

A name could not be generated for this structure.

Chemical Formula: $C_{22}H_{25}GdN_5O_{15}^5-$

Exact Mass: 767.14

Molecular Weight: 766.79

m/z: 767.14 (100.0%), 765.14 (80.4%), 769.14 (78.2%), 766.14 (71.9%), 764.14 (50.8%), 768.14 (24.3%), 770.14 (19.7%), 763.13 (7.2%), 771.14 (2.6%), 771.15 (2.3%), 768.13 (1.5%), 766.13 (1.3%)

Elemental Analysis: C, 34.46; H, 4.60; Gd, 20.51; N, 9.13; O, 31.30

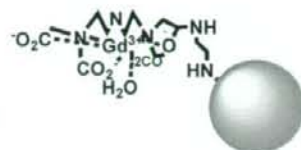


Fig. 6-1-04 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) 構造式と分子イメージング

6-1-2-1 非対称型 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) の質量分析測定 エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析

この新規造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) をエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) による質量分析を行なった。エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析計 ESI-TSQ フィニガン・マット社・SSQ 7000 (Fig. 6-1-05) は、高温キャピラリーから放出したサンプル分子をイオン化したのち、オクタポールチューブレンズによりフォーカスする。これはイオンに対してガス分子の比率を増大させ、簡易なチューニングで感度を高め、より多くのイオンをアナライザー部へ導入し、イオンフォーカスができる。トリプル四重極により高分離かつ高感度で検出できる。さらに高速液体クロマトグラフィによりカラム分離した混在した少量サンプルの質量分析計もできる。今回は Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) を ESI-TSQ ダイレクト測定することで、質量数を確認した (Fig. 6-1-05)。



Fig. 6-1-05 エレクトロスプレーイオン化トリプルステージ四重極質量分析計 (ESI-TSQ) フィニガン・マット社 SSQ 7000

6-1-2-2 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)の質量分析測定 (ESI-TSQ)

今回、我々は新たにMRI造影剤を合成した。Gd-DTPA-D1-Glc(OH)を軸にコア部分はそのままだけに糖鎖を付加した構造である。これを非対称型造影剤と命名した。糖が2個の付加したタイプである Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) (Fig. 6-1-03) と糖が1個の付加したタイプ Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) (Fig. 6-1-04) を合成した。

新規非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)をエレクトロスプレーイオン化法 (ESI) による質量分析を行なった。ESI-TSQ 質量分析計の negative 法で、5 ng/ μ l を注入にし、温度 280 度にて質量数 MW:988.2 を得た (Fig. 6-1-06 の上段)。この質量数は Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)の理論値と一致する。また、ガドリニウム元素特有な質量数同位体パターンによりガドリニウム元素が存在することも確認にした (Fig. 6-1-06 の下段)。

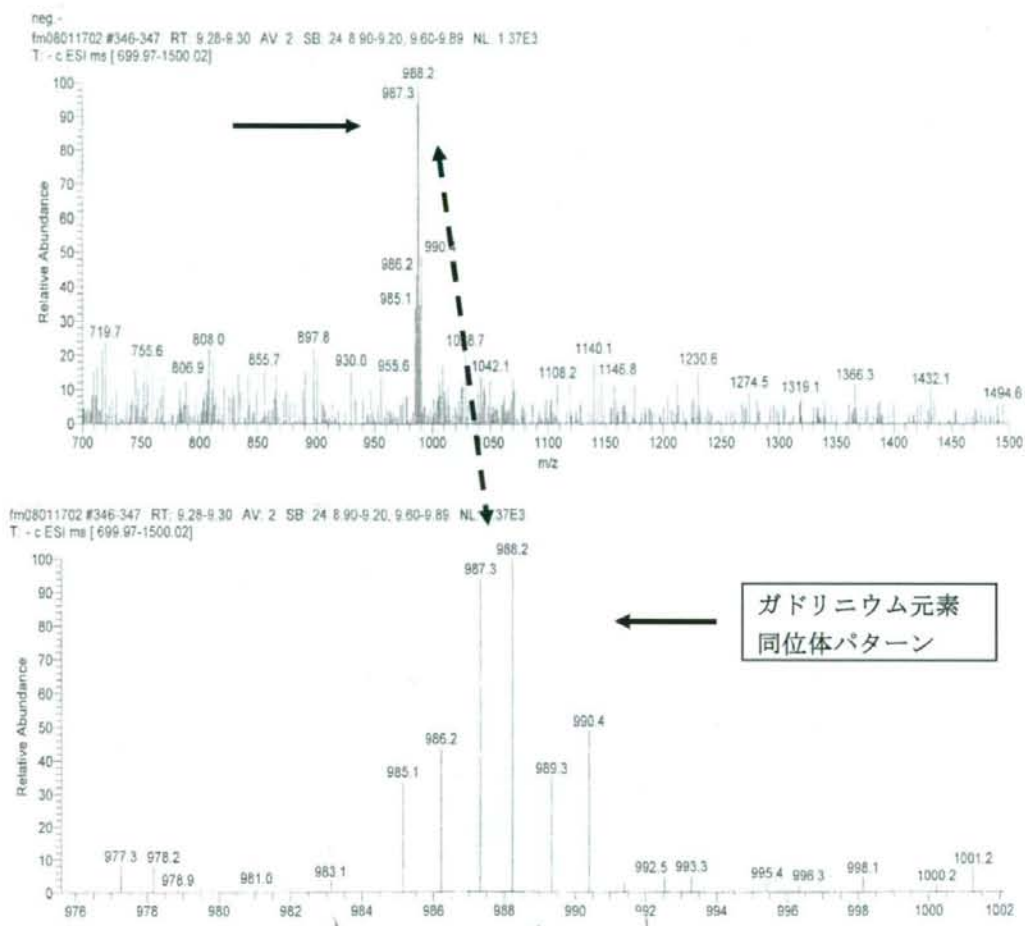


Fig. 6-1-06 ESI-TSQ 質量分析計による新規非対称造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)の質量測定

6-1-2-3 新規非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) の生体分子認識

非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 及び Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) は血管等に造影効果があることから、新しいタイプの MRI 造影剤として期待される。Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) が血管内のどの分子を認識し造影効果を高めているか解明が望まれる。Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) を血漿と混合させると生理食塩水と比較して、緩和率が高まることが分かっている。このことは Gd-DTPA-AS1-2Glc(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で、緩和率を高めるためと考えられる。

そこで、Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) が血液中の物質のどのような分子と結合すると、緩和率が高まり造影できるかを、複合電子顕微鏡システムやパルス磁場勾配型核磁気共鳴装置(ミニスペック)を用いて検討した。

新規非対称型 MRI 造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) は大血管や小血管も造影できることから、血液成分と何らかの結合性があるのではないかと考えられる。血液は体内中を還流し臓器や器官にさまざま物質を生命維持のための栄養物質、代謝産物、酸素や二酸化炭素を運搬してかつ交換している。また、血液は浸透圧調製のために大量の水や各種イオンが存在している。他にも生体防御機構の色々な機能を有し、免疫に関する物質や細胞が循環している。このような多種多様な血液内物質と MRI 造影剤である Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) がどのような結合性を有するのかを検討する。

血液は細胞成分と血漿成分からなる。血液細胞成分は赤血球、白血球及び血小板からなる。血漿成分は血清と血液凝固系タンパク質からなっている。血漿の中には主に水、凝固系タンパクや血清タンパク質や免疫に関するタンパクやヘプチド、脂質、糖質、アミノ酸類、無機質類、窒素化合物類及びホルモン等がある (Table 6-1-01)。

Table 6-1-01 血液成分

血液 (体重の 7~8%)	血漿 (55%)	水 (91~92%)	
		蛋白質 (7.5 g/dl)	{ 血清アルブミン 血清グロブリン(α, β, γ)
		脂質 (1%)	{ 中性脂肪, 遊離脂肪酸, コレステロール, リン脂質
		糖質 (空腹時 0.1%) (グルコースなど), アミノ酸 無機塩類 (0.9%) (Na, Cl, K, Ca, Mg, など) 尿素およびその他の窒素化合物 ホルモン	
細胞成分 (Ht 男子 47% 女子 42%)	赤血球 (1 mm ³ 中) (男子 500×10 ⁴ 女子 450×10 ⁴)		
	白血球 (1 mm ³ 中) (6000~8000)	{ リンパ球 顆粒白血球 (顆粒球) 単球	{ 中性好性白血球 (好中球) エオジン好性白血球 (好酸球) 塩基好性白血球 (好塩基球)
	血小板 (1 mm ³ 中) (28~76×10 ⁴)		

Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH)と血液成分 (Fig. 6-1-07) である血液細胞成分と血漿成分との結合性を複合電子顕微鏡システムを用いてタンパク質沈殿法で検討した。

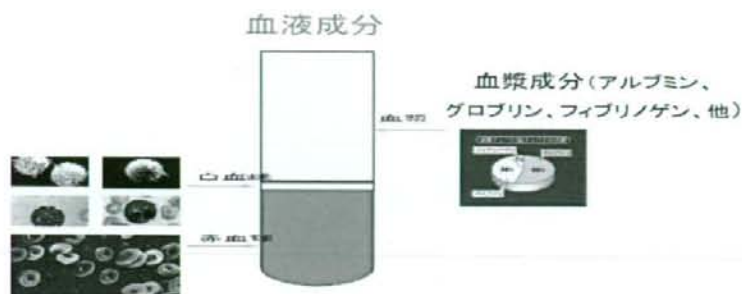


Fig. 6-1-07 血液成分 (血液細胞と血漿成分)

6-1-2-4 複合電子顕微鏡システムによる、Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH)の血液成分 (血漿タンパク質) との結合性の検討

(1) 複合電子顕微鏡システム

複合電子顕微鏡システムを用いて、ガドリニウム元素固有な特性 X 線を測定することで、新規造影剤 Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH)と血液成分との結合性の検討を行なった。測定概要は真空中で試料に高電圧電子線を当てると試料表面にある元素のエネルギー準位の低い電子軌道から電子が弾き出され、弾き出された軌道にエネルギー準位の高い電子が落ちた時、余剰エネルギーが特性 X 線として発生する。電子線が当たったことで、その表面の元素固有な特性 X 線が発生することになる。特性 X 線の周波数は元素固有であることから、特性 X 線を測定することで試料中にどのような元素があるのかが分かる (Fig. 6-1-08)。

このことからジエチレントリアミン五酢酸に配位したガドリニウムに電子線を照射し特性 X 線を測定することにより、試料中にガドリニウム元素の存在が確認できる。ガドリニウム元素の特性 X 線が測定されれば、Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH)が結合している物質特定ができる (Fig. 6-1-09)。



Fig. 6-1-08 複合電子顕微鏡システム 日本電子 JEM200CX

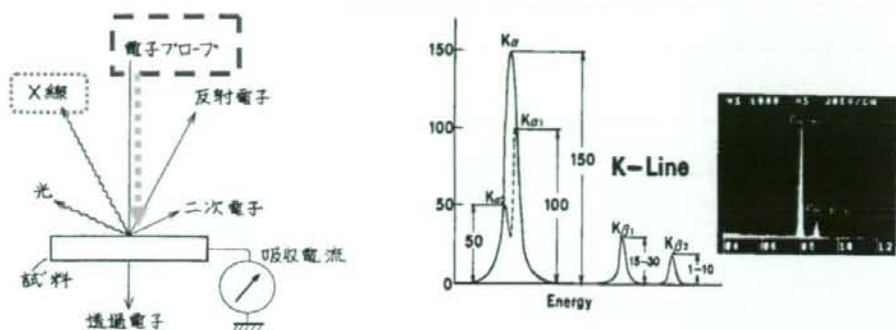


Fig. 6-1-09 直線型特性 X 線集合分光器と特性 X 線の K ラインの相対強度

浜松医大には日本電子製の複合電子顕微鏡システムがあり、試料中の各種元素分析を行っている。浜松医大の装置は非分散型 (EDX) で測定検出感度に優れ、試料の厚さにより SEM 撮影でも、TEM 撮影でも特性 X 線の測定が可能である (Fig. 6-1-09)。

(2) 複合電子顕微鏡システムによる非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) のガドリニウム測定

複合電子顕微鏡システムを用いて、非対称造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) と血液成分との結合性の分析を行なった。試料を入れるためのカーボン製舟形ホルダーを専用を作り、その中に Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) を入れ乾燥の後、真空中で試料に電子線を当てる。試料表面に存在する元素からの、元素固有の周波数である特性 X 線を測定する。その結果、Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 中にガドリニウム元素固有な特性 X 線を検出した。また、ガドリニウムは他の元素と重複がなく測定できる (Fig. 6-1-09)。

測定結果から、ガドリニウム元素固有な特性 X 線を検出したことにより、試料中に Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) が存在したことが確かめられた。(Fig. 6-1-10)。

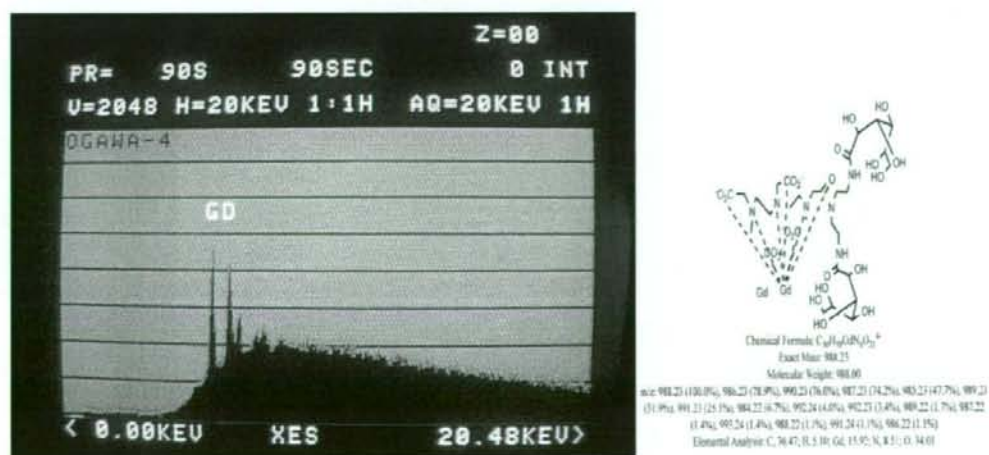


Fig. 6-1-10 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 分子とガドリニウム元素固有特性 X 線スペクトラル

ガドリニウム元素固有な特性 X 線が数本のスペクトラルが得られる。ガドリニウムの特性 X 線には固有な波長を持ち、他の元素と重複がなく、試料中に存在すればきわめて特徴的なピークが得られる (Fig. 6-1-10)。

(3) 複合電子顕微鏡システムによる、血液成分 (血液細胞, 血漿) との Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) の結合性の検討

血漿タンパクは血清総タンパクとそれに血液凝固系タンパクからなる。血漿を構成するタンパク質は、100 種類以上からなる。血漿タンパク質の多くは、物理化学的性質の違いからアルブミンとグロブリンに分けられ。グロブリンは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 β 、 γ に分類されている。また、血小板との作用により出血を止める血液凝固因子のフィブリノーゲン、プロトロンビンが含まれる。

血漿タンパクと Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) との結合性関連を、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。ガドリニウム元素の特性 X 線が検出された。このことから血漿タンパクの何かと Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) とは結合性があるのではないかと考えられる。どの血漿タンパクと結合しているかを検証して行く。この方法を用いて造影剤 Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) と血液成分物質との結合性の検討を行なった。

複合電子顕微鏡システムを用いて、新規造影剤 Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) に存在するガドリニウム元素固有の特性 X 線を検出することができる。このことから、Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) がどのような血液成分と結合しているのかを、血液と混和させたのち血液成分を分画しそれぞれの血液成分を精製して、Gd-特性 X 線を測定することで調べることができる。

血漿タンパク測定は血漿 500 μ l に 0.05mmol/ml Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) を 20 μ l 加えて、37 度で 30 分間緩やかに混和させたのち、タンパク凝固剤を加えて濁りを沈殿させ、15,000rpm で 15 分間遠心分離をした。チューブの底に沈殿したタンパクを複合電子顕微鏡システムでガドリニウムの特性 X 線を測定した (Fig. 6-1-11)。

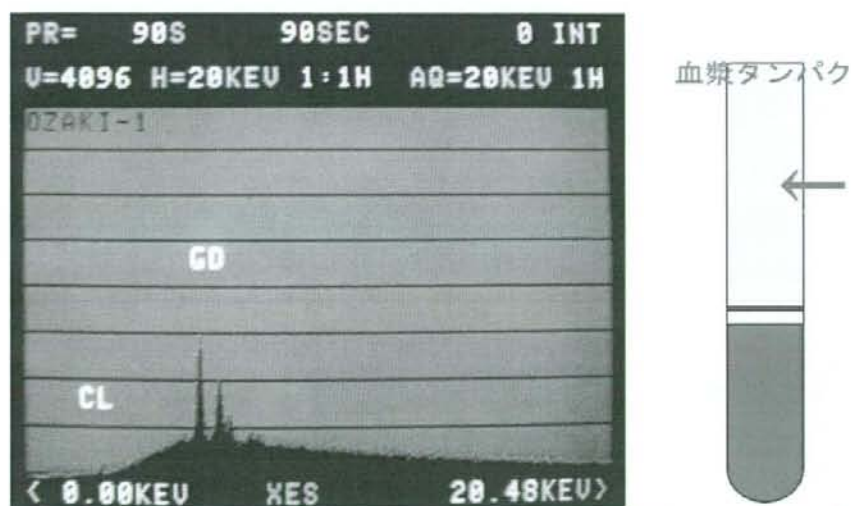


Fig. 6-1-11 血漿タンパクと Gd-DTPA-AS1-2G1c(OH) の混和による特性 X 線の測定

6-1-2-5 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 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)の緩和率の測定

緩和率を測定する装置である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. 6-1-12)。

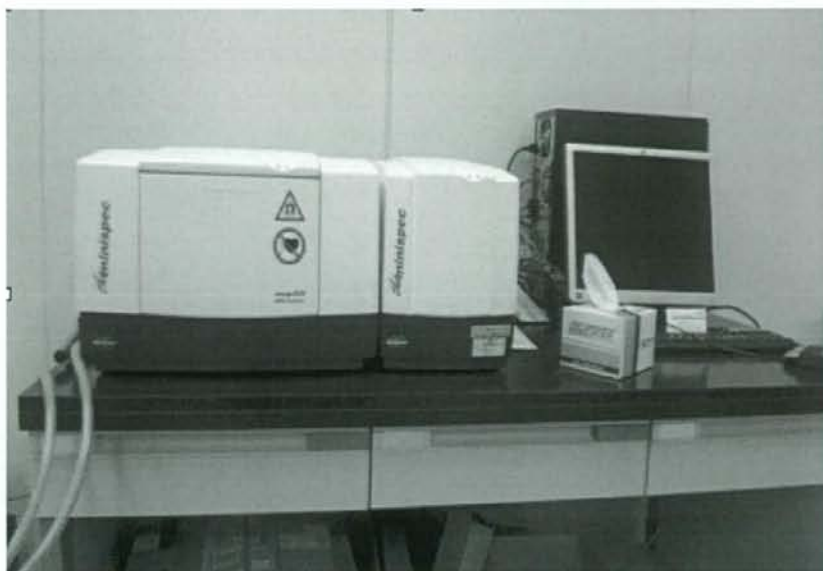


Fig. 6-1-12 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置 ミニスペック

サンプル中のフリーガドリニウムを除いた非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH), と Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) をサンプル管に 3 ml 入れ測定を行った。緩和時間は温度に影響を受けるため、サンプルを測定前に測定温度に保たれたブロックヒータであらかじめ測定温度にした。緩和率は温度に多大な影響を受けるためミニスペックは 37 度に設定していた。測定は測定範囲の補正をするため、まず T1 を測定し出てきた緩和時間を参考に測定範囲の数値を入力しなおしてから測定した。T1 測定は積算を 8 回行い、測定ポイントも 8 ポイントとった。各サンプル 3 回ずつ測定し平均値を導いた。測定後、T1 時間から換算式より緩和率 r_1 を計算した (Fig. 6-1-12)。

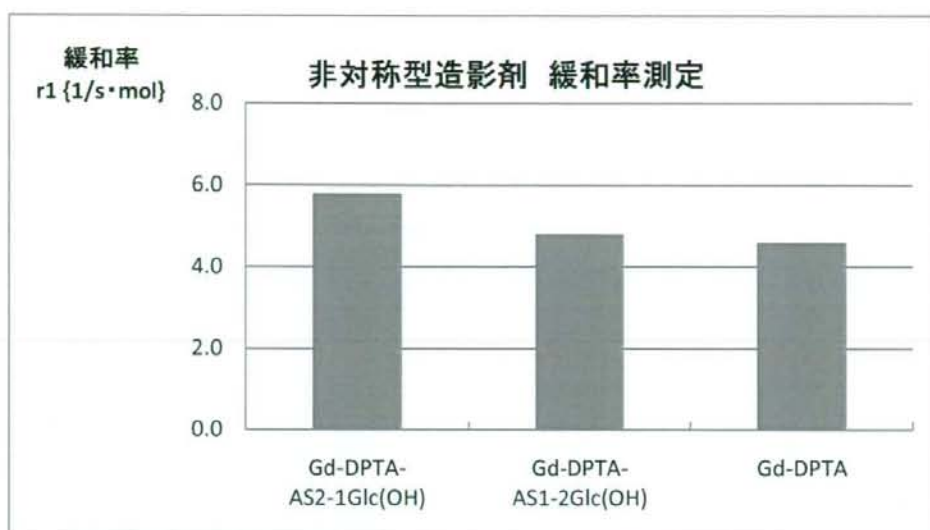


Fig. 6-1-13 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 及び Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH)の緩和率測定

今回、我々は新たに Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を軸にコア部分はそのままだけに糖鎖を付加した構造である、非対称型 MRI 造影剤を合成した。この非対称型 MRI 造影剤をパルス磁場勾配型核磁気共鳴装置（ミニスベック）を用いて緩和率を測定した結果、Gd-DTPA よりは緩和率が高いことがわかった (Fig. 6-1-13)。また、複合電子顕微鏡から血漿成分との結合性も認められた (Fig. 6-1-11)。

データは示さないが *in vivo* の評価から、糖が 2 個の付加したタイプである Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) (Fig. 6-1-03) と糖が 1 個の付加したタイプ Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) (Fig. 6-1-04) とともにマグネシウムより高いコントラストを得ている。

また、血管貯留時間も短いことも得られている。この非対称型造影剤は 4 分子のグルコース型に比べて血管貯留性やコントラスト面においてはさほどではないが、分子サイズが小さいことから、血管内からの少量の出血や滲みや腹腔内における出血など、今までの造影剤では見られなかった現象を、捉えることがサポートできるのではないかとと思われる。

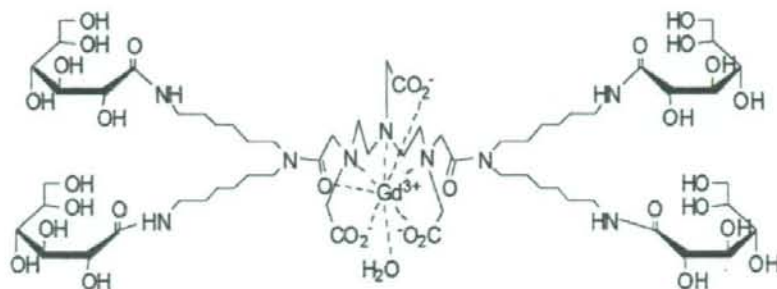
6-1-3 新規ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) における血液成分との分子認識

基本骨格である Gd-DTPA と、組織認識部位である糖鎖との間のブランチ部分の炭素鎖を今までの炭素鎖よりも長くし、コア部と糖末端との間にスペースを作った新規に作成した。新規造影剤として Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) を合成した。

その炭素鎖の長さや緩和度との関係と、血漿タンパク質であるアルブミンやグロブリン等との相互関係を検討した。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を軸にコア部分である Gd-DTPA とターミ

ナル部である糖鎖との間にあたるブランチ部を長くしたものである。そしてその造影効果を評価した。

その中でも、Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)は4分子のグルコース型に比べて血管貯留性やコントラスト面においては、ガン組織や血管に高い造影効果があった。このタイプのロングブランチ型造影剤はGd-DTPA-D1-Glc(OH)と比べても、明らかに造影効果が高いことが判明した。これは、幾つかの測定結果からも明らかであり優れた新しいタイプのMRI造影剤Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)になり得ると考えられる (Fig. 6-1-14)。



Chemical Formula: $C_{62}H_{114}GdN_9O_{32}$

Exact Mass: 1654.68

Molecular Weight: 1654.86

m/z: 1654.68 (100.0%), 1652.68 (83.9%), 1653.68 (83.6%), 1656.68 (59.8%), 1657.69 (48.2%), 1655.68 (47.8%), 1651.68 (43.2%), 1656.69 (25.8%), 1655.69 (20.7%), 1658.69 (19.6%), 1654.69 (18.0%), 1653.69 (10.6%), 1659.69 (6.3%), 1650.68 (5.9%), 1657.68 (2.6%), 1658.68 (1.3%), 1660.69 (1.1%)

Elemental Analysis: C, 45.00; H, 6.94; Gd, 9.50; N, 7.62; O, 30.94

Fig. 6-1-14 新規ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の構造式

6-1-3-1 新規ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) 及び DTPA-C6-D-4Glc(OH) の MALDI-TOF-MS 法による質量分析

(1) Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)

マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法でロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の質量測定のために分子量を測定した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法は MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) と TOF-MS (Time of Flight Mass Spectrometry) の略称である。サンプルは多量のマトリックス(Matrix)と均一に混合された状態にあり、マトリックスには、レーザー光を吸収し、熱エネルギーに変換する。この時、マトリックスのごく一部が急速に加熱さ

れ、サンプルとともに気化する。この時様々の大きさの正イオンがサンプルスライド上で発生する。サンプルスライドと接地グラウンドの間には V_0 の電位差があるので、イオンはある方向に引き出される。ここで電位差 V_0 は、どのイオンに対しても一定であるので、 m/z 値が小さいイオンほど高速でドリフト空間を飛行し検出器に到着する。質量電荷比 m/z 値の違いでイオンの飛行時間が異なることを利用して質量分析を行う方法である。新規ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の質量測定を行なった (Fig. 6-1-15)。

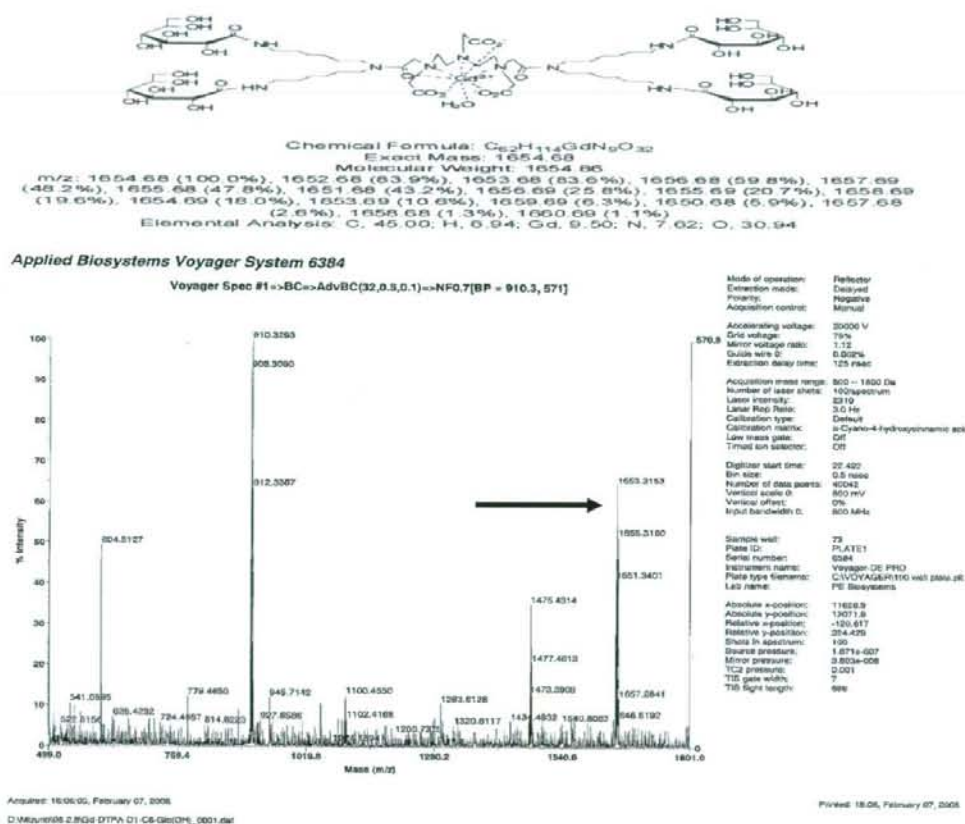
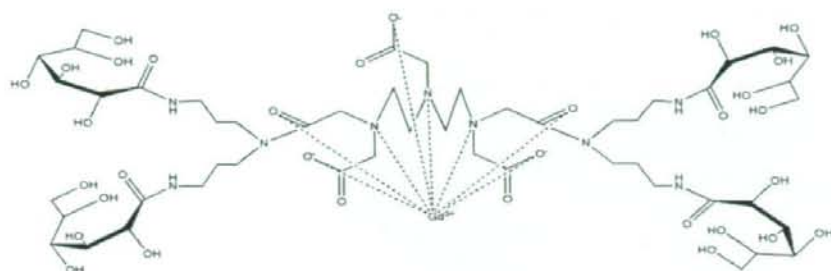


Fig. 6-1-15 ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の質量測定

(2) Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)

ブランチが炭素数3のC3型である、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)の構造式である (Fig. 6-1-16)。また、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)をマトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析法での質量測定で分子量を測定した。Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)の質量数 1486 であることを確認した (Fig. 6-1-17)。



Chemical Formula: $C_{60}H_{100}GdN_6O_{32}$

Exact Mass: 1486.49

Molecular Weight: 1486.54

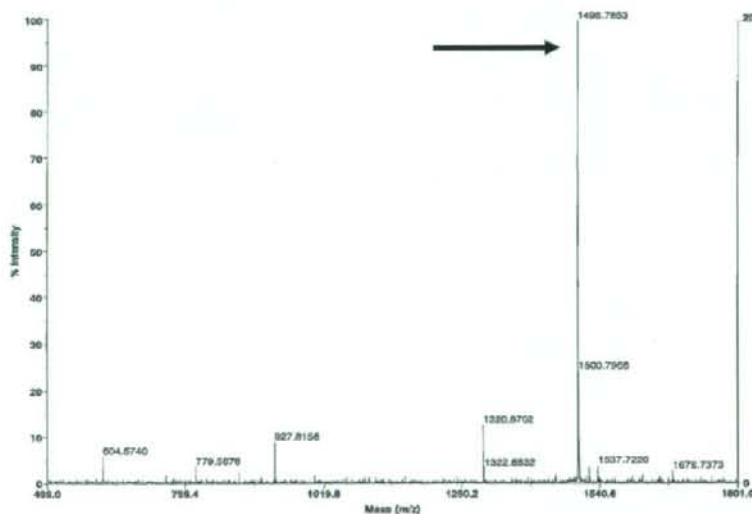
m/z: 1488.50 (100.0%), 1485.49 (96.2%), 1486.49 (89.6%), 1484.49 (73.4%), 1487.50 (66.3%), 1483.49 (55.8%), 1486.50 (50.0%), 1489.50 (49.5%), 1484.50 (30.1%), 1490.50 (19.0%), 1485.50 (13.4%), 1482.49 (7.6%), 1487.49 (4.1%), 1491.50 (3.3%), 1489.49 (2.7%), 1491.51 (2.4%), 1488.49 (1.8%), 1492.51 (1.0%)

Elemental Analysis: C, 40.40; H, 6.10; Gd, 10.58; N, 8.48; O, 34.44

Fig. 6-1-16 ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) の構造式

Applied Biosystems Voyager System 6384

Voyager Spec #1=>BC=>AdvBC(32.0.5.0.1)>>NF0.7[BP = 1488.8, 2051]



Mode of operation: Reflector
 Extraction mode: Delayed
 Pulsar: Negative
 Acquisition control: Manual

Accelerating voltage: 20000 V
 Grid voltage: 75%
 Mirror voltage ratio: 1.12
 Guide wire S: 0.0025
 Extraction delay time: 125 nsec

Acquisition mass range: 680 - 1880 Da
 Number of laser shots: 150/spectrum
 Laser intensity: 2319
 Laser flip Rate: 3.0-16
 Calibration type: Default
 Calibration reagent: a-Cyano-L-hydroxyisovaleric acid
 Low mass gate: Off
 Timed on detector: Off

Digitizer start time: 22.422
 Bin size: 0.5 nsec
 Number of data points: 40042
 Vertical scale S: 500 mV
 Vertical offset: 0%
 Input bandwidth C: 500 MHz

Sample well: 37
 Plate ID: PLATE1
 Serial number: 6384
 Instrument name: Voyager-D2 PFD
 Plate type Skanska: CIVOYASER100-well plate pH
 Lab name: PE Biosystems

Absolute y-position: 31682.4
 Absolute x-position: 31644.3
 Relative y-position: -173.836
 Relative x-position: -618.258
 Stress in spectrum: 150
 Source pressure: 1.03e-007
 Mirror pressure: 2.077e-006
 TIC2 pressure: 0.001
 TRS gate width: 7
 TRS light length: 688

Fig. 6-1-17 ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) の質量測定

6-1-3-2 複合電子顕微鏡システムによる、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の血漿タンパク質との結合性の検討

(1) Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の複合電子顕微鏡システムによる

複合電子顕微鏡システムを用いて、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と血液成分との結合性の分析を行なった。試料を入れるためのカーボン製舟形ホルダーを専用を作り、その中に Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) のを入れ乾燥の後、真空中で試料に電子線を当てる。試料表面に存在する元素からの、元素固有の周波数である特性 X 線を測定す

る。測定結果から、ガドリニウム元素固有な特性 X 線が数本のスペクトラルが得られる。ガドリニウムの特性 X 線には固有な波長を持ち、他の元素と重複がなく、試料中に存在すればきわめて特徴的なピークが得られる (Fig. 6-1-18)。

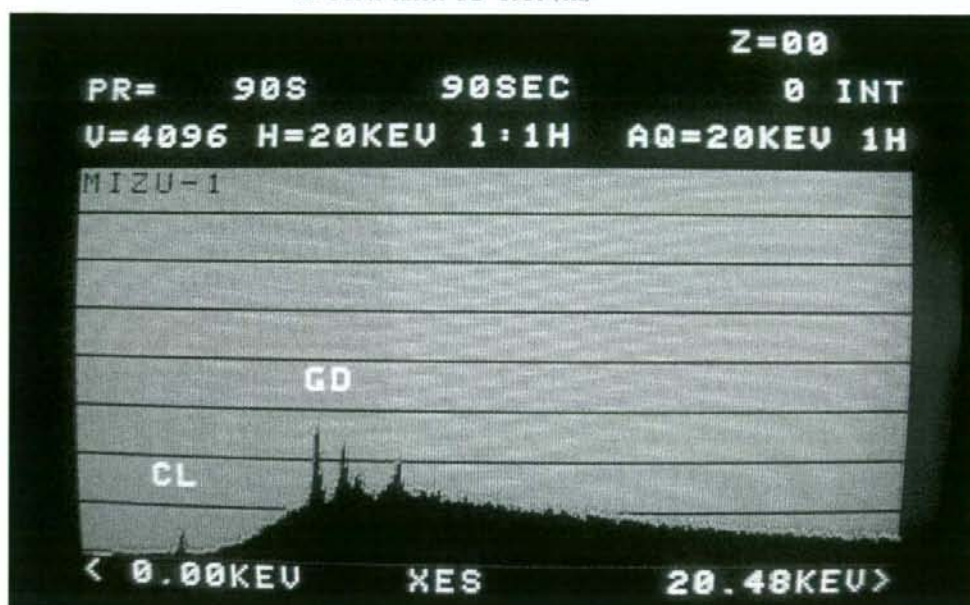
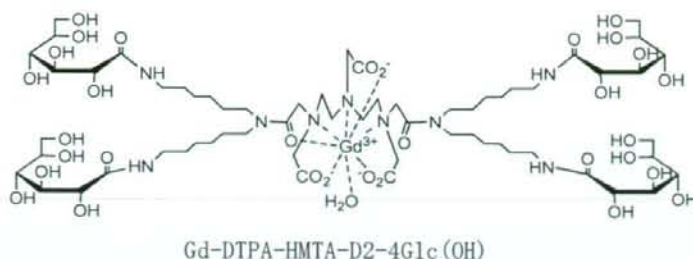


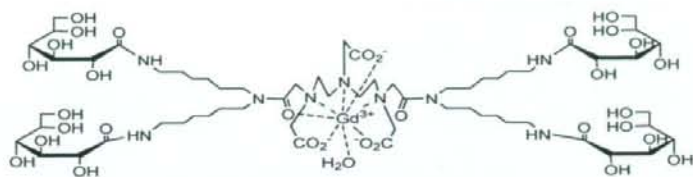
Fig. 6-1-18 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)のガドリニウム固有な特性 X 線スペクトラル

(2) 複合電子顕微鏡システムによる、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)と血漿タンパクの結合性の検討

血漿タンパク測定は血漿 500 μ l に 0.05mmol/ml Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)を 20 μ l 加えて、37 度で 30 分間緩やかに混和させたのち、タンパク凝固剤を加えて濁りを沈殿させ、15,000rpm で 15 分間遠心分離をした。チューブの底に沈殿したタンパクを複合電子顕微鏡システムでガドリニウムの特性 X 線を測定した (Fig. 6-1-19)。

血漿タンパクと Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)との結合性関連を、複合電子顕微鏡システムで特性 X 線を測定した。ガドリニウム元素の特性 X 線が検出された。このことは血漿タンパクの何かと Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)とは結合性があるのではないかと考えられる。ど

の血漿タンパクと結合しているかを検証して行く。この方法を用いて造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)と血液成分物質との結合性の検討を行なった。



Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)



血漿タンパク



Fig. 6-1-19 血漿タンパクと Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の混和による
特性 X 線の測定

6-1-3-3 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ロング プランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の緩和率の測定

緩和率を測定する装置である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 20MHz、測定温度 37度で計測を行なった (Fig. 6-1-20)。

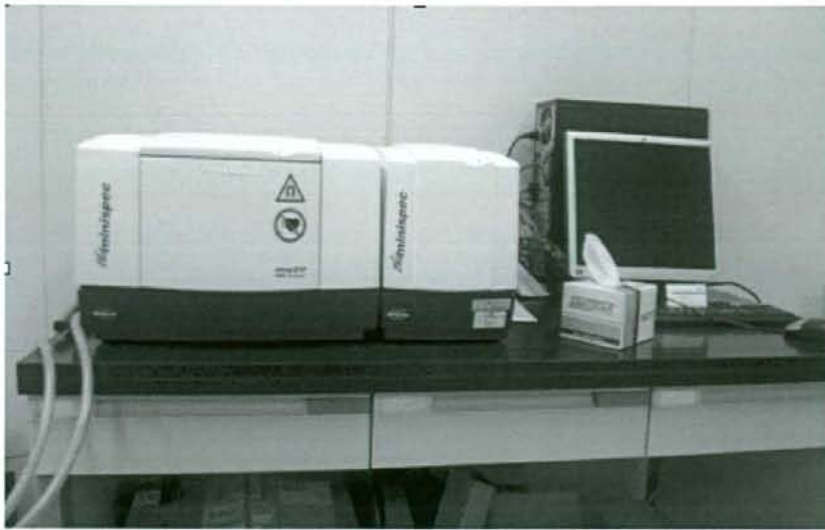


Fig. 6-1-20 パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置 ミニスぺック

サンプル中のフリーガドリニウムを除いたロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)，と Gd-DTPA-DETA-D2-1Glc(OH)をサンプル管に 3 ml 入れ測定をおこなった。緩和時間は温度に影響を受けるため、サンプルを測定前に測定温度に保たれたブロックヒータであらかじめ測定温度にした。緩和率は温度に多大な影響を受けるためミニスぺックは 3.7 度に設定していた。測定は測定範囲の補正をするため、まず T1 を測定し出てきた緩和時間を参考に測定範囲の数値を入力しなおしてから測定した。T1 測定は積算を 8 回行い、測定ポイントも 8 ポイントとった。各サンプル 3 回ずつ測定し平均値を導いた。測定後、T1 時間から換算式より緩和率 r_1 を計算した (Fig. 6-1-20)。

**(1) パルス磁場勾配型核磁気共鳴装置ミニスぺックを用いて、
Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) 及び Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) の緩和率速度の測定**

造影剤のガドリニウムと水の酸素原子のプロトン緩和率を測定することにより、緩和率速度を算出し、造影剤としての効果を調べることができる。緩和率速度測定はサンプルの 1 mM 濃度水溶液(超純水に溶解)の緩和率速度を計測した(37 °C)。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. 6-1-21)。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 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)，Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)の緩和度は $12.9 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ であり、Gd-DTPA の $3.7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$ の 3 倍以上の緩和度を得られた。

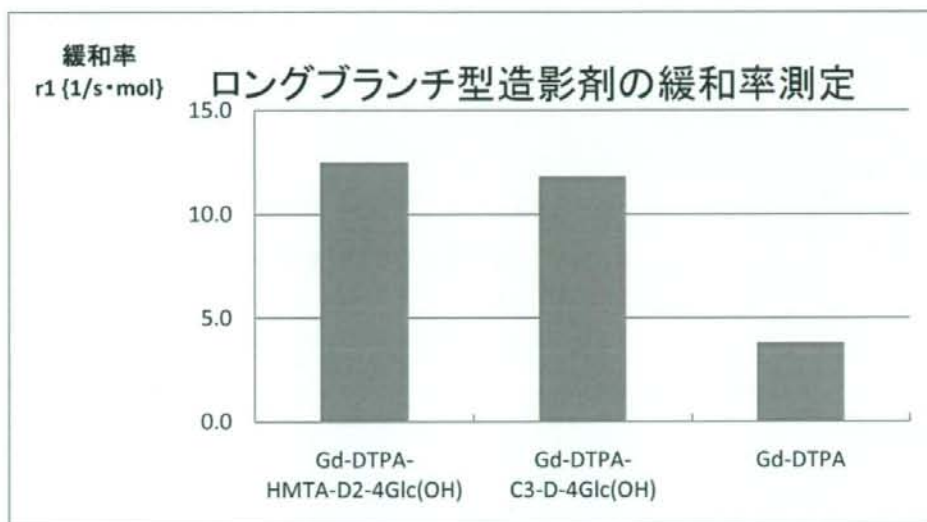
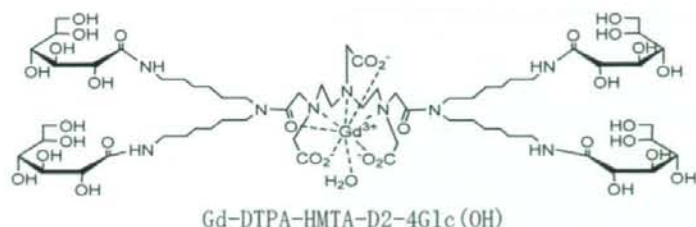


Fig. 6-1-21 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)とGd-DTPA-C3-D-4Glc(OH)緩和率速度の測定

ミニスペックの測定限界が緩和時間 25m s なのでサンプルの T1 緩和時間の値により測定濃度を 2 種類用意した。T1 緩和時間が 25m s より短い場合はサンプルに対して 7 倍の濃硝酸を加えて T1 緩和時間が 25m s 以上のものは、サンプルと同量の濃硝酸を加え 12 時間経過後ミニスペックで T1 を測定した。

(2) ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)と血清アルブミンとの結合性における緩和率の測定

ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)はブランチ部の 6 炭素鎖からなることにより、タンパクとの結合の度合いが上がり、ガドリニウムと水の水素原子のプロトン緩和率に変化が生じる可能性がある。そこで、ブランチ部の炭素鎖が 6 個の Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)と 2 個の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)と血清アルブミンとを混合させ、ミニスペックで緩和率を測定した (Fig. 6-1-22)。

サンプルの 1 mM 濃度水溶液 (超純水に溶解)の緩和速度を計測した (37 °C)。Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)と、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の緩和度はさほど大きな差はないが、ブランチ部が長い方が緩和率は高く、実際の肝臓がんラットを用いて MRI 画像においても高いコントラストが得られてことと一致している。4 章の *in vivo* の評価を参

照のこと。ブランチ部が長い方（炭素鎖が長鎖の方）が緩和度を高めることが分かった。

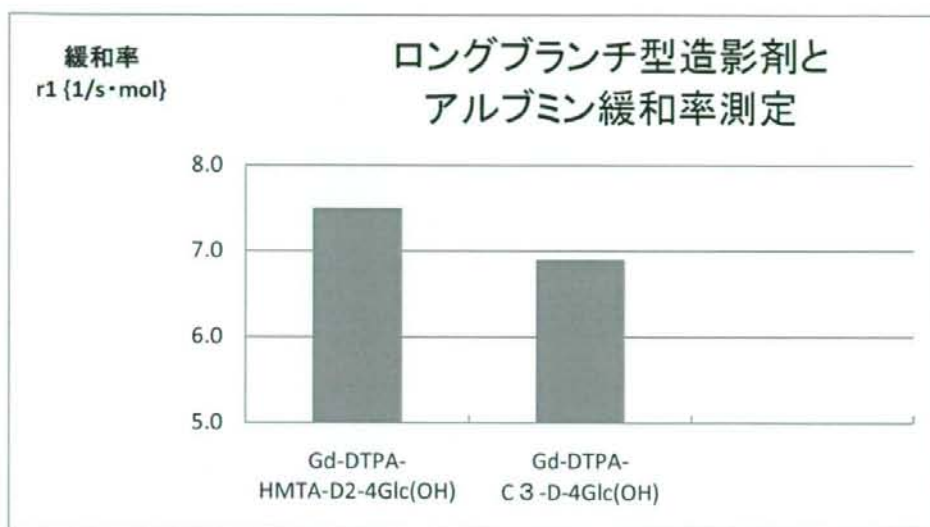
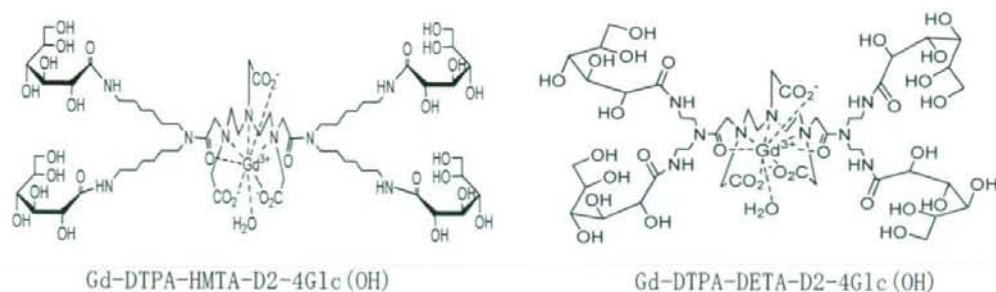


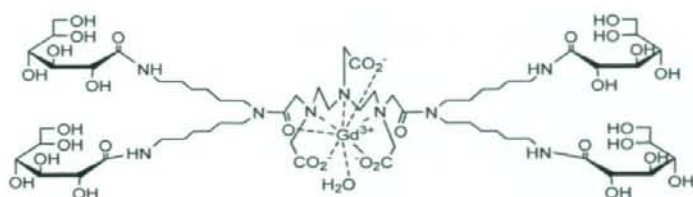
Fig. 6-1-22 ロングブランチ型 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) との血清アルブミンとの緩和率

(3) ロングブランチ型 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) における血清アルブミンと γ -グロブリンとの結合性における緩和率の測定

ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) はブランチ部の炭素鎖が 6 個からなることによりタンパクとの結合の度合いが上がる。それはガドリニウムと水の水素原子のプロトン緩和率に変化が生じることが考えられる。そこで、ブランチ部の炭素鎖が 6 個の Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と血清アルブミンと血清 γ -グロブリンの親和度における度合いを、ミニスペックで緩和率を測定した。サンプルの 1 mmol 濃度水溶液（超純水に溶解）の緩和速度を計測した (37 °C)。Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と、血清アルブミンと血清 γ -グロブリンの緩和率の大きな差はなかった (Fig. 6-1-23)。

このことは Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と血清タンパクとの強い結合性からでなく、混

和での緩やかな親和度を反映していることを意味していると思われる。データは示さないが他の実験からもそのようなことが云える事を得ている。



Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)

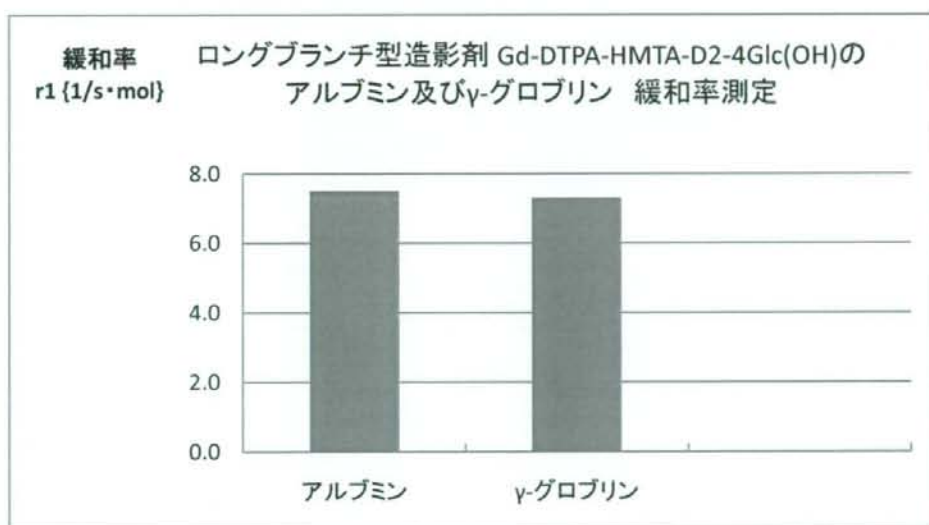
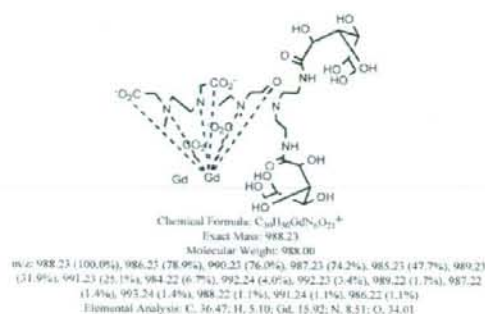


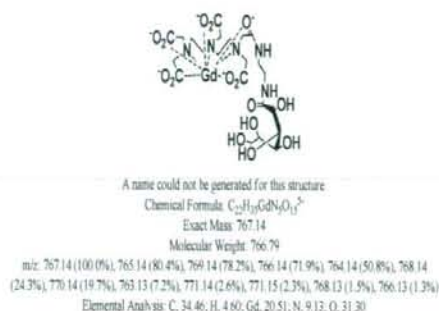
Fig. 6-1-23 ロングブランチ型 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の
血清アルブミン及び血清 γ -グロブリンとの緩和率

6-1-4 まとめ

(1) 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) と Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH)



Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)

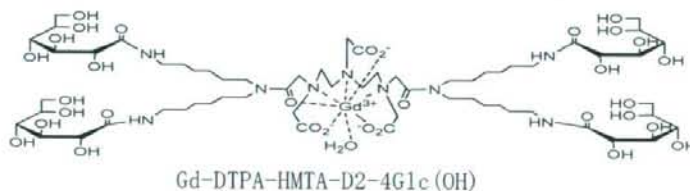


Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH)

この非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) と Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) とともに血漿成分との結合性は認められた。また、*in vivo* の評価から血管貯留時間も短いことも得られている。

この新たな非対称型造影剤は分子サイズが小さく、血管内からの少量の出血や滲みや腹腔内における出血など今までに見られなかった、現象を捉えることができる MRI 造影剤になり得るのではないかとと思われる。

(2) ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)



緩和率測定の結果から、ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) はブランチ部の炭素鎖が長くなることにより血清タンパクとの結合の度合いが上がる。また、血清アルブミンと血清γ-グロブリンとはゆるやかな親和度が認められた。ブランチ部が長い方（炭素鎖が長鎖の方）が緩和度を高めることが分かった。*in vivo* 評価からもかなり高いコントラストが得られた。Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) は造影効果の高い、新規の MRI 造影剤になりうる可能性があると考えられる。

参考文献

Table 6-1-01 血液成分 (シンプル生理学 205 ページより転載)

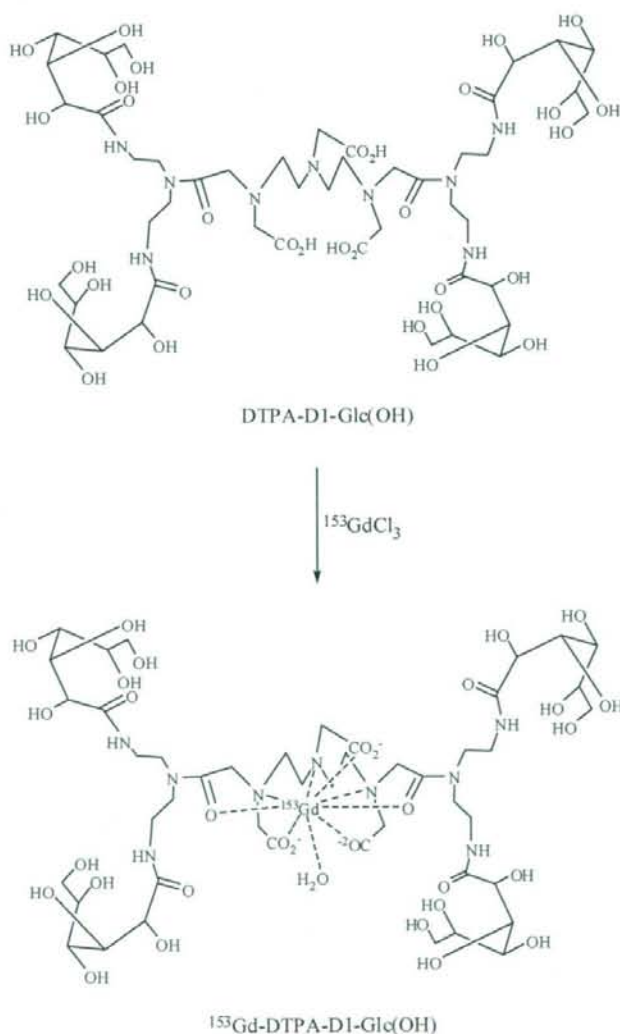
Fig. 6-1-08 直線型特性 X 線集合分光器と特性 X 線の K ラインの相対強度

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

6-2 放射性ガドリニウムによる生体分子認識

6-2-1 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の作成

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。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 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 6-2-01)。



Scheme 6-2-01 DTPA-D1-Glc(OH)に ^{153}Gd を配位して $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を作成

(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 のユーロビウム 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 (Perkin Elmer 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。

(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 倍に希釈し、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 :16.8 μmol 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。

(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) (2) の 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 (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. 6-2-01)。濾液に回収された放