

### 3-2 Gdの励起と蛍光測定

Gd(III)を272 nmの紫外光により励起すると544 nmおよび622 nmに蛍光が観測された(Fig. 3-04)。622 nmの蛍光強度は強く、この現象を利用すれば、Gd-錯体の生体内分子との相互作用などのメカニズムの解析に応用できるのではないかと期待される。

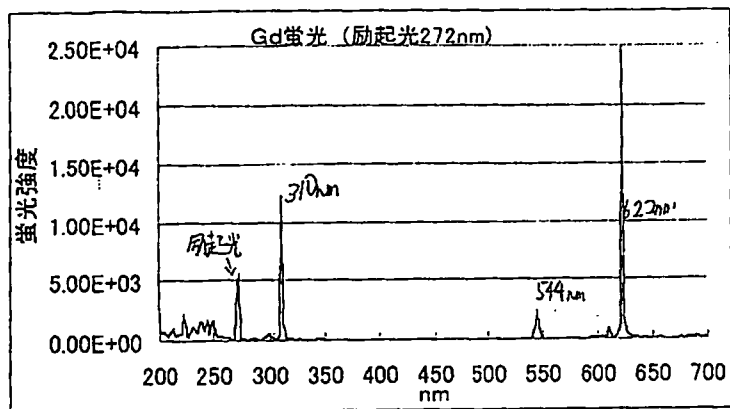


Fig. 3-04 Fluorescence of Gd(III) excited by 272 nm.

### 3-3 Gdの定量

平成19年度にICPプラズマ発光スペクトル分析装置が入手できた(Fig. 3-05)。この装置単独あるいは電気泳動やアフィニティークロマトグラフィーとの組み合わせ等により、今後の当該プロジェクトがゴールとするMRI造影剤の作用機序の解明と標的分子の調製に大きな役割を果たすことが期待される。

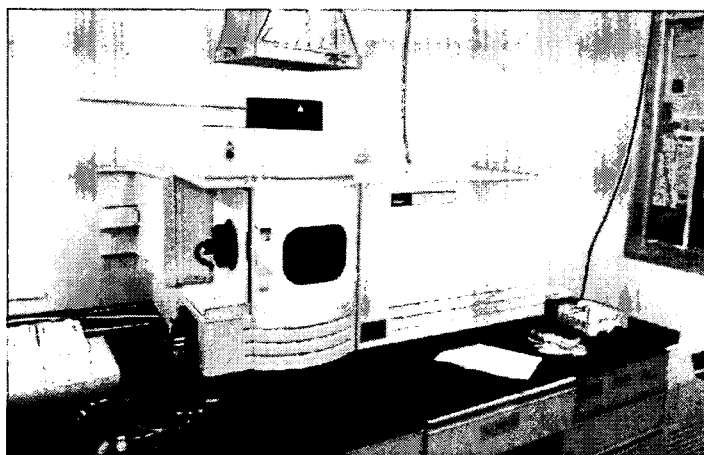


Fig. 3-05 ICP plasma emission spectrometer.

### 3-3 *in vitro* 評価および *in vivo* 評価の応用

3-1 の BURUKER 社製の Minispeck (Fig. 3-06) による *in vitro* 評価および *in vivo* 評価については、以下のそれぞれの章に於いて適宜研究結果を含めて表記される。*in vitro* 評価は平成 19 年度以降のプロジェクトの推進に大いに貢献するものと期待される。



Fig. 3-06 Minispeck NMR instrument prepared by Buruker.

## 4. *in vivo* 評価

これまで、T1 強調画像をベースとした MRI による造影検査は、非特異的な血管外漏出性ガドリニウムキレート製剤を用いたものであった。静脈注射された造影剤は速やかに血管外、細胞間質に漏出するため、その撮影のためには、造影剤の bolus 注入と、動脈相における高速イメージングが必要であった。MR angiography (MRA) による動脈病変の評価や、多血腫瘍の代表である肝細胞がんの同定やその評価においても、また然りで、このために、全肝の評価には高磁場の高速 MR 装置が必要であった。投与後数時間にわたり血管内に停滞する新しいデンドリマー型造影剤 dendrimers DTPA-D1Glu(OH) (以下デンドリマー) を用いて、T1 強調画像が撮影できれば、撮像の imaging-window が広がる可能性がある。

こうした血管内に滞留する性格を有する造影剤を別名、血液プール造影剤というが、この血液プール造影剤は、その調整段階ですでに分子量が高いか、あるいは大分子の蛋白に結合しているため、非特異性造影剤と比較して血管内滞留性があり、その血中における造影効果が持続するのみならず、大分子結合の遷移金属の性質として、thermal-rotation の関係から、T1 緩和度が高く、造影効果自体も非特異性造影剤に比して高い。これらの血液プール造影剤は、今まで血管や血管性病変の診断に用いられてきた。

### 4-1 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

我々は組織認識をする特異性造影剤の開発を行うなかで、特に血液プール造影剤の開発にも力を注いできている。そのなかで、現在までもっとも血液中への滞留傾向の強いことが判明しているリガンドが Gd-DTPA-D1-Glc(OH) である (Fig. 4-01)。この章ではこの造影剤を軸にデンドリマーコアの *in vivo* MRI の結果について述べる。

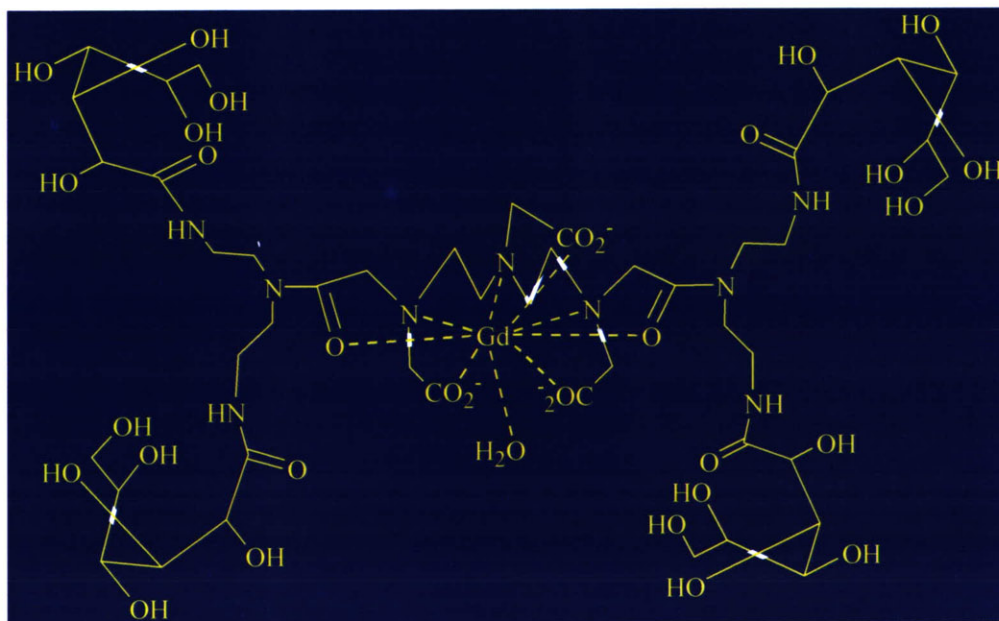
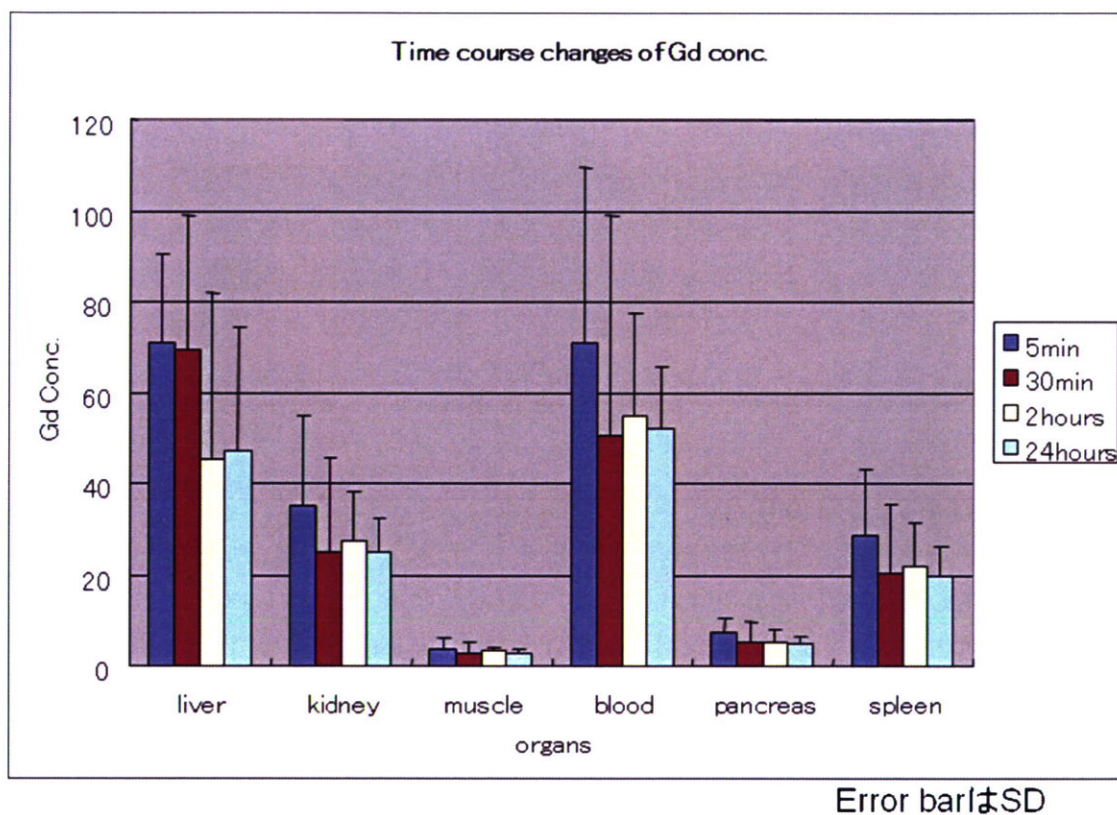


Fig. 4-01 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子構造

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は Gd-DTPA (gadolinium diethylenetriamine pentaacetic acid) を基本骨格とし、側鎖に glucose を 4 分子有している。

この造影剤は分子量が 1448 (Mass1448.44) と本来なら血管外に漏出しうるサイズであるにもかかわらず、マウスを用いた基礎実験では血管内に長時間停滞することが知られている。われわれはこの造影剤の血管内滞留性について、biodistribution study にて定量的に評価しているだけでなく (Fig. 4-02)、*in vivo* メージングでも確認している。



検体数n=19

Fig. 4-02

19匹の ddy マウスを使用して Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を 0.05 mmol/kg を静脈内投与後、5分、30分、2時間、24時間後に経時的に組織を採取し、inductively coupled argon plasma (ICAP) optical emission spectrometers にてガドリニウムを定量したデータ

特筆すべきは造影剤投与後 2 時間、24 時間においても投与 5 分後のレベルの 50% を下回らない濃度レベルにあることで、本造影剤の優れた血管内滞留性を示す結果となった。

#### 4-1-1 *in vivo* 信号増強効果

本造影剤が血管内に滞留する血液プール造影剤であるとするれば、その性質を利用すると、当然 MRA (血管造影) に優れた効果が予想される。試みに、3 匹の Wistar rat (20 週、雌性、体重 300g) を用いてソムノペンチル (50 mg/kg i.p.) による全身麻酔下で尾静脈から Gd-DTPA-D1-Glc(OH) については 0.05 mmol/kg (0.3 ml)、対照として Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング、大阪) については 0.1 mmol/kg (0.3 ml) を急速静注し、3Tesla (3T) MR 装置 (Magnetom Allegra, Siemens Medical System, Erlangen, Germany) を用いて、約 1 分毎に経時的に撮影を行った。使用した撮像パルス系列は 3D-VIBE で、パラメータは TR(ms)/TE(ms); 4.5/1.8、NEX; 1、FOV (mm); 120、matrix; 256x208、partition (mm); 0.7. である。撮像にはその結果、Fig. 4-03 に示すごとく、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) については急速静注直後 (3 分後) の MR angiography において対照の Gd-DTPA による造影よりもすぐれたコントラストで心血管の描出を得たのみならず、その造影効果は最長の観察時間である 6 時間後まで持続していた。これは対照の Gd-DTPA による心血管の造影効果が静注後 30 分にはほとんど造影剤投与前と同等のコントラストになっているのとは対照的である (Fig. 4-04)。

さらに、得られた元画像上で、信号増強効果に関して半定量的な検討を加えるべく、ワークステーション上で、造影前後の元画像上において、肝、腎 (皮質、髄質)、腹部大動脈、下大静脈、肝臓、ファントム (生理的食塩水、オリーブオイル)、バックグラウンドに ROI を設定し、平均信号強度、標準偏差を測定し、signal-intensity-ratio (SNR) を計算して比較した。得られた信号雑音比の経時変化について Fig. 4-05 ~ Fig. 4-07 に示す。なお、SNR は (信号強度-背景信号) / 背景信号の標準偏差で計算した。統計は時系列における変化については反復分散分析と Fisher の PLSD 検定を行い、各群間の差については Wilcoxon test を使用した。危険率 0.05 以下を有意差としている。

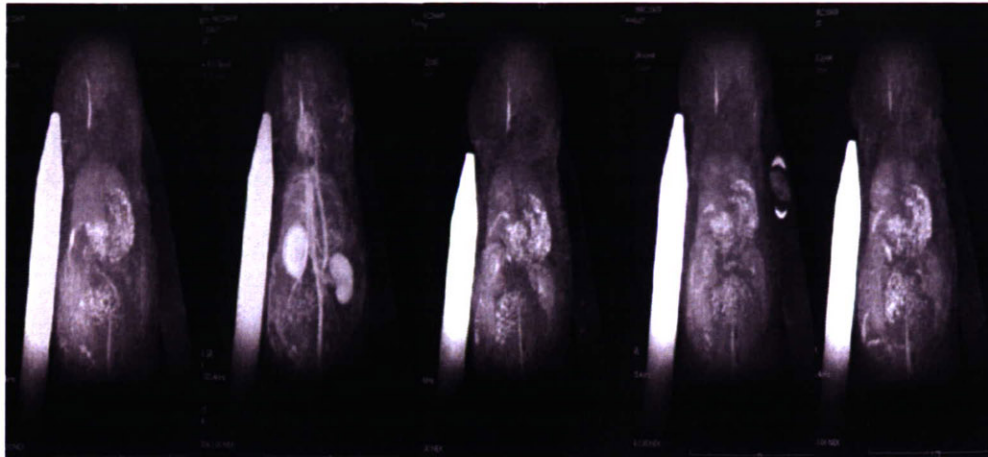
\*なお、以下に示す全ての手技は浜松医科大学動物実験センターの動物取扱に関する倫理規程並びに United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines に基づいて施行された。



**Fig. 4-03 ヨード系造影剤によるラットの血管造影像**

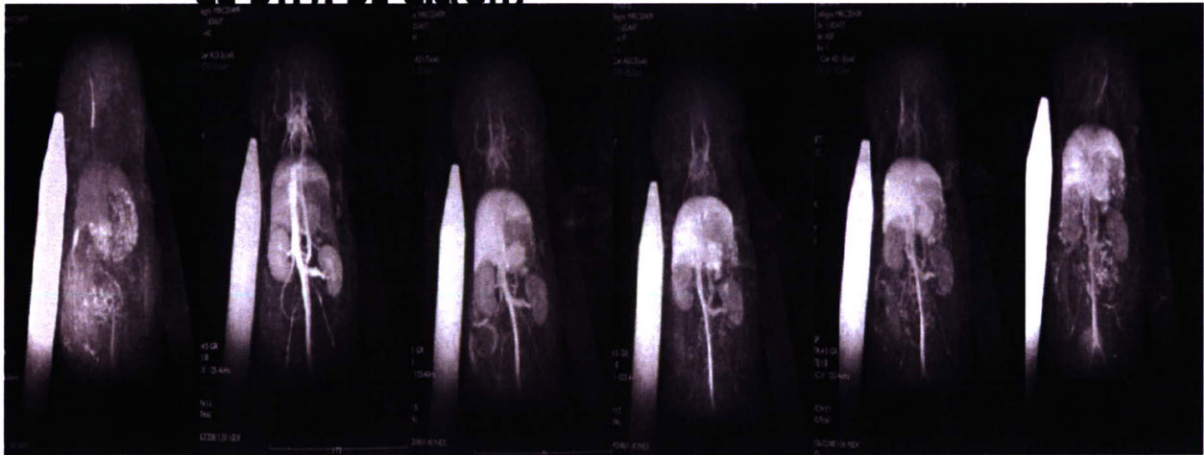
以下の MR angiography と比較されたい。ラットにおいては大動脈は細く、下大静脈は太い。循環血液中の造影剤濃度を評価するにはこうした大血管や心臓内腔を計測するのがよい。

## Gd-DTPA



pre 3min 30min 1hr 2hr

## Gd-DTPA-D1-Glc(OH)



pre 3min 30min 1hr 2hr 6hr

Fig. 4-04 対照の Gd-DTPA による心血管の造影効果（上段）と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) による心血管の造影効果（下段）

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)（下段に示す）については急速静注直後（3分後）の MR angiography において対照の Gd-DTPA による造影よりもすぐれたコントラストで心血管の描出を得たのみならず、その造影効果は最長の観察時間である 6 時間後（下段右端）まで持続していた。これは対照の Gd-DTPA による心血管の造影効果（上段）が静注後 30 分にはほとんど造影剤投与前と同等のコントラストになっている（上段中図）のとは対照的である。また、本造影剤が肝臓に持続的に集積していることと、6 時間後に尿路（膀胱）に一部排泄されていることにも注意。

## Time Course Changes of SNR of the Aorta

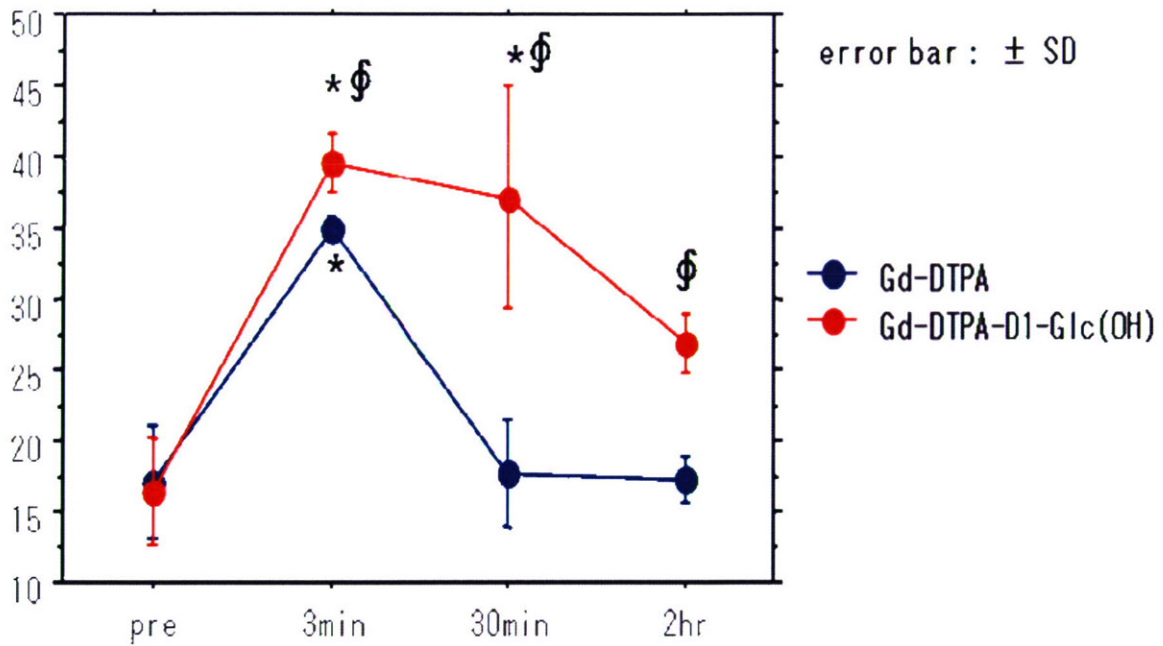


Fig. 4-05 造影剤投与前後におけるAorta（大動脈内）のSNRの時系列変化

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)はGd-DTPAと比較して、投与後全ての時相において、大血管のSNRが上回る。

\*：造影前に対する有意差、 $\phi$ ：群間有意差を示す

## Time Course Changes of SNR of the IVC

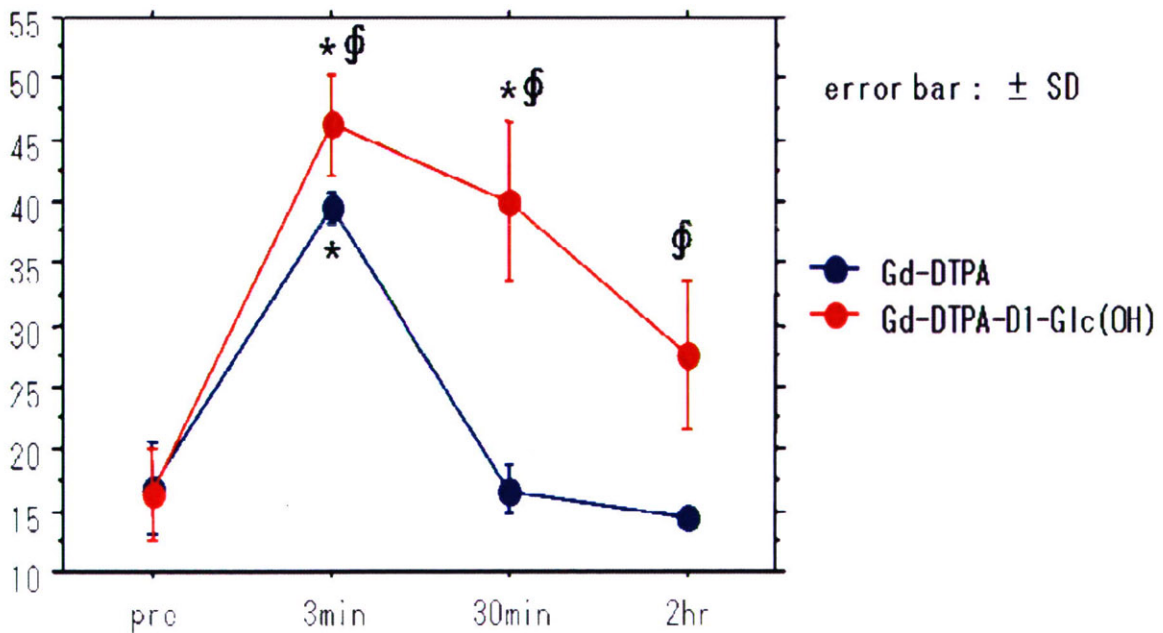


Fig. 4-06 造影剤投与前後におけるIVC（下大動脈）のSNRの時系列変化



IVC（下大静脈）における SNR の振る舞いは大血管であるので、大動脈内とほぼ同等である。Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は Gd-DTPA と比較して、投与後全ての時相において、大血管の SNR が良好であった。

\* : 造影前に対する有意差、 $\phi$  : 群間有意差を示す

### Time Course Changes of SNR of the Liver

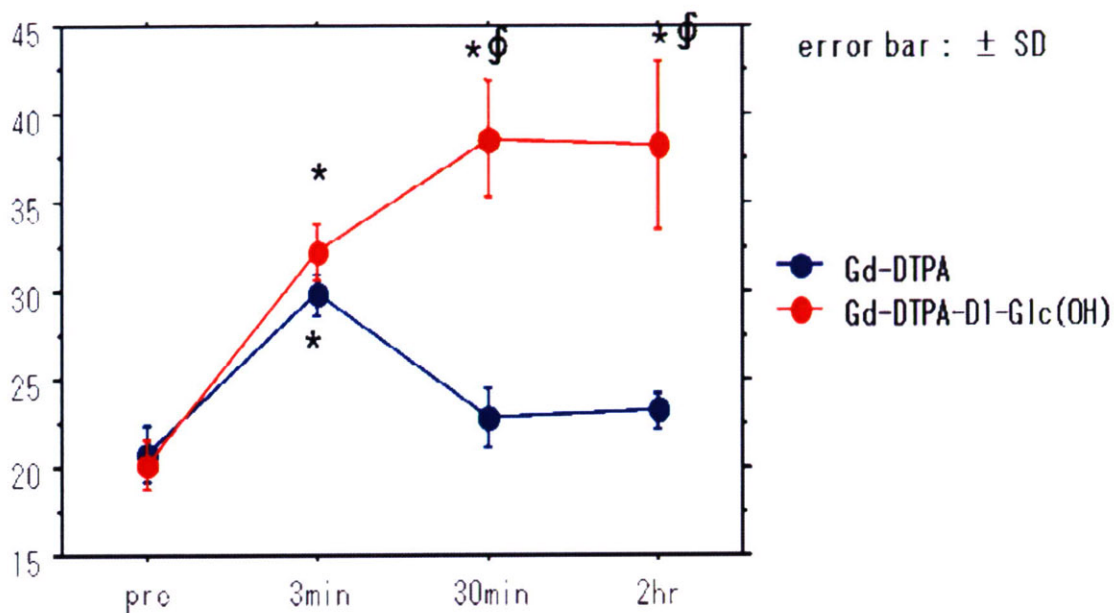


Fig. 4-07 造影剤投与前後における Liver（肝臓）の SNR の時系列変化

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)では、肝臓の SNR が本造影剤投与後 30 分後までにピークに達し、その後 2 時間後までそのレベルを維持した。本造影剤が肝実質になんらかの親和性を有していることがわかる。

\* : 造影前に対する有意差、 $\phi$  : 群間有意差を示す

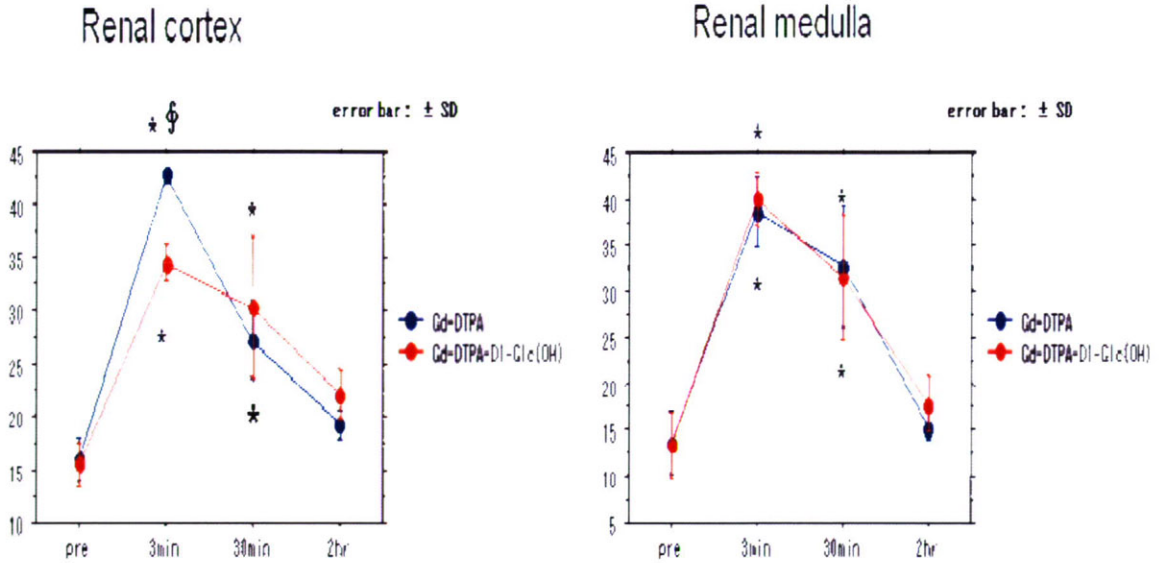


Fig. 4-08 腎皮質(左)、腎髄質(右)における SNR の時間的推移

両造影剤が腎において非常に似通った SNR を呈していることがわかる。血漿蛋白に結合しなかった Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が腎排泄を受けている可能性もある。

\* : 造影前に対する有意差、φ : 群間有意差を示す

イメージ上も SNR 上も、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は Gd-DTPA と比較して、投与後全ての時相において、大血管のコントラスト向上が目立って良好であった。血管内に造影剤が停滞していることを信号上も示唆する所見である。また、注目すべきは、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) はガドリニウムイオンのモルベースで半分の量が投与されているにもかかわらず、造影 3 分後において Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の信号雑音比が Gd-DTPA のそれを上回っていることである。

血液以外では、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は肝臓への親和性を有していることから、造影後、乏血性の肝内占拠性病変に対して存在診断の感度が向上する可能性もある。

腎臓へは、主として腎排泄の造影剤である Gd-DTPA とほぼ相似の SNR のパターンを示した。イメージ上でも腎臓から尿への Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 排泄が多少は見られることがわかる。あるいは 2 相性の排泄がある可能性があり、仮になんらかの血中の蛋白と結合している場合には、結合前の Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が腎排泄をうける可能性も除外できない。

#### 4-1-2 病的状態における 信号増強効果

病的状態として、多血腫瘍の代表である肝細胞がんをラットに化学発がんさせた動物モデルを作成した。また、同モデルにおいては肝機能障害から、出血傾向を有するため、肝腫瘍からの出血モデルとしても利用した。

#### 4-1-3 実験的肝細胞がんの動物モデルの作成

初期検討として10匹のF344/N slcラット（5週齢、体重80g、日本SLC、静岡）に12時間ごとの昼夜リズム下で飼育を行った。通常の飼料ペレットを給餌し、飲水中に100ppmとなるようにdiethylnitrosamine (DEN, Sigma Aldrich Japan, 東京)を混じて投与した(8,9)。12週後にラットの硬変肝臓内にはhyperplastic, dysplasticな結節と共に多血性の肝細胞がんが誘導された。

すべての手技は浜松医科大学動物実験センターの動物取扱に関する倫理規程に基づいて施行された(10)。肝細胞がんの誘導された5匹のラットが実験に供された。残りの5匹のラットは飼育中に肝細胞がんの破裂で死亡したもの1匹、麻酔により死亡したもの2匹、肝細胞がんの誘導が多数にわたり、病変間の区別が困難となったもの2匹であった。これらは検討から除外された。

ひきつづいて治療薬による薬理的介入による影響を検討するため、29匹の肝がん誘発ラットを作成し、撮影を行ったが、この群に関してはまだ組織学的検討が終了していないので本報告書には掲載しない。

#### 4-1-4 多血性腫瘍（肝細胞がん）の信号増強効果

すべてのラットにはまず最初に通常のMR造影剤であるGd-DTPA (0.1mmol/kg、Magnevist、日本シェーリング、大阪)と6時間以上の間隔をあけて、我々のGd-DTPA-D1-Glc(OH)、0.05mmol/kgによる造影MR撮影が行われた。まず、ペントバルビタールの腹腔内投与(50mg/kg)による全身麻酔下に撮影が行われた。撮影装置は3.0T超伝導装置(Magnetom Allegra, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany)に自家製の表面コイルを併用した。造影前にT2強調横断像とT1強調横断像、冠状断像が撮影された。造影後、T1強調画像冠状断像が繰り返し撮影された。T1強調画像は実験期間の初期にはspin-echo法が用いられたが、実験期間の途中から、3D gradient-echo法によるT1強調画像(3D VIVE)が可能となったため、5匹のラットのうち3匹23結節にspin-echo法、残り2匹4結節に対して3D gradient-echo法による撮影が行われ、造影能が比較されている。

また、一部の動物において、0.025mmol/kg (ガドリニウムのモルベースでGd-DTPA常用量の1/4量)のGd-DTPA-D1-Glc(OH)にて造影を施行してGd-DTPAと造影能を比較した。

#### 撮像パラメータ

1) T1強調画像 Spin-Echo法

TR(ms) / TE (ms) ; 250 / 9.1, NEX 6, FOV (mm) ; 90, matrix : 256 × 192, slice thickness (mm) ; 3, slice gap (mm) ; 0.9.

2) T1 強調 gradient-echo 法

3D-VIVE; TR(ms)/TE(ms); 4.5/1.8, NEX; 1, FOV (mm); 120, matrix; 256x208, partition (mm); 0.7.

3) T2 強調画像

TR (ms) / TE (ms) ; 2000 / 86, NEX ; 4, FOV (mm) ; 150, matrix ; 256 × 68, slice thickness (mm) ; 2, and slice gap (mm) ; 0.6.

### 病理組織学的検討

MR 撮像終了後、ラットはペントバルビタールの腹腔内過量投与により屠殺され、肝臓が一塊として摘出され、10%のホルマリン液に2日間漬けて固定された後、冠状断像または横断像に従ってスライスされ、ヘマトキシリン-エオジン (H&E) にて染色され、光学顕微鏡にて観察された。肝内の結節は細胞がん取扱い規約に準じて grading され (11, 12)、細胞ならびに構造異型を有する結節が肝細胞がんの結節として分類され、番号を付けられて、MR 画像と比較して造影能が検討された。

### MR 画像解析

すべての時相について、各結節と近傍の背景肝、背景の空気に関心領域 (region-of-interest; ROI) が設定され、平均信号強度とその標準偏差が計測された。これをもとに CNR (contrast/noise 比、signal intensity ratio) が計算された。

### 統計

反復分散分析と Tukey-Cramer test により解析された。コントラスト間での平均信号の差に関しては Bartlett' s の均一性検査にて正規分布が確認された場合は2群対応の T-test にて判定した。正規分布が保証されない場合には Mann-Whitney test にて差を検定した。

### 結果

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) では、gradient-echo 法で、すべての肝細胞がんが肉眼的にも背景肝よりも強く濃染され (下図左矢印)、造影効果は少なくとも2時間後まで持続した (下図右矢印)。2時間後でも血管系の描出は良好で、この造影剤が血管内滞留性であることがわかる。下図はそれぞれ MIP (maximum intensity projection algorithm) で再構成した表示である。

それぞれの造影剤による平均信号強度の経時的推移について下図3に示すとおり、両造影剤ともに静脈注射後早期(30秒後)に腫瘍の信号増強効果のピークを認めるが、デンドリマーによるもののほうが有意に強力であった。また、Gd-DTPAによる増強効果は静脈注射後1分ですでに背景肝とコントラストがつきにくくなるのに対して、デンドリマーのほうは常に Gd-DTPA による増強を有意に上回り、しかも背景肝に対するコントラストは静脈注射後2時間まで持続した。

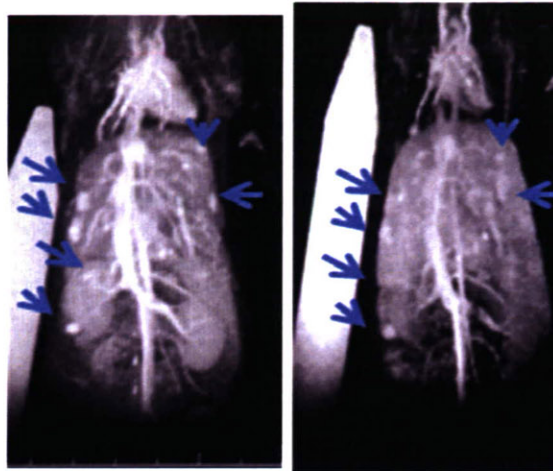


Fig. 4-09 造影30秒後(左)と造影2時間後(右)の3D-VIVEによる冠状断像MIP再構成したもの

矢印は肝細胞がんであり、きわめて強い信号増強を受けているのがわかる。このコントラストは2時間後まで持続している。

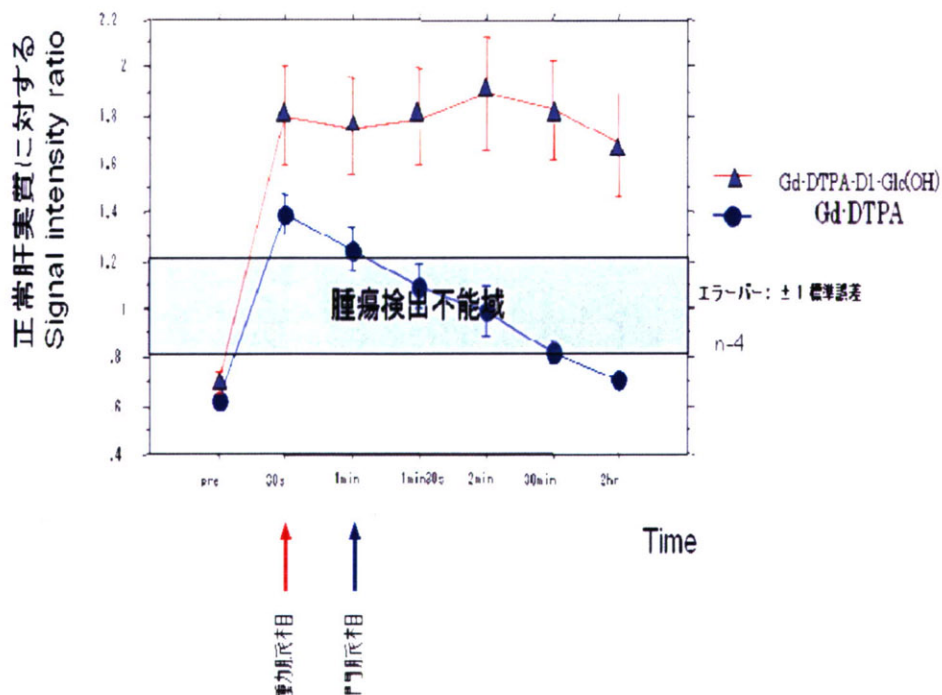


Fig. 4-10 signal intensity ratio(SIR)の時間経過による変動

Gd-DTPA では造影直後 (30 秒後) のみが背景肝に比して腫瘍が濃染された。これに対して、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)では造影後少なくとも2時間後まで、このコントラストが持続することが示されている。

#### 4-1-5

#### 低用量 (0.025mmol/kg) Gd-DTPA-D1-Glc(OH)によるダイナミックスタディ

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)による信号増強効果が強力であることから、肝細胞がんの担がんラットモデルにて、低用量(ガドリニウムのもルベースでGd-DTPA常用量の1/4)による *in vivo* ダイナミックスタディを施行して、Gd-DTPAによるダイナミックスタディと比較した。

撮影は造影前と造影後3時相を繰り返して撮影した。撮像パルス系列は3D-VIVEでパラメータはTR(ms)/TE(ms); 4.5/1.8、NEX; 1、FOV (mm); 120、matrix; 256x208、partition (mm); 0.7である。前述の3T MR装置に表面コイルにて撮像した。

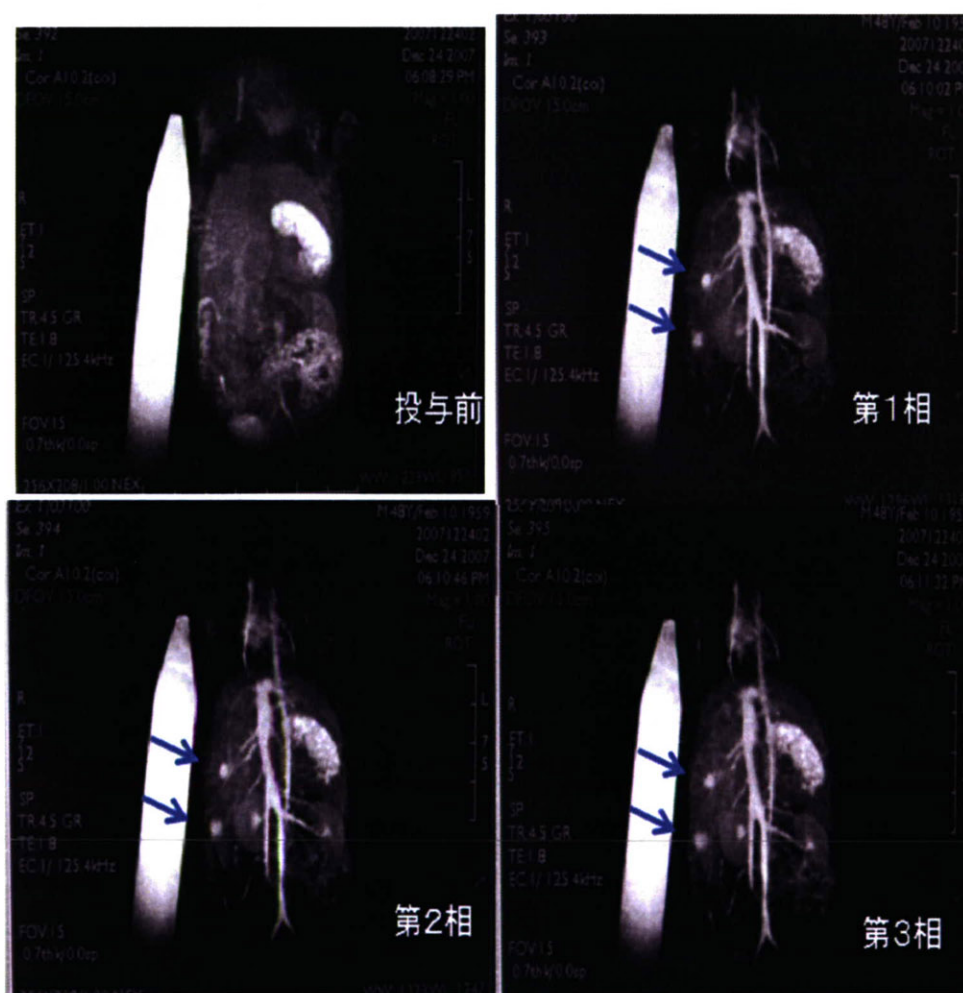
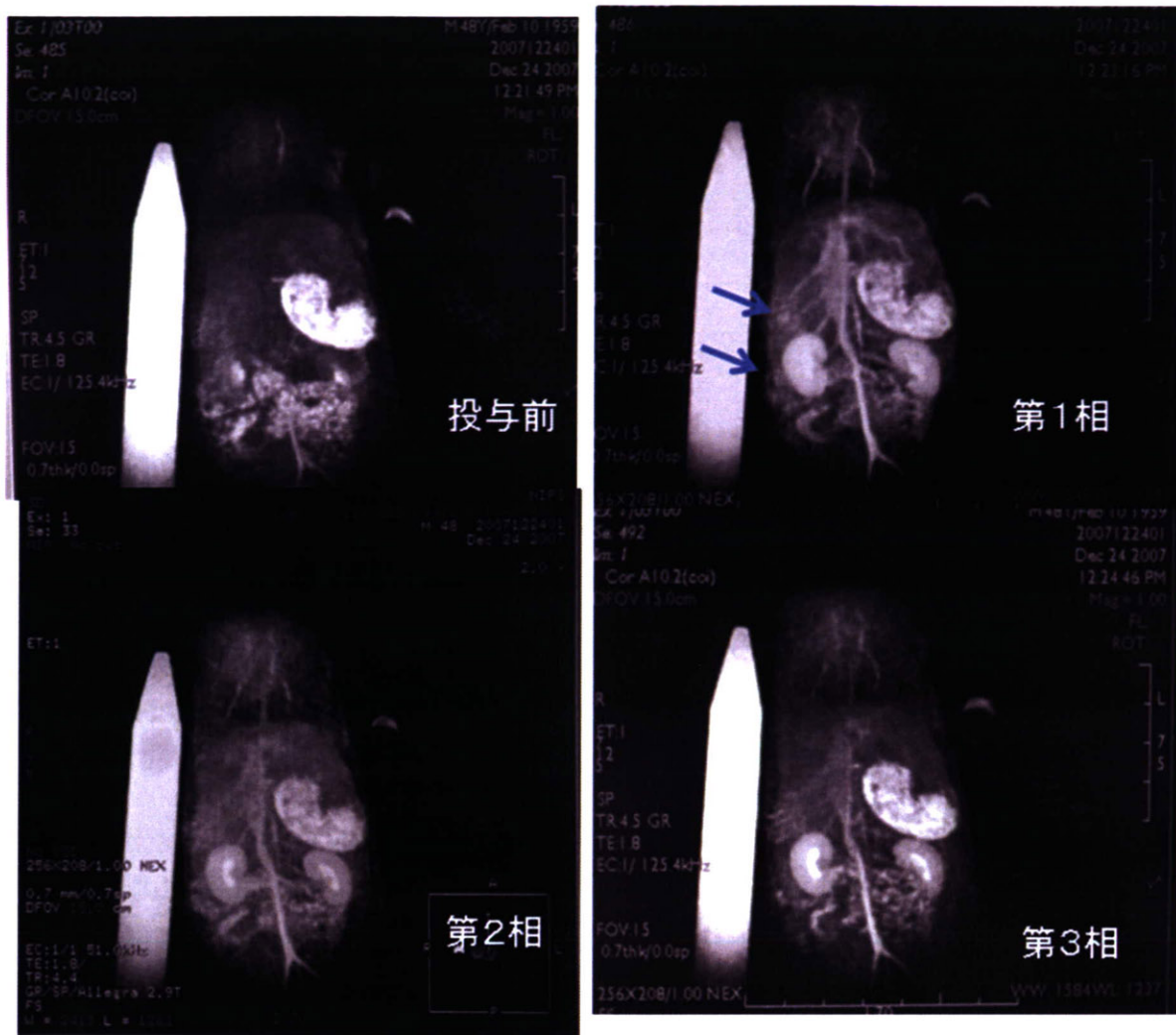


Fig. 4-1-1 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.025 mmol/kg 造影効果

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.025 mmol/kg 造影後のすべての時相で、肝右葉に2個の肝細胞がんが濃染されている。大血管や心臓の信号増強効果も著しい。



**Fig. 4-12 Gd-DTPA 0.1 mmol/kg 造影効果**

Gd-DTPA 0.1 mmol/kg 造影直後に、肝右葉に2個の肝細胞がんが淡く信号増強されている。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.025 mmol/kg 造影後の染まりと比較すると弱く、また、腫瘍濃染も第1相のみに限られているのがわかる。

#### 4-1-6 腫瘍の Angiogenesis

血管新生 (angiogenesis) とは、既存の血管から新しい血管を形成することである。血管新生は正常な人体にみられる生理的な反応である場合もあるが、特定の疾患で新しい血管が形成される場合もある。血管新生には、種々の分子や細胞のメカニズムによる、複雑なプロセスがある。もし仮に血管新生のシグナルが腫瘍細胞から来ている場合、血管新生のプロセスが腫瘍に新生血管を形成させ、その結果、腫瘍の増大や転移を促進してしまうことになる。悪性腫瘍やリウマチ様関節炎に血管新生の関連が報告されており、現在血管新生依存症疾患として、多数の疾病が確認されている。血管新生は血管腫、肥大性の癭痕、歯周病、強皮症、角膜移植片の血管新生、新生血管の緑内障などにおいても確認されている。血管新生はまた固形がん等の悪性腫瘍、関節炎等、乾癬、加齢性黄斑変性症の症状に密接な原因がある。この血管新生を妨げる薬剤による腫瘍や上記疾患の治療に結びつける戦略があり、近年注目されている。非特異的造影剤では投与後速やかに血管外に漏出してしまうため、非特異性造影剤を用いた MRI で腫瘍血管の多寡を正確に評価することは難しい。血液プール造影剤ではこうした評価がより正確に行える可能性があり、こうした抗血管新生薬剤の適応を決定したり、薬剤による抗腫瘍効果を評価したりすることに利用できる可能性がある。

#### 4-1-7 出血の診断における有用性

腹腔内あるいは後腹膜への出血で、出血源がはっきり同定できないことがあり、そうした場合には臨床現場では血管造影や出血シンチグラムが利用される。本来 blood-pool 造影剤は血管外には漏出しないが、出血が存在する場合には血管外への貯留が存在することで出血部位が明瞭に診断できる可能性がある。本研究において、出血傾向を有する肝細胞がんからの腹腔内出血を 29 例中 2 例において捉えることができた (Fig. 4-13)。MR による出血検査への利用が期待される。



Fig. 4-13  
Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.025 mmol/kg による造影 2 時間後の MRI

腹腔内に造影剤が漏出しているのがわかる (矢印)。ラットはこの撮影の後、すぐに死亡した。開腹すると、腫瘍が破裂して腹腔内に出血がみられた。



#### 4-2 血液滞留性向の調整を目指したその他の compounds

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は血液プール造影剤として、非常に有望なコンパウンドであるが、臨床での使用にあたっては、やや血液中の滞留時間が長い可能性がある。造影 MRI のイメージングウィンドウとしては長くても数時間あれば良いと思われるが、本造影剤は 6 時間でもまだ血液の造影効果が残存している。造影剤が体外に排泄されずに血中に長く残存することは一般論として安全性への懸念も生ずる。これをコントロールする方法はないであろうか？

デンドリマーコアの造影剤研究において、側鎖のバリエーションが少し異なるだけで造影能や造影効果の持続時間が大きく異なることが経験された。おそらく、造影剤の立体的な構造の変化により、結合する蛋白の構造に変化が生じ、造影能を大きく変化させることが予測される。逆に、側鎖のバリエーションによって、血管滞留性や信号増強効果を調整することが可能であるとの予測のもとに、われわれは、さまざまなコンパウンドを試作し、これらを用いて、実際に *in vivo* においてもその効果を評価した。以下、動物種の異なる例もあるが、正常ラットないしはマウスを使用し、造影早期の造影 MR 撮像を 3D-VIVE シーケンスによって撮影し、MIP にて後処理を施した画像を示す。すべて経静脈性に造影剤を投与後早期 (3 分以内) に 3.0T 装置にて、home-made の 5inch コイルにて撮影されたものである。

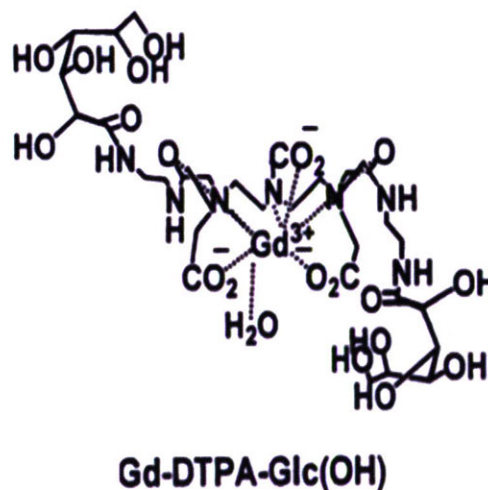
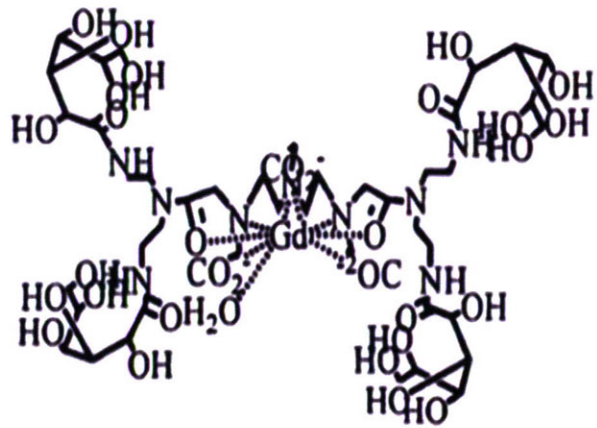


Fig. 4-14

グルコースを 2 分子側鎖に有する造影剤(右)、造影効果を表す画像(左)

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) ほどの信号強度と持続性は無いが、比較的良好な MRA が得られている。

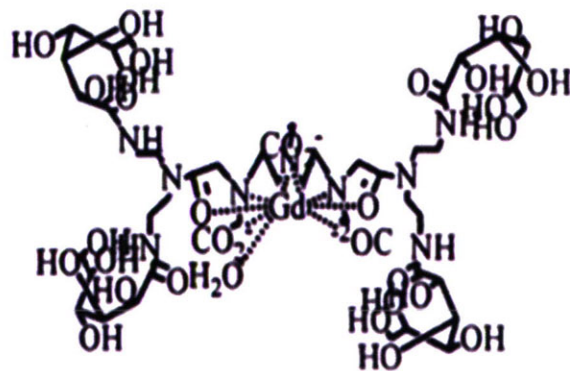


Gd-DTPA-D1-Gal(OH)

Fig. 4-15

側枝にガラクトースを4つ付けた造影剤(右)、造影効果を表す画像(左)

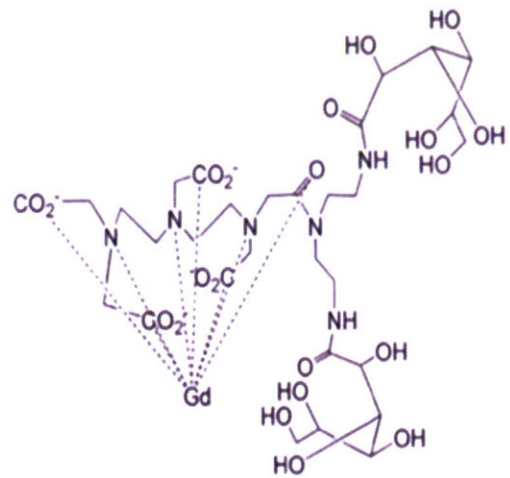
造影効果は弱かった



Gd-DTPA-D1—Man(OH)

Fig. 4-16 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) におけるグルコースをマンノースに変えた造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

造影効果は Gd-DTPA よりも弱いものであった。

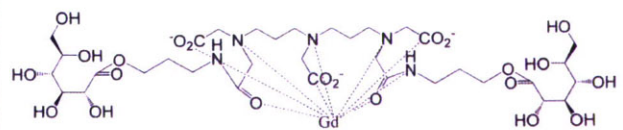


Gd-DTPA-AS1-Glc(OH)

Fig. 4-17

グルコース 2 個を非対称に側鎖に付けた造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

MRA の信号増強効果は Gd-DTPA-D1-Glc(OH) よりも弱く、信号増強効果の持続性も乏しかった。



Chemical Formula:  $C_{41}H_{64}N_6O_{22}$   
 Exact Mass: 1046.28  
 Molecular Weight: 1046.10

Elemental Analysis: C, 39.04; H, 5.59; Gd, 15.03; N, 6.69; O, 33.65

Fig. 4-18

グルコース 2 個を対称に側鎖に付けた造影剤(右)と造影効果を表す画像(左)

造影効果はほとんど見られなかった。

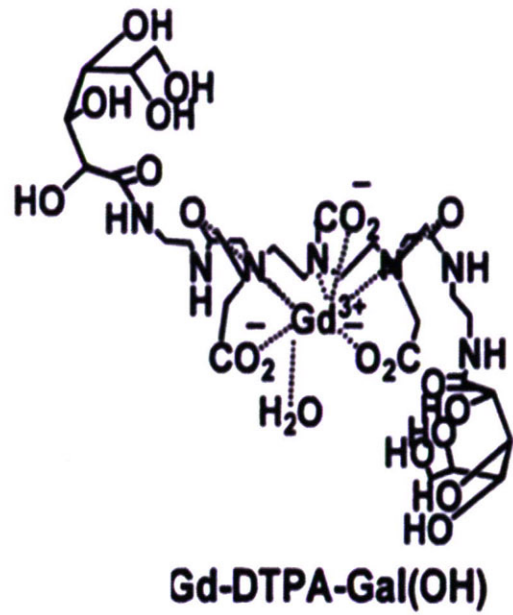


Fig. 4-19

ガラクトースを2分子側鎖に有する造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

比較的良好な MRA が得られている。

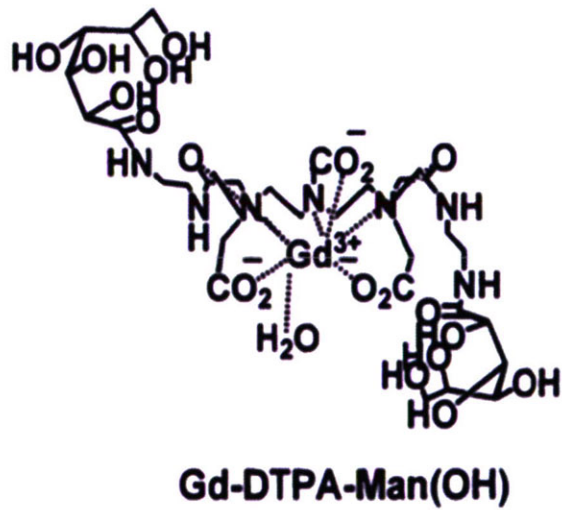


Fig. 4-20

マンノース2分子を側鎖に有する造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

比較的良好な MRA が得られている。