

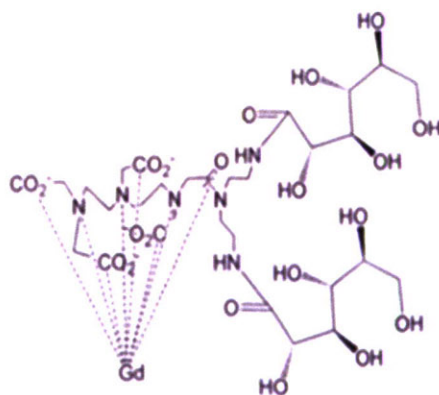
Chemical Formula: $C_{22}H_{35}GdN_5O_{15}^{4-}$
 Exact Mass: 767.14
 Molecular Weight: 766.79
 m/z: 767.14 (100.0%), 765.14 (80.4%), 769.14 (78.2%), 766.14 (71.9%), 764.14 (50.8%), 768.14 (24.3%), 770.14 (19.7%), 763.13 (7.2%), 771.14 (2.6%), 771.15 (2.3%), 768.13 (1.5%), 766.13 (1.3%)
 Elemental Analysis: C, 34.46; H, 4.60; Gd, 20.51; N, 9.13; O, 31.30

Gd-DTPA-AS2-Glc(OH)

Fig. 4-21

グルコースを1分子側鎖に有する造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)よりも信号増強効果は弱く造影効果の持続時間も短かった。



Gd-DTPA-AS1-Gal(OH)

Fig. 4-22

ガラクトース2分子を有する造影剤(左)、造影効果を表す画像(左)

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)ほどではないが、比較的良好なMRAが得られた。

4-3 考察

血液プール造影剤は、Gd-DTPAのような非特異性造影剤と比較して血管内滞留性があるため、造影効果が長続きするのみならず、大抵の場合、分子量が高いため、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。我々は今回、これを多血性腫瘍の代表である肝細胞がんの画像診断への応用することを試みた。

肝細胞がんは世界で年間 100 万を超える死亡をもたらす悪性腫瘍である (1, 2)。肝臓の悪性腫瘍としては最も頻度の高い腫瘍でもある。早期診断と治療が患者の予後を左右するため、ハイリスクグループに対する定期的なスクリーニングは欠かせない。肝細胞がんのスクリーニングには α フェトプロテインや PIVK_{III}などの腫瘍マーカーを定期的に測定するのは勿論、画像診断の併用が重要である。画像検査には非侵襲的なものとして、まず超音波検査があるが、造影 CT や造影 MRI も重要なスクリーニング法として定期的な検査に組み込まれていることが多い (3, 4)。最近のマルチスライス CT や全肝ダイナミック造影 MRI といった方法は多血性腫瘍を高い精度で検出するが、装置に高いパフォーマンスが要求されるため、中低磁場 MR 装置では息止め下に全肝を撮影することは困難であるし、検査に非協力的な患者や呼吸状態の悪い患者では検査ができないという欠点もある。

肝細胞がんは多血性の肝腫瘍の代表であり、肝動脈からほぼ 100%の供血を受ける。画像診断はこの肝動脈からの供血を利用して、背景肝に対しコントラストを形成することが基本である。しかし、現在使用されている経静脈性造影剤は血管外漏出性の非特異性造影剤である。従って肝細胞がんの画像診断は造影剤の投与後の第一循環をとらえて撮影することが必要となる。造影剤は速やかに血管外の間質に移行するため、造影剤によるコントラストも速やかに消失する。

現在、臨床現場では多血性肝細胞がんを造影 CT、造影 MRI で早期に検出することが肝細胞がん治療の基本となっている。この第一循環のタイミングをとらえることが画像診断学的に重要とされてきている所以であり、これに関してこれまで多くの研究が行われてきた。しかし、血液プール造影剤は血管外に漏出することが無いため、多血性腫瘍の信号増強効果は遷延し、その造影能は投与後の撮像タイミングに左右されにくい (これを imaging-window が広いという)。我々の今回の結果は多血性肝細胞がんの検出をする場合に、血液プール造影剤のひとつであるデンドリマー造影剤が有力であることを示唆する結果となった。デンドリマー造影剤は多血性肝細胞がんの背景肝に対する信号雑音比あるいはコントラスト雑音比において、通常の Gd-DTPA よりも強力な信号増強効果を有するのみならず、imaging-window も観測時間内では最低でも 2 時間と広がった。この傾向は現在撮影の主流であるところの gradient-echo 法のみならず、通常の spin-echo 法による T1 強調画像でも同様の結果となった。このことは、肝細胞がんのスクリーニングがデンドリマー造影剤を使用すれば、spin-echo 法でも可能ということであるが、これは従前の非特異性造影剤による造影 MRI の常識を覆すものである。もしかりに spin-echo 法でも肝細胞がんを鋭敏に検出することが可能であれば、中、低磁場装置でも肝細胞がんの検出が可能ということになり、低価格帯の MR 装置でも肝細胞がんのスクリーニングが可能だということになる。そうなれば、世界

的にも肝細胞がんの死亡率を引き下げることにも寄与する可能性もあるかと思われる。

ところで、海綿状血管腫では、遅延相における濃染があるので、肝細胞がんと同様の結果となる可能性があるが、幸い、海綿状血管腫は T2 強調画像において特徴的な高信号を呈するだけでなく、造影後の濃染のパターンにも造影早期に peripheral-dot-sign 等の特長があることが知られているので、これを肝細胞がんと同様に鑑別することは可能であると思われる。

なお、この信号増強効果に関しては単に多血性腫瘍に多量の血液が供給されるために造影剤の絶対量が多く腫瘍に分布したというのが第一義と考えているが、糖の他の可能性として、糖の血管内皮への親和性の影響が関与している可能性も考えられる。

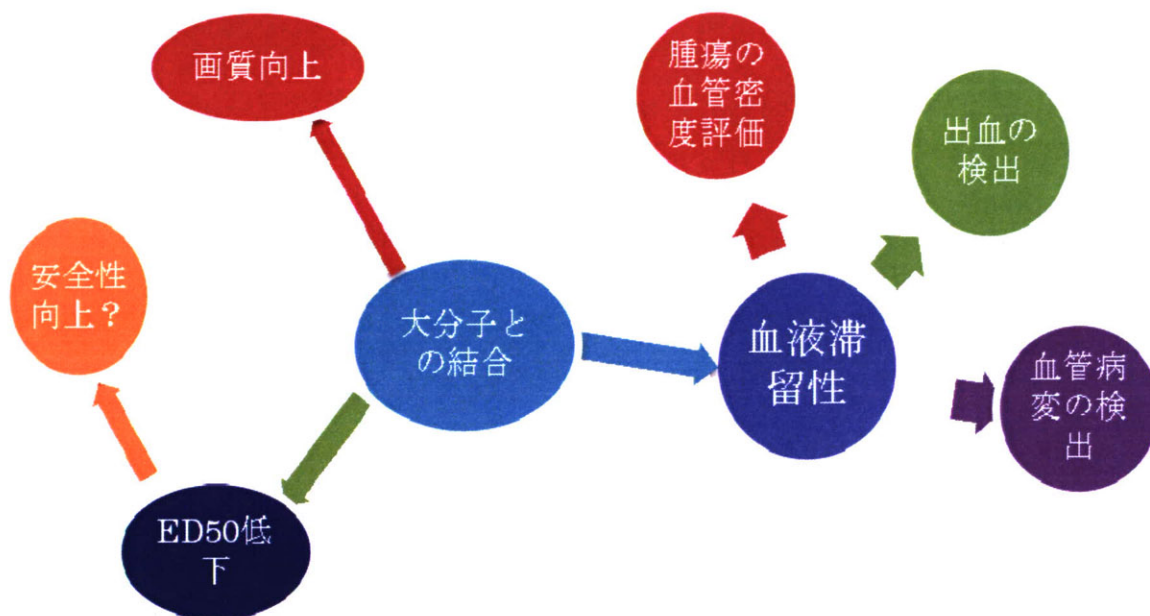


Fig. 4-23 比較的分子量の小さな血液プール造影剤の効能についての模式図

デンドリマーコアは大分子（血漿蛋白？）と結合することにより血液内での滞留性を獲得すると思われる。これは見てきたように腫瘍の染まりの多寡から腫瘍の血管新生（tumor angiogenesis）を反映させることができる可能性があり、抗血管新生薬の適応決定や、治療効果の指標として使用できる可能性がある。折しも、悪性腫瘍の治療に抗血管誘導薬が試みられようとしている時期であり（5,6）、もし、血液プール造影剤の利用が有効であれば、これら抗血管誘導薬による治療効果判定の可能性も将来的には考慮に値すると思われる（7）。

血液の T1 値を強力に短縮させ、イメージングウィンドウを拡大することで、micro MR angiography への利用が考えられる。造影剤の血中停滞時間が長ければ、呼吸や拍動を制御した上で、冠状動脈のような細い重要な血管を時間をかけて描出する可能

性が生じてくる。すなわち、冠状動脈のより詳細な評価が血液プール造影剤で施行できる可能性もでてくる。また、血管の健全性 (integrity) が損なわれている部位からの漏出を見ることで、血管の破綻 (出血) を捉えることができる可能性がある。これはまた、病変部の血管漏出性 (leakiness) (8)とも関係してくるであろう。

また、少量の造影剤で強力な T1 短縮効果を得ることができるということは、ED50 を低くし、造影剤の安全域を高める可能性がある (Fig. 4-23)。近年、NSF (nephrogenic systemic fibrosis) などという、腎不全患者にガドリニウムキレート製剤を投与した場合に腎からの排泄が不十分で、皮下にガドリニウムの沈着が生じ、皮膚拘縮をきたす疾患が報告されている。この疾患が dose-dependent であるかどうかはまだ証明されていないが、投与量が少ないアジアでの発症が欧米に比して少ないことから、その可能性は高い。ED50 の低い造影剤であれば、ガドリニウムの投与量低減も期待でき、NSF などの副作用発生頻度を低減する可能性もある。(ただし、血液中の停滞時間が長いこと、血漿蛋白と結合する可能性があることで新たな副作用を生じる可能性については今後十分検討を要するであろう。)

本研究では安全性に関して詳細な検討をまだ行っていないが、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の 0.05mmol/kg までの投与で急性毒性による死亡は観察されておらず、投与後、最長で1週間生存を確認している。少なくとも強い急性毒性は存在しないと思われる。

4-4 まとめ

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) をはじめとするデンドリマーコアタイプの造影剤は、血管内に停滞する血液プール造影剤としての優れた効能を *in vivo* でも証明した。

参考文献

- [1]. Rustgi VK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987;16(4):545-51.
- [2]. Tabor E. Hepatocellular carcinoma: global epidemiology. *Dig Liver Dis* 2001;33(2):115-7.
- [3]. Muramatsu Y, Nawano S, Takayasu K, Moriyama N, Yamada T, Yamasaki S et al. Early hepatocellular carcinoma: MR imaging. *Radiology* 1991;181(1):209-13.
- [4]. Taouli B, Losada M, Holland A, Krinsky G. Magnetic resonance imaging of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004;127(5 SUPPL 1):S144-52.
- [5]. Baillie CT, Winslet MC, Bradley NJ. Tumour vasculature—a potential therapeutic target. *Br J Cancer*. 1995 Aug;72(2):257-67. Review.
- [6]. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Sansonno D, Dammacco F. Angiogenesis and anti-angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Treat Rev*. 2006 Oct;32(6):437-44. Epub 2006 Jul 25. Review.
- [7]. Cyran CC, Fu Y, Raatschen HJ, Rogut V, Chaopathomkul B, Shames DM, Wendland MF, Yeh BM, Brasch RC. New macromolecular polymeric MRI contrast agents for application in the differentiation of cancer from benign soft tissues. *J Magn Reson Imaging*. 2008 Jan 24;27(3):581-589 [Epub ahead of print]
- [8]. Lin SP, Brown JJ. MR contrast agents: physical and pharmacologic basics. *J Magn Reson Imaging*. 2007 May;25(5):884-99. Review.

5. 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の生体分子認識

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の血液成分及びがん細胞との結合性

5-1 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の構造

我々は新規 MRI 造影剤として合成した Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は、肝臓がん組織や大小血管に造影効果が高いことが実験用ラットの *in vivo* 評価結果から判明した。この新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) はジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 骨格にガドリニウムを配位し、その骨格に 4 分子のグルコースがアミド結合した構造をしている (Fig. 5-01)。グルコース以外にもガラクトースやマンノースなどいくつかの糖を結合した Gd-DTPA-DN-Sugar(OH) も作製した。これらもがん組織や血管に高い造影効果があった。その中でも、4 分子のグルコース型が血管貯留性やコントラスト面において優れていた。

この新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が際立って造影効果が高いことから、がん組織や血管内生体分子と何らかの相互作用し、かつ分子認識しているかの検討を行なった。

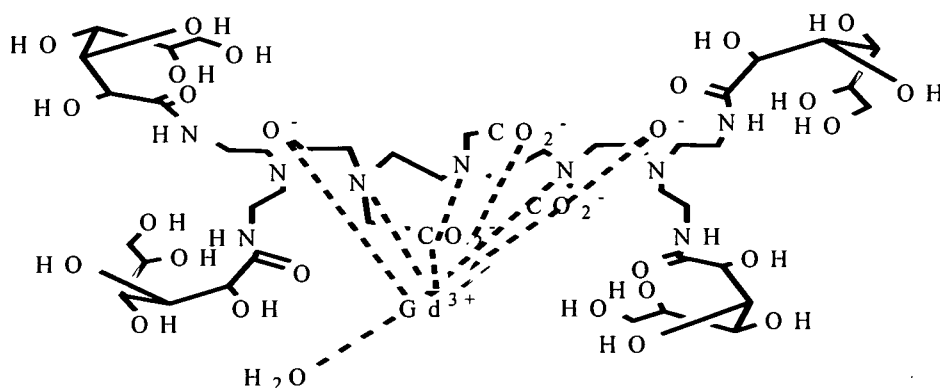


Fig. 5-01 新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子構造

5-1-1 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の質量分析測定

エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析計 (ESI-TSQ)

この新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) をエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) による質量分析を行なった。エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析計 ESI-TSQ フィニガン・マット社 SSQ 7000 (Fig. 5-02) は、高温キャピラリーから放出したサンプル分子をイオン化し、オクタポールチューブレンズによりフォーカスする。これはイオンに対してガス分子の比率を増大させ、簡易なチューニングで感度を高め、より多くのイオンをアナライザー部へ導入し、イオンフォーカスができる。トリプル四重極により高分離かつ高感度で検出できる。さらに高速液体クロマトグラフィによりカラム分離した混在した少量サンプルの質量分析計もできる。今回は、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) のダイレクト測定を行なった (Fig. 5-03)。



Fig. 5-02 エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析計 (ESI-TSQ) フィニガン・マット社 SSQ 7000

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) をエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) による質量分析を行なった。ESI-TSQ 質量分析計の negative 法で、 $5 \text{ ng}/\mu\text{l}$ を注入し、温度 280 度にて質量数 $\text{MW}:1429.9$ を得た (Fig. 5-03 の上段)。この質量数は Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の理論値と一致する。また、ガドリニウム元素特有の質量数同位体パターンによりガドリニウム元素が存在することも確認した (Fig. 5-03 の下段)。

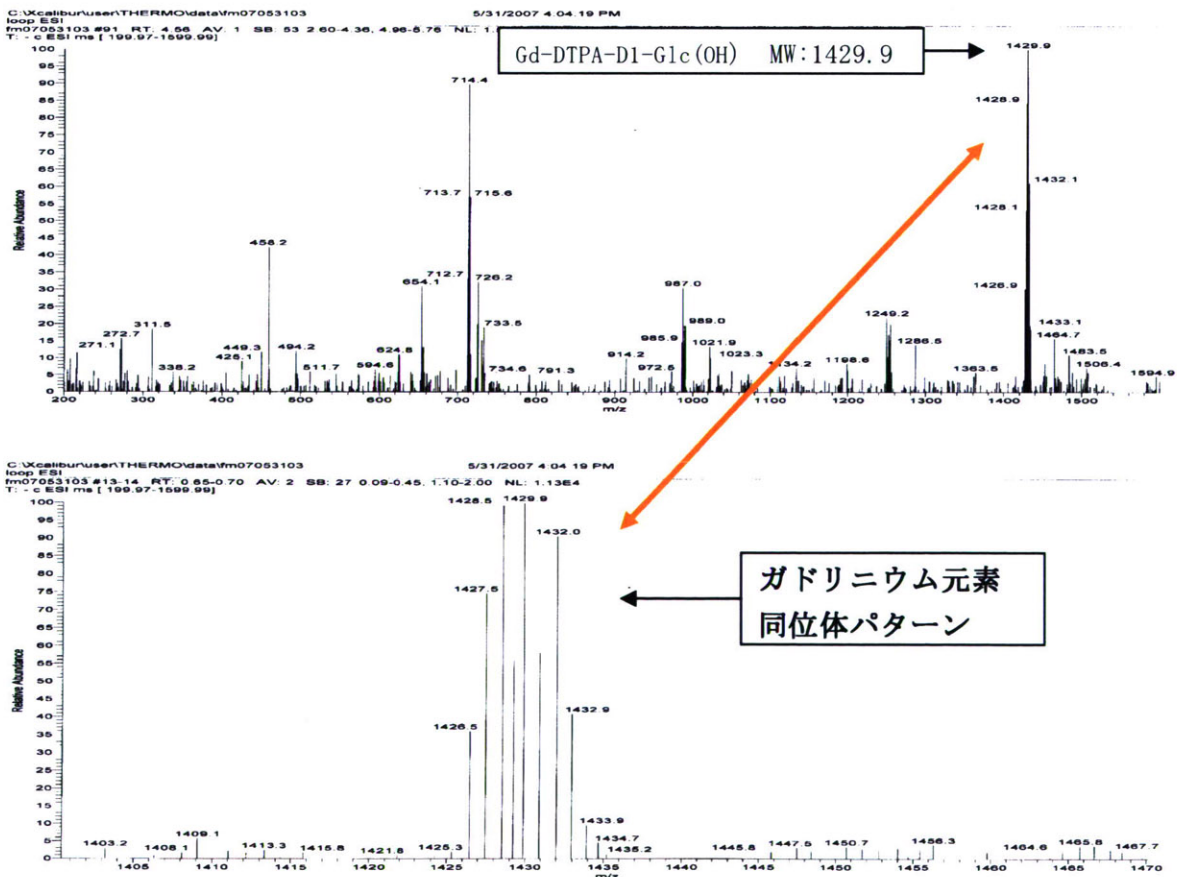


Fig. 5-03 ESI-TSQ 質量分析計による新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定

5-1-2 新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子

新規 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は肝臓がん組織や血管の造影効果が高いことから、MRI 造影剤として期待される。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) ががん組織や血管内のどの分子を認識し造影効果を高めているかの解明が望まれる。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を血漿と混合させると生理食塩水と比較して、緩和率が大幅に高まることが分かっている。このことは Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が血液成分の何かとが結合することにより、ガドリニウム分子と水分子との交換比率が変化することで、緩和率を高めるためと考えられる。

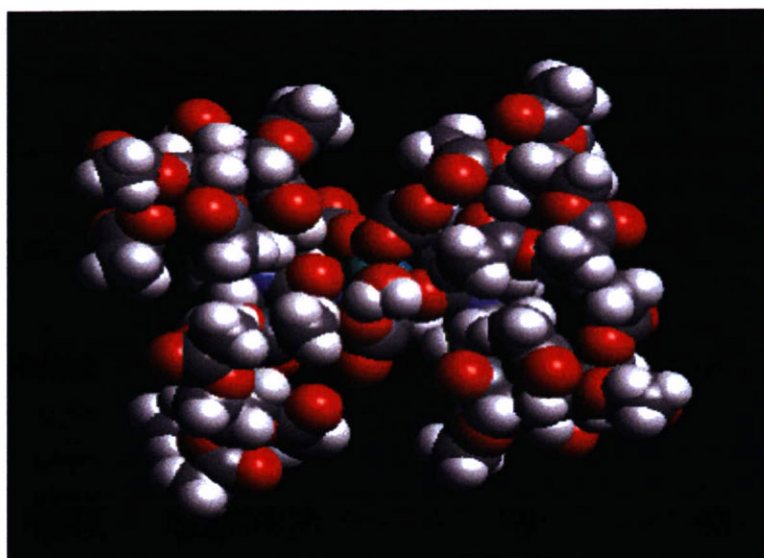


Fig. 5-04 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 分子モデリング

そこで、我々は Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が血液内物質や肝臓がん組織のどのような分子と結合すると、緩和率が大幅に高まり造影できるかを、複合電子顕微鏡システム、パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置 (ミニスペック) 及び誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) を用いて検討した。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子構造は (Fig. 5-01) に示した。また、分子モデリングを (Fig. 5-04) にさらに分子イメージングを (Fig. 5-05) に示す。

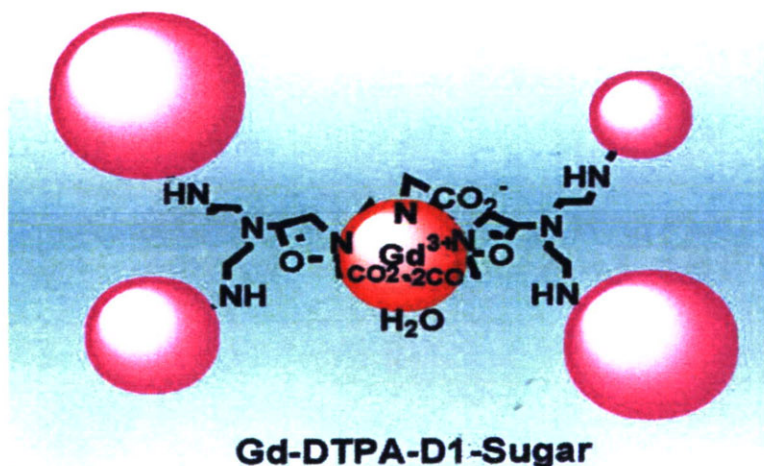


Fig. 5-05 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子イメージング

5-2 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の血液成分の分子認識

新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は大血管や小血管も鮮明に造影できることから、血液成分と何らかの結合性があるのではないかと考えられる。血液は体内中を還流し臓器や器官にさまざまな物質を生命維持のために栄養物質、代謝産物、酸素や二酸化炭素を運搬してかつ交換している。また、血液は浸透圧調製のために大量の水や各種イオンが存在している。他にも生体防御機構の色々な機能を有し、免疫に関する物質や細胞が循環している。このような多種多様な血液内物質と MRI 造影剤である Gd-DTPA-D1-Glc(OH) がどのような結合性を有するのかを検討する。

血液は細胞成分と血漿成分からなる。血液細胞成分は赤血球、白血球及び血小板からなる。血漿成分は血清と血液凝固系タンパク質からなっている。血漿の中には主に水、凝固系タンパクや血清タンパク質や免疫に関するタンパクやペプチド、脂質、糖質、アミノ酸類、無機質類、窒素化合物類及びホルモン等がある (Table 5-01)。

Table 5-01 血液成分 (シンプル生理学より転載)

血液 (体重の 7~8%)	血漿 (55%)	血清	水 (91~92%)	蛋白質 (7.5 g/dl) { 血清アルブミン 血清グロブリン(α, β, γ) 脂質 (1%) { 中性脂肪, 遊離脂肪酸, コレステロール, リン脂質 糖質 (空腹時 0.1%) (グルコースなど) アミノ酸 無機塩類 (0.9%) (Na, Cl, K, Ca, Mg, など) 尿素およびその他の窒素化合物 ホルモン
		フィブリノゲン		
細胞成分* (Ht 47% 男子 42% 女子)	赤血球	(1 mm ³ 中 男子 500×10 ⁴ 女子 450×10 ⁴)		
	白血球	(1 mm ³ 中 6000~8000)	リンパ球 顆粒白血球 (顆粒球) { 中性好性白血球 (好中球) エオジン好性白血球 (好酸球) 単球 塩基好性白血球 (好塩基球)	
	血小板	(1 mm ³ 中 28~76×10 ⁴)		

5-2-1 血液成分

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血液成分 (Fig. 5-06) である血液細胞成分と血漿成分との結合性を複合電子顕微鏡システム、タンパク質沈殿法及び SDS 電気泳動法で検討した。

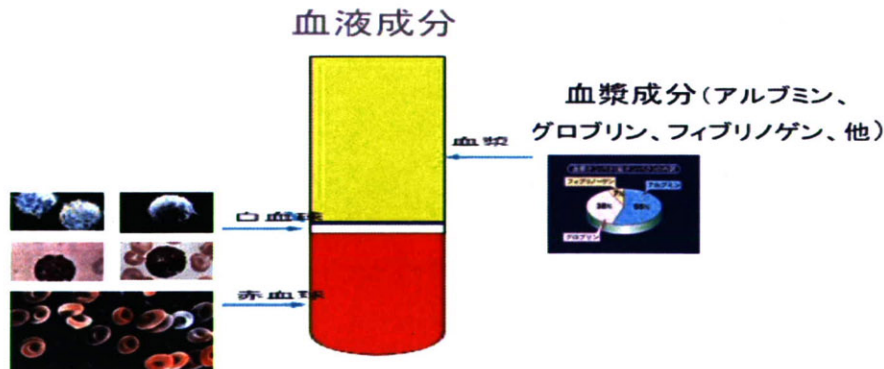


Fig. 5-06 血液成分 (血液細胞と血漿成分)

5-3 複合電子顕微鏡システムによる、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の血液成分（血液細胞、血漿）との結合性の検討

5-3-1 複合電子顕微鏡システム

複合電子顕微鏡システムを用いて、ガドリニウム元素固有な特性X線を測定することで、新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)と血液成分との結合性の検討を行なった。測定概要は真空中で試料に高電圧電子線を当てると試料表面にある元素のエネルギー準位の低い電子軌道から電子が弾き出され、弾き出された軌道にエネルギー準位の高い電子が落ちた時、余剰エネルギーが特性X線として発生する。電子線が当たったことで、その表面の元素固有な特性X線が発生することになる。特性X線の周波数は元素固有であることから、特性X線を測定することで試料中にどのような元素があるのかが分かる (Fig. 5-07)。

このことからジエチレントリアミン五酢酸に配位したガドリニウムに電子線を照射し特性X線を測定することにより、試料中にガドリニウム元素の存在が確認できる。ガドリニウム元素の特性X線が測定すれば、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)が結合している物質が特定ができる (Fig. 5-08)。

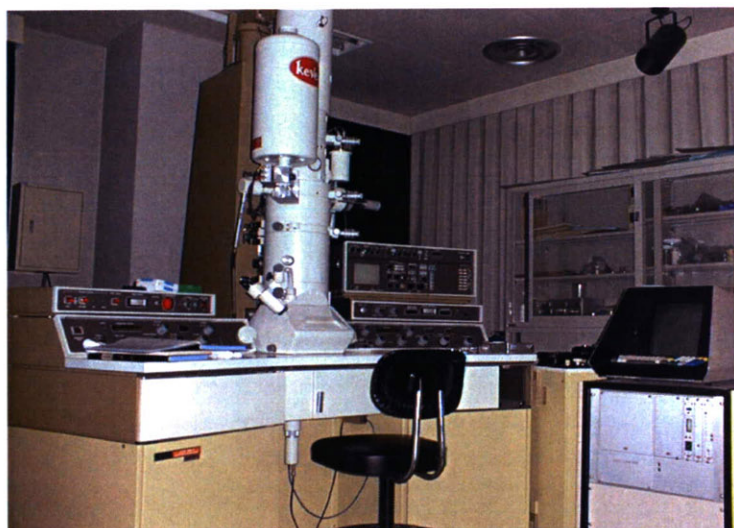


Fig. 5-07 複合電子顕微鏡システム 日本電子 JEM200CX

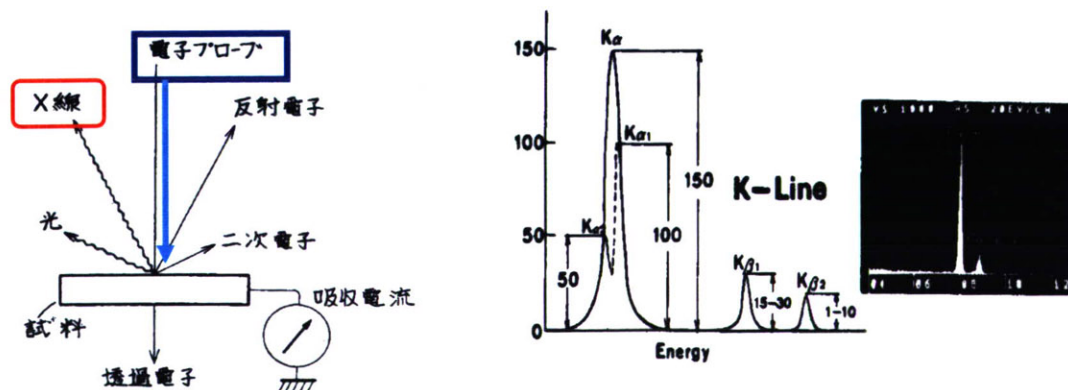


Fig. 5-08 直線型特性X線集合分光器と特性X線のKラインの相対強度

浜松医大には日本電子製の複合電子顕微鏡システムがあり、試料中の各種元素分析を行っている。浜松医大の装置は非分散型 (EDX) で測定検出感度に優れ、試料の厚さにより SEM 撮影でも、TEM 撮影でも特性 X 線の測定が可能である (Fig. 5-07)。

5-3-2 複合電子顕微鏡システムによる新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) のガドリニウム測定

複合電子顕微鏡システムを用いて、新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血液成分との結合性の分析を行なった。試料を入れるためのカーボン製舟形ホルダーを専用に取り、その中に Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を入れ乾燥の後、真空中で試料に電子線を当てる。試料表面に存在する元素から、元素固有の周波数である特性 X 線を測定する。その結果、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 中にガドリニウム元素固有な特性 X 線を検出した。また、ガドリニウムは他の元素と重複がなく測定できる (Fig. 5-08)。

測定結果から、ガドリニウム元素固有な特性 X 線を検出したことにより、試料中に Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が存在したことが確かめられた。この方法を用いて造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血液成分物質との結合性の検討を行なった (Fig. 5-09)。

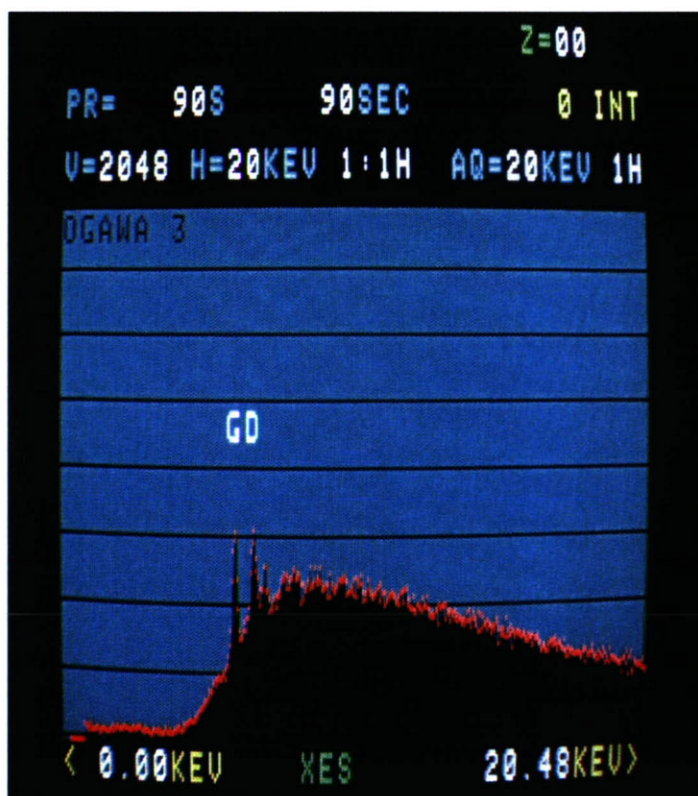
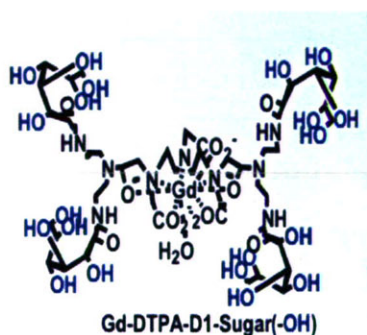


Fig. 5-09 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 分子とガドリニウム元素固有な特性 X 線スペクトラル

ガドリニウム元素固有な特性 X 線が数本のスペクトラルが得られる。ガドリニウムの特性 X 線には固有な波長を持ち、他の元素と重複がなく、試料中に存在すればきわめて特徴的なピークが得られる (Fig. 5-09)。

5-3-3 複合電子顕微鏡システムによる、血液成分（血液細胞、血漿）との Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の結合性の検討

複合電子顕微鏡システムを用いて、新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) に存在するガドリニウム元素固有の特性 X 線を検出することできる。このことから、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) がどのような血液成分と結合しているのかを、血液と混和させたのち血液成分を分画しそれぞれの血液成分を精製して、Gd-特性 X 線を測定することで調べることができる。ヒト健常人の血液をヘパリン入り採血管に採血したのち、血液 2 ml に Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の濃度 0.05mmol/ml を 200 μ l 加えて、37 度で 30 分間緩やかに混和し、その後 1500rpm で 15 分間遠心したのち、赤血球、白血球（パフィーコート）、血漿及び血漿タンパクに分画した (Fig. 5-10、Fig. 5-11、Fig. 5-12、Fig. 5-13)。

5-3-3-1 赤血球細胞と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性

赤血球細胞が Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とどのような結合性の関連があるか、複合電子顕微鏡システムで Gd-特性 X 線を測定することで検討した。赤血球細胞は、血液中で一番多い血液細胞であり骨髄中産生される造血幹細胞由来の細胞である。ヘモグロビンを有することで酸素と結合し、血流に乗って酸素を体中の隅々の器官や組織に運搬し、生体維持にはなくてはならない細胞である。

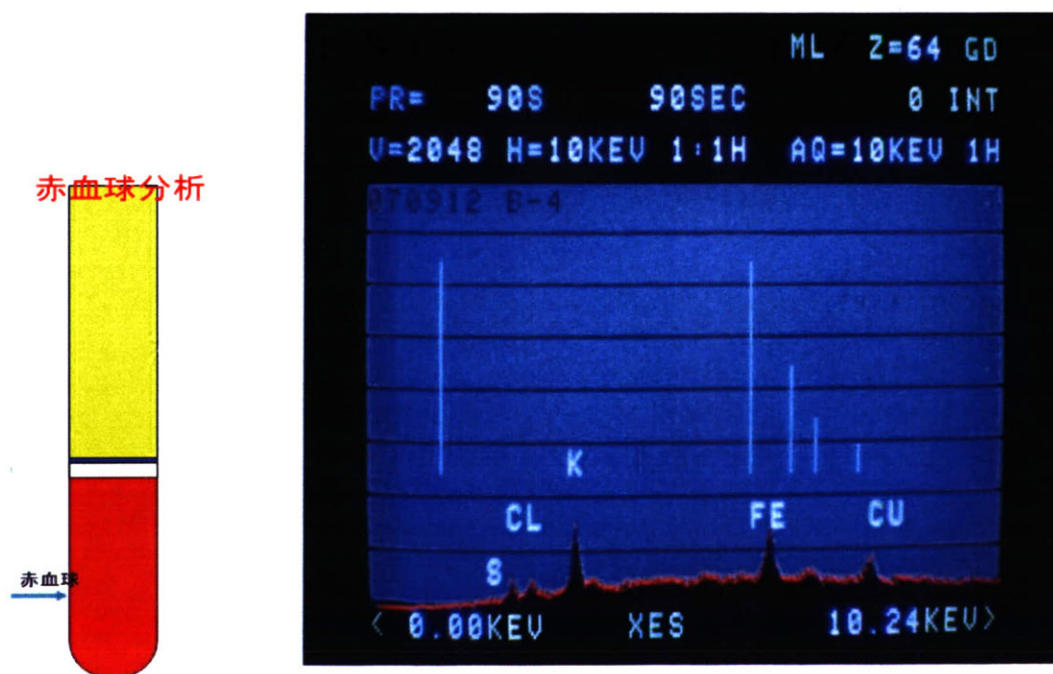


Fig. 5-10 赤血球細胞と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の混和による特性 X 線の測定

遠心分離して集めた赤血球細胞と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の有無を、複合電子顕微鏡システムで Gd-特性 X 線を測定したが、ガドリニウムは検出されなかった。ゆえに、赤血球細胞と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とは結合性はないと考えられる。また、ヘモグロビン中の鉄元素の特性 X 線が検出されている (Fig. 5-10)。

5-3-3-2 白血球細胞(パフィーコート)と Gd-DTPA-D1-Glc(OH)との 結合性

白血球細胞が新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)との結合関連の有無を、複合電子顕微鏡システムでガドリニウム-特性 X 線を測定することで検討した。

パフィーコートには白血球細胞と血小板が含まれる。白血球細胞には、好中球・好酸球・好塩基球・リンパ球・単球の5種類がある。好中球と単球は主として細菌や真菌などを排除し、好酸球と好塩基球は、アレルギー反応などに関与し、リンパ球はウイルスの排除や免疫反応の重要な細胞である。白血球細胞のそれぞれが体を守る重要な役目を果たしている。5種類白血球細胞の各比率は、好中球が40～60%、好酸球は2～4%、好塩基球は1～2%、リンパ球は26～40%、単球は26～40%程度である。白血球細胞の種類別の比率を調べると異常を見つけることができる。細菌感染症では好中球が増え、ウイルス感染症ではリンパ球が増大する。アレルギーでは、好酸球が増える。薬剤による副作用では、好中球が減少する。細菌感染症では好中球が増え、ウイルス感染症ではリンパ球が増大する。アレルギーでは、好酸球が増える。薬剤による副作用では好中球が減少する。

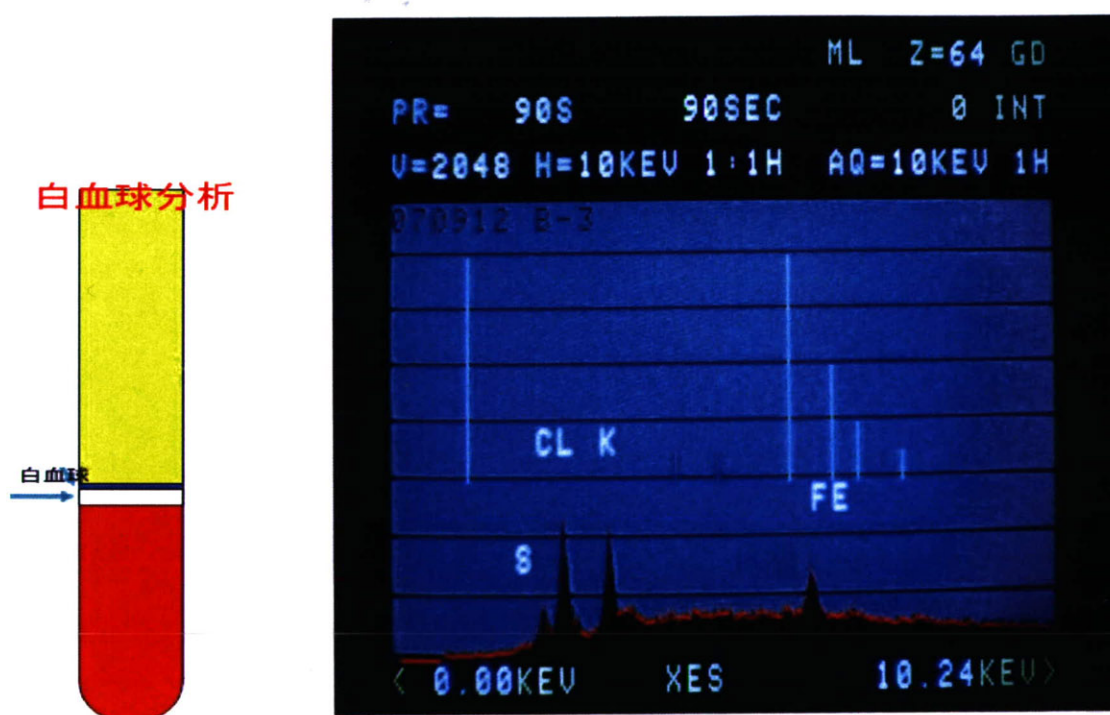


Fig. 5-11 白血球細胞と Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の混和による特性 X 線の測定

遠心分離して集めた白血球細胞 (パフィーコート) と Gd-DTPA-D1-Glc(OH)との結合関連性をガドリニウム元素固有な特性 X 線を測定で検討したが、ガドリニウムは検出されなかった。ゆえに、白血球細胞や血小板と Gd-DTPA-D1-Glc(OH)とは結合性はないと考えられる。また、鉄元素の特性 X 線が検出されているが、赤血球が混じっていたと考えられる (Fig. 5-11)。

5-3-3-3 血漿成分と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性

さまざまな働きをしている血漿及び血漿成分が新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とどのような結合関連性があり、鮮明な造影効果を増すのかを複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定することで検討した。

血漿は血液の量の半分以上を占め、またそのほとんどが水である。血漿の中には塩類や電解質物質があり、さらにアルブミンやグロブリン及び凝固系タンパクなどの血漿タンパク質が溶けている。アルブミンは血液の液体成分が血管から組織に漏れ出のを防ぎ、またホルモンや薬などの物質に結合して運搬する働きもする。血漿中のタンパク質にはこのほか、ウイルス、細菌、真菌、がんや細胞などから体を保護する役割を担う免疫グロブリンや、出血を止める血液凝固因子などがある。なお、二酸化炭素も運搬は、酸素と違いほとんどが血漿に溶けて運搬される。血漿には別の働きとして水分の貯蔵庫として、組織に水分が不足していれば補給し、余分になると吸収する。血漿は血管を満たして絶えず流れていることにより、血管がつぶれたり詰まったりするのを防ぎ、血圧と全身の循環を維持するのに役立っている。

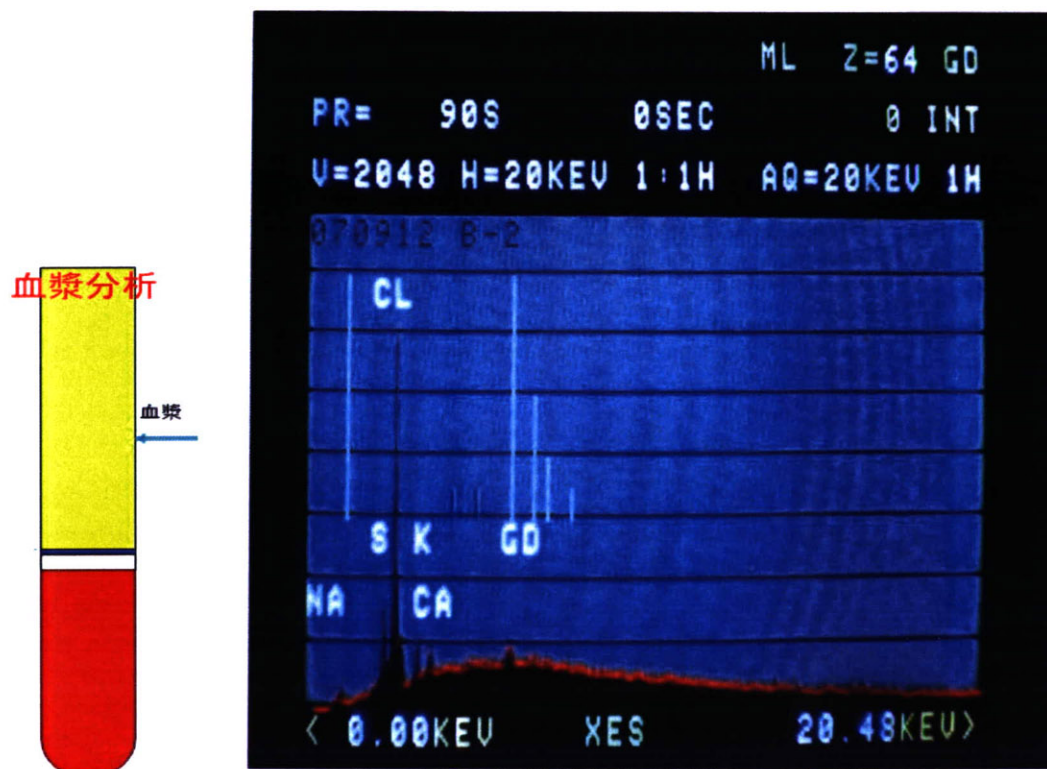


Fig. 5-1 2 血漿と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の混和による特性 X 線の測定

血漿と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性を、複合電子顕微鏡システムでガドリニウム元素-特性 X 線を測定した。測定結果から、ガドリニウム元素の特性 X 線が検出された。これは血漿中の物質の何かと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とが結合したのではないかと考えられる。また、Gd-特性 X 線のほかにも、血漿中のナトリウム、カリウム、カルシウムや塩素元素の特性 X 線も検出されている (Fig. 5-1 2)。

5-3-3-4 血漿タンパクと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性

血漿タンパクは血清総タンパクとそれに血液凝固系タンパクからなる。血漿を構成するタンパク質は、100 種類以上からなる。血漿タンパク質の多くは、物理化学的性質の違いからアルブミンとグロブリンに分けられ。グロブリンは α_1 、 α_2 、 β 、 γ に分類されている。また、血小板との作用により出血を止める血液凝固因子のフィブリノーゲン、プロトロンビンが含まれる。血漿タンパク質の主な役割として、血液の中のさまざまな物質と結合し運搬する。また、浸透圧の調節もして、身体の中のタンパク質やアミノ酸を貯蔵を行ない、それに血液凝固であるフィブリノーゲン、プロトロンビンも含まれる。血圧の維持や感染を防ぐ役割を担っている。さらに、血漿にはさまざまなタンパク質が含まれ、それぞれが身体の機能を維持するため大切な役割を持っている。血漿タンパクの多くが肝臓で作られるため、血漿中の総タンパク量から肝臓の働きを知ることができる。

血漿タンパク測定は血漿 500 μ l に 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を 20 μ l 加えて、37 度で 30 分間緩やかに混和させたのち、タンパク凝固剤を加えて濁りを沈殿させ、15,000rpm で 15 分間遠心分離をした。チューブの底に沈殿したタンパクを複合電子顕微鏡システムでガドリニウムの特性 X 線の測定した。

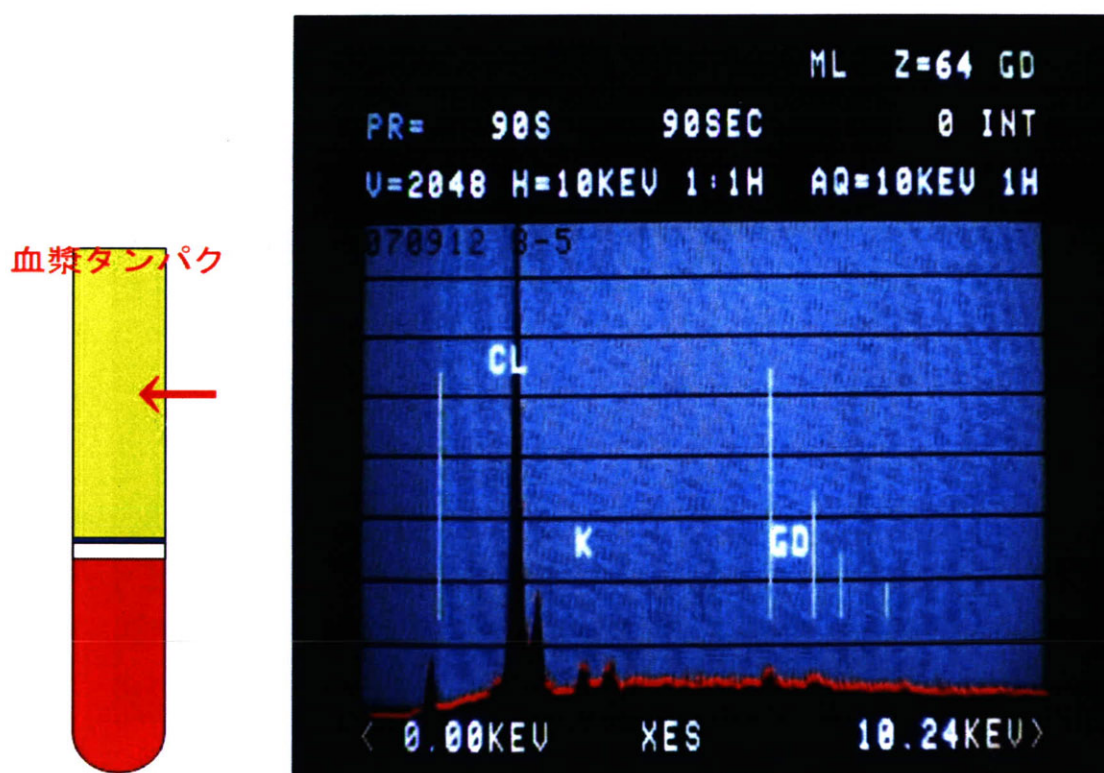


Fig. 5-13 血漿タンパクと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の混和による特性 X 線の測定

血漿タンパクと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性関連を、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。ガドリニウム元素の特性 X 線が検出された。このことから血漿タンパクの何かと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とは結合性があるのではないかと考えられる。どの血漿タンパクと結合しているかを検証して行く (Fig. 5-13)。

5-4 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と正常及び肝細胞がんラット血漿成分並びに正常及び肝細胞がん血清アルブミンの結合性の検討

前章の実験より新規造影剤である Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血漿タンパクとの結合性が、複合電子顕微鏡システムでのガドリニウムの特性 X 線測定から示唆された。血漿中に一番多いタンパク質である、血清アルブミンとの結合性の検討を行なった。血清アルブミンはラットの血清アルブミンを用いた。血清アルブミンは市販の Sigma 製 Albumin from rat serum (CAS:9048-46-8) を使用した。また、ラットの血漿及び血清は実験動物ラット F344/NS1c を使用した。また、正常オス 20 週令ラット及び肝細胞がんオス 20 週令ラットを使用した。肝細胞がんオス 20 週令ラットの作製及び飼育は浜松医科大学実験動物規程に適合しかつ同大学動物実験施設で行なった。

5-4-1 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 分離による血清アルブミンとの結合性の検討

タンパク質を分離精製することができる、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 法で、血漿成分及び血清アルブミンが Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とどのような結合性があるかを、複合電子顕微鏡システムの特異 X 線の測定検出によって調べた (Fig. 5-14)。

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

5-20% gradient gel サンプルは正常血清、肝細胞がん血清、血清アルブミン

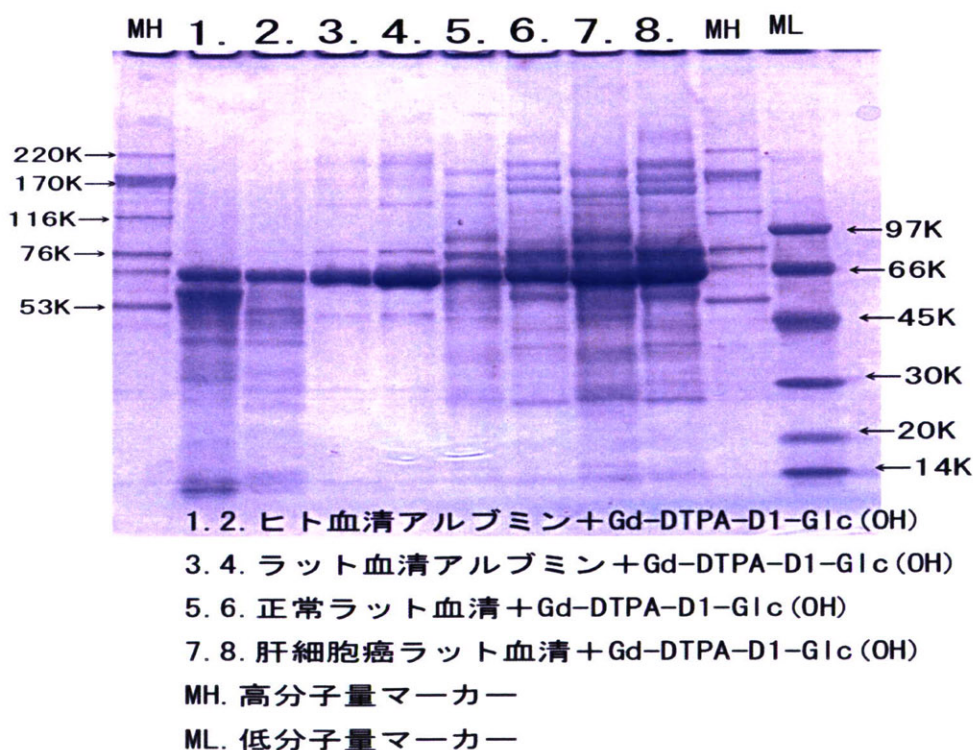


Fig. 5-14 血清及び血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との SDS-PAGE

5-4-2 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 SDS-PAGE

SDS-PAGE 概要

タンパク質を分離する方法としてドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）がある。タンパク質にドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を付加して、これをポリアクリルアミドゲル中を SDS 化したタンパク質を電氣的に泳動させることで、一定時間での移動距離の違いによりタンパク質を分子量の大きさに分離することができる。しかし通常、タンパク質はアミノ酸の残基同士が結合することで立体構造をとっている。この立体構造がタンパク質の酵素の活性などの機能の源であり、この場合分子量がそのタンパク質の大きさに比例しない場合がある。そこで、SDS-PAGE では、タンパク質をアミノ酸残基同士の相互作用をなくしたり、SH 基還元剤を用いてジスルフィド結合を切断し、タンパク質の大きさだけで移動度に比例するように調製する。すなわち、長い分子ほどゲル中の移動度は小さくなり、反対に短い分子は移動度は大きい。

SDS-PAGE 電気泳動装置

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）は垂直に立てた 2 枚のガラス板の間に平板状のゲルを形成させ、その中で試料の電気泳動を行わせる。各種分離したいタンパク質をサンプルバッファに溶かし、10 前後ある凹状の溝にサンプルを入れる。ゲルを内蔵したガラス板を上下泳動槽にセットし、上部には陰極があり下部に陽極がある。SDS によってマイナスに付加されたタンパク質が下部の陽極に引きつけられ電気泳動を行う。その移動距離が分子量に比例する（Fig. 5-15）。

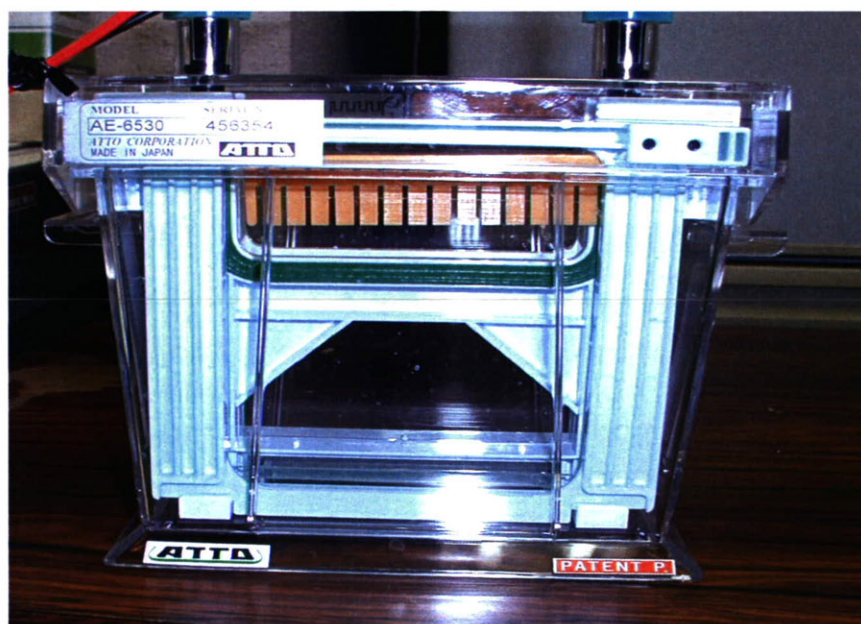


Fig. 5-15 SDS-PAGE 電気泳動装置 アト-AE6530

電気泳動ゲル作製及び泳動と染色

(A) ゲル作製 (SDS-PAGE 用)

保存溶液 (I, II, IIIは冷蔵庫保存)

I 溶液 (30%アクリルアミド溶液) ①29.2g アクリルアミド 0.8g BIS

蒸留水を加えて 100 ml とする。

II 溶液 (1.5M Tris-HCl 緩衝液 pH8.8)

18.17g の Tris と 0.4g の SDS を蒸留水に溶かし、塩酸で pH8.8 に調整した後、最終容量を 100 ml にする。

III 溶液 (0.5M Tris-HCl 緩衝液 pH6.8)

6.06g の Tris と 0.4g の SDS を蒸留水に溶かし、塩酸で pH6.8 に調整した後、最終容量を 100 ml にする。

IV 溶液 (10%過硫酸アンモニウム)

0.1g の過硫酸アンモニウムに蒸留水 1 ml を加える。I 溶液、II 溶液、蒸留水を所定量とり混合した後、TEMED とIV溶液を添加し緩やかに混合し、直ちにエタノールで清浄にしたガラスプレートに流し込む。

注意事項

始めに分離ゲル層を流し込みその上部に蒸留水を積層させ 1 時間程度重合させる。分離ゲルが固まったら蒸留水を捨て、少量の濃縮ゲル液で洗浄した後、濃縮ゲル層を流し込んでコームを差し込み重合させる。一晚程度放置し、安定したところで泳動槽にセットし試料溝を泳動槽用緩衝液で洗浄してから以後の操作に使用する。

(B) 泳動 保存溶液として 10%SDS 溶液

泳動槽用緩衝液: 0.025M Tris, 0.192M グリシン, 0.1%SDS

Tris3g、グリシン 14.4g に 10%SDS 溶液を 10 ml

加え蒸留水で 1000 ml にする。

マーカー色素: 試料注入に先立ち試料溝にマーカー色素をアプライ。

1mg BPB, 100 μ l グリセリン, 900 μ l 蒸留水

電気泳動時間: 試料溝に適当な量の試料と分子量マーカーをマイクロピペットで静かに注入し定電流 20mA でおおよそ 120 分通電する。

(C) 染色・脱色

ガラスプレートから外したゲルは染色液中に2-4時間浸漬・震盪させて染色し、その後脱色液中に3-12時間浸漬・震盪させて脱色する。

染色液: 2.5gクマジーブリリアントブルー、500 mlメタノール、100 ml酢酸に蒸留水を加えて1000 mlとする。

脱色液: 250 mlメタノール、70 ml酢酸に蒸留水を加えて1000 mlとする。

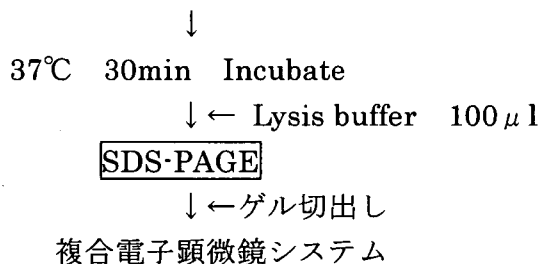
5-5 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) により分離したタンパク (ラット血清アルブミン) を複合電子顕微鏡システムによる Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定

血漿中のどのようなタンパクと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とが結合しているかをドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した後、ゲルを切り出し、複合電子顕微鏡システムを用いて Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の検出を試みた。SDS-PAGE ゲルをタンパクごとに切出し、乾燥ののちカーボン製舟形ホルダーに入れて、切出しゲル試料に電子線を当てると試料中にガドリニウム元素の存在すると特性 X 線が発生する。このことにより Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血漿タンパクとの結合性を検討する。

5-5-1 SDS-PAGE による分離したタンパクを複合電子顕微鏡システムによる Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定方法

(1) ゲルのみでタンパクなし (2) ラット血清 (3) ラット血清アルブミン (試薬; Sigam) (4) ラット血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とを 37 度 30 分緩やかに混和した後ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で下記のサンプルを電気泳動した。SDS-PAGE のゲルからそれぞれの切出し箇所の切片を乾燥したのち、カーボン製舟形ホルダーに入れ、複合電子顕微鏡システムでガドリニウム元素の特性 X 線を測定した (Scheme 5-01) 及び (Scheme 5-02)。

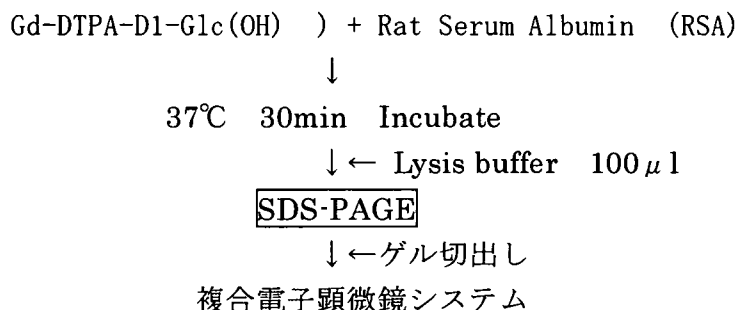
(1) Gel only, (2) Rat Serum (RS), (3) Rat Serum Albumin (RSA) 0.24 μ M
1. Rat Serum And Rat Serum Albumin 50 μ l



Scheme 5-01 SDS-PAGE の切出しゲルよりの Gd 特性 X 線の測定の分析手順

(4) Rat Serum Albumin (RSA) 0.24 μ M
1. RSA 0.24 μ M 50 μ l 2. Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.016mmol/ml 50 μ l

1



Scheme 5-02 切出しゲルより RSA と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との Gd 特性 X 線の測定手順

5-5-2 SDS-PAGE による分離したタンパク（ラット血清アルブミン）を複 合電子顕微鏡システムによる Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定

アトーの電気泳動装置 (Fig. 5-1 5) により、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲルを行ない血漿中のどのタンパクと新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と結合性があるかを検討するため、SDS-PAGE 電気泳動で分離後のゲルを切り出す。切り出したゲルに複合電子顕微鏡システムを用いて、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) があるかどうかガドリニウム元素固有の特性 X 線を測定した (Fig. 5-1 6)。

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

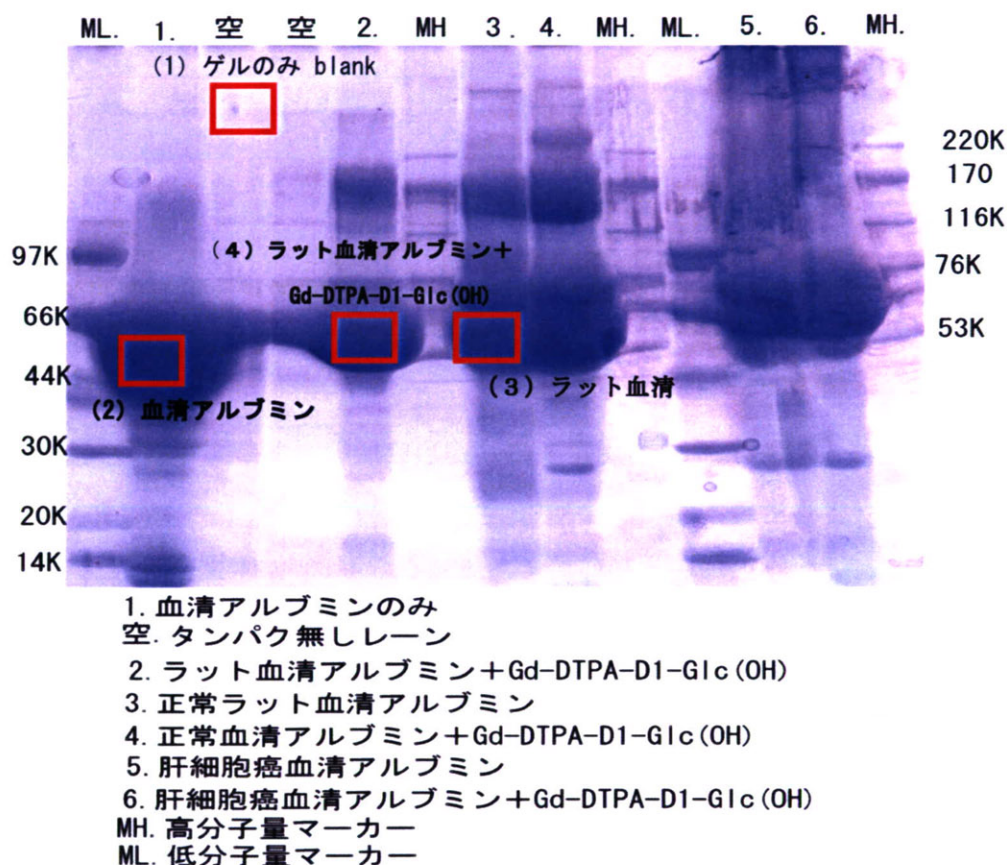


Fig. 5-1 6 SDS-PAGE □ は切り出したゲルのタンパクがない箇所、ラット血清血清アルブミン及び血清アルブミンとの Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の結合性の検討

SDS-PAGE 条件 (Fig. 5-1 6)

ゲル濃度：15%アクリルアミド 電気泳動電流：30mA 電気泳動時間：90分

固定時間：30分 染色液：和光クイック CBB 染色時間：60分

脱色の終了したゲルは蒸留水による洗浄、不要部分の切除の後、蒸留水で湿らせた濾紙上に配置し、張り付き防止用ラップを被せて乾燥をさせその後必要箇所をカッターで切り出す。