

(2) マグネビスト投与後30分の腎臓組織内元素分析とEDX マッピング像：

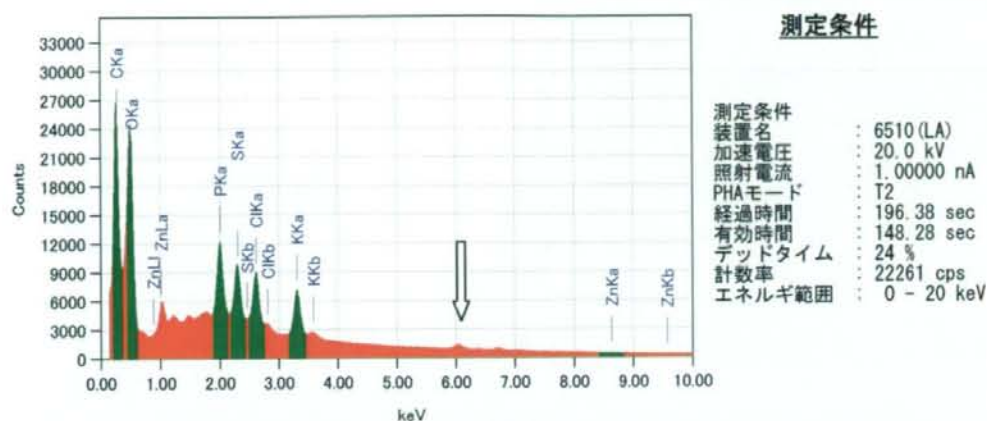


Fig. 4-3-08 マグネビストの腎臓組織内元素分析チャート

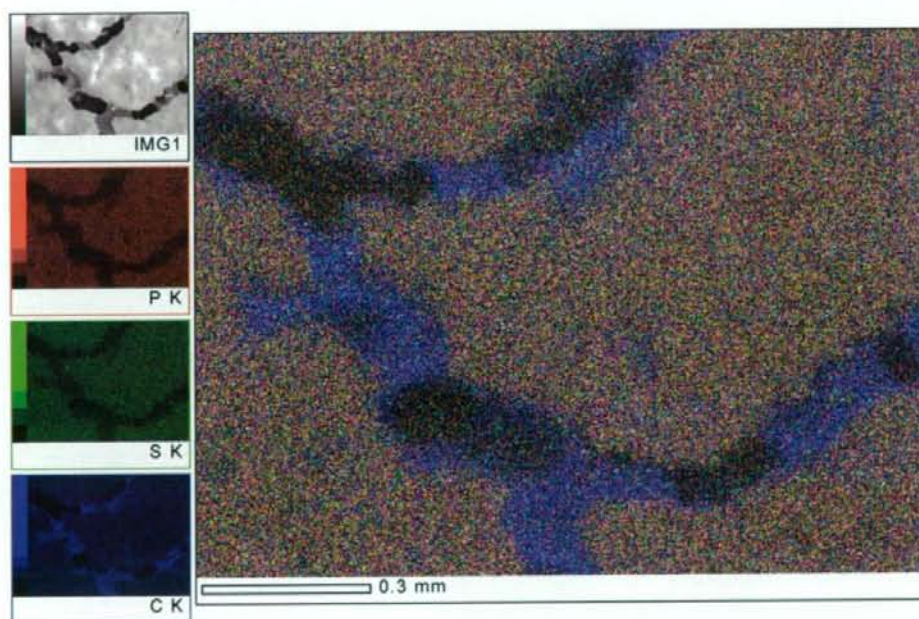


Fig. 4-3-09 マグネビストの腎臓組織内組成元素のEDX マッピング像

以上の2種類の臨床で使用されているMRI造影剤の現状は、十分把握されていないが、体内動態を今回のように走査電子顕微鏡に導入したX線元素分析とそのイメージング像から明らかにする試みは、今までに例を見ない。従って、投与前のオムニスキャンとマグネビストの組成元素の違いやそれらの存在比率の違いが明らかにできる。また、今回は投与後30分目の腎臓組織内のGd元素の分布を明らかにすべく、走査電子顕微鏡に導入したX線元素分析とそのイメージング像の分析技術を導入した。

その結果、Figs. 4-3-06, 4-3-08 のエネルギーのスペクトルにも見られるように、腎臓組織内には 6.1 keV のエネルギーの Gd 元素の L バンド  $\alpha$  が、矢印で示したように、小さくとも確かに存在していることが、明らかに確認できる。しかしながら、イメージング像では、腎臓の糸球体の毛細血管の内皮細胞に当たるリング状に取り込まれている様子が、オムニスキャンの Fig. 4-3-07 のマッピング像の場合に、少し観測される。また、メサンギウム細胞の DNA に相関して存在するリン酸基 ( $PO_4$ ) が、イメージング像としてマッピングされている。また、イオウ S 元素の豊富な蛋白質の存在や塩素 Cl 元素の存在も確認できる。

このように、正常臓器の組織内の微量元素を特定するのも、大変有意義な分析手段ではないかと思われる。

### 4-3-3 ヒト前立腺がん由来培養細胞移植腫瘍モデルマウスに投与前後の MRI 像

#### (1) 投与前の Gd-DETPA-D1-Glc(OH) 組成 EDX 元素分析と SEM マッピング像 :

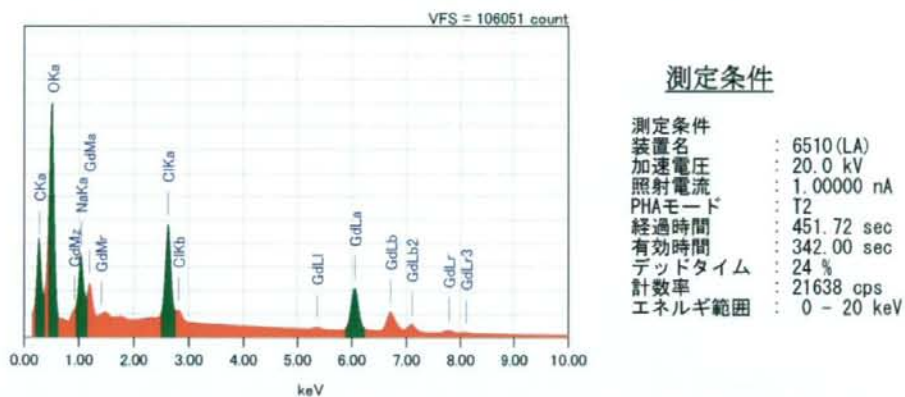


Fig. 4-3-10 Gd-DETA-D1-Glc(OH) の投与前の組成元素分析と測定条件

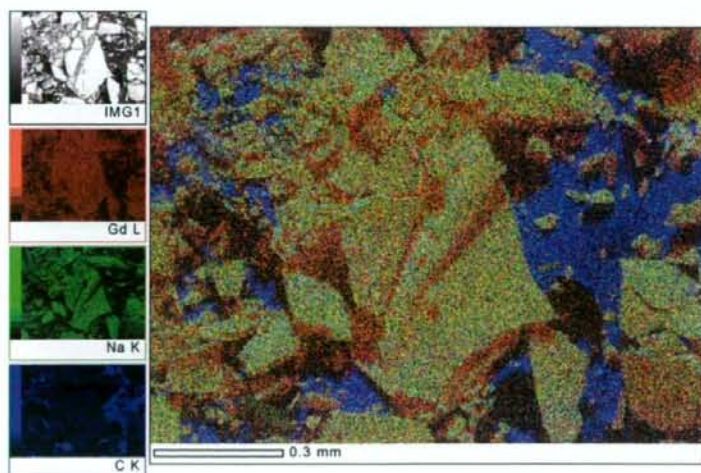
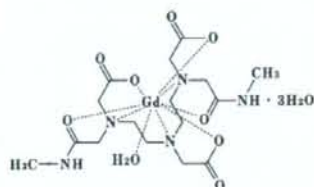


Fig. 4-3-11 Gd-DETPA-D1-Glc(OH) の投与前の組成元素の EDX マッピング像

(2) 0.05 mmol/kg. bw. Gd-DETPA-D1-Glc(OH)投与30分後のMRI像：

新しく合成開発・提供された Fig.4-3-12 の右下の化学構造式を持つ Gd-DETPA-D1-Glc(OH) を 0.05 mmol/kg. bw. の最終濃度で、尾静脈から投与後、約30分後に福井大学・高エネルギー研究センターで購入の3T-MRI (Sigma VH/I 3.0T, GE 横河メディカルシステム 社製のMRI装置2005年4月稼動、当時日本国内では最高の磁場強度を搭載した高画質の頭部専用MRI装置：Fig. 4-3-11)を使用した。

ナノサイズシュガーボールデンドリマー型MRI造影剤(血管)

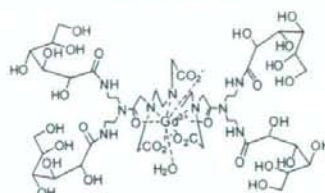


Gadodiamide hydrate (オムニスキャン)  
M.W.: 645.72

特許出願の関係で  
ここでは開示できない

Asymmetric Gd-DTPA-D2-2Glc(OH)  
M.W.: 1118.22

Gd-DTPA(EDA)  
M.W.: 649.75



Gd-DTPA-D1-Glc(OH)  
M.W.: 1450.47



Megumine Gadopentetate (マグネビスト)  
M.W.: 742.79

Fig. 4-3-12 オムニスキャン、マグネビスト及び合成開発されたMRI造影剤の化学構造式

投与前の(1)のFigs.4-3-10, 4-3-11で示したように、Gd-DETP-D1-Glc(OH)の組成元素の中には、NaCl(特にCl元素)がGd元素よりも多く存在している。恐らく原材料のGdCl<sub>3</sub>塩の形で含まれている可能性が高いと思われる。

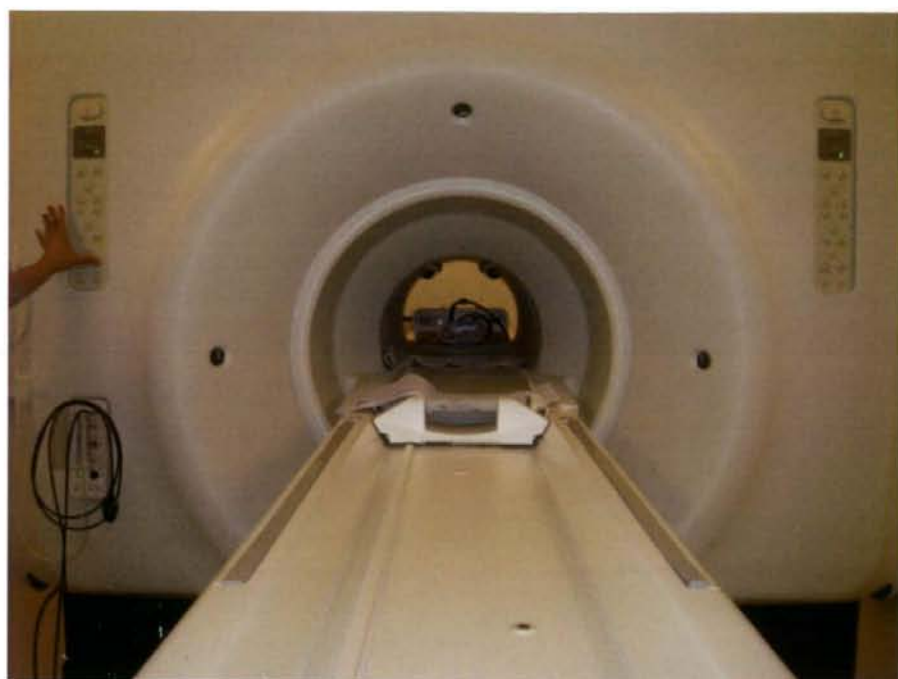


Fig. 4-3-13 福井大学・高エネルギー研究センターの3T-MRI (Sigma VH/I 3.0T 型)

使用した実験腫瘍マウスは  $1 \times 10^6$  cells/30 $\mu$ l のヒト前立腺由来がん培養細胞(PC-3)を移植して3週間後の BALB-c-nu/nu マウスの背中側からと腹側からのマクロ写真を Fig. 4-3-14 で提示する。



Fig. 4-3-14 PC-3 前立腺がん移植マウスの背中側と腹側の写真

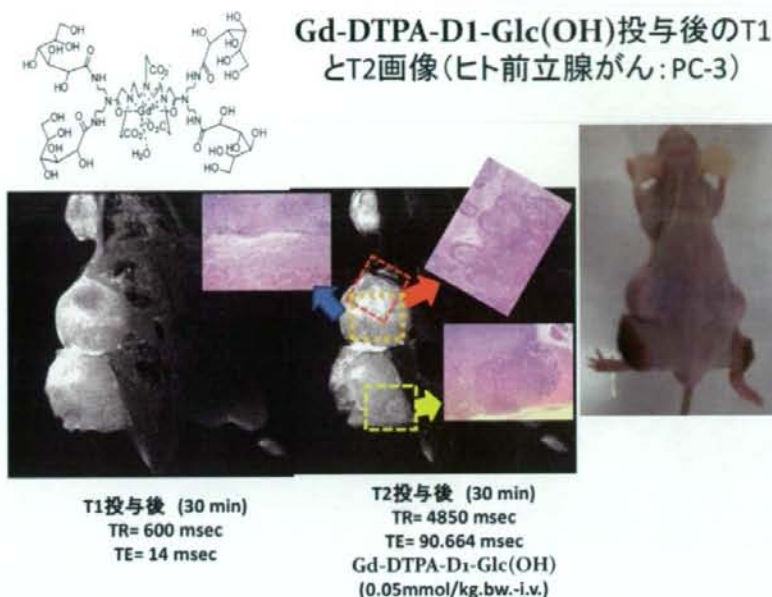


Fig. 4-3-15 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 投与後の T1 と T2 画像

上の Fig. 4-3-15 でも示したように、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の投与有無に関わらず、T1 と T2 のプロトンスピンの縦と横緩和の違いで、左右の MRI 像の違いを明らかにできた。測定時間は約 8 倍を要するものの、T1 と T2 では挿入した 3 枚のヘマトキシリン・エオジン染色組織像でも明らかのように、T2 像で白く強調されている部位のがん組織部位は確かに Viable な領域に対応していることが明らかにできた。また、それらとは引き換えに、同じ腫瘍組織内の Necrotic な領域では、むしろ黒く抜けていることがマウスの左足の大腿部腫瘍の黒い仮皮部と一致することからも判明した。さらに正常部位の皮下脂肪に対応する領域では、T1, T2 像とも白く強調されて画像化されていることも分かる。

以上の事実から、T2 像の白く強調された部位の水分子の周囲が、脂肪分が多い環境にあることが示唆される。その周囲の水分子とは、いったいどのような水分子の運動が許されているのであろうか？振動分光学的考察から考えると、恐らくは運動性の高い水分子の挙動を予測できる。しかしながら、T1 像と T2 像が良く似通った領域の水分子の挙動をどのように理解すれば、良いであろうか？まだ、未解決の課題も多い。

T1 像は、水分子の運動が束縛された領域で、強調されると言われているが、左側の PC-3 腫瘍の 3 個のうち、上から 2 番目の T1 像で黒く抜けている領域が対照的に T2 像では白く強調されている。このように一般的に報告されているストーリーと一致する場合とそうでない場合のイメージ像が観測できた。特に、ストーリーどおりの現象では解釈できない点にスポットを当て、今後、赤外顕微鏡計測を中心とした振動分光学と磁気共鳴分光学の接点を掘り下げて、生体内、特に生のがん組織内の水分子に焦点を合わせて、研究を進めることにより、MRI 造影原理を見極めて、応用研究へと進めるのも、より確実な解決策と言えよう。

開発合成された Gd-DTPA-D1-Glc(OH) で強調すべき点は、T2 像と良く似た T1 像で強調画像が得られた点である。これは、腫瘍の Viable な領域と異なる領域も強調されている点は注意を要する。

(3) 0.05 mmol/kg. bw. オムニスキャン投与30分後のMRI像:

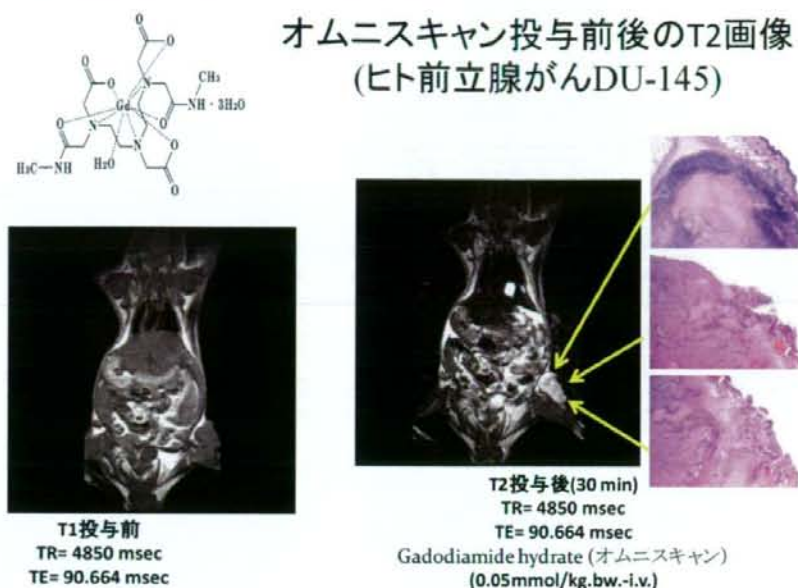


Fig. 4-3-16 オムニスキャン投与後のT1とT2画像

異なるヒト前立腺がん由来の培養細胞(DU-145)をALB-c-nu/nu系マウスの右大腿部皮下に移植して3週間目の腫瘍のマウスに対して、0.05 mmol/kg. bw.の割合で尾静脈より投与して30分後にMRI像を、計測後、腫瘍組織をサンプリングしてホルマリン固定後、パラフィンブロック作成して薄切切片のH. & E. 染色像と共にFig. 4-3-16に提示した。

今回は、合成開発したGd-DTPA-D1-Glc(OH)のT1像と異なり、計測時間を約8倍にして計測しても、腫瘍への白い強調されたコントラストは得られなかった点で、開発されたGd-DTPA-D1-Glc(OH)造影剤のT1像への寄与が、ある程度提示された結果になった。今後、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)のT1像の計測を他の2種類のヒト前立腺がん由来の培養細胞(DU-145, LNCaP)を同じマウスに移植して、再検討する必要がある。

(4) 投与前の Gd-DETPA (EDA) 組成 EDX 元素分析と SEM マッピング像 :

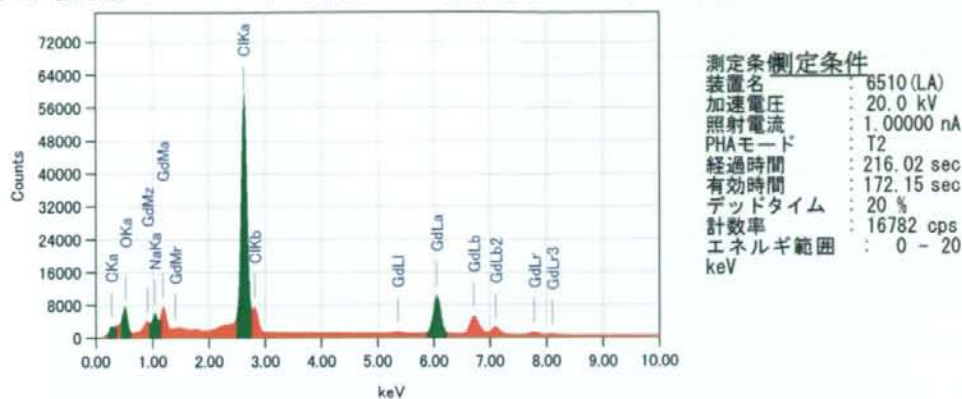


Fig. 4-3-17 Gd-DETPA (EDA) の投与前の組成元素分析と測定条件

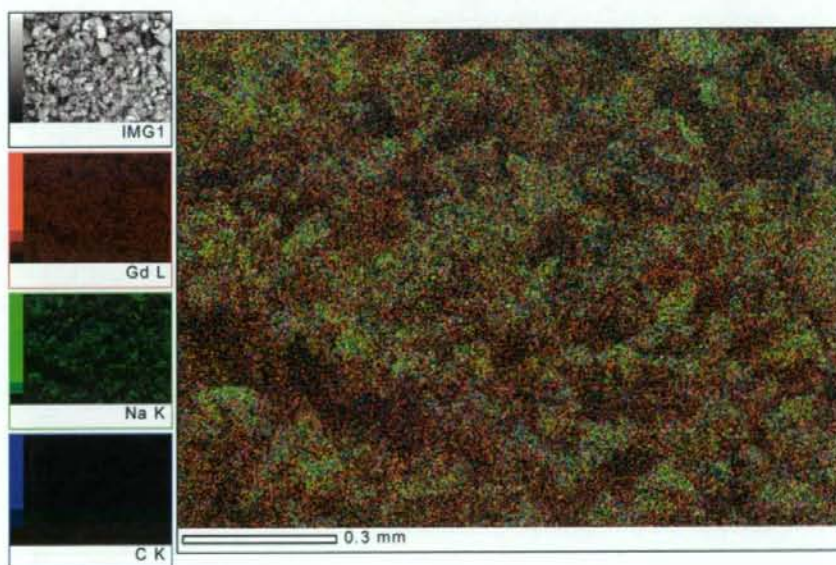


Fig. 4-3-18 Gd-DETPA (EDA) の投与前の組成元素の EDX マッピング像

上記のスペクトルとマッピング像から、新しく開発合成された Gd-DETPA (EDA) の造影剤には Gd-DETPA-AS 2-2 Glc(OH) と同様、NaCl が多量に含まれているものと考えられた。このことが、移植腫瘍モデルマウスに高濃度投与の場合には急性毒性を提示する可能性も否定できない。

(5) 0.05 mmol/kg. bw. Gd-DTPA(EDA) 投与前後のMRI-T1 像 :

### Gd-DTPA(EDA)投与前後のT1 画像(ヒト前立腺がんDU-145)

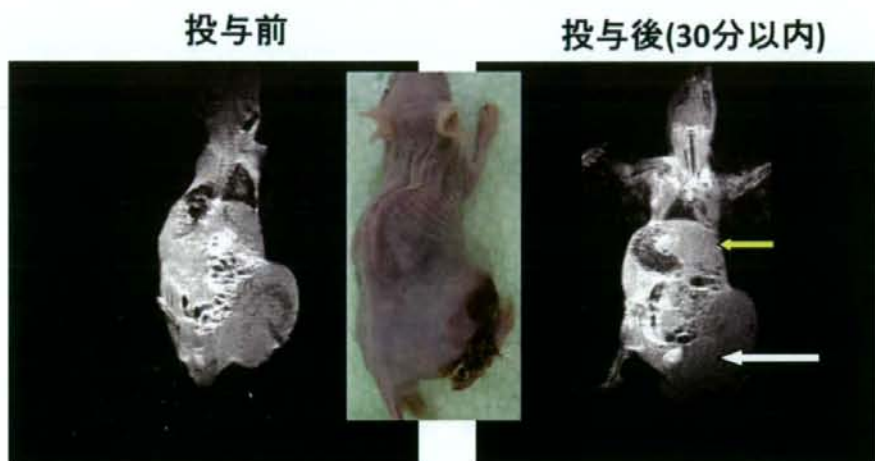


Fig. 4-3-19 Gd-DTPA(EDA) 投与前後の T1 画像と移植腫瘍マウスの写真

(6) 0.05 mmol/kg. bw. Gd-DTPA(EDA) 投与前後のMRI-T2 像 :

### Gd-DTPA(EDA)投与前後のT2 画像(ヒト前立腺がんDU-145)

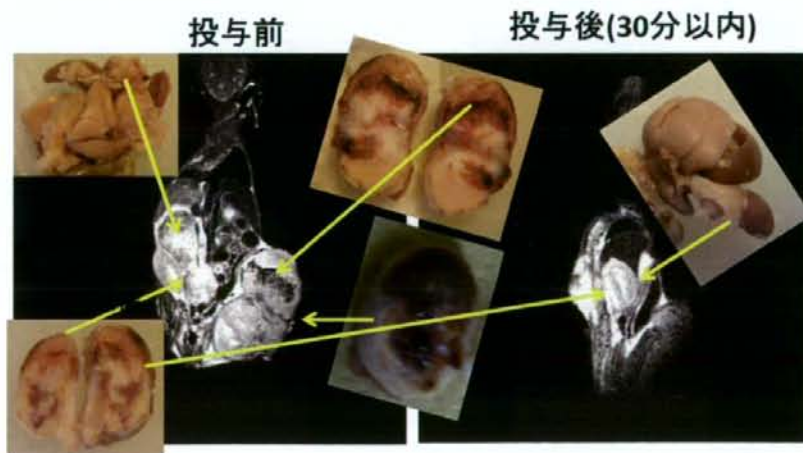


Fig. 4-3-20 Gd-DTPA(EDA) 投与前後の T2 画像と移植腫瘍組織の写真



(7) 0.05 mmol/kg. bw. Gd-DETPA(EDA) 投与後のMRI-T1, T2 像:

### Gd-DTPA(EDA)投与後のT1とT2画像(ヒト前立腺がんDU-145)

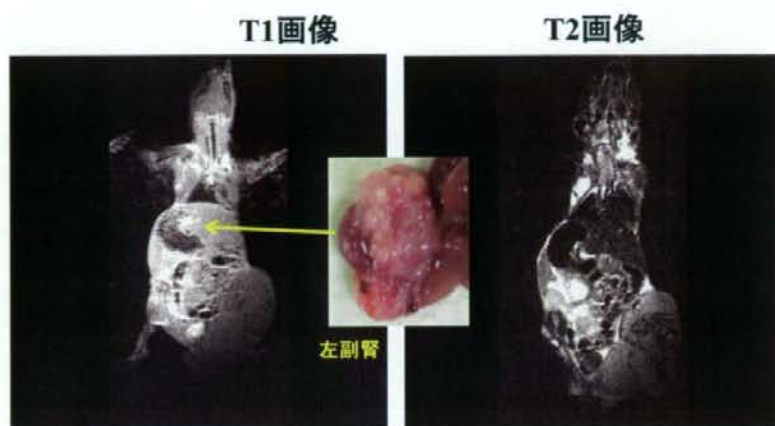


Fig. 4-3-21 Gd-DTPA(EDA) 投与後の T1, T2 画像と左副腎転移腫瘍組織の写真

(8) 0.05 mmol/kg. bw. Gd-DETPA(EDA) 投与前後のMRI-T2 像:

### Gd-DTPA(EDA)投与前のT1とT2画像(ヒト前立腺がんDU-145)

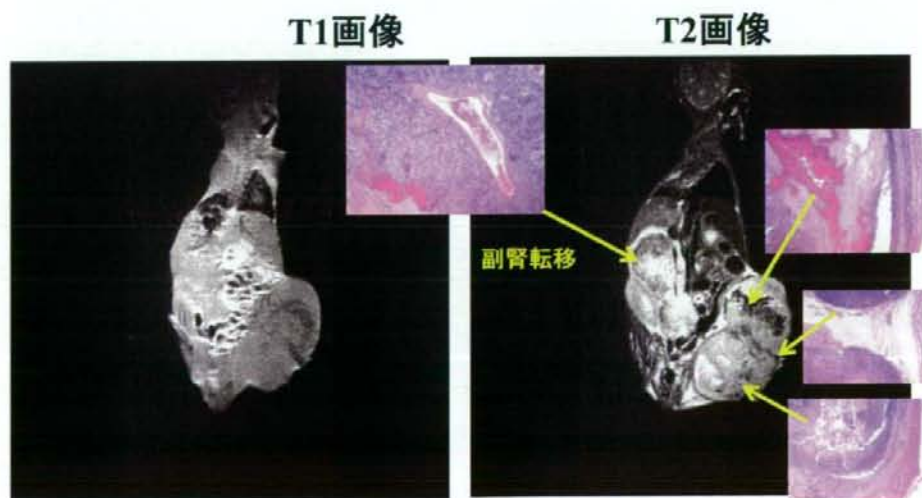


Fig. 4-3-22 Gd-DTPA(EDA) 投与前の T1, T2 画像と腫瘍組織の H. & E. 染色像

新たに開発合成された Gd-DTPA(EDA)に関しては、DU-145 腫瘍から副腎への転移部位も T1 画像より見つけ、かなり詳細に MR I 計測を行なうことができた。Fig. 4-3-19 の Gd-DTPA(EDA)投与前後の MRI-T1 像から、Gd-DTPA(EDA)造影による強調部位が発見され、そのマウスの解剖とそのサンプリングしたマクロの写真(Fig. 4-3-21)とミクロの写真(Fig. 4-3-22)の対応した組織学的知見により、DU-145 移植前立腺がんより左副腎に転移した腺がんであることが明らかにされた。これは正に Gd-DTPA(EDA)の投与後 30 分以内の造影効果を如実に実証化したことになる。今後、その組織内の Gd 元素の取り込み部位を、組織化学的にまた、SEM-EDX 電顕元素分析画像システムを使用した検証が求められている。

従来の造影剤であるオムニスキャンの MRI 像に比較して、開発された造影剤である Gd-DTPA-D1-G1c(OH)と Gd-DTPA(EDA)の今回の前立腺がん移植腫瘍組織への親和性に関して、言及するとすれば、ある程度の腫瘍親和性は出ているのではないかと考えられる。その根拠は、腫瘍組織構造の MRI-T2 画像において、オムニスキャンよりも Gd-DTPA(EDA)の方が、鮮明に出ていることから示唆されたからである。

#### 4-3-4 今年度の実験操作に対する問題点

今後の問題として、MRI 造影剤の投与前と後での同じ画像的切り口面、すなわち水平面での画像切り口の深さの再現性が要求される。これは、マウスの固定台に対してアクリル板での 2 枚のリング状のプロープの水平位置の固定化ができるように、現在設計中である。MRI の計測のスピードの問題がある。現在の計測時間は積算時間を含めると長すぎる。積算時間の短縮と画質の確保が、今後、オペレーターとの連携で計測時間の 3 分間や 5 分間の短縮化の改善が必要である。その技術的向上が実験者自らに要求されているように思われるが、使用する MRI 装置が臨床に使用されているものに対しては、その操作利用範囲に限界があり、臨床検査技師との分担になる可能性がある。また、尾静脈血管に最初から導入した管から、薬剤を静かに注入できるシステムづくりも準備していく必要があると思われる。

また、開発された造影剤 Gd-DTPA(EDA)の投与後の T2 像に与える影響に支障を来している可能性も出てきている。それは、投与することにより投与前の腫瘍組織内の詳細な画像がかき消されている可能性である。確かに腫瘍組織内水分子のスピン緩和に影響を与えていることには変わらないので、投与前に十分な T2 画像情報を取得した上で、この Gd-DTPA(EDA)造影剤の投与を開始して、T1 画像を詳細に検討すべきものとする。

#### 4-3-5 合成開発造影剤の組織学的評価結果の考察と今後の検討課題

##### (1) 本研究分担評価の意義とその価値：

我々の大きなメリットは、MRI 計測後、その生きた組織のサンプリングを行い、必ずマクロ的にもミクロ的にも組織学的検証を行なう点にある。この検証なくしては、MRI 像のより正確な組織学的対応が付ける事ができず、はっきりした詳細な強調画像の解釈が不可能ではないか？との反省に基づいている。組織学的検証無くして、この画像の正確な造影評価は実に困難を極めるとの見地に立って、この研究班の共同研究に臨んでいる。

さて、その造影画像の組織学的側面から評価そのものは、新しく開発合成された造影剤そのものが、従来の造影剤と比較して、如何ほどに改善されているのであろうか？現実的なMRI計測側の評価と相まって、臨床学的応用評価の迫力には劣るが、確実なGd元素を目的組織、特にがん組織に送り込んでいるのであろうか？今までその検証は、ミクロ的には何ら対策が練られていない。MRI像の空間的分解能は3 mmとされている。これはマクロの世界でしか評価できないが、これら計測した同じ検体の慎重なサンプリングと慎重なオリエンテーションを行なわない限り、貴重な検体組織からは目的のGd元素を検出できない。これはマクロからミクロの世界への検証のダイナミックレンジの切り替えの現実的な困難さに他ならない。従って、それは10の3乗倍の細心の注意に相当し、同じ部位を対応させる確率はその逆数になって跳ね返り、困難を極めた組織学的検証を経験的に行なうことになっている。

ここまで述べてきたことから、MRI像のがん組織にH.&E.染色組織像をセットで載せている事実は、決して容易に対応ができていないわけではない。何百枚の薄切切片作成の労力とそのH.&E.染色プレパラートの中から1枚のスライドを探し出す根気が、必要となる。その薄切切片の切り出す深さもMRI装置のソフトで機械的に切り出すのとは、大きく異なる。現実には3 $\mu$ mを1枚1枚切り出して、しかも何百枚もの染色を施している。そこで、その見つけ出したそれらの画像一致とその知見が大変貴重になる。

このような貴重な組織化学的画像の空間分解能は1 $\mu$ mであり、詳細な生体情報を提供している。これら膨大な形態学的情報をこの貴重な組織化学的染色画像から取得するには、実は通常10年間位の経験的修練を要するので、誰でもすぐに正確な病態学的解釈ができるものではないことも事実である。従って、このような経験的背景の元でのMRI-T1像とT2像に対する組織化学的対応の病態学的画像は、価値の高い情報を提供していることには間違いはない。また、その病態学的画像は最終的判断を下すものである。

今までに放射線領域でのMRI画像を多く拝見してきたが、臨床に於いては上記のような組織化学的検証は先ず有り得ない。実験的腫瘍モデル動物であるが故の、特権でもある。この動物実験段階でこそ、このような病態学的検証を十分行なうことが、臨床段階で問題を起こすことなく、今回の班研究の表題にある造影剤の開発・検証の最大の目的に適っている。

しかしながら、純度の高い、しかも量的に確保された開発合成化合物であることがスタートポイントであることには変わらない。今回提供されたGd-DTPA-D1-Glc(OH)とGd-DTPA(EDA)の化合物も、我々のMRI-T1やT2画像の実験データからは、それなりの腫瘍親和性が出ている事実が、見つけられた。従って、これらの化合物の物性データと合成プロセスの記録を元に、論文作成は可能であると考え。今後、合成者とその化合物の物性データを持ち寄って、論文作成への段階に持って行く価値はあると考える。なぜなら、上記の化合物の*in vitro*の物性計測、例えば、<sup>1</sup>H-NMR、IRスペクトル、MSスペクトル、特性X線測定、パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置(ミニスベック)計測による結合性(T1 relaxation rate/sec)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)による血清アルブミンやがん培養細胞との結合性の計測、<sup>153</sup>Gdラベルによるラット血清との親和性溶出プロフィール測定等の基

礎データとの対応を付けて行く必要がある。今までに蓄積されたデータの活用も、今後有益なものにしていく必要性を認める。

## (2) 本研究分担評価の総括：

- 1) MRI の T2 像での強調部位は、共通して腫瘍組織の Viable な細胞領域であることを証明し得た。(Figs. 4-3-15, 4-3-16, 4-3-22)
- 2) MRI の T1 と T2 像の比較により Gd-DTPA-DI-Glc(OH)造影効果により、腫瘍組織内の強調部位の面白い一致と不一致領域の異なる組織学的検証から、その原因が解明でき、そのチャンスを作った。(Figs. 4-3-15, 4-3-16)
- 3) MRI の T1 像は、Gd-DTPA(EDA)の造影効果により、副腎に転移した腫瘍組織を MRI-T1 画像上強調できる事実が得られた。(Figs. 4-3-19, 4-3-20, 4-3-21, 4-3-22)
- 4) SEM-EDX 装置の導入により、造影剤を投与後の目的組織内の凍結切片上やパラフィンブロックを面だした表面から Gd 元素の存在と腎臓組織内局在分布を検証できる可能性を提示できた。(Figs. 4-3-6, 4-3-7, 4-3-8)
- 5) SEM-EDX 装置の導入により、投与前の造影剤結晶や溶液の含有組成元素の Gd 元素以外の不純物 NaCl の混在、特に合成の源材料である  $GdCl_3$  が合成物に混入している可能性があり、合成された Gd-DTPA-DI-Glc(OH)と Gd-DTPA(EDA)に共通して存在していた事実を走査電子顕微鏡に導入した X 線元素分析スペクトルとその元素のマッピング像から明らかにした。(Figs. 4-3-10, 4-3-11, 4-3-17, 4-3-18)

## (3) 本研究分担評価の今後の検討課題とその方針：

- 1) 今後、より造影効果のある化合物の合成開発ができた段階で、第一年目に検証した技術、すなわち SEM-EDX エネルギー元素分析チャートとマッピング像の計測により、目的とする移植腫瘍モデル組織内、および体内正常臓器組織内の経時的変化の Gd 元素の定量化とその局在分布を明らかにすることで、新たに開発合成された造影剤の体内動態を明らかにする。
- 2) より造影効果のある化合物の合成開発ができた段階で、その物性の分析結果を参考にして、組織化学的 SEM-RDX 元素分析や MRI 像の経時的変化の追跡により、移植腫瘍動物の体内動態の相関性を見たい。
- 3) 新たに開発合成された造影剤の投与前後の MRI-T1 と T2 像の計測画像に対応した組織化学的検討を行い、確かに腫瘍組織内に取り込まれている事実とその経時的変化を MRI 計測により追跡して、最後に組織学的形態像の対応を付ける。
- 4) MRI 画像に見る T1 と T2 像のスピン緩和過程と赤外分光領域で見る振動緩和過程の相互関係が、組織内水分子による水素結合様式を明らかにすることで、形態学的組織化学から示唆できるものが多いと考えられるので、今後更に種々の生体分子の水溶液にて、

赤外分光学的計測で追及する価値があると思われる。しかしながら、スピンの緩和過程とO-Hの水素結合の振動緩和過程の時間的オーダーの違いが有るために、今後どのような融合と理論的関連性を付けて、解釈をして行くのかが、今後の大きな課題となりそうである。そのためには、中赤外領域のみならず、遠赤外のテラヘルツ波領域における水分子の回転運動領域からも、生の移植腫瘍組織内水分子の分光計測結果も考慮した、幅広い見方と洞察力でアプローチしていく必要があると思われる。

- 5) 滋賀医科大学にある動物用の拡散型 7T-MRI 装置を共同利用させて頂く予定を組んだので、今後、より詳細なイメージの計測とその解析が、期待できるものと思われる。
- 6) 来年度、合成を分担する班長グループにリクエストする項目としては、先ず合成された物質の精製を十分に行い、毒性試験を終えた段階で、化合物の *in vitro* の物性計測、例えば、<sup>1</sup>H-NMR, IR スペクトル、MS スペクトルの基礎データーを付けて、班員に *in vivo* 評価の判断を仰いで頂きたい。また、いつでも同じ化学組成の化合物、すなわち再現性のある合成過程で行なえる技術と慎重さが要求されると思われる。今までそれぞれの分野で長年培ってきた最高の技術と情熱で、それなりの予算を工面して投入している。今年度分配されている予算は、手伝わせているポストドクターの賃金を無視しても、現在、本研究課題に投入している予算にははるかに及ばないでいることも、配慮すべき点の1つと言えよう。
- 7) 本研究課題で、目指す化合物の有用性を遺憾なく発揮するためには、臨床応用に重点を置いているが、今までの合成物の基礎データーを生かす方向でまとめる必要性も出てきているように思われる。その1つに、開発合成造影剤である Gd-DTPA-D1-Glc (OH) の *in vitro* の物性計測、例えば、<sup>1</sup>H-NMR, IR スペクトル、MS スペクトル、特性X線測定、パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置(ミニスペック)計測による結合性 (T1 relaxation rate/sec)、誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES)による血清アルブミンやがん培養細胞との結合性の計測、<sup>153</sup>Gd ラベルによるラット血清との親和性溶出プロフィール測定等の基礎データーがかなり揃っているようにも見受けられる。従って、Cl 元素の混入の問題を解決して、今一度、Gd-DTPA-D1-Glc (OH)と Gd-DTPA(EDA)を精製して、*in vivo* 評価班に回して頂ければ、今年度報告したデーターの再現性も含めて取り直すことは可能である。
- 8) 本研究課題の推進には、各段階毎に論文報告の義務が課せられていることは、どの研究班でも共通である。従って我々は Gd-DTPA-D1-Glc (OH)と Gd-DTPA(EDA)の直接の合成担当者と合成プロセスとその新規性を議論し、それらの *in vitro* の持てる種々のデータと、上記で示したデーター(Figs. 4-3-15, 4-3-16), (Figs. 4-3-19-22), 及び(Figs. 4-3-10-11, 4-3-17-18)とを照合しながら、論文作成への打ち合わせを協議したいと考えている。現在、不足している腫瘍組織内 SEM-EDX の X線元素分析データーとその組成元素 Gd, P, S, K, and Na のマッピング像の計測である。これらのデーターが取得されしだい綿密な打ち合わせに入りたい。

- 9) 今後、新たな臨床応用に適していることの検証後には、その化合物が供給されるものと期待はしているが、先日配布された3種の化合物(No. 1, 2, 3)の精製を、今一度、お願いしたい。今回の報告書には、No. 2(Gd-DTPA(EDA))とNo. 3(Gd-DTPA-D1-Glc(OH))の化合物の検証を実験腫瘍動物で終えているので、今年度末には残り時間でNo. 1のAssymmetric Gd-DTPA-D2-2Glu(OH)の検証を、投与前後のSEM-EDX分析とマッピング及びMRI-T1, -T2像の計測を予定している。
- 10) 本研究班の研究課題は、臨床応用面から見た緊急の要望に思えるが、MRI-T1像とT2像の枠を超える造影剤でなければ生き残れない、過当競争の中にある問題と捉えている。そのためには、空間分解能を改善する方向と、従来の発想が血管造影から出発しているが、元々糖代謝にアクティブな腫瘍親和性の高い造影剤を目指していたようにも見受けられる。そこで、今後どの方面で絞りを掛けて、合成開発を進めていくのかも、見定めていく必要がある。我々は、どの方面に的を絞っても臨床応用からの貴重な要望に答える必要がある。もう少し、今までの反省に立って、臨床応用からの当事者からの真剣な要望を本班会議にて一同に聞きだして、協議の必要性を感じる。2番目の必要性として、研究成果の集大成のグループが必要ではないだろうか？これは今後最終年度に向かい必要不可欠の作業グループとなるように思える。3番目は、上記の2つの最初と最後をはっきりさせて、常にフィードバックの効く研究体制を、各研究班員の研究領域を有機的連携によって、よりしっかりと構築していく必要性をこの中間の研究成果報告書において提案しておきたい。
- 11) 従来より、生鮮の凍結切片腫瘍組織内の水分子の振動分光学的挙動を予測しながら、凍結切片組織内の生体分子の組織内分布、特にタンパク質2次構造の各成分の比率等のマッピング像を観測してきた立場から、実際の生きた実験腫瘍モデルマウスのMRI-T1とT2像を観測できる機会にふれ、大変感謝している。これらの画像間の関連性を直接結びつけるには、スピン緩和と振動緩和の間には、対象とする緩和の時間的開きと観測する空間的分解能においてまだ大きな開きを感じるが、生体内水分子の挙動において共通性を持たせた、腫瘍組織特異性をキーワードに造影効果をさらに追求することは、それなりの期待感に溢れている。
- 12) 今後の方針としては、もう少し造影効果の本質に議論を持って行き、何を持って造影効果があると言うべき画像診断と言っているのかが、本研究班において明らかにすべきではないだろうか？確かに放射線診療科で間に合わない造影剤では仕方がない。血管造影にどうして拘るのかも明らかではない。また、投与して迅速な診断画像が出ることは望ましいが、血液成分との親和性は12時間後位であるとの*in vitro*のデータにギャップを感じる。ポルフィリン誘導体の光増感剤には各種申請されているが、早いもので体内腫瘍組織親和性は投与してから2時間目から5時間目にピークを迎える。MRI画像診断では、投与前と後の画像が核磁気内に身体がセットされている間(10分間)に、計測ができるのが理想的ではある。ましてや腫瘍組織に至る血管までもが経時的に追跡できるに越したことはない。すでに、臨床放射線医学領域では次世代の造影剤の目論見が出来上

がっているのかも知れないが、我々の処までは届かない。嫌氣的低酸素濃度域である腫瘍組織内血管にまで、果たして短時間内に到達し得るものであろうか？また、糖代謝に特異的腫瘍組織への到達時間は、果たして短時間のスケールで評価して良いものであろうか？ある腫瘍の種類にも限定したものにならざるを得ない。それでは、それ以外の腫瘍に対する造影剤としては、時間オーダーの体内糖代謝の時間を必要とするものとしての有用性に探りを入れるのも一案と言えよう。従って、放射線診療科で率先力として功を發し得るアプローチと、基礎的研究を重視した前臨床学的研究を重視したアプローチの2段階構えで臨むことを提案したい。

- 13) 前臨床学的研究を重視したアプローチには、決して率先的臨床研究のペースに振り回されること無く、新たに開発合成した造影剤に対して、着実に動物実験のデータを集めて報告していく必要があると考える。従って、そのことが逆に臨床応用に貢献し得るものが出てくる可能性を引き出すことにもなるのではないだろうか？それは、必ず研究成果を報告する義務を果たし得ることにもなるからである。
- 14) 少なくとも我々は、開発合成して提供を受けた No. 2 (Gd-DTPA(EDA)) と No. 3 (Gd-DTPA-DI-Glc (OH)) に対して、従来のオムニスキャンと比較して、MRI-T2 像のヒト前立腺がん由来培養細胞(PC-3)の移植による腫瘍モデル組織内増強効果(Fig. 4-3-15: No.3)と、MRI-T1 像のヒト前立腺がん由来培養細胞(DU-145)の移植による腫瘍から副腎に転移した腫瘍組織を新たに投与後 30 分後に造影し発見できた事実を中心に、投与前後のMRI-T1 と T2 像とその腫瘍組織に対応する組織化学染色像を新たに提示できた。さらには、投与前後における、合成された造影剤の客観性を持たせる SEM-EDX 分析装置による新たな Gd 元素マッピング像を提示することができたことは、従来の MRI 研究に少しなりとも新規性を加えることができるものと結論し、本年度の研究報告とする。

## 5. 構造—活性化相関の解明



## 5. 構造—活性化相関の解明

### 5-1 概要

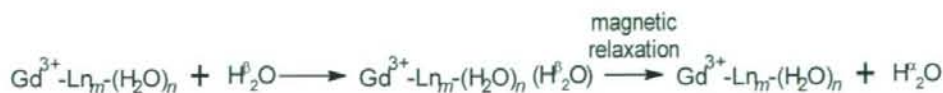
電子計算機の性能向上に伴って分子の物理的・化学的性質を理論的に予測することが可能になってきている。本研究事業の目指す高性能 MRI 造影剤の開発においても計算化学的手法に基づいた検討を通して、MRI 造影機構の推定や合成すべき分子の最適分子構造を分子設計することが可能であろう。平成 20 年度の研究では、計算化学的アプローチにより以下の 3 点の検討を行った。

- (1) 半経験的分子軌道法を用いるガドリニウム(III)錯体の水和-脱水和機構の解明
- (2) 密度汎関数法によるマンガン(II)錯体の水和-脱水和機構の解明と半経験的分子軌道法計算の評価
- (3) 分子力学法によるシュガーボールデンドリマー-DTPA-Gd(III)錯体とヒト血清アルブミンとの親和性評価

### 5-2 半経験的分子軌道法による反応機構解明

#### 5-2-1 ガドリニウム(III)錯体も水和-脱水和機構の解明

MRI におけるガドリニウム(III)錯体の造影効果は希土類元素ガドリニウムの 3 価の 8 重項イオン( $Gd^{3+}$ )の持つ f 軌道上の対電子と媒質分子である水の水素原子核(プロトン)が常磁性緩和機構による磁氣的相互作用を起こし、核磁気共鳴で飽和状態にある陽子の磁気励起状態の緩和を早めることによる。この磁氣的相互作用は、 $Gd^{3+}$ イオンと水分子の距離に依存し、 $Gd^{3+}$ イオンと水分子がより接近することで緩和反応が加速される。 $Gd(III)$ 錯体は $[Xe]4f^7 5d^0 6s^0$ の電子配置から、一般に、 $d^5 sp^3$  混成軌道による 9 配位子の高配位構造をとると考えられ、配位力の強い配位子が存在しなければ媒質の水分子が  $Gd^{3+}$ イオンに直接配位している。水分子の配位力は弱いので、次式のように水和-脱水和が平衡反応として起こっている。この平衡反応の反応速度は速いので、 $Gd^{3+}$ イオンによって緩和された水素核を持つ水分子が媒質のバルク中の水分子と速やかに交換することで、緩和された水素核を持つ水分子が拡散して媒質水全体の磁氣的緩和が達成されると考えられる。



Ln: 配位子  $H^{\beta}$ :  $\beta$ スピンプロトン  $H^{\alpha}$ :  $\alpha$ スピンプロトン

この機構を計算化学的に検証するために、まず、 $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_n+(9-n)H_2O$  ( $n=5-9$ )のモデル錯体分子について半経験的分子軌道法(Semi-empirical Molecular Orbital Theory)の一つで

ある PM3 法により最適構造を求め、最適配位数を求め、さらにその水和-脱水機構による反応の活性化エネルギーを推定し、室温での速やかな反応が可能かを検証した。

## 5-2-2 方法

計算には、Linux ワークステーション (CPU: AMD-Athlon64x2(5600+) メモリ: 3.6 GB, HDD: 320 GB, OS: Fedora r.8) 上で起動させた分子モデリングソフトウェアパッケージ Spartan'06 for Linux Build 129 (Wavefunction inc.製, 2006)を用いた。以後の計算にも同一の計算環境を使用した。

Spartan の GUI 上で  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_n$  ( $n = 5 \sim 9$ ) の初期構造を発生させ PM3 法で構造最適化した。  $Gd^{3+}$  に直接配位していない水分子は配位している水分子に水素結合させた構造を初期構造とした。水分子配位数  $n = 5 \sim 9$  (8-12 配位構造) についてトリカチオン状態を条件として構造最適化を行い、PM3 法プログラムで算出される標準生成熱 ( $H_f$ : [kJ/mol]) を比較し安定配位構造を推定した。さらに、得られた安定構造を用いて、多配位構造からの水分子 1 個の脱離過程における、Gd-O 核間距離と  $H_f$  の変化をプロットし遷移状態構造と活性化エネルギーに相当するポテンシャル面上のエネルギー障壁を算出した。  $Gd^{3+}$  には f 電子が 7 個ありすべて不対電子として軌道を占めているので 8 重項化学種である。しかし、CNDO 法を源流とする半経験的分子軌道法では計算時間の短縮を目的として、内殻電子の影響はすべてパラメータに含まれているとして基本的には最外殻軌道の s 電子原子軌道および p 電子原子軌道のみを取り扱う。半経験的分子軌道法でも最も新しいパラメータセットである PM3 法では d 電子原子軌道も計算に組み込んでいるが f 電子原子軌道は無視している。従って、 $[Xe]4f^7 5d^0 6s^0$  配置の  $Gd^{3+}$  では無電子イオンとして計算されるので、計算に用いたすべてのモデル化合物構造は 1 重項化学種として取り扱われた。

## 5-2-3 結果と考察

Fig. 5-01 に算出された、アンモニア 3 分子と水分子が配位した配位数 8-12 の  $Gd^{3+}$  イオン錯体の安定構造における  $H_f$  (kJ/mol) と相対値を示す。また、Fig. 5-02 には、各配位数における最安定構造の分子模型図を示す。

Fig. 5-01 から明らかなように、PM3 計算では、 $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_n$  が予想通り 9 配位構造で安定である結果を示したが、これよりわずかに 10 配位構造の方が安定であることを示した。先にも示した通り、 $Gd^{3+}$  は  $d^5 sp^3$  混成化による 9 配位構造をとると予想される。PM3 計算では  $5d/6s/6p$  の原子軌道のみを使って計算しているため、計算結果が示した 10 配位構造を構成する混成軌道がどの軌道を付加的に用いているのかは不明である。Fig. 5-02c (9 配位体) と Fig. 5-02d (10 配位体) を比較すると、9 配位体では  $Gd^{3+}$  イオンと配位子の窒素原子、酸素原子との核間距離は、ほぼ均一 ( $RGd-N$ :  $2.570 \pm 0.004 \text{ \AA}$ ,  $RGd-O$ :  $2.461 \pm 0.041 \text{ \AA}$ ) であるのに対して、10 配位体では配位数の増加による核間距離の増加とともに不均一化が目立つ ( $RGd-N$ :  $2.573 \pm 0.007 \text{ \AA}$ ,  $RGd-O$ :  $2.544 \pm 0.260 \text{ \AA}$ )。特に水分子の酸素原子との核間距離は大きく変動している。最大の Gd-O 核間距離は  $2.804 \text{ \AA}$  である。最小の Gd-O 核間距離 ( $2.412 \text{ \AA}$ ) とは 16% もの差があり、この構造が算出された  $H_f$  値から予想されるようには安定な構造ではなく、やはり 9 配位構造が基本的な構造であることを示唆している。さらに、分子軌道法によるエネルギー計算

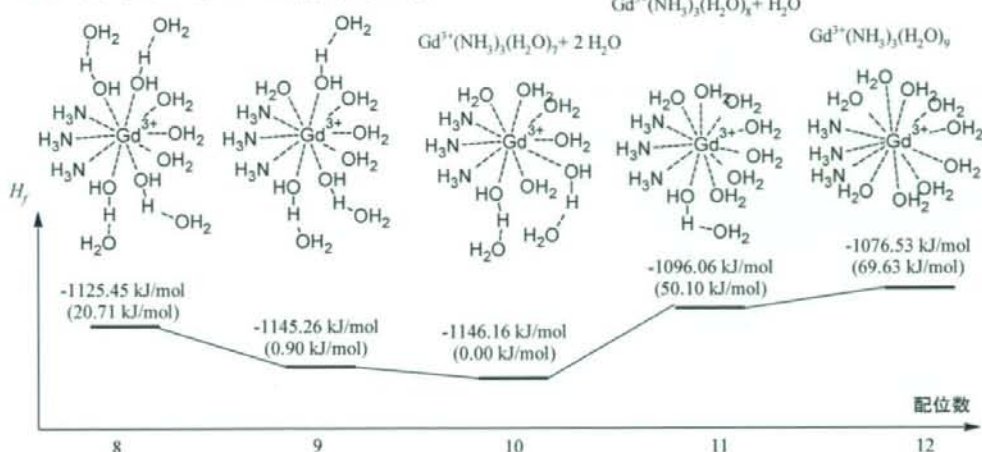
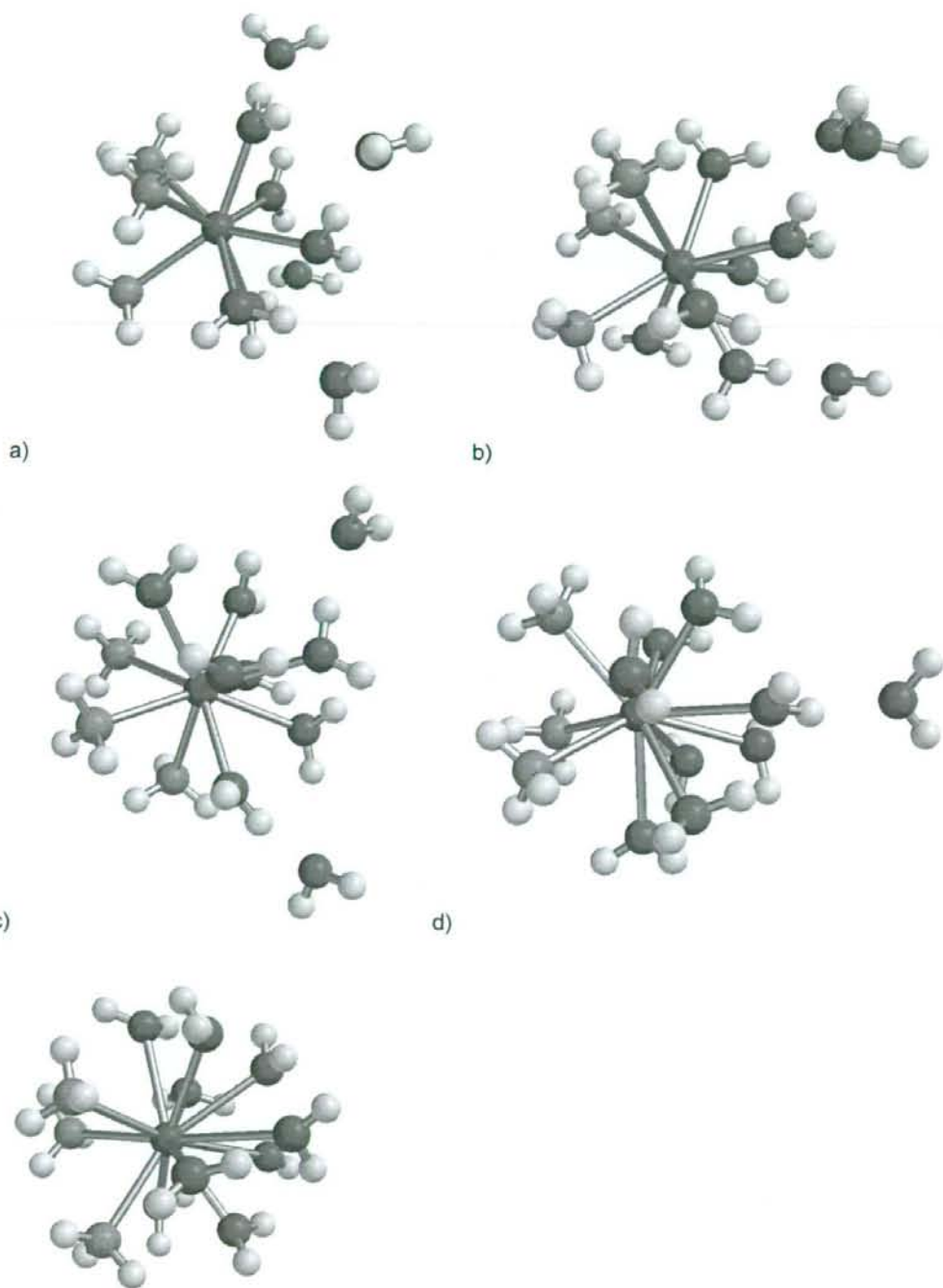


Fig. 5-01 PM3 法による  $\text{Gd}^{3+}(\text{NH}_3)_3(\text{H}_2\text{O})_n + (9-n)\text{H}_2\text{O}$  ( $n = 5\sim 9$ ) 錯体の最適化構造における標準生成熱( $H_f$ : [kJ/mol])の比較  
括弧内は 10 配位構造を 0 kJ/mol としたときの相対値を示す

では全宇宙に 1 分子しか存在しない状況を仮定してエネルギーを計算する。実際には多分子系に基づくエントロピー効果が存在するので、体温程度では、この計算結果をしても、9 配位体よりも低エントロピー構造である 10 配位体の方が不安定であると推定される。

脱水過程の解析では、構造最適化計算で最も安定であった 10 配位構造から付加的な 2 分子の水分子を取り除いたモデル分子構造から、1 分子の配位子水分子を  $\text{Gd}^{3+}$  イオンからの Gd-O 核間距離を徐々に延ばした構造を仮定し、各ステップで核間距離を固定し、その他の構造を最適化して得られる  $H_f$  値を反応座標 (Gd-O 核間距離) に対してプロットした。Fig. 5-03 に  $H_f$  の変化の概略を示す。最も不安定な構造が遷移状態構造である。Fig. 5-04 に 9 配位構造、10 配位構造、および遷移状態構造を示した。この計算では、各反応ステップにおいて移動しつつある水分子の酸素とガドリニウムとの核間距離は固定して計算しているが、反応座標上の二か所の極小エネルギー構造については核間距離の制限は外して最適化している。従って、これら二つの分子構造では計算に含めた水分子の個数が異なるのみで構造最適化条件としては先の計算と同一である。しかし、この結果からは最終の安定 9 配位構造が先の計算に反して 10 配位構造よりも安定になった。先の計算との違いは、先の構造最適化計算では、比較するために分子式を一致させるため付加的な水分子を分子の外側に水素結合させていた。過剰な配位子による不安定化を水素結合による安定化が打ち消す可能性があるが、水素結合のエネルギーは配位結合のエネルギーに対し小さすぎるので、この可能性は否定される。先の計算では 9 配位体の構造最適化の過程でポテンシャル面上の準安定構造 (ローカルミニマム) に落ち込んでしまったものであろうと考えられる。今回の計算で得られた構造では、先の構造最適化計算で求められた構造より Gd-N 平均核間距離が縮まっていることから (9 配位体  $R_{\text{Gd-N}}: 2.561 \pm 0.004 \text{ \AA}$ , 10 配位体  $R_{\text{Gd-N}}: 2.570 \pm 0.004 \text{ \AA}$ )、この錯体構造の安定性がうかがわれる。他の配位構造については、先の計算でも標準生成熱の値が、これら二つの配位体とは大きく異なることから、付加的な水分子の数を減らしての再計算は行わなかった。



a)

b)

c)

d)

e)

Fig. 5-02 PM3 法による  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_n + (9-n)H_2O$  ( $n = 5\sim 9$ ) 錯体の最適化構造

a)  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_5$ , b)  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_6$ ,

c)  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_7$ , d)  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_8$ , e)  $Gd^{3+}(NH_3)_3(H_2O)_9$ .