③低副產物。PET 標幟藥物製備流程及作業皆以 GMP 規範管理。



圖 8. ^{11}C 、 ^{18}F 標幟 PET 藥物品管分析：(a)HPLC 純度及(b)放射活度測定 (c)傳送窗口

臨床試驗藥物品質管制：在 Nahid Amini 博士說明下，討論藥物品管方法。KI PET Center 製備 ^{11}C 、 ^{18}F 標幟 PET 藥物，品管分析依據 United States Pharmacopeia (USP)或 Europe Pharmacopeia (EP)規範。因製備 ^{11}C 、 ^{18}F 標幟藥物多樣化、放射核種半衰期短，品管項目之殘留溶劑、熱原試驗、無菌試驗等採取風險評估方式，即以每十批次產物進行一次檢驗。殘留溶劑檢測 methanol, acetonitrile, acetone, ethanol 等 4 溶劑。以頂空樣品注入模式、氣相層析、constant flow control 控制動相氣體流速。數據品管要求偏差低於 10%，否則誤差過大需重測。職與 Nahid 博士交流本實驗室也曾建立藥物殘留溶劑分析方法之經驗，而以 constant pressure control 模式控制動相氣體流速，因 constant flow control 模式下殘留溶劑 chloroform 與 tetrahydrofuran 無法層析分離定量。圖 9 為 KI PET Center 使用的 Head-Space Agilent GC 6890，與本實驗室相同，分析藥物殘留溶劑。為供應臨床病患試驗及附屬醫院例行 PET 檢驗使用，藥劑製備程序都依照 GMP 規範管理，由 QAU 部門 Arsalam Amir 博士負責，掌握 SOP 制定與執行、drug master files (DMFs)、chemistry, manufacturing, and control (CMC)管制等。但動物實驗用試劑不在 GMP 規範內。



圖 9. KI PET Center 使用的 Head-Space Agilent GC 6890，分析藥物殘留溶劑

$^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -PET ligands 的製備，因半衰期短，各階段的時間掌握相當重要。製備流程與時間相關性如圖 10 所示。

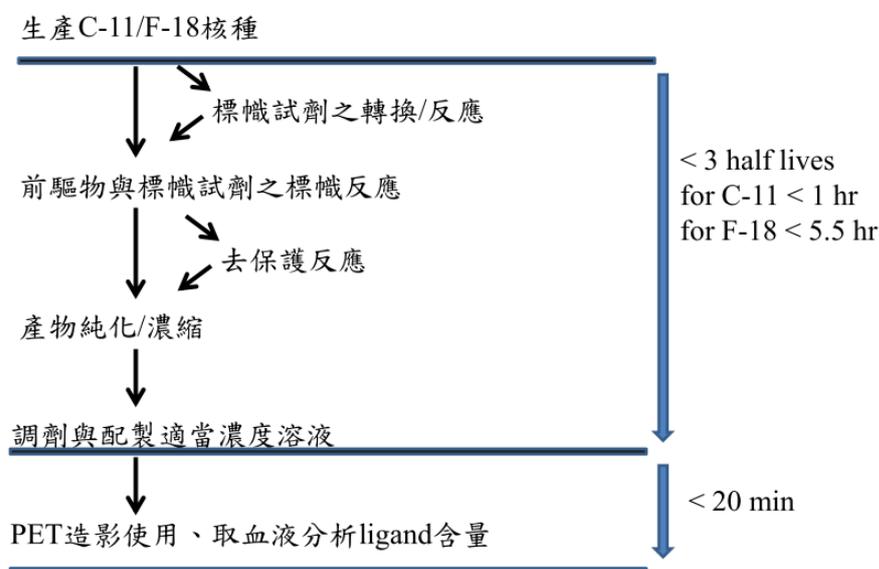


圖 10. $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -PET ligands 的製備流程與時間相關性

2. ^{11}C 或 ^{18}F 標幟 PET 造影與活度量測

在 ^{11}C (或 ^{18}F)標幟 PET 造影試劑製備同時，另一組人員在 PET camera 準備：獼猴施打麻醉劑使昏睡、裝置心跳血壓呼吸等監視器、備妥抽血檢驗活度等。圖 11(a)為 PET 造影室情形。獼猴每次麻醉以 8 小時為限。而臨床試驗病患則不麻醉，以清醒狀態進行 PET 造影，亦不監測心跳血壓。PET 試劑經靜脈注射即開始計時、定時(例如給藥前、2、5、10、20、30、40、50、60、75、90、120 等 12 時間點)取血液檢體 2 mL 測定劑量活度，每次實驗總取血體積以試驗對象體重之 0.7% 為限，故通常獼猴體重 5 kg，最多可抽血 35 mL。獲得血液檢體活度-時間曲線與 PET 影像。PET Center 以研究 CNS 為主，多數工作在腦部造影，但亦可進行其他器官造影，例如實習期間一次進行肺部 PET 研究。不同於大鼠活體藥物試驗大多採用雄性，PET Center 以雌性獼猴為試驗對象，原因是雄性猴具攻擊性、領域性格強，較難馴養。為同時支援多家藥廠許多委託試驗藥物，獼猴飼養數量保持在 30~35 隻，由專業獸醫師照顧，如圖 11(b 及 c)。腦部正子影像如圖(d)。獼猴試驗程序需遵守動物實驗相關規範(Guidelines for experimental research)，經瑞典農業部動物研究倫理委員會認可後執行。



圖11. (a)PET造影準備情形 (b)及(c)獼猴飼養及獸醫照顧 (d)PET腦部造影圖

藥物進入活體，其分佈由幾項因素決定，如血管毛細管運送、擴散到 binding site、內生神經傳導物質競爭等。而研究腦神經藥物，因血腦障壁保護腦細胞不受外來化學物質影響，但允許氧、二氧化碳和血糖通過，大部分的藥和蛋白質由於分子結構過大，一般無法通過。因此藥物分子之特性包括脂溶性、親水性、帶電性、與血漿蛋白的結合度、分子大小等是影響因子，決定了藥物通過血腦障蔽之效率，藥物能到達腦部細胞受體才能發揮作用。各因子與 BBB 關聯性說明如下：

- (1) 脂溶性/親水性。藥物需通過腦毛細血管的內皮細胞才能到腦組織，而內皮細胞膜是以類脂為基架的雙分子層的膜結構，具有親脂性，脂溶性物質容易通過。故將某些中樞神經系統藥物加以改造為脂溶性類緣物，會強化藥效。
- (2) 帶電性。藥物分子不論帶有正電荷或負電荷，易溶於水並形成氫鍵，通過血腦屏障的能力差。
- (3) 與血漿蛋白的結合度。血漿中許多化合物，會與血漿蛋白結合，就不容易透過血腦屏障，藥物效用無從發揮。反之，若某激素與血漿蛋白質結合後就不容易透過血腦屏障，亦無從發揮其生理效應，例如甲狀腺素；待其游離以後才能通過屏障發揮其效應。如設計某藥物能競爭、阻止體內該激素與血漿蛋白的結合，則提高游離激素含量及通過 BBB，間接達成藥物作用目的。

故由 PET 腦部造影之外，另測定血液/血漿藥物含量、藥物在血液中與血漿蛋白結合度(Plasma protein binding)。由 Nahid Amini 博士及 Stefan 先生進行血液、血漿中藥物活度量測、血漿蛋白結合度及測定藥物在血漿檢體之含量示範。操作步驟如附錄一 SOP，摘要

說明：自 PET 試驗獼猴/病患每次取血液 2 mL，gamma counter 測活度→離心分離血球收集血漿 0.7 mL，gamma counter 測活度→加入 1 mL acetonitrile, vortex 混合沉澱蛋白質並離心分離，取出上清液加水 1:1 稀釋，進入 radio-HPLC 分析。蛋白沉澱測定 gamma 活度。由此評估試驗 radioligand 與體內 receptor 或 binding site 結合能力的強弱。使用儀器為 gamma counter、PerkinElmer2480、HPLC-radio detector。血漿加入 acetonitrile, vortex 混合後離心去除蛋白質後上清液以 HPLC 分析，因 radioligand 含量低，注入體積 2 mL，管柱為 preparative column，管徑 1 cm，據以計算各時間點 unchanged radioligand 比例。儀器如圖 12 所示。量測數據填寫於表格。¹¹C 廢棄物待實驗後一天可送出焚化處理。而 ¹⁸F 廢棄物待實驗後 2 天處理。

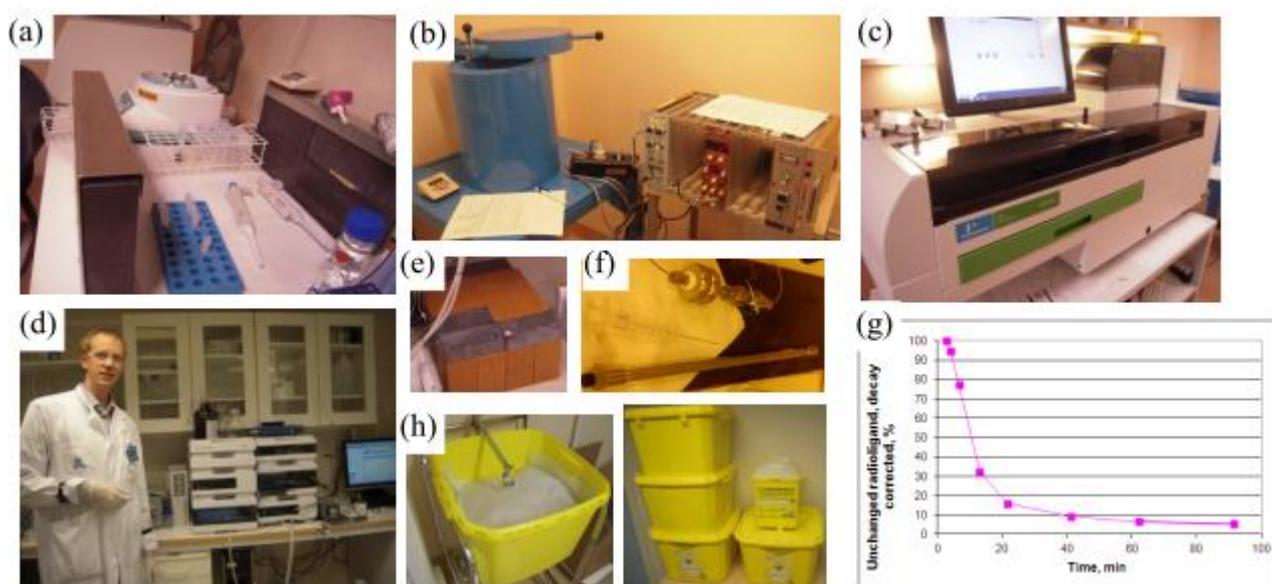


圖 12. 為(a)血液檢體處理區、(b)gamma counter、(c) gamma counter PerkinElmer2480、(d)HPLC、(e) 鉛屏蔽中 radio detector、(f) preparative column、(g)HPLC 分析血漿 radioligand 結果、(h) 實驗廢棄物收集裝箱。

3. 藥物代謝研究

肝臟是哺乳動物主要的藥物、外來化合物之代謝器官，將藥物或有毒物質轉變為水溶性，使易於排出體外。藥物代謝之形式可分成二階段反應。即 Phase I 反應，又稱為官能基反應及 Phase II 反應，又稱為接合(conjugation)反應。兩種機制皆可形成親水性代謝物，由尿液排出體外。通常藥物代謝之 Phase I 乃是為了進行 Phase II 作準備，意即進行藥物代謝之 Phase II 反應所需之特定官能基。Phase I 反應主要將藥物進行氧化、還原、水解及水和

等反應，產物的親水性較大，其中氧化反應是此階段最主要的反應形式，由細胞色素 P450 酵素家族所主導。藥物代謝之 Phase II 反應乃將體內之內生性分子加在藥物代謝之 Phase I 反應之產物上。包括葡萄糖醛酸反應(glucuronidation)、硫酸化(sulfation)、甲基化 (Methylation)、乙醯化(Acetylation)、氨基酸共軛反應、及接合 glutathione。藥物代謝之 Phase II 反應中以葡萄糖醛酸反應及硫酸化反應為最常發生之化學反應，分別經由 UDP-glucuronosyl transferases 及 sulfotransferases 等酵素執行。藥物經 Phase I 及 Phase II 代謝後分子量差值列表於表 2。

表 2. 藥物經 Phase I 及 Phase II 代謝後分子量差值

Examples of Common Oxidation (Phase I) and Conjugation (Phase II) Biotransformations					
Type of Biotransformation		Net Transformation	<i>m/z</i> Shift (Nominal)	<i>m/z</i> Shift (Exact)	
Oxidation	Hydroxylation/ N-oxidation/S-oxidation	+O	+16	+15.9949	
	Dihydroxylation	+2O	+32	+31.9898	
	Dehydrogenation or reduction	-H ₂	-2	-2.0156	
	Demethylation	-CH ₂	-14	-14.0234	
	Deethylation	-C ₂ H ₄	-28	-28.0468	
	Depropylation	-C ₃ H ₆	-42	-42.0468	
	Oxidative deamination	-NH ₃ , +O	+1	+0.9843	
	Oxidative dechlorination	-Cl, +OH	-18	-17.9662	
	Oxidative defluorination	-F, +OH	-2	-1.9957	
	Hydration	+H ₂ O	+18	+18.0105	
	Methyl to an acid	-H ₂ , +O ₂	+30	+29.9742	
	Conjugation	Glucuronidation	+C ₆ H ₈ O ₆	+176	+176.0321
		Sulfation	+SO ₃	+80	+79.9568
Glutathione conjugation		+C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	+307	+307.0837	
		+C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₆ S	+305	+305.0681	
Cysteine-glycine conjugation		+C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	+178	+178.0410	
Cysteine conjugation		+C ₃ H ₇ NO ₂ S	+121	+121.0196	
<i>N</i> -acetyl-cysteine conjugation		+C ₅ H ₉ NO ₃ S	+163	+163.0301	
Glycine		+C ₂ H ₃ NO	+57	+57.0213	
Glutamine		+C ₅ H ₁₀ N ₂ O ₃	+145	+145.0609	
Taurine	+C ₂ H ₅ NO ₂ S	+107	+107.0038		

文獻出處: Using Mass Spectrometry for Drug Metabolism Studies, 2nd. Ed. edited by W.A. Korfmacher (2010), P.141

利用 Microsome 研究藥物代謝產物：Nahid Amini 博士說明利用取自肝臟組織均質液
的 microsome 進行藥物代謝產物分析。Liver microsomes 是取自肝臟組織均質液體經不同離
心程序所製成，過程如下：肝組織在 buffer 中均質化，經 9000 g 離心。取得上清液再經
100,000 g 離心。由高速離心所沉澱之固體稱為 microsome。上清液稱為 cytosol。第一次高
速離心取得之 Microsomes 再次懸浮於緩衝液中，再以 100000 g 離心。此第二次高速離心
之固體回溶於 250 mM 蔗糖溶液，將此酵素溶液濃度調整到 20 mg/mL。Microsomes 主要
來自肝細胞之內質網膜。Microsomes 提供結合於內質網膜上之藥物代謝酵素。這些酵素主
要有 CYP450 酵素大家族，提供氧化外來物質的能力及 UGT 酵素，此外同時還有多種酵
素。使用 CYP450 酵素一般需要以 NADPH 輔助。研究 UGT 酵素代謝則需要 UDPGA (uridine
diphosphate glucuronic acid) 酵素。Microsome 購自 BD Biosciences 公司(San Jose, California,
USA)，有鼠、狗、兔、猴及人類的 liver microsome 可供選擇，訂購時需指明物種、品系。
利用 microsome 作藥物代謝產物結構分析研究，所加入藥物及代謝產物都在該反應試管中，
容易掌握，且不需犧牲及飼養動物，不損害動物生存福利，故不需經動物倫理委員會審查。
相較於藥物直接施用於動物，進行體內代謝研究，經循環系統稀釋及分佈於全身，通常以
PET 造影或 autoradiography 獲得藥物分佈情形；然而採取檢體以串聯質譜儀分析代謝物分
子量，代謝物含量很低經常難以搜尋。Microsome 已成為國際認可的臨床前藥物代謝與藥
物作用研究工具之一，藉以探索藥物毒性及藥動(pharmacokinetic)性質。試驗藥物經 <
Microsome 藥物代謝研究實驗步驟> (附錄二) 處理後以已確認之 HPLC 藥物分析方法分析
代謝反應成分，高質量解析串聯質譜(Q-TOF)分析成分分子量，由質譜分析軟體計算試驗
藥物經各式代謝反應，預測試驗藥物可能的代謝產物分子量，由 LC-QTOF 測得層析峰線
分子量(質量精確度達小數 4 位，在眾多可能的同質量分子式組合中幾乎不會誤判)與預期
分子量符合，得到可能的代謝產物分子式，由質量碎片(product ion 子離子、parent ion 母離
子與 neutral loss 中性丟失)獲得分子式內分子基團次結構與相關性，解析代謝物結構。圖
13 所示為(a)市售 Microsome、(b)LC-tandem MS(廠牌 Waters)及 (c)代謝物鑑定結果⁽¹⁾。筆
者實驗室將參考該方法準備進行利用肝臟微粒體進行藥物代謝試驗。Nahid 並表示目前 PET
Center 臨床前實驗尚未具備 GLP 實驗室認證。

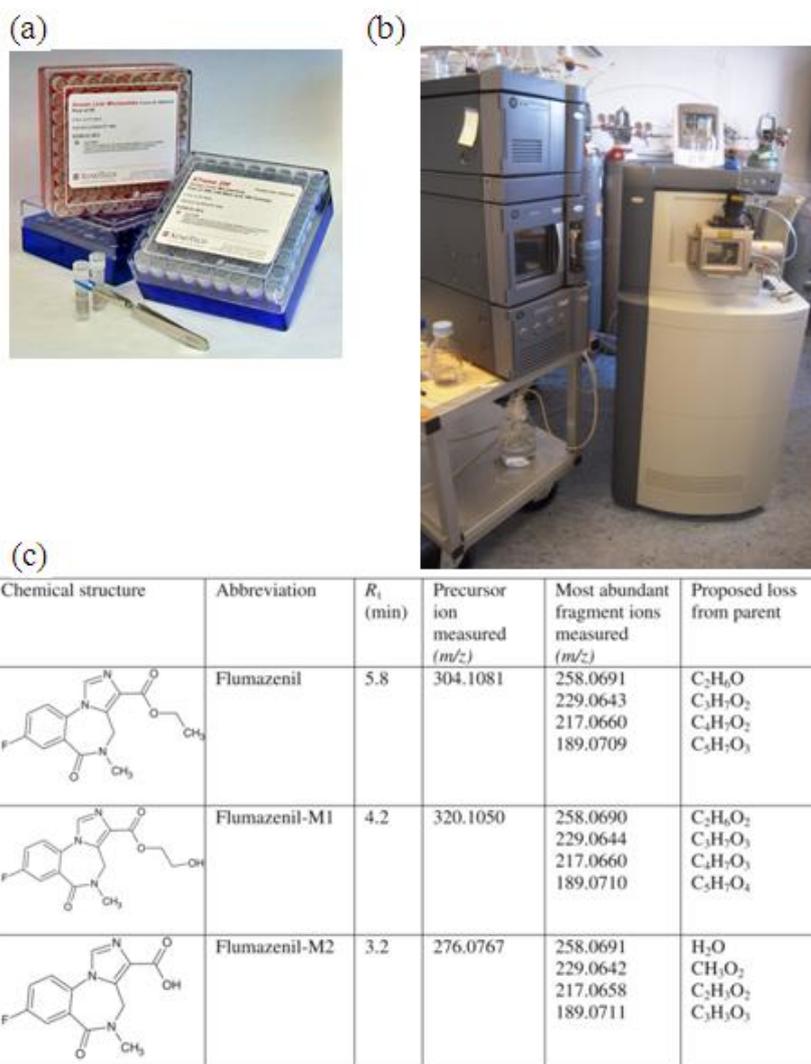


圖 13 所示為(a)市售 Microsome、(b)LC-tandem MS(廠牌 Waters)及 (c)代謝物鑑定結果 (Nahid Amini, 2013)。

以上兩個階段(正子核種標識藥物之製備與管理、 ^{11}C 或 ^{18}F 標識 PET 造影與活度量測)可用圖 14 表示⁽²⁾。

4. 放射自顯影 (Autoradiography)

由 Siv Eriksson 女士示範解說，了解 autoradiography 過程。為研究試驗藥物與作用標的的結合力，PET Center 冷凍保存動物器官組織標本，包括人、猴、鼠等腦部。以切片機將冷凍(-80°C)保存之動物器官組織製作薄片(厚度 20~40 μm)，轉置於載玻片。試驗 radioligand 溶液覆蓋於載玻片上組織切片，部分 radioligand 與組織上受體結合，再以清洗液沖洗未結合 ligand，以儀器記錄組織玻片上 radioactivity 位置及強度，成為 autoradiography 影像。顯現

radioligand 藥物與組織受體結合部位及強度。亦可將此方法反向應用：試驗藥物不易取得放射核種標識 radioligand 時，試驗組織切片先以另一已知有效作用的 radioligand 結合，再以待試驗藥物溶液競爭反應，radioligand 結合度降低的部分即為試驗藥物競爭取代的結果。PET Center 使用此方法研究 CNS 藥物對腦部組織受體結合趨勢，也能應用於其他器官組織。標識核種除 ^{11}C 、 ^{18}F 等正子輻射外，gamma 輻射 $^{123/125}\text{I}$ 、 ^{99}Tc 、 ^{188}Re 等、beta 輻射 ^{14}C 、 ^3H 等核種都可應用。賈志勝博士即以 ^3H 標識 ligand 進行對腦部 autoradiography 研究。圖 15 所示為切片機、載玻片上人腦切片樣本、成像儀及腦部放射自顯影圖像。

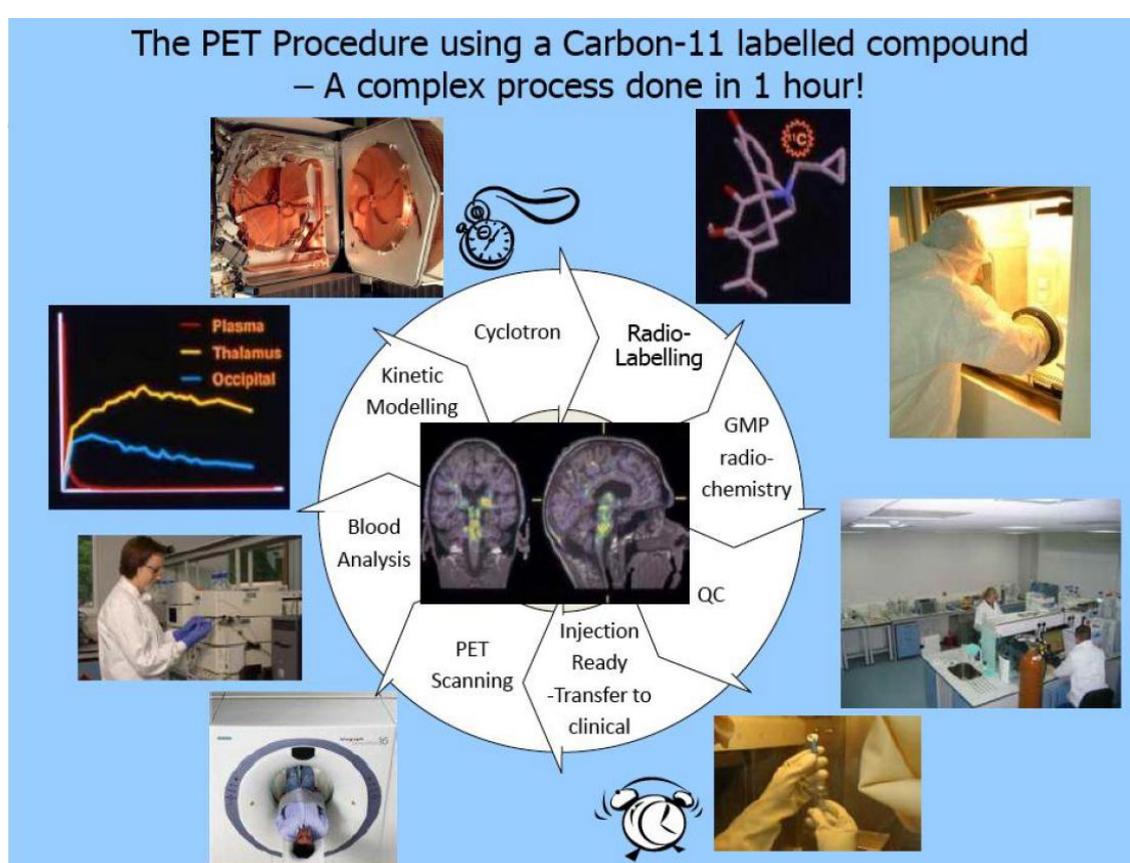


圖 14. 正子核種標識藥物之製備與管理、 ^{11}C 或 ^{18}F 標識 PET 造影與活度量測程序之相關性

1. ^3H 標識藥物應用研究

與賈志勝博士討論 ^3H 標識 ligand 操作程序，以為本實驗室進行放射標識藥物體內分佈、代謝排除研究參考。 ^3H 標識 ligand 操作在 HEPA 過濾的抽氣罩中進行，作業中人員需穿戴護目鏡、頭套、口罩、手套及實驗衣。試驗耗材需置於實驗廢棄物收集箱、封箱標示後方得以運送離開實驗室並於醫院焚化爐燒毀處理。進入實驗室物品欲離開實驗室前需以擦

拭紙擦拭表面、量測 beta 活度低於背景值 3 倍以下才得以移出實驗室。作業程序、實驗室管理等需遵照已確認之 SOP 進行、使用劑量、作業人員、及訓練考核等相關紀錄備查。使用 ^3H 標幟藥物後擦試作業桌面，量測擦拭紙上 ^3H 活度(wipe test)，高於背景值需除汙。記錄於表格如附錄三。 ^3H 標幟 ligand 為委託試驗方提供。管制 ^3H 標幟 ligand 的嚴謹程度與其 ^3H 活度操作量有關，PET Center 只用於 autoradiography 研究，使用頻率不高，操作活度及用量屬微量級。圖 16 為該實驗室情形。許可作業活度為 ^3H : 2000 MBq、 ^{125}I : 2 MBq、 ^{11}C : 1000 MBq、 ^{18}F : 500 MBq。

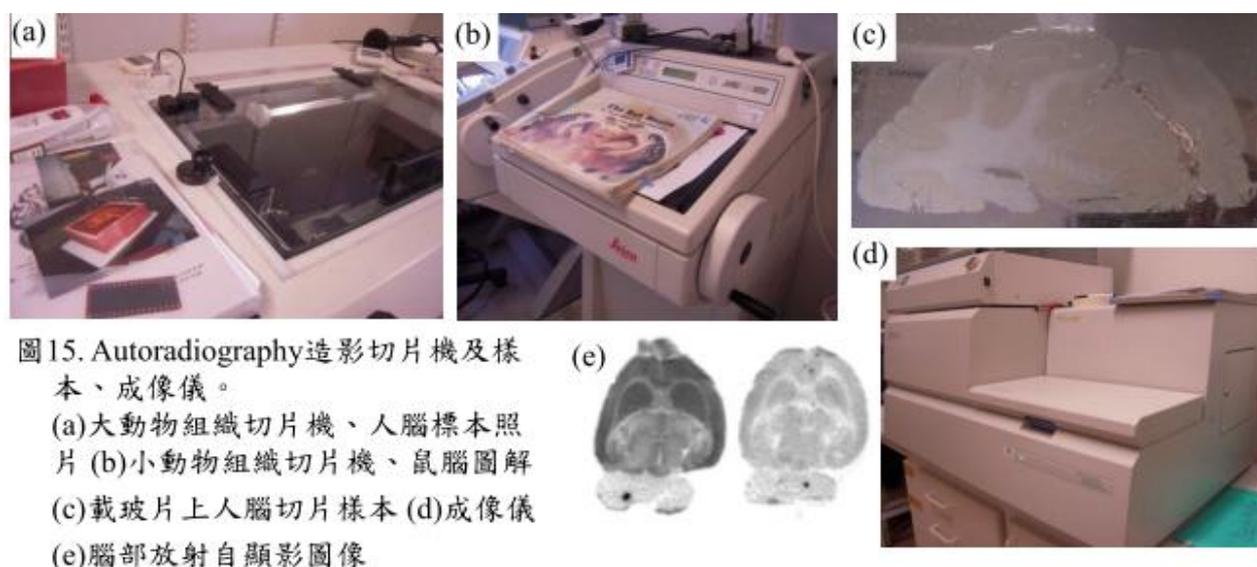


圖 15. Autoradiography 造影切片機及樣本、成像儀。
(a)大動物組織切片機、人腦標本照片 (b)小動物組織切片機、鼠腦圖解
(c)載玻片上人腦切片樣本 (d)成像儀
(e)腦部放射自顯影圖像



圖 16. ^3H 標幟藥物作業區，抽氣罩具備 HEPA filter

2. 應用 micellar liquid chromatography 分析 radiometabolite

PET Center 的 Ryuji Nakao 博士發展 micellar liquid chromatography (MLC) 方法及放射活度偵測分析血漿檢體 PET 藥物代謝速率。PET 影像研究中，定量血漿之 radio-metabolites 在藥動學評估 PET radioligands 是重要課題。因 ^{11}C -ligands 半衰期僅約 20 min，縮短樣品前處理及分析時間對分析方法至為重要。使用 MLC，血漿樣品直接注入 LC 分析系統，

減少樣品前處理工作時間、簡化短半衰期 radioligands 分析程序及較精確的估算代謝物、定量 PET ligand。MLC 方法是利用陰離子界面活性劑型成的微胞(micellar)作流動相[流動相溶液組成: 100 mM sodium dodecyl sulfate (SDS)、100 mM 1-butanol in 10 mM sodium-phosphate, pH 7.2]，流速為 5 mL/min，層析管柱為 C18 半製備型(octadecyl semipreparative column, dimension: 10 mm I.D., 150 mm, 10 μ m)，裝於保護管(10 mmx10 mm I.D. 10 μ m)之後。檢體為取自 PET 試驗的獼猴或臨床病患血漿，注入 LC 分析系統，以 radio-detector 測定。與傳統逆相層析放射活度偵測法比較，傳統方法需初步分離血漿中蛋白質後才能 LC 分析。缺點除步驟、操作時間較多外，另導致 radioligands 與蛋白質附著而沉澱，或因加入有機溶劑、酸等使蛋白質沉澱同時 ligand 降解，致分析結果偏低。MLC 方法作用機制屬於逆相層析之一：流動相是含有介面活性劑之濃度高於臨界微胞濃度(CMC)之水溶液。層析靜相表面由大約固定量的介面活性劑單體所修飾，待測物為低極性並被 micellar 包圍通過層析靜相，在流動相的溶解度隨微胞特性而異。藉選用適當介面活性劑: 疏水性、離子性或立體障礙等特性，可控制待測物的分離選擇性。另外，梯度控制有機溶劑可改變微胞性質，如 CMC、aggregation number，甚至不型成微胞。層析分離過程示意圖如圖 17 所示。應用 MLC 可直接注入生物樣品進行液相層析，因為微胞可溶解並帶走蛋白質，直接分析血漿、血清中藥物，用於 radio-ligands 分析需要爭取時間，縮短樣品處理流程。Nakao 以此方法發表論文數篇，包括 Analytical Chemistry 期刊 2 篇^(3,4)。梯度程式控制流動相 1-butanol 百分比，各 PET ligands 分離流動相梯度及層析峰 retention time 如表 3。MLC 分析血漿 radio-ligand 層析圖及與傳統 RPLC 比較如圖 18(a)與(b)所示。

除定量血漿中 PET parent radioligand 外，藥動分析還需要了解 PET radioligand 與血漿蛋白質結合程度，用於反映 radioligand 與腦部作用受體、轉運體或酵素等蛋白質標的之關係，因為這影響腦血障蔽的通透性及腦細胞吸收度。傳統 LC 方法無法獲得血漿中未與蛋白質結合的 radioligand 濃度。high performance frontal analysis (HPFA)是一種液相層析方法，用於測定未與蛋白結合的藥物濃度。HPFA 同時測量層析圖中完全與干擾成分(蛋白質或代謝物)分離的未與蛋白結合的 free ligand 及總藥物濃度。但 HPFA 的缺點是不能用於直接分析血漿檢體。因此 Nakao 再將 MLC 方法改進，結合微胞液相層析及 HPFA，

發展新分析方法，二維層析系統(two-dimensional radio-LC)，如圖 19 所示，結合二種層析分離方法，其中 column 1 是 gel-filtration column、column 2 是 reversed-phase C18 monolithic column。流動相 M1 是磷酸緩衝液(組成: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4)，流速 2 mL/min；分離管柱恆溫於 37°C。流動相 M2 是微胞溶液。用於同時定量血漿中未與蛋白質結合的未經代謝反應之 PET radioligand 含量及原 ligand 總量⁽⁴⁾。分析過程說明如下：第一部分(圖 A)，分析 protein-free radioligand。200 μL 血漿檢體直接注入 column 1，M1 流動相沖提 column 1 進入 BGO detector (flow cell 體積為 200 μL)後進入 5 mL loop，完成 HPFA 分析測定 protein-free radioligand。第二部分(圖 B)，分析總 radioligand。檢體注入 2 min 時轉動 6 向閥，層析流路轉換使 loop 內液體進入 column 2 進行逆相層析，同時 M2 微胞流動相以流速 5 mL/min 沖提 column 2，自 radiometabolites 中分離 unchanged radioligand (free +bound forms)，層析流路再次進入 BGO detector (flow cell 體積為 400 μL)，完成 MLC 分析總 radioligand 含量。

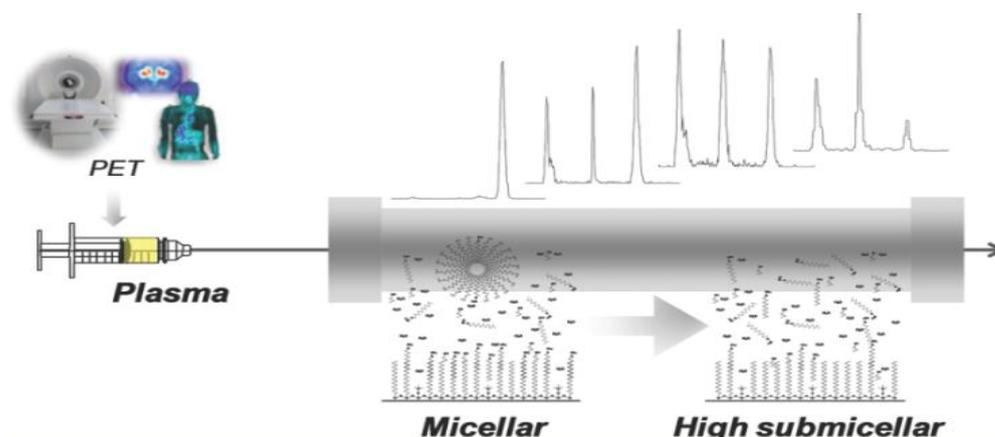


圖 17. MLC 層析分離血漿中 radioligands 過程示意圖

表 3. MLC 微胞層析分析 PET radioligands 代謝速率之流動相梯度組成及 ligands 滯留時間

PET radioligands	1-BuOH concentration (v/v), in 100 mM SDS (pH7.2)	retention time of radioligands (min)
[¹¹ C]Flumazenil	1% (0–2.0 min), 1→10% (2.0–2.1 min), 10% (2.1–6.0 min), 10→1% (6.0–8.1 min), 1% (6.1–8.0 min)	5.76
[¹¹ C]AZ10419369	2% (0–2.0 min), 2→18% (2.0–2.1 min), 18% (2.1–8.0 min), 18→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	6.97
[¹¹ C]AZD2184	1% (0–2.0 min), 1→10% (2.0–2.1 min), 10% (2.1–6.0 min), 10→1% (6.0–8.1 min), 1% (6.1–8.0 min)	5.58
[¹¹ C]Deprenyl	2% (0–2.0 min), 2→20% (2.0–2.1 min), 20% (2.1–8.0 min), 20→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	7.53
[¹¹ C]Clozapine	2% (0–2.0 min), 2→20% (2.0–2.1 min), 20% (2.1–8.0 min), 20→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	7.31
[¹¹ C]Diazepam	2% (0–2.0 min), 2→15% (2.0–2.1 min), 15% (2.1–8.0 min), 15→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	6.95
[¹⁸ F]LBT-999	2% (0–2.0 min), 2→20% (2.0–2.1 min), 20% (2.1–8.0 min), 20→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	7.65
[¹¹ C]Verapamil	2% (0–2.0 min), 2→20% (2.0–2.1 min), 20% (2.1–8.0 min), 20→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	7.47
[¹¹ C]MePPEP	2% (0–2.0 min), 2→25% (2.0–2.1 min), 25% (2.1–8.0 min), 25→2% (8.0–8.1 min), 2% (8.1–10.0 min)	8.18

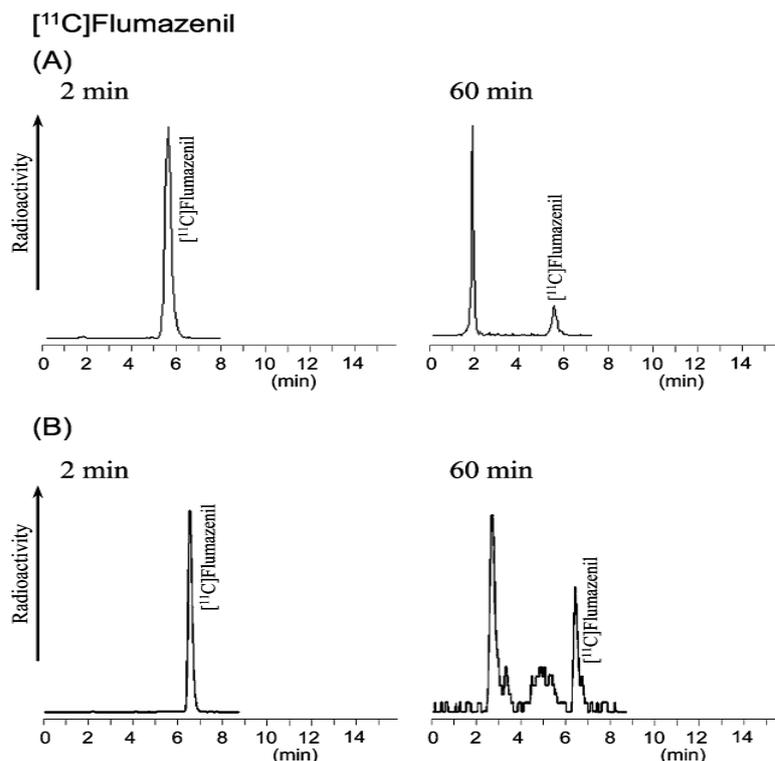


圖 18. (a)MLC 分析血漿 radio-ligand 層析圖及與(b)傳統 RPLC 比較

本方法用於分析臨床試驗病患 PET 造影同時定時取血液檢體，離心後取血漿即注入層析分析。藥物注入體內後經 4, 50, 90 min 後的 2 維層析圖如圖 20 所示。HPFA 層析為 0~2 min、MLC 層析為 2~9 min，完成每一樣品分析所需時間為 11 min。

另一方面，Ryuji Nakao 博士利用化學分析常用的樣品前處理方法—固態萃取(solid phase extraction, SPE)與 MLC 層析方法結合，用於分析血漿中 ^{11}C -ligand 含量，方法簡易快速⁽⁵⁾。過程摘要如下: SPE 管以 1 mL 甲醇, 1 mL 水, 5 mL 微胞溶液(成分為: 40-100 mM SDS, 正丁醇 5~8% v/v, 20 mM pH 7 磷酸銨緩衝液)依次沖提、平衡，保持 SPE 吸附劑上方仍有 0.2 mL 微胞溶液以備用於血漿樣品前處理。0.2~2.0 mL 血漿樣品與 1 mL 微胞溶液混合後以 5 mL 針筒盛裝，緩慢導入 SPE 管。以 2 mL 水沖洗 SPE，去除過量溶劑，收集流出液於一試管。流出液試管及 SPE 管分別以 gamma counter 計測活度(計測時間持續 10 秒)，扣除背景活度，及修正施打 ^{11}C -ligand 後經過時間的放射衰變量，獲得測定結果。研究並驗證新方法與傳統 radio-LC 分析所得結果一致，因此是確實可用的方法。

參考以上微胞液相層析流動相條件，可應用於本所以層析分離及輻射偵測法分析生物檢體中藥物含量。唯注意完成實驗後清洗層析系統需要延長流洗時間，因介面活性劑較難自系統管路清除；且應避免進入質譜儀，將導致隨後質譜分析的污染。

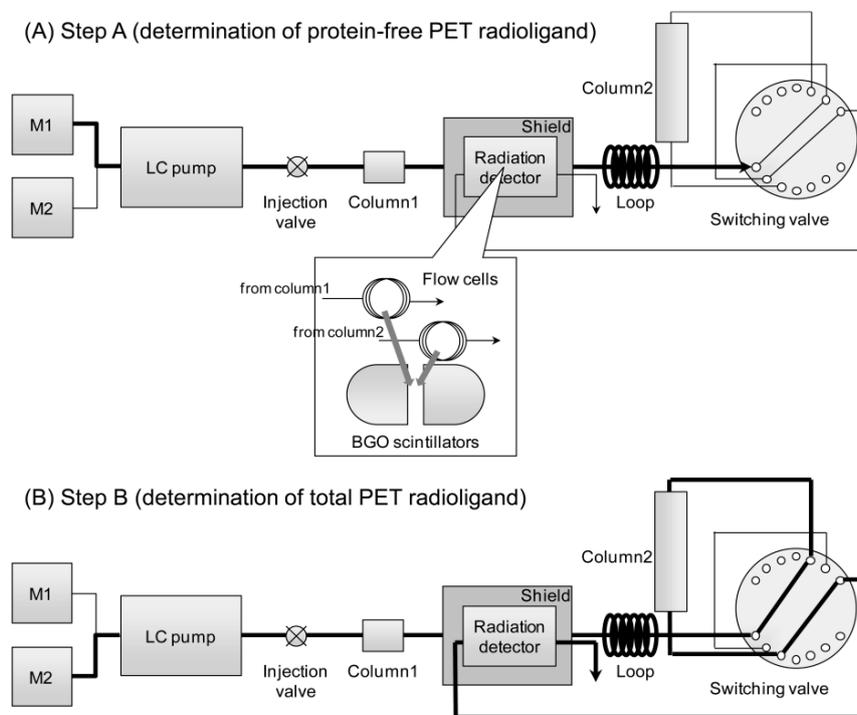


圖 19. 二維液相層析系統用於分析血漿中總 PET ligand 及游離 ligand 含量。(a) HPFA 方法分析 protein-free radioligand；(b)以 MLC 方法分離 radioligand/radiometabolites

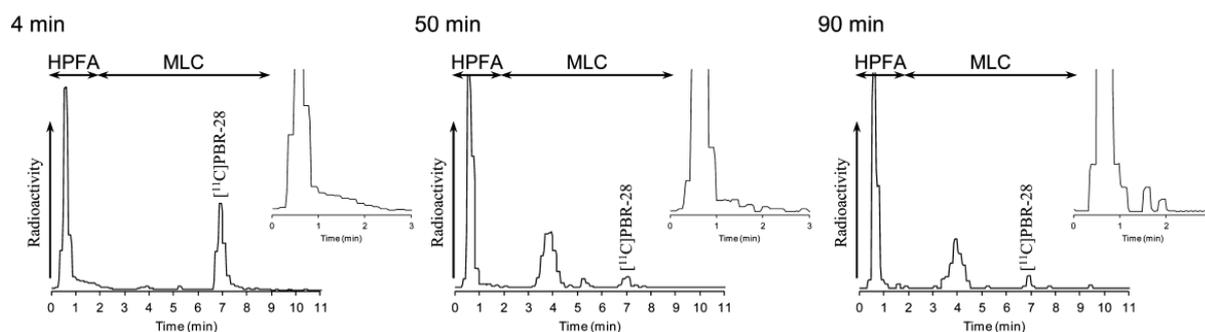


圖 20. HPFA 及 MLC 二維層析直接分析血漿中 PET ligand

三、心得

(一) Prof. Christer Halldin 領導 KI 附屬醫院精神醫學正子研究中心，現有 2 台 PET 儀器，團隊成員約有 70 人，未來 2-3 年正建造中的大樓完工後，實驗室遷入，團隊規模將大幅擴大。成員分別來自世界各國與不同族裔，有伊朗、匈牙利、日本、中國...，包括一位來自台灣的博士留學生楊凱鈞，各有不同的文化背景、專長，各自為自己的理想與前途、團隊內分工任務，盡一己之力。PET 中心的運作，整合不同專長人員(cross-disciplinary team): 獸醫、藥師、護士、技術員、放射化學、藥物合成、儀器分析、醫學影像及專科醫師...，領導者的管理與指導，使每一成員各有表現並由工作成果獲得樂趣、樂意奉獻心力、並獲得團隊績效：多次獲得知名研究獎項、多家藥廠提供資金及候選藥物爭搶與其合作，是相當不容易而值得學習之處。團隊透過內部網頁，排定每天預定進行試驗藥物代號、試驗對象、實驗起迄時間，成員各自負責崗位分別完成： ^{11}C 、 ^{18}F 標幟藥物製備、品管分析、臨床試驗病患或獼猴備妥、血液/血漿活度分析。曾有一天標幟藥物純度不合要求，當天已麻醉的獼猴準備妥當將進行實驗，只得決定改天再進行，而實驗風險與成本也相對提高。每週一團隊成員聚集討論上週工作結果並溝通當週預訂工作，協調解決瓶頸。

(二) Prof. Christer Halldin 於 1984 年取得瑞典 Uppsala 大學有機化學與放射化學博士學位，隨即致力於放射同位素藥物的應用研究已將近 30 年。以化學為立足點但不畫地自限，積極多目標的學習與探索，橫跨醫學、藥學...等領域專業限制並予整合，開發一片天地，才有今天的成就，他的歷程與典範值得我思考與學習。PET Center 團隊的成果有目共睹，Prof. Halldin 因此受邀訪問或提供研討會演講的頻率相當高，例如兼任新加坡 Nanyang Technological University 醫學院訪問教授、接連出席法國里昂的歐洲核醫年會及台灣世界分子影像學會年會，幾乎馬不停蹄的在國際研討會簡報，其精神與拼勁令我十分佩服。由此更說明，研究單位的研究工作人員，屬智慧工作者，沒有明確定義的上班時間，需為自己的任務與成果負責、「使命必達」，不能與生產線上論件論時的勞力作業員比擬，才能有所成績。

(三) 以 ^{11}C 標幟試劑製備 PET 藥物，各式化學反應轉化試劑分子之技術，也可適用於 ^{14}C 標

職藥物的製備。同理， ^{11}C 標職藥物動物實驗研究藥物分佈與代謝，部分研究也可以用 ^{14}C 標職取代。雖然 ^{11}C 、 ^{14}C 間差異為輻射正子(或最終 gamma ray) vs. beta ray，但化學反應並無二致，唯需注意半衰期及輻射防護、活度量測方式之不同。意即偵測 ^{11}C -ligand 可體外造影定位，但 ^{14}C -ligand 需取檢體樣本，處理成爲均質溶液後分析含量。 ^{11}C 或 ^{14}C 標職 ligand 的相同與相異優缺點列表比較如表 4 所示。

表 4. 比較 ^{11}C 或 ^{14}C 標職 ligand 進行藥物代謝分佈研究的相同與相異優缺點

Radio-ligand		^{11}C -ligand	^{14}C -ligand
Radio-half life		20.4 min	5730 year (3011688000 min)
Decay modes		Positron emission (99.8%) Electron capture (0.2%)	Electron emission
Maximal/Average energy		0.96 MeV (positron)*	156/45 keV (beta)
Maximal range in water		4.1 mm*, 0.4 mm average (positron)	<0.8 mm (beta)
Detection	Instrument	PET camara/gamma counter (expansive), Autoradiography	Liquid scintillation counter (LSC, unexpansive), Autoradiography
	Study subject	遠距/體外偵測, in vivo, noninvasive, alived	近接/取樣偵測, iv vitro, invasive, sacrificed
	Specimen pretreatment	Non	Yes
	Sample type	Solid, 3D maping	Homogenous solution
Radiation protection		Lead block	Plastic or Acrylic plate
Metabolism study		Less than 90 min	More than 10 days, depend on bio-half life of studied ligand
Experiment waste treat		Store 2 days after study then incinerate as usual waste	Incinerate. Waste always has radioactivity

*ref: Production of ^{11}C C-labeled radiopharmaceuticals

<http://intramural.nimh.nih.gov/mib/radio/radiotalk03.pdf> (2013 11 25)

(四) PET 的醫學應用，在醫院臨床應用上，對腫瘤與癌症轉移、CNS 疾病、頸動脈硬化等是最正確而靈敏的診斷工具。協助評估最適治療方法及病程與療效追蹤。在藥物開發上，包括針對不同疾病致病機轉，研究試驗針對受體、轉運體或關鍵代謝酵素發展有效 PET 顯

影劑，以高精確性、及早發現器官功能異常，及早治療。同時， ^{11}C -ligand 若證明有效作用於標的受體、轉運體或關鍵酵素，且原 ligand 與代謝型 ligand 的生理副作用在可控制範圍內，則其 stable isotope (^{12}C)-ligand 即可做為治療藥物；反之，若 ^{12}C -ligand 能有效與標的蛋白受體、轉運體結合，則以 ^{11}C 標幟 ligand 作為 PET 研究該蛋白功能異常引起的病徵。例如 Flumazenil ($\text{C}_{15}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}_3$)是中樞神經系統之苯重氮(benzodiazepine)受體的拮抗劑，當它與受體結合，可以減弱神經傳導物質 GABA(γ -AminoButyricAcid)的作用效果。而 ^{11}C -Flumazenil 則作為 PET 研究 GABA 受體功能/活性的試劑。

(五)以開發治療新藥而言，比較 ^{11}C 或 ^{14}C -ligand 作示蹤劑研究藥物吸收分佈代謝與排除 (ADME)， ^{11}C -ligand 為非侵入性、遠距偵測、半衰期短，因此可施用於人體臨床，短時間內重複給藥，快速獲得藥物在組織的分佈與定位。而 ^{14}C -ligand 需取樣前處理及量測分析，只能取臨床病患血液、尿液或排泄物分析，無法獲得藥物定位資訊。

(六)由 Ryuji Nakao 博士發展新層析方法，將血漿檢體分析的樣品前處理所需步驟與時間減少至最低程度：自試驗中獼猴或臨床病患抽血，經離心後取得血漿就可以進入層析系統，放射活度偵測獲得 PET radioligand 含量，解決 ^{11}C -radioligand 分析需在短時間內完成的瓶頸，而其使用的儀器並非價格昂貴的最新型設備，而是 HPLC 及 radiocounter detector，但只要創新構思，使用便宜的設備或試藥如界面活性劑 SDS 等，研究成果、創新方法仍然可以在頂尖分析化學期刊出頭，是我最感動之處。

(七)外來藥物進入體內，酵素即開始與之反應，將其氧化或還原、水解、降解等，以取得能量(獲得 ATP)，或增加水溶性以利於排出體外。肝臟是最重要的代謝器官，意即大多數代謝反應由肝臟進行。大多數藥物代謝產物之生物活性較原藥物為低。但有些藥物代謝後去除保護機而露出生物活性官能基，或代謝產物的立體構型恰與目標受體更為符合，活性更高。因此掌握藥物代謝路徑對藥物劑型、劑量設計及可能副作用具重要性。

(八)對 PET ligand 而言，假若代謝產物具有結合蛋白活性，其留滯體內時間延長、ligand 轉移至其他組織可能性增大，導致假影像可能干擾結果。利用肝細胞取出的 microsome 進行代謝研究，不用犧牲動物，無操作時間限制，已有許多文獻採用。Liver microsome 是肝

細胞內質網膜之碎片，主要是 CYP450 與 UGT 酵素。因此相較於直接以大鼠肝臟進行體外代謝，microsome 代謝實驗之樣品基質較為單純。本實驗室下一階段將嘗試以 microsome 進行藥物代謝實驗研究。

(九)PET 與 MRI 影像的整合對動物體器官所呈現的獨特分子影像與表現功能或病徵的相關性已在最近幾年的研究成果獲得證明，不僅在症狀確診、療程與療效評估，更對於治療新藥開發、biomarkers 研究、病理機制探索、酵素或細胞受體、轉運體之功能或濃度在活體直接觀察分析。放射同位素標幟藥物(radioligand)應用於腦部研究，首應考慮神經精神藥理，並應用於精神與神經異常的疾病治療藥物研發。正子放射斷層影像技術研究腦部功能的關鍵之一，是適用的 radioligands，近十年來，有許多 ^{11}C 、 ^{18}F 標幟 PET 藥物被開發應用於各種 CNS 研究。但仍有需要研究新 radioligands 以改善對受體或轉運體之專一性、探索尚未有合適 radioligand 的病症、並可據以開發更好的中樞神經藥物，更有效治療病患，是核醫藥物研究人員的責任。

(十)筆者在研習期間的觀察，發現瑞典人口有各種膚色、族裔和諧相處，國際化程度相當高；儘管瑞典人之間以瑞典語交談、報紙及官方通用文字為瑞典文，但普遍英語溝通無礙，學校教育以英語為第二語言。社會環境營造吸引國際優秀人才在此工作定居的氛圍，約有 110 萬人是他國移民或後裔，占全國人口 9 百餘萬中約 12%。因此儘管人口數不算大國，但國際競爭力有目共睹，諸如國際大型企業：Volvo、Saab、Ikea、Ericsson...等。世界排名前 100 大學除 KI 之外還有 Uppsala University (70~80 名)、Stockholm University，國際研究生相當普遍。由此借鏡台灣處境，國內市場受限於人口數與消費族群有限，企業規模不易擴大，但如果有獨特創新、有吸引國際優秀人才就業的政策，必定可以提昇台灣在國際經貿市場及科技的競爭力。

(十一) 本所目前研究的中樞神經 PET 或 SPECT 影像試劑，如 ^{123}I -ADAM、 ^{123}I -BZM、 ^{18}F -FMZ 等藥物在文獻上都有熱烈討論。如果能有發現某一有效 lead compound 由本所領導進行深入研究，有助於提升本所之地位。利用電腦高速運算能力，由多巴胺、血清素或腎上腺素受體、轉運體之胺基酸序列建立該蛋白質立體構型，再由分子資料庫(如西藥資

料庫 ZINC、天然藥物資料庫 Super Natural Database、台灣中國醫藥資料庫)中總數百萬個的化學分子結構進行數位化虛擬篩選，計算化合物與蛋白質間結合的能量差值，找出適合與上述蛋白質構型適切結合的化合物(key and lock 關係)立體構型，自行合成或採購取得該藥物，進行體外細胞試驗，或 autoradiography，由實驗驗證該先導結構對該蛋白質親合性，並可再修改成爲衍生物或類緣物，提高親合性或專一性，如圖 21 所示。電腦輔助藥物篩選與電腦輔助藥物設計差異處在於：電腦輔助藥物篩選爲文獻上已有之藥物，可採購或自行合成取得；而電腦輔助藥物設計之化合物結構可能無法由化學合成技術支援。電腦輔助藥物篩選可大幅提高發現對蛋白受體、轉運體有效作用的化合物。

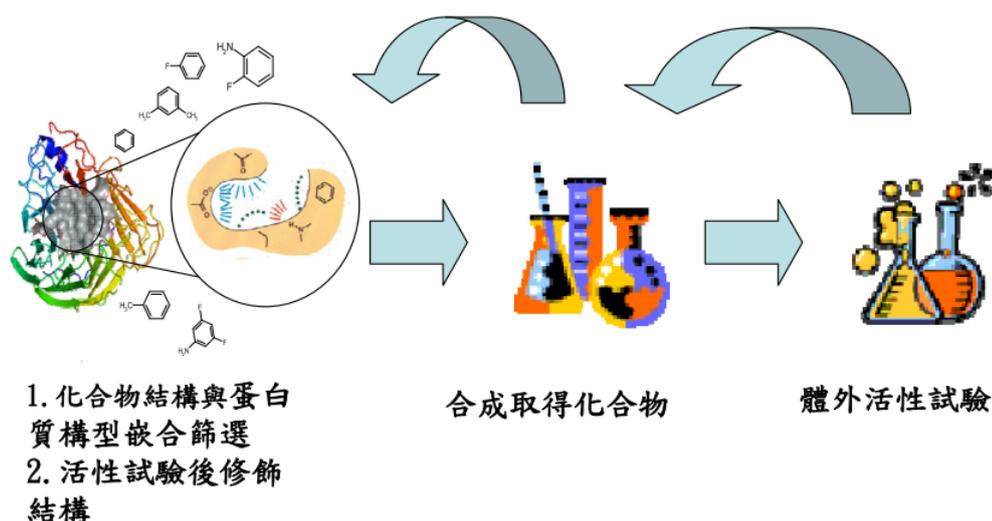


圖 21. 化合物嵌合蛋白質立體構型篩選有效中樞神經纖維藥物

(十二) 誠如在 KI 醫院新大樓建築工地的圍籬上寫的一句標語「Do you see what we see? Concrete and steel or the building blocks of life?」，如圖 22 所示。如果看待一件事只看表面膚淺現象，或深究探索其內涵義理，則各人得到的啓發將會天差地遠。身爲科學研究人員，應當深入思考所看到的現象，發現別人所忽略的深意，將會有意想不到的收穫。而 PET Center 由病徵深入了解體內分子機制爲這句話做了最好示範。

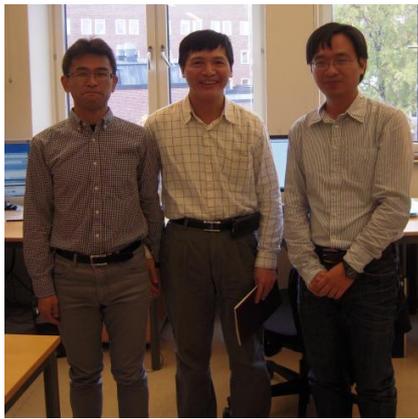
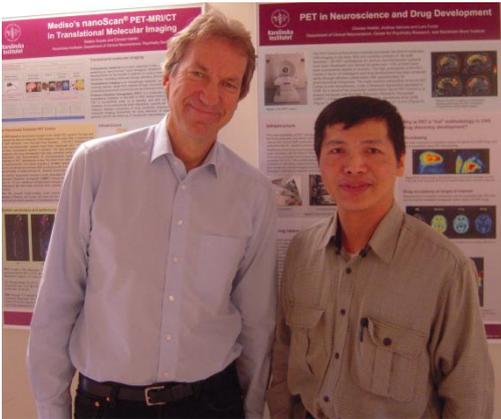


圖 22. 建築工地圍籬的標語「Do you see what we see? Concrete and steel or the building blocks of life?」

致謝

本次研習過程中 PET center 實驗室所有成員對筆者在人生地不熟的環境提供生活經驗以及專業討論、學習，幫助我平安順利且愉快的完成公差任務，筆者希望表達萬分感激之意。包括向 Dr. Nahid Amini (Nana)、Stefan 學習計測血液、血漿活度，分離處理與 HPLC 分析 $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -ligand、microsome 代謝藥物實驗、串聯質譜結構分析。向 Dr. ZhiSheng Jia (賈志勝) 學習 $^{11}\text{C}/^{18}\text{F}$ -ligand 製備合成與品管、 ^3H -ligand 作業規範、KI 校園介紹。向 Siv Eriksson 女士學習冷凍切片及放射自顯影過程。向 Dr. Nandor Kaposy 學習迴旋加速器反應生產 ^{11}C 、 ^{18}F 過程。向 Dr. Arsalan Amir 請教 cGMP 之 QAU 工作。向楊鈞凱醫師學習獼猴或臨床試驗病患施打 PET ligand 的過程。Zsolt Sarnyai 先生與 Sara Lundqvist 小姐介紹動物實驗用 nanoPET 與 MRI、實驗過程。秘書 Zahir Karin 女士的聯繫安排與協助筆者行政作業等。尤其要感謝 Prof. Halldin 邀請筆者進行本次研習。由許多人的協助，筆者才能在實習期間獲得豐碩的研究心得。

此外，出國研習準備期間，筆者感謝本所許多長官、同仁的指導、支持、協助，提供經驗與心得，筆者才能完成此項任務，在此一併致謝。



四、建議事項

- (一) 迴旋加速器生產核種及應用： ^{11}C -labeled ligand 因侷限於半衰期短(20.4 min)，主要用於生物功能機制探討及新藥研發等研究活動，醫院臨床診斷應用仍有困難，本所目前尚未有此能力且仍不宜發展。但本所迴旋加速器可生產 ^{18}F 、 ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 等核種，具有臨床診斷藥物發展的可能性。尤其 ^{18}F -labeled ligand 是 ^{11}C -labeled ligand 之外的 PET 試劑應用最多者，醫院臨床例行使用僅 FDG。但文獻研究中的 ^{18}F -labeled ligand 眾多，可能陸續應用於例行病患，顯示仍有相當發展空間。本所目前有 ^{18}F -FLT、 ^{18}F -FMZ 等 ^{18}F -ligands 進行試驗，建議可增加其他 ^{18}F -核醫藥物的研究。除 PET 造影試劑外， ^{123}I 、 ^{111}In 、 ^{64}Cu 等用於 SPECT、MRI 造影試劑開發，以發揮迴旋加速器的效能，且朝多方向發展。
- (二) 本所核醫造影設備陸續建立小動物 SPECT、PET，MRI 亦完成裝機，分子影像儀器等硬體漸趨完備，而造影試劑等軟體方面的開發需要更多投入才能展現成績。包括生物活性藥物、標幟 ^{18}F 與 ^{123}I 之前驅物、及各式核種(^{111}In 、 ^{64}Cu 及其他)適宜配位子的合成、linker(橋接上述二者)的設計，運用電腦高速運算方法篩選生物活性受體、轉運體等蛋白質的專一性與高親和力(affinity)藥物，需要繼續投入研發。
- (三) 治療藥物的開發，藥物在動物體內的去處、停留時間、排除速率及代謝物演變(ADME)等資訊對藥物通過核准相當重要。應用放射同位素示蹤特性研究藥物 ADME 是有效的方法。因治療藥物以 C、H 為主要組成元素，故研究 ADME 常標幟以 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^3H 以利偵測，因標幟其他不屬於原 ligand 的核種如 ^{18}F 、 ^{123}I 等，生物與化學特性與原 ligand 存在差異性、研究結論恐無法代表原藥物。在 ^{11}C -ligand 運作成本高、短半衰期等因素限制下， ^{14}C 、 ^3H 標幟藥物實驗及量測分析運作成本較低，但核種半衰期長，易進入生物圈循環，是 ^{14}C 、 ^3H 標幟藥物作業實驗室管理需要著力管控避免污染的課題，才得以使用 ^{14}C 、 ^3H 標幟藥物進行研究。解決方案，需有一區隔專屬 ^{14}C 、 ^3H 實驗室，實驗耗材只進不出。送出實驗室物品必須是實驗室廢棄物裝箱送焚化爐處理；或者經擦拭量測 beta 活度與背景質相當，確認未受污染方可帶出該實驗室。廢棄物經高溫焚化後 ^{14}C 、 ^3H 排放至空曠環境大氣中，因大氣層原已存在 ^{14}C 、 ^3H 環境背景(如 ^{14}C 約含 1 ppt)，並不衝擊環境品質。

五、附 錄

附錄一

<SOP 1> Measurement of plasma protein binding of PET ligands

1. The volume of blood sample for protein binding analysis should be approximately 2 mL in a plastic test tube.
2. Centrifuge the samples for 2~4 min with 4000 rpm (2000 g).
3. Use a micropipette to collect 500 μ L of plasma samples in duplicate and put them in clean test tubes.
4. Use a micropipette to collect 500 μ L of PBS solutions in duplicate and put them in clean test tubes.
5. Add 50 μ L of formulated ligand solution (10~40 MBQ/mL) to each sample.
6. Use a micropipette to collect 20 μ L of samples in triplicate and put them in clean test tubes, totally 12 tubes.
7. Measure counts for 10 sec in the samples by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press botton'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time.
8. Measure background by pressing'Reset' botton of the well counter without having any test tube in it. Note the background in the protocol.
9. Incubate the mixtures for 10 min at room temperature.
10. Pipette 200 μ L proteins of each incubation mixture to Millipore Centrifree tubes (YM-30).
11. Centrifuge the tubes for 15 min with 3000 rpm (1500 g).
12. Use a micropipette to collect 20 μ L of each filtrate in triplicate and put them in clean test tubes, totally 12 tubes.
13. Measure counts for 10 sec in the filtrated samples by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press botton'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time.
14. Measure background by pressing'Reset' botton of the well counter without having any test tube in it. Note the background in the protocol.
15. Inject the filtrated samples (plasma and PBS solution) and formulated ligand solution into radio-HPLC system and calculate the percent of parent radio-ligand. Note the results in the protocol.

16. When finished, throw the waste tubes in a special container and clean up the bench.

<SOP 2> Blood/Plasma Radioactivity Measurement

1. Measure 3 times with calibration source CS-1102-2 by using a well counter, and check that the average of this value lies within the given range.
2. The volume of the blood sample for blood measurement studies should be approximately 2.2 mL in a plastic test tube.
3. Use a micropipette to collect 2 mL of blood and put in a new test tube.
4. Measure counts for 10 sec in the plasma sample by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press button 'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time.
5. Centrifuge the samples for 2~4 min with 4000 rpm (2000 g).
6. Use a micropipette to collect 700 μ L of plasma in a clean test tubes
7. Measure counts for 10 sec in the filtrated samples by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press button 'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time
8. Measure background by pressing 'Reset' button of the well counter without having any test tube in it. Note the background in the protocol.
9. When finished, throw the waste tubes in a special container and clean up the bench and measure, Measure 3 times with calibration source CS-1102-2 by using a well counter, and check that the average of this value lies within the given range.

<SOP 3> Metabolite Analysis

1. Measure 3 times with calibration source CS-1102-2 by using a well counter, and check that the average of this value lies within the given range.
2. Use a micropipette to collect defined volume of blood and put it in a clean test tube.
3. Measure counts for 10 sec in the sample by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press button 'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time.
4. Centrifuge the samples for 2~4 min with 4000 rpm (2000 g).
5. Use a micropipette to collect defined volume of plasma and put in a clean test tubes

6. Measure counts for 10 sec in the plasma samples by using a well counter.
 - Put the samples in a well counter.
 - Press button 'Reset'.
 - Read off and note in protocol counts and time.
7. Add 1.4 times plasma volume of acetonitrile to the plasma for participating of plasma proteins and shake it by vortex mixer.
8. Centrifuge the samples for 2~4 min with 4000 rpm (2000 g).
9. Pour the supernatant into a clean test tube (for some ligands the supernatant should be diluted with water to get good separation).
10. Inject the supernatant into radio-HPLC system and run HPLC-series according to the time schedule.
11. Measure background by pressing 'Reset' button of the well counter without having any test tube in it. Note the background in the protocol.
12. Measure 3 times with calibration source CS-1102-2 by using a well counter, and check that the average of this value lies within the given range.

附錄二

Microsome 藥物代謝研究實驗步驟

Cytochrome P450 及其他 NADPH 相關酵素

- I. 解凍肝 microsome (20 mg protein/mL), NADPH 再生系統溶液 A 及 B, 置於冰水浴。
- II. 配製濃度 5 mM 之試驗 ligand 溶於 DMSO 中, 以 Ligand 穩定性為前提適當儲存。
- III. 需準備試劑/耗材: 0.5 M potassium phosphate pH 7.4 (BD Biosciences Cat.No. 451201), CH₃CN, 1.7 mL 離心試管, pipettor, 37 度恆溫水浴槽。
- IV. 合併下述液體:
 - i. 713 μ L 純水
 - ii. 200 μ L 0.5 M potassium phosphate,
 - iii. 50 μ L NADPH solution A (BD Biosciences Cat.No. 451220)
 - iv. 10 μ L NADPH solution B (BD Biosciences Cat.No. 451200)
 - v. 2 μ L 試驗 Ligand 溶於 DMSO 溶液, 反應混合溶液 ligand 濃度為 10 μ M
- V. 水浴槽中 37°C 5 min.
- VI. 加入 25 μ L (即 0.5 mg) liver microsome 開始代謝反應. 反轉加蓋試管 2 次以混合溶液. 回到 37°C 水浴.
- VII. 反應 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min 後, 代謝溶液各抽取 100 μ L, 各加入 100 μ L CH₃CN 終止反應. 混合, 置於冰水浴.
- VIII. 離心 10000 g, 3 min
- IX. 抽出上清液, 以藥物分析方法分析之.

UGT 酵素

- I. 解凍肝 microsome (20 mg protein/mL), UGT 反應混合溶液 A 及 B, 置於冰水浴。
- II. 配製濃度 5 mM 之試驗 ligand 溶於 DMSO 中, 以 Ligand 穩定性為前提適當儲存。
- III. 需準備試劑/耗材: AcN, 1.7 mL 離心試管, pipettor, 37 度恆溫水浴槽。
- IV. 合併下述液體:
 - i. 693 μ L 純水
 - ii. 200 μ L UGT 反應混合溶液 B (BD Biosciences Cat.No. 451320)
 - iii. 80 μ L UGT 反應混合溶液 A (BD Biosciences Cat.No. 451300)
 - iv. 2 μ L 試驗 Ligand 溶於 DMSO 溶液, 反應混合溶液 ligand 濃度為 10 μ M
- V. 水浴槽中 37°C 5 min.
- VI. 加入 25 μ L (即 0.5 mg) liver microsome 開始代謝反應. 反轉加蓋試管 2 次以混合溶液. 回到 37°C 水浴.
- VII. 反應 0, 5, 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min 後, 代謝溶液各抽取 100 μ L, 各加入 100 μ L CH₃CN 終止反應. 混合, 置於冰水浴.

VIII. 離心 10000 g, 3 min

IX. 抽出上清液, 以藥物分析方法分析之.

其他事項:

- ★ 對代謝穩定性研究, ligand 濃度應保持低(如 1 μM).
- ★ 一般言, 鼠類肝 microsome 代謝活性大於人肝 microsome
- ★ 當測定代謝線性(酵素用量或代謝時間) 建議酵素濃度 0.05~0.5 mg/mL; 反應時間 1~60 min.
- ★ 當測定酵素動力參數 (apparent K_m 、 V_{max}), ligand 濃度用 10~20 μM .
- ★ 當執行抑制實驗 (如 IC_{50}), ligand 濃度用接近 apparent K_m

附錄三

PET Center 使用 H-3 標幟藥物作業實驗室記錄相關表格

(一) 實驗室 H-3 標幟藥物作業後檢驗操作台是否汙染, Wipe Test (H-3) 記錄表格

Wipe Test (H-3)						
Lab Room No. _____ Contact person: _____						
Date	Work places	Background dps	Test results dps	Action Clean/ Replace paper	Sign	Note

(二) H-3 標幟藥物使用記錄表

Notify concerned staff on the accident.

If the contamination exceeds three times the backgrounds level after decontamination the area should be designed as a controlled area until acceptable levels are obtained, please contact the department of nuclear medicine.

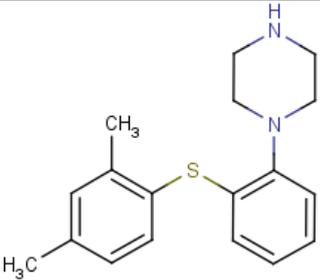
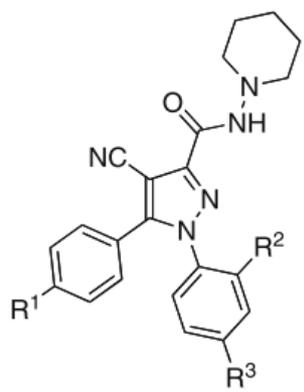
Radionuclide Arrival and Usage

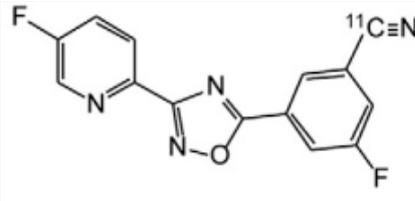
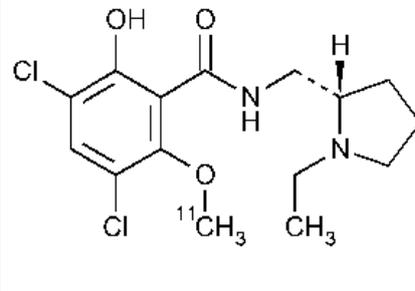
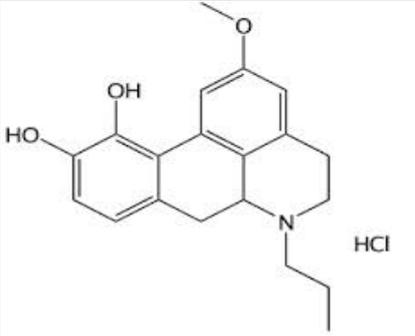
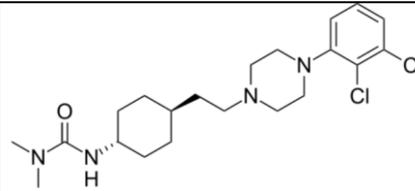
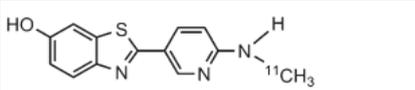
Isotope	Quantity	Lot. No.	Arrival date	Use date

附錄四

PET Center 研究中藥物資料表

PET Center 與各藥廠合作研究中之藥物名稱與結構牽涉保密協定，不便公佈。但由 2012、2013 年發表於文獻可查閱之資料，列表如下。

Radioligand	Structure	Traget	Diease/ Syndrome	Reference
Lu AA21004		5-HTT, 5-HT1A receptor	anxiety / mood disorders	6
[¹²⁵ I]SD-7015	 [¹¹ C]6, R ¹ = Me*O, R ² = R ³ = Cl [¹¹ C]7, R ¹ = Me*O, R ² = Br, R ³ = H [¹²⁵ I]8, R ¹ = MeO, R ² = *I, R ³ = H	CB ₁ cannabinoid receptor	Alzheimer's disease	7
[¹⁸ F]FE-PE2I	[¹⁸ F]-N-(3-iodo-prop-2-enyl)-2 <i>β</i> -carbofluoroethoxy-3 <i>β</i> -(4-methyl-phenyl)nor-tropane)	dopamine transporter	Parkinson's disease	8
[¹¹ C]AZD1940	N-(2-tert-butyl-1-((4,4-di fl uorocyclohexyl)methyl)-1 H-benzo[d]imidazol-5-yl)ethane sulfonamide	cannabinoid type one and two receptors (CB ₁ R and CB ₂ R)	neuropathic pain	9

[¹¹ C]AZD9272		Glutamate metabotropic receptor (mGlu) subtypes, mGluR5	-----	10
[¹¹ C] Raclopride		Dopamine D 2/3 receptors	psychotic disorders such as schizophrenia	11
[¹¹ C]MNPA		同上	同上	同上
AZD5213	-----	histamine H 3 receptors	Alzheimer's disease; Parkinson's disease Huntington's disease	12
[¹¹ C]Cariprazine		Dopamine D ₃ /D ₂ Receptor	schizophrenia	13
[¹¹ C]AZD2184		human amyloid fibrils	Alzheimer's disease;	

5-HTT: 5-HT transporter

AZDxxxx 即為瑞典藥廠 AstraZeneca,Sweden 委託研究藥物

六、參 考 文 獻

- (一)Nahid Amini, Ryuji Nakao, Magnus Schou, Christer Halldin (2013) 'Identification of PET radiometabolites by cytochrome P450, UHPLC/Q-ToF-MS and fast radio-LC: applied to the PET radioligands ^{11}C -flumazenil, ^{18}F -FE-PE2I, and ^{11}C -PBR28' *Anal Bioanal Chem* 405:1303–1310.
- (二)Jean-Marie Le Goff (2012) 'A very low energy cyclotron for PET isotope production' European Physical Society, Technology and innovation workshop.
<http://indico.cern.ch/getFile.py/access?contribId=7&resId=1&materialId=slides&confId=215087>
- (三)Ryuji Nakao, Magnus Schou, and Christer Halldin (2012) 'Direct plasma metabolite analysis of positron emission tomography radioligands by micellar liquid chromatography with radiometric detection' *Anal. Chem.* 84, 3222–3230.
- (四)Ryuji Nakao, Nahid Amini, and Christer Halldin (2013) 'Simultaneous Determination of Protein-Free and Total Positron Emission Tomography Radioligand Concentrations in Plasma Using High-Performance Frontal Analysis Followed by Mixed Micellar Liquid Chromatography: Application to ^{11}C -PBR28 in Human Plasma' *Anal. Chem.* 85, 8728–8734.
- (五)Ryuji Nakao, Christer Halldin (2013) 'A simplified radiometabolite analysis procedure for PET radioligands using a solid phase extraction with micellar medium' *Nuclear Medicine and Biology* 40, 658-663.
- (六)Per Stenkrona, Christer Halldin, Johan Lundberg (2013) '5-HTT and 5-HT_{1A} receptor occupancy of the novel substance vortioxetine (Lu AA21004). A PET study in control subjects' *European Neuropsychopharmacology* 23, 1190-1198.
- (七)Szabolcs Farkas et al. (2012) ' ^{125}I]SD-7015 reveals fine modalities of CB₁ cannabinoid receptor density in the prefrontal cortex during progression of Alzheimer's disease' *Neurochemistry International* 60 286–291.
- (八)Andrea Varrone et al. (2012) 'Simplified quantification and whole-body distribution of [^{18}F]FE-PE2I in nonhuman primates: prediction for human studies' *Nuclear Medicine and Biology* 39, 295–303
- (九)Magnus Schou et al. (2013) 'Radiolabeling of the cannabinoid receptor agonist AZD1940 with carbon-11 and PET microdosing in non-human primate' *Nuclear Medicine and Biology* 40, 410-414

- (十) Jan D. Andersson et al. (2013) ‘Palladium mediated ^{11}C -cyanation and characterization in the non-human primate brain of the novel mGluR5 radioligand [^{11}C]AZD9272’. *Nuclear Medicine and Biology* 40 547–553
- (十一) Fumitoshi Kodaka et al. (2013) ‘Test-retest reproducibility of dopamine $\text{D}_{2/3}$ receptor binding in human brain measured by PET with [^{11}C]MNPA and [^{11}C]raclopride’ *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 40:574–579
- (十二) Aurelija Jucaite et al. (2013) ‘AZD5213: a novel histamine H_3 receptor antagonist permitting high daytime and low nocturnal H_3 receptor occupancy, a PET study in human subjects’ *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 16, 1231–1239
- (十三) Milkos Toth et al. (2013) ‘Brain Uptake and Distribution of the Dopamine D_3/D_2 Receptor Partial Agonist [^{11}C]Cariprazine: An In Vivo Positron Emission Tomography Study in Nonhuman Primates’ *SYNAPSE* 67:258–264