

2009/2015A

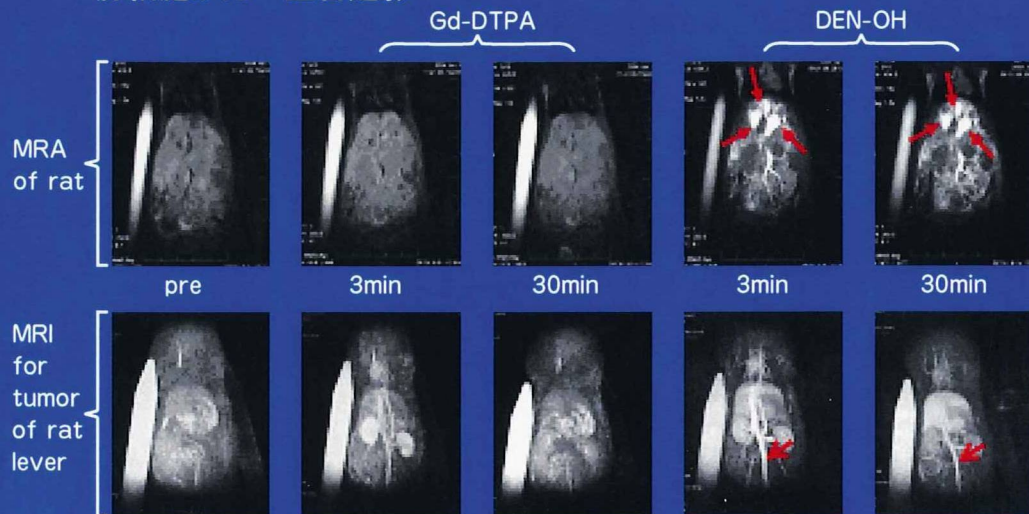
平成 21 年度

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 dendrimer 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・血管造影



研究代表者 山下 光 司

平成 22 (2010) 年 3 月

平成 21 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 dendrimer 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 22 (2010) 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・・・ 27

2. 創製

2-1 糖などにより化学修飾した Gd-DTPA 錯体構造を持つ新規な 生体適合性 MRI 造影剤の合成と評価

杉山 雅紀・・・ 51

2-2 MOE を用いたアルブミンとのドッキングシミュレーションを基に アルブミン認識を期待した造影剤の合成及び評価

石田 真吾・・・ 87

2-3 生体内分子認識サイトあるいは長鎖アルキル鎖及び糖を備えた 新規 MRI 造影剤の設計・合成及び評価

小倉 貴章・・・ 98

2-4 糖 dendrimer 型 MRI 造影剤における糖のアセチル保護基の 加水分解及びその評価に関する研究

都築 靖隆・・・ 113

2-5 リン糖・各種 Gd-DTPA-Phospha Sugar の合成

山岡 真弓・・・ 124

2-6 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・・・ 134

2-7 糖 dendrimer・各種 Gd-DTPA dendrimer 合成

押川 達夫・・・ 185

2-8 ガドリニウム錯体の合成上の問題点と配位子の構造 ～XRD による 解析～

戸田三津夫・・・ 194

2-9 Design and Synthesis of New Potential M.R.I. contrast agents

Arigala Uma Ravi Sankar・・・ 200

2-10 Synthesis of Gd-DTPA-complexes

Kambam Srinivasulu・・・ 230

2-11	Synthesis of Gd-DTPA-HMTA-A-2Glc(OH) and Gd-DTPA-E	Bitragunta Siva Kumar . . . 246
2-12	Synthesis of DTPA amido ester ligands	於 剛 . . . 264
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 . . . 285
3-2	ガドリニウム錯体の蛍光分析	田中 康隆 . . . 296
4.	<i>in vitro</i> 評価	
4-1	<i>in vitro</i> 評価 (1)	山下 光司 . . . 303
4-2	<i>in vitro</i> 評価 (2)	竹原 康雄 . . . 309
4-3	<i>in vivo</i> 評価の目的とその評価方法	三好 憲雄 . . . 329
5.	構造—活性化相関の解明	岡野 孝 . . . 351
6.	生体分子の認識	
6-1	新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 及び非対称型造影剤、 ロングブランチ型造影剤における生体内分子認識	藤江三千男 . . . 371
6-2	放射性ガドリニウムによる生体分子認識	阪原 晴海 . . . 393
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 . . . 417
7-2	他製品との比較評価	阪原 晴海 . . . 427
7-3	PET、X 線 CT との本製品の比較評価	間賀田泰寛 . . . 435

8.	安全性評価	
8-1	安全性評価 <i>in vivo</i> 評価 (1)	山下 光司・・・447
8-2	安全性評価 <i>in vitro</i> 評価 (2)	木村 元彦・・・449
9.	社会のニーズ、医療技術の動向	本間 信行・・・457
10.	結語	山下 光司・・・469
データ集		
(1)	学会等での発表	山下 光司・・・477
(2)	研究会	山下 光司・・・498
(3)	研究者業績	山下 光司・・・511

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 dendrimer 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」と謳って居り約30%の死亡率削減を目標値としている。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 dendrimer 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リンカーにより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（あるいは、強く相互作用）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r1値を指標として約10倍の造影効果の発現を研究開発の目標値とした。

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 dendrimer 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。その後の研究では、Gd-DETA-D2-4Glc(OAc)の加水分解生成物（DEN-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(III)が検出されたので、改良を要する点も明らかになった。また、通称「青島サンプル」を復刻する為の加水分解ルートの加水分解反応の条件の検討及び動態サンプルの再現実験も研究課題となった。また、同サンプルを別途合成すること、同等以上の緩和率を示すGd-DTPA錯体誘導体を非加水分解ルートで調製する方法も中心的な研究課題となった。

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-D2-4Glc(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、Gd-DTPAと比較すると*in vitro*評価におけるr1値及び*in vivo*評価における臓器選択性や血管造影能力は優れているが、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-D2-4Glc(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」とい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-DTPA錯体の開発、リンカー部分の化学修飾(脂肪族あるいは芳香族のリンカー、炭素鎖の長さの異なる(メチレン鎖の長さの異なる)リンカー)を使って分子サイズや分子の運動性の可変性、分子の易動性の可変性、Gd-DTPAに配位した水分子の生体内の水分子との交換速度を高める等のコンセプトに基づくMRI造影剤の分子設計及び化学合成)を行った。対称型では、Gd-DTPA-EDA-D1-2Glc(OH)やGd-DTPA-AP-E1-2Glc(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-AS1-1Glc(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、これらの新規に調製したGd錯体構造をコア部に持つ様々な錯体について、*in vitro*および*in vivo*評価を行った。その結果、対称型2糖(尾崎サンプル)により直径約1 mm程度の初期がん(ラットの肝細胞がん)を画像化できることに成功した。また、腹腔内出血を容易に画像化できることも発見した。このような画像は比較対象のGd-DTPAでは非常に困難であった。これらの糖デンドリマー型Gd-DTPA錯体による超早期がんの発見あるいは腹腔内出血の画像化は、「がんの早期発見」を確実に可能とし、患者のQOLを向上させる医療技術の革新を齎す発見である。更に新規に導入した分子設計ソフトMolecular Operating Environment(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-D2-4Glc(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」であると判明した。

平成21年度は、平成20年度までの研究成果を、新規なMRI造影剤の調製方法別に分類整理して、最終年度に目指す研究の方向性を再度検討した。最終年度の課題として、次の（１）～（４）の項目に加えて項目（５）及び（６）までの全ての課題に取り組んだ。

- （１）現在の造影剤では画像化が難しい「血管造影」を可能にすること
- （２）小さな初期がんを低濃度の造影剤で高感度（Magnevistの10倍の感度）で鮮明に画像化すること
- （３）高感度で画像化できる造影剤であるために安価な普及型のMR装置（1.5 T（あるいは、3.0 T））により「がんを安全・安心に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 dendrimer型新規MRI造影剤」を実用化する
- （４）近年ガドリニウム錯体による発症例として知られるようになった腎性全身性線維症 Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF) の問題を解決するMRI造影剤（単回投与で Imaging Window が広いMRI造影剤）の開発研究を行う
- （５）前臨床前試験までの研究を行う
- （６）当該研究成果の今後の応用として、抗がん剤との複合化、抗体等との結合可能性を図る。等

平成21年度（第3年度目）は、第2年度までに得られたラットの血管造影及び肝細胞における初期がんの造影に於いて非常に優れた効果を示した①DEN-OHの調製の再現性を検討した。また、②コンピュータを用いて、富士通のソフトウェアMOE (Molecular Operating Environment) により、血管内に存在する生体機能材料、特にアルブミン、との相互作用の大きい機能性残基を有する分子をターミナルとし、MSDS (Material Safety Data Sheet (製品安全データシート)) に於いて特に問題のないリンカーを用いた分子設計・化学合成、*in vitro*評価を行った。また、更に③ターミナルとして糖及び非糖の複合化、④MRI造影剤と抗がん剤の複合化、⑤がんを特異的に認識する残基の導入、⑥抗体を認識するNHS (*N*-hydroxysuccinic imide) の導入、等を検討した。これらの新規なMRI造影剤は、本来ならば、岡崎の大学共同利用機関法人 自然科学研究機構 生理学研究所のMRI装置 (3.0 T) を用いて *in vivo* 評価を行う予定であったが、当該年度における同装置のソフトウェアの入れ替えにより従来と同様な3D画像を得る事が出来なくなったために、*in vivo* 評価はできなかった。それ故、最終年度の評価は浜松医科大学のMRIの実機 (1.5 T) 及びミニスペック (0.48 T) による *in vitro* 評価を行った。また、C6リンカーを用いた4糖 (グルコース) をターミナルとしたサンプル (非加水分解ルートの水野サンプル) に対して安全性試験を実施した。平成21年度の研究により、前臨床前試験の全てのデータの収集を行い、第1ステージの研究開発スキーム (Fig. 1-01及びFig. 3) におけるゴールに到達した。

当該研究の目標値と進捗度については、3年間の研究成果と設定した目標値とを比較して、次の様に評価する。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：Magnevist マグネビスト（バイエル社（旧シェーリング社））の造影効果の10倍（r1値の比較）を有するシュガーボール dendroliマー型Gd-DTPA錯体である。それ故、当該研究により開発される造影剤は従来の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」をターゲットとした。

この様な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、この様な高機能性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と言う研究のバックグラウンドがある。本開発研究により、近未来に於いて医療技術のイノベーションを齎し、がん治療の均てん化、欧米に比べて非常に低いがん検診率の改善とがんの診断の飛躍的革新が実現し、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た。平成19年度までに、DEN-OHによりImaging Windowが十分に広い血管造影、鮮明な肝細胞がん造影、r1値として約30 [$s^{-1} \cdot M^{-1}$]（Magnevistでは、r1値は3.5 [$s^{-1} \cdot M^{-1}$]）を達成した。平成20年度には、尾崎サンプル（対称2糖型Gd-DTPA錯体）により直径約1 mmの超早期がんの造影に成功し、青木サンプル（）により腹腔内出血の画像化に成功した。

当該の厚生労働科研費による3年間のプロジェクトの総括としては、第1ステージに於いて当初計画の目標値の約80%を達成することが出来たと纏めることができる。安全性評価結果も問題が無く、加水分解ルートにおける当該開発品DEN-OHはMRI造影剤としての機能（r1値ベース）を目標値の80%の進捗度達成し、非加水分解ルートにおける別途合成による糖 dendroliマー型Gd-DTPA錯体はr1値ベースで約70%の進捗度であった。これらの研究開発結果は、今後の製品化・商品化に向けた第2ステージ以降の研究に展開するには十分な研究成果である。

最後になりましたが、当該の厚生労働科研費により平成19年度にリースにより静岡大学に導入したICP装置によるGd(III)の定量およびMini SpeckによるGd(III)-DTPA錯体のT1緩和時間の測定による新規なシュガー dendroliマー型Gd-DTPA錯体の *in vitro* 評価は当該プロジェクトの推進に大いに貢献した。また、厚生労働科研費による分子構造解析用のMALDI-TOF-MSのメンテナンスや超伝導NMR装置のソフトウェアのバ

ージョンアップ等（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）によりMRI造影剤の開発に使用した大型装置、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。また、学内・学外の経理担当者等々の関係者各位に感謝いたします。

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

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であるMRI (Magnetic Resonance Imaging) の造影剤（特に、Gd-DTPA錯体 (Magnevist)）に不足している(ア)がん造影あるいは

A. 研究目的

(1) 研究の目的は、血管造影機能、臓

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。

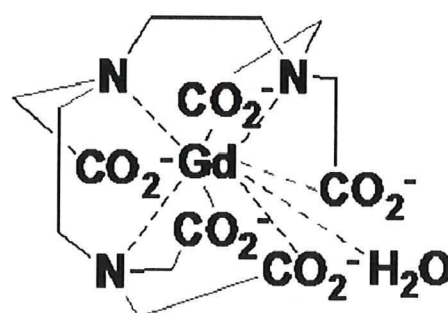
Table 1 MRI造影剤の開発 分子設計カテゴリー

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)糖及びその他の残基による複合機能化/がん特異性・選択性残基/抗体特異的残基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」の為の高機能化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 (Magnevist) (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・使用量に注意が必要ではあるが、現在臨床使用されている医薬品の中では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 錯体を中心にT1緩

和を利用したMRI造影剤の開発はグローバルに研究が盛んに行われている。



Gd-DTPA (DTPA=Diethylenetriamine-N,N,N',N'',N'''-pentaacetic acid)

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。

当該の厚生労働科研費の平成21年度の総括研究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)。

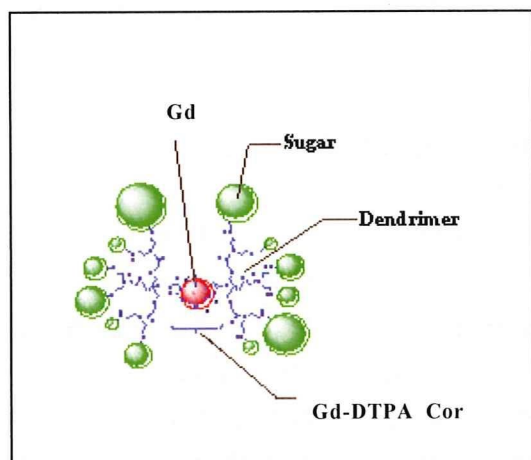


Fig. 2 デンドリマーコア部へのGdの配位(Gd-DTPA-DETA-D2-12Glc(OAc)の場合)

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に基づく緩和度(縦緩和率) 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。

最終年度である平成21年度には、加水分解経路によるDEN-OHの再現性およびその反応条件の探索を第1の課題とした。また、MOE等によるコンピュータで支援された化学を第2の課題とした。がんを特異的に認識する残基あるいは生体内において生体内成分(アルブミン等)を認識するアミノ酸やカルボン酸、アミノ基、フェニル基等の残基を持つ基を糖デンドリマー型の配位子に複合化させる課題を第3の課題とした。また、抗がん剤や抗体に特異的に反応する事が期待されるリン糖類やNHS (*N*-hydroxysuccinic imide)を配位子の糖に複合化させるあるいは糖の代わりにデンドリマーの外殻に導入して生体内でがんや抗体と相互作用あるいは反応するMRI造影剤を開発することを第4の課題とした。これらの研究課題については、本総括研究報告書の該当する章に於いて述べる。これらの研究課題により、平成20年度までの研究成果を引き継ぎつつ更に高感度・高造影効果の超Gd-DTPA-DEN-OHあるいは超Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)誘導体を開発した。また、平成19年度から21年度の3年間の研究により発見された有望なMRI造影剤に対する安全性

試験試験を実施し、前臨床前試験データを収集し、次のプロジェクトの第2ステージにおける臨床試験（Phase I～III）に続ける研究成果を得た。更に、第3ステージに研究を繋げて実用化・商品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、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3年度までの3年間の研究の進捗度

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り込み、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・商品化の為に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①～⑩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21年度（第3年度）までに、流れ図に示す第1ステージの研究計画の②～⑧の項目の研究を行った。また、第2ステージの⑨～⑩の項目の予備的な研究を行った。その結果、本研究が開発する造影剤の構造を加水分解経路では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加水分解経路ではDEN-OHにターゲットを絞り、その造影剤の再現性及びその反応条件の検討を行った。DEN-OHは現段階で十分に有力なMRI造影剤として実用化・商品化段階へ進める事が出来るGd-DTPA錯体の一つである。更に、非加水分解経路によりリンカーの検討、ターミナルの検討等を行い、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、がんの造影に関してはGd-DTPAと比較して遥かに優れた造影効果を示した。直径約1 mm程度の初期がんの画像化にも成功し、がんの造影に関しては目標値の90%以上の進捗度を示した。また、(6)腹腔内出血の診

断への応用可能性を発見した。この発見は非常に重要な発見であり、患者のQOLを向上させる腹腔鏡や内視鏡による手術における医療過誤をバックアップする医療技術となり得る。進捗度は90%以上である。(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、外部委託した全ての安全性試験サンプルに於いて問題が無く、前臨床試験前データの収集の進捗度は90%程度である。

以上の3年間の研究開発成果を総括して、当該プロジェクトの研究の進捗度は約80%程度の好成績であったと言える。今後の第2ステージ~第3ステージに研究を継続して実用化・商品化に進めるに値する研究成果を挙げたと評価できる。

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

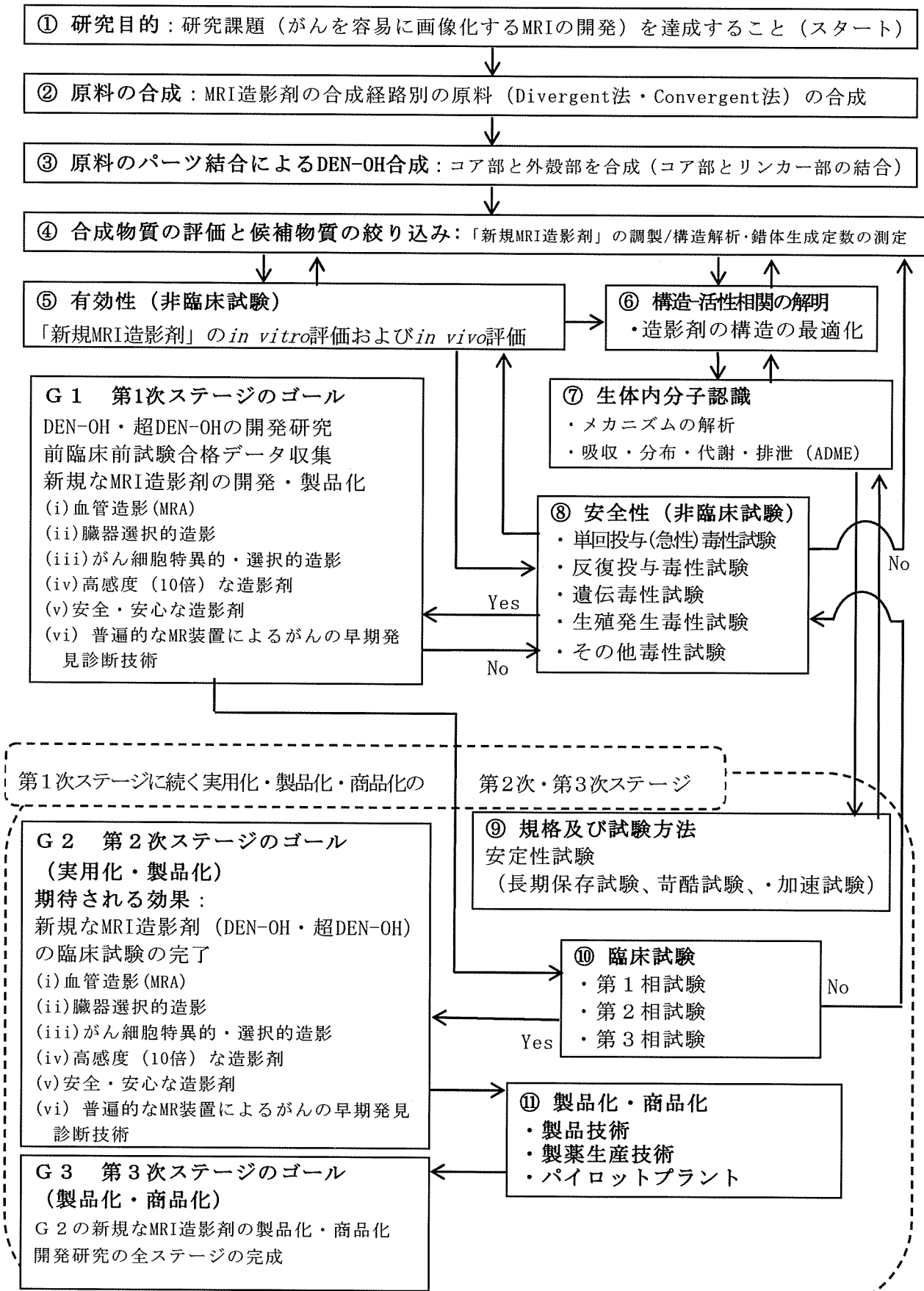


Fig. 3 Flow chart for the present project from the start to the goal.

研究協力者Krishna、Siva、Uma、於、牧田、平井、石野、大場、藤田等の学術研究員、技術補佐員、その他の博士課程・修士課程大学院学生及び学部等の学生は、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)。また、MOE等のPCソフトを応用して、生体内分子認識残基のMRI造影剤への導入の為の分子設計・化学合成、等の研究を積極的に行った。

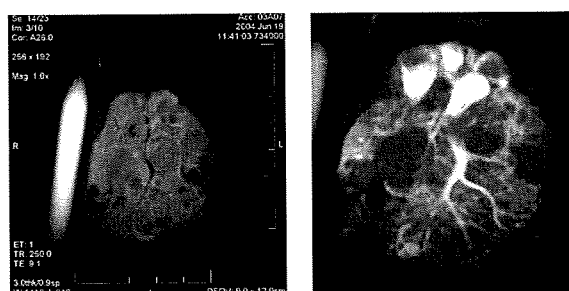


Fig. 4 ラットの肝細胞がんのMRI画像 (左: Gd-DTPA (従来品) 右: DEN-OH)

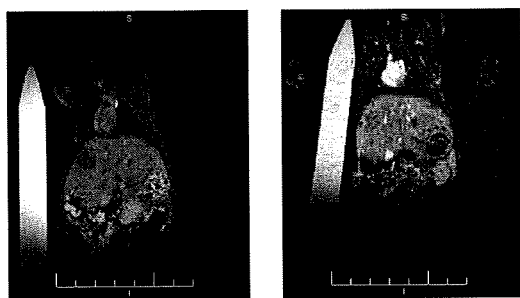


Fig. 5 ラットの初期の肝細胞がんのMRI画像 (左: Gd-DTPA (従来品) 右: DEN-OH)

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-DTPA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-DTPA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員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19年度以前の予備的な研究段階、平成19年度～21年度の厚生労働科研費によるプロジェクト研究期間も継続して研究を遂行でき、流れ図 (Fig. 3) に示す研究計画の全体の計画と年次計画を遂行できた。この流れ図に従って、3年間のプロジェクト研究成果 (第1ステージ) を十分に達成し、第2ステージ～第3ステージにより臨床試験、実用化・商品化を進め、医用材料の開発及び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通じ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19年度～平成21年度の研究成果流れ図（Fig. 3）の第1ステージの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21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、今後の研究の進捗を加速できる。（総括研究報告の該当する章を参照）
- 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年度では、加水分解条件の詳細な検討を行った。今後の研究ステージの研究の進捗を加速できる。（総括研究報告の該当する章を参照）

- 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。今後の研究ステージの進捗を加速できる。（総括研究報告の該当する章を参照）
- 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、今後の研究の進捗を加速できる。（総括研究報告の該当する章を参照）
- 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、構造の最適化および造影効果の最適化を行った。今後の研究ステージの加速が可能である。(総括研究報告の該当する章を参照)

- 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。
(総括研究報告の該当する章を参照)
- ⑧ 安全性試験：候補化合物である、DEN-OHおよびGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)について行った結果は、安全性に問題はなかった。最終年度は、Gd-DTPA-Xについての安全性試験を実施した。全てのサンプルに於いて安全性に問題はなく、前臨床試験前データの収集が出来た。(総括研究報告の該当する章を参照)
- 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19年度～21年度までの開発研究に

より、「青島サンプル」{Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)の誘導体(DEN-OH)}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-D2-4Glc(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

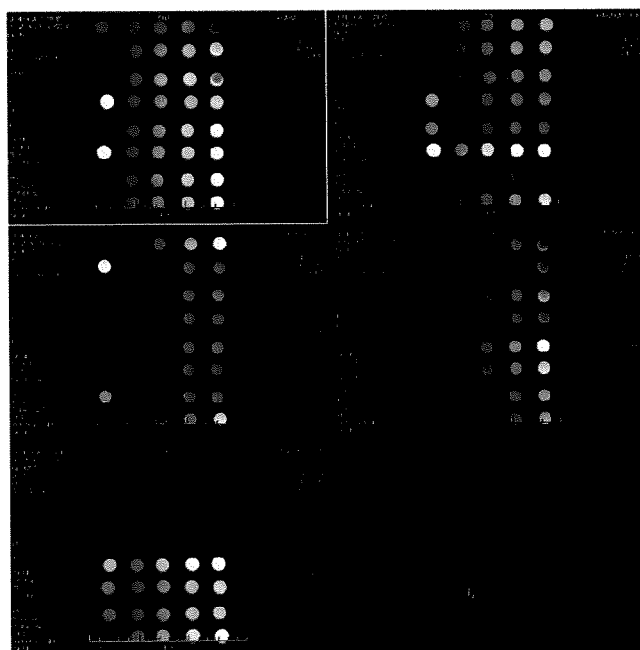


Fig. 6 Various DEN-OH prepared under different hydrolysis conditions.

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-D2-4Glc(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-D2-4Glc(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」はデンドリマー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-AS1-1Glc(OH)は *in vivo* 評価に於いて、がん化ラットの1 mm程度の小さながんの描出に成功した。

シュガーボールデンドリマー型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 $r_1 = \text{約 } 24 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$ を筆頭とする、MRI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 ）関連、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19年度～21年度（3年間）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」の非常に長い体内貯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2ステージ以降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21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。平成20年度及び平成21年度のサンプルに対する安全性試験の結果は問題は無い。この研究により、前臨床試験前のデータの収集ができ、臨床試験に移行可能となった。

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)) とい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, G., Yamashita, M., 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.
- [3] Satoru Ito, Mitsuji Yamashita, et.al., "Preparation and characterization of phospholanes and phospho sugars as novel anti-cancer agents", *Heterocyclic Communications*, 15, 23-30 (2009).
- [4] Satoki Nakamura, Mitsuji Yamashita, et.al., "Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospho sugar derivatives with antileukemic activity", *Investigational New Drugs*, 2009.3. (Web)
- [5] Junko Yamashita, Mitsuji Yamashita, et.al., "R & D of Novel Medicinal Materials for Curing Cancer: Sugar Modified Gd-DTPA MRI Contrast Agents and Phospho Sugar Anti-Cancer Agents", *J. Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems*, 3(4), 80-83 (2009) (Web on line).
- [6] Masaki Sugiyama, Mitsuji Yamashita, et.al., "Synthesis and Evaluation of Novel MRI Contrast Agents of Chemically Modified Gd-DTPA Complexes with Sugars", *J. Automation, Mobile Robotics & Intelligent Systems*, 3(4), 191-194 (2009) (Web on line).
- [7] Satoki Nakamura, Mitsuji Yamashita,