

5-5-2-1 SDS-PAGE から切出したゲル中のタンパク（血清アルブミン） における、複合電子顕微鏡システムによる Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定 (1) SDS-PAGE のゲルのみ

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) の分離ゲルから、空レーンの切り出したゲル (□) を (タンパクのない所)、カーボン製舟形ホルダーに入れ、乾燥のち、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。左側は特性 X 線測定、右側は測定面の電子顕微鏡像、上面 500 倍で下面 100 倍 (Fig. 5-17)。

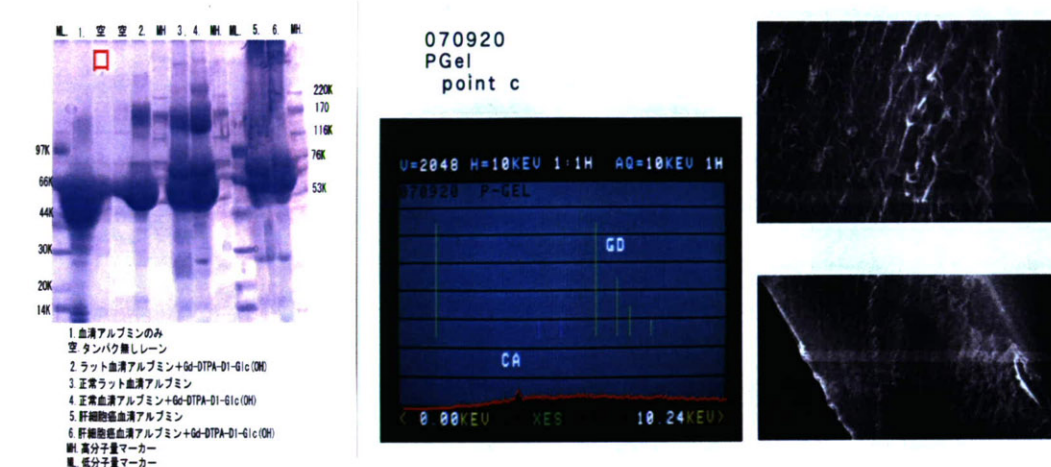


Fig. 5-17 SDS-PAGE 分離ゲル中の (□) 箇所のガドリニウムの特性 X 線の測定

複合電子顕微鏡システム測定結果から、空レーンの切り出した分離ゲル中 (□) からはガドリニウム特性 X 線は検出されなかった。このことから Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は存在しないと考えられる (Fig. 5-17)。

(2) ラット血清アルブミン

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) のゲルから、ラット血清アルブミンのゲルの所 (□) を切り出し、カーボン製舟形ホルダーに入れ、乾燥のち、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。左側は特性 X 線測定、右側は測定面の電子顕微鏡像、上面 500 倍で下面 100 倍 (Fig. 5-18)。

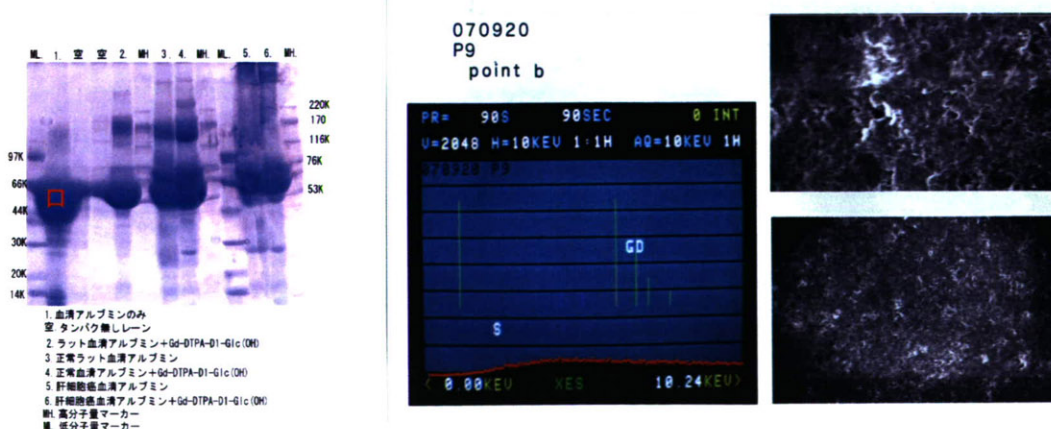


Fig. 5-18 ラット血清アルブミンの分離ゲル中 (□) の Gd の特性 X 線の測定

複合電子顕微鏡システム測定結果から、ラット血清アルブミンの分離ゲル中 (□) からはガドリニウム特性 X 線は検出されなかった。このことから Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は存在しないと考えられる (Fig. 5-18)。

(3) ラット血清

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) のゲルから、ラット血清のゲルの所 (□) を切り出し、カーボン製舟形ホルダーに入れ、乾燥のち、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。左側は特性 X 線測定、右側は測定面の電子顕微鏡像、上面 1000 倍で下面 100 倍 (Fig. 5-19)。

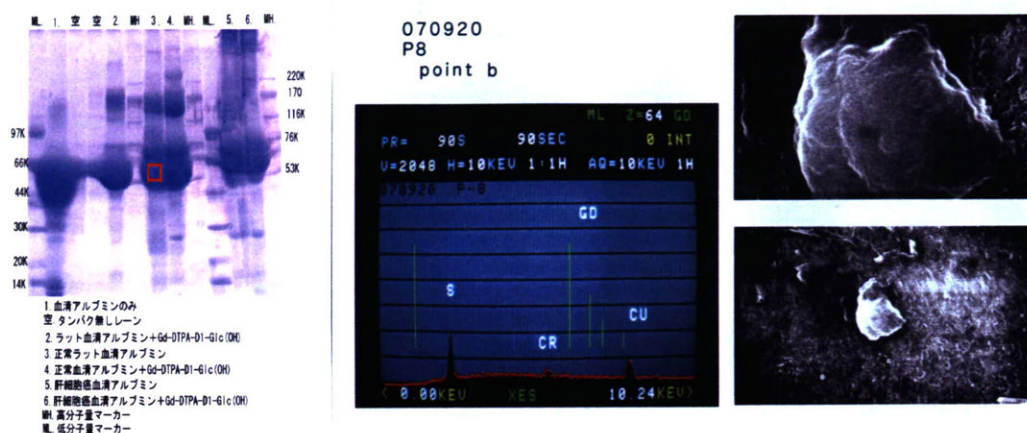


Fig. 5-19 ラット血清のアルブミンの分離ゲル中 (□) の Gd の特性 X 線の測定

複合電子顕微鏡システム測定結果から、ラット血清のアルブミンの分離ゲル中 (□) からはガドリニウム特性 X 線は検出されなかった。このことから Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は存在しないと考えられる (Fig. 5-19)。

(4) ラット血清アルブミン+Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

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) のゲルから、ラット血清アルブミン+Gd-DTPA-D1-Glc(OH) のゲルの所 (□) を切り出し、カーボン製舟形ホルダーに入れ、乾燥のち、特性 X 線を測定した。左側は特性 X 線測定、右側は測定面の電子顕微鏡像、上面 100 倍で下面 500 倍 (Fig. 5-20)

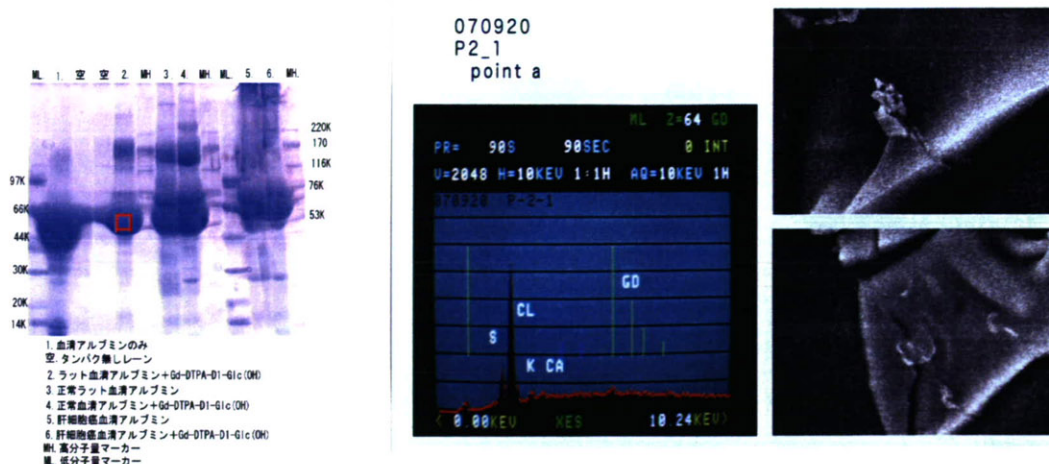


Fig. 5-20 分離ゲル中ラット血清アルブミン (□) の Gd の特性 X 線の測定

測定結果から、ラット血清アルブミン+Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の分離ゲル中 (□) からは Gd 特性 X 線は検出された。このことから Gd-DTPA-D1-Glc(OH)はラット血清アルブミンと結合することが考えられる。(Fig. 5-20)。

5-6 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスペックを用いて血清アルブミン及びがん細胞との Gd-DTPA-D1-Glc(OH)との結合性の検討

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は 肝臓がん組織や大血管や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。また血漿と混和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によると思われる。現在使用されている MRI 造影剤のデータなどから、この緩和率上昇の物質候補として血清アルブミンが云われている。

我々が開発した Gd-DTPA-D1-Glc(OH)が血清アルブミンと結合すると緩和率が上昇するのかを検討した。また培養の胃がん細胞 (MKN45) に Gd-DTPA-D1-Glc(OH)を添加すると緩和率が上昇するかどうか検証してみた。緩和率を測定する装置はパルス磁場勾配型核磁気共鳴装置はブルカー・オプティクス製 ミニスペック mq20 (0.41T) を用いた。ミニスペックの測定条件は周波数 20 MHz、測定温度 37 度で計測を行なった (Fig. 5-21)。



Fig. 5-21 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置 ミニスペック

5-6-1 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスペックを用いての血清アルブミンとの Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)を血漿と混和させると、緩和率が大幅に高まることからが分かっている。このことは Gd-DTPA-D1-Glc(OH)が血液成分の血清アルブミンと結合すると、T1緩和率が上昇するかどうか、パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスペックで検討を行なった。血清アルブミンの濃度は一定に Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の量を増加させ、緩和率が変わるかを周波数 20 MHz、温度 37 度で計測を行なった (Scheme 5-03)。

実験手順

(I) 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.05mmol/ml pH5-6Chelex でフリーGd を除去
各 0、2、5、10、20、40、80 μ l (O-P-0 ~ O-P-80)

(II) 血清アルブミン (RSA) 0.58mM 各 50 μ l
造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (0 μ l ~ 80 μ l) + 血清アルブミン RSA (50 μ l)

↓

37°C 30min Incubate

↓ ← 99%Ethanol 100 μ l (-20°C)

マイナス 20°C 24h Incubate

↓

13,000rpm 15min Centrifuge

↓ ← Wash 200 μ l 99%EtOH (S1-H2O) final 2ml

13,000rpm 15min Centrifuge

↓ ← Wash 200 μ l 99%EtOH (S2-H2O) final 2ml

ppt

↓ ← 2ml PBS

ミニスペック測定

Scheme 5-03 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と RSA との混和後のミニスペック測定の実験手順

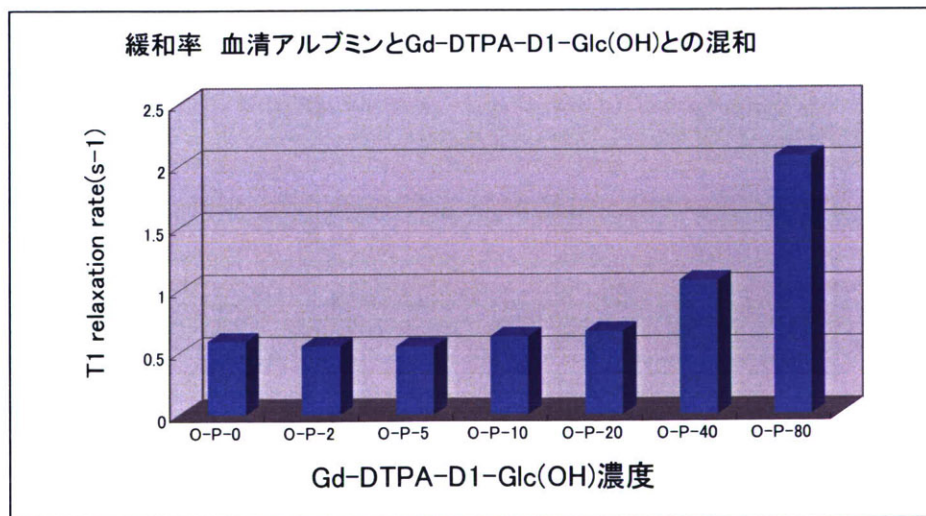


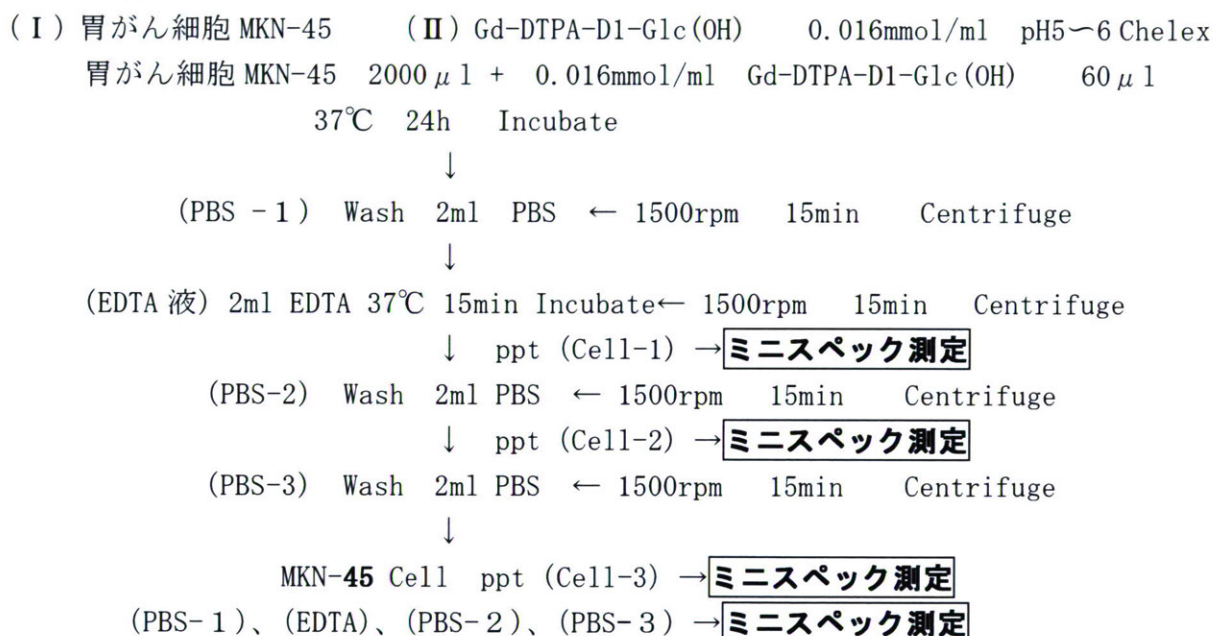
Fig. 5-22 血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 結合性をミニスペックで測定

パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスペック測定から血清アルブミンが一定量に対して Gd-DTPA-D1-Glc(OH)を増加していくに従い、緩和率が徐々に上昇している。このことは Gd-DTPA-D1-Glc(OH)が血液成分の血清アルブミンと結合性を示唆していると考えられる (Fig. 5-2 2)。

5-6-2 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスペックを用いて胃がん細胞 MKN-45 と造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と胃がん細胞 MKN-45 との結合性を、ミニスペック計測を周波数 20 MHz、温度 37 度での測定条件で行ない検討した。(Scheme 5-0 4)。

実験手順



Scheme 5-0 4 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と MKN-45 Cell との混和後のミニスペック測定手順

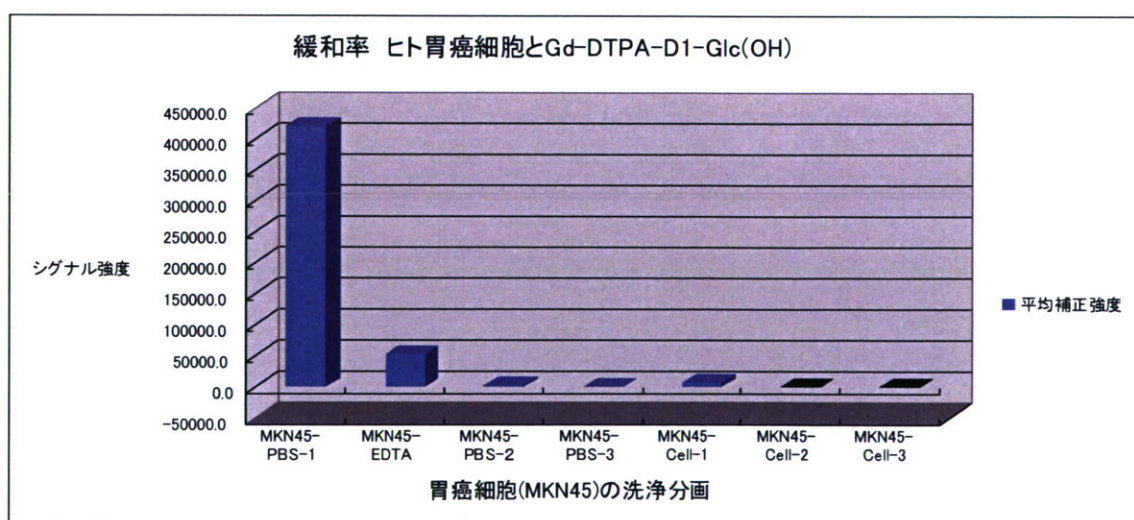


Fig. 5-2 3 胃がん細胞 MKN-45 と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 結合性をミニスペックで測定

ミニスペックの緩和率測定で、胃がん細胞 MKN-45 の最初の培養液や胃がん細胞をシャーレから剥がす EDTA 液からは T1 緩和率のシグナルは高い値を示したが、2 回目以降の洗浄液 PBS や洗浄後の胃がん細胞からは T1 緩和率のシグナル値が計測されなかった。よって胃がん細胞 MKN-45 と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の結合性は認められなかった (Fig. 5-2 3)。

5-7 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との血液成分及びがん細胞との結合性の検討

誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) は直流高周波数 (300MHz) 電流をコイルに流れることで、高周波磁界の時間変化に伴い電磁誘導により高温が発生する。分析試料管中にアルゴンガス (窒素ガス) を流すと、高温アルゴンがプラズマ状態になり、そこに液体試料を霧化して導入すると、高い熱エネルギーにより試料が励起され、試料中の元素特有な光が発生する。その光を分光器で分析すると特有なスペクトラルが得られことから、どのような元素が試料中に存在するかが判明できる。またスペクトラルの強さから、検量線を引くことにより試料中の濃度を知ることが出来る。誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) は検出感度が高く、かなり微量の元素の濃度も測定できる。さらに、ダイナミックレンジが広く直線範囲が 5 桁にも及ぶことから、希薄な試料から相当濃度まで、同時に測定が可能である (Fig. 5-2 4)。



Fig. 5-2 4 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES)
Perkin Elmer 社 Optima 2000

液体の中に存在する元素をプラズマ状態することをを用いて、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 中のガドリニウムの測定をすることができる。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) にはガドリニウムが配位しているため、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) がタンパクなどと結合していると、そのタンパクを精製分離して液体状態にし霧化したのち試料管に導入して、プラズマ化し、ガドリニウム元素固有なスペクトラルを分光光度測定すれば、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の濃度も含め、存在がわかる。ゆえに、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) を用いれば、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血漿成分やがん細胞との結合性や取り込み状態も分かる。それに様々な物質と結合性の検討もでき、分子認識も判明する可能性がある。ガドリニウムのスペクトラル測定は誘導結合プラズマ発光分光分析装置パーキンエルマー社 Optima 2000 で行なった (Fig. 5-2 4)。

5-7-1 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミン及びがん細胞における結合性の検討

ICP-AES を用いてラット血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討を下記の実験手順に従って行なった (Scheme 5-05)。

造影剤 Gd-DTPA-Glc(OH) とラット血清アルブミンの結合性の検討

- Rat Serum Albumin (RSA) 0.24 μ M
- Gd-DTPA-Glc(OH) 0.016mmol/ml pH5~6 Chelex 0、2、5、10、20 μ l
- RSA 0.24 μ M 50 μ l
- Gd-DTPA-Glc(OH) + RSA
 - ↓
 - 37°C 30min Incubate
 - ↓ ← 99%Ethanol 100 μ l (-20°C)
 - 20°C 24h Incubate
 - ↓
 - 13Krpm 15min Centrifuge
 - ↓ ← Wash 200 μ l 99%EtOH (H2O-1) final 2ml
 - 13Krpm 15min Centrifuge
 - ↓ ← Wash 200 μ l 99%EtOH (H2O-2) final 2ml
 - PBS
 - ↓ ← 2ml PBS (RSA-S)
 - ICP

Scheme 5-05 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と RAS との結合性を ICP 用いての測定手順

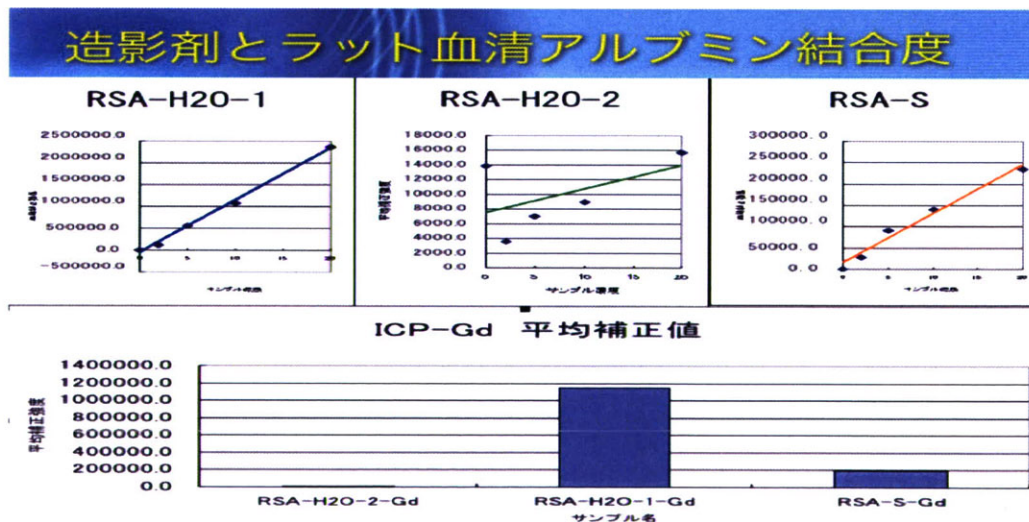


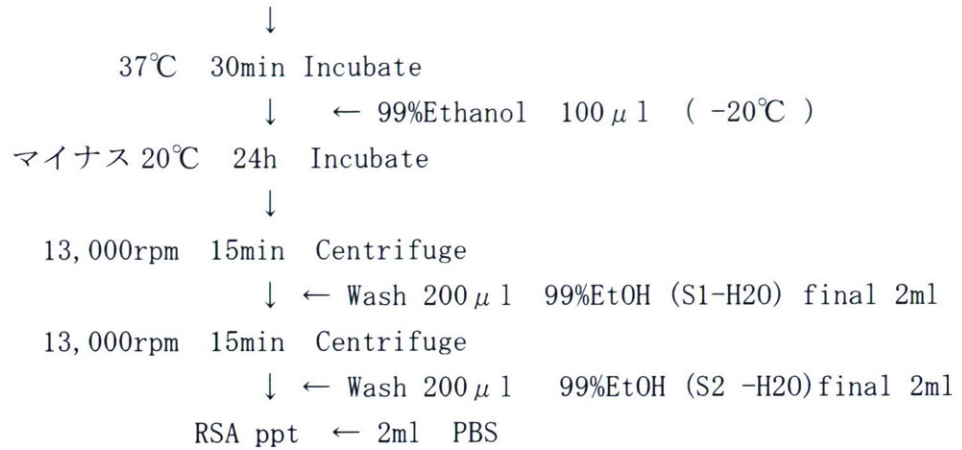
Fig. 5-25 ICPによりラット血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の測定

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミン (RSA) を 37°C 30 分間混和後、血清アルブミンを回収したのち、誘導結合プラズマ発光分光分析計 (ICP) でガドリニウムを測定した。1 回目の洗浄液 (PBS) にはガドリニウムは存在したが、2 回目洗浄液 (PBS) ではガドリニウムが皆無であった。そして回収した RSA からはガドリニウムを検出した。このことにより Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と RSA とは結合性があると考えられる (Fig. 5-25)。

5-7-2 誘導結合プラズマ発光分光分析装置による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とマグネビストとのラット血清アルブミン (RSA) における結合性の比較

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と現在医療用として使われている造影剤マグネビストとの、ラット血清アルブミン (RSA) における結合性の比較を行なった (Scheme 5-06)。

- (I) 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 0.05mmol/ml 0, 2, 5, 10, 20, 40, 80 μ l (OP-0 から 80 μ l)
 - (II) 造影剤マグネビスト 0.05mmol/ml 0, 2, 5, 10, 20, 40, 80 μ l (OP-0 から 80 μ l)
 - (III) 血清アルブミン (RSA) 0.58mM 各 50 μ l
- マグネビスト or Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (0 μ l ~ 80 μ l) + 血清アルブミン RSA (50 μ l)



ICP-AES 測定

Scheme 5-06 マグネビストと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との RSA における結合性測定手順

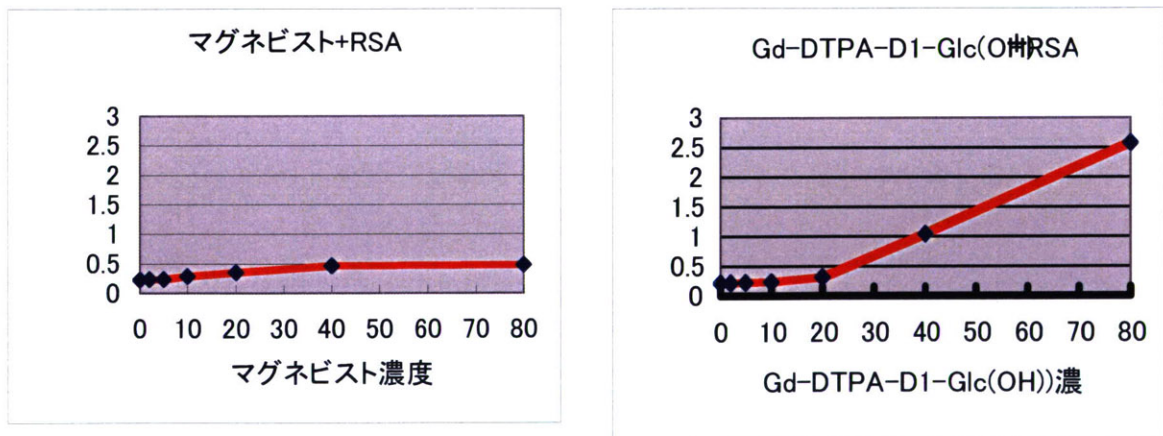
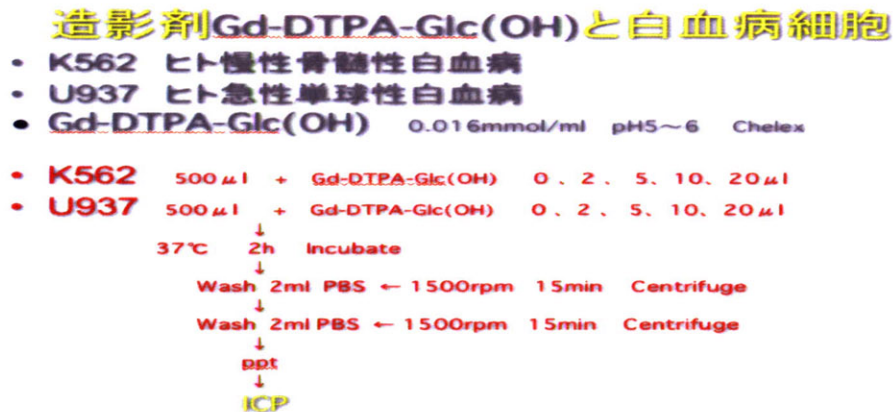


Fig. 5-26 誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP による、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とマグネビストとのラット血清アルブミン (RSA) における結合性の比較測定

ICP 測定において、ラット血清アルブミン (RSA) が一定量に対して、マグネビストは量を増やしても、回収した RSA からのガドリニウム濃度が増加してないのは、マグネビストと血清アルブミンとは結合性が低いことが示唆される。一方、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は量が増えるのに従い、回収した RSA からのガドリニウム濃度が上昇している。このことは Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と RSA との結合性が高いことを示唆している (Fig. 5-26)。

5-7-3 誘導結合プラズマ発光分光分析装置による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との慢性骨髄性白血病及び単球性白血病との結合性の検討

誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP) を用いて Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と白血病細胞 (K562, U937) との結合性の検討を行なった (Scheme 5-07)。



Scheme 5-07 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と白血病細胞との結合性を ICP を用いて測定手順

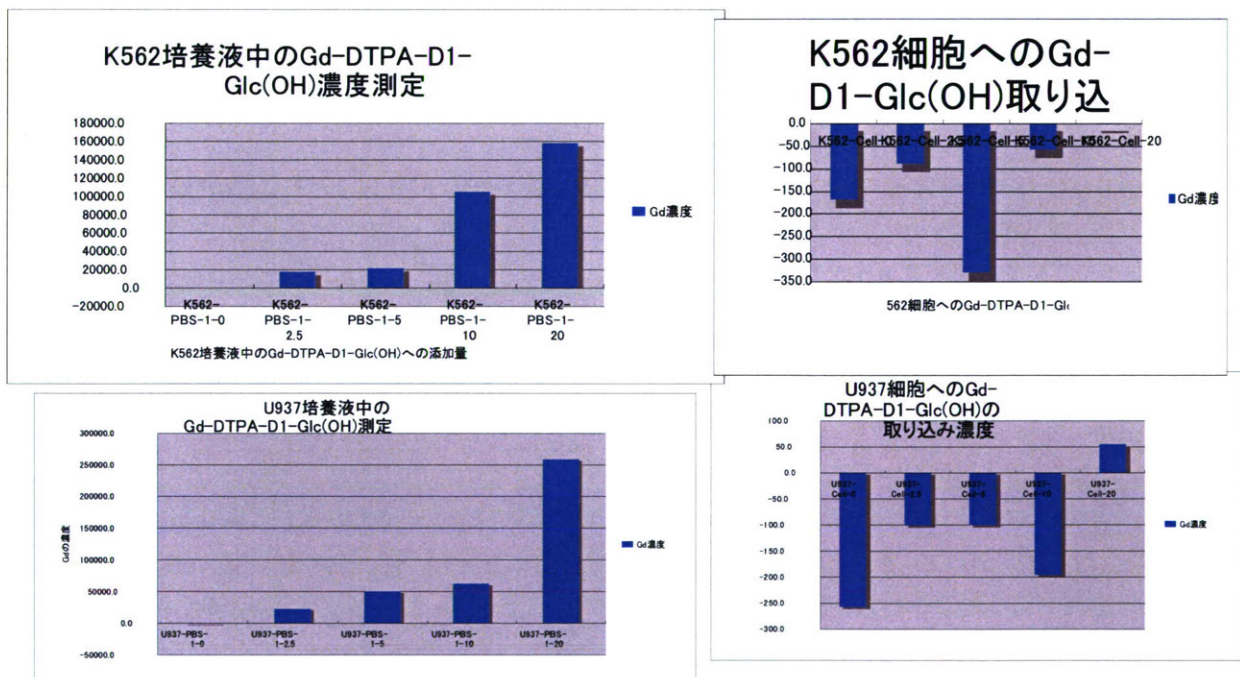


Fig. 5-27 ICP-AES 測定から慢性骨髄性白血病 K562 及び単球性白血病 U937 と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

ICP-AES 測定から、慢性骨髄性白血 K562 及び単球性白血病 U937 とともに添加した Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の量に伴い、培養液中の濃度も比例してガドリニウム濃度も高いが、PBS 洗浄後に回収した K562 細胞及び U937 細胞とも、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の添加量が多いにもかかわらず、ガドリニウムの検出は皆無であった。よって慢性骨髄性白血病 K562 及び単球性白血病 U937 と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の結合性は認められなかった (Fig. 5-27)。

5-7-4 誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP) による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との胃がん細胞 MKN-45 の結合性の検討

誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP) を用いて、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と胃がん細胞 MKN45 との結合性の検討を行なった (Scheme 5-08)。

造影剤 Gd-DTPA-Glc(OH) と胃癌細胞 MKN-45



Scheme 5-08 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と胃がん細胞との結合性を ICP を用いての測定手順

Gd-DTPA-Glc(OH) とヒト胃腺癌 MKN-45 との結合性 ICP-Gd 測定値

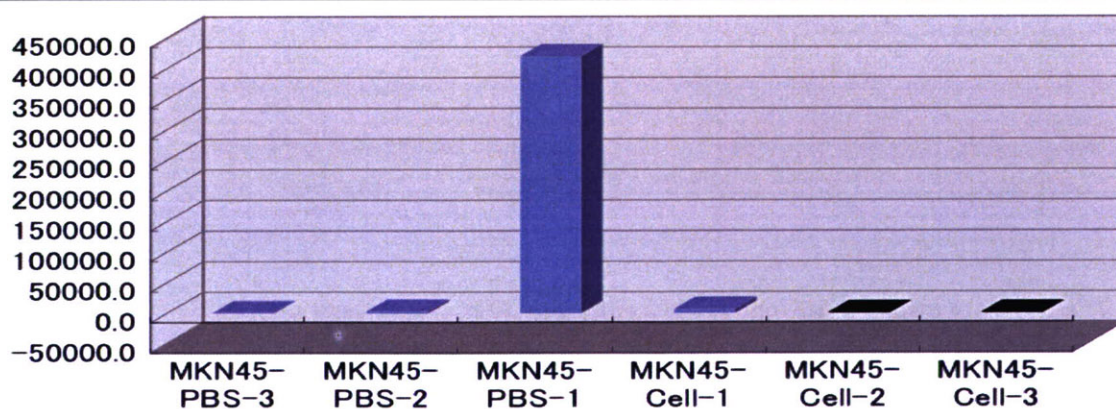


Fig. 5-28 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と胃がん細胞との結合性の ICP-AES 測定結果

ICP-AES おける Gd の測定から、胃がん細胞 MKN-45 の最初の培養液 PBS-1 液からは高濃度の Gd の存在を示したが、PBS-2、-3 の洗浄液 PBS からはほとんど検出できなかった。3回洗浄後に回収した胃がん細胞 MKN-45 (Cell-3) からは Gd の検出は皆無であった。よって胃がん細胞 MKN-45 と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性は認められなかった (Fig. 5-28)。

5-8 誘導結合プラズマ発光分光分析装置による界面活性剤による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミン (RSA) との結合性への影響の検討

ICP-AES を用いて、界面活性剤 (SDS, TritonX100) の Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミン (RSA) との結合性への影響の検討を行なった (Scheme 5-09)。

界面活性剤における造影剤 Gd-DTPA-Glc(OH) と RSA

- Rat Serum Albumin (RSA) 0.05 μ M
- Gd-DTPA-Glc(OH) 0.008mmol/ml pH5~6 Chelex
0, 1, 2.5, 5, 10 μ l
- RSA 0.05 μ M 200 μ l
- Gd-DTPA-Glc(OH) + RSA
 - ↓
 - 37°C 30min Incubate
 - ↓ ← 10% Triton 11 μ l (final 1%) 1dimension
 - ↓ ← 10% SDS 11 μ l (final 1%) 2dimension
 - 37°C 30min Incubate
 - ↓ ← 99%Ethanol 100 μ l (-20°C)
 - 20°C 2h Incubate
 - ↓
 - 13Krpm 15min Centrifuge
 - ↓ ← Wash 200 μ l 99%Ethanol (S1) final 2ml
 - 13Krpm 15min Centrifuge
 - ↓ ← Wash 200 μ l 99%Ethanol (S2) final 2ml
 - PPT
 - ↓ ← 2ml PBS
 - ICP

Scheme 5-09 界面活性剤 (SDS, TritonX100) による Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と RSA との結合性への影響を ICP-AES を用いての測定手順

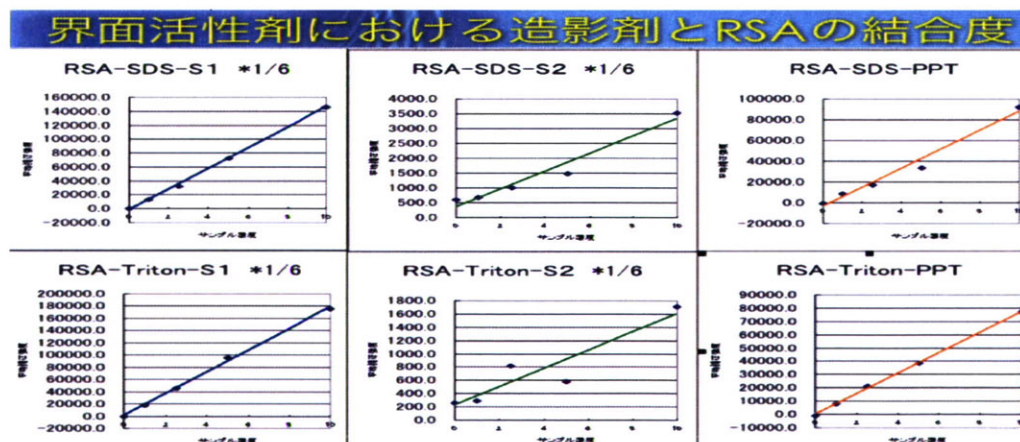


Fig. 5-29 界面活性剤 (SDS, TritonX100) によるラット血清アルブミン (RSA) と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性への影響測定

誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でのガドリニウム測定から、1%の陰イオン性界面活性剤である SDS や、1%の非イオン性界面活性剤である Triton X-100 での洗浄のうち、回収したラット血清アルブミン (RSA) において、添加した Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 濃度に比例して、ガドリニウム量も増加している。よって、陰イオン性界面活性剤や非イオン性界面活性剤存在下であったとしても、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミン (RSA) との結合性への影響はさほどないと考えられる (Fig. 5-29)。

5-9 誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP を用いて、SDS-PAGE ゲルから分離し切出した血清タンパク並びに血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が陰イオン性界面活性剤や非イオン性界面活性剤存在下であったとしても、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミンの結合性が損なわれないとの結果が、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でのガドリニウム測定から得られた (Fig. 5-29)。そのことより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) を行ない、染色ののちタンパクバンド所のゲルを切り出し、切り出したゲルからタンパクを電氣的に抽出し、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定して、タンパク質と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討を行なった。

SDS-PAGE で分離したタンパク質のバンドをカッターで切り出し、切り出したゲル中から SDS 化したタンパクを電気泳動エリ्यूター装置でゲルから Buffer 液へ抽出を行なう。電気泳動エリ्यूター装置は Bio-Rad 製 Modle420 で行なった (Fig. 5-30)。

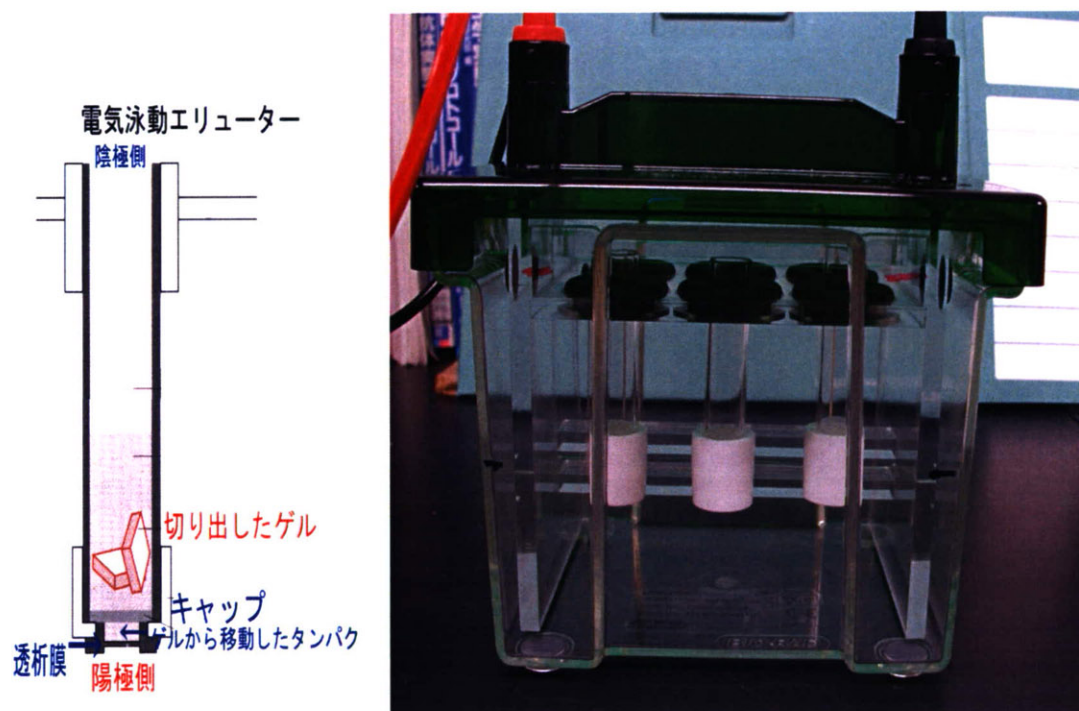


Fig. 5-30 ガラス管内の模式図と電気泳動エリ्यूター装置 BioRad 製 420

ガラス管のなかで SDS-PAGE から切り出したゲルの中のタンパクは、陰性の SDS に包まれているので、電圧をかけると陽極側に引かれゲル中から外に出て、透析膜で仕切られたキャップの中に移動する。電気は流れるが透析膜で仕切られているので、徐々にタンパクだけがキャップの中で濃縮される。キャップの中で濃縮されたタンパク溶液を誘導結合プラズマ発光分光分析でガドリニウム元素の測定すれば、タンパク質と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討が行なえる。ガドリニウム元素が検出されれば Gd-DTPA-D1-Glc(OH) そのタンパク質と何らかの結合性があったと考えられる (Fig. 5-30)。

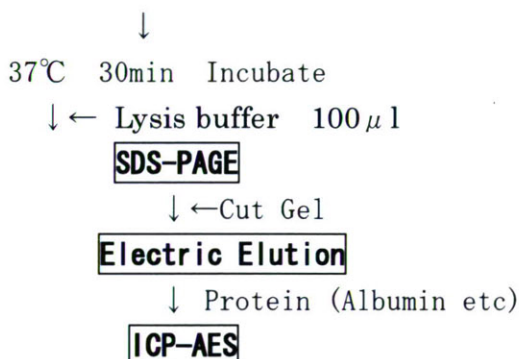
5-9-1 SDS-PAGE ゲルから切出し分離した血清タンパク並びに血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

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、血清アルブミン及び血清タンパク質のゲルのバンドをカッターで切り出し、電気泳動エリ्यूーター装置でそれぞれのタンパクを回収し、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素の測定した (Scheme 5-10)。

- (1) 0.058 μ mol/ml ラット血清アルブミン+0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (2) 正常ラット血清+0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (3) 肝細胞がんラット血清+0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

実験手順

0.058 μ mol/ml Rat Serum Albumin , Normal Rat Serum And Cancer Rat Serum 50 μ l
add 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 50 μ l



Scheme 5-10 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血清タンパクとの結合性を ICP を用いての測定手順

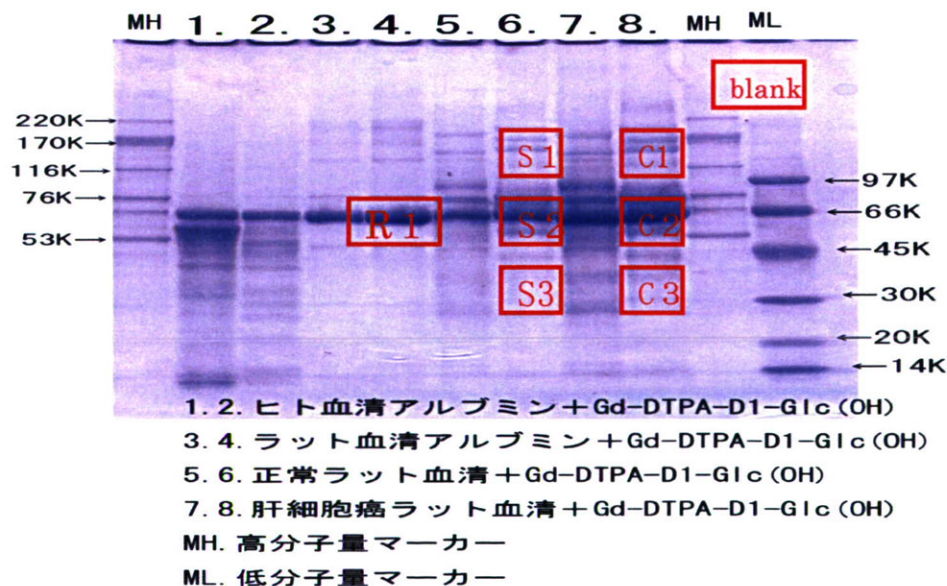


Fig. 5-31 SDS-PAGE □ 切出したゲル、ラット血清、血清タンパク及び血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との混和ゲルからの切出し箇所

SDS-PAGE条件

ゲル濃度：5～20%グラジェントゲル 泳動電流：20mA 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 (Fig. 5-31)。

5-9-2 SDS-PAGE ゲルから切出し分離した血清タンパク並びに血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

SDS-PAGE 分離ゲル中の (□) 箇所を切出しの誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素の測定した。

- (□) Blank : 空レーンの切り出した分離ゲル (タンパクなし)
- (□) R1 : ラット血清アルブミン + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S1 : 正常ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S2 : 正常ラット血清 (アルブミン) + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S3 : 正常ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C1 : がんラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C2 : がんラット血清 (アルブミン) + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C3 : がんラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

Control : 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

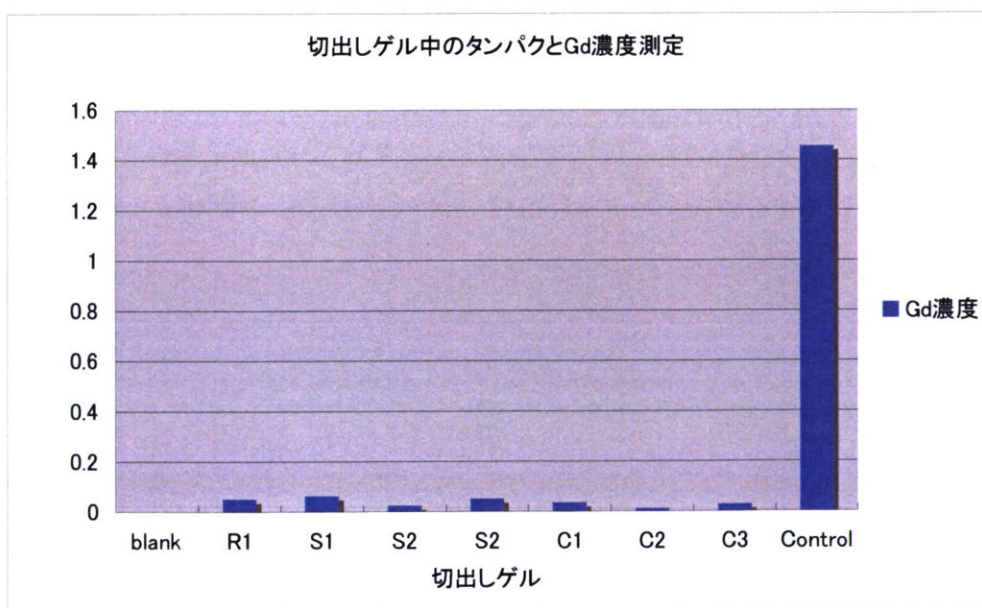


Fig. 5-32 切出した SDS-PAGE ゲルからの Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血清アルブミン及び正常ラット並びに肝細胞がん血清タンパクとの結合性の測定

切出した SDS-PAGE ゲルから、電気泳動エリ्यूーターで Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血清アルブミン及び正常ラット並びに肝細胞がん血清タンパクとの結合性を、誘導結合プ

ラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素の測定した。僅かではあるが、血清アルブミンをはじめそれぞれのタンパクゲル中に Gd-DTPA-D1-Glc(OH)を見出すことができた (Fig. 5-3 2)。

5-10 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の血液成分及びがん細胞との結合性及び分子認識

まとめ

新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は実験用ラットの *in vivo* 評価結果から肝臓がん組織や大小血管の造影効果が高いことが判明した。このとはこの新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は肝臓がん細胞や血液成分と何らかの分子との結合性があるのではないかと考えられ、複合電子顕微鏡システムや磁場勾配型核磁気共鳴装置 (ミニスペック) 並びに誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) を用いて検討を行ない、下記の実験結果を得たので報告する。

実験結果より以下のことが云える。

- (1) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は赤血球、白血球及び血小板との結合性は認められなかった。
- (2) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は白血病細胞 (慢性骨髄性白血病 K 5 6 2、単球性白血病 U 9 5 7) との結合性は認められなかった。
- (3) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は胃がん細胞 (MKN-45) との結合性は認められなかった。
- (4) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)はラット血清アルブミンとの結合性は少量ながら認められた。
- (5) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)はいくつかのラット血清タンパクとの結合性は少量ながら認められた。

参考文献

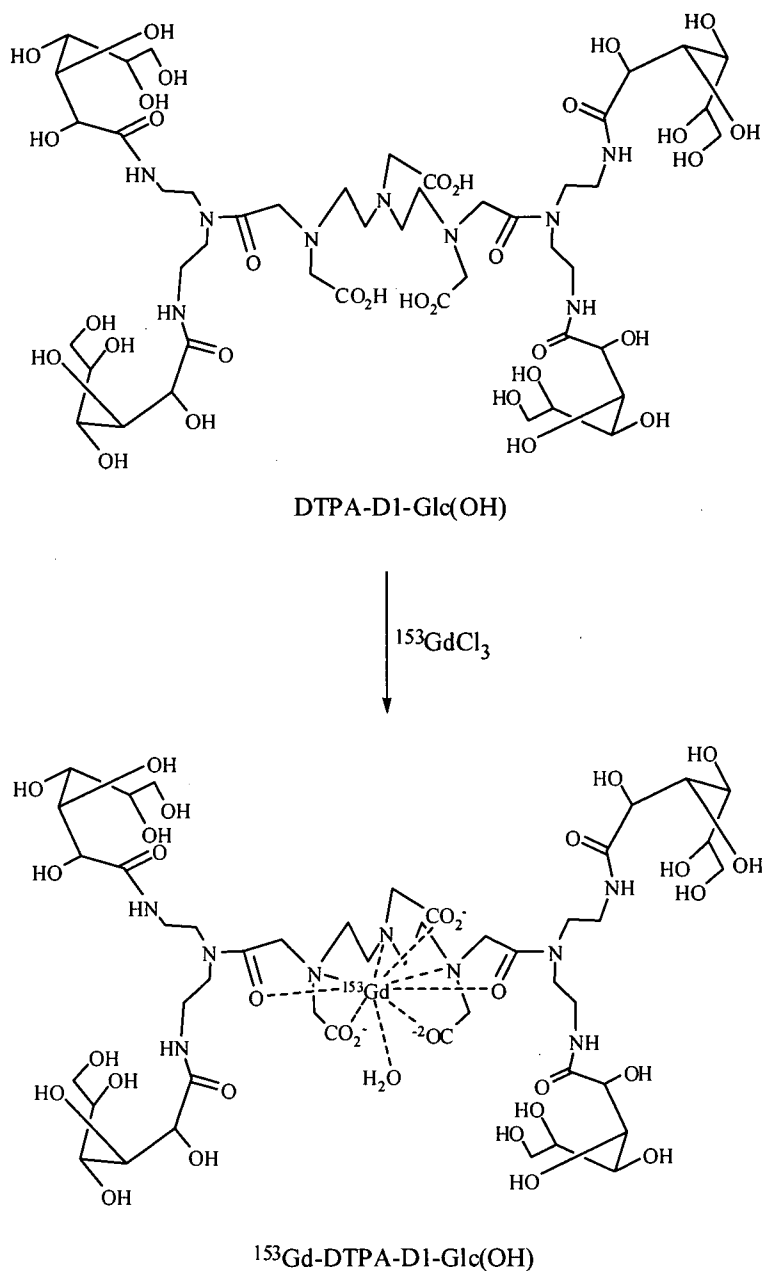
Table 5-01 血液成分 (シンプル生理学 205 ページより転載)

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
(月刊 細胞 VOL.10 NO.4 pp514 pp528 1978 年より転載)

6. $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ による検討

6-1 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の作成

$\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ は血管内滞留性の高い新しいMRI造影剤として期待されている。 $\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の生体内挙動を簡便にかつ定量的に評価するために、放射性同位元素標識体 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を作成した。本来の $\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ はジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) の骨格にガドリニウムを配位した後、さまざまな精製過程を経て目的とする最終産物を得る。放射性同位元素標識体の場合、できるだけ精製操作を加えずに化合物を得たいので、ガドリニウムの配位されていない DTPA-D1-Glc(OH) に放射性ガドリニウムを添加するのみで標識体を得ることを検討した (Scheme 6-01)。



Scheme 6-01 DTPA-D1-Glc(OH) に ^{153}Gd を配位して $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を作成

6-1-1 ガドリニウム 153 (^{153}Gd)

ガドリニウム 153 (^{153}Gd) は原子番号 64、質量数 153 のランタノイド系の元素で物理学的半減期は 241.6 日である。主な放出放射線は 97.4keV のガンマ線と 41.5keV のユーロピウム Eu の特性 X 線である。

^{153}Gd は塩化ガドリニウム $^{153}\text{GdCl}_3$ の形で 0.5N の塩酸溶液として供給される (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Boston, MA, USA)。供給された $^{153}\text{GdCl}_3$ は比放射能が 3547.97MBq/mg であった。1MBq あたり 281.9ng すなわち 4.4nmol の金属ガドリニウムを含むと計算された。放射能濃度は 761.63MBq/mL であった。

6-1-2 ^{153}Gd の配位

DTPA-D1-Glc(OH) に ^{153}Gd を配位させた手順は以下の通りである。

- (1) DTPA-D1-Glc(OH) (分子量 1276) の原末を 0.2M クエン酸緩衝液 pH5.4 に 12.76mg/mL、0.01M の濃度で溶解した。
- (2) $^{153}\text{GdCl}_3$ 1 μL を 0.1N 塩酸で 1000 倍希釈し、0.76163MBq/mL とした。
- (3) DTPA-D1-Glc(OH) 溶液 100 μL に希釈した $^{153}\text{GdCl}_3$ 5 μL を加え、軽く振盪した。配位子とガドリニウムのモル比は 1 μmol :16.8pmol で約 6 万倍の配位子過剰の条件で混和したことになる。
- (4) 室温で 5 分間静置後、1N 水酸化ナトリウムを加え、pH を 7 に調整した。
- (5) 60°C で 1 時間もしくは 24 時間静置した。最終的にはあとに示す実験の結果からインキュベーション時間は 1 時間とした。

6-1-3 ^{153}Gd の標識率

^{153}Gd が DTPA-D1-Glc(OH) に配位されたか、以下の通り検討した。

- (1) Chelex chelating ion exchange resin (Chelex100, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を 0.01M リン酸緩衝生理食塩水 pH7.4 に 1mL あたり 200mg 加えた。
- (2) 6-1-2 (5) で得られた ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH) に (1) で調整した Chelex100 を攪拌しながら 20mg 加え、室温で 1 時間もしくは 12 時間激しく振盪した。
- (3) 試料と Chelex100 の混和物を 0.5mL のフィルタ付チューブに移し、3,000rpm で 5 分間遠沈した。
- (4) オートウエルガンマカウンタで濾液の放射能を計測した。
- (5) ^{153}Gd が DTPA-D1-Glc(OH) に配位された場合、 ^{153}Gd は Chelex100 に吸着されず、濾液に回収される。一方、配位されなかった ^{153}Gd は Chelex100 に吸着され、フィルタで除去される。加えた放射能のうち濾液に移行した放射能の比率が標識率とみなされる。DTPA-D1-Glc(OH) を含まないクエン酸緩衝液に 6-1-2 と同様の操作を加えたものを対照として用い、濾液の放射能を測定した。この場合、 ^{153}Gd はすべて Chelex100 に吸着されるので、理論的には濾液の放射能は 0 となるはずである。
- (6) Chelex100 とのインキュベーション時間を 12 時間として、 ^{153}Gd と DTPA-D1-Glc(OH) のインキュベーション時間を検討した (Fig. 6-01)。濾液に回

収された放射能は1時間のインキュベーションで91.2%、24時間のインキュベーションで90.9%と差が認められなかったため、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間は1時間とした。なお対照ではそれぞれ6.4%、5.8%の放射能が濾液に回収された。

- (7) ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間を1時間として、試料とChelex100とのインキュベーション時間を検討した(Fig. 6-02)。濾液に回収された放射能は1時間のインキュベーションで93.3%、12時間のインキュベーションで91.2%と差が認められなかったため、Chelex100とのインキュベーション時間は1時間とすることにした。なお対照ではそれぞれ6.5%、6.4%の放射能が濾液に回収された。
- (8) 以上の結果から、 ^{153}Gd をDTPA-D1-Glc(OH)に配位する条件は60°C、1時間とし、今後、標識率を確認する必要がある場合にはChelex100を加えた後、室温、1時間の振盪とすることにした。
- (9) あとで示す血清とインキュベートした後のHPLCの分析から、 ^{153}Gd は実質上100% DTPA-D1-Glc(OH)に配位されたと考えられるので、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)を混和後の精製は行わないこととした。
- (10) 標識率を100%とすると ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH)の比放射能は2.98kBq/mgまたは3.81MBq/mmolであり、DTPA-D1-Glc(OH)約6万分子あたり1個の ^{153}Gd が配位されていると計算される。

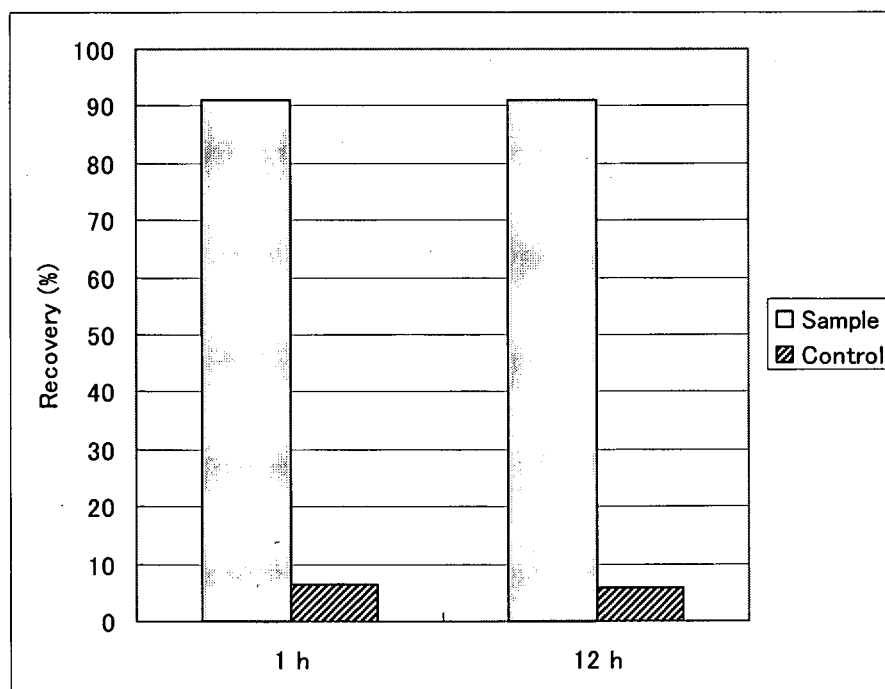


Fig. 6-01 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間の検討

Chelex100とのインキュベーションは12時間に固定した。濾液に回収された放射能に差が認められないため、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間は1時間とした。

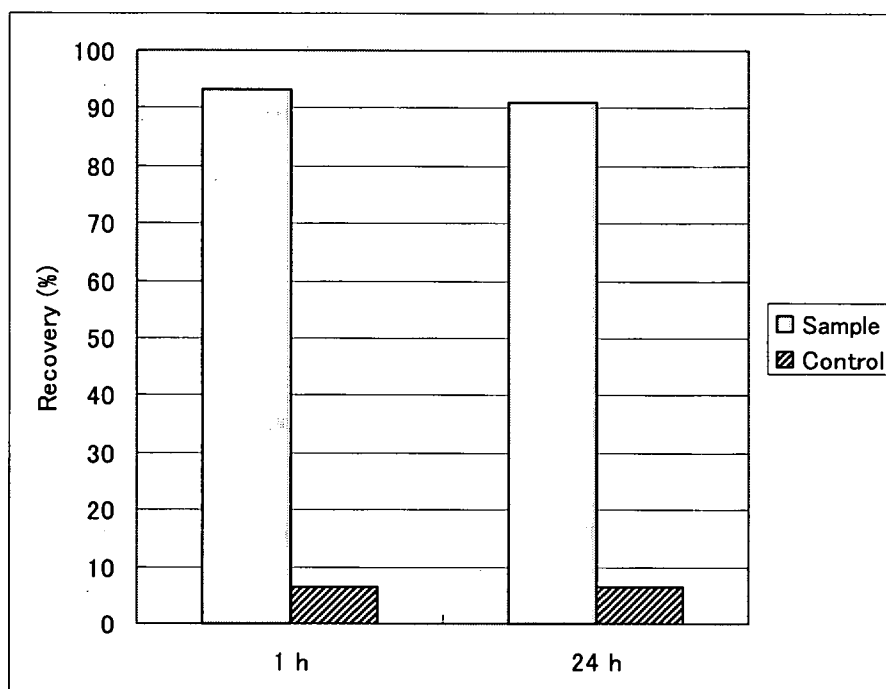


Fig. 6-02 Chelex100 とのインキュベーションの条件の検討

^{153}Gd と DTPA-D1-Glc(OH) のインキュベーションは 1 時間に固定した。濾液に回収された放射能に差が認められないため、Chelex100 とのインキュベーションは 1 時間とした。

6-2 HPLC による ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH) と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分析

作成した ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH) が MRI 造影剤の非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と同一のものであるか、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて確認した。用いたカラムはガードカラムをつけたゲル濾過用カラム TSK-GEL G3000SW_{XL} (TOSOH, Tokyo, Japan) である。溶出液は 0.05% アジ化ナトリウム添加 0.01M リン酸緩衝液 pH7.4、溶出速度は 1ml/min とした。試料の添加量は 10 μL とし、280nm の吸光度と放射能をモニタした。なお同一グラフ上で吸光度と放射能を表示するために、縦軸のスケールは相対値を表す。また試料は吸光度の検出器を通過約 0.5 分後に放射能の検出器を通過するので 0.5 分のずれを持ってグラフに表示される。

6-2-1 正常ラット血清の溶出プロファイル

タンパクの溶出時間を確認するために正常ラット血清 (CedarLane Laboratories, Ontario, Canada) をこの HPLC システムで分析した (Fig. 6-03)。最初のピークは分子量 90 万以上、3 番目のピークは IgG、4 番目のピークはアルブミンである。

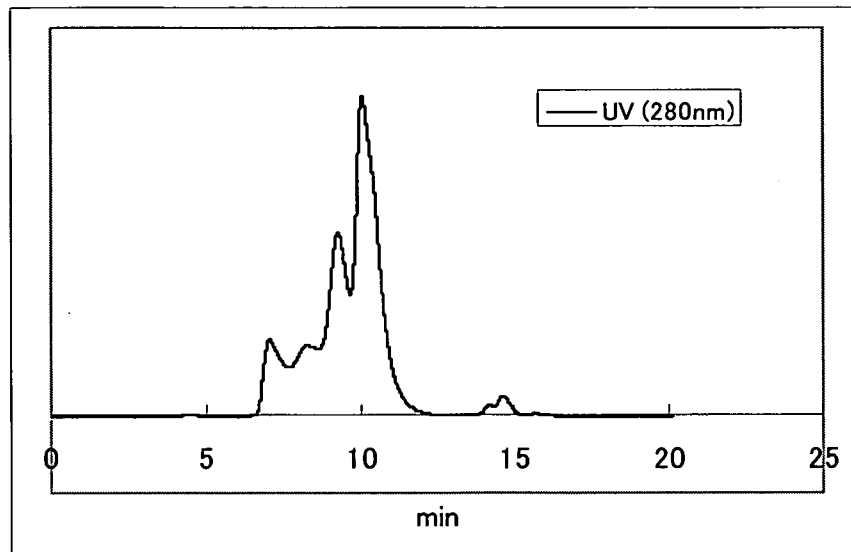


Fig. 6-03 正常ラット血清の溶出プロファイル

アルブミンの溶出時間は 10.05 分、15 分前に溶出される 2 つの小さなピークはそれぞれ 14.19 分、14.62 分であった。

6-2-2 非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

TSK3000SW_{XL} は本来タンパク質分析用のカラムなので低分子量の試料には向かないが、非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) をこのシステムで分析した (Fig. 6-04)。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は 280nm の吸収を有し、溶出時間が 12.83 分の単一のピークを示した。このピークはアルブミンの溶出時間より遅く、ラット血清で認められる 5 番目のピークより早い。

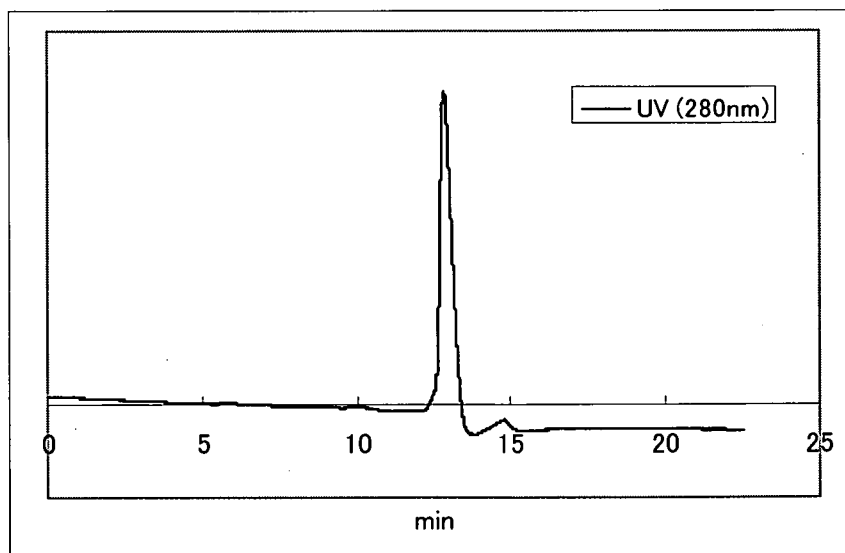


Fig. 6-04 非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の溶出プロファイル

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を 0.2M クエン酸緩衝液 pH5.4 に溶解し、¹⁵³Gd を添加するときと同様 0.1N 塩酸を加え、1N 水酸化ナトリウムで pH を 7 に調整した後、0.26mg/10 μ L をかけた。12.83 分に単一のピークを認める。