

平成20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デンドリマー型  
新規MRI造影剤の開発研究

(H19-ナノ一般-015)

総括研究報告書

肝細胞がん  
Gd-DTPA



DEN-OH

← :Tumor

研究代表者 山下 光 司  
平成21 (2009) 年3月

平成 20 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デンドリマー型  
新規MRI造影剤の開発研究

(H19-ナノ-一般-015)

総括研究報告書

研究代表者 山下 光 司  
平成 21 (2009) 年 3 月

# 目 次

## 総括研究報告書

山下 光司・・・ 1

## 研究代表者・研究分担者・研究協力者一覧 ガドリニウム錯体の略記およびその名前の対応表

### 1. 緒言

山下 光司・・・ 21

### 2. 創製

#### 2-1 Gd-DTPA を基本骨格とする新規 MRI 造影剤の合成および評価

青木 峻・杉山 雅紀・・・ 39

#### 2-2 糖デンドリマー・各種 Gd-DTPA デンドリマー合成

押川 達夫・・・ 90

#### 2-3 Synthesis of Gd-DTPA-HMTA-A-2Glc(OH) and Gd-DTPA-E

Bitragunta Siva Kumar・・・ 98

#### 2-4 Synthesis of New -Symmetric Gd-DTPA-Sugar Frame Work

Uma Ravi Shankar・・・ 117

#### 2-5 Synthesis of DTPA amido ester ligands

於 剛・・・ 133

#### 2-6 ガドリニウム錯体の製造

戸田三津夫・・・ 151

### 3. 合成物質の評価と候補物質の絞込み

#### 3-1 配位子および Gd 錯体の合成・評価・絞込み

山下 光司・・・ 157

#### 3-2 ガドリニウム錯体の蛍光分析

田中 康隆・・・ 166

### 4. *in vitro* 評価

#### 4-1 *in vitro* 評価 (1)

山下 光司・・・ 175

#### 4-2 *in vitro* 評価 (2)

竹原 康雄・・・ 180

#### 4-3 *in vivo* 評価 (3) の目的とその評価方法

三好 憲雄・・・ 199

5.	構造—活性化相関の解明	岡野 孝・・・221
6.	生体分子の認識	
6-1	新規非対称型及びロングブランチ型造影剤における生体分子認識	藤江三千男・・・245
6-2	放射性ガドリニウムによる生体分子認識	阪原 晴海・・・265
7.	MRI 製品の比較	
7-1	現在のMR 製品、造影剤の新動向、今回MRI の比較	竹原 康雄・・・283
7-2	他製品との比較評価	阪原 晴海・・・293
7-3	ペット、X線CT との本製品の比較評価	間賀田泰寛・・・300
8.	安全性評価	
8-1	安全性評価 <i>in vivo</i> 評価(1)	山下 光司・・・313
8-2	安全性評価 <i>in vitro</i> 評価(2)	木村 元彦・・・315
9.	社会のニーズ、医療技術の動向	本間 信行・・・323
10.	結語	山下 光司・・・335
	データ集	
	(1) 学会等での発表	山下 光司・・・341
	(2) 研究会	山下 光司・・・359
	(3) 研究者業績	山下 光司・・・386

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 dendリマー型新規MRI造影剤の開発研究

研究代表者 山下 光司 静岡大学創造科学技術大学院

研究要旨

がんは死因第1位の病気であり、医療技術の画期的なイノベーションが無ければ、今後も増加の一途を辿ることが予想されている最悪の病気である。「第3次対がん戦略10か年計画」では、「『研究』、『予防』及び『医療』を総合的に推進することにより、がんの罹患率と死亡率の激減を目指す」と謳っている。当該プロジェクトでは、この国家戦略の目標値を達成する方法として、「がんの早期発見・早期治療」を最重要な課題と位置付けた。がんを人類が克服することは並大抵の努力では到底叶えられないことは容易に推察される。本開発研究では国の政策目標を達成する最善の方法として、MRI画像診断技術を構成する造影剤の高機能化とその実用化を開発研究課題とした。具体的には、本開発研究では、MRI画像診断技術を現在よりもより安全・安心、容易且つ普遍的に使用できる目安として、現在の造影剤の10倍程度の高感度で画像化できるナノサイズシュガーボール dendリマー型Gd-DTPA-糖錯体構造を持った新規なMRI造影剤を開発し実用化に繋げる。

現在最も広く使用されているGd-DTPA錯体（ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸；一般名：ガドペンテト酸メグルミン注射液；商品名：マグネビスト（Magnevist））の安全性を継承して造影効果を画期的に高める為に、優れた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て、コア部と外殻部間を強固に結合する分子設計を行った。分子設計のコンセプトは、単に設計された造影剤分子が高い造影効果を発揮するに止まらず、糖が生体内機能分子と強固に結合することによる優れた血管貯留性、がん等に対する選択性・特異性を誘導し、相乗効果として縦緩和T1を画期的に高めることによる10倍の造影効果の発現を期待した。

本プロジェクトの第1年度（平成19年度）は、上述の様な分子設計思想に基づく一般表示式Gd-DTPA-Linker-Sugarの構成要素で示されるシュガーボール dendリマー型Gd-DTPA錯体を化学的に合成し、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。

平成19年度以前の研究成果は、4糖タイプのGd-DTPA-Diethylenetriamine-D2-4or12Glc(OAc) {Gd-DTPA-DETA-D2-4or12Glc(OAc)} の合成とその物性測定による*in vitro*評価である。その後の研究成果として、Gd-DETA-D2-4Glc(OAc)の加水分解生成物（DE



N-OHで示される通称「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であることを明らかにした。しかし、このDEN-OH「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Gd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、DEN-OH「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-D2-4G1c(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DEN-OH「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20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20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(MOE)を使った構造-活性相関の解析を行った。これらの新規なMRI造影剤の研究結果の半分程度は、特許出願の関係で平成20年度の報告書に記載ができなかった。当該プロジェクトで開発するシュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体のMRI造影剤の調製及び評価と並行して安全性試験を行った。調製したGd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OH)(サンプルA)およびDEN-OHの複製版サンプル(サンプルB)について外部委託による安全性試験結果により、「安全」とであると判明した。

本プロジェクトが目指す新規MRI造影剤の性能は「(I)現在のGd-DTPA錯体(商品名:マグネピスト(バイエル社(旧シュering社))の1/10の使用量)で従来品と同等以上の造影効果を有し、(II)優れた血管内貯留性の性質を持ち、(III)広いImaging Windowを持つ血管造影を可能にするMRI造影剤である。また、(IV)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造影剤」である。このような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(1.5T以下)のMRI装置により、安全・安心に鮮明に「初期がんの超早期発見」を可能にする医療の技術革新ができる。また、このような高機能性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など高エネルギー放射線や放射性同位元素を用いた高価なPET等の画像診断技術からMRI画像診断技術へとシフトして、現在165億円(薬価基準レベルでの平成19年度実績)と言われるMRI造影剤の市場が数倍~10倍程度にまで成長することが期待される。本開発研究により、医療技術のイノベーションを促進し、がんの死亡率激減に寄与できる具体的な研究成果を挙げることを期待して研究組織を挙げて努力している。平成20年度現在までにがん化ラットによるMRI画像により約1 mm程度の径の初期がんの描出に成功している。

最後に、平成19年度および平成20年度の厚生労働科研費により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貢献した。また、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顕やLC-MS等の質量分析装置、二次元電気泳動、*in vivo*評価の動物実験の準備・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、等々に於ける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ご協力に対して深謝したい。

更に、このプロジェクトの研究費用を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へい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して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致します。

#### 研究分担者

木村 元彦

静岡大学工学部

田中 康隆

静岡大学工学部

戸田 三津夫

静岡大学工学部

阪原 晴海

浜松医科大学医学部

間賀田 泰寛

浜松医科大学光量子医学研究センター

竹原 康雄

浜松医科大学医学部

藤江 三千男

浜松医科大学機器センター

三好 憲雄

福井大学医学部

岡野 孝

東京慈恵会医科大学医学部

押川 達夫

沼津工業高等専門学校

本間 信行

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・特異性、がん（特に、初期の小さながん）病巣造影機能を備えた新規なMRI造影剤の開発である。本プロジェクトでは、最終的には、がんの超早期発見を可能に出来る造影剤の実用化に向けた臨床試験等に続ける前臨床前研究成果を挙げることである。

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が、医学だけでも工学だけでも達成できないので医工連携の必要な研究分野である。

「第3次対がん10か年総合戦略」では、「研究、予防及び医療を総合的に推進することにより、がんの罹患率と死亡率の激減を目指すこと」が謳われており、「がんの早期発見・早期治療」の為の新規なMRI造影剤の開発を左に示す研究組織により行い、国の医療行政政策の達成に寄与する。



現在実用化されている画像診断法の中で最も安全な核磁気共鳴画像診断法 (Magnetic Resonance Imaging: MRI) の造影剤に不足している(ア)がん造影あるいは、(イ)血管造影、(ウ)特定臓器選択

的・特異的造影、(エ)高感度・高造影効果などの高機能化することが「第3次対がん10か年総合戦略」を達成するための最も現実的な課題であると思われる。

Table 1 MRI造影剤の開発 分子設計カテゴリー

カテゴリー		1-1	1-2	1-3	1-4	2	3-1	3-2	4-a	4-b
i	鎖式	○	○	○	○	○	×	×	○	複合機能化MRI造影剤
	環式	×	×	×	×	×	○	○		
ii	対称型	○	○	×	×	○	○	×		
	非対称型	×	×	○	○	×	×	○	○	
iii	糖誘導体	○	×	○	×	○	○	○	○	
	非糖誘導体	×	○	×	○	×	×	×	×	
iv	加水分解経路	×	×	×	×	○	×	×	×	
	非加水分解経路	○	○	○	○	×	○	○	○	
v	配位子の主鎖に置換基を導入する	×	×	×	×	×	×	×	○	

- ① 最も注力した MRI 造影剤
- ② 次に注力した MRI 造影剤
- ③ 第3番目に注力した MRI 造影剤
- ④ その他：(a)配位子の主鎖に置換基を導入する MRI 造影剤  
(b)複合機能化MRI造影剤

それ故、本研究は、厚生労働行政に沿って、がんによる死亡率を激減させる「がんの早期発見」の為に高機能化MRI造影剤の開発を目的とする。現在最も多用されている Gd-DTPA 錯体 (Fig. 1) は、近年、特に腎臓疾患の患者に於けるガドリニウムの筋肉への堆積による腎性全身性線維症 (Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF)) の問題が提起され使用方法に注意が必要ではあるが、最も安全な医薬品の一つであることには変わりがなく、Gd-DTPA を中心にグローバルに研究が盛んに行われている。

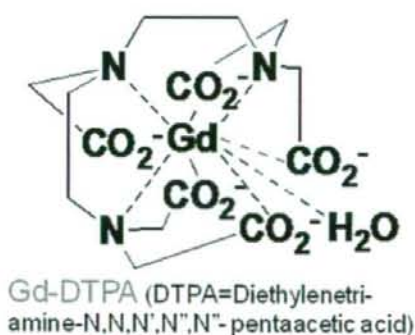


Fig. 1 Structure of Gd-DTPA (Magnevist).



本研究では、Gd-DTPA錯体を基本の骨格として、Gd-DTPAに生体内分子認識の機能を付加し、(ア)～(エ)のがん造影、血管造影等の高機能化MRI造影剤の開発のコンセプトに基づく分子設計によりシュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体を開発する。本報告書を作成している現段階までに、MRI造影剤Gd-DTPA-DEN-OHを分子設計カテゴリー2に属する(i)鎖式、(ii)対称型あるいは非対称型、(iii)糖誘導体、(iv)非加水分解経路により開発し、血管貯留性に優れた新規な造影剤を発見した(Fig. 2)。

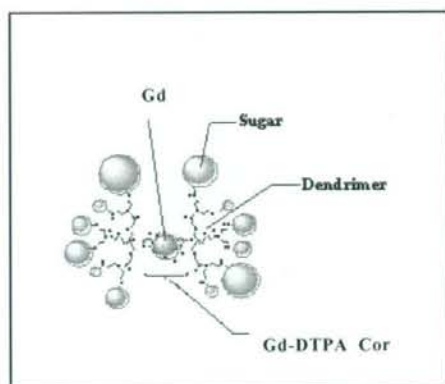


Fig. 2 デンドリマーコア部へのGdの配位(Gd-DTPA-DETA-D2-12Glc(OAc)の場合)

その機能は、Gd-DTPAと対比すると、(a)血管造影、(b)がん造影、(c)腹腔内出血造影、(d)高感度、の点において際立って優れている。また、カテゴリー1に属する(i)鎖式、(ii)対称型あるいは非対称型、(iii)糖誘導体、(iv)非加水分解経路によりGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)等の多種多様なシュガーボールデンドリマーを調製し、*in vitro*および*in vivo*評価を行った。Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)では、縦緩和T1の緩和率 $r_1$ が約 $10 [s^{-1} \cdot M^{-1}]$ であった。因みに、当該開発研究の基準MRI造影剤としているGd-DTPAは約 $3.5 [s^{-1} \cdot M^{-1}]$ である。

現在開発中の、カテゴリー1に属する新規なシュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体(構造は特許の関係で本報告書では非公開)は、牛アルブミン中で $r_1$ が約 $24 [s^{-1} \cdot M^{-1}]$ である。

本厚生労働科研の最終年度には、更に高感度・高造影効果の超Gd-DTPA-DEN-OHあるいは超Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)誘導体を開発し、前臨床前試験データを収集し、次のプロジェクトにおける臨床試験(Phase I~III)に続ける。更に、実用化の為のプロセス開発、試験設計、製造準備、製薬製造プラント、等のプロジェクトに続ける研究成果を挙げる。将来的には、がん撲滅を目指す医療技術の革新を実現する「がんの超早期発見・早期治療」を実現する医用材料を開発する。

## B. 研究方法および2年度までの進捗度

本研究が開発するMRI造影剤は、(1)生体機能性分子の糖及び(2)マグネシウム(Gd-DTPA)をコア部に配置した構造を有する。当該MRI造影剤の備える機能は、(3)血管内貯留性、(4)血管造影(MRA)、(5)初期がんの描出、(6)対従来品の10倍の高感度、(7)NSF対策、(8)安全性・安定性、等である。

本研究計画をFig. 3の流れ図に示す。研究計画の第1次ステージは、①研究開始、②原料合成、③DEN-OH合成、④候補造影剤の評価と絞込、⑤有効性(非臨床試験)、⑥構造-活性相関解析、⑦生体内分子認識、⑧安全性試験、第1次ステージのゴール(G1)に至る。

その後、第2次ステージ以降のプロジェクトに継続し、実用化・製品化の為に、

⑨規格及び試験方法、⑩臨床評価、を経て第2次ステージのゴール(G2)、更に、継続する別途プロジェクトとして、製品化・商品化の為の⑪製品化・商品化、及び第3次ステージのゴール(G3)までを本研究では視野に入れている。この①～⑪及び(G1)～(G3)の中で、第1次ステージの第1年度は①～⑤のステップを行い、更に⑨に至るステップの予備的な研究を行った。第2年度は主として、③～⑧のステップ及び⑩の予備的な研究を行った。更に、第3年度では主として⑥～⑧のステップを行い、⑨～⑩のステップの予備的な研究を行い、⑩のステップの前段階(前臨床試験前)の必要なデータの収集を完了させて(G1)に到達させる。

平成20年度(第2年度)までに、流れ図に示す研究計画の②～⑧の項目の研究を行った。また、⑨～⑩の項目の予備的な研究を行った。その結果、本研究の開発する造影剤の構造をDEN-OHに絞り込むに至った。そして、DEN-OHよりも優れた超Gd-DTPA-DEN-OHを最終年度に開発する予定を計画に加えた。今までの開発研究の進捗によりDEN-OH及び様々なGd錯体を開発した。進捗度は、(1)血管内貯留性、(2)従来品の10倍の高感度、(3)初期がんの描出、(4)血管造影、(5)広い画像化ウインドウ、については目標を80%～90%程度達成した。また、(6)腹腔内出血の診断への応用可能性を発見した。(7)MRI造影剤の構造最適化、(8)生体内分子との相互作用、(9)高感度のMRI造影効果を示す作用機序の解明、(10)安全性評価、については60%～80%進捗度であり、(11)が

ん細胞への集積性、(12)前臨床試験前データの収集は50%～70%程度の進捗度である。

研究代表者、分担者の担当は以下の通りである。

研究代表者：山下 光司

本研究の統括、様々なGd錯体の合成、DEN-OHの調製、総合評価

以下研究分担者

木村 元彦

*in vitro*評価

田中 康隆

DEN-OHの調製及び構造解析

戸田 三津夫

Gd錯体の調製及び安定性評価

阪原 晴海

DEN-OHの生体内認識の解明と作用機序

間賀田 泰寛

他のモダリティの比較

竹原 康雄

様々なGd錯体及びDEN-OHの*in vivo*評価

藤江 三千男

Gd錯体及びDEN-OHの構造解析及び評価

三好 憲雄

Gd錯体の*in vivo*評価とがん集積性の研究

岡野 孝

分子設計

押川 達夫

DEN-OHの再現研究

本間 信之

MRI造影剤の解析及び研究・市場調査





研究協力者Siva、Uma、於、平井、等の研究者・技術者、その他博士課程・修士課程大学院等の学生は、DEN-OH及び様々なGd錯体の合成及び評価を行った (Fig. 4およびFig. 5)。



Fig. 4 ラットの肝細胞がんのMRI画像  
(左: Gd-DTPA (従来品) 右: DEN-OH)

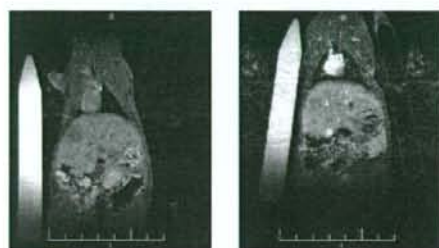


Fig. 5 ラットの初期肝細胞がんのMRI画像  
(左: Gd-DTPA (従来品) 右: DEN-OH)

本研究は、研究組織の協力及び本研究費により遂行された。DEN-OHの調製及び様々なGd錯体の調製は静岡大学の研究施設及び装置類や薬品・消耗品等により行われ、その再現性についての検証を沼津高専の研究施設にて行った。DEN-OH及び様々なGd錯体の構造解析、分析、物理定数、*in vitro*評価等は静岡大学及び浜松医科大学の研究施設・装置類で行った。Gd錯体の生体内分子認識及びその作用機序の解明は浜松医科大学の研究施設・装置等にて行った。DEN-OH及び様々なGd錯体の*in vivo*評価は、浜松医科大学、岡崎国立共同研究施設、福井大学の研究施設・設備で行った。DEN-OH及び様々なGd錯体

の分子設計、生体内分子認識能評価は東京慈恵会医科大学及び静岡大学の研究施設にて行った。MRI造影剤の研究の実験指導や造影剤開発の理論的指導は海外共同研究者のベルギーMons大学のRobert N. Muller教授およびその研究室の研究者の協力により行われた。分子設計、がん集積性、造影効果の予測及びがんについての指導や講義・講演はアメリカ合衆国のIowa大学のDavid F. Wiemer教授により行われた。

これらの研究体制・施設・装置類等は平成21年度も維持して研究を遂行する研究計画の全体の計画と年次計画を流れ図 (Fig. 3) に示す。この流れ図に従って、3年間のプロジェクト研究成果を十分に達成し、医療技術の革新により社会のニーズに応える研究を完遂する。

(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、動物を用いた*in vivo*評価の際に使用する薬剤も非常に少量で足りる故に低侵襲性であり、被験動物の肉体的負担を軽減した研究である。基本的には、安全性を担保した造影剤サンプルを使用して動物を使った*in vivo*評価を行っているが、当該研究の最終段階では安全性試験等をパスしたサンプルを使用して霊長類等の動物による試験を実施する。更に、実用化・製品化研究の段階での臨床試験では認定された機関で所定の手続きを経て研究を行う。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あるいは被験者に対して十分な配慮をし、負担は極々軽減しつつ、インフォームド・コンセント等を含めて、各研究機関及び当該大学の

諸規則・諸手続きを遵守する。続くステージの臨床段階でも、認定された機関の当該施設にて行い、当該機関の諸規則・手続きを遵守し、動物愛護上の配慮、被験者の同意等の倫理面の配慮も十分に尽くす。

### C. 研究結果

平成20年度までの研究結果

流れ図 (Fig. 3) の①～⑧の項目について研究を行った。また、⑨～⑩を見据えた準備について検討した。

- ① 研究目的：研究課題を達成する研究を平成19年度に引き続いて平成20年度も継続して行った。
- ② 原料合成：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段階は確立され、第3年度以降の研究の進捗を加速できる。
- ③ DEN-OH及び各種のGd-DTPA-糖錯体の合成：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配位子シュガーボールデンドリマー分子（配位子）を合成する工程についてもプロセスを確立した。また、調製したDEN-OHおよび様々なGd-DTPA-糖錯体について、*in vitro* および*in vivo*評価を行い、候補化合物の絞り込み、並びに、DEN-OH調製の反応条件の絞り込みを行った。第3年度以降の研究の進捗を加速できる。
- ④ 得られた様々な配位子に対しGd(III)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段階についても、手法を確立した。第3年度以降の研究の進捗を加速できる。
- ⑤ 有効性（非臨床試験）：開発研究が標的としている造影剤のカテゴリー2に

相当するDEN-OHの有効性の確認と再現試験を行った。また、カテゴリー1について、様々なGd-DTPA-糖錯体を創製し、評価を行った。1.5T及び3.0Tの実際のMRI装置を使い*in vitro*評価および動物(ラット)を用いた*in vivo*評価を行った。また、0.47Tの核磁気共鳴装置を使って*in vitro*評価を行った。その結果、非臨床試験結果として、本研究が目標としている(i)がん造影、(ii)血管造影、(iii)特定臓器選択的・特異的造影、(iv)高感度・高造影効果などの高機能化において十分な有効性が認められた。尚、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）を使ってGd錯体の純度を測定する方法も確立できた。それ故、第3年度以降の研究の進捗を加速できる。

- ⑥ 構造-活性相関解析：標的化合物のカテゴリー2では、DEN-OHの際立って優れたMRI造影効果の構造と機能について解析したところ、外殻部の必要とする機能基を推定することができた。第3年度には、DEN-OHを別途合成する。カテゴリー1のGd-DTPA-糖錯体から優れた造影効果を示す化合物の構造と活性相関を解析し、標的化合物の絞り込みができたので、第3年度には、構造の最適化および造影効果の最適化を行う。
- ⑦ 生体内分子認識：動物実験における*in vivo*評価、あるいは*in vitro*評価に於ける造影剤としての効果を異なった媒体中で行った。また放射性Gdあるいは、電気泳動法による生体内分子認識について検討した。結果としては、最終的な決定はできないが、アルブミン認識の可能性が示唆された。



- ⑧ 安全性試験：候補化合物である、DEN-OHおよびGd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OH)について行った結果は、安全性に問題は無かった。現在は、Gd-DTPA-Xについての安全性試験を実施中である。
- ⑨ 規格及び試験方法：実用化するプロセスにおいて必要な規格及び試験方法を検討した。
- ⑩ 臨床評価：コーディネータあるいは臨床経験者あるいは、医師等のアドバイスの必要性があると思われる。

#### D. 考察

平成20年度までの開発研究により、「青島サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4G1c(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-D2-4G1c(OH)}を調製したが、「青島サンプル」の造影効果には及ばなかった。「青島サンプル」の復刻

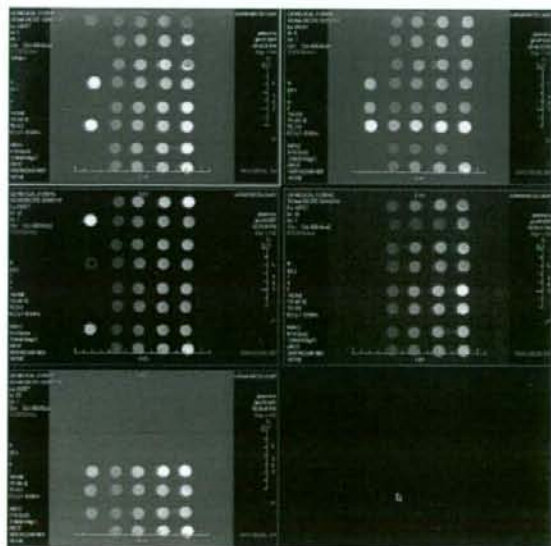


Fig. 6 Various DEN-OH prepared under different hydrolysis conditions.

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。博士研究員等の「青島サンプル」の再現実験では、Gd-DTPA-DETA-D2-4G1c(OAc)の加水分解を、アルカリ濃度、温度、加水分解時間、等のファクターを変化させて行い、様々な条件下で様々なDEN-OH誘導体を調製した。その*in vitro*評価結果を、Fig. 6に示す。

Fig. 6に示された結果(計測値は特許の都合により省略)から、非常にきれいに調製された「小川サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4G1c(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。しかし、「青島サンプル」は dendrimer 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20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-AS1-1G1c(OH)は*in vivo*評価に於いて、がん化ラットの1mm程度の小さながんの描出に成功した。

平成20年度は、シュガーボール dendrimer 型 Gd-DTPA-糖錯体の構造を持つ様々なGd錯体を合成し、それらの*in vitro*評価を行った。その結果、Gd-DTPA-X誘導体(詳細な構造は、特許の関係で表示できない。)の血清中での緩和率 $r_1$ は約 $24 [s^{-1} \cdot M^{-1}]$ を筆頭とする、MRI造



造影剤として幾つかの有望なGd-DTPA-糖錯体を開発した。

また、MOEによる構造-活性(緩和率 $r_1$ ) 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20年度までの研究では、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)の誘導体の更なる誘導体と推察される。(推定構造は、特許の為に明示できない。)
- (2)「小川サンプル」は糖に保護基の導入無しに、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。また、この合成方法により、様々なGd-DTPA-糖錯体の誘導体・類似体の合成ができ、それらの*in vitro*および*in vivo*評価を行った。
- (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*及び*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。

(4) (1)~(3)の結果から、「青島サンプル」の再現性の良い加水分解反応条件の設定が難しいことが示唆された。「青島サンプル」の復刻には更なる研究が必要である。また、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)をはじめ、様々なシュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体誘導体が創製された。それらの*in vitro*および*in vivo*評価により、Gd-DTPA-Xの基本構造のGd錯体が最高の縦緩和率 $r_1$ を与え、シュガーボールデンドリマー型Gd-DTPA-糖錯体構造の絞り込みの作業に非常に有効な情報が得られた。

これらの研究成果は、第3年度目の研究推進に当たって非常に大きな価値のある結果である。

- (5)平成20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-糖錯体誘導体により描出された。
- (6)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。尚、平成20年度の安全性試験の結果は問題は無い。

## F. 健康危険情報

Gd-DTPAは、特に、腎臓疾患の患者に於けるガドリニウムの筋肉への堆積による腎性全身性線維症(Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF))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、NSF問題の解決にもなるGd錯体が開発できると思われる。

## G. 研究発表

### 1. 著書・論文(詳細はデータ集を参照)

- [1] Yamashita, Mitsuji, et.al.,  
"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, et.al., "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., et.al., "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] Matoh F, et.al., "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, et.al., "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, et.al., "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, et.al., "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, et.al., "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 3 T 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., et.al., "MR findings of pseudoneoplastic lesions in the uterine cervix mimicking a denoma malignum", *Br. J. Radiol.*, 2007 Nov;80(959):878-83. PMID: 17989332 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [16] Sugiyama, K., et.al., "Magnetic resonance findings of clear-cell adenocarcinofibroma of the ovary", *Acta Radiol.*, 2007, Jul;48(6):704-6. PMID: 17611882 [PubMed - indexed for MEDLINE]
- [17] Matoh F., et.al., "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., et.al., "Studies on Preparation and Characterization of Novel MRI Contrast Agents for Targeting Organs and Blood Vessels", *Heterocyclic Communications*, 13(2-3), 2007, 101-108.
- [19] G. Yu., et.al., "A Glycosylated Complex of Gadolinium, a New Potential Contrast Agent for MR Angiography?", *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(8), 15 April 2007, 2246-2249.
- [20] S. Ito, M. Yamashita, et.al., "Preparation and characterization of phospholanes and phospho sugars as novel anti-cancer agents", *Heterocyclic Communications*, in press (2008).
- [21] M. Fujie, et.al., "A novel phospho sugar analogue: synthesis and evaluation of 2,3-dibromo-3-methyl-1-phenylphospholane 1-oxide having potential anti-proliferative effects for human tumors" *J. Environ. Biology*, in press (2008).
- [22] M. Fujie, et.al., "A Novel Phospho Sugar Analogue: Synthesis and Evaluation of 2,3-Dibromo-3-methyl-1-phenyl-phospholane 1-Oxide as a New Class of Potential Anti-proliferative Materials for Leukemia Cells", *Heterocyclic Communications*, in press (2009).
- [23] 阪原晴海: 前立腺がんの病期診断, 画像診断-2(骨シンチグラフィ). 吉田修 監修, 大園誠一郎, 荒井陽一 編, インフォームドコンセントのための図説シリーズ, 前立腺がん. 大阪, 東京, 医薬ジャーナル社, 2008. pp 34-39.



- [24]Ishida Y, et.al., "Differential Expression of Fos and Zif268 in the Nigrostriatal System After Methamphetamine Administration in a Rat Model of Parkinson's Disease", *SYNAPSE* 62:920-926 (2008).
- [25]Temma T, et.al., "PET 0-15 cerebral blood flow and metabolism after acute stroke in spontaneously hypertensive rats", *Brain Res.*, 2008 May 30;1212:18-24. Epub 2008 Mar 29.
- [26]Sekimata K, et.al., "Radio-synthesis and *in vivo* evaluation of N-[<sup>11</sup>C]methylated imidazopyridine-acetamides as PET tracers for peripheral benzodiazepine receptors", *Nucl Med Biol.*, 2008 Apr;35(3):327-34.
- [27] Sostaric, Z. J., et.al.,: Dynamic adsorption properties of n-alkyl glucopyranosides determine their ability to inhibit cytotoxicity mediated by acoustic cavitation. *J. Phys. Chem. B*, Inpress. (accepted at 30<sup>th</sup> July, 2008).
- [28]Tanigawa, J., Miyoshi, N., et.al., "Characterization of chitosan/citrate and films and applications for wound healing. *J. Appl. Polymer Sci.*, 110 (1), 608-615 (2008).
- [29]Miyoshi, N., et.al.,: "[Reviews]" PDT and PDT with porphyrin precursors (5-ALA) in Japan", *J. Jpn. Soc. Laser Surg. and Med.*, 9 (2), 124, 164-168 (2008).
- [30]三好憲雄、総説、Part I. PDTとは:PDTの原理、特集:総説欄、皮膚科のPDT(光線力学療法)、月刊「Visual Dermatology」, Vol. 7 (8), 844-845 (2008).
- [31]Kinoshita, H., Miyoshi, N., et.al., "Functional mapping of carious enamel in human teeth with Raman microspectroscopy", *J. Raman Spectroscopy*, 39, 655-660 (2008).
- [32] Miyoshi, N., et.al., "Ultrasound-induced cytotoxicity of cancer cells is enhanced in the presence of micron-sized alumina particles", *Ultrasonics Sonochemistry*, 15 (5), 881-890 (2008).
- [33] Kinoshita, H., Miyoshi, N., et.al., "Phosphate mapping of sialoliths with Raman microspectroscopy", *Journal of Raman Spectroscopy*, 39: 349-353, (2008).

## 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", 14<sup>th</sup> European Carbohydrate Symposium, 159, Sept. 2-7, 2007, Luebeck, Germany.
- [2] N. Ozaki, "Synthesis and evaluation of novel Gd-DTPA-Sugar compounds as MRI contrast agents", 5<sup>th</sup> Inter-academia 2007, Sept. 26-27, Hamamatsu, Japan.
- [3] M. Yamashita, "Research on Novel Sugar Dendritic MRI Contrast Agents for Cancer and Phospho Sugar Anti-cancer Material", 4<sup>th</sup> 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"

- g", 15<sup>th</sup> 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)", 15<sup>th</sup> Scientific Meeting and Exhibition of International Society for Magnetic Resonance in Medicine, 19-25 May 2007, Berlin, Germany.
- [6] M. Yamashita, et al., "Construction of DDS of Gd-DTPA Complex with Sugar Ball Dendrimer for Drawing Blood Vessels and Tumors by MRI", *ICOM2008*, 13-18 July, 2008, Rennes, France.
- [7] M. Yamashita, et al., "Studies on Novel MRI Contrast Agents Having a Sugar-Ball-Dendrimer Framework for R & D of Imaging Specific Organs, Blood Vessels, and Tumors", *24th international Carbohydrate Symposium (ICS2008)*, 27. July~1. August, 2008, Oslo, Norway.
- [8] J. Yamashita, M. Yamashita, et al., "Medical Materials for Ultra Early Finding and Curing Cancers: Syntheses and Evaluation of Anhydro- and Deoxybromo-phospho Sugars or Epoxy- and Bromo-Phospholanes for Leukemia Cells", *24th international Carbohydrate Symposium (ICS2008)*, 27. July~1. August, 2008, Oslo, Norway.
- [9] M. Yamashita, M. Fujie, et al., "Research on Novel Materials for Cancer Finding and Chemotherapy at the Early Stage --- Novel MRI Contrast Agents with Sugar Ball Dendrimer Structures and Novel Ant-tumor Agents with Phospho Sugar or Phosphorus Heterocyclic Structures and Their Evaluation", *Inter-Academia 2008*, 15-18 September, 2008, Pecs, Hungary.
- [10] M. Yamashita, et al., "Research on Cancer Finding and Chemotherapy at the Early Stage --- Syntheses and Evaluations of Novel Sugar-Ball-Dendrimer MRI Contrast Agents and Phospho Sugars by Sugar Modification", *11th Bratislava Symposium on Saccharides (11BSS)*, 21-26 September, 2008, Smolenice Castle, Slovakia.
- [11] T. Aoki, M. Yamashita, et al., "Synthesis and Evaluation of Chemically-Modified Novel MRI Contrast Agents with Sugars", *11th Bratislava Symposium on Saccharides (11BSS)*, 21-26 September, 2008, Smolenice Castle, Slovakia.
- [12] M. Yamashita, M. Fujie, et al., "Research on Cancer Finding and Chemotherapy at the Early Stage --- Epoxidation and Bromination of 2-Phospholenes for Preparation of Phospho Sugars and Their Biological Activity", *XV International Conference on Chemistry of Phosphorus Compounds (ICPCP-XV)*, 25-31 June, 2008, Saint-Petersburg, Russia.
- [13] 山下光司、et al., 「がんの早期発

見・早期治療の為の医用材料開発研究」、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（名古屋大学）、2008. 11. 8～11. 9.

- [14] 山下光司、山下純子、藤江三千男、et. al., 「がんの早期発見・早期治療を目指す医用材料—プロモ基を環構造に有する含リン複素環化合物あるいはリン糖誘導体の合成と生理活性の評価」、第 35 回有機典型元素化学討論会（首都大学）、2008. 12. 11～12. 13.
- [15] 山下光司、藤江三千男、et. al., 「プロモ基を有する含リン複素環化合物あるいはリン糖誘導体の合成と生理活性」、第 38 回複素環化学討論会（広島県民文化センターふくやま）、2008. 11. 21～11. 23.
- [16] 浅井一秀、山下光司、et. al., 「新規リン糖誘導体の合成およびがんに対する生理活性評価」、第 38 回複素環化学討論会（広島県民文化センターふくやま）、2008. 11. 21～11. 23.
- [17] 浅井一秀、山下光司、藤江三千男、et. al., 「新規リン糖誘導体の合成およびがんに対する生理活性評価」、第 35 回有機典型元素化学討論会（首都大学）、2008. 12. 11～12. 13.
- [18] 浅井一秀、山下光司、藤江三千男、et. al., 「新規リン糖誘導体の合成およびがんに対する生理活性評価」、第 39 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会（名古屋大学）、2008. 11. 8～11. 9.

#### 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. 特許出願

- [1] 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「ガドリニウム化合物及びMRI造影剤」出願番号：2008-038115、出願日：平成20年2月20日。
- [2] 山下光司、他「ガドリニウム化合物及びMRI造影剤」特願2008-136139(2008)。
- [3] 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「ガドリニウム錯体の製造方法」、出願番号：2008-038116、出願日：平成20年2月20日。
- [4] N. Miura, M. Yamashita, "Preparation of monosaccharide- and oligosaccharide-containing gadolinium compounds and contrast medium for MRI", PCT Int. Appl. (2008), 121 pp.
- [5] M. Yamashita, M. Fujie, S. Nakamura, "Phospholane oxide derivatives and antitumor agents containing them." Jpn. Kokai Tokkyo Koho (2008).

##### 3. 実用新案登録 なし

##### 4. その他 なし