

### 3-1-5 様々な Gd 錯体の評価 (Gd-DTPA をコアに持つシュガーボールデンドリマー等の糖錯体及び非糖錯体)

#### (1) 非加水分解タイプの Gd-DTPA 誘導体の *in vitro* 評価・絞込み

3-1 及び 3-2 に示した様々な Gd-DTPA 錯体誘導体について、MRI 造影剤としての *in vitro* 及び *in vivo* 評価を行った。評価の結果は、それぞれの錯体の創製 (第 2 章) の各論に於いて記述されている。

ここでは、創製された数種の Gd-DTPA 錯体誘導体を比較できるデータを収集し、その結果を議論する。

先ず、20 種類余の Gd-DTPA 錯体誘導体の *in vitro* 評価結果を Fig. 3-1-01 に示す。この図から、新規な方法により調製した Gd-DTPA-D2-Glc(OH) ( $r_1 =$  約 10 [1/sM]) はマグネピスト ( $r_1 =$  約 3.5 [1/sM]) の約 3 倍の緩和率を示すことが分かる。尚、この Gd-DTPA 錯体誘導体 (A サンプル) は、安全性試験をパスしている。

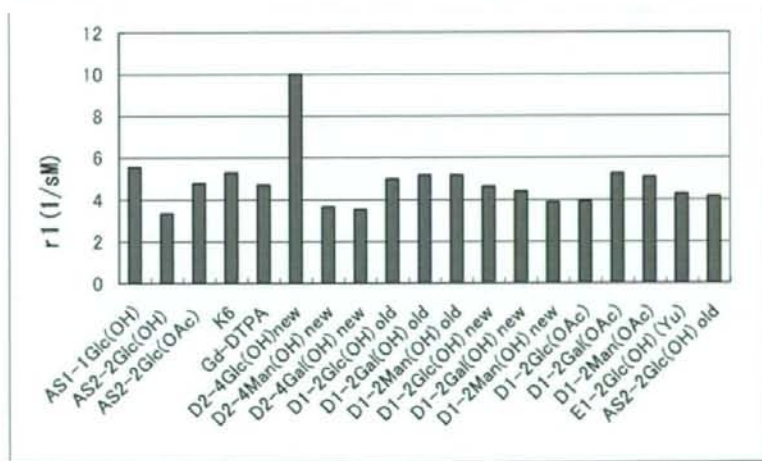


Fig. 3-1-01  $r_1$  Values for various Gd-DTPA complex derivatives obtained by *in vitro* evaluation.

更に、Gd-DTPA、Gd-DTPA-D1-C2-Glc(OH) および新規な Gd-DTPA 錯体誘導体 W、X、Y、Z (構造は特許の関係で非開示) を比較すると、X、Y、Z は更に優れた緩和率 ( $r_1 =$  約 10~13 [1/sM]) を示すことが判明した (Fig. 3-1-02)。

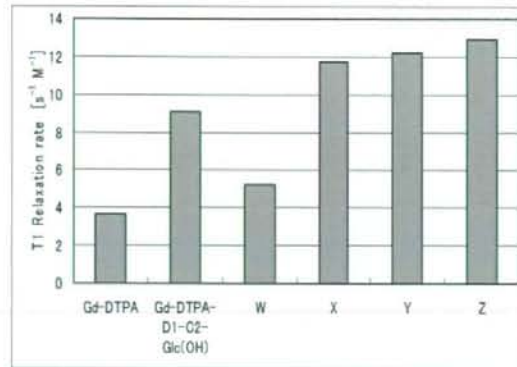


Fig. 3-1-02  $r_1$  Values for various Gd-DTPA complex derivatives obtained by *in vitro* evaluation.

これらの結果から、DEN-OH 以外にも、優れた分子設計により、Gd-DTPA の約 10 倍の造影の昂揚が期待される Gd-DTPA が期待される。それ故、当該プロジェクトの最終年度の目標は、①DEN-OH の完成、②DEN-OH 以外の MRI 造影剤（ここでは、Super DEN-OH と表記）の開発、③前臨床試験前段階データの収集、を達成することである。

## (2) 加水分解タイプの Gd-DTPA 誘導体の *in vitro* 評価および *in vivo* 評価・絞込み

特筆すべき加水分解タイプのカテゴリーに属する (i) 鎖式、(ii) 対称型あるいは非対称型、(iii) 糖誘導体、(iv) 加水分解経路の Gd-DTPA 糖誘導体 DEN-OH の *in vitro* 評価および *in vivo* 評価結果を以下に示す。

*In vitro* 評価では、Fig. 3-1-03 に示す様に、DEN-OH は Gd-DTPA の約 10 倍の  $r_1$  の計測値を示した。

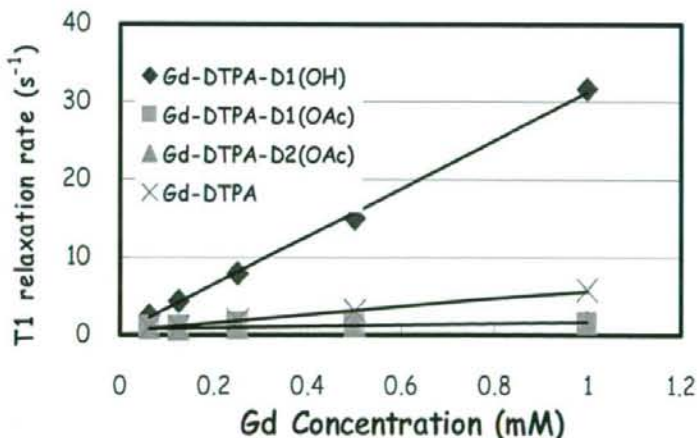


Fig. 3-1-03 Relaxation rate vs. [Gd] concn.

また、DEN-OHは血管貯留性に優れていることが示された (Fig. 3-1-04)。DEN-OHは血管貯留性に優れている故に血管造影 (Magnetic Resonance Angiography: MRA) においても広い Imaging Windowを示した (Fig. 3-1-05)。この結果は、血管造影に於いては、Single doseで十分に良好なMRA画像が得られることを示している。

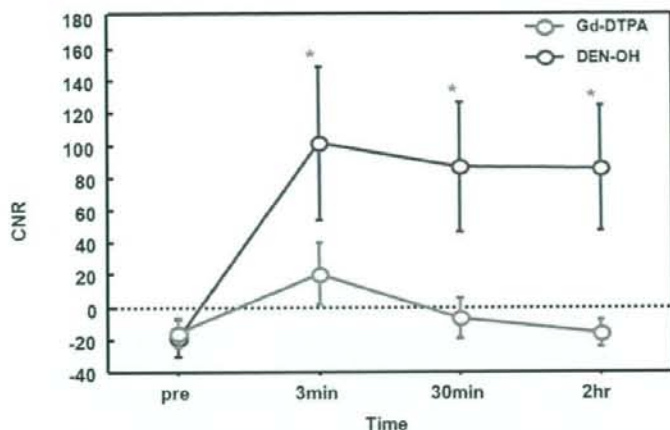


Fig. 3-1-04 Time course changes of CNR (Lesion basis) for DEN-OH compared with Gd-DTPA.

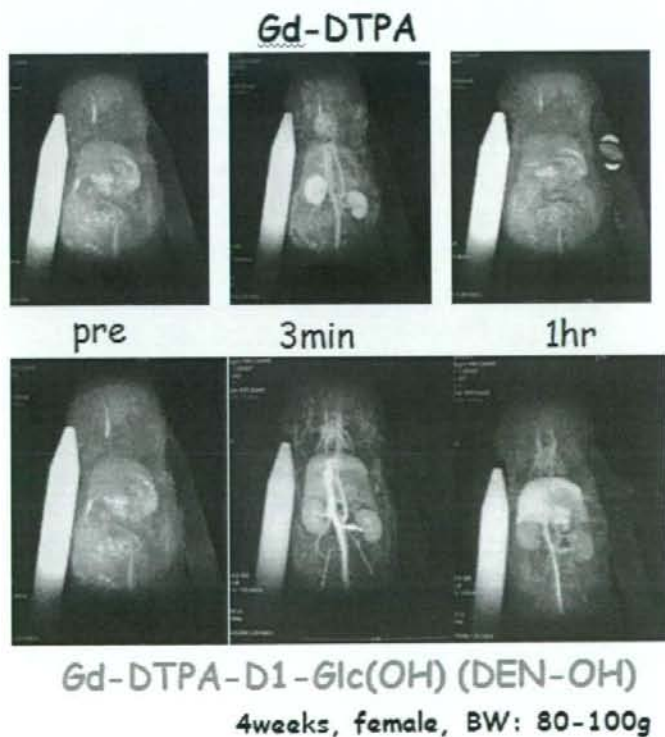


Fig. 3-1-05 MRI for blood vessel of rat.

DEN-OH を使って、ラットの肝細胞がんの MRI による描出を行った。そのプロトコールを Fig. 3-1-06 に示す。また、肝細胞がんの MRI 画像を Fig. 3-1-07 に示す。

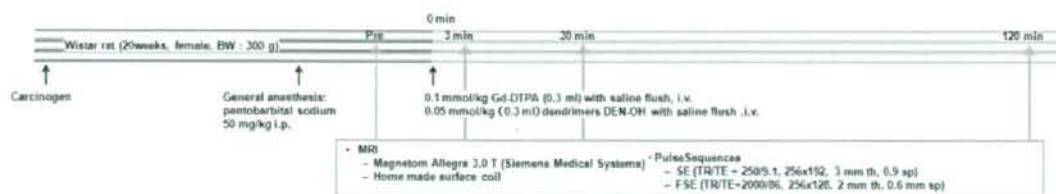


Fig. 3-1-06 Protocol for *in vivo* evaluation experiment of rat with MRI contrast agent DEN-OH.

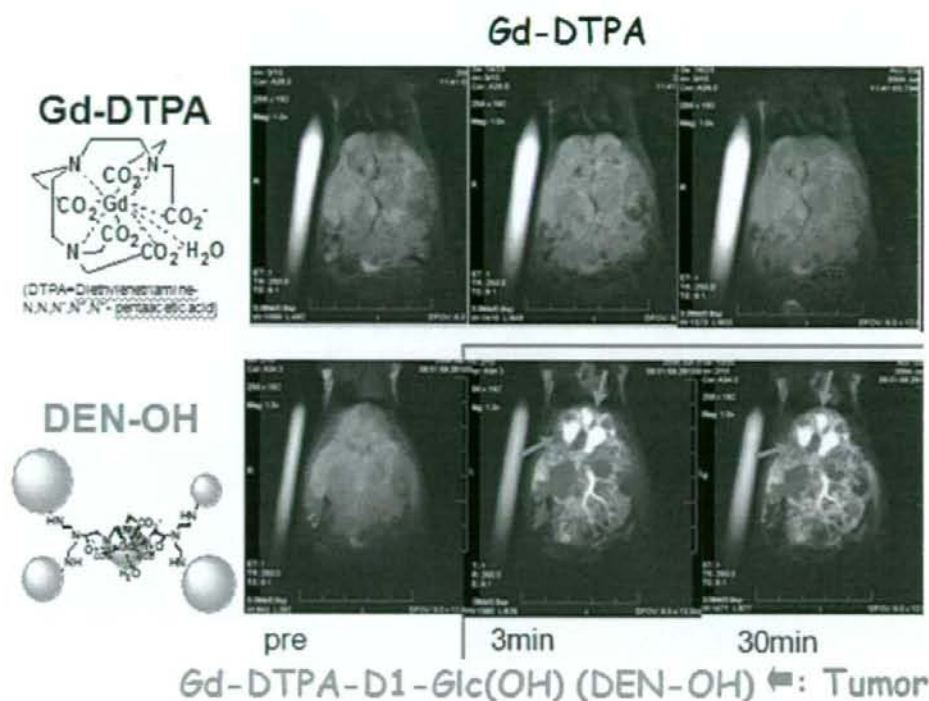
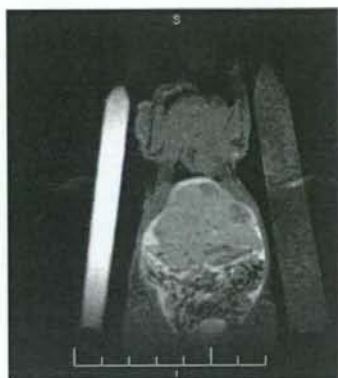


Fig. 3-1-07 MRI for liver tumour of a rat with DEN-OH.

DEN-OH を用いた血管造影、がん造影の他の利用例として、腹腔内出血の描出の例を Fig. 3-1-08 に示す。

患者の QOL 改善の為の医療技術として、内視鏡や腹腔鏡による観察の他、内視鏡や腹腔鏡による手技あるいは処置が従来技術としての外科的手術に代わって、しばしば行われている。このような手技あるいは処置の際に、内視鏡等の狭い視野故に、手技後の出血を見過ごす危険性がある。このような手技の際に、術後に腹腔内出血を容易に描出できることは非常に大切な技術である。



ラットの腹腔内出血  
のMR画像

Fig. 3-1-08 MRI for “Intraabdominal Hemorrhage” of a rat with DEN-OH.

## 3-2 ガドリニウム錯体の蛍光分析

本研究プロジェクトでは多数の新規ガドリニウム錯体の合成を行う。このため高効率で高感度な試料中のガドリニウムの定性および定量分析が必要となる。定量分析によるガドリニウム錯体の純度検定は、*in vivo*での投与量に直接結びつくことから必須な過程である。本プロジェクトでは ICP (誘導結合プラズマ) 発光分析装置を導入し、ppm から ppb オーダーでのガドリニウムの定性および定量を行っている。この ICP 発光分析に加え、さらに簡便に短時間に数多くのガドリニウムの分析を行うため、希土類が有する蛍光特性に着目し蛍光分光分析の可能性を調査した。蛍光分析は非破壊分析であり、試料を溶液とするだけで簡便に定性および定量が可能な分析方法である。ここでは最初にガドリニウム錯体が実際に蛍光で定量分析が行えるかどうかの検討を行った。

### 3-2-1 希土類の蛍光

#### (1) 希土類の電子配置

希土類元素はランタン (La) からルテチウム (Lu) までの 4f 電子が詰まっていく過程の 15 元素をいい、その電子構造は、 $4f^{0-15}5d^{0-10}6s^2$  で表される。これらの元素の価電子は 4f 電子であるが、この軌道はそれより主量子数の大きい 5s、5p、5d、6s 軌道より内側にあり、他の元素のように価電子が物理的な最外殻電子でないという特徴を持つ。4f 電子が他の外側の電子により環境から遮蔽されているため、周囲の環境の影響を受けにくく希土類元素相互の性質はよく似ている。このような電子構造と多数の対電子を持つという特徴によって、カラーテレビの蛍光体、永久磁石、レーザー発光体などに広く応用されている。蛍光性の希土類錯体の用途は蛍光標識剤として用い、種々の物質の測定に用いることである。希土類蛍光性錯体を蛍光特性から分類すると、3 つのグループに大別される。強蛍光性グループ ( $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$ 、 $\text{Dy}^{3+}$  の錯体) は、中心金属のイオンの励起エネルギー準位は、配位子の励起三重項 ( $T_1$ ) 準位より少し低い位置にあり、 $T_1$  からのエネルギー移動を受けることができる。またこれらのイオンでは、励起準位と基底準位のエネルギー差が大きいため非放射遷移が起こりにくく、蛍光の量子収量が高い。弱蛍光性グループ ( $\text{Ce}^{3+}$ 、 $\text{Pr}^{3+}$ 、 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Pm}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Tm}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}$  の錯体) では、中心金属イオンの励起準位と基底準位の差がかなり小さいため、非放射遷移の割合が大きく蛍光の量子収率は低い。 $\text{Nd}^{3+}$ 、 $\text{Er}^{3+}$ 、 $\text{Yb}^{3+}$  に関しては、近赤外領域に発光を持つ錯体が報告されている。

通常、 $\text{Sm}^{3+}$ 、 $\text{Eu}^{3+}$ 、 $\text{Tb}^{3+}$  および  $\text{Dy}^{3+}$  の水溶液は、普通の蛍光光度計では検出できないほどの弱い蛍光しか発しない。これらのイオンは適当な配位子と錯体を形成すると、近紫外領域の光を吸収して励起され、非常に強い蛍光を発するようになる。これは錯体が配位子から中心金属イオンへのエネルギー移動に基づいた蛍光発光を示すためである。一般的には、 $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Gd}^{3+}$ 、 $\text{Lu}^{3+}$  の錯体は蛍光を発しない (非蛍光グループ) とされる。

#### (2) 希土類の発光過程

配位子を有するユウロピウムイオンを例にとると、励起と発光は次のような過程で起こる。まず配位子が紫外光により励起され励起状態 ( $S_1$ ) となる。次に項間交差により三重項状態の  $T_1$  にエネルギーが移動し、そこからユウロピウムイオンの励起状態 ( $^5D$ ) にエネルギー移動が起こる。そして金属の励起状態から基底状態 ( $^7F$ ) に戻る時に蛍光を発する。このとき希土

類イオンに配位している配位子が、溶媒分子等へのエネルギーの移動による失活過程を抑制し強い蛍光発光が得られる。したがって、強い蛍光を持つ錯体を得るための配位子としては、その吸光度が高く励起三重項状態のエネルギーレベルが希土類イオンの最低励起エネルギーレベル $^5D$ 準位より高く、エネルギー移動が効率よく起こることが必要となる。さらに、配位子の励起一重項状態から三重項状態への項間交差の効率も錯体の蛍光強度に大きな影響を与える。例えば、 $\beta$ -ジケトン型配位子では配位子の吸収極大波長の変化に関わらず、ユウロピウム<sup>3+</sup>の蛍光は常に約615nmに観測される。しかし、吸収極大波長がある一定の値を超えると、その錯体は全く蛍光を発しなくなる。吸収極大波長は、励起一重項のエネルギーレベルに関係し、励起三重項のエネルギーレベルを直接的に表す値ではないが、一定の相関性が存在するため、この傾向は励起三重項状態のエネルギーレベルが希土類イオンの最低励起エネルギーレベル $^5D$ 準位へ遷移するのに十分高くなり、エネルギー移動が起こらなくなったためと説明される。しかし、本検討ではあえて蛍光を発しないとされるガドリニウムイオン( $Gd^{3+}$ )の配位子の無い状態での水中の蛍光観察を最初に行う。

### (3) 希土類の蛍光の特徴

希土類蛍光錯体の特徴を理解するために、従来の蛍光検出法で使用される有機蛍光色素と比較してみる。普通の有機蛍光色素化合物、例えばフルオレセインやローダミンBと比ユウロピウム錯体の蛍光は以下の4つの特徴を持つ。これらの特徴は新規ガドリニウム錯体の蛍光分析を行う上で極めて有利に作用する。

#### 1. 発光波長が配位子の構造にほとんど影響を受けない。

先に述べたように、希土類錯体は配位子の吸収により励起され、錯体内でのエネルギー移動により中心金属にエネルギーが移動し希土類イオンの励起状態から基底状態に戻る時に蛍光を発するとされる。多くの場合、 $4f \rightarrow 4f$  遷移に基づく蛍光を発する（ほとんどの場合 $^5D_0 \rightarrow ^7F_2$  放射（約615nm）が一番強い）。すなわち励起と発光が錯体の異なる部分によって行われているため、希土類蛍光錯体は、配位子の分光学的性質に依存した励起スペクトルと、配位子には依存せず、中心金属イオンにのみ依存した発光スペクトルを示す。例えばユウロピウム錯体であれば、強度比に変化はあるものの常にユウロピウムイオンに特徴的な蛍光スペクトルを示す。今回多数のガドリニウム錯体を合成するが、種類の違いは配位子の構造の違いである。このように配位子が異なっても、ガドリニウムからの蛍光を観測する事が出来ればその波長が一定である事が予想され、定性および定量には極めて好都合である。

#### 2. 蛍光寿命が長い。

希土類蛍光錯体は一般的に長い蛍光寿命を持つ。希土類イオンの4f軌道が5sや6p軌道により大きく遮蔽されており、本質的に $4f \rightarrow 4f$ 遷移は禁制であることも寿命が長い理由であると考えられる。有機蛍光色素の蛍光寿命は通常ナノ秒レベルであるが、希土類蛍光錯体、特にユウロピウムとテルビウム錯体の蛍光寿命は数百マイクロ秒以上である。ユウロピウム蛍光錯体は普通の有機蛍光色素と比べて、 $10^5$ 倍もの長い蛍光寿命を持つ。この特徴を利用して時間分解蛍光測定法が開発されているが、今回のガドリニウムの蛍光分析では蛍光寿命はとりあえず大きな影響を及ぼさない。

### 3. 大きなストークスシフト (Stokes shift) を有する。

有機蛍光色素の励起スペクトルと発光スペクトルは一部重なっており、通常鏡面对称のような関係にある。そのため励起極大波長と発光極大波長の差 (ストークスシフト) は数十 nm で、励起-発光スペクトル間には大きな重なりがあるのが一般的である。一方、希土類蛍光錯体では配位子が励起光により励起され、エネルギー移動のち希土類金属イオンの励起状態から基底状態への遷移に伴って発光するため、ストークスシフトが非常に大きく 250nm 以上であるのが普通である。このため、有機蛍光色素に見られるような濃度消光 (自己消光) をほとんど受けず、さらに蛍光測定をする際に励起光に由来する散乱光 (レイリー散乱、ラマン散乱) の影響を受けにくいという利点がある。今回の検討では配位子を持たないガドリニウム錯体に対しても大きなストークスシフトが観測され、定性や定量分析に有利に働くかどうかを観測する。

### 4. 発光ピークがシャープである。

蛍光発光エネルギーが非常に狭い波長領域に集中し、発光ピークの半値幅が約 10-20nm である。例えば、約 615nm におけるユウロピウムの蛍光スペクトルは非常にシャープであり、蛍光放射のエネルギーがほとんど 615±10nm の波長範囲に集中している。このようなシャープなピークを持つことは、蛍光量子収率が低くても特定波長での発光強度はブロードな発光スペクトルを持つ有機蛍光色素に比べて大きくなり、より検出しやすいという利点になる。

## 3-2-2 ガドリニウム錯体の蛍光

先述のようにガドリニウムイオン ( $Gd^{3+}$ ) は蛍光を発しない「非蛍光グループ」に分類され、蛍光を発しない希土類金属とされる。さらにここで合成する新規なガドリニウム錯体の配位子は、シュガーボールデンドリマーと呼ばれ紫外-可視領域に吸収を持たない。このことから、これも先述した希土類錯体の強い蛍光の要因の一つである以下の過程、「配位子の光吸収→項間交差による配位子の励起三重項状態の発生→希土類イオンへの分子内エネルギー移動による 4f 電子の遷移→発光」を期待できない。かついずれの希土類でも蛍光が観測しにくいとされる水中での蛍光測定をまず行う。しかし発光すれば数々の利点があることから、まず直接ガドリニウムイオンの 4f 電子を光励起し蛍光が観測できるかどうかの検討を行った。



### (1) 希土類の吸収スペクトルおよびガドリニウム錯体の励起スペクトル

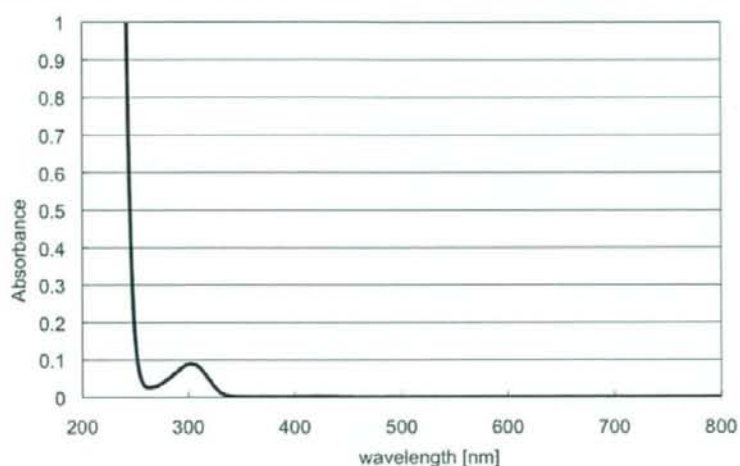


Fig. 3-2-01 塩化テルビウム (TbCl<sub>3</sub>) の水中での吸収スペクトル

典型的な希土類としてテルビウムの水中での吸収スペクトルを Fig. 3-2-01 に示した。300 nm 付近に 4f→4f 遷移と考えられる吸収が観測される。この吸収波長 300 nm を基本として、次の塩化ガドリニウムの蛍光励起スペクトルの測定を行った (Fig. 3-2-02)。

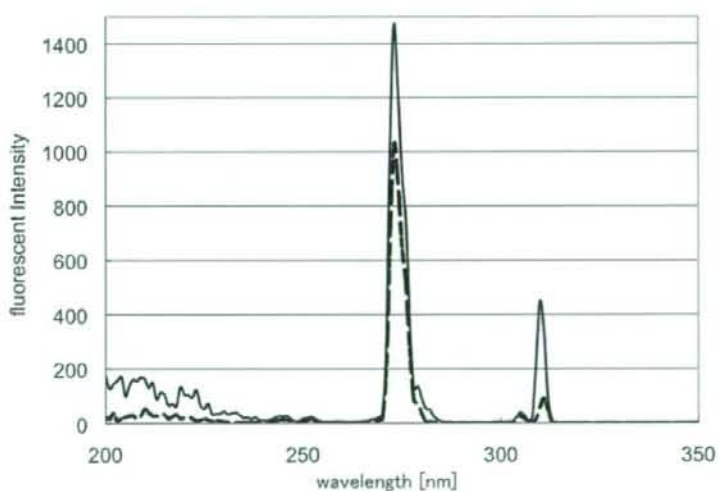


Fig. 3-2-02 塩化ガドリニウムの (GdCl<sub>3</sub>) の水中での蛍光励起スペクトル  
励起波長 (実線…310 nm, 点線…544 nm, 破線…622 nm)

この図中3つの波長の実線、点線、破線が重なっているので分かりにくいですが、いずれの蛍光波長においても 272 nm 付近の励起で極大が観測されることから、以後のガドリニウムの励起波長として 272 nm を用いる。

## (2) ガドリニウムの蛍光スペクトルおよび定量性

任意の濃度における塩化ガドリニウムの蛍光スペクトルを示した (Fig. 3-2-03)。272 nm の励起により 622 nm に蛍光が観測された。これは非蛍光グループに分類されるガドリニウムでも、蛍光発光には不利とされる水中かつ配位子を持たない状態であっても発光する事を示した例である。またこの発光は、極めて強く、シャープで、かつ大きなストークスシフト (272→622 nm) を有することから、希土類に特徴的な蛍光発光の性質を示している。つまり定性および定量分析には有利な性質を備えている。次にガドリニウムイオンの濃度と蛍光強度が、Lambert Beer の式に従い比例関係にあるかどうかを検証した。これが比例関係にあれば蛍光分光法をガドリニウムイオンの定量に応用できるという事になる。Fig. 3-2-04 に種々の濃度における 622 nm 付近の蛍光スペクトルを、Fig. 3-2-05 に濃度と蛍光強度の関係を示した。Fig. 3-2-05 から分かるように濃度と蛍光強度は極めて良好な比例関係を示した。ここには濃度が  $1 \times 10^{-2}$  M 程度までの結果を示しているが、 $1 \times 10^{-5}$  M 程度まで比例関係がある事を確認している。これらの結果より、蛍光分析はガドリニウムイオンの定量に有効な方法である事が確認された。

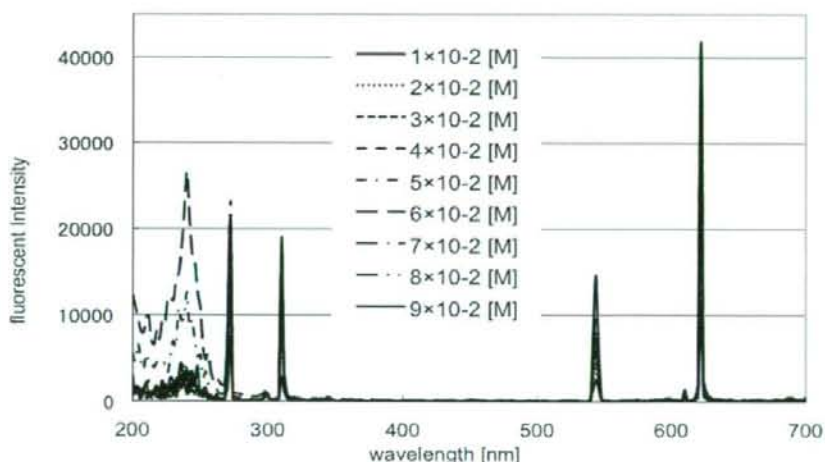


Fig. 3-2-03 塩化ガドリニウムの蛍光スペクトル (水中)

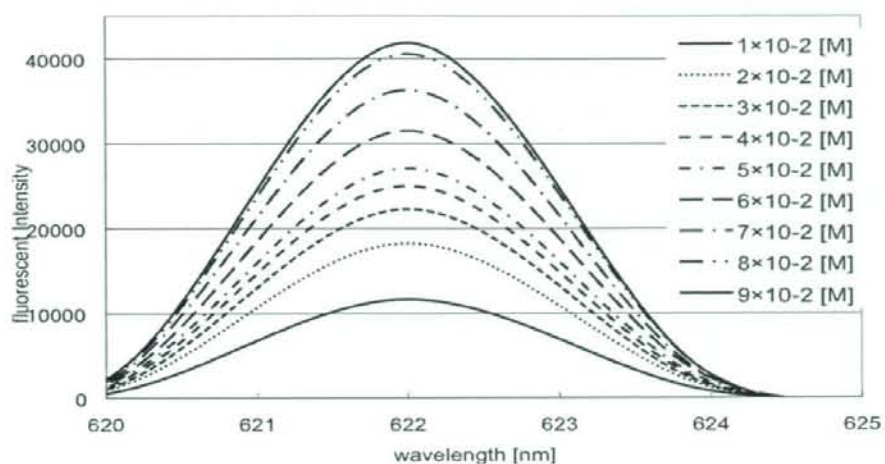


Fig. 3-2-04 種々の濃度における 622 nm 付近の蛍光スペクトル (水中, 272 nm 励起)

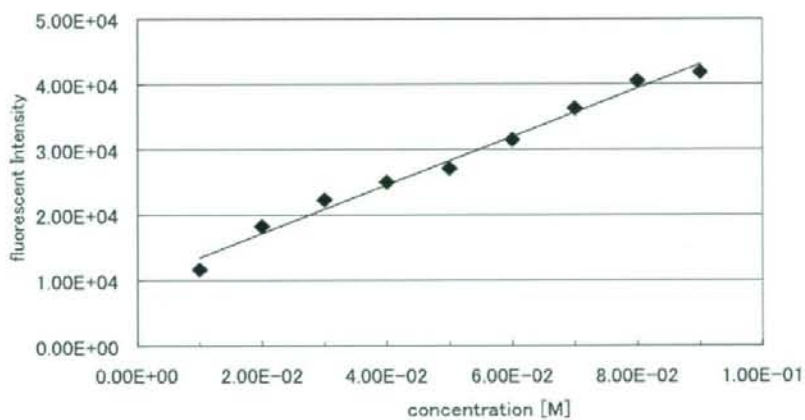


Fig. 3-2-05 ガドリニウムイオン濃度と蛍光強度の関係 (水中, 272 nm 励起)

#### 4. *in vitro* 評価

## 4. *in vitro* 評価

### 4-1 *in vitro* 評価 (1)

#### 4-1-1(a) 超純水中での T1 緩和速度

Gd 錯体である Gd-DTPA (マグネビスト)、および Gd-DTPA-糖誘導体の Gd 錯体である Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)、W、X、Y、Z (新規な MRI 造影剤 (特許出願関係のために、本研究報告書では非公開)) について、T1 緩和速度 (単位は  $[s^{-1} \cdot M^{-1}]$ ) を測定し、造影剤としての効果を見積もった。各サンプルの 1.0 mM 濃度水溶液 (超純水に溶解) の緩和速度を計測した (37 °C)。また、同様の濃度の Gd-DTPA 水溶液 (マグネビスト、日本シェーリング社製) も測定し、比較した (Fig. 4-1-01)。

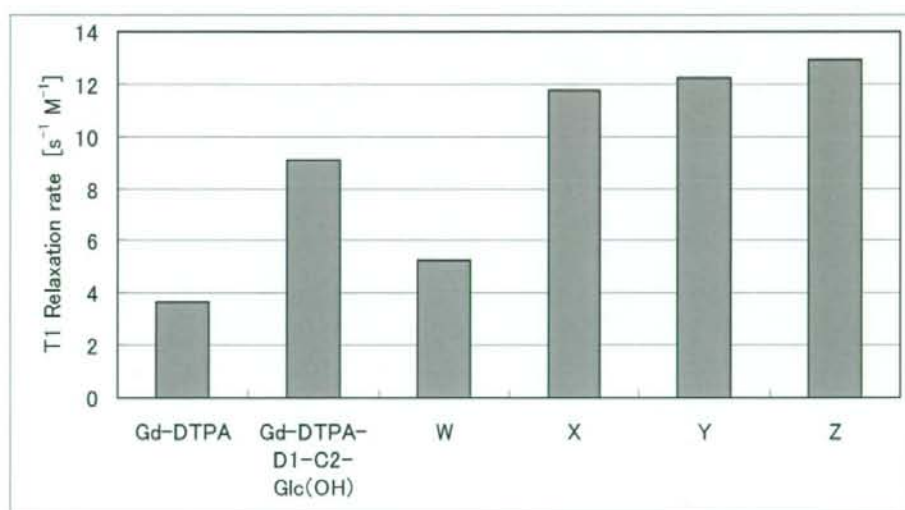


Fig. 4-1-01 T1 relaxation rate for Gd complexes in ultra pure water.

全ての Gd-DTPA 糖錯体について、Gd-DTPA と比べて高い緩和度を得ることが出来た。特に MRI 造影剤 Z の緩和度は  $12.9 s^{-1} M^{-1}$  であり、Gd-DTPA の  $3.7 s^{-1} M^{-1}$  の 3 倍以上の緩和度が得られた。

#### 4-1-1(b) 血清中での T1 緩和速度測定

100 %, 50 %, 0 % の 3 種類の濃度のウシ胎児血清 (蛋白 4.5 g/dl) 水溶液 (超純水に溶解) 中での Gd 錯体、Gd-DTPA (マグネビスト、日本シェーリング社製) および Gd-DTPA-糖誘導体の Gd 錯体、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)、あるいは、W、X、Y、Z (新規な MRI 造影剤 (特許出願関係のために、本研究報告書では非公開)) の 1.0 mM の緩和速度 (37 °C) を計測し比較した。

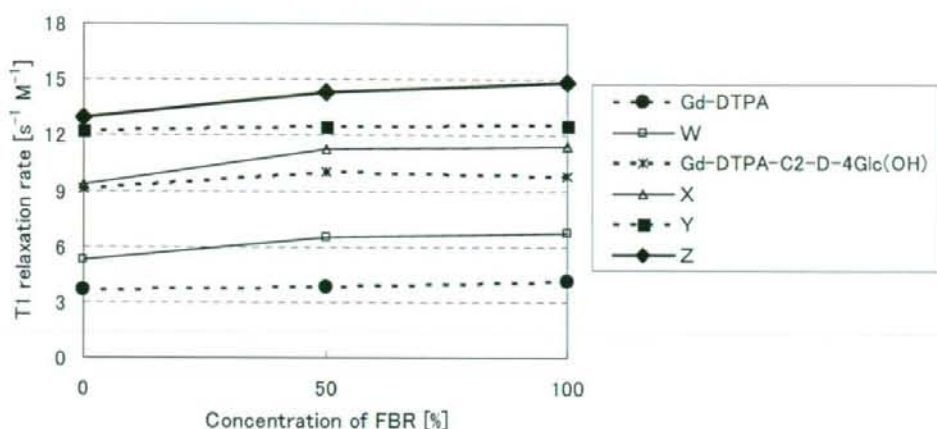


Fig. 4-1-02 T1 relaxation rate for Gd complexes in cow albumin.

Gd-DTPA ではアルブミンの濃度変化による緩和度の変化は見られなかったが、Gd-DTPA 糖錯体では緩和度の上昇が見られた。特に、Gd 錯体 Z のアルブミンの濃度変化による高い緩和度の上昇率を得ることが出来た。

更に、Gd-DTPA の誘導体 A1(OH)、A2(OH)、A3(OH)、A4(OH)、A5(OH)あるいは B1(R)、B2(R)、B3(R)（特許出願関係のために、本研究報告書では非公開）についても T1 緩和速度を測定し、Gd-DTPA のそれと比較した（Fig. 4-1-03）。また、血清中での T1 緩和速度についても比較検討した。

これらの研究結果から、当該研究により開発を目指す標的分子の設計に対するヒント（特許出願関係のために、本研究報告書では非公開）が得られたと思われる。

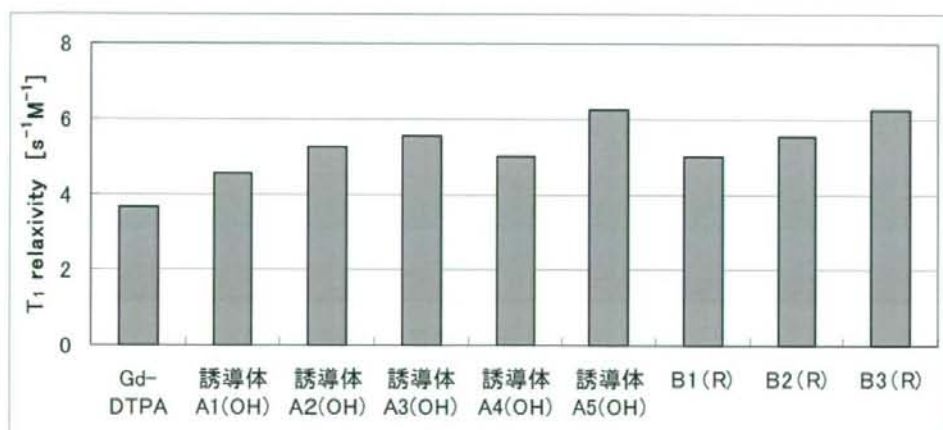


Fig. 4-1-03 T1 relaxivity for Gd complexes A's and B's in ultra pure water.

#### 4-1-2 Gdの定量および *in vitro* 評価（あるいは、*in vivo* 評価）の装置

ICP プラズマ発光スペクトル分析装置 (Fig. 4-1-05) により、サンプル中の Gd 濃度を定量した。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、当該開発研究プロジェクトにより創製される Gd 錯体が生体内で認識する生体機能性物質についての解明とその作用機序の解明が進捗すると思われる。



Fig. 4-1-05 ICP plasma emission spectrometer.

また、BURUKER 社製の Minispeck (0.47 T) (Fig. 4-1-06) による *in vitro* 評価を行った。また、国立大学法人浜松医科大学の超電導 MRI 装置 (1.5 T) および大学共同利用機関法人岡崎生理学研究所の超電導 MRI 装置 (3.0 T)、あるいは福井大学や滋賀県立医科大学の超電導 MRI 装置 (7.0 T) 等の装置を *in vitro* あるいは *in vivo* 評価に用いた。



Fig. 4-1-06 Minispeck NMR instrument prepared by Buruker.

### 4-1-3 DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) の *in vitro* 評価

Gd 錯体である DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) は、第 1 章緒言の 1-1 サブチャプターで記載した様に、調製したシュガーボール dendリマーを形状あるいは合成経路により大別すると、(i)鎖式、(ii)対称型あるいは非対称型、(iii)糖誘導体、(iv)加水分解経路、となる。DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) 更に、種々の Gd 錯体を様々な学生および博士研究員により、また様々な反上条件下で調製し、DEN-OH 創製の最適条件を検討した。結果を、Fig. 4-1-07 に示すが、詳細は特許の関係で省略する。

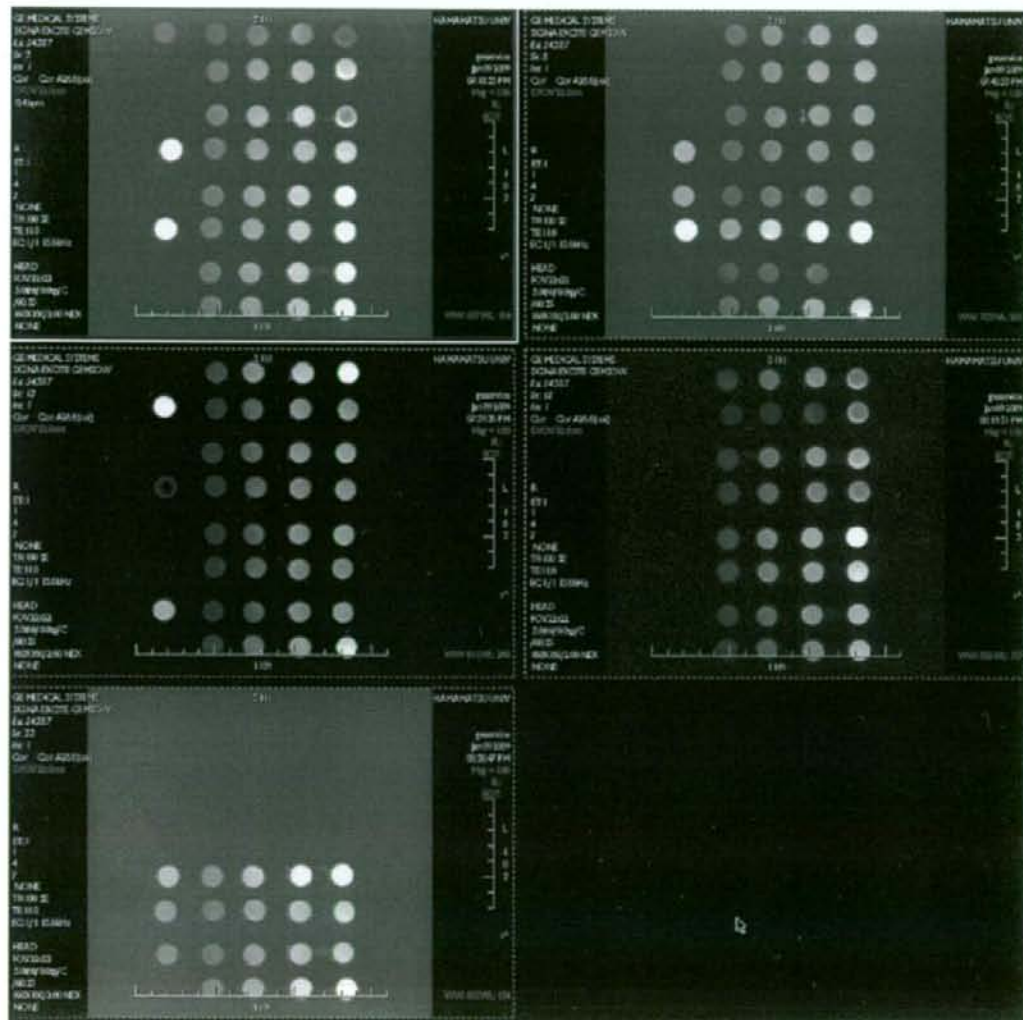


Fig. 4-1-07 *in vitro* Evaluation of DEN-OH in ultra pure water and human serum.

The bright circle shows good drawings by the MRI contrast agent with a good relaxation effect. Each line shows the separate sample prepared by deferent



reaction conditions. The concentration of the Gd complex in medium for each column from the right is as follows: The 1<sup>st</sup>, 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup>, and 4<sup>th</sup> columns from the right correspond to the concentrations of 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 mmol/litter (mM) in ultra pure water and concentration of the 5<sup>th</sup> column is 0.1 mM in human serum.

#### 4-1-3(a) 生理食塩水中での DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) の *in vitro* 評価

様々な条件下で調製した DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) を、国立大学法人浜松医科大学の超電導 MRI 装置により *in vitro* 評価を行った。生理食塩水中での評価結果を、Fig. 4-1-07 にシート 5 枚を纏めて示す (シートは、左上を 1 枚目とし、右上を 2 枚目とする。最後のシートは、左下のシートである。)。Fig. 4-1-07 の各列の右から 1 番目～4 番目カラムは超純水中の結果であり、右から 5 番目のカラム (左から 1 番目のカラム) はヒト血清中での評価結果である。また、各シートに一番下の列は比較品のマグネビストの結果を示す。

Fig. 4-1-07 の超純水中の結果から、右上のシート (2 枚目) の上から 6 列目が最も明るく染まっている。それ故、加水分解条件として、アルカリ条件としては、1N の濃度の NaOH を用いて、室温 4 時間加水分解した時の生成物が最良の造影効果を与える結果であった。

#### 4-1-3(b) ヒト血清中での DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) の *in vitro* 評価

様々な条件下で調製した DEN-OH (あるいは、DEN-OH 類似体) を、国立大学法人浜松医科大学の超電導 MRI 装置により *in vitro* 評価を行った。ヒト血清中の評価結果を Fig. 4-1-07 の右から 5 番目のカラム (左から 1 番目のカラム) に示す。Fig. 4-1-07 のヒト血清中の結果から、右上のシート (2 枚目) の上から 6 列目が最も明るく染まっている。また、同じサンプルは、超純水中でも最も明るく染まっており、ヒト血清中で造影効果の増強が見られた。それ故、4-1-3(a) および 4-1-3(b) の結果を総合して、DEN-OH を調製する加水分解条件として、アルカリ条件としては、1N の濃度の NaOH を用いて、室温 4 時間加水分解の条件が最善の加水分解反応の条件である。

## 4-2 *in vivo* 評価 (2)

我々は2007年度にひきつづき、2008年度も Gd-DTPA を基本骨格とし側鎖を修飾した様々な造影剤を開発したが、これらの新規な造影剤の有用性を調べるべく、以下の要領で *in vivo* 評価を行った。

### 4-2-1 実験方法

#### (1) MR 装置

Siemens 社製の 3.0Tesla (3T) 超伝導装置 (Magnetom Allegra, Siemens Medical System, Erlangen, Germany) に自作の表面コイルを装着して撮影を施行した。

#### (2) 実験動物ならびに疾患モデル

*In vivo* 実験に供されたのは ddy マウス (15 週齢、雄性、体重 40g)、あるいは F344 rat (5 週齢雄性ラット、体重 90g、あるいは 10 週齢、雄性、体重 200g) で、病的状態として、多血腫瘍の代表である肝細胞がんを化学発がんさせた動物モデルを作成した。15 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、通常の飼料ペレットを給餌し、飲水中に 100 ppm となるように diethylnitrosamine (DEN, Sigma Aldrich Japan, 東京) を混じて投与した。12 週後にラットの硬変肝内には多数の hyperplastic, dysplastic な結節と共に数個の多血性の肝細胞がんが誘導された。結果的にこのモデルのラットは体重 250g 程度となった。

#### (3) 造影剤の調整

製造した造影剤の結晶を高精度の電子秤にて秤量して、試験管に取り、生理食塩水を加えて攪拌して、100g 体重あたり投与量が 0.1ml となるように溶液を調整した。投与量は 0.05mmol/kg とした。

#### (4) 投与

25G 翼状針を用いてラットの尾静脈を確保し、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造影剤の急速静脈注射を行い 0.8ml の生理的食塩水でフラッシュした。

#### (5) 撮影

撮像に使用したパラメータは

- 1) T1 強調画像 Spin-Echo 法では 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 法では 3D-VIBE; TR(ms)/TE(ms); 4.5/1.8, NEX; 1, FOV (mm) ; 120, matrix ; 256x208, partition (mm) ; 0.7.
- 3) T2 強調画像では TR (ms) / TE (ms) ; 2000 / 86, NEX ; 4, , FOV (mm) ; 150, matrix ; 256 × 68, slice thickness (mm) ; 2, and slice gap (mm) ; 0.6.

## (6) 標本作製

肝細胞がんの腫瘍モデルのラットは実験終了後、ソムノペンチルの致死量を腹腔内投与の後、深麻酔下に心臓採血し、死亡確認後に開腹して、肝臓を摘出された。摘出された肝臓は4%中性緩衝液(PBS)加10%ホルマリンで24時間以上48時間以内の固定を室温で行った後、自動包埋装置でアルコール→キシレン→パラフィンに置き換えパラフィンブロックを作製し、マイクロトームで薄切して3mm毎の連続切片を作製、各切片をシランコートスライドガラスに貼り付け乾燥機で乾燥した後、ヘマトキシリンエオジンにて染色した。

\*なお、動物の飼育、動物実験に関わる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 基づいて施行された。

## (7) MR 画像と組織標本との対比

連続組織切片上で肝細胞がんの同定を行い、ナンバーリングを行った。MR 画像と個々の肝細胞がん結節を対応させ、次に結節内の血管密度と、造影剤による信号増強効果に注目して画像と組織切片の鏡見像を比較した。

## (8) 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1mM水溶液ファントムに対する信号強度比が計算され、baselineを1としてグラフに表記した。

## (9) 統計

得られたデータは反復分散分析と 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。

## 4-2-2 結果

以下に *in vivo* 造影 MRI の結果を示す。新しく合成されたサンプルは、特許申請前であるので、構造式や分子量等の記載は差し控え、また、我々の付与した code name で呼称する。

以下にそれぞれの時相における 3DVIBE で得られた T1 強調画像を、maximum intensity projection algorithm (MIP) で再構成して表示し、信号強度の推移をグラフに示した。また、特に造影効果の優れたものについては肝細胞がんモデルを使用し、同様に信号強度比の推移をグラフに示した。

なお、今回使用したサンプルの投与直後に死亡した動物がおらず、強い急性毒性を有すると考えられる造影剤はなかった。

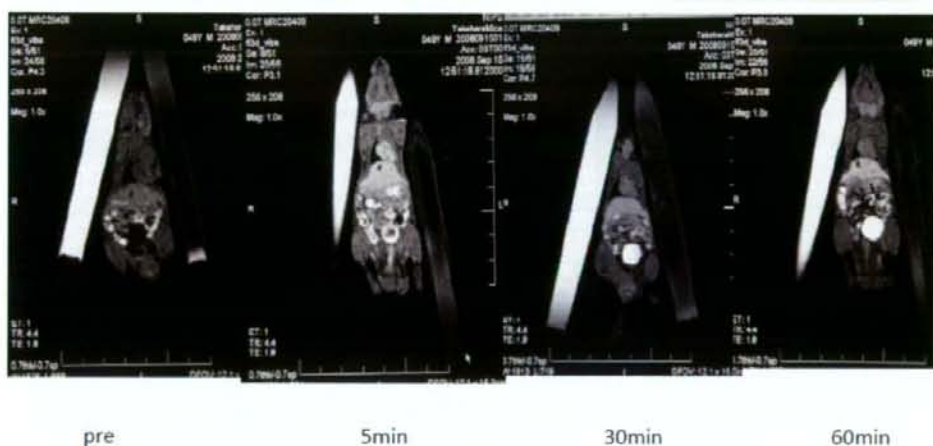


Fig. 4-2-01 SIVA sample (正常 ddy mouse, 0.05 mmol/kg)

本造影剤を投与直後血液に対して強い信号増強効果を呈するが、30分後にはその効果はすでに消失している。膀胱に信号の増強が見られており尿路に排泄される傾向が強いものと思われる。ただし投与30分後並びに投与1時間後に肝臓の信号もある程度増強しうることから、多少は、肝臓への親和性もある程度は存在するものと思われる。