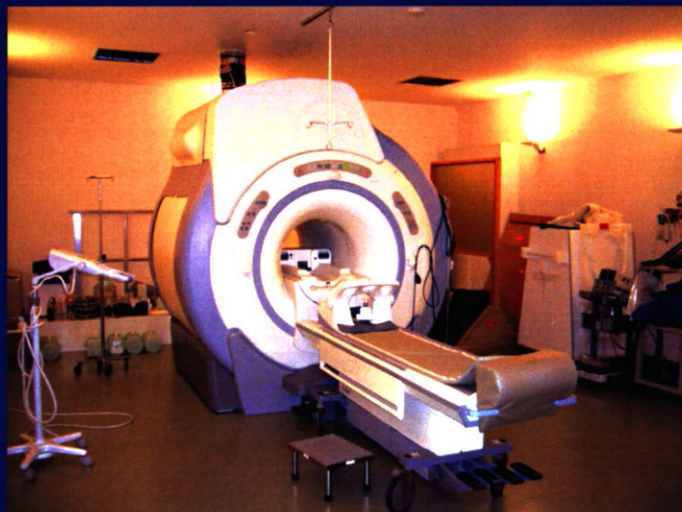


平成19年度
厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

がんを安全・高感度で鮮明に画像化できる
ナノサイズシュガーボール dendリマー型
新規MRI造影剤の開発研究

(H19-ナノ-一般-015)

総括研究報告書



主任研究者 山下 光 司

平成20 (2008) 年3月

平成19年度
厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業

**がんを安全・高感度で鮮明に画像化できる
ナノサイズシュガーボール dendrimer 型
新規MRI造影剤の開発研究**

(H19-ナノ-一般-015)

総括研究報告書

主任研究者 山下 光 司
平成20 (2008) 年3月

目 次

総括研究報告書

山下 光司 . . . 1

主任研究者・分担研究者・研究協力者一覧

. . . 9

ガドリニウム錯体の略記およびその名前の対応表

. . . 10

1. 緒言

山下 光司 . . . 11

2. 創製

2-1 Gd-DTPA を糖で化学修飾した新規 MRI 造影剤の合成

青木 峻 . . . 21

2-2 がん組織等を画像化する新規 MRI 造影剤としての

Gd-DTPA-糖鎖体の合成並びに合成プロセスと造影剤の評価

小川 圭介 . . . 37

2-3 新規非対称糖鎖導入型造影剤

尾崎 伸久 . . . 99

2-4 Utilization of Dendritic 1 Framework as a Multivalent ligand: Synthesis of a functionalized asymmetric gadolinium(III) carrier with glycoside cluster periphery

Valluru Krishna Reddy . . . 123

2-5 糖の末端基を調整した新規 MRI 造影剤の合成

青木 峻 . . . 129

2-6 Synthesis of DTPA amido ester ligands

於 剛 . . . 143

3.	<i>in vitro</i> 評価	山下 光司 . . .	155
4.	<i>in vivo</i> 評価	竹原 康雄 . . .	161
5.	造影剤 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) の生体分子認識 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) の血液成分及びがん細胞との結合性	藤江三千男 . . .	185
6.	^{153}Gd -DTPA-D1-G1c(OH) による検討	阪原 晴海 . . .	215
7.	安全性評価	山下 光司 . . .	225
8.	造影剤の市場及び製品化	掛澤 俊英 . . .	229
9.	結語	山下 光司 . . .	233
データ集			
	(1) 特許	山下 光司 . . .	235
	(2) 学会、発表	山下 光司 . . .	237
	(3) 研究会	山下 光司 . . .	264
	(4) 研究者業績	山下 光司 . . .	278

厚生労働科学研究費補助金（医療機器開発推進研究事業）

総括研究報告書

がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズ
シュガーボール dendrimer 型新規MRI造影剤の開発研究

主任研究者 山下 光司 静岡大学創造科学技術大学院

研究要旨

がんを撲滅するためには、超早期発見・早期治療が不可欠であり、そのための医療技術や医療材料のイノベーションが必要とされている。がんを人類が克服することは、並大抵の研究・努力では到底達しえないということは容易に推察されるが、本開発研究は、がんの超早期発見のために、X線CTあるいはPETよりも安全であると思われるMRI画像診断技術を現在よりもより安全に、且つより高感度で画像化できるナノサイズシュガーボール dendrimer 構造を持った新規なMRI造影剤を実用化することを目標にした研究である。

そのために、現在広く使用されているGd-DTPA（ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸）錯体の欠点を克服することが必要であると考え、MRI造影効果を有するGd-DTPA錯体をコア部とし、外殻部に分子認識能を有する糖を配置し、コア部と外殻部間を安全なリンカーにより結合する分子設計を行った。この様な開発のコンセプトに基づいて、血管貯留性の新規なMRI造影剤の開発研究を行う。

本プロジェクトの第1年度目（平成19年度）は、この様な分子設計思想に基づく一般表示式Gd-DTPA-Linker-Sugarを化学的に合成した。また、今年度末までに調製した新規なGd錯体について、*in vitro*および*in vivo*評価を行った。

今年度（平成19年度）以前の研究成果（準備段階）は、4糖タイプのGd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc(OH) {Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)} あるいはその類似体（通称「青島サンプル」）において、肝臓などの特定の臓器選択性があり血管貯留性に優れた新規な造影剤を開発した。しかし、この「青島サンプル」は体内貯留性が非常に高く、ラットの体内に24時間あるいは48時間後もそのGd濃度が検出されたので、改良を要する点も明らかになった。

平成19年度は、「青島サンプル」の合成プロセスの改良により、対称型構造のGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の簡便で短経路・高収率の合成（通称「小川サンプル」の合成）に成功した。このサンプルは、血管貯留性が「青島サンプル」よりも低く、2時間程度で体外排出が見られた。

平成19年度は、「小川サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OH)}の合成経路の開発およびその*in vitro*および*in vivo*評価結果を受けて、更に、「造影効果はより高く、体外排出速度は適度にする」と言う目標を達成するために、対称型のみでなく、非対称型のGd錯体の開発、リンカー部分の化学修飾を行った。対称型では、Gd-DTPA-EDA-D1-2G1c(OH)やGd-DTPA-AP-E1-2G1c(OH)等の調製とその*in vitro*および*in vivo*評価を行った。また、非対称型のGd錯体としては、Gd-DTPA-EDA-AS1-1G1c(OH)等の調製とその*in vitro*および*in vivo*評価を行った。

平成19年度は、これらの新規なGd錯体構造をコア部に持つ様々な錯体を調製し、その幾つかについては、*in vitro*および*in vivo*評価を行い、更に新規に導入した分子設計ソフトを使った構造-活性相関の解析を行った。これらの新規な結果の半分程度は、特許出願の関係で、本報告書に記載ができないことは残念である。国や大学の特許戦略や特許政策の検討をお願いしたいが、「特許の関係で書くことができない」と記述しなくても良い方策があればご教示頂きたいと切に念願する次第である。

また、この原稿を書いている段階で、サンプルAおよびサンプルBの安全性試験を行っている。サンプルAは「小川サンプル」Gd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OH)、サンプルBは「青島サンプル」でGd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OH)あるいはその誘導体である。安全性試験に関する現時点までの速報結果によれば、急性毒性試験はパスしている。

本プロジェクトが目指す新規MRI造影剤の性能は「現在のGd-DTPA錯体（商品名：マグネビスト（シェーリング社）の1/10の使用量で広いウィンドーを持つ血管造影を可能にすること。1 mm以下の小さな初期のがん組織を鮮明に画像化することができること。」である。この様なMRI造影剤を実用化できれば、現在普遍的に使用されている低磁場強度のMRI装置により、安全に鮮明な初期がんの超早期発見を可能にすることができる。また、この様な高機能性MRI造影剤が開発されれば、がんなどの生体内画像診断技術がX線CTなどの他の画像診断技術からMRI画像診断へとシフトして、現在60億円と言われるMRI造影剤の市場が益々大きくなる。本開発研究により、医療技術のイノベーションを促進し、がんの撲滅に一步でも前進できるものと期待しつつ研究組織を挙げて努力しており、平成19年度末では、がん化ラットによるMRI画像により約1 mm程度の初期がんの描出に成功している。

最後に、平成19年度に静岡大学に導入したICP装置によるGdの定量およびMini SpeckによるGd錯体の緩和速度の測定は当該プロジェクトの推進に大いに寄与した。また、平成19年度以前に導入した分子構造解析用のMALDI-TOF-MSや超伝導NMR装置（平成19年度にデータ測定やデータ解析用のコンピュータのバージョンアップ等を実施）等の大型装置、浜松医科大学における複合電頭や質量分析装置、

*in vivo*評価の動物実験の準備や実施、更には、岡崎共同研究機構生理学研究所などでの*in vivo*評価実施、等々に研究分担者や博士研究員、流動研究員、研究員や大学院・学部学生、技術職員・技術補佐員、経理処理担当者等々の協力に対して深謝したい。更に、このプロジェクトを経済的に支えてくれている厚生労働科学研究費補助金および財団法人医療機器センターの流動研究員制度および外国人研究者招聘事業等々の基金ならびにこれらの基金の運用・プロジェクト実施に対して親切なアドバイスを頂いた厚生労働省および財団法人医療機器センターの担当者の皆様方に感謝する。

分担研究者

阪原晴海
浜松医科大学医学部

竹原康雄
浜松医科大学附属病院放射線部

藤江三千男
浜松医科大学機器センター

掛澤俊英
静岡県工業技術研究所
浜松工業技術支援センター

A. 研究目的

(1) 研究の目的は、血管造影機能、臓器選択性、がん組織造影機能を備えた新規なMRI造影剤の開発であり、特にがんの超早期発見を可能にする造影剤の実用化研究である。このがん組織を超早期に画像化可能とする技術は、日本の死因の第1原因であるがんの早期治療や患者のQOLの観点から社会的のみならず、医学・工学的に非常に必要とされている技術である。

現在、MRI造影剤としては、糖質を外殻に持たないGd-DTPA等のGd錯体を使用されている。しかし、これらは分子サイズが小さいために血管壁から漏出しやすく血管造影が難しい。また、特定の臓器や病変部をターゲティングできない故に、標的箇所の特異的・選択的で鮮明なMRI画像が得られない。

本研究課題が開発しようとするMRI造影剤はGd-DTPAをコアに持ち、外殻部に糖を配したナノ分子サイズの新規な造影剤であり、このMRI造影剤は国内外において当研究室

以外には報告例がなく、Gd-DTPAをコアに持ち、臓器を分子認識し、血管貯留性があり、がん病変部を認識して鮮明に画像化するナノスケールのシュガーボール dendrimer 型MRI造影剤を当研究室が世界で最初に発見した。(文献、特許、参照)本開発研究は、この新規な糖 dendrimer 型MRI造影剤を実用化するための開発研究である。この造影剤が実用化(更に、商品化)すれば、危険な放射線のX線CTや高価で放射性同位元素を使うPETなどによらず、通常の普及型のMRI装置によって超早期に安全にがん組織を鮮明に画像化でき、それ故に、国民の誰もが安心して受診できるがん検診技術の革新となり得る成果が期待される重要な開発研究である。

(2) 現在までに行った研究は、天然の糖質の化学変換あるいは非天然型の擬似糖類の化学合成、複素環化合物の創製及びそれらの化合物の生理活性評価等である。また、当該研究に関しては、シュガーボール dendrimer 型の構造を持つ化合物の調製を行った。これらの研究成果を基に当該のがんを超早期に発見できるMRI造影剤の開発研究に応用して、当該のMRI造影剤を実用化する研究の完成を行う。

B. 研究方法

Fig. 1の流れ図の①をスタートとして、⑩のゴールに達する研究計画を達成する。

・実施中の平成19年度(第1年度目)の研究計画・方法と評価

(1) エチレンジアミン類やトリアミン類

により、シュガー dendriマーのコア部と外殻の中間部を構築する。(進捗度80%)
 (2) 各種の糖あるいは糖ラクトンを合成し、中間部とアミド結合やエステル結合により、DDS配位子シュガー dendriマー分子(配位子)を合成する。この工程に於いて、縮合反応や加水分解反応、置換反応等の化学反応を行う。(進捗度80%)
 (3) 得られた様々な配位子に対してGd(I II)イオンを配位させ、ナノサイズGd錯体を調製しその構造を解析する。(進捗度70%)
 (4) dendriマーの配位子およびGd錯体の構造解析、Gd錯体の純度解析のために核

磁気共鳴装置、IPC等の機器(リース)を使う。その他、現有装置類である複合電顕、元素分析、質量分析等の装置を有効に使うための消耗品等を購入し実用化研究を行なう試料(例えば、Fig. 2のGd錯体等の試料)を作成する。(進捗度80%)
 (5) Gd錯体の造影機能、生体機能分子認識(動物実験によるターゲティング機能)等Gd-DTPAシュガー dendriマーの機能を明らかにし、MRI造影剤の実用化のための性能を評価する。(進捗度70%)
 (6) *in vivo*評価を行う。(進捗度90%)

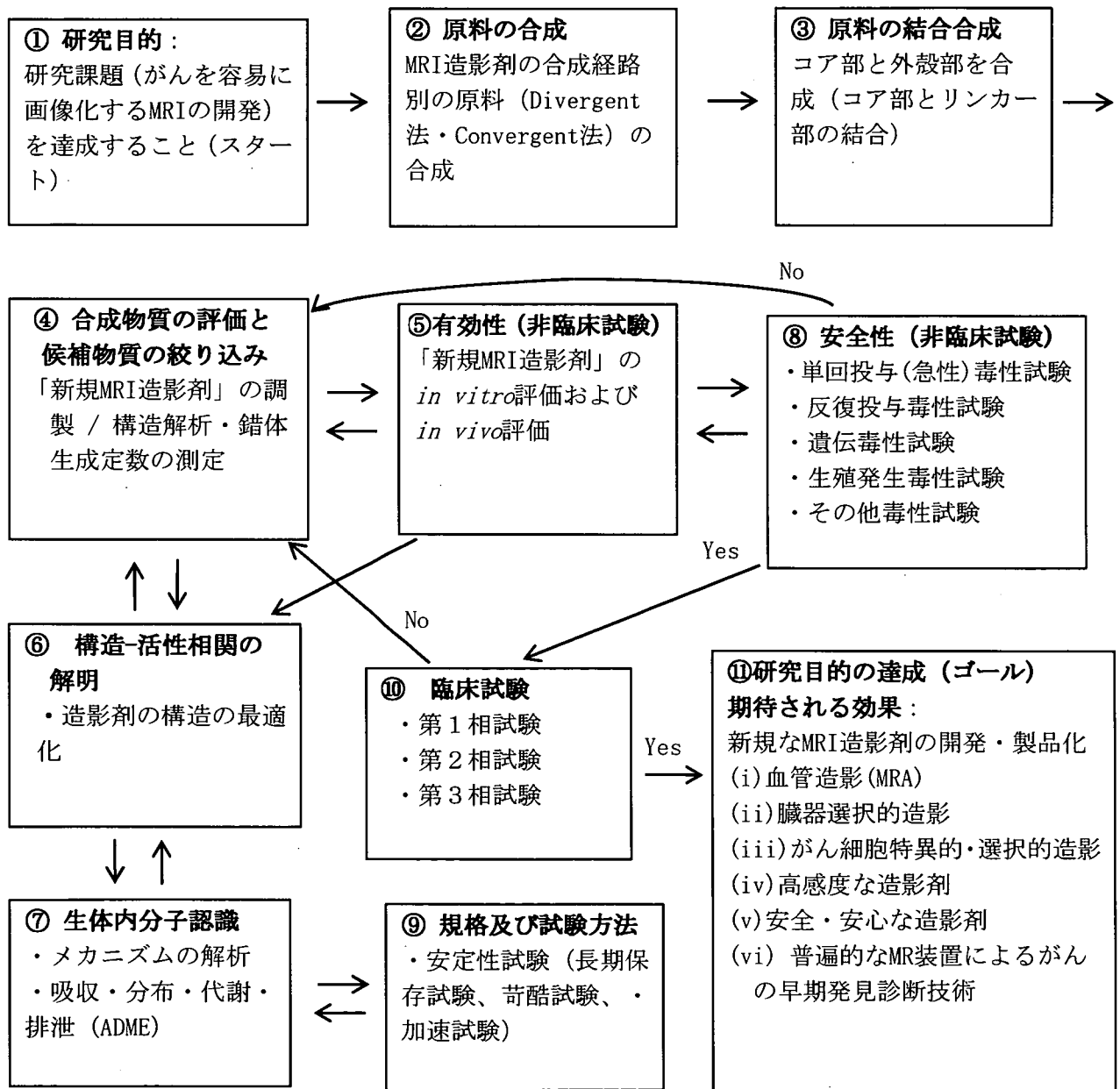


Fig. 1

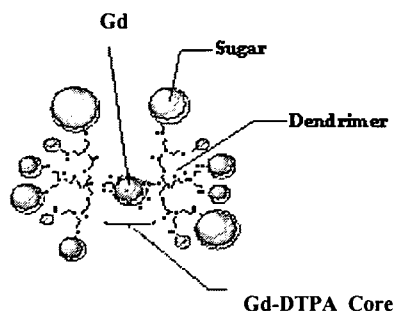


Fig. 2 デンドリマーコア部へのGdの配位 (Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)の場合)

(倫理面への配慮)

本研究により齎される新規MRI造影剤は、安全で感度が非常に高く、組織特異的・選択的であるので、使用する薬剤も非常に少量で足りる。また、基本的には、安全性を担保したサンプルを使用して *in vivo* 評価を行い、更に当該研究の最終段階で安全性試験等を通したサンプルを使用して臨床試験を実施する。それ故、動物実験（非臨床試験）の段階、あるいは臨床試験段階に於ける被験動物に対する配慮あるいは被験者の負担は極々軽減できる。臨床段階に進む場合及び臨床段階では、各研究機関及び当該の大学の学内の諸規則・手続きに従い被験者の同意等通常の倫理面の配慮はもちろん十分に尽くす。

C. 研究結果

平成19年度の研究結果

図1の①～⑧の項目に相当：

(1) エチレンジアミン類やトリアミン類により、シュガーデンドリマーのコア部と外殻の中間部を構築する。(進捗度80%)

(2) 各種の糖あるいは糖ラクトンを合成し、中間部とアミド結合やエステル結合により、DDS配位子シュガーデンドリマー分子(配位子)を合成する。この工程に於いて、縮合反

応や加水分解反応、置換反応等の化学反応を行う。(進捗度80%)

(3) 得られた様々な配位子に対してGd(II I)イオンを配位させ、ナノサイズGd錯体を調製しその構造を解析する。(進捗度70%)

(4) デンドリマーの配位子およびGd錯体の構造解析、Gd錯体の純度解析のために核磁気共鳴装置、IPC等の機器(リース)を使う。その他、現有装置類である複合電顕、元素分析、質量分析等の装置を有効に使うための消耗品等を購入し実用化研究を行なう試料(例えば、Fig. 2のGd錯体等の試料)を作成する。

(進捗度80%)

(5) Gd錯体の造影機能、生体機能分子認識(動物実験によるターゲティング機能)等Gd-DTPAシュガーボールデンドリマーの機能を明らかにし、MRI造影剤の実用化のための性能を評価する。(進捗度70%)

(6) *in vivo* 評価を行う。(進捗度90%)

D. 考察

平成19年度の開発研究により、「青島サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の誘導体}が、肝細胞がんの描出にベストの結果を与えた。この「青島サンプル」の別途合成により、「小川サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)}を調製したが、「青島サンプル」造影効果には及ばなかった。「青島サンプル」の複製版が、青木により調製された。「青木サンプル」も「青島サンプル」の肝細胞がん描出画像には及ばなかったが、「小川サンプル」よりもはるかに鮮明な画像を描出した。

これらの結果から、非常にきれいに調製された「小川サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)}はグルコース残基が血管内生体分子を認識してGd-DTPAをはるかにしのぐ造影効果を与えることが明らかになったが、「青島サンプル」はデンドリマー外殻部の糖のみによる血管内生体分子認識では説明できない強い分子認識とMRI画像描出能力を備えて

いることも明らかで、平成19年度の研究では「青島サンプル」の構造解明に未解明の課題を残した。

いずれにしても、肝細胞がんの描出は、対称型および非対称型のGd-DTPA-糖錯体がGd-DTPA自身と比較すると明らかに低濃度でがんの描出ができることが明確となった。

Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH)は *in vivo* 評価に於いて、がん化ラットの1 mm程度の小さながんの描出に成功した。

また、MOEによる構造-活性(緩和率R1) 相関、Docking Simulationから、「青島サンプル」を越すMRI造影剤の開発の可能性が示唆された。

これらの研究結果並びに考察の詳細については、対応する各章を参照されたい。

E. 結論

平成19年度の研究では、次のことが明らかになった。

(1) 「青島サンプル」は、今までに調製されたGd-DTPA-糖構造のデンドリマー型の新規な造影剤としては、最高の血管描出能および肝細胞がん描出能を備えている。この造影剤の構造はGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)ではなく、Gd-DTPA-DETA-D2-nGlc(OH)の誘導体の誘導体と推察される。

(2) 「小川サンプル」は糖に保護基の導入なしに、短経路により高収率で化学合成された。このサンプルによる血管造影および肝細胞がん描出能は「青島サンプル」との比較において及ばないが、かなり鮮明なMRI画像を描出した。この造影剤の構造はGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)である。

(3) 「青島サンプル」の非常に長い体内滞留性を改良するため、更に構造と活性相関を解明するために、様々な構造Gd-DTPA-糖構造をもつGd錯体を調製した。また、その *in vitro* および *in vivo* 評価を行った。その結果は、特許等の関係で本報告書では記述できない

が、平成20年度の研究を推進する上において、非常に有効な情報が得られた。

(4) 平成19年度までの開発研究によって、1 mm程度の小さな肝細胞がんが、低濃度のGd-DTPA誘導体錯体により描出された。

(5) 平成19年度に調製されたサンプルAおよびサンプルBは、単回投与による急性毒性試験で特に問題のある毒性を示さず、安全なMRI造影剤であることが示された。

F. 健康危険情報

Gd-DTPAはNFLと言う症状を起こすと言う危険情報がある。しかし、本開発研究が目指すGd-DTPA-糖誘導体錯体は、感度が高く、低濃度で鮮明なMRI画像を描出することができるので、NFL問題は起こすことがないと思われる。

G. 研究発表

1. 論文発表 (詳細はデータ集を参照)

- [1] Yamashita, Mitsuji, "Preparation, Structure, and Biological Property of Phosphorus Heterocycles with a C-P ring System", in Top Heterocyclic Chemistry Series Vol. 8 (Bioactive Heterocycles II), ed. by Shoji Eguchi, Springer, Germany, 2007, published on line.
- [2] Yu, Gang; Studies on preparation and characterization of novel MRI contrast agents for targeting organs and blood vessels. Heterocyclic Communications (2007), 13(2-3), 101-108.
- [3] Yu, G., R. N. A glycosylated complex of gadolinium, a new potential contrast agent for magnetic resonance angiography? Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters (2007), 17(8), 2246-2249.

- [4] 竹原康雄：腎がんの検査，画像診断。吉田修，大園誠一郎 編，インフォームドコンセントのための図説シリーズ，腎がん。大阪，東京，医薬ジャーナル社，2007. pp36-45.
- [5] Match F: Usefulness of delayed enhancement magnetic resonance imaging to differentiate dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. J Card Fail 13 (5): 372-379, 2007
- [6] Isoda H: Contrast-enhanced three-dimensional MR angiography with an elliptical centric view for the evaluation of intracranial aneurysms. Eur Radiol 17 (5): 1221-1225, 2007.
- [7] Yamashita S: T2-weighted MRI of rectosigmoid carcinoma: comparison of respiratory-triggered fast spin-echo, breathhold fast-recovery fast spin-echo, and breathhold single-shot fast spin-echo sequences. J Magn Reson Imaging 25 (3): 511-516, 2007.
- [8] Yamashita S: Visualization of hemodynamics in intracranial arteries using time-resolved three-dimensional phase-contrast MRI. J Magn Reson Imaging 25 (3): 473-478, 2007.
- [9] Masui T: Magnetic resonance cholangiopancreatography: comparison of respiratory-triggered three-dimensional fast-recovery fast spin-echo with parallel imaging technique and breath-hold half-Fourier two-dimensional single-shot fast spin-echo technique. Radiat Med 24 (3): 202-209, 2006.
- [10] 2007342622 【Step up MRI 2007 3T MRIである理由】 クリニカル3T MRIの現状 どこまで使いこなせるか 磐田市立総合病院 腹部領域における有用性 SIGNA HDx3.0T
Author: 寺田理希(磐田市立総合病院放射線技術科), Source: INNERVISION (0913-8919)22巻9号 Page46-49(2007.08)
- [11] 2007300021 【MRIの普及はなにをもたらすのか】 キーワードで読むMRI [PETとの対比] MRIはFDG-PETに取って代わるか
Author: 竹原康雄(浜松医科大学附属病院 放射線部), Source: 新医療(0910-7991)34巻6号 Page76-78(2007.06)
- [12] 2007290724 【これだけは知っておきたい画像診断のコツ 研修医のための胸・腹部CT、MRI】 MRCP 胆管・膵管が見える
Author: 竹原康雄(浜松医科大学附属病院 放射線部), Source: 臨床研修プラクティス(1349-0524)4巻8号 Page62-64(2007.07)
- [13] 2007217341【分子イメージング 現状と展望】 腫瘍の分子イメージングがん検出
Author: 竹原康雄(浜松医科大学附属病院 放射線部), 今野弘之, Source: 日本臨床(0047-1852)65巻2号 Page342-351(2007.02)
- [14] 007180506 【閉塞性黄疸の画像診断】 MRI検査
Author: 竹原康雄(浜松医科大学附属病院 放射線部), Source: 臨床画像(0911-1069)23巻4号 Page416-429(2007.04)
- [15] Sugiyama K. MR findings of pseudoneoplastic lesions in the uterine cervix mimicking adenoma malignum. Br J Radiol. 2007 Nov;80(95

- 9):878-83. PMID: 17989332 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [16] Sugiyama K. Magnetic resonance findings of clear-cell adenocarcinoma of the ovary. *Acta Radiol.* 2007 Jul;48(6):704-6. PMID: 17611882 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [17] Match F. Usefulness of delayed enhancement magnetic resonance imaging to differentiated dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Card Fail.* 2007 Jun;13(5):372-9. PMID: 17602984 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [18] Gang Yu. "Studies on Preparation and Characterization of Novel MRI Contrast Agents for Targeting Organs and Blood Vessels", *Heterocyclic Communications, Vol 13, Nos. 2-3, 2007, Pages 101-108.*
- [19] G. Yu. "A Glycosylated Complex of Gadolinium, a New Potential Contrast Agent for MR Angiography?", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Volume 17, Issue 8, 15 April 2007, Pages 2246-2249.*
2. 学会発表 (詳細はデータ集を参照)
- [1] K. Ogawa, "Studies on novel contrast agents for specific organs, blood vessels, and tumors", 14th European Carbohydrate Symposium, 15-19, Sept. 2-7, 2007, Luebeck, Germany.
- [2] N. Ozaki, "Synthesis and evaluation of novel Gd-DTPA-Sugar compounds as MRI contrast agents", 5th International Academic Conference, Sept. 26-27, Hamamatsu, Japan.
- [3] M. Yamashita, "Research on Novel Sugar Dendritic MRI Contrast Agents for Cancer and Phospho Sugar Anticancer Material", 4th Tumor Progression & Therapeutic Resistance Conference, Oct. 4-5, in Philadelphia, PA. U.S.A.
- [4] S. Yamashita, Analysis of Wall Shear Stress of Carotid Bifurcation using Time-Resolved Three-Dimensional Phase-Contrast MR Imaging 15th Scientific Meeting and Exhibition of International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 19-25 May 2007, Berlin, Germany
- [5] Y. Takehara, Assessment of the Flow Dynamics Changes in Splanchnic Arteries in Patients with Median Arcuate Ligament Compression Using Time-Resolved Three-Dimensional Phase-Contrast MRI (4D-Flow) and a New Flow Analysis Application (Flova) 15th Scientific Meeting and Exhibition of International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 19-25 May 2007, Berlin, Germany
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。詳細はデータ集を参照)
1. 特許取得
 - [1] ガドリニウム化合物及びMRI造影剤
 - [2] ガドリニウム錯体の製造方法
 - [3] ジエチレントリアミン五酢酸誘導体、ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸誘導体の錯体及びMRI造影剤並びに富血性腫瘍特異性造影剤
 - [4] 富血性腫瘍特異性造影剤
 - [5] 新規なデンドリマーおよび造影剤
 2. 実用新案登録
 - なし
 3. その他
 - なし

主任研究者・分担研究者・研究協力者一覧

主任研究者

山下 光司 静岡大学 創造科学技術大学院 (教授)

分担研究者

阪原 晴海 浜松医科大学 医学部 放射線医学 (教授)
竹原 康雄 浜松医科大学 医学部 放射線医学 (准教授)
藤江三千男 浜松医科大学 機器センター 構造解析 (技術職員)
掛澤 俊英 静岡県工業技術研究所 浜松工業技術支援センター
機械材料科 (科長)

研究協力者

間賀田泰寛 浜松医科大学 光量子医学研究センター (教授)
作佐部太也 藤田保健衛生大学 医療科学部 (准教授)
田中 康隆 静岡大学 工学部 物質工学科 (准教授)

西脇 州 コニカミノルタエムジー株式会社 医療事業推進室
三浦 紀生 コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社
材料技術研究所

Valluru Krishna Reddy 財団法人 医療機器センター (研究員)
Arigala Uma Ravi Sanker 財団法人 医療機器センター (研究員)

Bitragunta Siva Kumar 静岡大学 工学部 物質工学科 (研究員)
於 剛 静岡大学 イノベーション共同研究センター (研究員)
小川 圭介 静岡大学 工学部 物質工学科 (研究員)
尾崎 伸久 静岡大学 大学院工学研究科 (修士課程2年)
青木 峻 静岡大学 大学院工学研究科 (修士課程1年)
杉山 雅紀 静岡大学 工学部 物質工学科 (4年)
水野紗耶香 静岡大学 工学部 物質工学科 (4年)

ガドリニウム錯体の略記およびその名前の対応表

略記	Gd錯体の名前
Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OH)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal (OH)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Gal (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Man (OH)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Man (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (OAc)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc (OAc)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Gal (OAc)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Gal (OAc)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Man (OAc)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Man (OAc)
Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc (OH)	Gd-DTPA-Ethylenediamine-D-2Glc (OH)
Gd-DTPA-EDA-D1-2Gal (OH)	Gd-DTPA-Ethylenediamine-D-2Gal (OH)
Gd-DTPA-EDA-D1-2Man (OH)	Gd-DTPA-Ethylenediamine-D-2Man (OH)
Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc (OH)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-AS-2Glc (OH)
Gd-DTPA-DETA-AS2-2Glc (OAc)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-AS-2Glc (OAc)
Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc (OH)	Gd-DTPA-Ethylenediamine-AS-1Glc (OH)
Gd-DTPA-AE3 (OH) B (CO) EDA-AS6-6Glc (OH)	Gd-DTPA-aminoethatriolbutyraldehyde3diethylentriamine-AS-6Glc (OH)
Gd-DTPA-AE3 (OH) B (CO) EDA-AS6-6Glc (OAc)	Gd-DTPA-aminoethatriolbutyraldehyde3diethylentriamine-AS-6Glc (OAc)
Gd-DTPA-AP-E1-2Glc (OH)	Gd-DTPA-aminopropanol-E-2Glc (OH)
Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc (40Ac) (10H)	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-D-4Glc (40Ac) (10H)
Gd-DTPA-DETA-AS1-3Glc (OH, OAc) 誘導体	Gd-DTPA-Diethylenetriamine-AS1-3Glc (OH, OAc) 誘導体

1. 緒言(3年間の計画)

1-1 開発研究の要約

本開発研究は、現在実用に供されている MRI 造影剤の Gd-DTPA 錯体 (ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸錯体: Gadolinium-(Dethylenetriaminepentaacetic acid) : 商品名 マグネビスト) が血管外漏出型の造影剤であるために、(1) 現在の造影剤では画像化が難しい「血管造影」を可能にすること、(2) 小さな初期がんを低濃度の造影剤で高感度で鮮明に画像化すること、(3) 高感度で画像化できる造影剤であるために安価な普及型の MR 装置により「がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズシュガーボール dendrimer 型新規 MRI 造影剤」を実用化する開発研究を行う。

当該開発研究課題に対して平成 19 年度～平成 21 年度の 3 年間にわたる厚生労働科学研究費補助金を申請致しましたところ幸いにも開発研究計画の採択を頂いた。社会ニーズの請託を受けたと、肝に銘じて当該のプロジェクトを完成し医療技術の革新を実現したいと思う。

本開発研究は、がんの超早期発見を安全な MRI 法により実現することであり、早期治療と協働してがんの撲滅のための医療技術のイノベーションを惹起する新規なシュガーボール dendrimer 型の MRI 造影剤の開発・実用化を最終目標とする開発研究である。初年度の平成 19 年度の開発研究では、従来の MRI 造影剤を用いたのでは画像の描出ができない程度の初期がん (現時点で、*in vivo* 評価により、直径 1 mm 程度のがんの描出ができる) の描出に成功した。また、様々な Gd 錯体を分子設計し、それらの錯体を調製した。更に、これらの Gd 錯体を化学合成して、*in vitro* 及び *in vivo* 評価を行い、マグネビストよりも高感度で肝臓がんの造影に成功しており、次の段階として、更に高感度で安全な描出が可能な新規 MRI 造影剤の開発研究のステップアップを継続して行く。

1-2 開発研究の概要

本開発研究は、現在使用されている MRI 造影剤の備えていない機能 (即ち、血管貯留性、血管造影機能や特定の臓器あるいは生体組織、がんなどの病変部の選択的造影能) を生体分子認識能を持つ糖により付与された新規な MRI 造影剤を開発し、特にがんを安全で容易に画像化する MRI 造影剤を実用化 (更には商品化) するための開発研究である。本研究で開発する MRI 造影剤は、現在実用に供されている Gd-DTPA をコア部の基本骨格として、外殻部に糖質 (あるいはペプチド) をリンカーを介して 1 個～12 個備えたナノサイズシュガーボール dendrimer 構造を基本的な骨格とする MRI 造影剤であり、Gd-DTPA を血管内で運搬する DDS 型の造影剤であるとも言える。この場合、糖の種類はグルコースやガラクトース、マンノース、ラクトース等様々な種類・性質の糖が使用できる。またコア部と外殻部とのリンカーの結合様式はアミド結合やエステル結合など生体内で代謝あるいは分解される速度の異なる結合を使用し、血管造影およびがん組織を選択的に造影する安全・高感度で画像化を可能にする MRI 造影剤である。

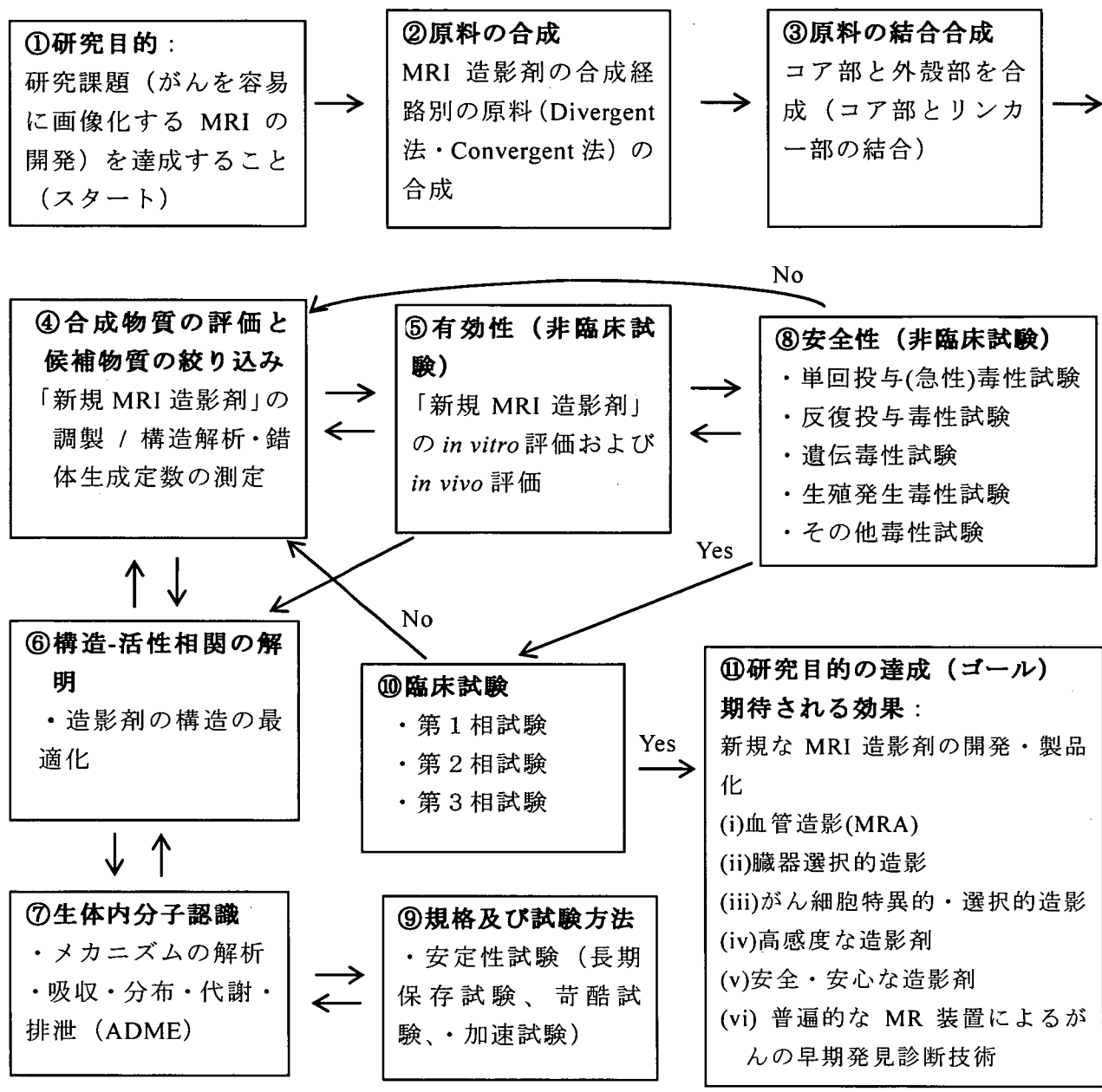


Fig. 1-01 開発研究のスキーム

1-3 開発研究の目的、必要性及び期待される成果

開発研究の目的は、血管造影機能、臓器選択性、がん組織造影機能を備えた新規な MRI 造影剤の開発研究である。これらの画像化技術、特にがん組織の画像化技術は、死因の第 1 原因のがんの治療や患者の QOL 改善の観点から社会的、医学・工学的に非常に必要とされている。本開発研究が成功すれば、MRI 画像化技術は、X 線 (X 線 CT 等) や放射性同位元素 (PET 等) を必要としない故に、医療技術的にも患者にとっても非常に安全で鮮明な画像化技術を提供できる。本開発研究で開発される造影剤は非常に高い緩和率を有し高感度で画像化できるので、現在通常の病院に設備されているレベルの MRI 装置により、がん組織や血管が画像化でき、がんの超早期発見・早期治療に画期的な医療技術を提供できる。

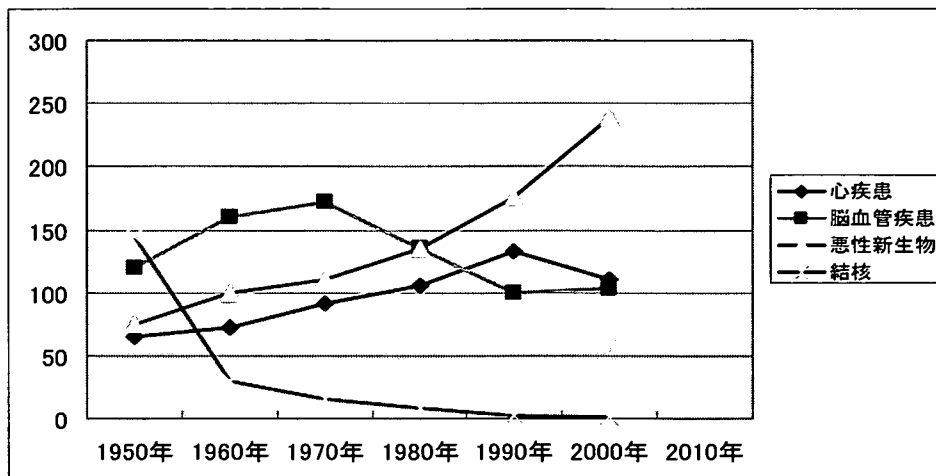


Fig. 1-02 疾病による死亡者（1000人当たりの死者数）の推移の傾向

1-4 この開発研究に関連する国内・国外における研究状況及びこの研究の特色・独創的な点

糖質を外殻に持たないGd-DTPA等のMRI造影剤が現在主流であるが、分子サイズが小さいために血管壁から漏出し易く（血管漏出型造影剤）、血管造影が難しい。また、特定の臓器や病変部をターゲティング（非特異的造影剤）できない故に、がんや血管、特定臓器等の標的箇所の鮮明なMRI画像が得られない（あるいは、得難い）。Gd-DTPAをコア部に持ち、外殻部に糖を配した大きな分子サイズのMRI造影剤は国内外において当研究室以外の報告例は少ない¹⁻⁶⁾。当研究室では、Gd-DTPAをコア部として持ち、生体機能性物質である糖を外殻に配置することにより、血管内に留まり（血管貯留性）、臓器・組織を分子認識（組織・病変部選択性）して、特にがん病変部を認識して、がんなどの標的を鮮明に画像化するナノスケールのシュガーボール dendrimer 型MRI造影剤の開発に世界で初めて着手した⁷⁾。

本開発研究は、平成19年度までに、世界で初めての新規な糖 dendrimer 型MRI造影剤の分子設計とその造影剤の調製ならびにその評価の基礎的な研究に成功した例であり、小さな初期がんの描出に成功し、平成20年度では、更に実用化に向けた開発研究を継続する段階である。この種のシュガーボール dendrimer 型の造影剤が実用化（更に、商品化）すれば、危険なX線や高額なPETなどによらなくても、通常のMRI装置によって血管や特定臓器、特に、がん組織が鮮明に画像化できる画期的な開発研究である。

1-5 申請者がこの開発研究に関連して現在までに行った研究状況

当研究室では、すでに、Gd-DTPAをコア部に持ち、臓器を分子認識し、血管貯留性の機能のあるナノスケールのシュガーボール dendrimer の調製を進めている⁷⁻⁹⁾。核磁気共鳴装置を用いた *in vitro* 評価で従来のGd-DTPA錯体よりも数倍緩和率が優れ、ラットやマウス等による *in vivo* 評価では血管造影や臓器選択性が顕著に認められ、特に肝

細胞がんを鮮明に画像化することに成功した。平成19年度から採択された厚生労働科学研究費補助金および関連した医療機器センターの諸事業によるサポートを受けて、実用化に向けて、平成19年度～平成21年度の事業年度において更なる開発研究を進めている。

現在までの開発研究により、分子量1,000～10,000程度のGd-DTPA-シュガーボールデンドリマー型の造影剤は、ラットの肝臓がんや血管の画像において従来のGd-DTPAよりはるかに高感度で鮮明であることが証明された (Fig. 1-03 の右の新造影剤によるMRI画像)。

それ故、本開発研究が目指す造影剤は、あらゆる病院にある普遍タイプのMRI装置によりがんの画像化 (Fig. 1-02 MRI画像 (右: 新造影剤)) が可能であり、がんの超早期発見・早期治療に画期的な成果をもたらすことが期待される。医工連携による本開発研究成果は国内外に特許出願し⁸⁻¹²⁾、成果の一部は国内外の学会あるいは論文でがん治療に関連した内容を発表し、高い評価を得ている¹³⁻²⁰⁾。

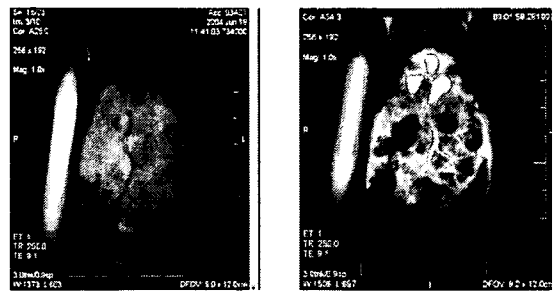


Fig. 1-03 MRI画像
従来のMRI造影剤 (Gd-DTPA) によるMRI画像 (左) および新造影剤によるMRI画像 (右)

1-6 開発研究計画・方法及び倫理面への配慮

平成19年度と平成20年度～21年度の研究計画・方法を、以下に具体的に箇条書および図 (図は、概要 Fig. 1-01 参照) にて記述する。

●平成19年度

- 1) エチレンジアミン類やトリアミン類により、シュガーデンドリマーのコア部と外殻の中間部を構築する。
- 2) 各種の糖あるいは糖ラクトンを合成し、中間部とアミド結合やエステル結合により、DDS 配位子シュガーデンドリマー分子の配位子を合成する (例えば、Fig. 1-04) に示す Gd-DTPA-D2-12Glc(OAc) の配位子部分、等)。デンドリマーの配位子の構造解析を行う。

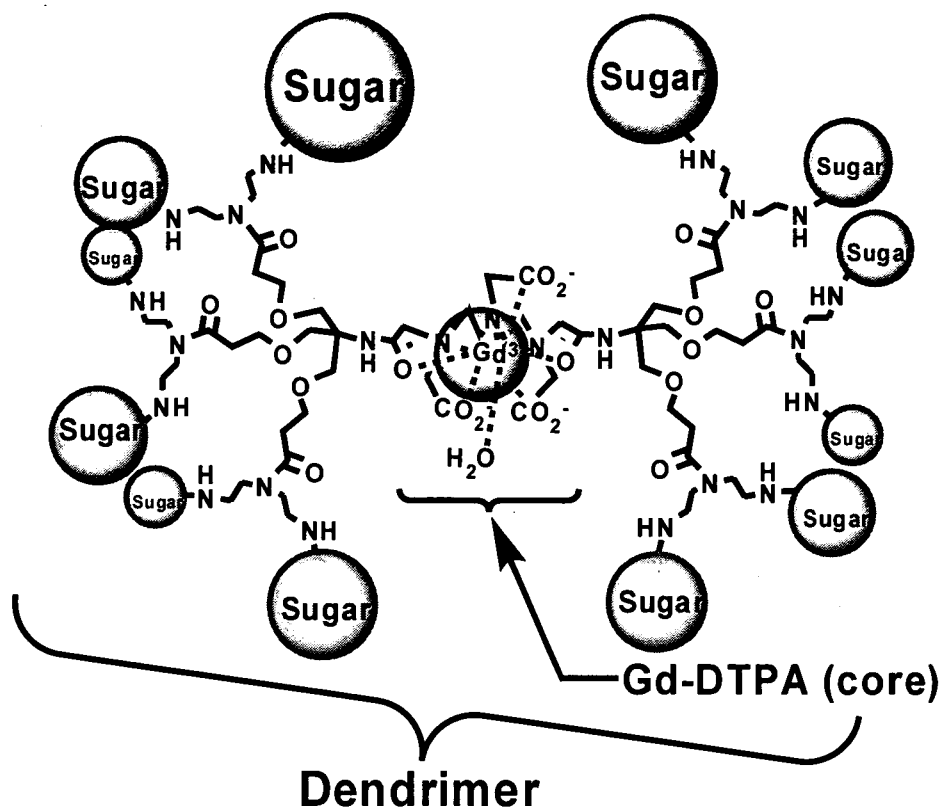


Fig. 1-04 デンドリマーコア部への Gd の配位 (Gd-DTPA-D2-12Glc(OAc)) の場合

- 3) 得られた様々な配位子に Gd(III) イオンを配位させ、新規な Gd 錯体を調製する。
- 4) Gd を配位した新規な MRI 造影剤の構造解析を行う。また、Gd 錯体の生成定数、緩和率の測定（純水中、生理食塩水中、血清中、等）、分子認識（動物実験によるターゲティング機能や高感度化のメカニズム）等の機能を明らかにし、MRI 造影剤の性能を *in vitro* 評価する。
- 5) 新規な MRI 造影剤の *in vivo* 評価を行う。また、重要な Gd 錯体に対して、安全性評価を行う。
- 6) 構造-活性相関の研究や分子設計を開始する。

●平成 20 年度～21 年度

- 1) デンドリマーコア部をダイマーあるいはオリゴマー化したり、分子認識能力を高めるための分子の設計と化学合成をおこなう。分子認識される生体内機能物質を特定する。外殻の糖質の種類や数を変化させ、多様な結合、多様な糖質、多様な分子サイズ、多様な配位数の MRI 造影剤を調製し、MRI 造影剤の構造の最適化を図る。
- 2) 様々なデンドリマーコア部に配位した Gd の定量や MRI 造影剤の純度や分子量を解析する。
- 3) 創製したデンドリマー型 MRI 造影剤を、物理化学評価 (*in vitro* 評価)・生物評価 (*in vivo* 評価、安全性評価) 等の諸手法により造影剤としての評価と最適化を行う。動物実験により造影機能のみでなく代謝経路や体外排出速度などを測定し、新

規な MRI 造影剤を開発する。

- 4) 開発された造影剤により、臨床試験を経て、がん組織を MRI で可視化する当該の開発研究を完成させる。

これらの開発研究のスキームは、概要の Fig. 1-01 を参照して頂きたい。

●倫理面の配慮

本開発研究により齎される新規 MRI 造影剤は、安全で感度が非常に高く、組織特異的・選択的であるので、使用する薬剤も非常に少量で足りる⁷⁻⁹⁾。また、基本的には、安全性を担保したサンプルを使用して *in vivo* 評価を行い、更に当該開発研究の最終段階で安全性試験等をパスしたサンプルを使用して臨床試験を実施する。それ故、動物実験（非臨床試験）の段階、あるいは臨床試験段階に於ける被験動物に対する配慮あるいは被験者の負担は極々軽減できる。臨床段階に進む場合及び臨床段階では、各研究機関及び当該の大学の学内の諸規則・手続きに従い被験者の同意等通常の倫理面の配慮はもちろん十分に尽くす。

1-7 当該開発研究の成果

平成 19 年度は、先開発の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) 誘導体（所謂、青島サンプル；恐らく、Gd-DTPA-Gd-DTPA-DETA-AS2-3Glc(OH, OAC) 誘導体で表記できる Gd-DTPA 錯体）の再現性に関する研究、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) の別途合成による、合成経路の開発に関する研究、リンカー部分と外殻部分の化学的修飾に関する研究、対称型 Gd-DTPA 錯体・非対称型 Gd-DTPA 錯体の調製、構造と造影剤効果に関する *in vitro* および *in vivo* 評価に関する研究、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) の研究、新規な Gd-DTPA の安全性評価に関する研究、構造-活性相関の研究と分子設計に関する研究、生体内分子への集積性に関する研究、がん組織への集積性に関する研究、等を精力的に行った。各項目の研究成果については、対応する章を参照願いたい。

これらの研究成果を第 2 章以下に示す。但し、特許の関係で、結果の開示ができない研究については、簡単な研究内容の記述に留めた。当該報告書の公開性に関しては、日本が技術立国を標榜するとしたら、先出願主義の特許法に依っている日本では、出来れば一定期間の非公開、特許法の特例条項適用の準用、等の配慮が必要であると思われる。あるいは、日本の特許法を根本的に変更して、先発明主義の特許法にする等の英断が必要ではないかと思われる。

この章の最後に当たって、平成 14 年度～平成 16 年度に採択された財団法人しずおか産業創造機構の「地域イノベーション共同研究促進事業」による研究のサポートや JST の研究費の配分等の研究経費の支援を深謝する。

財団法人しずおか産業創造機構の「地域イノベーション共同促進事業」によって、次の研究課題に研究成果を上げることができた故に、平成 19 年度の厚生労働省の科学研究費補助金を申請しその申請書が採択に至る機会が与えられたと思われる。

- (1) 抗血栓性や抗菌性等の性質を持つ機能性のオリゴ糖又は多糖を用いて高度に機能化した医用材料を開発し、優れた機能を持つ医療器具製造のための独創