

### 6-2-3 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$

$^{153}\text{Gd}$  を DTPA-D1-Glc(OH) に配位させたものを HPLC で分析した (Fig. 6-05)。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  は吸光度では 12.81 分に単一のピークとして溶出され、非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の溶出時間に一致した。放射能は 13.32 分に単一のピークとして溶出され、放射化学的に不純物が含まれていないことが確認された。吸光度のピークと放射能のピークの位置がずれているが、試料が吸光度と放射能のそれぞれの検出器を通過する時間のずれに起因する。

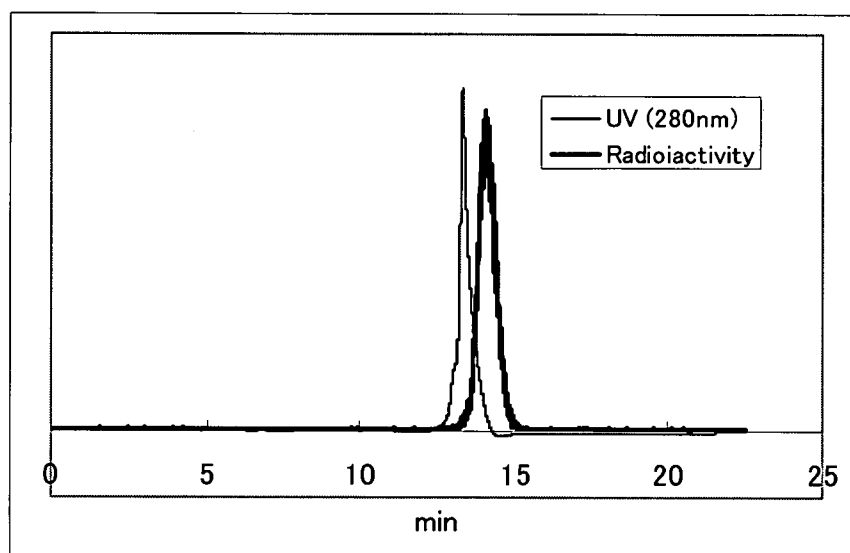
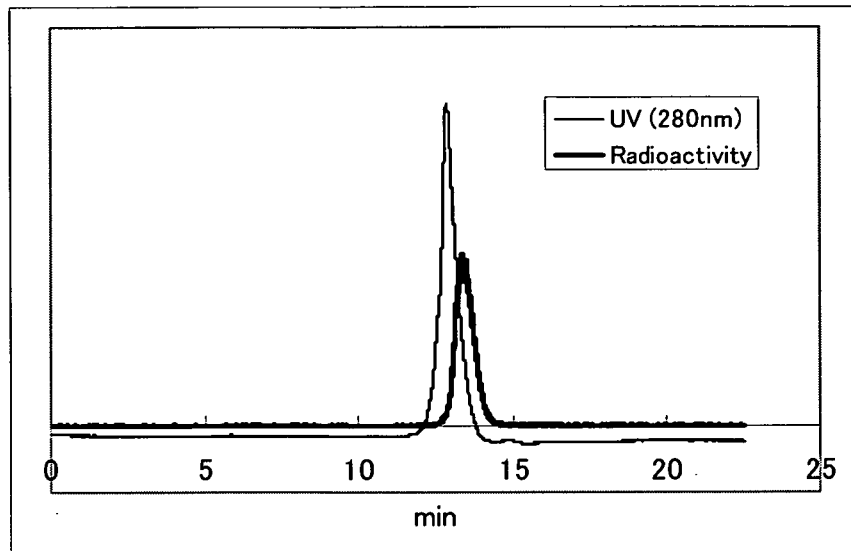


Fig. 6-05  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  の溶出プロファイル

63.5kBq/0.21mg/10 $\mu\text{L}$  をかけた。12.81 分に吸光度のピーク、13.32 分に放射能のピークを認める。

### 6-2-4 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の混合物

さらに  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を混ぜて、HPLC で分析した (Fig. 6-06)。吸光度のピークは完全に単一であり、放射能もすべてこのピークに一致した。



**Fig. 6-06  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  と非放射性  $\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  の混合物の溶出プロファイル**

6-2-2 と 6-2-3 の試料を等量混和した。吸光度のピークは 12.85 分、放射能のピークは 13.37 分に溶出された。

### 6-3 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血中での挙動のインビトロ解析

$\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  はラットに静脈内投与された場合、長時間血管の MRI 信号強度を変化させ続ける。血管の信号強度を長時間変化させる原因を明らかにするために、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  の血清中での挙動をインビトロで検討した。

#### 6-3-1 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と血清とのインキュベーション

ラット血清 1mL に  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  を 624kBq/10.5mg/100 $\mu\text{L}$  を加え、37°C でインキュベートし、1 時間後、24 時間後に HPLC で分析した。

1 時間後の試料の放射能は 13.43 分に単一ピークとして溶出され、インキュベートする前の試料と一致した (Fig. 6-07)。すなわち  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  はラット血清中で凝集したり、血清中の高分子物質と結合したり、分解されたりしていないと考えられた。24 時間後においても放射能は 13.49 分に単一ピークとして溶出され、血清とインキュベートする前の  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  と変化がなかった。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  は安定性の高い物質であることが示唆された (Fig. 6-08)。

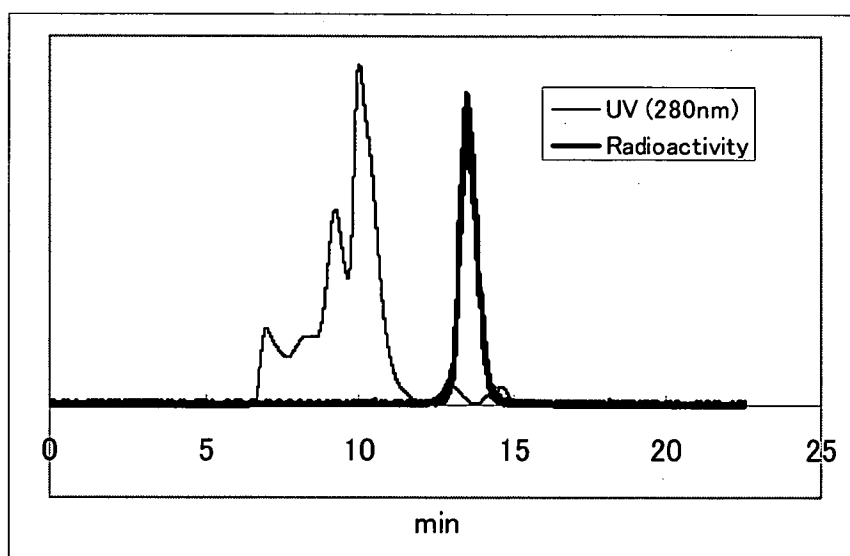


Fig. 6-07  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ をラット血清と1時間インキュベートした後の溶出プロファイル

放射能のピークは血清とインキュベートする前の試料 (Fig. 6-05) と変化がない。

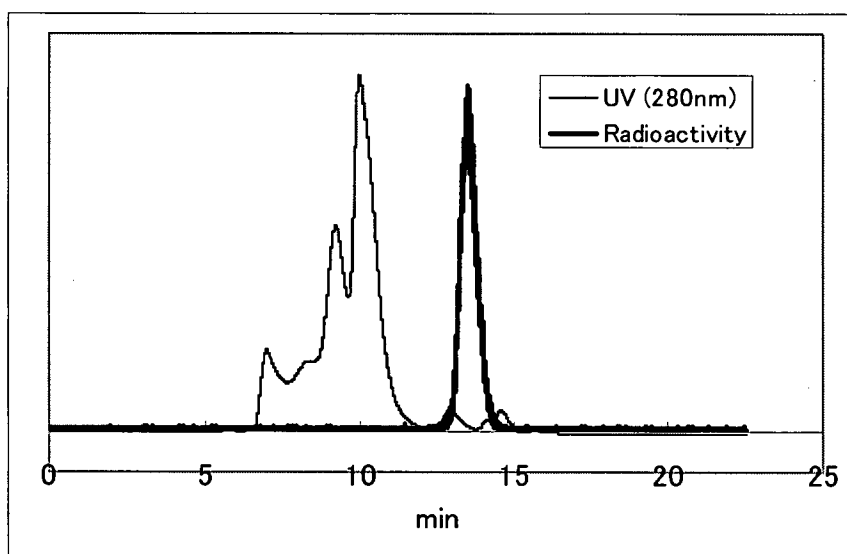


Fig. 6-08  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ をラット血清と24時間インキュベートした後の溶出プロファイル

### 6-3-2 $^{153}\text{Gd}$ と血清とのインキュベーション

試料中に  $^{153}\text{Gd}$  が混入していた場合、すなわち  $^{153}\text{Gd}$  の標識率が 100% でなかった場合、 $^{153}\text{Gd}$  が HPLC でどのように溶出されるか、検討した。 $^{153}\text{GdCl}_3$  を血清と 1 時間インキュベートしたところ、放射能は分子量 90 万以上のところに単一のピークとして溶出された (Fig. 6-09)。pH が中性の環境下で  $^{153}\text{Gd}$  が加水分解して水和物を形成したと想像される。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  をラット血清とインキュベートした後の試料ではこのような大分子を観察していないので、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  の試料中に  $^{153}\text{Gd}$  の残存がないことが支持された。

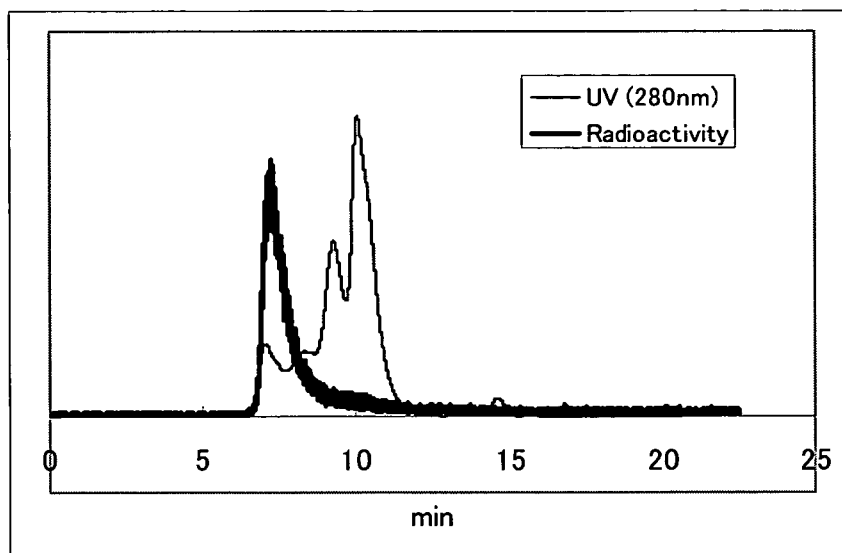


Fig. 6-09  $^{153}\text{GdCl}_3$ をラット血清とインキュベートした後の溶出プロファイル  
ラット血清 1mL に  $^{153}\text{GdCl}_3$  を 761.63kBq/ $\mu\text{L}$  を加え、37°C で 1 時間インキュベート後、HPLC で分析した。

#### 6-4 考察

DTPA-D1-Glc(OH) に  $^{153}\text{Gd}$  を配位させる条件として、酸性で行わないと  $^{153}\text{Gd}$  が加水分解するので、pH は 5.4 で行った。実際  $^{153}\text{Gd}$  は血清とインキュベートすると分子量 90 万以上の大分子となった。DTPA-D1-Glc(OH) に  $^{153}\text{Gd}$  を加えた後、Chelex100 とインキュベートすると 90% 以上の放射能が濾液に回収されたこと、HPLC で DTPA-D1-Glc(OH) に一致するところに放射能の単一ピークが得られたこと、血清とのインキュベーションで  $^{153}\text{Gd}$  の場合に見られるような大分子の生成が見られなかったこと、などにより、 $^{153}\text{Gd}$  は完全に DTPA-D1-Glc(OH) に配位されたと考えられる。

Chelex100 による  $^{153}\text{Gd}$  の吸着に関しては条件の設定が難しく、今回の実験では  $^{153}\text{Gd}$  と Chelex100 を 12 時間、激しく振盪させたが、5.8% から 6.4% の  $^{153}\text{Gd}$  が Chelex100 に吸着されなかった。MRI 造影剤の非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の精製において Gd を除去するために Chelex100 が用いられている。生成物に関して Gd の混入がないか、注意が必要と考えられた。

HPLC のカラムはタンパク分析用のカラムであるが、 $^{153}\text{Gd}$ -DTPA-D1-Glc(OH) と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は吸光度のピークが一致し、吸光度と放射能のピークも一致した。 $^{153}\text{Gd}$ -DTPA-D1-Glc(OH) は MRI 造影剤として検討されている Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と同一のものと考えられた。

$^{153}\text{Gd}$ -DTPA-D1-Glc(OH) と血清のインキュベーションにおいて、血清 1mL に対し  $^{153}\text{Gd}$ -DTPA-D1-Glc(OH) は 0.82 $\mu\text{mol}$  を添加したことになる。MRI 造影剤のラットでの実験では非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は 0.05mmol/kg 投与されている。ラットの血液量を 60ml/kg、ヘマトクリットを 50% とすると血清 1ml あたり 1.7 $\mu\text{mol}$  投与されていることになる。インビトロとインビボの実験において血清内の Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の濃度に大きな違いはないと言える。

## 6-5 まとめ

DTPA-D1-Glc(OH)に  $^{153}\text{Gd}$  を配位することにより  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  を作成した。 $^{153}\text{Gd}$  は 100%配位され、精製は不要であった。得られた  $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  は MRI 造影剤として検討中の非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と同一と考えられた。

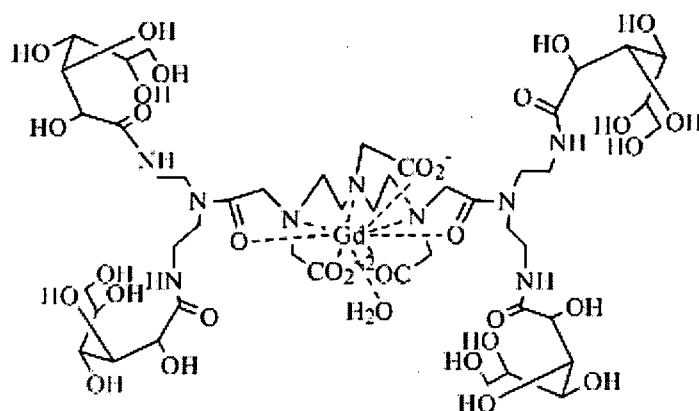
$^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$  はインビトロの検討では少なくとも 24 時間は血清中で凝集したり、血清中の高分子物質と結合したり、分解されたりしないと考えられた。

## 7. 安全性評価

安全性評価をサンプルAおよびサンプルBについて、財団法人日本食品分析センター 一千歳研究所 安全評価試験課に依頼して行った。

サンプルAは「小川サンプル」で、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)である。また、サンプルBは「青島サンプル」でGd-DTPA-DETA-AS2-3Glc(OH, OAc)誘導体である。

### 7-1 サンプルA



#### 7-1-1 安全性試験方法結果

##### (1) 急性経口毒性試験

サンプルAを検体として、雄ラットを用いた単回投与毒性試験(限度試験)を行った。

検体投与群には、2000 mg/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として生理食塩液を雄ラット各5匹に単回静脈内投与し、14日間観察を行った。その結果、観察期間中に異常及び死亡例は認められなかった。したがって、検体の雄ラットにおける単回静脈内投与によるLD50値は、2000 mg/kg以上であると考えられた。

##### (2) 反復投与毒性試験

サンプルAを検体として、雄ラットを用いた反復投与毒性試験を行った。

検体投与群には、1又は0.2 mmol/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として生理食塩液を各群5匹の雄ラットに7日間連続で静脈内投与した。その結果、いずれの群においても観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、平均赤血球容積(MCV)、平均赤血球ヘモグロビン量(MCH)、総タンパク質(TP)及びアルブミン(ALB)が用量依存的に低下した。また、血小板数(PLT)は用量依存的に増加した。その他の項目では統計学的な差は認められなかった。この変化が検体投与に起因するか否かを特定するこ

とは、本試験条件のみでは困難であった。

### (3) 抗原性試験

サンプルAを検体として、系雄モルモットを用いた抗原性試験を行った。

1群4匹として2群を設定し、それぞれ試験群及び陽性対照群(馬血清感作群)とした。第1日目、第3日目及び第5日目に、試験群では試験液(0.25 mmol/mL)を2 mLずつ、陽性対照群には馬血清を0.10 mLずつ腹腔内注射した。各群それぞれ、第15日目に2匹、第22日目に残りの2匹の動物に惹起処置を行った。すなわち、試験群では試験液を0.4 mLずつ、また、陽性対照群では馬血清0.20 mLをそれぞれ静脈内注射した。注射後30分間及び24時間の観察において、試験群で呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例(4匹)でこれらの症状を示し、なおかつ3匹以上が死亡したとき、検体は本試験において陰性であるものとした。

その結果、試験群においては、第15日目及び第22日目の惹起後の観察において、いずれの試験動物にも異常は認められず、陽性対照群においては、第15日目及び第22日目の惹起後の観察において、全例が呼吸困難及び虚脱を示し、4例中3例が惹起後30分以内に死亡した。

以上のように、惹起後30分間及び24時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4例中3例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。

### (4) 変異原性試験

サンプルAの突然変異誘起性を調べる目的で労働省告示第77号(昭和63年9月1日)に準じ試験を実施した。

検体について、*Escherichia coli* WP2uvrA及び*Salmonella typhimurium* TA系4菌株を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を9.77~5,000  $\mu$ g/プレートの用量で行ったところ、いずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。

## 7-2 サンプルB

分子式  $C_{40}H_{72}GdNgO_{26}^{50-}$

分子量 1252.39

### 7-2-1 安全性試験方法結果

#### (1) 急性経口毒性試験

サンプルBを検体として、雄ラットを用いた単回投与毒性試験(限度試験)を行った。

検体投与群には、2000 mg/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として生理食塩液を雄ラット各5匹に単回静脈内投与し、14日間観察を行った。その結果、検体投与群では投与後30分以内に一般状態の悪化が認められたがその後回復し、観察期間中に死亡例は認められなかった。

したがって、検体の雄ラットにおける単回静脈内投与によるLD50値は、2000 mg/kg以上であると考えられた。

#### (2) 反復投与毒性試験

サンプルBを検体として、雄ラットを用いた反復投与毒性試験を行った。

検体投与群には、1.2又は0.24 mmol/kgの用量の検体を、対照群には溶媒対照として生理食塩液を各群5匹の雄ラットに7日間連続で静脈内投与した。その結果、いずれの群においても観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。

血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、網赤血球数(RET)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)及び乳酸脱水素酵素(LDH)が用量依存的に増加した。その他の項目では統計学的な差は認められなかった。この変化が検体投与に起因するか否かを特定することは、本試験条件のみでは困難であった。

#### (3) 抗原性試験

サンプルBを検体として、系雄モルモットを用いた抗原性試験を行った。

1群4匹として2群を設定し、それぞれ試験群及び陽性対照群(馬血清感作群)とした。第1日目、第3日目及び第5日目に、試験群では試験液(0.25 mmol/mL)を2 mLずつ、陽性対照群には馬血清を0.10 mLずつ腹腔内注射した。各群それぞれ、第15日目に2匹、第22日目に残りの2匹の動物に惹起処置を行った。すなわち、試験群では試験液を0.4 mLずつ、また、陽性対照群では馬血清0.20 mLをそれぞれ静脈内注射した。注射後30分間及び24時間の観察において、試験群で呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例(4匹)でこれらの症状を示し、なおかつ3匹以上が死亡したとき、検体は本試験において陰性であるものとした。

その結果、試験群においては、第15日目及び第22日目の惹起後の観察において、いずれの試験動物にも異常は認められず、陽性対照群においては、第15日目



及び第 22 日目の惹起後の観察において、全例が呼吸困難及び虚脱を示し、4 例中 3 例が惹起後 30 分以内に死亡した。

以上のように、惹起後 30 分間及び 24 時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4 例中 3 例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。

#### (4) 変異原性試験

サンプル B の突然変異誘起性を調べる目的で労働省告示第 77 号(昭和 63 年 9 月 1 日)に準じ試験を実施した。

検体について、*Escherichia coli* WP2uvrA 及び *Salmonella typhimurium* TA 系 4 菌株を用いて代謝活性化を含む復帰突然変異試験を 313~5,000  $\mu$ g/プレートの用量で行ったところ、いずれの場合においても復帰変異コロニー数の増加は認められなかった。以上のことから、本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。

## 8. 造影剤の市場及び製品化

本研究に取り組む静岡大学工学部、浜松医科大学が存立する静岡県においては、現在、平成22年度の県の将来像を基本目標とした総合計画の下に、環境、安心、安全、産業、交流などの日常生活に関わる様々な場面での「県民暮らし満足度日本一」を目指した施策が展開されている。

この中で、医療や健康など人の身体に直結する満足度ファクタを高度技術で充実させ、それに関わる新産業の創出や産業振興をはかる「静岡トライアングルリサーチクラスター形成事業」が平成19年度から開始された。この中には、東部地域の富士山麓先端健康産業集積プロジェクト（ファルマバレー）、中部地域の食品・医薬品・化成品産業集積プロジェクト（フーズ・サイエンスヒルズ）、西部地域の光・電子技術関連産業集積プロジェクト（フォトンバレー）の3つのプロジェクトを連携強化して、研究開発と成果の事業化を推進させ、県民生活の満足度とともに、各地域の産業、経済への波及効果の高揚を目標としている（Fig. 8-01）。

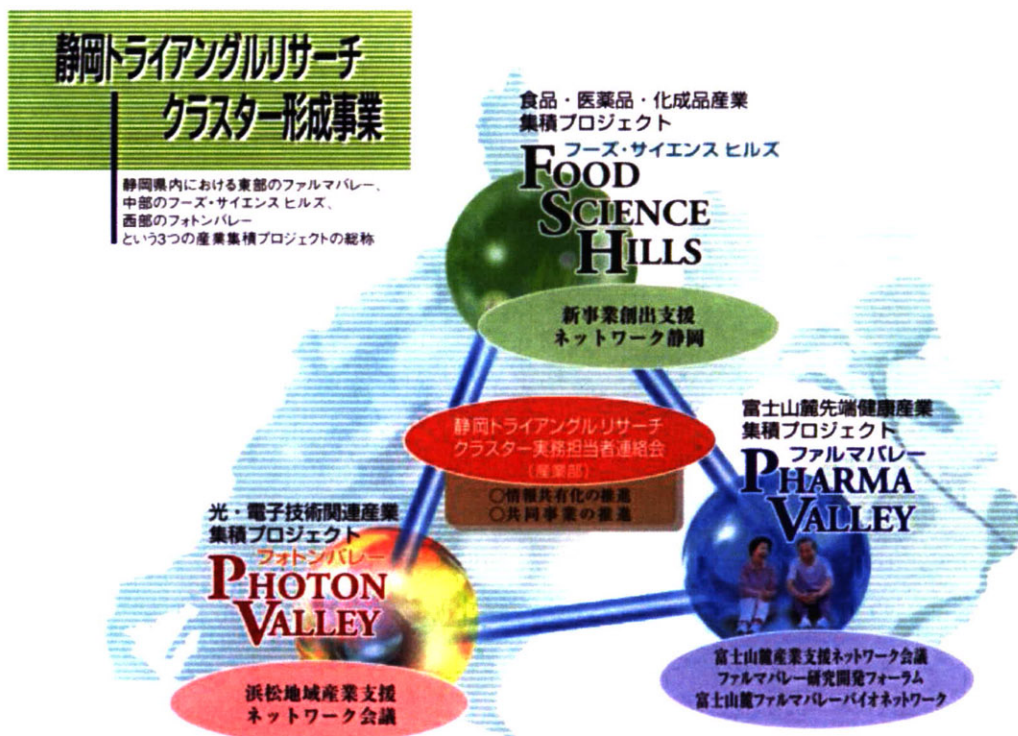


Fig. 8-01. 静岡トライアングルリサーチクラスターのネットワーク<sup>1)</sup>

厚生労働省が発表する薬事工業生産動態統計<sup>2)</sup>によると、国内の医薬品、医療機器の生産金額において静岡県は比較的上位に位置する規模を占めており、県内の主要産業となっている。

**Table 8-01 医薬品・医療機器の全国生産金額における  
都道府県別構成比(%)の年次推移(上位10位の都道府県)**

[ 医薬品 ]

	平成12年	平成13年	平成14年	平成15年	平成16年	平成17年
1	大阪 (13.95)	大阪 (13.37)	大阪 (13.66)	大阪 (12.94)	大阪 (12.99)	大阪 (12.69)
2	静岡 (11.28)	静岡 (11.17)	埼玉 (11.21)	静岡 (11.22)	静岡 (10.76)	静岡 (10.54)
3	埼玉 (9.89)	埼玉 (10.86)	静岡 (10.89)	埼玉 (10.86)	埼玉 (10.39)	埼玉 (9.22)
4	神奈川 (6.70)	神奈川 (5.79)	神奈川 (6.25)	神奈川 (6.33)	神奈川 (5.91)	栃木 (6.09)
5	栃木 (5.33)	兵庫 (5.00)	兵庫 (5.47)	栃木 (5.56)	栃木 (5.76)	神奈川 (5.32)
6	兵庫 (5.31)	栃木 (4.95)	栃木 (5.47)	兵庫 (4.99)	兵庫 (5.09)	愛知 (5.05)
7	愛知 (4.40)	愛知 (4.62)	愛知 (4.72)	愛知 (4.78)	愛知 (4.55)	兵庫 (4.59)
8	富山 (3.70)	山口 (3.27)	茨城 (3.55)	富山 (3.77)	富山 (3.91)	富山 (4.13)
9	滋賀 (3.26)	富山 (3.24)	富山 (3.50)	山口 (3.65)	山口 (3.57)	山口 (3.50)
10	茨城 (3.20)	茨城 (3.05)	山口 (3.49)	茨城 (3.19)	滋賀 (3.30)	徳島 (3.38)

[ 医療機器 ]

	平成12年	平成13年	平成14年	平成15年	平成16年	平成17年
1	栃木 (10.67)	東京 (11.41)	栃木 (10.67)	栃木 (12.19)	栃木 (10.93)	栃木 (13.19)
2	東京 (10.45)	栃木 (11.20)	静岡 (9.53)	東京 (10.36)	東京 (9.75)	静岡 (9.84)
3	静岡 (10.35)	静岡 (10.22)	東京 (8.86)	静岡 (8.70)	静岡 (9.40)	東京 (9.72)
4	大分 (6.83)	大分 (7.46)	大分 (7.72)	大分 (7.45)	大分 (7.49)	大分 (6.59)
5	千葉 (6.68)	千葉 (6.53)	千葉 (6.44)	千葉 (6.30)	千葉 (6.28)	千葉 (5.89)
6	埼玉 (5.42)	埼玉 (5.67)	埼玉 (5.71)	埼玉 (5.41)	埼玉 (5.51)	埼玉 (5.30)
7	愛知 (4.31)	福島 (3.90)	兵庫 (4.45)	滋賀 (4.52)	山梨 (4.85)	滋賀 (4.63)
8	兵庫 (3.94)	愛知 (3.74)	滋賀 (4.44)	山梨 (4.48)	滋賀 (4.58)	福島 (3.88)
9	福島 (3.78)	滋賀 (3.72)	茨城 (4.04)	福島 (3.91)	福島 (3.94)	茨城 (3.76)
10	滋賀 (3.61)	山梨 (3.31)	愛知 (3.89)	茨城 (3.47)	茨城 (3.58)	山梨 (3.61)

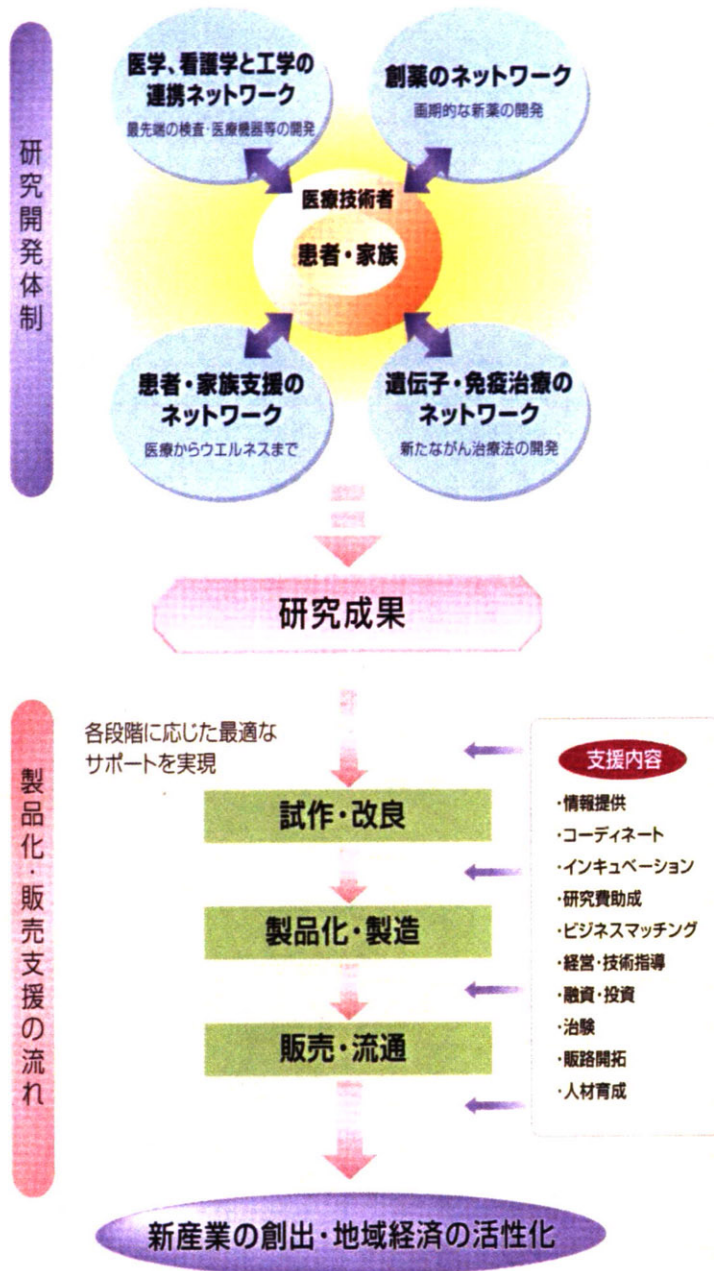
※ 厚生労働省(医政局経済課調査統計室)の薬事工業生産動態統計年報など

富士山麓先端健康産業集積プロジェクトでは、日本人の死因率の高い「がん」の治療、看護を主とする研究開発が、患者、家族の支援を中心に、医学・看護・工学の連携ネットワーク、創薬ネットワーク、治療技術開発ネットワークなどの連携ネットワークによって取組まれ、先進医療技術と健康産業の集積を目指している。すでに、平成14年3月には「静岡がんセンター」および「静岡がんセンター研究所」が開設され(長泉町)、医療、看護支援が先行する。

同プロジェクトによる研究開発体制のネットワークと、その研究成果を具現化する製品化、販売支援など、新産業創出や産業の活性化に直結するフローが動き出している(Fig. 8-02)。

## ●ベッドサイドクラスターの形成

研究テーマに応じたさまざまなネットワークで  
研究・開発を推進



医薬品の研究開発費の対売上げ比率は、約11%で他の製造業に比べて格段に高い。診療薬価の引き下げやジェネリック薬品の促進の動きさらに、抗体医薬など新規の治療技術のための開発などのために、海外企業も含めた企業合併や統合、買収など最近の医薬品産業の経営環境変化は大きい。

本研究は、MRI診断用の新規造影剤の開発を目指すものであるが、MRI診断法<sup>3)</sup>は、コントラスト分解能が高い、任意多方向の断層像が得られる、血管が抽出できる、放射線被爆がないなどの長所を有する一方、撮像時間が長い、装置や維持費が高い、組織特性の診断能が十分でないなどの課題が残っている。本研究のGd-DTPAは、分子設計によって特定臓器への集積性（ターゲティング）が制御でき、鮮明な画像化が期待できる。ただ、商品化には、製造工程が多段階の化学反応の繰り返しであるため、コストの低減が次の課題となる。

日本人の死因率でトップを続ける「がん」の診断用造影剤として実用化され、早期発見、早期治療の促進や臨床治療への応用の波及も期待される。

Fig. 8-02 富士山麓先端健康産業集積プロジェクトにおける開発支援システム

参考資料：

- 1) 静岡県：静岡トライアングルリサーチクラスター形成事業：平成19年10月
- 2) 厚生労働省：薬事工業生産動態統計年報（厚生労働省医政局）平成17年ほか
- 3) 高橋睦正：全身のMRI；南江堂（1993）

## 9. 結語

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 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (小川サンプル) の誘導体と推測され、Gd-DTPA-DETA-AS2-3Glc(OH, OAC) 誘導体あるいは Gd-DTPA-DETA-D2-nGlc(OH) と推定される。この Gd-DTPA 錯体は、今までに調製された Gd-DTPA-糖構造のデンドリマー型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。安全性評価試験 (サンプル B) では特に問題はなく (下記 (5) 項目参照)、当該研究の現段階ではベストの造影剤である。しかし、今後は、血管貯留性を短めに調整する問題点と構造決定、合成方法の確立、別途合成の検討、構造-活性相関、生体内分子との相互作用とその作用機序の解明、等の諸問題を解決する必要がある。
- (2) 「小川サンプル」は、糖あるいはリンカー部に反応位置選択性を与えるための保護基の導入反応及び反応性に戻すための脱保護反応を経由しない簡便かつ効率的な合成方法を設計して、プロセス改良により Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) (小川サンプル) の調製に成功した。当該研究の安全性試験では、サンプル A と表記され、当該研究に於ける表記方法によれば、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) と略式される。また、Glc 以外の糖に於いてもこの合成方法が応用可能である。  
このサンプルは、合成プロセスにおいて保護・脱保護なしに、短経路により高収率で化学合成され得ると言う利点に加えて、最終生成物の精製も容易且つ、高純度で Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) で表記される MRI 造影剤が調製可能であると言うメリットも備えている。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」との比較においてそれには及ばなかったが、ラットを用いた *in vivo* 評価に於いてかなり鮮明な MRI 画像を描出した。また、この造影剤の緩和率 ( $r_1$ ) は  $10.0 [S^{-1} \cdot M^{-1}]$  でサンプルの略記は Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) である。
- (3) 「青島サンプル」の非常に長い体内貯留性を改良するため、更に構造と活性相関を解明する必要があった (上記 (1) に記載)。そのために、様々な方法により構造の Modification を行い、様々な 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、現段階では、特許等の関係で本報告書では記述できない部分があるが、当該開発研究の目指す MRI 造影剤の構造-活性相関に関する未知のデータであり、平成 20 年度以降の研究を推進する上において、非常に有効な情報であると言える。
- (4) 平成 19 年度までの開発研究によって、例えば、Gd-DTPA-EDA-AS1-1Glc(OH) (尾崎サンプル) は、がん化ラットの 1 mm 程度の小さな肝細胞がんを描出した。また、青島サンプルは、その低濃度の Gd-DTPA 誘導体錯体により、肝細胞がんを極々鮮明に描出した。また、その剖検サンプルと MRI 画像は見事な一致をみた。

## (5) 安全性試験

### (5-1) サンプルAの評価

平成 19 年度に調製されたサンプルAは、①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。試験結果の報告書によれば、検体の雄ラットにおける単回静脈内投与による LD50 値は、2000 mg/kg 以上であると報告された。また、②反復投与毒性試験結果より、「観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。」と報告された。③抗原性試験の結果では、「惹起後 30 分間及び 24 時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4 例中 3 例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。」と報告された。④変異原性試験結果では、「本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。」と報告された。

### (5-2) サンプルBの評価

安全性試験の為に平成 19 年度に調製された複製版のサンプルBは、①単回投与による急性毒性試験では、検体投与群においては投与後 30 分以内に一般状態の悪化が認められたがその後回復し、観察期間中に死亡例は認められなかった。それ故、特に問題のある急性毒性を示さず、安全な MRI 造影剤であることが示された。試験結果の報告書によれば、「検体の雄ラットにおける単回静脈内投与による LD50 値は、2000 mg/kg 以上であると考えられた。」と報告された。また、②反復投与毒性試験結果では、「観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。」と報告された。また、「血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、網赤血球数(RET)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)及び乳酸脱水素酵素(LDH)が用量依存的に増加した。その他の項目では統計学的な差は認められなかった。この変化が検体投与に起因するか否かを特定することは、本試験条件のみでは困難であった。」という結果であった。③抗原性試験の結果では、「惹起後 30 分間及び 24 時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4 例中 3 例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。」と報告された。④変異原性試験結果では、「本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。」と報告された。

### (5-3) 安全性評価のまとめ

サンプルAでは、特記すべき毒性は報告されなかった。また、サンプルBに於いては、サンプルAと比較すると、投与により因子に若干の変化が見られたが、特記すべき毒性とは報告されなかった。

## データ集1 特許

- ① 発明の名称 「ガドリニウム化合物及びMRI造影剤」  
発明者 三浦紀生、山下光司、尾崎伸久、阪原晴海、竹原康雄、  
藤江三千男  
出願人 コニカミノルタホールディング株式会社、国立大学法人静岡大学  
国立大学法人浜松医科大学  
出願番号 2008-038115  
出願日 平成20年2月20日
- ② 発明の名称 「ガドリニウム錯体の製造方法」  
発明者 三浦紀生、山下光司、小川圭介、阪原晴海、竹原康雄、  
藤江三千男  
出願人 コニカミノルタホールディング株式会社、国立大学法人静岡大学  
国立大学法人浜松医科大学  
出願番号 2008-038116  
出願日 平成20年2月20日
- ③ 発明の名称 国際出願「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」  
発明者 山下光司、高橋雅樹、阪原晴海、竹原康雄、於剛、加藤辰徳、上陰那央、  
押川達夫、青島堅吾  
出願人 国立大学法人静岡大学、国立大学法人浜松医科大学  
国際出願番号 PCT/JP2006/304409  
国際出願日 平成18年3月7日  
国際公開番号 WO 2006/095745 A1  
国際公開日 平成18年9月14日
- ④ 発明の名称 「富血性腫瘍特異性造影剤」  
発明者 山下光司、高橋雅樹、阪原晴海、竹原康雄、押川達夫、青島堅吾  
出願人 国立大学法人静岡大学、国立大学法人浜松医科大学  
出願番号 特願 2005-062340  
出願日 平成17年3月7日

- ⑤ 発明の名称 「新規な dendrimer および造影剤」  
発明者 山下光司, 高橋雅樹, 阪原晴海, 竹原康雄, 押川達夫, 青島堅吾  
出願人 財団法人 浜松科学技術研究振興会  
出願番号 特願 2003-99222  
出願日 平成 15 年 4 月 2 日  
公開番号 特開 2004-307356  
公開日 平成 16 年 11 月 4 日



データ集2 学会、発表(静岡大学 関連のみ)

	学会名	日付・場所	発表者
1	EuroCarb	2007/9/2・ドイツ	小川 圭介 山下 光司
2	Inter-Academia Conference	2007/9/26-28・浜松	山下 光司 尾崎 伸久
3	4th International Conference on Tumor Progression	2007/10/4-5 ・アメリカ	山下 光司
4	第37回複素環化学討論会	2007/10/17-19・長野	山下 光司
5	第38回 中部化学関係学協会支部連合秋季大会	2007/11/11・三重	山下 光司
6	ナノバイオテクノロジー連携群の 成果報告会	2007/12/5・東京	山下 光司
7	C-P 化合物研究会	2007/12/8・京都	山下 光司
8	第34回有機典型元素化学討論会	2007/12/14-15・大阪	山下 光司
9	ナノメディシン研究推進事業発表会	2008/2/27・東京	山下 光司

## 2-1 EuroCarb

### (1) HIGHLY STEREOSELECTIVE AND STEREOSPECIFIC EPOXIDATION OF 2-PHOSPHOLENES TO PREPARE BIOACTIVE PHOSPHA SUGARS AND THEIR *N*-GLYCOSIDES

Mitsuji Yamashita,<sup>1\*</sup> Taishi Niimi,<sup>1</sup> Michio Fujie,<sup>1,2</sup> Valluru Krishna Reddy,<sup>1</sup> Hirono Totsuka,<sup>1</sup> Buchammagari Haritha,<sup>1</sup> Maddali Kasthuraiah Reddy,<sup>1</sup> Junko Yamashita,<sup>1</sup> Satoki Nakamura,<sup>2</sup> Kazuhide Asai,<sup>1</sup> Takuya Suyama,<sup>1</sup> and Tatsuo Oshikawa<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Nano Materials, Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan

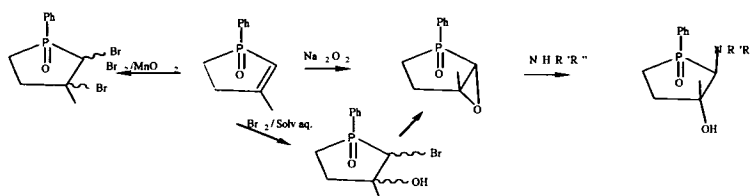
<sup>3</sup> Department of Materials Chemistry and Biochemistry, Numazu College of Technology, Numazu 410-8501, Japan

*tcmmyama@ipc.shizuoka.ac.jp*

Phospha sugar derivatives are one of the pseudo sugar analogues having a phosphorus atom in the sugar ring structure when they are represented by Haworth equation. Normal sugars have an oxygen atom in the hemiacetal ring. The popular pseudo sugars have a carbon, nitrogen, or sulphur atom in the hemiacetal ring, and many of them are naturally occurring and are called as *carba*, *aza*, or *thia* sugars. These popular pseudo sugars are well investigated and many of them are known to be biologically active materials. On the other hand, phospha sugars are not yet found in the nature and the synthesis and characterization of them are not so well studied. Especially biologically active and medicinally useful phospha sugars are not yet found and developed.

Previous methodologies for the preparation of phospha sugars used entirely sugar starting materials, however, we are challenging to develop novel synthetic routes from phosphorus heterocyclic compounds, mainly, 2- or 3-phospholene derivatives. Here we will report a new reaction to prepare 2,3-epoxyphospholanes, which correspond to anhydrophospha sugars, by stereoselective and stereospecific epoxidation of 2-phospholenes with sodium peroxide [1,2] and the reaction of the epoxides with nucleophiles such as amines for the preparation of *N*-glycosides of phospha sugar derivatives as well as their halides, which correspond to dehydrohalo phospha sugars. Treatment of 1-phenyl-2-phospholene 1-oxide with sodium peroxide gave *erythro* 2,3-epoxy-1-phenylphospholane 1-oxide in highly stereoselective and stereospecific manner. The epoxide was then converted into *N*-glycosides of phospha sugar derivatives. Dibromo derivatives were prepared from 2-phospholenes (Scheme 1).

Some of phospha sugars and phospholanes prepared were subjected to bioassay (MTT method) to show very important characters for medicines.



Scheme 1

- [1] Yamashita, M.; Valluru, K. Reddy; Lakonda, N. Rao; Buchammagari, H.; Maeda, M.; Suzuki, K.; Totsuka, H.; Takahashi, M.; Oshikawa, T. *Tetrahedron Lett.* **2003**, 44, 2339-2341.
- [2] Totsuka, H.; Maeda, M.; Valluru, K. Reddy; Takahashi, M.; Yamashita, M. *Heterocyclic Commun.* **2004**, 10, 295-300.

## (2) STUDIES ON NOVEL MRI CONTRAST AGENTS FOR SPECIFIC ORGANS, BLOOD VESSELS, AND TUMORS

Keisuke Ogawa<sup>1</sup>, Nobuhisa Ozaki<sup>1</sup>, Michio Fujie<sup>12</sup>, Mitsuji Yamashita<sup>1,\*</sup>, Gang Yu<sup>1</sup>, Kengo Aoshima<sup>1</sup>, Masatsugu Kobayashi<sup>1</sup>, Tatsunori Kato<sup>1</sup>, Nao Kamikage<sup>1</sup>, Takashi Aoki<sup>1</sup>, Hisao Takayanagi<sup>3</sup>, Tatsuo Oshikawa<sup>4</sup>, Yasuo Takehara<sup>2</sup>, Harumi Sakahara<sup>2</sup>, Sofie Laurent<sup>5</sup>, Carmen Burtea<sup>5</sup>, L. Vander Elst<sup>5</sup>, Robert N. Muller<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Science and Engineering, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan

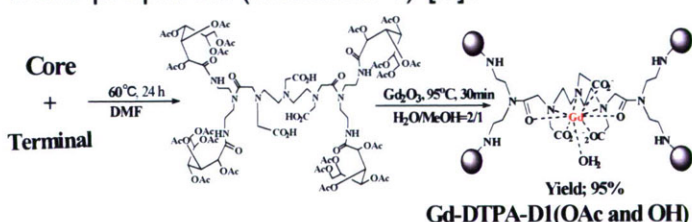
<sup>3</sup> Mitsubishi Pharma Corporation, Kamoshida, Aoba, Yokohama 227-0033, Japan

<sup>4</sup> Department of Materials Chemistry, Numazu College of Technology, Numazu 410-8501, Japan

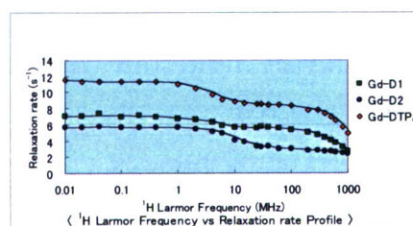
<sup>5</sup> NMR Laboratory, Department of Organic Chemistry, University of Mons-Hainaut, B-7000 Mons, Belgium

E-mail: [tcmyama@ipc.shizuoka.ac.jp](mailto:tcmyama@ipc.shizuoka.ac.jp)

Gd-DTPA derivatives are widely used for MRI contrast agent, however, the agent has poor potential for imaging specific organs, blood vessels, and tumors. To improve these properties, DTPA-Sugar dendritic derivatives with four sugars, as well as with twelve sugars, were prepared and their Gd complexes, dendrimers (**Gd-DTPA-D1-Glc(OAc and OH)** and **Gd-DTPA-D2-Glc(OAc)**), were prepared (Scheme 1) [1].



**Scheme 1.** Preparation of Gd-DTPA-D1(OAc and OH)

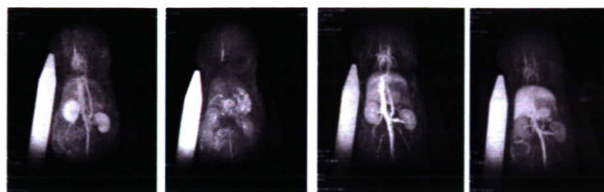


**Figure 1.**  $^1H$  Larmor frequency vs. relaxation rate

The image intensity in  $^1H$  NMR signal of water protons linked with Gd(III) is dependent on nuclear relaxation times [2]. The profiles of  $^1H$  Larmor frequency

vs. relaxation rate for Gd-DTPA, Gd-D1, and Gd-D2 were obtained and are shown in Figure 1.

The *in vivo* MR imaging of blood vessel by Gd-DTPA and **Gd-DTPA-D1-Glc(OH)** (Figure 2) clearly demonstrates that the newly developed **Gd-DTPA-D1-Glc(OH)** provides blood pool character and then MR angiography and tumor imaging property.



**Figure 2. MRI. imaging by Gd-DTPA(Left: 3 and 30 min) and Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (Right: 3 and 30 min)**

[1] M. Takahashi, Y. Hara, M. Yamashita, et.al., *Tetrahedron Lett.*, **41**, (2000) 8485-8488.

[2] H. Lammers, M. Frederic, R. N. Muller, et.al., *Inorg. Chem.*, **36** (1997) 2527-2538.

## **2-2 Inter-Academia Conferenc**

### **Synthesis and Evaluation of Novel Gd-DTPA-Sugar Compounds as MRI Contrast Agents**

Nobuhisa Ozaki<sup>1)</sup>, Mitsuji Yamashita<sup>2)</sup>, Gang Yu<sup>3)</sup>, Satoru Ito<sup>4)</sup>, Michio Fujie<sup>4)</sup>, Keisuke Ogawa<sup>4)</sup>, Takashi Aoki<sup>1)</sup>, Sayaka Mizuno<sup>5)</sup>, Masaki Sugiyama<sup>5)</sup>, Kengo Aoshima<sup>3)</sup>, Masatsugu Kobayashi<sup>3)</sup>, Nao Kamikage<sup>3)</sup>, Yasuo Takehara<sup>6)</sup>, and Harumi Sakahara<sup>6)</sup>

### **Abstract:**

MRI is the way to scan transverse sections through body. Gd-DTPA (DTPA: diethylenetriamine pentaacetic acid) is used extensively as MRI contrast agents. This contrast agent easily leaks out from vascular. In our laboratory novel MRI contrast agents were prepared to show clear MRI images, however, it takes longer time to be eliminated from body. Therefore, we designed molecular models and synthesized new MRI contrast agents with relatively lower molecular weight.

**Keywords:** MRI contrast agent, Dendrimer, Gd(III)-DTPA, MRA (Angiography), Tumor imaging

### **Introduction:**

Cancer is the worst among diseases which cause human to die. For improving QOL (Quality of Life) of patients development of medical sciences are steadily performing, nevertheless, the increment of number of persons being killed by cancer is remarkably increasing. To innovate in the medical therapy for cancer, research and development to prepare improved and/or highly