

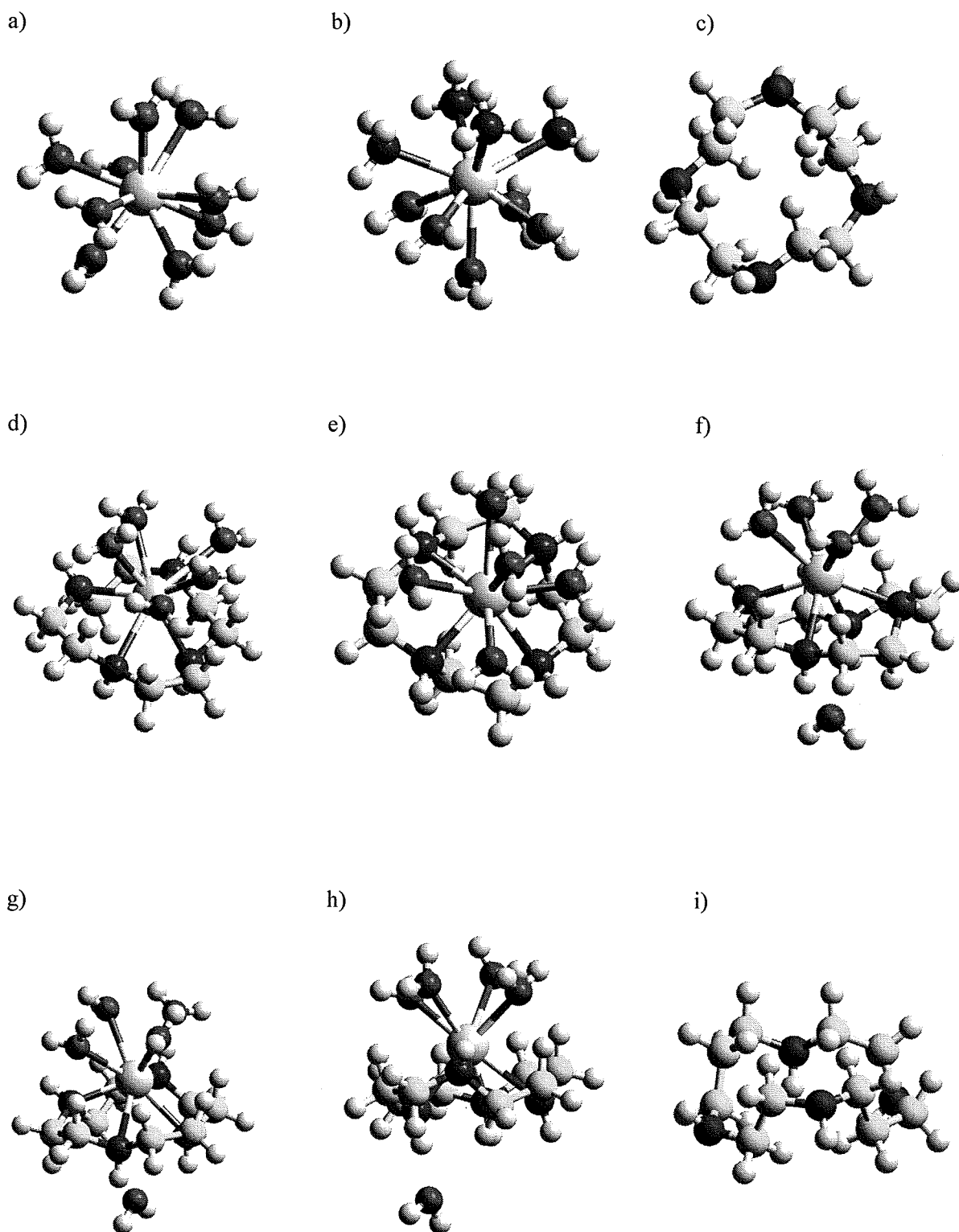


Fig. 5-10 PM3 法で最適化された配位子および Gd^{3+} 錯体の構造(括弧内の数字は計算された錯体形成によるエンタルピー変化 ΔH_f^0 (kJ/mol)): a) $[\text{Gd}(\text{H}_2\text{O})_9]^{3+}$, b) $[\text{Gd}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$, c) 配位子 I, d) $[\text{Gd}(\text{I-3})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-255.95), e) $[\text{Gd}(\text{I-1})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-251.79), f) $[\text{Gd}(\text{I-8})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-246.83), g) $[\text{Gd}(\text{I-7})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-227.15), h) $[\text{Gd}(\text{I-16})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-225.07), i) 配位子 II.

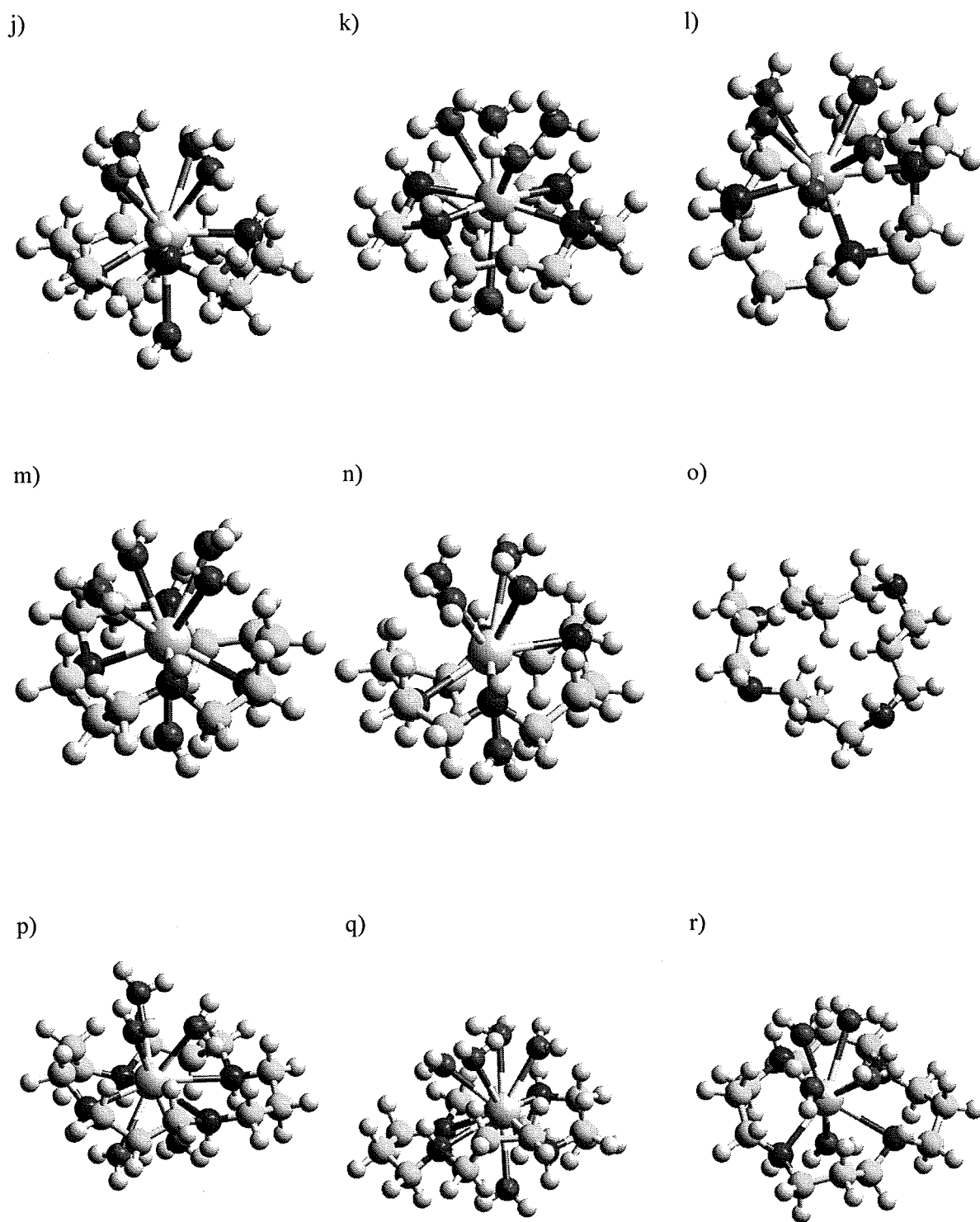


Fig. 5-10 PM3 法で最適化された配位子および Gd^{3+} 錯体の構造(括弧内の数字は計算された錯体形成によるエンタルピー変化 ΔH_f^0 (kJ/mol)) (続き) j) $[\text{Gd}(\text{II-7})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-266.59), k) $[\text{Gd}(\text{II-5})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-240.85), l) $[\text{Gd}(\text{II-2})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-233.66), m) $[\text{Gd}(\text{II-8})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-229.44), n) $[\text{Gd}(\text{II-6})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-226.93), o) 配位子 III, p) $[\text{Gd}(\text{III-13})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-213.54), q) $[\text{Gd}(\text{III-8})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-198.03), r) $[\text{Gd}(\text{III-6})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-193.81).

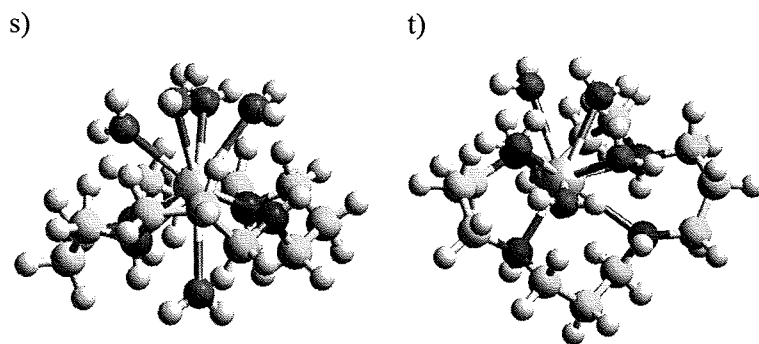


Fig. 5-10 PM3 法で最適化された配位子および Gd^{3+} 錯体の構造(括弧内の数字は計算された錯体形成によるエンタルピー変化 ΔH_f^0 (kJ/mol)) (続き) s) $[\text{Gd}(\text{III-16})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-192.06), t) $[\text{Gd}(\text{III-4})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ (-191.41).

計算により得られた熱力学データである ΔH_f^0 の値を比較すると、最も安定な錯体を形成するのはアミン II であった。Gd-DOTA の基本骨格である I に比べても 10kJ/mol の差がある。大環状ポリアミン I~III の員数は I が 12 員環、II が 14 員環、III が 16 員環である。したがって、計算結果は、 Gd^{3+} イオンに対する最も適した環状配位子は 14 員環であることを示している。配位子の窒素原子・酸素原子とガドリニウムイオンの原子間距離は配位原子と金属イオンとの結合の強さを示す。環歪みのない非環状の $[\text{Gd}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ 錯体での PM3 法により最適化した構造の N-Gd 距離の平均値は 2.577Å、O-Gd 平均距離は 2.476Å であり、*ab initio* 法で得られた、より正確な値(Table 5-01)よりわずかに短い結合を示しているが、このレベルの計算でも酸素原子と窒素原子の配位結合距離の傾向を正しく表している。しかし、それぞれの配位子で最も安定な錯体を見てみると、配位子 I がつくる最も安定な錯体 $[\text{Gd}(\text{I-3})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ では、Gd-O 間平均距離の方が Gd-N 間平均距離より 0.1Å 長くなった。Gd-N 間平均距離は 2.540Å であり $[\text{Gd}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ 錯体よりわずかに短いだけであるが、Gd-O 間平均距離は 2.641Å と著しく延びている。Gd-O 間平均距離が Gd-N 間平均距離より長くなる傾向は配位子 II や III でも観察された。特に、最も安定な $[\text{Gd}(\text{II-7})(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ 錯体では平均 Gd-N 間距離が 2.486Å と非環状の $[\text{Gd}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_5]^{3+}$ 錯体のそれに比べ約 0.9 Å も短くなった。これに比べ、Gd-O 結合は弱まり平均値は 2.791Å であり、非環状の錯体より 0.32Å も延びている。これは、ポリアミン配位子がガドリニウムイオンの配位空間をかなり覆ってしまうため、残った空間を弱配位子である水分子が集まってひしめき合い長い結合では 3Å を超えてしまうものもあるためである。Gd-O 結合が弱まる分、Gd-N 結合がより強まった結果を示したと考えられる。この水配位子とガドリニウムイオンとの結合の弱化は水中での配位子交換の容易さを高める効果が期待される。

Gd-DOTA からわかるように、配位子 I との 12 員環キレートはかなり安定であるが、比較的環が小さいため、ガドリニウムイオンの赤道周りを覆うことができず、配位子はやや極方向に傾いている。このため、安定な錯体では 5 個の水分子はキレートの片方の面に集まった配座が安定であった(Fig. 5-10d,e)。キレート環の上下に水 4 配位子：1 配位子に分かれた配座も安定性を示すが、アミン配位子が存在している半球側では水分子は立体的な影響から配位できず配位圏外に押し出されていて、実質的に $[\text{Gd}(\text{I})(\text{H}_2\text{O})_4]^{3+} + \text{H}_2\text{O}$ の構造になってしまう

ている(Fig. 5-10f,g,h)。配位子交換反応の機構は 5-2-2 節で示したように協奏的な配位子の進入と脱離が同時に起こる機構である。したがって、ガドリニウムイオンを挟んで脱離する水分子の反対側から進入する水分子が入り込む余地がある方が反応速度は高いと考えられる。この点で、5 個の水分子がキレート面的一方にしか存在しない[Gd(I)(H₂O)₅]³⁺錯体は脱離する水分子の反対側への攻撃が禁止されるため反応速度の低下が予想される。これに対して、II の 14 員環、III の 16 員環キレート錯体では I の錯体に比べて、ガドリニウムの赤道周りにキレート環を形成できるので、キレート環の上下に 4 配位子：1 配位子に分かれた配座が安定性を示している(Fig. 5-10j,k,m,n,p,q,r)。したがって、これらの錯体ではキレートの上下から水分子が交互に攻撃し、[5 配位子：0 配位子]錯体 ⇌ [4 配位子：1 配位子]錯体間の配座変換を通して磁気緩和が進行しやすいと期待される。

以上のように、配位子交換が速い錯体の分子設計では環状錯体では環の大きさが緩和速度に大きく影響するであろうという予測が成り立つ。同様に非環状錯体でも錯体配位子でアミン窒素をどのくらいの長さのリンカでつなぐかが重要である。ジエチレントリアミンを基本骨格とする Gd-DTPA では二つのエチレン鎖でアミンをつなげておりその構造は基本的に不完全な I の構造とみなすことができる。したがって、このアミンはガドリニウムイオンの赤道周りを巻くためにはやや短すぎ、窒素が配位表面の一部領域に集まってしまうために、水分子の攻撃を妨げる可能性がある。一方のエチレン鎖をトリメチレン鎖に置き換えることで、環状配位子で 12 員環(I)から 14 員環(II)に大きくしたときと同じ効果が得られると期待される(Fig. 5-11)。

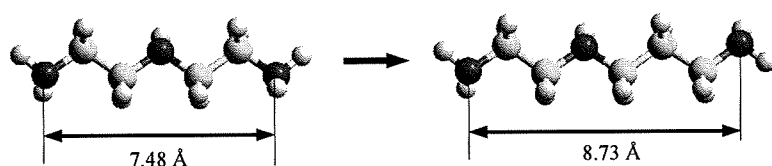


Fig. 5-11 ジエチレントリアミンから (アミノエチルアミノ)プロピルアミンへ

5-4 結論

量子化学計算法を用いてガドリニウム(III)錯体における配位子交換機構の精密な解析と、大環状ポリアミンによるガドリニウム(III)錯体形成能について検討した。

精密な非経験的計算法によりガドリニウムの配位子交換反応が、10 配位構造をとらず、有機化学反応における S_N2 反応に似た水分子の攻撃と立体的に対称の位置にある水配位子の脱離が協奏的に起こることを明らかにした。

大環状ポリアミンの配位による錯体形成では、市販の Gd-DOTA の母核にあるような 12 員環の配位が必ずしも最も安定ではなく、14 員環による配位の方が安定な錯体を形成しうることが示唆された。また、このような環状配位子ではアミンとガドリニウムイオンの配位結合が非環状の配位子に比べて強まるため、水配位子とガドリニウムの結合が相対的に弱まり配位子交換が起こり易くなるであろうという予測も得られた。

配位子交換機構の結果を併せて考慮すると、非環状配位子である DTPA でも中心のトリア

ミンの構造はジエチレントリアミンより、3-(2-アミノエチルアミノ)プロピルアミンを母核とする配位子の方が配位子交換しやすい錯体を形成できる可能性を示した。

5-5 参考文献

- [1] J. J. P. Stewart, *J. Comput. Chem.*, **1989**, *62*, 206.
- [2] Gaussian 09, Revision A.02, M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel, G. E. Scuseria, M. A. Robb, J. R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, B. Mennucci, G. A. Petersson, H. Nakatsuji, M. Caricato, X. Li, H. P. Hratchian, A. F. Izmaylov, J. Bloino, G. Zheng, J. L. Sonnenberg, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, J. A. Montgomery, Jr., J. E. Peralta, F. Ogliaro, M. Bearpark, J. J. Heyd, E. Brothers, K. N. Kudin, V. N. Staroverov, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A. Rendell, J. C. Burant, S. S. Iyengar, J. Tomasi, M. Cossi, N. Rega, J. M. Millam, M. Klene, J. E. Knox, J. B. Cross, V. Bakken, C. Adamo, J. Jaramillo, R. Gomperts, R. E. Stratmann, O. Yazyev, A. J. Austin, R. Cammi, C. Pomelli, J. W. Ochterski, R. L. Martin, K. Morokuma, V. G. Zakrzewski, G. A. Voth, P. Salvador, J. J. Dannenberg, S. Dapprich, A. D. Daniels, O. Farkas, J. B. Foresman, J. V. Ortiz, J. Cioslowski, D. J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
- [3] U. Cosentino, D. Pitea, G. Moro, V. Barone, A. Villa, R. N. Muller, and F. Botteman, *Theor. Chem. Acc*, **2004**, *111*, 204.
- [4] Z. Pálkás, A. Roca-Sabio, M. Mato-Iglesias, D. Esteban-Gómez, C. Platas-Iglesias, A. de Blas, É. Tróth, *Inorg. Chem.* **2009**, *48*, 8878.
- [5] SPARTAN '06, build 129int9 (Jun 12 2007), B. J. Deppmeier, A. J. Driessen, T. S. Hehre, W. J. Hehre, J. A. Johnson, P. E. Klunzinger, J. M. Leonard, I. N. Pham, W. J. Pietro, J.-G. Yu, Y. Shao, L. Fusti-Molnar, Y. Jung, J. Kussmann, C. Ochsenfeld, S. T. Brown, A. T. B. Gilbert, L. V. Slipchenko, S. V. Levchenko, D. P. O'Neill, R. A. DiStasio Jr., R. C. Lochan, T. Wang, G. J. O. Beran, N. A. Besley, J. M., Herbert, C. Y. Lin, T. Van Voorhis, S. H. Chien, A. Sodt, R. P. Steele, V. A. Rassolov, P. E. Maslen, P. P. Korambath, R. D. Adamson, B. Austin, J. Baker, E. F. C. Byrd, H. Dachsel, R. J. Doerksen, A. Dreuw, B. D. Dunietz, A. D. Dutoi, T. R. Furlani, S. R. Gwaltney, A. Heyden, S. Hirata, C.-P. Hsu, G. Kedziora, R. Z. Khalliulin, P. Klunzinger, A. M. Lee, M. S. Lee, W. Liang, I. Lotan, N. Nair, B. Peters, E. I. Proynov, P. A. Pieniazek, Y. M. Rhee, J. Ritchie, E. Rosta, C. D. Sherrill, A. C. Simmonett, J. E. Subotnik, H. L. Woodcock III, W. Zhang, A. T. Bell, A. K. Chakraborty, D. M. Chipman, F. J. Keil, A. Warshel, W. J. Hehre, H. F. Schaefer III, J. Kong, A. I. Krylov, P. M. W. Gill, M. Head-Gordon, Wavefunction Inc., Irvine CA.

6. 生体内分子の認識

6. 生体内分子の認識

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

6-1-1

6-1-1-1 新規 MRI 造影剤対称型造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) における血液成分の分子認識

我々はこれまで MRI 造影剤として糖鎖を付加した、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 系列に基づいた、造影効果が高い新規の造影剤を開発して来た。それは肝臓がん組織や生体内の大小血管を特異的に造影できるものである。我々が開発した新規の造影剤がどのような理由から、高い造影効果があるのかは不明なことが多い。そこには血液成分やがん細胞とのインタラクションが考えられるが、未だにはっきりしない事も多々ある。今回新たに合成した造影剤を用いて、生体内分子の認識について検討を行なったので報告する。

これまでジエチレントリアミン五酢酸 (DTPA) 骨格にガドリニウムを配位し、その骨格に 4 分子のグルコースがアミド結合した構造をし、グルコース以外にもガラクトースやマンノースなどいくつかの糖を結合したものを我々が開発し作製した。組織や血管に高い造影効果があった。その中でも、4 分子のグルコース型 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が血管貯留性やコントラスト面において優れている (Fig. 6-1-01)。また、分子イメージング及び分子モデリングである (Fig. 6-1-02)。

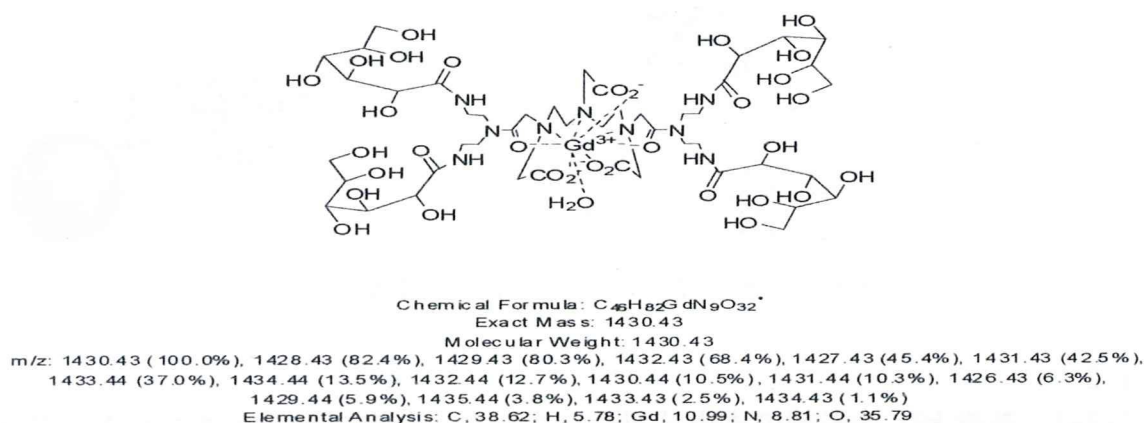


Fig. 6-1-01 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子構造

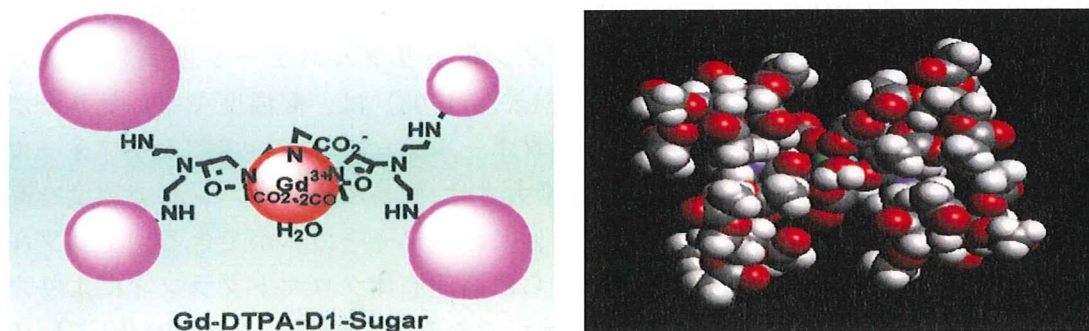


Fig. 6-1-02 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分子イメージング及び分子モデリング

6-1-1-2 非対称型造影剤における血液成分との分子認識

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

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に片側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。そしてその造影効果を評価した。いくつかの糖を結合した Gd-DTPA-D1-Sugar(OH) も作製した。

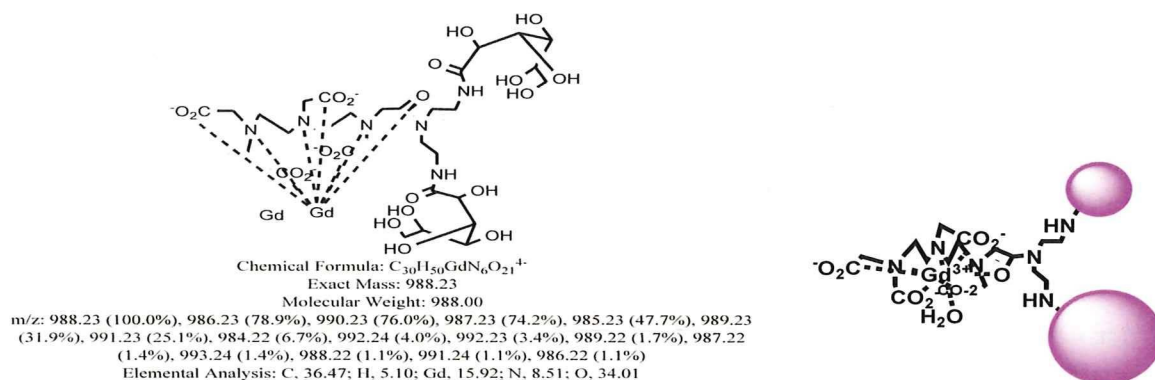


Fig. 6-1-03 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 構造式と分子イメージング

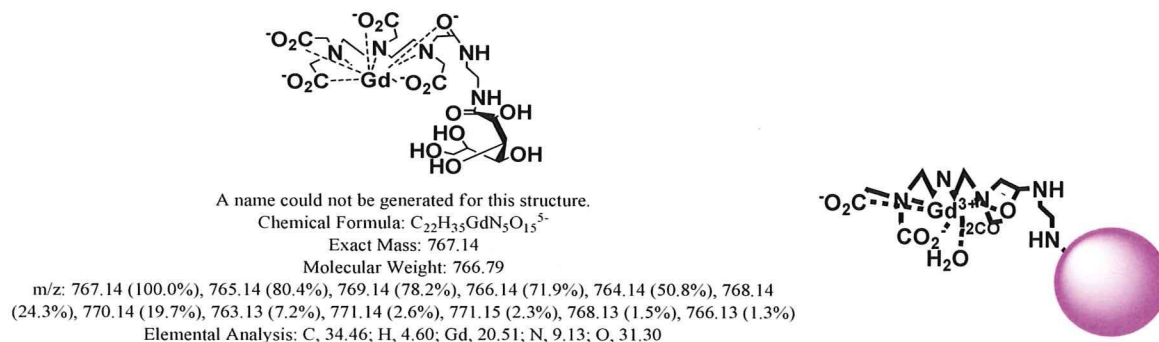


Fig. 6-1-04 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) 構造式と分子イメージング

6-1-2

6-1-2-1 新規 MRI 造影剤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・マツ社 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、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もできる。今回は、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と

(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. 6-1-06-1, -2)。



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 対称型造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)の質量分析測定 (ESI-TSQ)

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(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 質量分析計で negative 法で、5 ng/ μ l を注入し、温度 280 度にて質量数 MW:1429.9 を得た (Fig. 6-1-06 の上段)。この質量数は Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の理論値と一致する。また、ガドリニウム元素に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)。

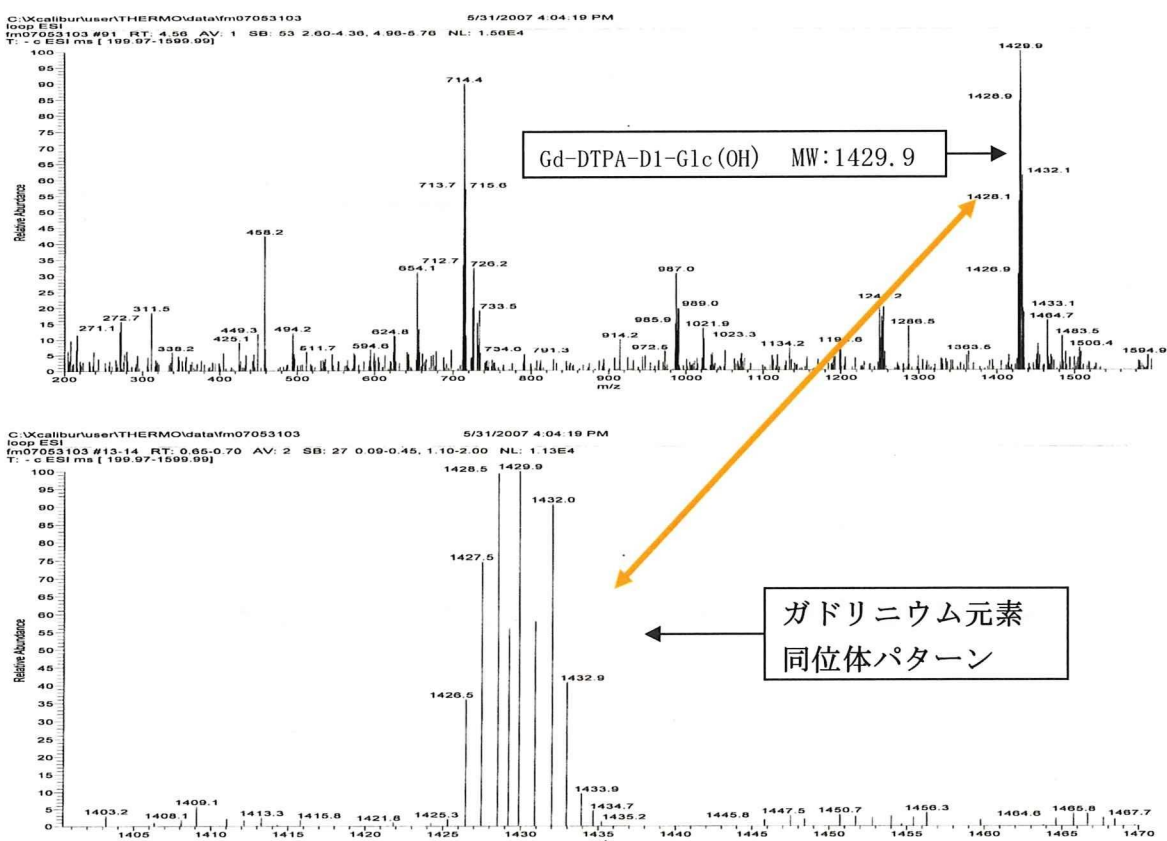


Fig. 6-1-06 ESI-TSQ 質量分析計による新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の測定

6-1-2-3 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) の質量分析測定 (ESI-TSQ)

我々は今回新たに 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に片側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 を注入し、温度 280 度にて質量数 MW:988.2 を得た (Fig. 6-1-07 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、ガドリニウム元素に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した (Fig. 6-1-07 の下段)。

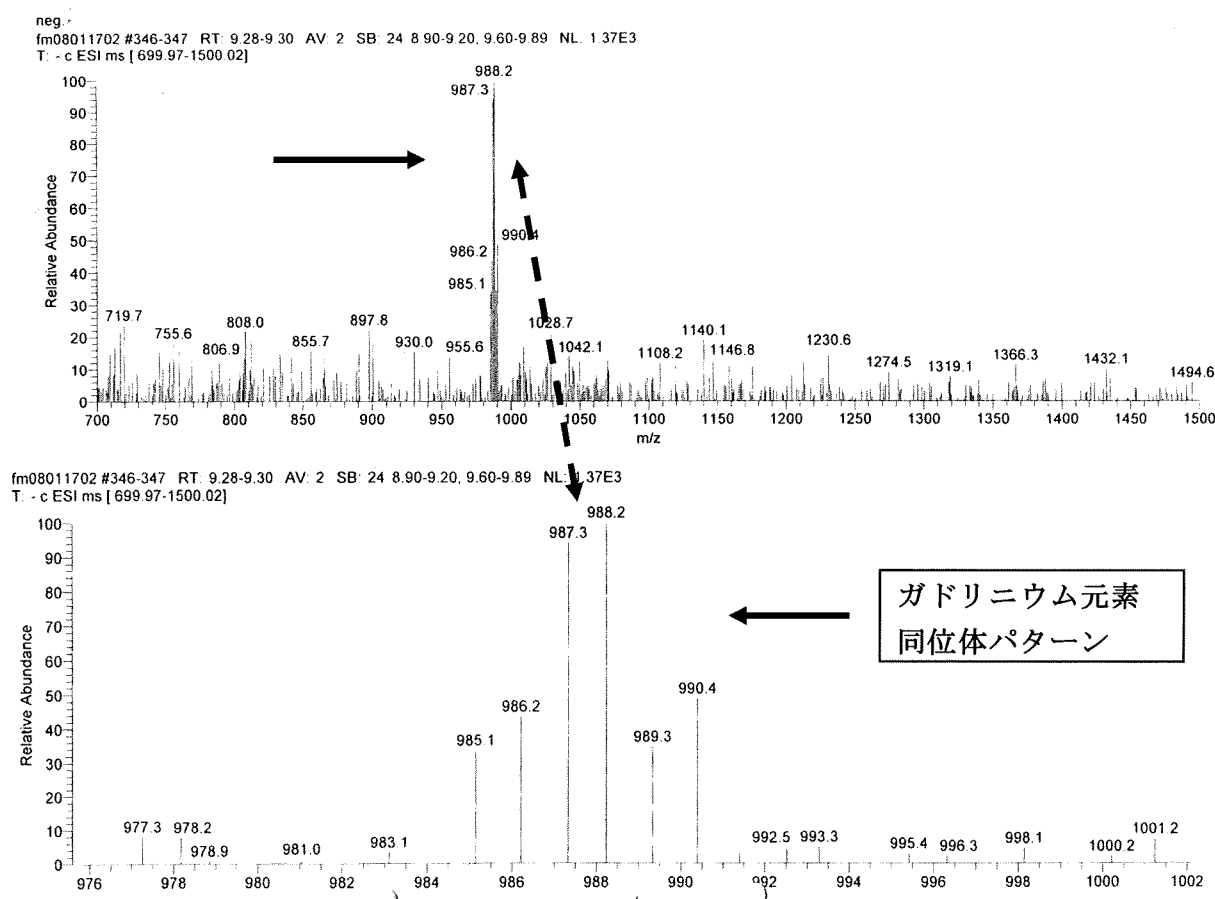


Fig. 6-1-07 ESI-TSQ による新規非対称造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) の質量測定

6-1-2-4 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の生体内分子認識

MRI 造影剤として糖鎖を付加し、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) 系列に基づいた、造影効果が高い新規の造影剤を開発して来た。さらに、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。

6-1-2-5 複合電子顕微鏡システムによる、Gd-DTPA-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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 線を測定すれば、Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)が結合している物質の特定ができる (Fig. 6-1-09)。



Fig. 6-1-08 複合電子顕微鏡システム 日本電子 JEM200CX

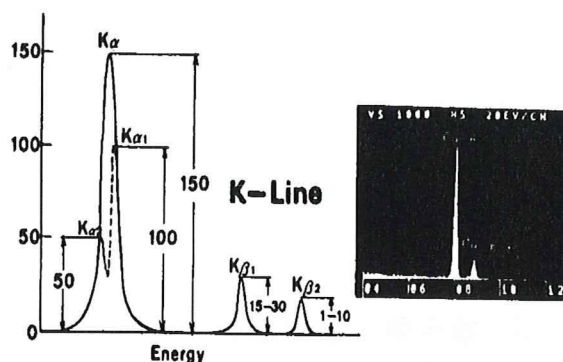
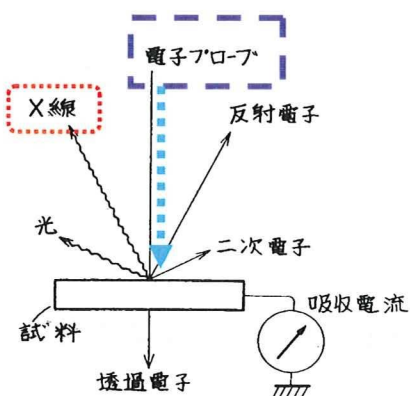


Fig. 6-1-09 直線型特性 X 線集合分光器と特性 X 線の K ラインの相対強度

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、非対称型造影剤 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)。

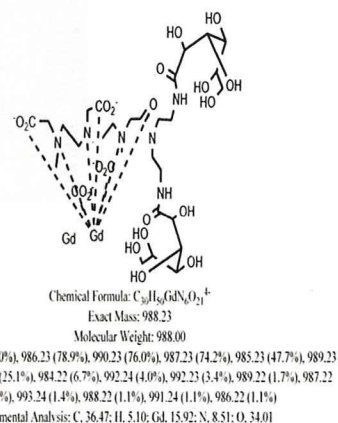
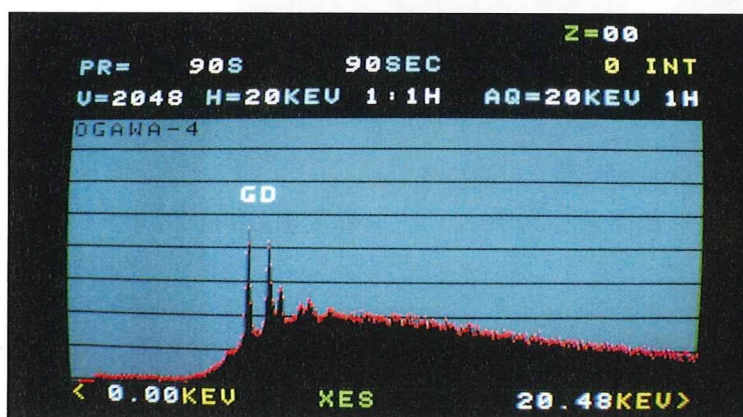


Fig. 6-1-10 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 分子とガドリニウム元素固有特性 X 線スペクトル

ガドリニウム元素に固有な特性 X 線の数本のスペクトルが得られる。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-AS1-2Glc(OH) の結合性の検討

血漿タンパクは血清総タンパクと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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(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-AS1-2Glc(OH) の混和による特性 X 線の測定

6-1-2-6 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・オブ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. 6-1-12)。



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サンプルを測定温度にした。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. 6-1-13)

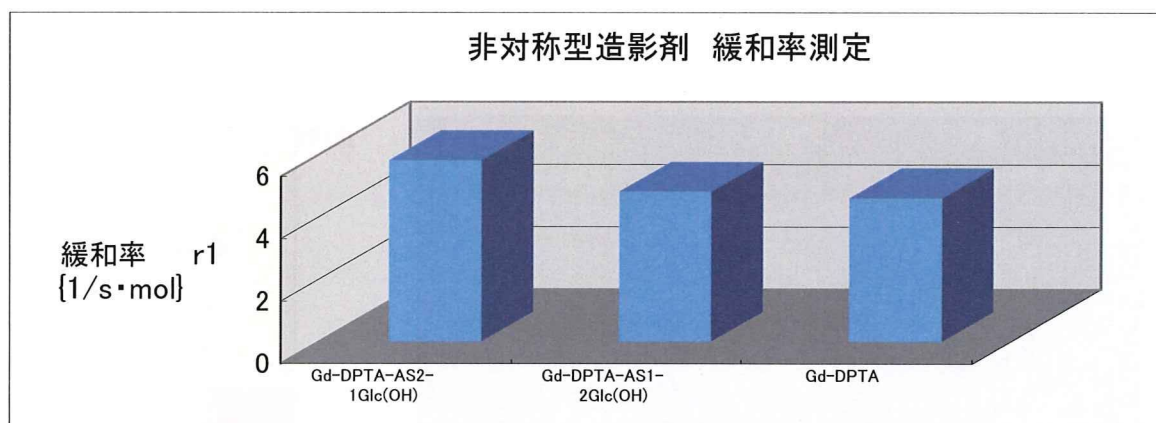


Fig. 6-1-13 非対称型造影剤 Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH) 及び Gd-DTPA-AS2-1Glc(OH) の緩和率測定

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に片側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 (ミニスペック) 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) ともマグネシウムより高いコントラストを得ている。

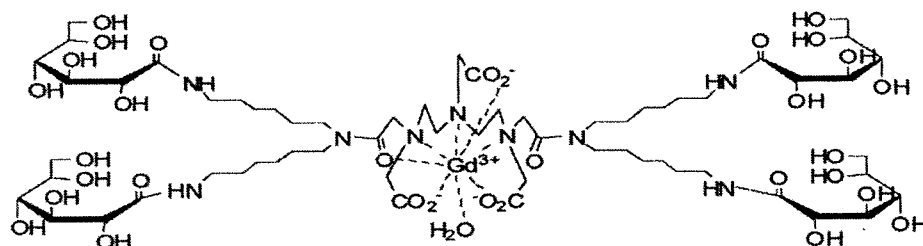
また、血管貯留時間も短いことも得られている。この非対称型造影剤は4分子のグルコース型に比べて血管貯留性やコントラスト面においてはさほどではないが、分子サイズが小さいことから、血管内からの少量の出血や滲みや腹内における出血など、今までの造影剤では見られなかった現象を、捉えることがサポートできるのではないかとと思われる。

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、がん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

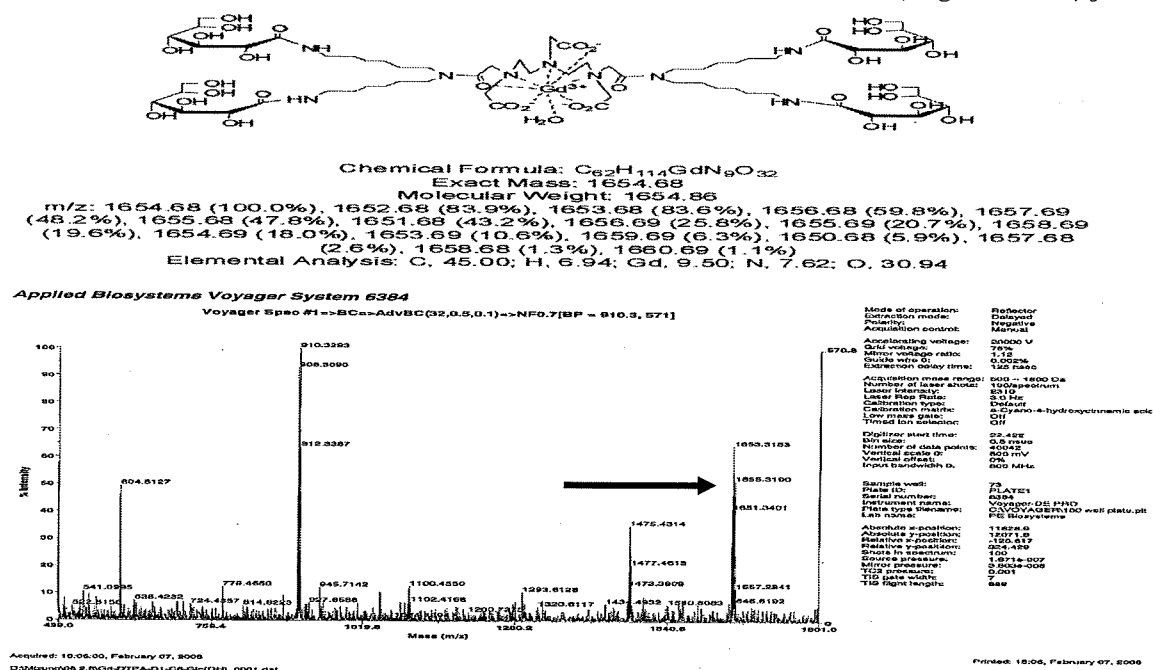
Fig. 6-1-14 新規ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の構造式

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) の質量測定のみ分子量を測定した。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)。



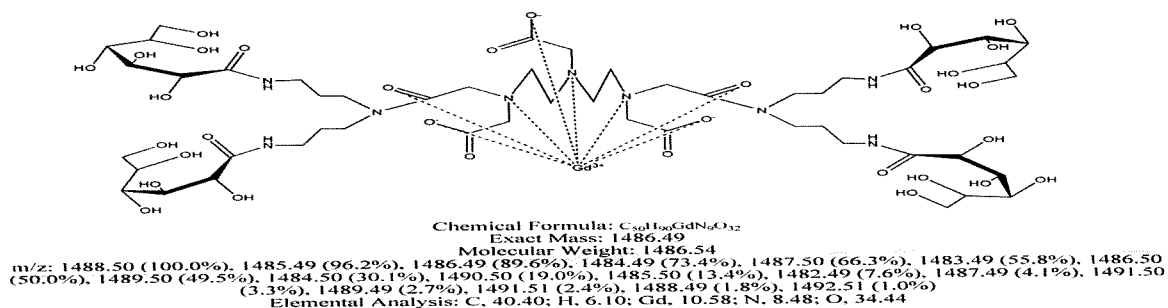


Fig. 6-1-16 ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) の構造式

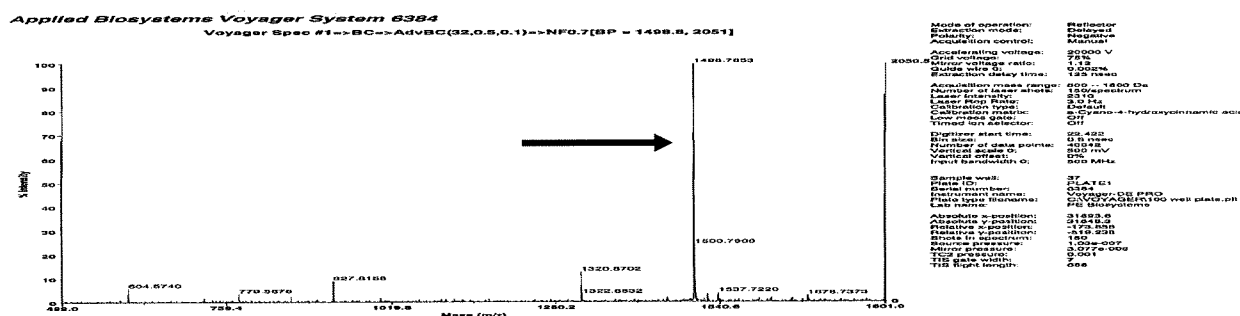


Fig. 6-1-17 ロングブランチ型造影剤 Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) の質量測定

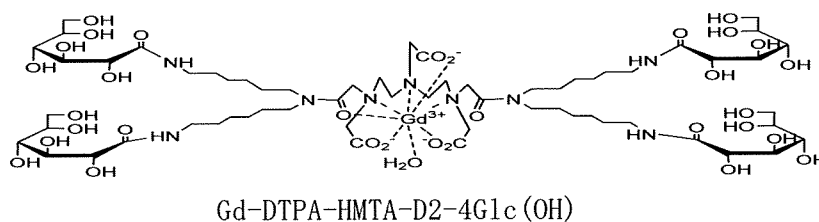
6-1-3-2 複合電子顕微鏡システムによる、ロングブランチ型造影

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に作り、その中に Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(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-HMTA-D2-4Glc(OH) の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. 6-1-08)。

測定結果から、ガドリニウム元素固有な特性 X 線の数本のスペクトルが得られる。ガドリニウムの特性 X 線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)。



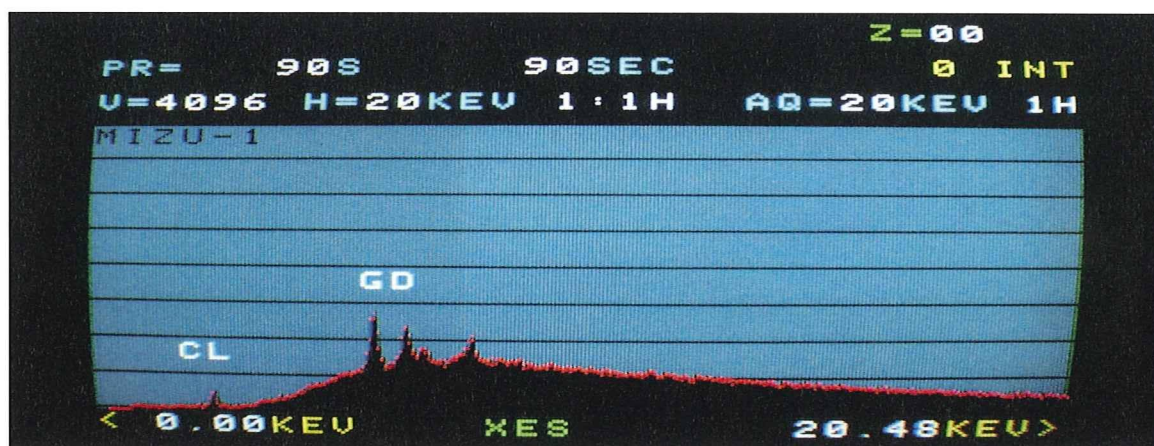
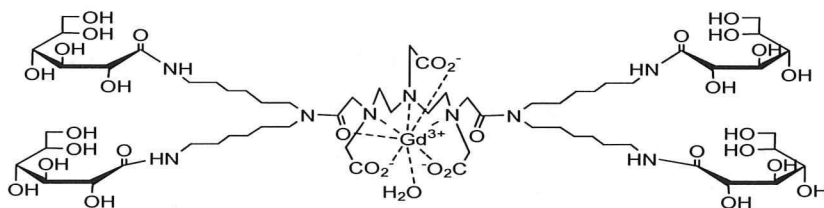


Fig. 6-1-18 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) のガドリニウム固有な特性 X 線スペクトル

(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 $500 \mu\text{l}$ に 0.05mmol/ml Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) を $20 \mu\text{l}$ 加えて、 37°C 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、 $15,000\text{rpm}$ 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)

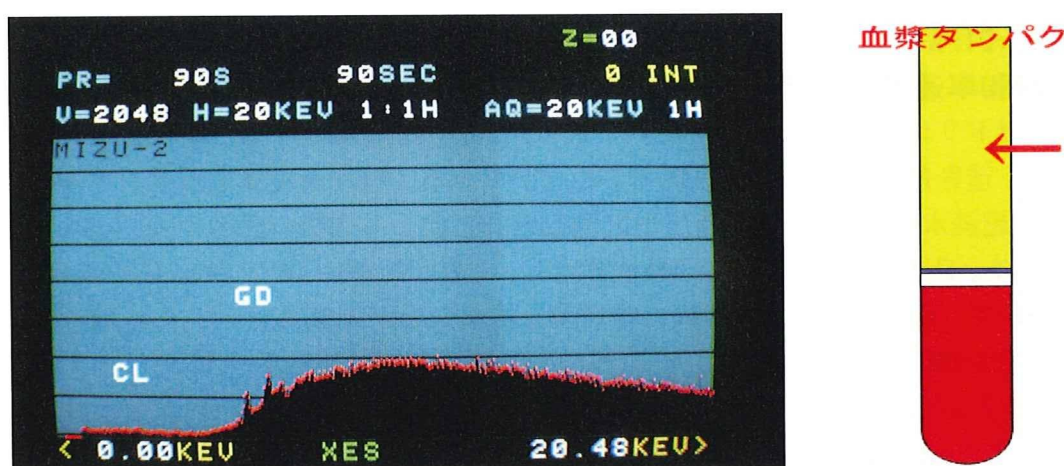


Fig. 6-1-19 血漿タンパクと Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)の混和による特性 X 線の測定

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ブランチ型造影剤 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・オブ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 ミニスペック

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 入れ測定を行なった。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. 6-1-21)。

(1) 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-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水素原子のプロトン緩和率を測定することにより、緩和速度を算出し、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. 6-2-21)。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。

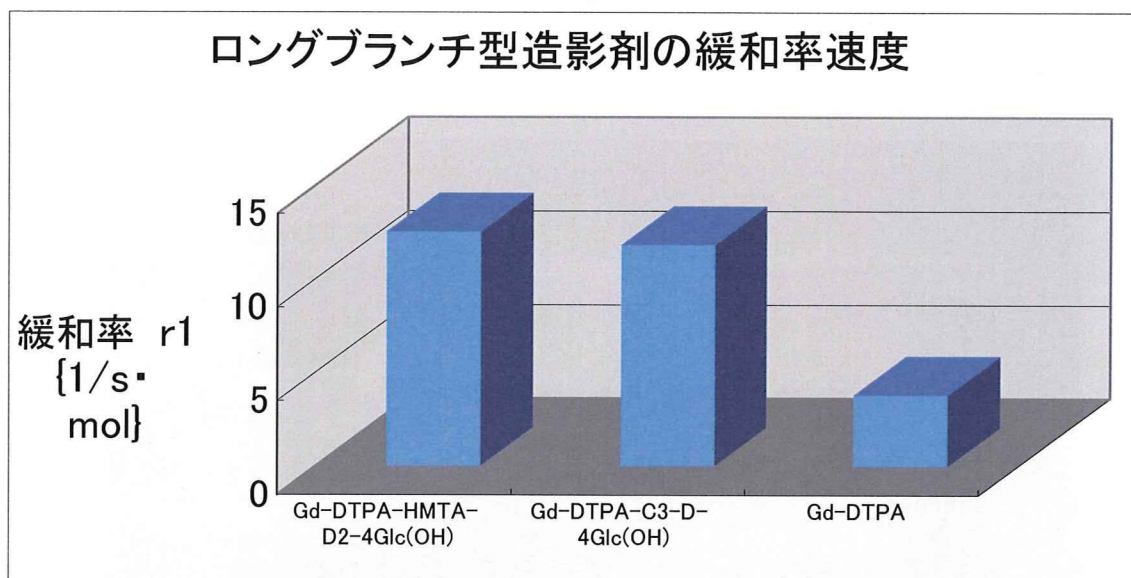
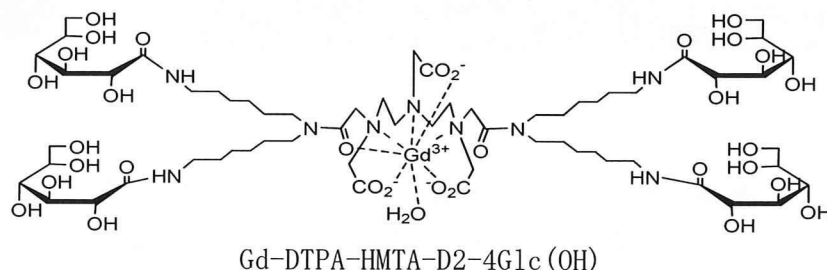


Fig. 6-1-21 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH), Gd-DTPA-C3-D-4Glc(OH) 緩和率速度の測定

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 以下の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