

4. *in vitro* 評価

4. *in vitro* 評価

4-1 *in vitro* 評価 (1)

山下 光司

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)。

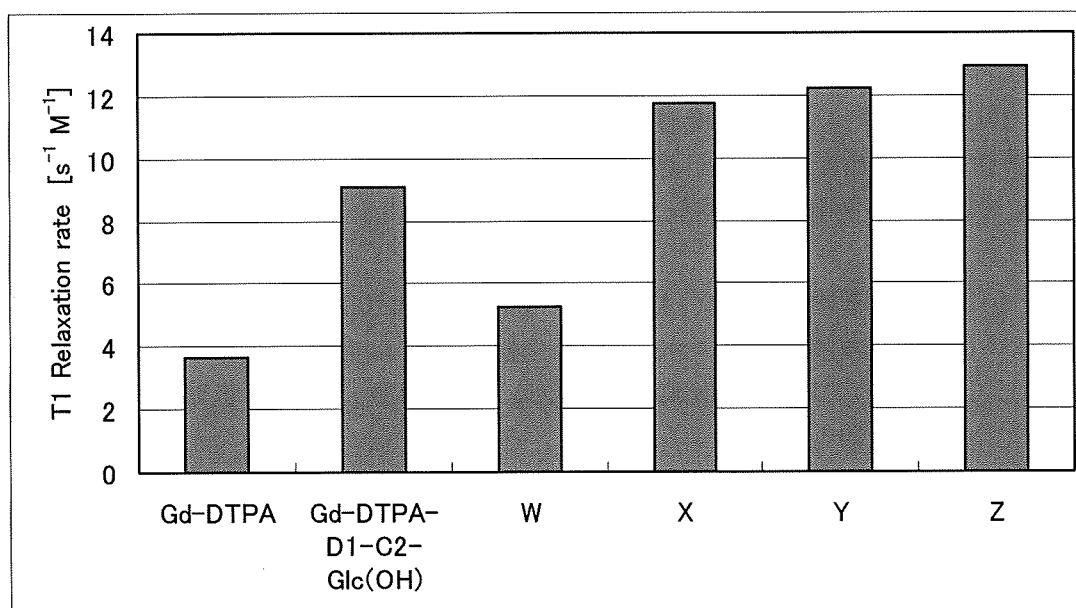


Fig. 4-1-01 T1 relaxation rate for Gd complexes in ultra pure water.

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。

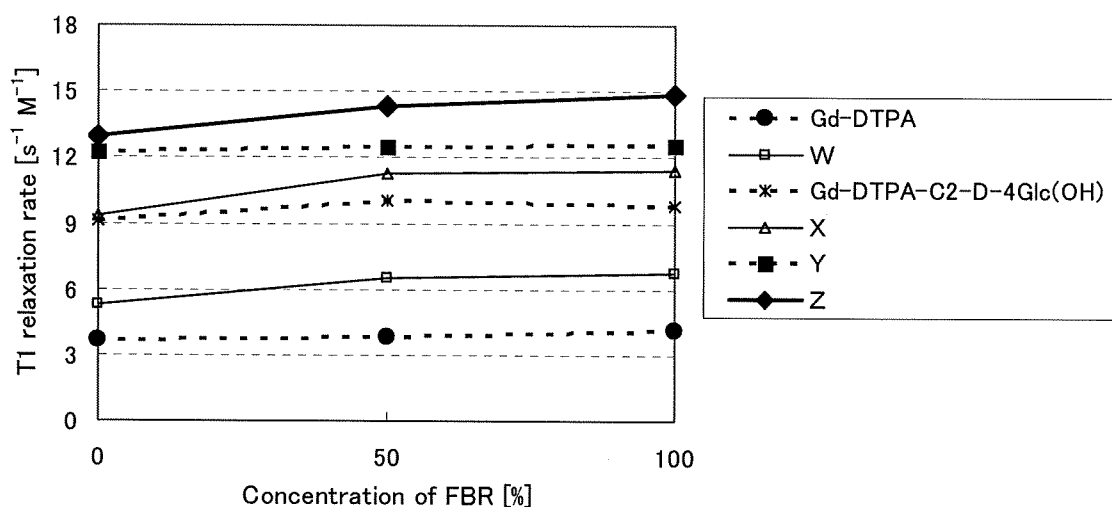


Fig. 4-1-02 T1 relaxation rate for Gd complexes in cow albumin.

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。

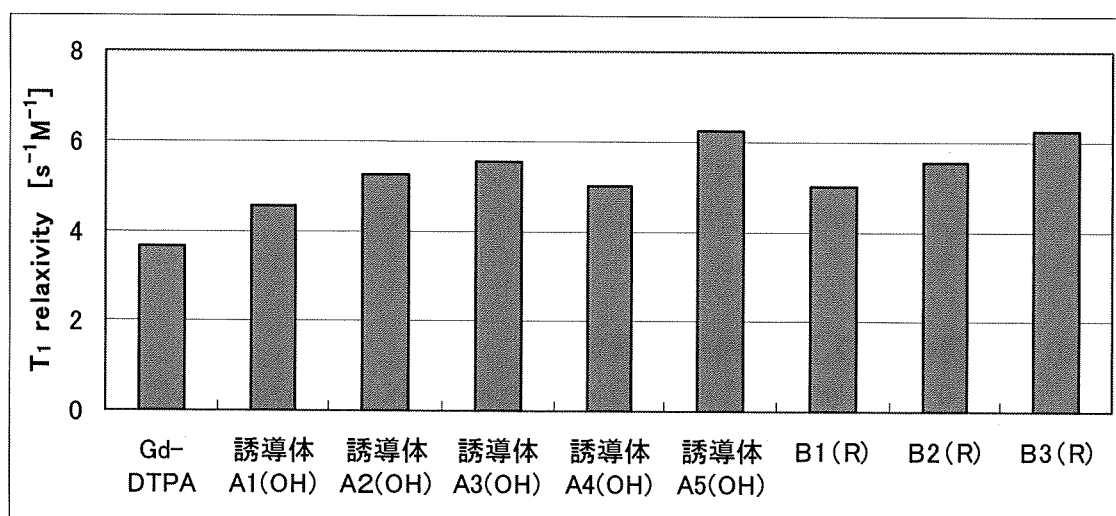


Fig. 4-1-03 T1 relaxivity for Gd complexes A' s and B' s in ultra pure water.

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 Bruker.

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デンド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。

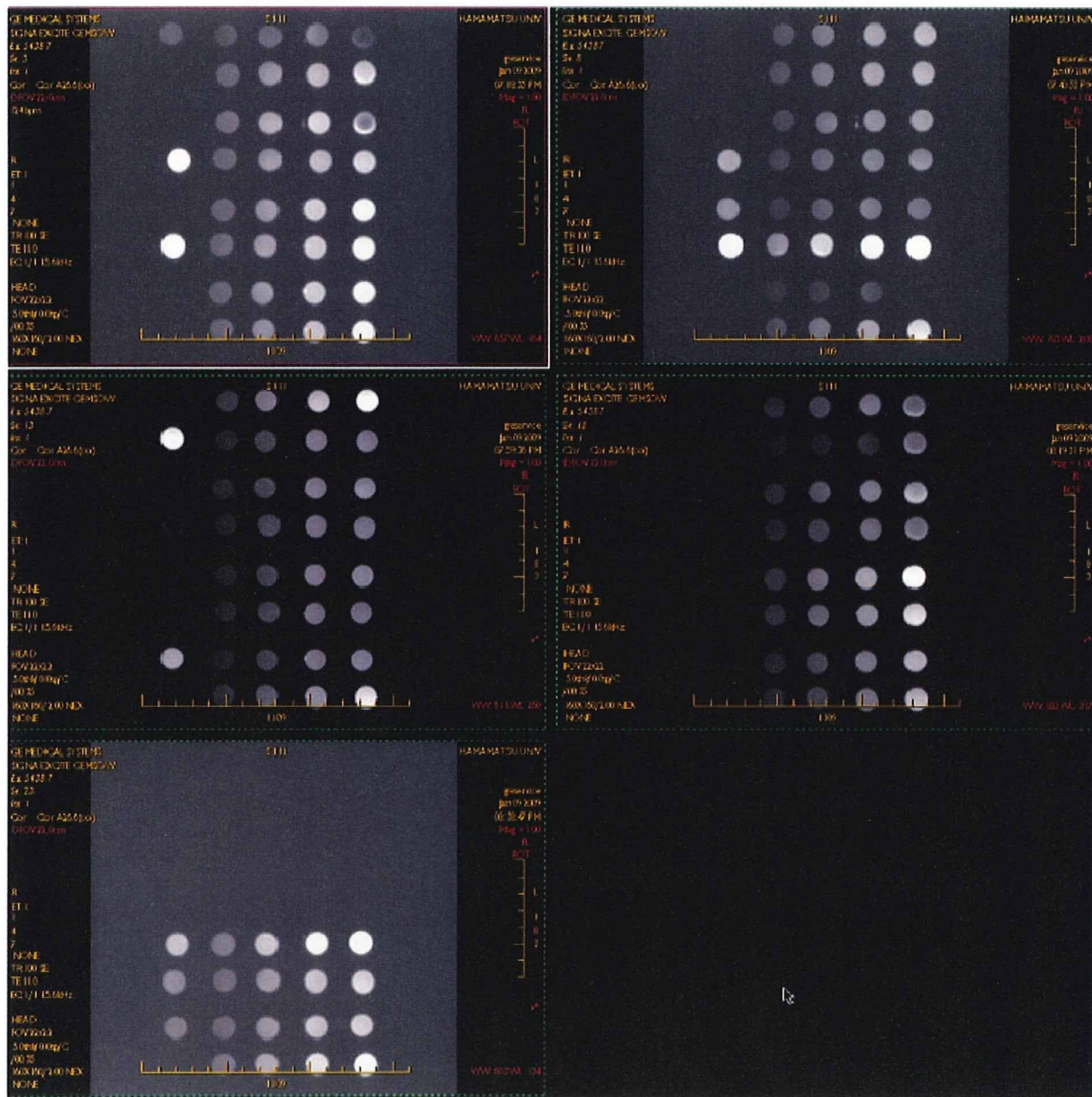


Fig. 4-1-07 *in vitro* Evaluation of DEN-OH in ultra pure water and human serum.

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 1st, 2nd, 3rd, and 4th 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 5th column is 0.1 mM in human serum.

平成 21 年度は、大学利用機関法人 自然科学研究機構 NIPS 生理学研究所における MRI 装置 (3.0 T) のソフトウェアの更改により従来 (平成 20 年度まで) と同一の *in vivo* 評価が出来ない状況になった為に、共同研究機関の浜松医科大学の実機 (1.5 T) により、*in vitro* 評価を行った。その結果の一部を Fig. 4-1-08 に示す。

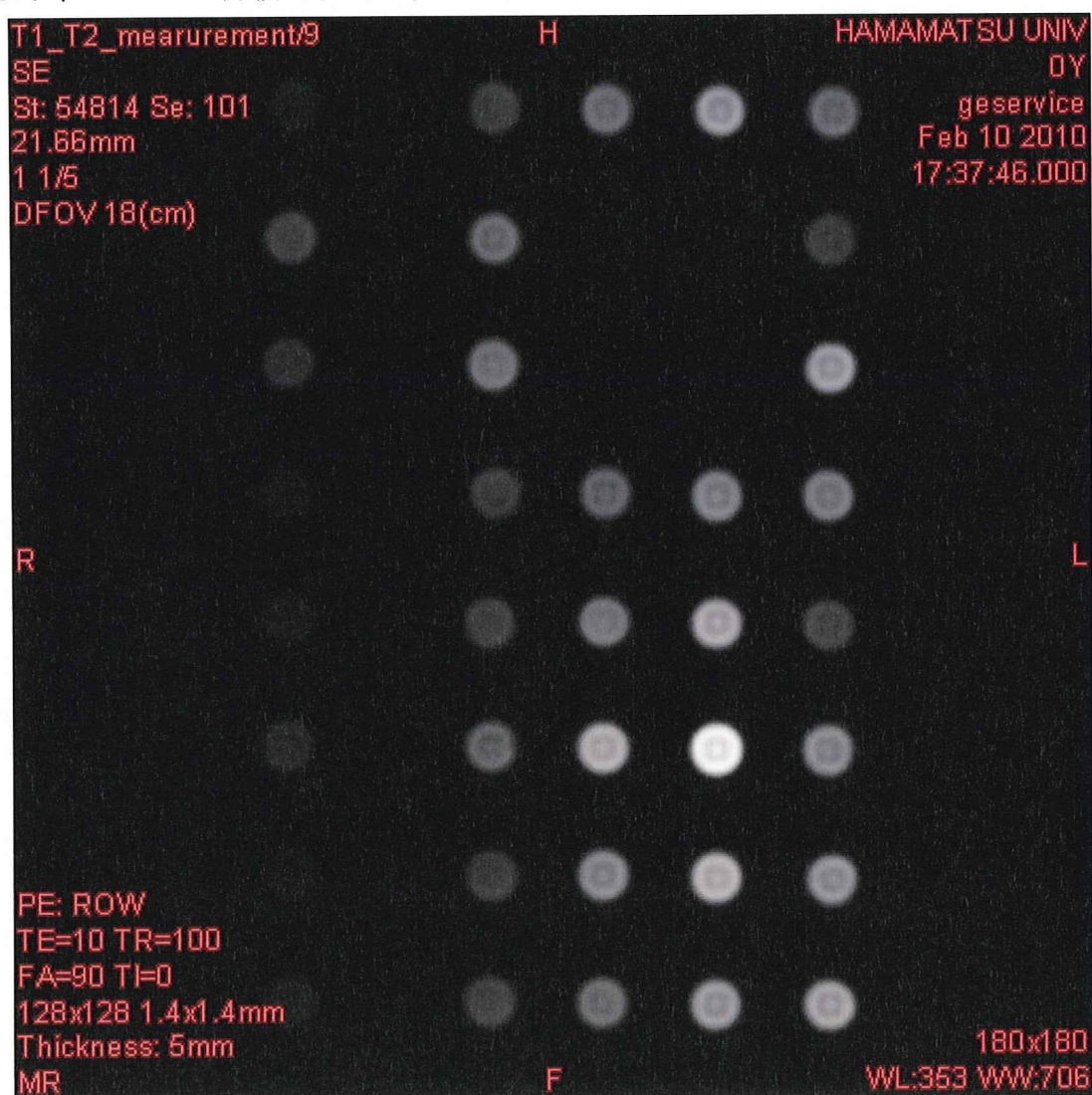


Fig. 4-1-08 *in vitro* evaluation of new Gd-DTPA complex derivatives.

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。

4-1-4 *in vitro* 及び/又は *in vivo* 評価の纏め

非加水分解ルートでは、デンドリマーのリンカー及びターミナルの変形を行った。リンカー部分は、炭素鎖の長い脂肪族あるいは報告族誘導体に於いて r_1 値の増強効果があった。また、ターミナル部分では、糖及び非糖、あるいは両者の複合化等のバリエーションを行った。糖及び糖と非糖との複合化に於いて r_1 値の増強が見られた。また、計算機ソフトの MOE を用いてアルブミン等とターミナルとの相互作用が期待される機能性残基を用いると、 r_1 値がアルブミン中で予想した様に増強されることが見出された。NHS やリン糖等を Gd-DTPA に導入した Gd-DTPA 錯体も調製し、次世代の MRI 造影剤の開発も試みられた。

これらの結果から、DEN-OH は当該研究が目標とした「Gd-DTPA 錯体の r_1 値の 10 倍 (即ち、 $r_1 = 35 [s^{-1} \cdot mM^{-1}]$) には及ばないものの約 8 倍の値を与え得た。また、Gd-DTPA 錯体、例えば、Gd-DTPA-Xy1DA-D-2Glc(OH) または Gd-DTPA-BHMTA-D2-4Glc(OH) は r_1 値が約 $20 [s^{-1} \cdot mM^{-1}]$ と大きく、目標値の約 7 倍の r_1 値を得た。これらの化合物のいくつかのサンプルは、研究組織の外部委託による安全性試験により、安全性に問題が無い事が報告された。

上記の様な大きな r_1 値の報告例は殆ど無く、これらの新規に開発された Gd-DTPA 錯体は当該研究開発の第 2 ステージ～第 3 ステージに繋がる研究のスキームにより、臨床試験を経て、近い将来に、実用化・商品化が実現する標的化合物あるいはリーディング化合物となることが期待される。

4-2 *in-vivo* 評価 (2)

竹原 康雄

これまでの研究期間内に多くの compound を開発し、*in-vivo* MR 撮像を施行した。すべての造影剤はまず水溶液中の信号強度を確認した後に、有望な造影剤に関して、必要最小限の数の動物を使用して *in-vivo* における造影効果の評価を行った。

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正常動物としては 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 90 g、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 100ppm 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プロックを作製し、ミ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。なお必要に応じて腫瘍組織の血管密度を測定するために Factor VIII等による免疫組織学染色を併用した。

*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 (UKCCR) 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。

得られた元画像上で、信号増強効果に関して半定量的な検討を加えるべく、ワークステーション上で、像影前後の元画像上において、肝、腎 (皮質、髓質)、腹部大動脈、下大静脈、肝臓、ファントム (生理的食塩水、オリーブオイル)、バックグラウンドに ROI を設定し、平均信号強度、標準偏差を測定し、signal-intensity-ratio (SNR) を計算して比較した。得られた信号雑音比の経時変化について Fig. 4-2-04～Fig. 4-2-07 に示す。なお、SNR は (信号強度-背景信号) /背景信号の標準偏差で計算した。

(9) 統計

統計は時系列における変化については反復分散分析と Fisher の PLSD 検定を行い、各群間の差については Wilcoxon test を使用した。危険率 0.05 以下を有意差としている。

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

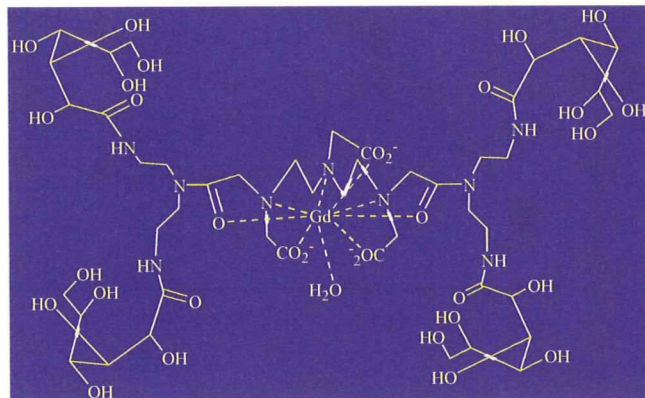
れた場合は 2 群対応の T-test にて判定した。正規分布が保証されない場合には Mann-Whitney test にて差を検定した。

4-2-2 結果

最も優れた血管並びに多血性腫瘍の信号増強効果を呈したのは Gd-DTPA-D1-Glc(OH) であった。

Fig. 4-2-01

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子構造
Gd-DTPA に glucose を
4 分子配している。



この造影剤については急速静注直後（3 分後）の MR angiography において対照の Gd-DTPA による造影よりもすぐれたコントラストで心血管の描出を得たのみならず、その造影効果は少なくとも造影 2 時間後まで持続していた。これは対照の Gd-DTPA による心血管の造影効果が静注後 30 分にはほとんど造影剤投与前と同等のコントラストになったのとは対照的であった。

Time Course Changes of SNR of the Aorta

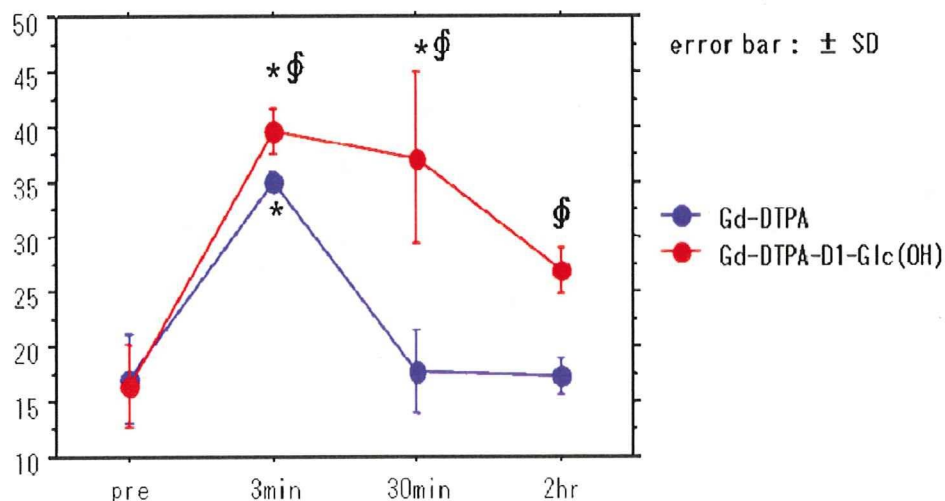


Fig. 4-2-02

造影剤投与前後における Aorta（大動脈内）の SNR の時系列変化。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は Gd-DTPA と比較して、投与後全ての時相において、大血管の SNR が上回る。

*：像影前に対する有意差、§：群間有意差を示す

Time Course Changes of SNR of the Liver

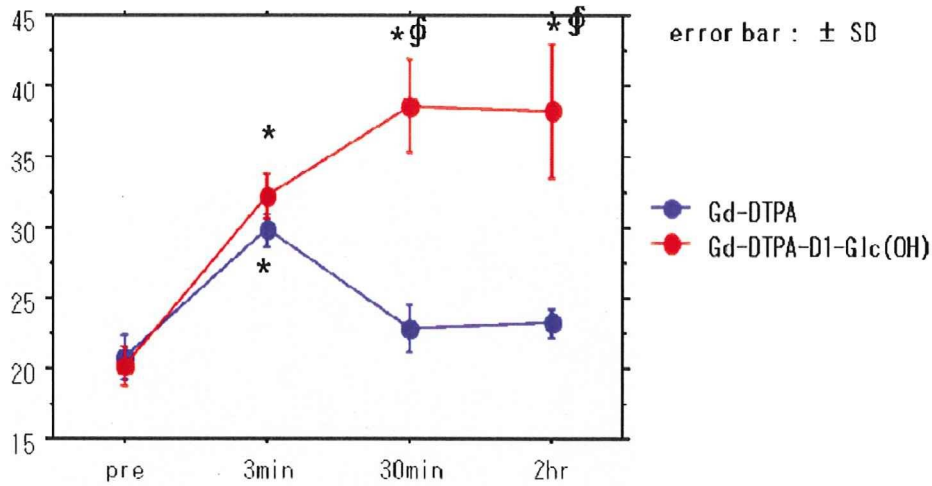
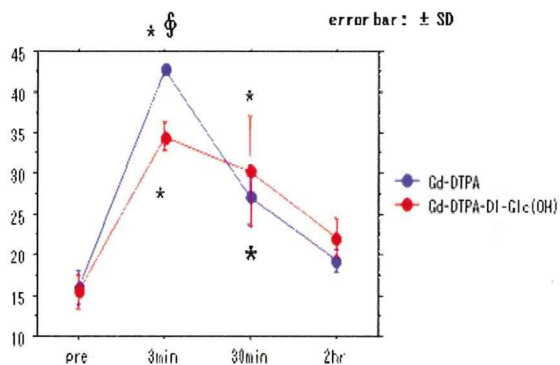


Fig. 4-2-03

Gd-DTPA-D1-Glc(OH)では、肝臓の SNR が本造影剤投与後 30 分後までにピークに達し、その後 2 時間後までそのレベルを維持した。本造影剤が肝実質になんらかの親和性を有していることがわかる。

* : 像影前に対する有意差、 ϕ : 群間有意差を示す

Renal cortex



Renal medulla

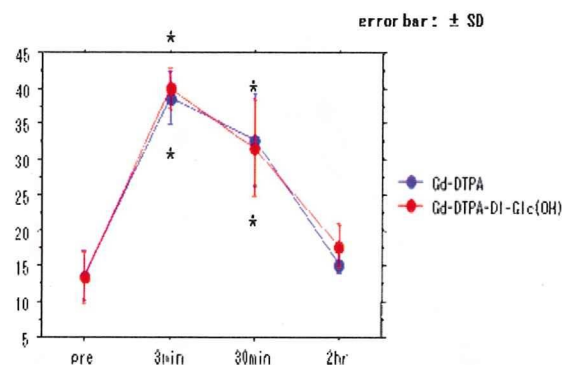


Fig. 4-2-04

上左は腎皮質、上右は腎髄質における SNR の時間的推移を示す。両造影剤が腎において非常に似通った SNR を呈していることがわかる。血漿蛋白に結合しなかった Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が腎排泄を受けている可能性もある。

* : 像影前に対する有意差、 ϕ : 群間有意差を示す

イメージ上も SNR 上も、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は Gd-DTPA と比較して、投与後全ての時相において、大血管のコントラスト向上が目立って良好であった。血管内に造影剤

が停滞していることを信号上も示唆する所見である。また、注目すべきは、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)はガドリニウムイオンのモルベースで半分の量が投与されているにもかかわらず、造影3分後においてGd-DTPA-D1-Glc(OH)の信号雑音比がGd-DTPAのそれを上回っていることである。

血液以外では、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)は肝臓への親和性を有していることから、造影後、乏血性の肝内占拠性病変に対して存在診断の感度が向上する可能性もある。

腎臓へは、主として腎排泄の造影剤であるGd-DTPAと類似のSNRのパターンを示した。イメージ上でも腎臓から尿へのGd-DTPA-D1-Glc(OH)排泄が多少は見られることがわかる。あるいは2相性の排泄がある可能性があり、仮になんらかの血中の蛋白と結合している場合には、結合前のGd-DTPA-D1-Glc(OH)が腎排泄をうける可能性も除外できない。

4-2-3 血液プール造影剤を目指したその他の compounds

デンドリマーコアの造影剤研究において、側鎖のバリエーションが少し異なるだけで造影能や造影効果の持続時間が大きく異なることが経験された。おそらく、造影剤の立体的な構造の変化により、結合する蛋白の構造に変化が生じ、造影能を大きく変化させることが予測される。逆に、側鎖のバリエーションによって、血管滞留性や信号増強効果を調整することが可能であるとの予測のもとに、われわれは、さまざまなコンパウンドを試作し、これらを用いて、実際に *in-vivo* においてもその効果を評価した。以下、動物種の異なる例もあるが、正常ラットないしはマウスを使用し、造影早期の造影MR撮像を3D-VIVEシーケンスによって撮影し、MIPにて後処理を施した画像を示す。すべて経静脈性に造影剤を投与後早期(3分以内)に3.0T装置にて、home-madeの5inchコイルにて撮影されたものである。

新しく合成されたサンプルは、特許申請前のもものでは、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。差し支えない範囲において構造式を添付した。

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。

A14

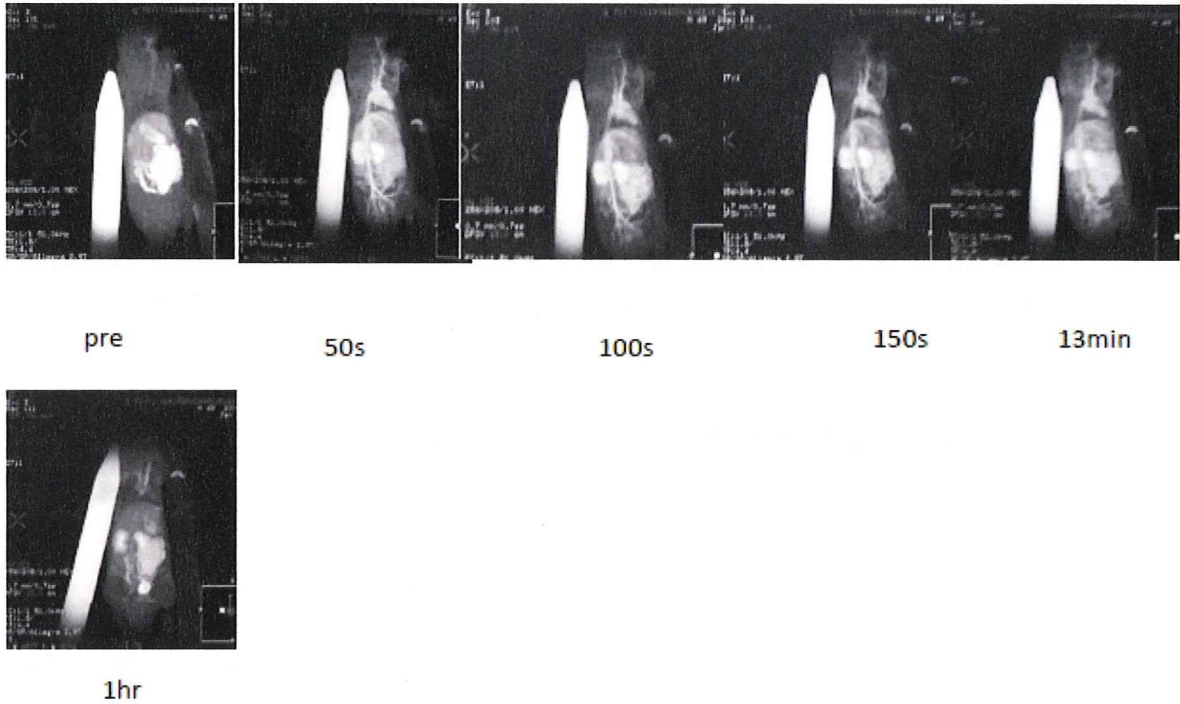


Fig. 4-2-05

A14 強い信号増強効果あり。比較的長時間にわたり（少なくとも 13 分間）まで持続する信号増強効果を確認する。

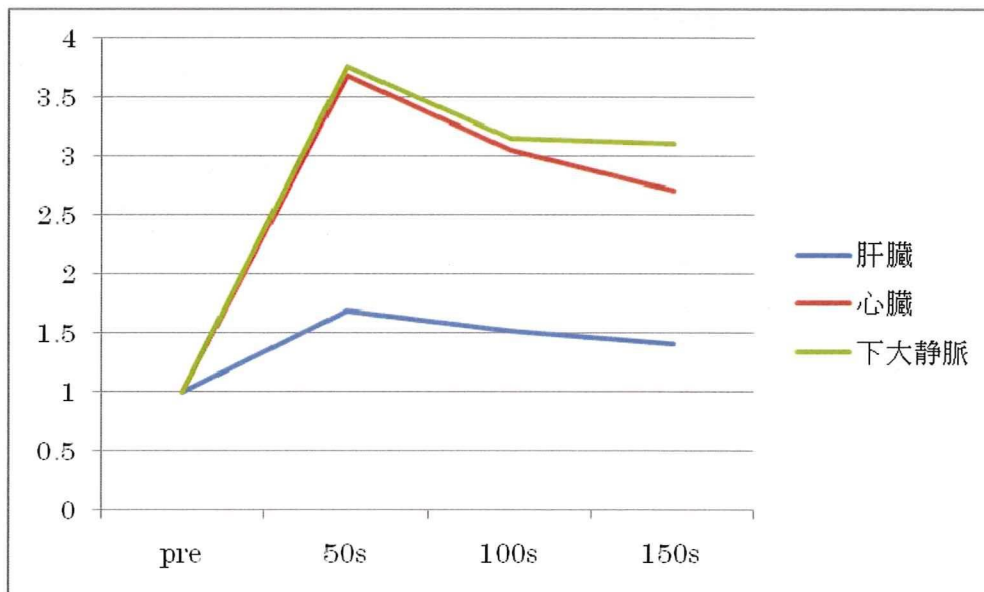


Fig. 4-2-06

A14 投与前後における肝臓、心臓、下大静脈のファントームに対する信号強度比の推移をグラフに示した。

A21

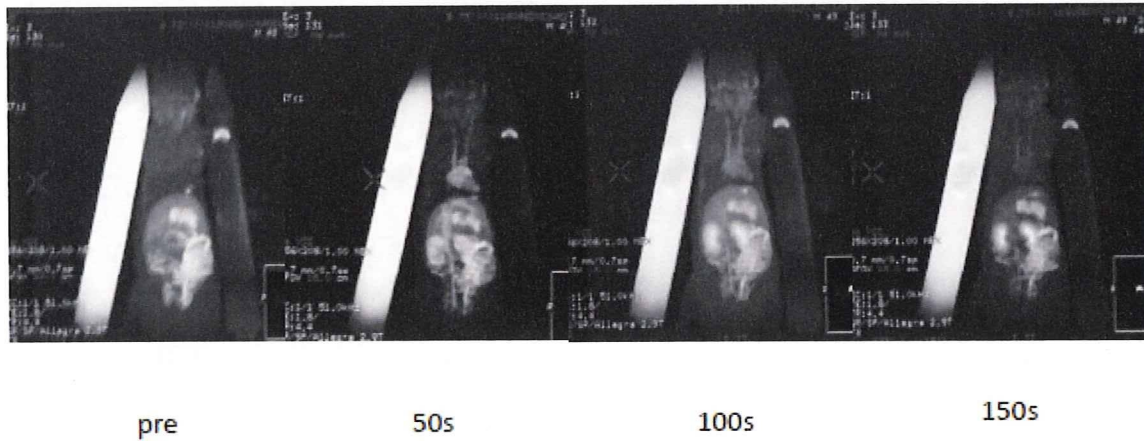


Fig. 4-2-07

A21 動脈相における信号増強効果を中等度に認められるが信号増強効果の持続性は乏しい。

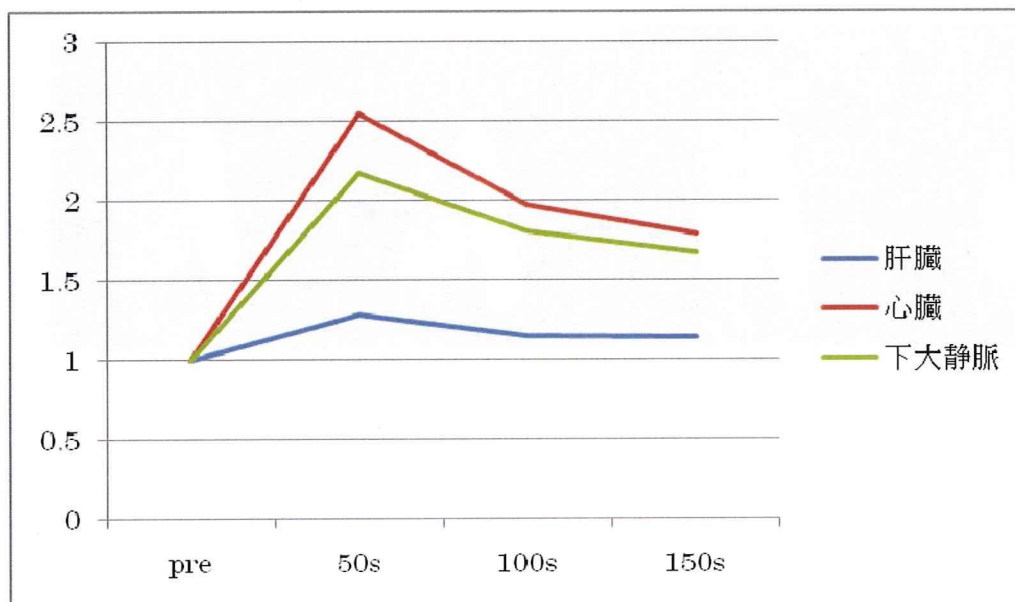


Fig. 4-2-08

A21 投与前後における肝臓、心臓、下大静脈のファントムに対する信号強度比の推移をグラフに示した。信号増強効果の持続性はいま一つである。

A28

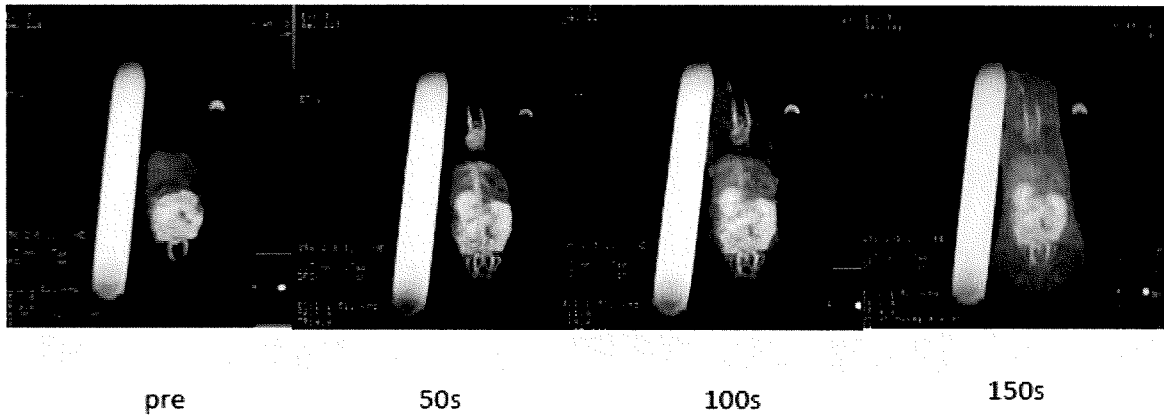


Fig. 4-2-09

A28 造影直後から血管内の信号増強効果があり、比較的長時間（150秒後まで）信号増強効果が持続する。

A29

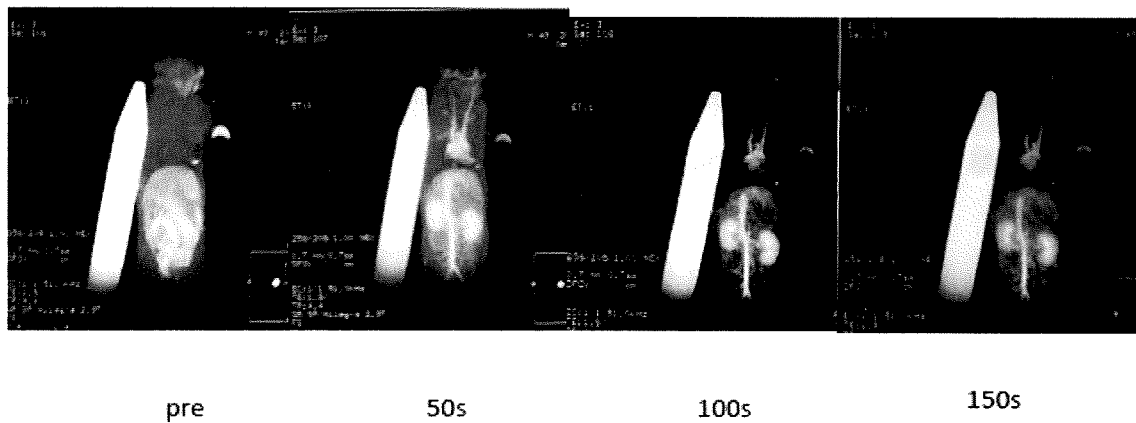


Fig. 4-2-10

A29 造影剤投与直後の信号増強効果も高く、少なくとも150秒後まで信号増強効果が持続している。

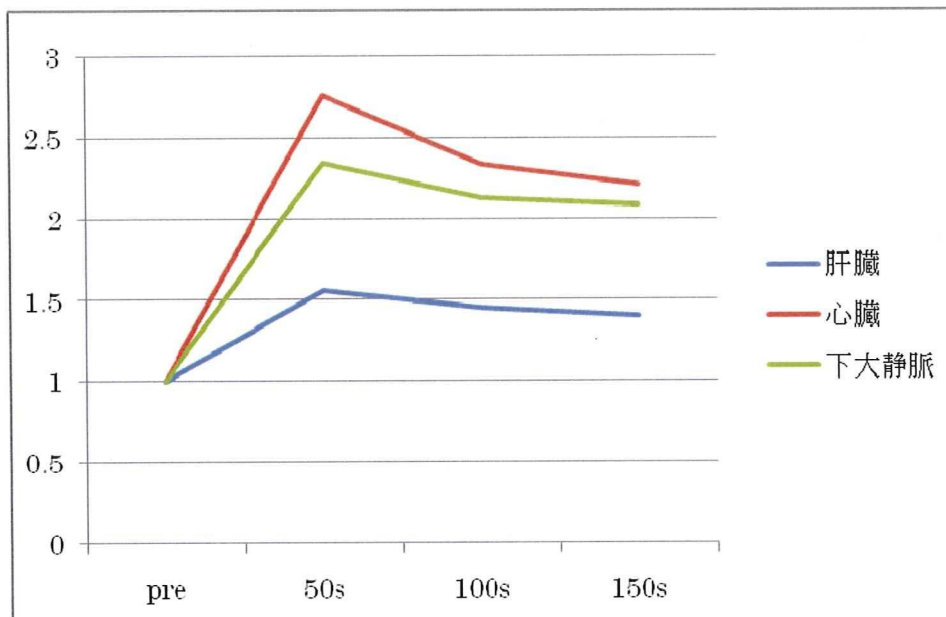


Fig. 4-2-11

A29 投与前後における肝臓、心臓、下大静脈のファントームに対する信号強度比の推移をグラフに示した。組織特異性造影剤として期待の持てるリガンドである。

A14

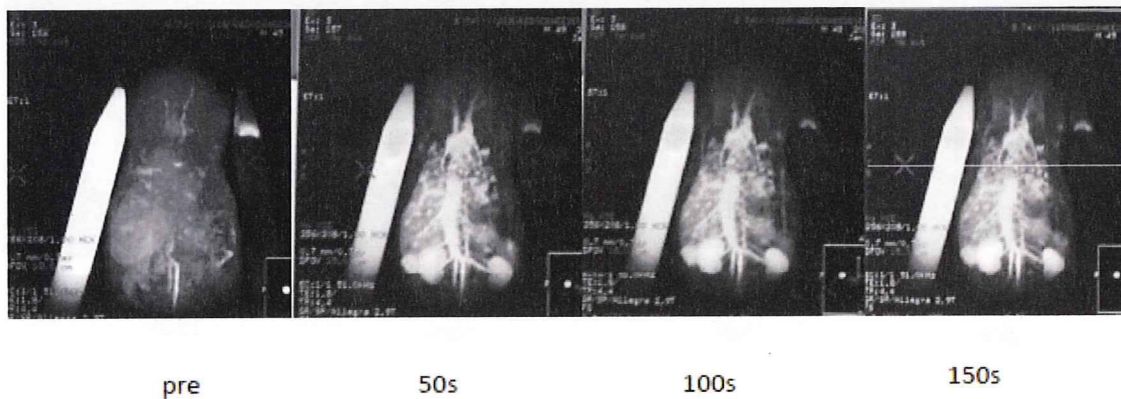


Fig. 4-2-12

A14 担がんラット。血管とともに腫瘍が染まっている。信号増強は少なくとも150秒後まで持続している。

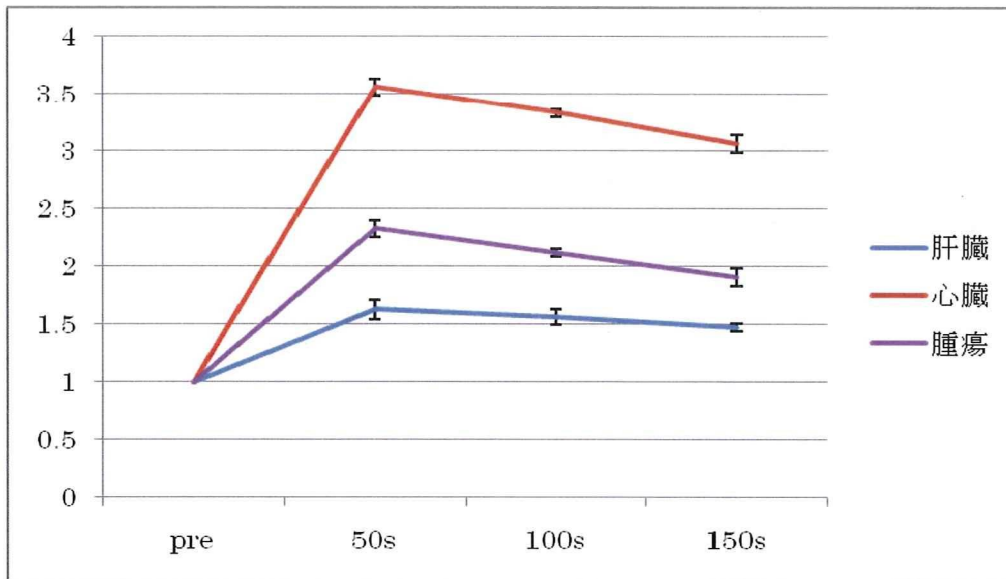


Fig. 4-2-13

A14 投与前後における肝臓、心臓、腫瘍のファントムに対する信号強度比の推移をグラフに示した。腫瘍と肝臓との信号強度比には表記の全ての時相において有意差がある ($p < 0.05$)。

A21

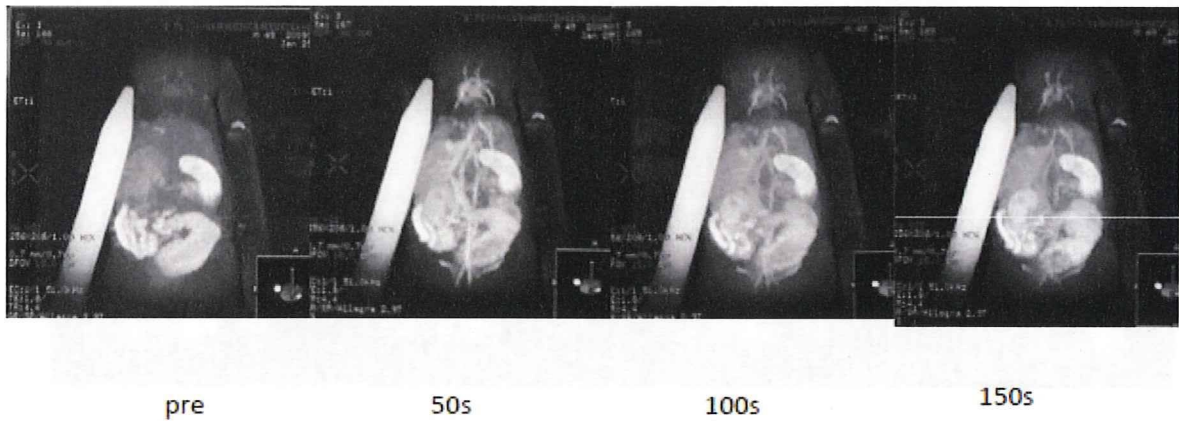


Fig. 4-2-14

A21 坦がんラット。造影剤投与後の血管腔内の信号増強効果は概ね良好。少なくとも150秒後まではコントラストが持続する。

A21

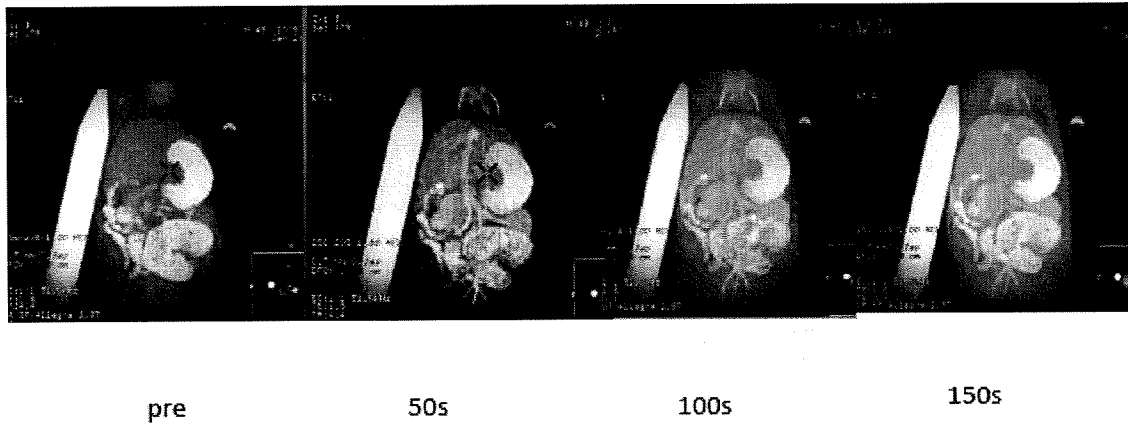


Fig. 4-2-15

A21 がんラットモデル。造影直後の信号増強効果は中等度であるがマグネビストよりは劣る印象である。

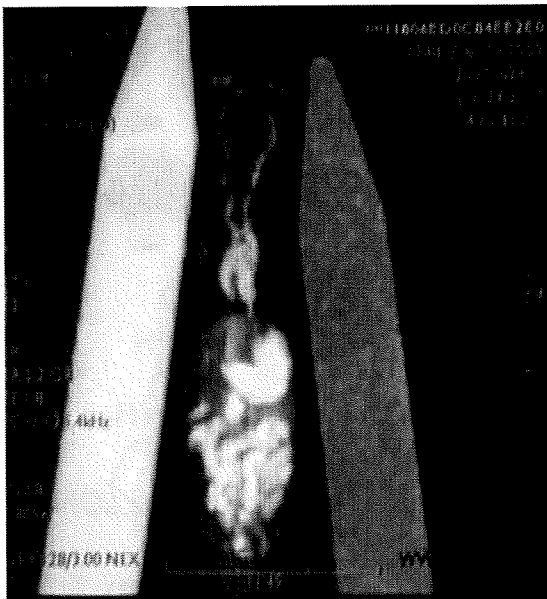
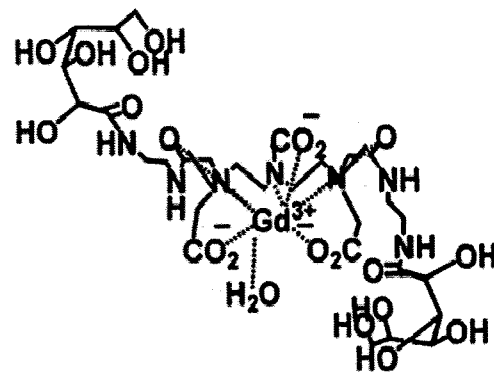


Fig. 4-2-16

グルコースを2分子側鎖に有する造影剤である。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) ほどの信号強度と持続性は無いが、比較的良好なMRAが得られており、ある程度有望と思われる。



Gd-DTPA-Glc(OH)

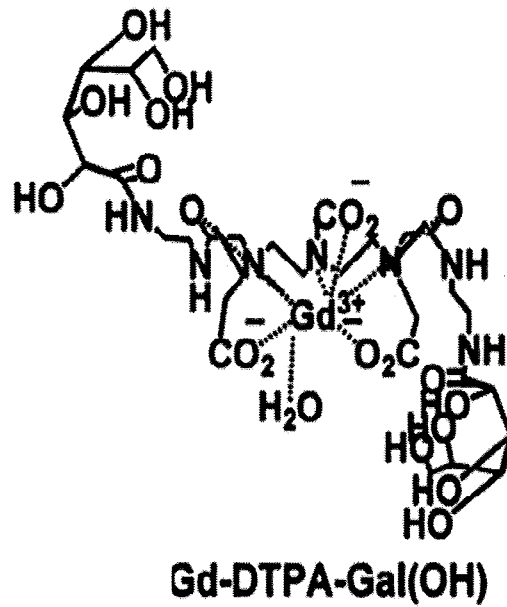


Fig. 4-2-17

ガラクトースを2分子側鎖に有する造影剤。比較的良好なMRAが得られている。

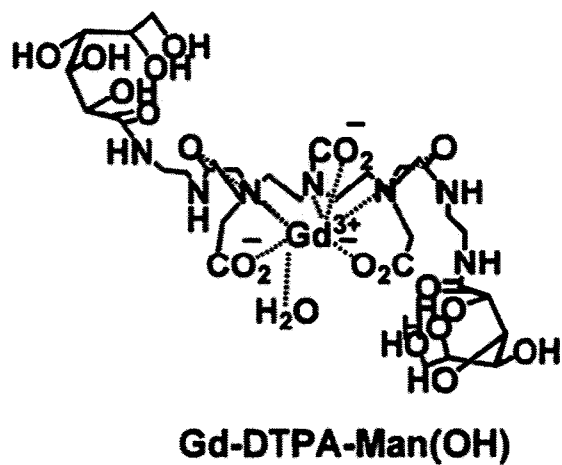
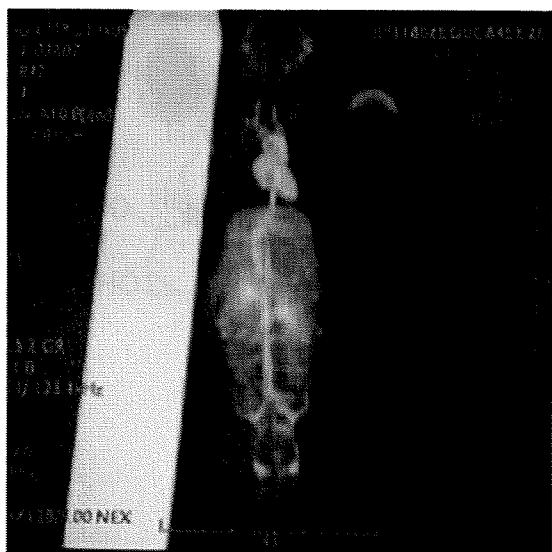
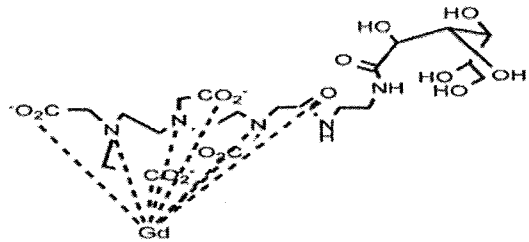
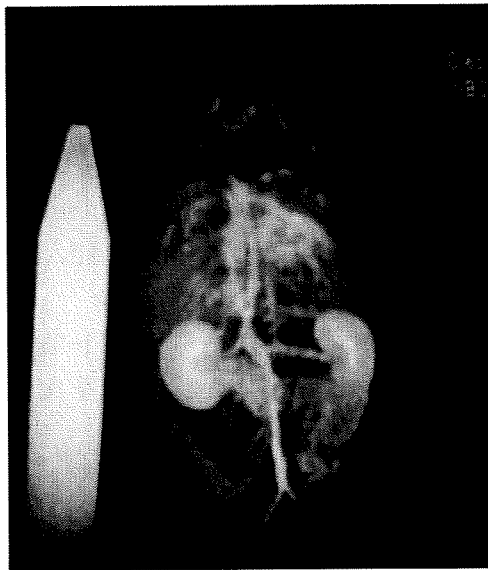


Fig. 4-2-18

マンノース2分子を側鎖に有する造影剤。比較的良好なMRAが得られている。

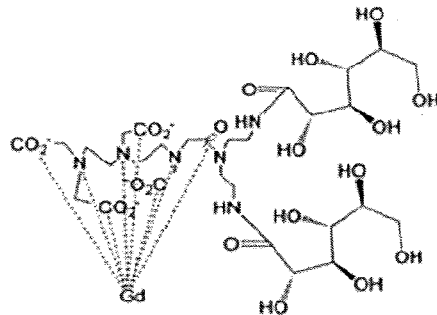
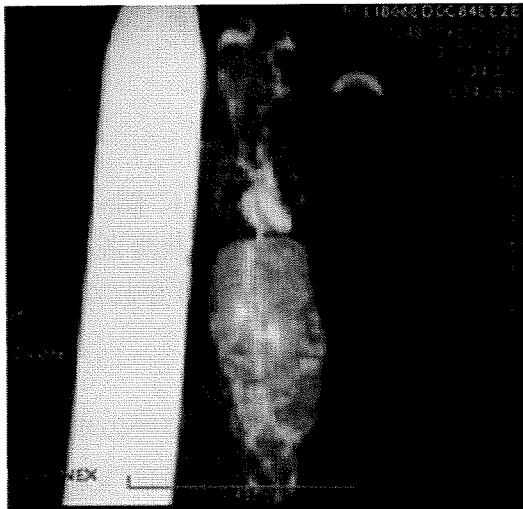


Chemical Formula: $C_{22}H_{35}GdN_5O_{15}^{4-}$
 Exact Mass: 767.14
 Molecular Weight: 766.79
 m/z: 767.14 (100.0%), 765.14 (80.4%), 769.14 (78.2%), 766.14 (71.9%), 764.14 (50.8%), 768.14 (24.3%), 770.14 (19.7%), 763.13 (7.2%), 771.14 (2.6%), 771.15 (2.3%), 768.13 (1.5%), 766.13 (1.3%)
 Elemental Analysis: C, 34.46; H, 4.60; Gd, 20.51; N, 9.13; O, 31.30

Gd-DTPA-AS2-Glc(OH)

Fig. 4-2-19

グルコースを1分子側鎖に有する造影剤。Gd-DTPA-D1-Glc(OH)よりも信号増強効果は弱く造影効果の持続時間も短かった。



Gd-DTPA-AS1-Gal(OH)

Fig. 4-2-20

ガラクトース2分子を有する造影剤。Gd-DTPA-D1-Glc(OH)ほどではないが、比較的良好的なMRAが得られた。

4-2-4 多血性腫瘍（肝細胞がん）の信号増強効果

我々の造影剤の中で最もR1が大きく信号増強効果の持続するGd-DTPA-D1-Glc(OH)を使用して多血性腫瘍の造影を試みた。

(1) 投与並びに撮影

すべてのラットにはまず最初に通常のMR造影剤であるGd-DTPA (0.1mmol/kg、Magnevist、日本シェーリング、大阪)と6時間以上の間隔をあけて、Gd-DTPA-D1-Glc(OH)、