

改変した PTD-ODD 融合タンパク質を用いて、透過性、ODD 制御を検証した。膜

透過性は、前回の報告と同様 FACS 法により検討した (図 6)。

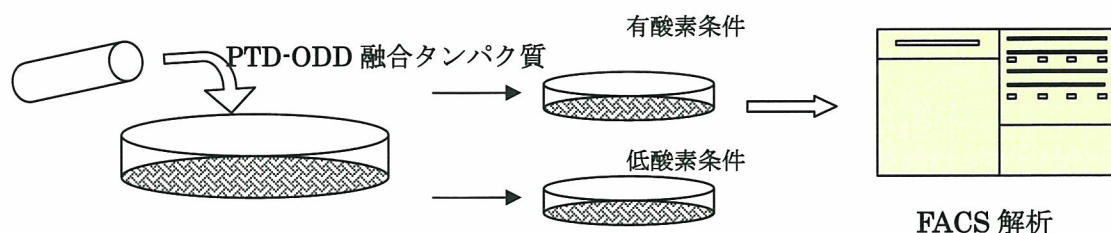


図 6 PTD-EGFP を用いた膜透過性の検討 (FACS 解析法)

また、ODD 制御は、ODD 機構阻害作用を示す試薬 (CoCl₂) を使用して、ODD 機能の評価を上記と同様に FACS 法で検討した。具体的には、CoCl₂ の存在下と非存在下で、PTD-ODD-EGFP タンパク質を細胞に添加し、タンパク質が細胞内に取り込まれた細胞の EGFP 蛍光の強度を FACS で検証した。

結果、透過性は現行の物と変わりなく高い蛍光強度を保ったままであり (上図)、その後 3 時間培養すると、CoCl₂ 非存在下では、蛍光強度が有意に低下していた (図 8 ピンクの線)。このことは、GGK の挿入により、ODD 制御が有意に改善されたことを意味している。

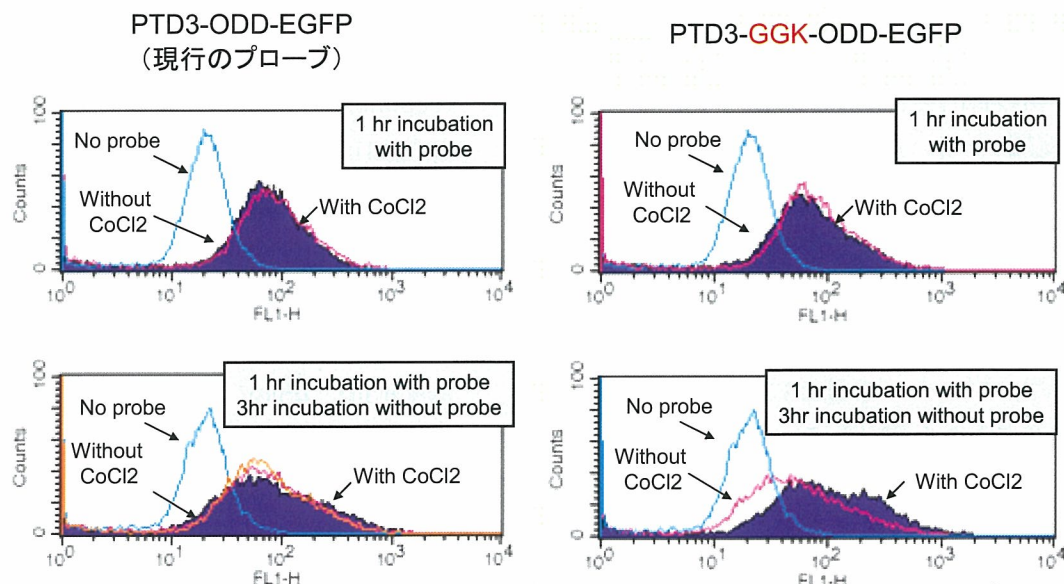


図 8 ODD 制御機能の評価

現行の PTD-ODD-EGFP を用いてアッセイをすると、CoCl₂ を入れても顕著な違いはみられなかったが、GGK を挿入したものでは CoCl₂ 処理無しと処理ありで、顕著な蛍光強度の違いが見られ、ODD 制御が改善されたことが示された。

今後この PTD-ODD を用いて、生体でのイメージングを行うことで、がんの悪性化の原因となる HIF-1 活性化がん細胞への特異性を検証して行く予定である。

D. 考察

以上の結果から、より機能を充進した ODD ドメインの構築ができ、プローブの標的特異性を更に高めることができると考えられる。昨年度の結果から、新規の PTD によりデリバリー効率が上がることを期待できるため、プローブ全体の機能性を高めることができたと思われる。今後、培養細胞を用いた新規 PTD-ODD 融合タンパク質の評価を行い、まず、近赤外の蛍光標識を直接付ける事により、小動物での生体内動態、標的特異性を確認することが可能になると考えられる。

E. 結語

前年度の新規 PTD の構築と ODD の機能充進により、PTD-ODD 部分の最適化という当初の目的を、おおむね達成できたので、実験動物を用いたプローブの生体内動態の評価を、来年度実行できると思われる。とりあえず、今回構築した PTD-ODD を含むプローブに直接標識したものをを用いて、標的特異性を検証し、目的のプレターゲティング用のプローブ構築という最終段階への準備ができたと思われる。

G. 研究発表

論文発表

1. Tanaka S, Kizaka-Kondoh S, Harada H, Hiraoka M. Development of a novel

fluorescent imaging probe for tumor hypoxia by use of a fusion protein with oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α . *Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV, Proceedings of SPIE Volume 6449, 64490Y (2007)*

2. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564. *FEBS Lett.* 580:5718-5722 (2006)
3. Y Kageyama, H Sugiyama, H Ayame, A Iwai, Y Fujii, L Eric Huang, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. and Kihara K. Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells using pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element. *Acta Oncologica.* 45(3):317-324 (2006)
4. Harada H, Kizaka-Kondoh S, Hiraoka M. Antitumor protein therapy; application of the protein transduction domain to the development of a protein drug for cancer treatment. *Breast Cancer.*;13(1):16-26. (2006)
5. Aoki T., Takahashi J., Ueba T., Oya N., Hiraoka M., Matsui K., Fukui T., Nakashima Y., Ishikawa M., Hashimoto.: Phase II study of nimustine, carboplatin, vincristine, and interferon- β with radiotherapy for glioblastoma multiforme:

- experience of the Kyoto Neuro-Oncology Group., *J Neurosurg.*, 105(3): 385-91, 2006
6. Fujino M., Shirato H., Onishi H., Kawamura H., Takayama K., Koto M., Onimaru R., Nagata Y., Hiraoka M.: Characteristics of patients who developed radiation pneumonitis requiring steroid therapy after stereotactic irradiation for lung tumors., *Cancer J.*, 12(1): 41-6, 2006
 7. Hiraoka M., Matsuo Y., Nagata Y.: Stereotactic body radiation therapy (SBRT) for early-stage lung cancer., *Cancer Radiother.*, 2006.
 8. Kamino Y., Takayama K., Kokubo M., Narita Y., Hirai E., Kawawda N., Mizowaki T., Nagata Y., Nishidai T., Hiraoka M.: Development of a four-dimensional image-guided radiotherapy system with a gimbaled X-ray head., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 66(1):271-8, 2006
 9. Kawashita M., Domi S., Saito Y., Aoki M., Ebisawa Y., Kokudo T., Saito T., Takano M., Araki N., Hiraoka M.: In vitro heat generation by ferrimagnetic maghemite microspheres for hyperthermic treatment of cancer under an alternating magnetic field., Submitted to *Biomaterials*, 2006
 10. Kawashita M., Sadaoka K., Kokubo T., Saito T., Takano M., Araki N., Hiraoka M.: Enzymatic preparation of hollow magnetite microspheres for hyperthermic treatment of cancer., *J Mater Sci Mater Med.*, 17(7): 605-10, 2006
 11. Kawashita M., Takayama T., Kokubo T., Takaoka G.G., Araki N., Hiraoka M.: Enzymatic Preparation of Hollow Yttrium Oxide Microspheres for In Situ Radiotherapy of Deep-Seated Cancer., *J.Am. Ceram. Soc.*, 89(4): 1347-51, 2006
 12. Kazawa, N., Kitaichi, M., Hiraoka, M., Togashi, K., Mio, N., Mishima, M., Wada, H.: Small cell lung carcinoma: Eight types of extension and spread on computed tomography., *J Comput Assist Tomogr.*, 30(4): 653-61, 2006
 13. Kosaka Y., Mitsumori M., Araki N., Yamauchi C., Nagata Y., Hiraoka M., Kodama H.: Avascular necrosis of bilateral femoral head as a result of long-term steroid administration for radiation pneumonitis after tangential irradiation of the breast., *Int J Clin Oncol.*, 11(6): 482-6., 2006
 14. Kubo T., Shibata T., Itoh K., Maetani Y., Isoda H., Hiraoka M., Egawa H., Tanaka K., Togashi K.: Outcome of percutaneous transhepatic venoplasty for hepatic venous outflow obstruction after living donor liver transplantation., *Radiology*, 239(1): 285-90, 2006
 15. Mitsumori M., Sasaki Y., Mizowaki T., Takayama K., Nagata Y., Hiraoka M., Negoro Y., Sasai K., Kinoshita H., Kamoto T., Ogawa O.: Results of radiation therapy combined with neoadjuvant hormonal therapy for stage III prostate cancer: comparison of two different definitions of PSA failure., *Int J Clin Oncol.*, 11(5): 396-402, 2006
 16. Narabayashi M., Mitsumori M., Araki N.,

- Yamauchi C., Kawamura S., Sakamoto T., Tachiiri S., Oya N., Nagata Y., Hiraoka M., Mise K., Kodama H.: A Case of Metachronous Bilateral Breast Cancer with Bilateral Radiation Pneumonitis After Breast-conserving Therapy., *Breast Cancer*, 13(3): 313-6, 2006
17. Nishio T., Kunieda E., Shirato H., Ishikura S., Onishi H., Tateoka K., Hiraoka M., Narita Y., Ikeda M., Goka T.: Dosimetric verification in participating institutions in a stereotactic body radiotherapy trial for stage I non-small cell lung cancer: Japan clinical oncology group trial (JCOG0403)., *Phys Med Biol.*, 51(21): 5409-17, 2006
 18. Okada T., Miki Y., Fushimi Y., Hanakawa T., Kanagaki M., Yamamoto A., Urayama S., Fukuyama H., Hiraoka M., Togashi K.: Diffusion-tensor fiber tractography: intraindividual comparison of 3.0-T and 1.5-T MR imaging., *Radiology*, 238(2): 668-78, 2006
 19. Oya N., Sasai K., Tachiiri S., Sakamoto T., Nagata Y., Okada T., Yano S., Ishikawa T., Uchiyama T., Hiraoka M.: Influence of radiation dose rate and lung dose on interstitial pneumonitis after fractionated total body irradiation: acute parotitis may predict interstitial pneumonitis., *Int J Hematol.*, 83(1): 86-91, 2006
 20. Oya N., Shibuya K., Sakamoto T., Mizowaki T., Doi R., Fujimoto K., Imamura M., Nagata Y., Hiraoka M.: Chemoradiotherapy in patients with pancreatic carcinoma: phase-I study with a fixed radiation dose and escalating doses of weekly gemcitabine., *Pancreatology*, 6(1-2): 109-16, 2006
 21. Saga T., Kawashima H., Araki N., Takahashi J. A., Nakashima Y., Higashi T., Oya N., Mukai T., Hojo M., Hashimoto N., Manabe T., Hiraoka M., Togashi K.: Evaluation of primary brain tumors with FLT-PET: usefulness and limitations., *Clin Nucl Med.*, 31(12): 774-80., 2006
 22. Sakamoto M., Oya N., Mizowaki T., Araki N., Nagata Y., Takayama K., Takahashi J. A., Kano H., Katsuki T., Hashimoto N., Hiraoka M.: Initial experiences of palliative stereotactic radiosurgery for recurrent brain lymphomas., *J Neurooncol.*, 77(1): 53-8, 2006
 23. Shibata T., Shibata T., Maetani Y., Isoda H., Hiraoka M.: Radiofrequency ablation for small hepatocellular carcinoma: prospective comparison of internally cooled electrode and expandable electrode., *Radiology*, 238(1): 346-53, 2006
 24. Tachiiri S., Katagiri T., Tsunoda T., Oya N., Hiraoka M., Nakamura Y.: Analysis of gene-expression profiles after gamma irradiation of normal human fibroblasts., *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 64(1): 272-9, 2006
 25. Yoshimura K., Kamoto T., Nakamura E., Segawa T., Kamba T., Takahashi T., Nishiyama H., Ito N., Takayama K., Mizowaki T., Mitsumori M., Hiraoka M., Ogawa O.: Health-related quality-of-life after external beam radiation therapy for localized prostate cancer:

- intensity-modulated radiation therapy versus conformal radiation therapy., Prostate Cancer Prostatic Dis., 2006.
26. Yoshimura M., Kohzaki M., Nakamura J., Asagoshi K., Sonoda E., Hou E., Prasad R., Wilson S. H., Tano K., Yasui A., Lan L., Seki M., Wood R. D., Arakawa H., Buerstedde J. M., Hochegger H., Okada T., Hiraoka M., Takeda S.: Vertebrate POLQ and POLbeta Cooperate in Base Excision Repair of Oxidative DNA Damage., Mol Cell, 24(1): 115-25, 2006
 27. Lyshchik A., Higashi T., Asato R., Tanaka S., Ito J., Hiraoka M., Insana M. F., Brill A. B., Saga T., Togashi K.: Cervical Lymph Node Metastases: Diagnosis at Sonoelastography--Initial Experience., Radiology, 2007
 28. 近藤科江、原田浩、平岡真寛 『低酸素がん細胞』を標的としたがんのイメージング・ターゲティング バイオテクノロジージャーナル 6 (2), 234-237 (2006) .
 29. 近藤科江、原田浩、平岡真寛 低酸素を標的とした生体イメージング分子プローブの開発。未来医学。21, 32-37 (2006).
 30. 田中正太郎,近藤科江 蛍光の生体イメージングへの応用。Bioclinica 21(11), 992-998 (2006)
 31. 近藤科江、原田浩、田中正太郎、平岡真寛 HIF-1 を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング 1。放射線科学 49 (11) 399-404 (2006).
 32. 近藤科江、原田浩、田中正太郎、平岡真寛 HIF-1 を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング 2。放射線科学 49 (12) 436-441 (2006).
- シンポジウム・学会発表
1. 近藤科江 HIF-1 を利用したイメージング・ターゲティング Biomarker と DDS: ナノ技術の多元と諸相 2007年2月15日 神戸
 2. 近藤科江、原田浩、田中正太郎、曾麗華、板坂聡、澁谷景子、平岡真寛 HIF-1 を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング 第9回がん治療増感研究シンポジウム 2007年2月10～11日 奈良
 3. 近藤科江 HIF-1 を利用した低酸素細胞のイメージング・ターゲティング、第9回日本組織工学会、シンポジウム5「再生誘導の診断とイメージング技術」2006年9月7日8日 京都
 4. 近藤科江、板坂聡、原田浩、澁谷恵子、平岡真寛 すい臓がん同所移植モデルを用いた低酸素がん細胞のイメージングとターゲティング、第10回がん分子標的治療研究会総会、2006年6月15日～16日 東京
 5. 近藤科江 HIF-1 を利用した腫瘍内低酸素がん細胞のイメージング・ターゲティング、第3回日本癌学会カンファレンス、2006年3月9日～11日 長野県蓼科

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

PET イメージングに関する研究

分担研究者 福山 秀直 京都大学医学部附属高次脳機能総合研究センター長

研究要旨：

神経膠腫に浸潤するミクログリアの PBBS 発現の有無を $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET で調べることで、神経膠腫の早期発見や炎症性疾患との鑑別に役立てること

A. 研究目的

末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (PBBS) は血液由来細胞をはじめ末梢の様々な組織において発現している。しかし、血液脳関門の破綻がないヒトの正常脳内ではほとんど発現していない。脳内で病理学的変化が起これ、脳内免疫担当細胞であるミクログリアが活性化されると PBBS を多量に発現する。PK11195 は PBBS に結合するので、放射性同位元素で標識した $[^{11}\text{C}]$ PK11195 を PET のトレーサーとして用いることで ($[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET)、生体内ミクログリアの活性化を可視化することができる。これまでに $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET は、多発性硬化症や脳炎のような神経炎症性疾患患者、アルツハイマー病やパーキンソン病のような神経変性疾患患者への適応が報告されている。

神経膠腫（グリオーマ）は最も多い脳腫瘍であり、組織学的にみると比較的良性のものから最悪のものまで様々である。しかし、比較的良性のものでも外科的に摘出困難な例が多く、全身の腫瘍病変のなかでも最も治療が困難なもののひとつである。

最近の研究により、悪性神経膠腫に浸潤するミクログリアにおいては、通常の炎症反応では認められるはずの蛋白質発現やサイトカイン分泌が抑制されていることが病理学的に明らかになりつつある。そのため、神経膠腫がこのような免疫寛容状態を作り出していることが、腫瘍の増殖を許す原因のひとつとして考えられている

そこでこの度、私たちの施設では、神経膠腫に浸潤するミクログリアの PBBS 発現の有無を $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET で調べることで、神経膠腫の早期発見や、神経膠腫と炎症性疾患との鑑別に役立てることができないかについての予備研究を行った。

B. 研究方法

MRI で造影効果を示さず、血液脳関門の大きな破綻がないと考えられる神経膠腫 (WHO グレード III) を持つ患者を対象にして $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET を施行した。更に、摘出された腫瘍組織を病理学的に検討した。

倫理面への配慮：本研究計画は、ヘルシ

ンキ宣言に則り、京都大学医の倫理委員会で承認された研究プロトコルに従い、被験者の文書によるインフォームドコンセントを得たうえで、被験者の人権及び利益の尊重に留意して実験を行った。

C. 研究結果

神経膠腫組織に集積するミクログリアにおいて、PBBS がほとんど発現されていないことが PET 及び病理組織検査によって明らかになった。一方で、病理学的検査では、MHC class II 抗原の発現は保たれていた。

D. 考察

神経膠腫が作り出す環境においては、PBBS 発現のようなミクログリアの活性化反応が一部抑制されている可能性がある。この性質を利用して、 $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET によって神経膠腫の早期発見や炎症性疾患との鑑別ができる可能性がある。

E. 結論

神経膠腫におけるミクログリアの活性化状態は、炎症性疾患のものと異なり、 $[^{11}\text{C}]$ PK11195-PET を用いてその違いを検出することができた。

G. 研究発表

1. 論文発表

Takaya S, Hashikawa K, Turkheimer FE, Mottram N, Deprez M, Ishizu K, Kawashima K, Akiyama H, Fukuyama H, Banati RB, Roncaroli F. Lack of expression of the peripheral benzodiazepine receptor in glioma-infiltrating microglia. 投稿中

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

PETイメージングに関する研究

分担研究者 中本 裕士 京都大学医学研究科放射線医学講座・助手

研究要旨： 軀幹部の腫瘍において、FLT-PET検査とFDG-PET検査を同時期に撮像し、所見が乖離した場合にどちらが正しいのかを術後の病理組織診断を最終診断として比較検討した。原発巣に関しては、どちらも診断成績に差異はなかったが、リンパ節転移に関しては、4病変で所見の乖離がみられ、うち3病変ではFDG-PETが正診していた。しかしFDG-PET、FLT-PETのリンパ節転移に対する感度はそれぞれ53%、47%であり、いずれも決して高いものではなかった。現時点ではどのような場合にどちらの所見を優先すべきかはまだ結論を出せず、今後症例を蓄積して検討する必要がある。

A. 研究目的

フッ素-18標識フルオロチミジンを用いたポジトロン断層撮像法（FLT-PET）検査は、腫瘍の増殖能を非侵襲的に評価可能できる検査として期待されている。核酸代謝の亢進を画像化し、細胞の増殖に応じた集積をきたすことから、治療効果判定における有用性が報告されつつあるが、すでに臨床で普及しているフッ素-18標識フルオロデオキシグルコース(FDG)を用いたPET検査と比較すると、FLTの集積度がFDGよりも少ない分、偽陽性が減るとともに偽陰性が増加する可能性が危惧される。当研究の目的は、FDGとFLTの集積に乖離がみられた場合にどちらがどの程度正しく病態を反映しているのかを検討することである。

B. 研究方法

軀幹部の悪性腫瘍が証明あるいは疑われ、手術が予定された8人(男性5人、女性3人)

の患者にFLT-PETおよびFDG-PET検査を施行

した。両検査の期間は7日以内であった。約370 MBqのFLTおよびFDGを静脈内投与し、50分後より、エミッションスキャンは1ベッドあたり3分、トランスミッションスキャンは1ベッドあたり1分で撮像した。逐次近似法を用いて画像を再構成し、原発巣、リンパ節転移を定性的に評価した。画像所見は術後の病理所見と対比し、両検査の診断精度を算出するとともに、乖離所見について考察した。

（倫理面への配慮）

FLT-PETの研究内容は、医学研究科・医の倫理委員会の承認を得ている。被験者には研究内容を文書にて説明し、同意を得た後に、同意書に署名の上、検査を施行した。

C. 研究結果

両検査を施行した8人のうち、検査後に

手術が施行されて最終診断の病理が得られた5人を解析した。5人の内訳は肺癌、食道癌、下咽頭癌、中咽頭癌、子宮頸癌それぞれ1人ずつである。子宮頸癌症例は検査まで無治療、肺癌症例は放射線化学療法後に両検査を施行、他の3症例は化学療法後に両検査を施行した。手術により活動性の腫瘍細胞は原発巣、リンパ節転移あわせて19部位にみられた。一方、肺癌の原発巣は治療によりほぼ壊死に、またリンパ節転移1つについてはFLTで陽性だったがFDG-PETおよび病理では陰性だった。FDG-PET、FLT-PETともに原発巣に対する診断成績は同じで、4例で真陽性、1例で真陰性（治療効果による）であった。リンパ節転移に関する感度はFDG-PETが53%、FLT-PETが47%で、わずかにFDG-PETが勝った。FLT-PETとFDG-PETの所見の乖離はリンパ節病変4カ所にみられた。うち1例はFLT-PET真陽性、FDG-PET偽陰性、1例はFLT-PET偽陽性、FDG-PET偽陰性、残りの2例はFLT-PET偽陰性、FDG-PET真陽性であり、4病変中、3病変はFDG-PETが正診していた。

D. 考察

これまでの報告通り、乖離があった4病変のうち、2病変ではFDG-PET偽陽性、FLT-PET偽陰性を示し、FLTの低い腫瘍集積性に起因する結果となった。しかしながら、残りの2例については、FLTのみの真陽性、偽陽性であり、このような不一致も起こりうることを確認された。まだ症例が非常に限られているため、どちらの診断成績が高いとか、乖離所見が得られた場合に

どちらの所見を優先すべきかについては、現時点では結論が出せない。今後症例を蓄積し、術後の病理所見を検討した上で考察する必要があると思われた。

E. 結論

症例数が限られているが、原発巣およびリンパ節転移については、おおむねFDG-PETとFLT-PETは類似した診断能を呈したが、約20%に所見の乖離がみられた。今回は3/4の病変でFDG-PET所見が正診していたが、どちらの所見を優先させるべきかについては、今後症例を増やして検討する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

（いずれも症例数が少ないため、まだ発表には及んでいないが、近い将来の発表に備え、現在症例を蓄積中である）

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（萌芽的先端医療技術推進研究事業）
分担研究報告書

PET イメージングに関する研究・近接撮像型フレキシブル分子イメージング装置の開発

分担研究者 村山 秀雄 放射線医学総合研究所研究員

研究要旨

高解像度を保ちつつ高感度を達成する PET 用検出器として、3次元放射線位置 (DOI) 検出器が必要とされているが、我々は独創的な DOI 方式を世界に先駆けて開発し、8層 DOI 方式が可能であることを実験室段階で実証した。この方式で結晶構成の異なる2つの検出器を試作して性能の違いを比較し、その分析を行った。

A. 研究目的

高感度かつ高解像度を達成するための PET 装置用検出器を研究開発すると共に、分子イメージング画像の定量性を向上する測定法を研究開発する。

B. 研究方法

256ch FP-PMT の上に、2.9mm × 2.9mm × 3.6mm の LSO シンチレータ結晶を 16 × 16 × 8 層に配置する 3次元小型結晶配列は、次世代 PET 開発研究の中で放医研が開発した技術を下に新たな光学的制御を工夫して行った。結晶には、Ce 濃度 0.5 mol%:Ce, 1.5 mol%:Ce の 2種類の GSO を用いた。結晶配列内はシンチレーション光の広がり进行操作するため部分的に反射材を挿入した。8層 DOI 検出器として2つの結晶構造が可能である。結晶構造 1 (LSLS) は 0.5 mol%:Ce, 1.5 mol%:Ce GSO 層が深さ方向に交互に配置され、連続する2層が同じ反射材構造になっている。検出器構造 2 (LLSS) は 0.5 mol%:Ce, 1.5 mol%:Ce GSO 層が深さ方向に4層ずつ配置され、4層間で1結晶素子ずつずれた反射材構造になる。この2つの結晶構造間で性能の比較を Ce 4層 DOI 検出器に対する応答関数実験を体軸方向、深さ方向それぞれに行った。

C. 研究結果

γ 線源として 662 keV の ^{137}Cs 点線源を用い、検出器上方からの一様照射と、側方からの DOI 各層へのファンビーム (1 mm 幅) 照射を行った。抵抗チェーンを通した 256ch FP-PMT からのアノード信号 (全 16 信号) をアンガー計算して得られる 2次元 (2D) ポジションヒストグラムで DOI 4層分の結晶識別を行なった。また、異なる Ce 濃度の結晶が異なるシンチレーション波形をもつことから、Timing Filter Amplifier により整形される波形のゼロクロスのタイミングが異なる事を利用して、異なる Ce 濃度の結晶を弁別した。

光電ピークの相対値とエネルギー分解能については、LSLS、LLSS 間に大きな相違はなく、両構造において上層で光電ピーク値が下がりシンチレーション光の減衰が示唆されるが、エネルギー分解能は全層でほぼ均一であった。光電ピーク値の傾向としては、一番 PMT に近い層から徐々に値が下がるが Layer-1~3 でほぼ同じ値となった。光量の減衰は、PMT からの距離より PMT に届くまでに通過する層間の数に大きく依存すると考えられる。

D. 考察

光電ピークの相対値とエネルギー分解能については、LSLS、LLSS 間に大きな相違

はなく、両構造において上層で光電ピーク値が下がりシンチレーション光の減衰が示唆されるが、エネルギー分解能は全層でほぼ均一であった。光電ピーク値の傾向としては、一番 PMT に近い層から徐々に値が下がるが Layer-1~3 でほぼ同じ値となった。光量の減衰は、PMT からの距離より PMT に届くまでに通過する層間の数に大きく依存すると考えられる。

E. 結論

ゼロクロスタイミング分布は LLSS の方が明らかに切れが良いが、LSLS で分布の谷に現れる検出器内散乱イベントによる結晶識別の誤りは LLSS 構造でも 2D ポジションヒストグラムで Look-up-table を作成する時に結局起こると考えられる。従って、LLSS での 2D ポジションヒストグラムにおける端の結晶識別の悪さが検出器全体の性能に最も寄与すると考えられるため、その改善方法が見つからない限りは LSLS 構造を採択することになると思われる。8 層 DOI 検出器の構造が検出器性能に及ぼす影響の分析結果は、今後の多層 DOI 検出器の開発指針に有益な情報を与えた。

G. 研究発表

1. 論文発表

- Yoshida, E., Kitamura, K., Tsuda, T., Shibuya, K., Yamaya, T., Inadama, N., Hasegawa, T., Murayama, H. : Energy spectra analysis of the four-layer DOI detector for the brain PET scanner: jPET-D4. Nucl. Instr. Meth.A, 557, pp.664-669, 2006.
- Inadama, N., Murayama, H., Kitamura, K., Inadama, N., Yamaya, T., Yoshida, E., Nishikido, F., Hamamoto, M., Kawai, H., Ono, Y. : Preliminary evaluation of 4-layer BGO DOI-detector for PET. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(1), pp.30 -34, 2006.
- Tsuda, T., Murayama, H., Kitamura, K., Yamaya, T., Yoshida, E., Omura, T., Kawai, H., Inadama, N., Orita, N. : Performance evaluation of a subset of a four-layer LSO detector for a small animal DOI PET scanner: jPET-RD. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(1), pp.35 -39, 2006.
- Yeom, JY., Takahashi, H., Siritiprussamee, P., Murayama, H., Nakazawa, M. : Multichannel CMOS ASIC preamplifiers for avalanche photodiode and microstrip gas chamber readouts. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(1), pp. 242-246, 2006.
- Yamaya, T., Hagiwara, N., Obi, T., Tsuda, T., Kitamura, K., Hasegawa, T., Haneishi, H., Inadama, N., Yoshida, E., Murayama, H. : Preliminary resolution performance of the prototype system for a 4-layer DOI-PET scanner: jPET-D4. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(3), pp.1123 -1128, 2006.
- 小林哲哉、山谷泰賀、高橋悠、北村圭司、長谷川智之、村山秀雄、菅幹生: 検出器配置の異なる近接撮影型 DOI-PET 装置の計算機モデルによる感度・計数率特性の比較、Med. Imag. Tech., 24(4), pp. 247-253, 2006.
- 高橋悠、山谷泰賀、小林哲哉、北村圭司、長谷川智之、村山秀雄、菅幹生: 近接撮影型 DOI-PET の画像再構成における観測系モデルの検討、Med. Imag. Tech., 24(4), pp. 300-305, 2006.
- Muraishi, H., Hasegawa, T., Fukushima, Y., Yoda, K., Maruyama, K., Shiba, Y., Muraishi, K., Yamaya, T., Yoshida, E., Murayama, H. : New tracking method for head motion using a single camera and a solid marker. Med. Imag. Tech., 24(4), pp. 320-328, 2006.
- Shimura, N., Kamada, M., Gunji, A., Yamana, S., Usui, T., Kurashige, K., Ishibashi, H., Senguttuvan, N., Shimizu, S., Sumiya, K., H. Murayama, H.: Zr doped GSO:Ce single crystals and their scintillation performance. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(5), pp. 2519-2522, 2006.
- Inadama, T., Murayama, H., Hamamoto, M., Tsuda, T., Ono, Y., Yamaya, T., Yoshida, E., Shibuya, K., Nishikido, F.: 8-layer DOI encoding of 3-dimensional crystal array. IEEE Trans. Nucl. Sci., 53(5), pp. 2523-2528, 2006.

11. Hasegawa, T., Yoshida, E., Kobayashi, A., Shibuya, K., Nishikido, F., Kobayashi, T., Suga, M., Kitamura, K., Maruyama, K., Murayama, H. : Evaluation of static physics performance of the jPET-D4 with Monte Carlo simulations. *Phys. Med. Biol.*, 52, pp. 213-230, 2007.
2. 学会発表
1. Lam, CF., Hagiwara, N., Obi, T., Yamaguchi, M., Yamaya, T., Murayama, H. : Correction of inter-crystal scatter effect in iterative image reconstruction of the jPET-D4, *Proc. of SPIE Medical Imaging 2006*, Feb. 11-16, San Diego, 2006.
 2. 稲玉直子, 村山秀雄, 山谷泰賀, 吉田英治, 澁谷憲悟, 津田倫明, 高橋慧 : 2種類のGSO結晶を用いた8層DOI検出器の結晶構成の検討. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 119- 120, 2006.
 3. 山谷泰賀, 吉田英治, 佐藤允信, 北村圭司, 小尾高史, 棚田修二, 村山秀雄 : jPET-D4画像再構成のための3Dシステムマトリックス事前計算手法の提案. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 127- 128, 2006.
 4. 佐藤允信, 吉田英治, 大村知秀, 山谷泰賀, 村山秀雄 : 次世代PET装置jPET-D4のDOI検出器の実装. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 133- 134, 2006.
 5. 塩入憲二, 長谷川智之, 丸山浩一, 村石 浩, 吉田英治, 北村圭司, 村山秀雄 : モンテカルロ・シミュレーション法を用いた次世代PET装置性能評価分析. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 135- 136, 2006.
 6. 小林彩子, 吉田英治, 山谷泰賀, 佐藤允信, 村山秀雄, 渡辺光男, 福土政広 : JPET-D4試作機における感度および散乱成分の評価. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 137- 138, 2006.
 7. 澁谷憲悟, 吉田英治, 鈴木敏和, 稲玉直子, 山谷泰賀, 村山秀雄 : PETにおける角度揺動の定量評価. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 143- 144, 2006.
 8. 高橋慧, 村山秀雄, 稲玉直子, 山谷泰賀, 北村圭司, 小田一郎, 河合秀幸, 津田倫明 : PET・蛍光イメージングと兼用可能なDOI-PET 検出器の基礎検討. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 145- 146, 2006.
 9. 小林哲哉, 山谷泰賀, 高橋悠, 北村圭司, 長谷川智之, 村山秀雄, 菅幹生 : 近接撮影型DOI-PET装置の検出器配置検討(1) モンテカルロシミュレータGATEによる感度・計数率特性評価. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 149- 150, 2006.
 10. 高橋悠, 山谷泰賀, 小林哲哉, 北村圭司, 長谷川智之, 村山秀雄, 菅幹生 : 近接撮影型DOI-PET装置の検出器配置検討(2) リストモード画像再構成による分解能評価. *医学物理*, 26巻 Sup. 2, pp. 151- 152, 2006.
 11. Yoshida, E., Kitamura, K., Kimura, Y., Nishikido, F., Shibuya, K., Yamaya, T., Murayama, H. : Inter-crystal scatter identification for a depth-sensitive detector using support vector machine for small animal PET. *Proc. of EuroMedIm2006, 1st European Conf. on Molecular Imaging Technology*, Marseille, France, 2006.
 12. Kitamura, K., Ishikawa, A., Mizuta, T., Yamaya, T., Yoshida, E., Murayama, H. : Detector normalization and scatter correction for the jPET-D4: a 4-layer depth-of-interaction PET scanner. *Proc. of EuroMedIm2006, 1st European Conf. on Molecular Imaging Technology*, Marseille, France, 2006.
 13. Inadama, N., Murayama, H. : Development of depth-of-interaction (DOI) detector for PET and prototype PET scanner. *Proc. of the six Japan-France workshop on radiobiology and isotopic imaging (June 19-22, 2006, CEA)*, pp.87-88, 2006.
 14. 澁谷憲悟, 吉田英治, 鈴木敏和, 稲玉直子, 山谷泰賀, 村山秀雄 : ドップラーシフトを利用した生体PETの角度揺動測定. 第43回アイソトープ・放射線研究発表会講演要旨集, 2006.
 15. Shibuya, K., Yoshida, E., Nishikido, F., Suzuki, T., Tsuda, T., Inadama, N., Yamaya, T., Murayama, H. : Limit of spatial resolution in FDG-PET due to annihilation photon non-collinearity. *IFMBE Proc. Vol. 14 (Proc. of World Congress on Medical*

- Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul), pp. 1554-1557, 2006.
16. Murayama, H. : Recent advantages in PET and the new jPET-D4 system. IFMBE Proc. Vol. 14 (Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul), pp. 1570-1573, 2006.
 17. Yamaya, T., Yoshida, E., Sato, M., Kitamura, K., Obi, T., Tanada, S., Murayama, H. : 3D image reconstruction with accurate system modeling for the jPET-D4. IFMBE Proc. Vol. 14 (Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul), pp. 1574-1577, 2006.
 18. Takahashi, K., Murayama, H., Inadama, N., Tsuda, T., Yamaya, T., Yoshida, E., Shibuya, K., Nishikido, F., Kitamura, K., Kawai, H. : Performance evaluation of jPET-RD detector composed of 32 x 32 x 4 LYSO. IFMBE Proc. Vol. 14 (Proc. of World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2006, Seoul), pp. 1581-1583, 2006.
 19. Yoshida, E., Kitamura, K., Kimura, Y., Nishikido, F., Shibuya, K., Yamaya, T., Murayama, H. : Inter-crystal scatter identification for a depth-sensitive detector using multi-anode outputs, 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M6-77, 2006.
 20. Shibuya, K., Yoshida, E., Nishikido, F., Suzuki, T., Inadama, N., Yamaya, T., Murayama, H. : A healthy volunteer FDG-PET study on the limit of the spatial resolution due to annihilation radiation non-collinearity. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M6-107, 2006.
 21. Shimazoe, K., Yeom, JY., Takahashi, H., Kojo, T., Minamikawa, Y., Fujita, K., Murayama, H. : Comparison of nonlinear position estimators for continuous scintillator detectors in PET. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M11-95, 2006.
 22. Yoshida, E., Kobayashi, A., Yamaya, T., Watanabe, M., Nishikido, F., Kitamura, K., Hasegawa, T., Fkushi, M., Murayama, H. : The jPET-D4: Performance evaluation of four-layer DOI-PET scanner using the NEMA NU2-2001 standard. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M11-146, 2006.
 23. Kobayashi, T., Yamaya, T., Takahashi, H., Kitamura, K., Hasegawa, T., Murayama, H., Suga, M. : Monte Carlo simulation study on detector arrangement for a small bore DOI-PET scanner: jPET-RD. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M14-72, 2006.
 24. Nishikido, F., Tsuda, T., Inadama, N., Yoshida, E., Takahashi, K., Shibuya, K., Yamaya, T., Kitamura, K., Murayama, H. : Spatial resolution measured by a prototype system of two 4-layer DOI detectors for jPET-RD. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M14-96, 2006.
 25. Inadama, N., Murayama, H., Tsuda, T., Nishikido, F., Shibuya, K., Yamaya, T., Yoshida, E., Takahashi, K., Ohmura, A. : Optimization of crystal arrangement on 8-Layer DOI PET detector. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M14-135, 2006.
 26. Yamaya, T., Yoshida, E., Kitamura, K., Obi, T., Tanimoto, K., Yoshikawa, K., Ito, H., Murayama, H. : First human brain images of the jPET-D4 using 3D OS-EM with a pre-computed system matrix. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., M14-390, 2006.
 27. Nakamura, H., Nomachi, M., Ejiri, H., Hai., Murayama, H. : Study of statistical and non-statistical components of energy resolution for position sensitive beta camera. 2006 IEEE Nuc. Sci. Sympo. & Med. Imag. Conf. Record., N30-144, 2006.
 28. Shibuya, K., Yoshida, E., Tsuda, T., Inadama, N., Yamaya, T., Murayama, H. : Evaluation of annihilation radiation non-collinearity in positron emission tomography by measuring the Doppler effect. Proc. of the 20th Workshop on Radiation Detectors and Their Uses (KEK Proceedings 2006-7, Nov.), pp.78-85, 2006.

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許出願

1. 北村圭司, 吉澤昌由加, 稲玉直子, 村山秀雄 : マンモグラフィ装置, 平成 18 年 3 月 31 日出願、 出願番号 特願 2006-097320
2. 清水成宜, 石橋浩之, 村山秀雄, 津田倫明, 稲玉直子, 山谷泰賀 : 放射線検出器, 平成 18 年 4 月 25 日出願、 出願番号 特願 2006-120680
3. 澁谷憲悟, 津田倫明, 錦戸文彦, 稲玉直子, 吉田英治, 山谷泰賀, 村山秀雄 : 陽電子放射断層撮像装置及び放射線検出器, 平成 18 年 8 月 25 日出願、 出願番号 特願 2006-229376

2. 特許登録

1. Murayama, H., Inadama, N., Kitamura, K., Yamashita, T. : Radiation three-dimensional position detector, August 8, 2006. Patent No.: US 7,087,905 B2 (米国特許庁)
2. Sumiya, K., Ishibashi, H., Murayama, H., Inadama, N., Yamashita, T., Omura, T. : Depth of interaction with uniform pulse-height, August 15, 2006. Patent No.: US 7,091,490 B2 (米国特許庁)

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ogawa K, Mukai T, Asano D, Kawashima H, Kinuya S, Shiba K, Hashimoto K, Mori H, Saji H.	Therapeutic effects of a 186Re-complex- conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic bone pain in an animal model.	J Nucl Med.	48(1)	122-7	2007
Ogawa K, Mukai T, Inoue Y, Ono M, Saji H.	Development of a novel 99mTc-chelate- conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent.	J Nucl Med.	47(12)	2042-7	2006
Ogawa K, Mukai T, Arano Y, Otaka A, Ueda M, Uehara T, Magata Y, Hashimoto K, Saji H.	Rhenium-186- Monoaminemonoamide- dithiol-conjugated bisphosphonate derivatives for bone pain palliation.	Nucl Med Biol.	33(4)	513-20	2006
Hanaoka H, Mukai T, Tamamura H, Mori T, Ishino S, Ogawa K, Iida Y, Doi R, Fujii N, Saji H.	Development of a 111In-labeled peptide derivative targeting a chemokine receptor, CXCR4, for imaging tumors.	Nucl Med Biol.	33(4)	489-94	2006

Ohkura K, Yamaguchi T, Nishijima K, Kuge Y, Seki K	Photochemical synthesis of polycyclic pyrimidines through the acid catalyzed cycloaddition of 6-chloro-1-methyluracil to methyl substituted benzenes.	Heterocycles.	70	501-508	2006
Ohkura K, Nishijima K, Sanoki K, Kuge Y, Tamaki N, Seki K.	A new convenient method for the synthesis of [2- ¹¹ C]thymine utilizing [¹¹ C]phosgene.	Tetrahedron Letters.	47	5321-5323	2006
Tanaka S, <u>Kizaka-Kondoh S.</u> Harada H, <u>Hiraoka M.</u>	Development of a novel fluorescent imaging probe for tumor hypoxia by use of a fusion protein with oxygen-dependent degradation domain of HIF-1 α .	Genetically Engineered and Optical Probes for Biomedical Applications IV, Proceedings of SPIE	6449	64490Y	2007
Harada H, <u>Kizaka-Kondoh S.</u> <u>Hiraoka M.</u>	Mechanism of hypoxia-specific cytotoxicity of procaspase-3 fused with a VHL-mediated protein destruction motif of HIF-1 α containing Pro564.	FEBS Lett.	580	5718-5722	2006
Y Kageyama, H Sugiyama, H Ayame, A Iwai, Y Fujii, L Eric Huang, <u>Kizaka-Kondoh S.</u> <u>Hiraoka M.</u> and Kihara K.	Suppression of VEGF transcription in renal cell carcinoma cells by pyrrole-imidazole hairpin polyamides targeting the hypoxia responsive element.	Acta Oncologica	45(3)	317-324	2006
Oka S, Masutani H, Liu W, Horita H, Wang D, <u>Kizaka-Kondoh S.</u> Yodoi J.	Thioredoxin-binding protein-2 (TBP-2)-like inducible membrane protein (TLIMP) is a novel Vitamin D3- and PPAR- γ ligand target protein that regulates PPAR- γ signaling.	Endocrinology	147 (2)	733-743	2006
近藤科江、 平岡眞寛	低酸素を標的とした生体イメージング分子プローブの開発。	未来医学	21	32-37	2006
田中正太郎、 近藤科江	蛍光の生体イメージングへの応用	Bioclinica	21(11)	992-998	2006

近藤科江、原田浩 、田中正太郎、 平岡眞寛	HIF-1を利用した腫瘍 内低酸素がん細胞のイ メージング・ターゲテ ィング 1	放射線科学	49 (11)	399-404	2006
近藤科江、原田浩 、田中正太郎、 平岡眞寛	HIF-1を利用した腫瘍 内低酸素がん細胞のイ メージング・ターゲテ ィング 2	放射線科学	49 (12)	436-441	2006

Therapeutic Effects of a ^{186}Re -Complex-Conjugated Bisphosphonate for the Palliation of Metastatic Bone Pain in an Animal Model

Kazuma Ogawa^{1,2}, Takahiro Mukai^{1,3}, Daigo Asano¹, Hidekazu Kawashima¹, Seigo Kinuya⁴, Kazuhiro Shiba², Kazuyuki Hashimoto⁵, Hirofumi Mori², and Hideo Saji¹

¹Department of Patho-Functional Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Kyoto, Japan;

²Division of Tracer Kinetics, Advanced Science Research Center, Kanazawa University, Kanazawa, Japan; ³Department of Biomolecular Recognition Chemistry, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan; ⁴Department of Biotracer Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kanazawa University, Kanazawa, Japan; and ⁵Japan Atomic Energy Agency, Tokai-mura, Ibaraki, Japan

Previously, based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals, we developed a highly stable ^{186}Re -mercaptoacetyl-glycylglycylglycine (MAG3) complex-conjugated bisphosphonate, [(((4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl)carbamoylmethyl]carbamoylmethyl]carbamoylmethyl]carbamoylmethanethiolate] oxorhenium(V) (^{186}Re -MAG3-HBP), for the treatment of painful bone metastases. This agent showed a superior biodistribution as a bone-seeking agent in normal mice when compared with ^{186}Re -1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (^{186}Re -HEDP). In this study, we evaluated the therapeutic effects of ^{186}Re -MAG3-HBP using an animal model of bone metastasis. **Methods:** The model was prepared by injecting syngeneic MRMT-1 mammary tumor cells into the left tibia of female Sprague-Dawley rats. ^{186}Re -MAG3-HBP (55.5, 111, or 222 MBq/kg) or ^{186}Re -HEDP (55.5 MBq/kg) was then administered intravenously 21 d later. To evaluate the therapeutic effects and side effects, tumor size and peripheral blood cell counts were determined. Palliation of bone pain was evaluated by a von Frey filament test. **Results:** In the rats treated with ^{186}Re -HEDP, tumor growth was comparable with that in untreated rats. In contrast, when ^{186}Re -MAG3-HBP was administered, tumor growth was significantly inhibited. Allodynia induced by bone metastasis was attenuated by treatment with ^{186}Re -MAG3-HBP or ^{186}Re -HEDP, but ^{186}Re -MAG3-HBP tended to be more effective. **Conclusion:** These results indicate that ^{186}Re -MAG3-HBP could be useful as a therapeutic agent for the palliation of metastatic bone pain.

Key Words: bone metastases; internal radiotherapy; bisphosphonate; pain; radiopharmaceutical

J Nucl Med 2007; 48:122-127

Malignant tumors, especially cancers of the breast and prostate, frequently metastasize to bone (1,2). A prominent

Received Jun. 26, 2006; revision accepted Sep. 25, 2006.
For correspondence or reprints contact: Hideo Saji, PhD, Department of Patho-Functional Bioanalysis, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan.
E-mail: hsaji@pharm.kyoto-u.ac.jp
COPYRIGHT © 2006 by the Society of Nuclear Medicine, Inc.

symptom of such metastasis is pain, which has a significant impact on patient quality of life, and pain within the skeletal tissues is the most common source of pain in patients with malignant disease (3-5). Treatments designed to reduce inflammation-associated pain with nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) are the first option in most cases, with stronger opioids used as the intensity of the pain rises. However, these drugs produce side effects such as gastrointestinal ulceration, neutropenia, enhanced bleeding, and deterioration of renal function in the case of NSAIDs, and nausea, sedation, and constipation in the case of opioids. Localized radiation therapy is an effective treatment for bone pain (6) but is difficult to apply when there are multiple lesion sites, as is often the case in patients with bone metastases. Wide-field, hemibody radiotherapy is also an effective treatment but its potential benefit is often outweighed by significant bone marrow and gastrointestinal toxicity. Accordingly, in cases of metastases to multiple sites, molecular radiotherapy using bone-seeking radiopharmaceuticals is preferable (7,8).

^{186}Re is a promising radionuclide with a maximum β -energy of 1.07 MeV and a γ -ray of 137 keV (9%) that are adequate for therapy and imaging, respectively. Furthermore, the physical half-life of ^{186}Re is 3.8 d, which is long enough for shipment and processing of the radiopharmaceutical but not too long for its disposal as a radioactive waste. These physical characteristics have led to the development and clinical application of ^{186}Re -1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (^{186}Re -HEDP) (9,10). However, ^{186}Re -HEDP showed a delayed blood clearance and high gastric uptake after injection, due to its instability in vivo (11-14). Thus, to overcome the problems of ^{186}Re -HEDP, we recently developed, based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals, a highly stable ^{186}Re -mercaptoacetyl-glycylglycylglycine (MAG3) complex-conjugated bisphosphonate, [(((4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl)carbamoylmethyl]carbamoylmethyl]carbamoylmethyl]carbamoylmethanethiolate] oxorhenium(V) (^{186}Re -MAG3-HBP, Fig. 1)

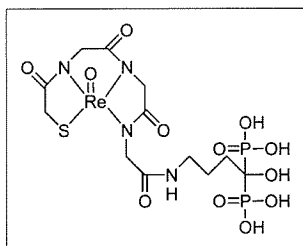


FIGURE 1. Chemical structure of Re-MAG3-HBP.

(15). This agent showed greater accumulation in bone and faster clearance from blood than ^{186}Re -HEDP in normal mice.

In this study, we evaluated the therapeutic potential of ^{186}Re -MAG3-HBP in comparison with ^{186}Re -HEDP for the palliation of metastatic bone pain using an animal model of bone metastasis.

MATERIALS AND METHODS

Materials

^{186}Re was supplied by the Japan Atomic Energy Research Institute as perrhenate ($^{186}\text{ReO}_4^-$) at a specific activity of 18–20 TBq/g. Other reagents were of reagent grade and were used as received.

^{186}Re -HEDP, ^{186}Re -MAG3-HBP, and nonradioactive Re-MAG3-HBP were prepared according to a published procedure (15) with radiochemical yields of >90% without requiring purification. The radiochemical purity of ^{186}Re -HEDP was determined by thin-layer chromatography (TLC) and cellulose acetate electrophoresis (CAE) (Separax-SP; Joko Co. Ltd.). TLC analyses were performed with silica plates (Silica gel 60; Merck KGaA) with acetone as a developing solvent. ^{186}Re -HEDP remained at the original position ($R_f = 0$), whereas the free perrhenate ($^{186}\text{ReO}_4^-$) migrated with the solvent front ($R_f = 1$). CAE was run at an electrostatic field of 0.8 mA/cm for 20 min in veronal buffer (ionic strength 0.06 M, pH 8.6). ^{186}Re -HEDP migrated to the 3.5-cm anode from the origin, whereas reduced-hydrolyzed rhenium ($^{186}\text{ReO}_2$) remained at the origin. The radiochemical purity of ^{186}Re -MAG3-HBP was determined by reversed-phase (RP) high-performance liquid chromatography (HPLC). RP-HPLC was performed with a Cosmosil 5C₁₈-AR-300 column (4.6 × 150 mm; Nacalai Tesque) at a flow rate of 1 mL/min with a mixture of 0.2 mol/L phosphate buffer (pH 6.0) and ethanol (90:10) containing 10 mmol/L tetrabutylammonium hydroxide.

Biodistribution in Normal Rats

Experiments with animals were conducted in accordance with our institutional guidelines, and the experimental procedures were approved by the Kyoto University Animal Care Committee. Biodistribution experiments were performed by intravenously administering ^{186}Re -labeled compounds into male Wistar rats (200–250 g). Groups of 4 rats each were administered 250 μL of each ^{186}Re -labeled compound and sacrificed at 10 min, 3 h, and 24 h after injection. Tissues of interest were removed and weighed, and radioactivity counts were determined with an auto well γ -counter (ARC-2000; Aloka) and corrected for background radiation and physical decay during counting.

Rat Model of Bone Metastasis

Female Sprague–Dawley rats were used (150–180 g). The animals were housed with free access to food and water at 25°C with a 12-h alternating light/dark cycle. MRMT-1 mammary tumor cells

were kindly supplied by the Cell Resource Center for Biomedical Research, Tohoku University. The culture of MRMT-1 cells and induction of bone cancer was performed as previously described with slight modifications (16). Briefly, MRMT-1 cells were grown in cell culture dishes in RPMI 1640 medium with phenol red, 10% heat-inactivated fetal calf serum, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ glutamine, 100 units/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. The cells were cultured in a humidified atmosphere of 95% air and 5% carbon dioxide at 37°C. They were then released from the dishes by treatment with 0.05% trypsin/ethylenediaminetetraacetic acid. Next, the rats to be inoculated were anesthetized with chloral hydrate, and a 1.5-cm incision was made over the top half of the tibia. A 23-gauge needle was inserted into the intramedullary canal of the tibia, approximately 5 mm below the knee joint to create a cavity for injection of the cells. At the left tibia, 3 μL of medium with tumor cells (approximately 3×10^3 cells) was then injected into the bone cavity using a Hamilton syringe (Hamilton Co.). At the right tibia, 3 μL of medium only was injected into the bone cavity as a sham-treated control. The cavities were sealed using bone wax, and the wounds were closed with surgical suture.

Imaging and Therapy

Rats were randomly distributed to the experimental groups. ^{186}Re -MAG3-HBP (55.5, 111, or 222 MBq/kg), ^{186}Re -HEDP (55.5 MBq/kg), or nonradioactive Re-MAG3-HBP was administered intravenously 21 d after inoculation—that is, the time needed for tumors to reach a palpable size (about 1 cm in diameter). A group of rats that did not receive any treatment served as a control group.

At 24 h after the injection of radiolabeled compounds, γ -imaging was performed on a SPECT-2000H (Hitachi Medical Co.) fitted with low-energy, high-resolution collimators. The energy window was symmetric ($\pm 20\%$) and centered on the ^{186}Re photopeak (137 keV).

Tumoral bone-to-normal bone ratios were calculated by drawing regions of interest (ROIs) on planar images (counts/pixel). The ROI of tumoral bone was drawn manually around the edge of the tumoral bone activity by visual inspection. The ROI of normal bone was drawn at the corresponding site of the contralateral tibia (sham-treated) using an inverted figure of the tumoral bone ROI.

Tumor size was measured once weekly with a slide caliper in 2 dimensions. Individual tumor volumes (V) were calculated by the formula $V = [\text{length} \times (\text{width})^2]/2$ and related to the values on the day of treatment (relative tumor volume).

Pain was evaluated as the hind paw withdrawal response to stimulation with von Frey filaments (North Coast Medical) as previously described with slight modifications (17,18). The test environment consisted of a wire mesh box. The rat was placed in the test box and allowed to acclimate for 5–10 min. The tactile stimulus was applied to the plantar surface in ascending order of force beginning with the 2.84-mN filament. Once a withdrawal response was established, the paw was retested, starting with the next descending von Frey filament until no response occurred. The lowest amount of force required to elicit a response was recorded as the paw withdrawal threshold (in newtons [N]). The ratio of the right value to the left value was used as an index of the palliation of pain.

The myelotoxicity of the radiotherapy was assessed using the peripheral blood cell counts. Two blood samples (5 μL) were obtained from a tail vein. The samples were pooled and diluted with 95 μL of Turk's solution (0.01% gentian violet and 1% acetic acid) for white blood cell (WBC) counts and 495 μL of 1% ammonium oxalate for platelet counts, and cell counts were performed using a hemocytometer and a light microscope.