

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た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。

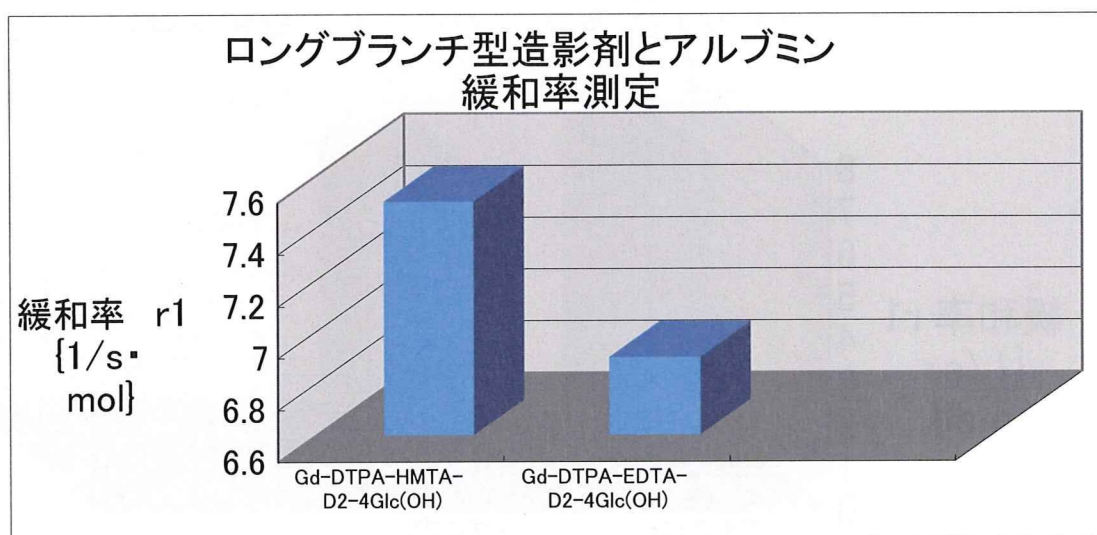
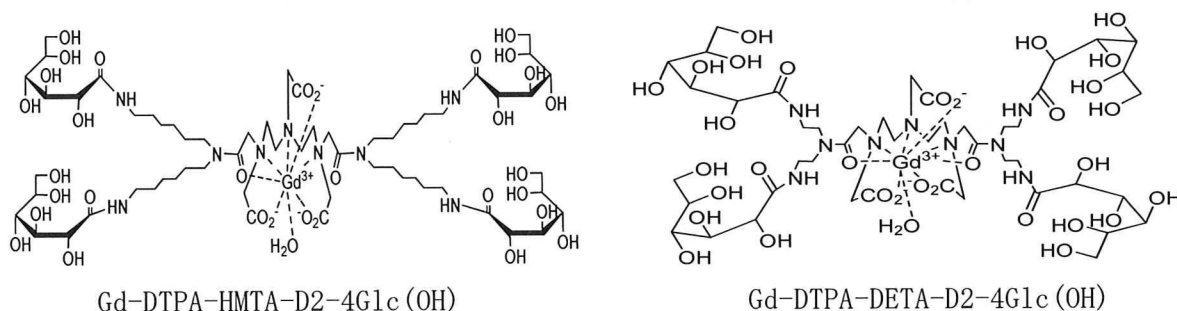


Fig. 6-1-22 ロングブランチ型 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) と Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) との血清アルブミンとの緩和率

(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 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、血清アルブミンと血清γ-グロブ

リンの緩和率に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、混和でのゆる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。

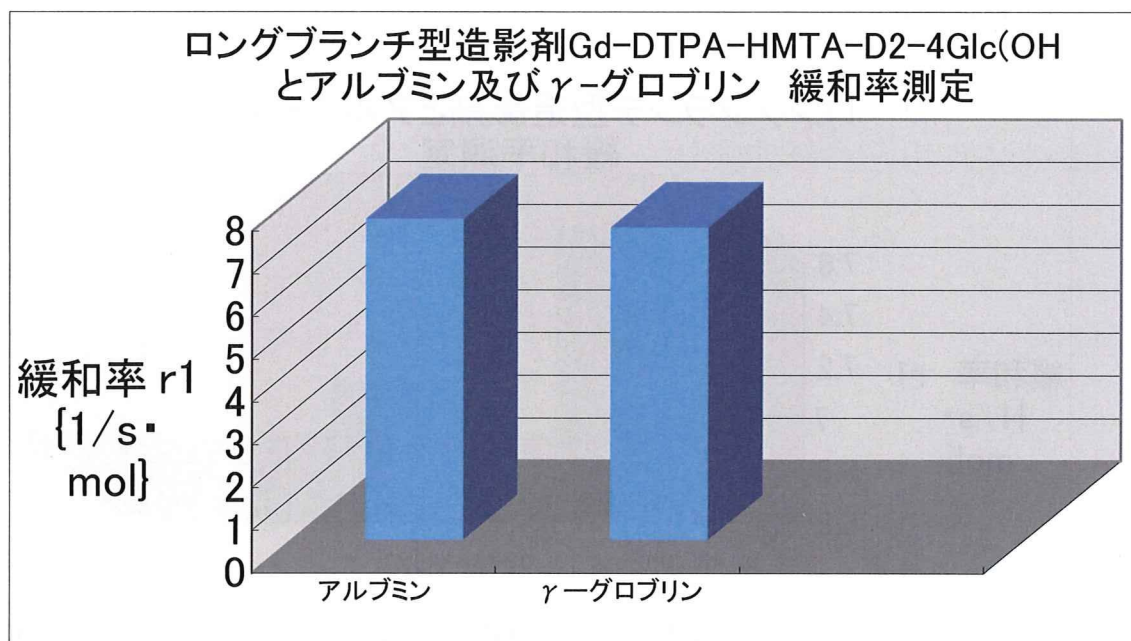
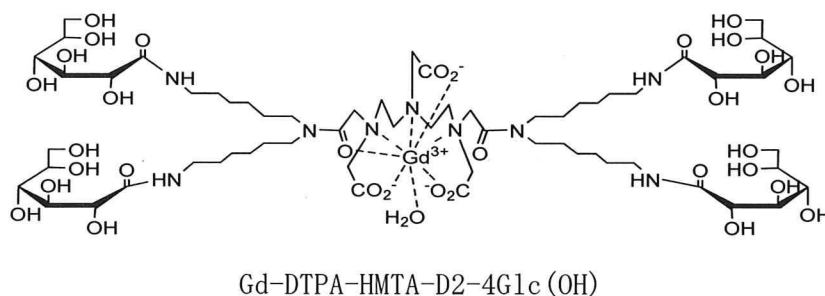


Fig. 6-1-23 ロングブランチ型 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) の血清アルブミン及び血清 γ -グロブリンとの緩和率

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

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が陰イオン性界面活性剤や非イオン性界面活性剤存在下であったとしても、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミンの結合性が損なわれないことが、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でのガドリニウム測定から得られた (Fig. 6-1-24)。そのことよりドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、染色ののちタンパクバンド所のゲルを切り出し、切り出したゲル

からタンパクを電氣的に抽出し、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定して、タンパク質と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討を行なった。

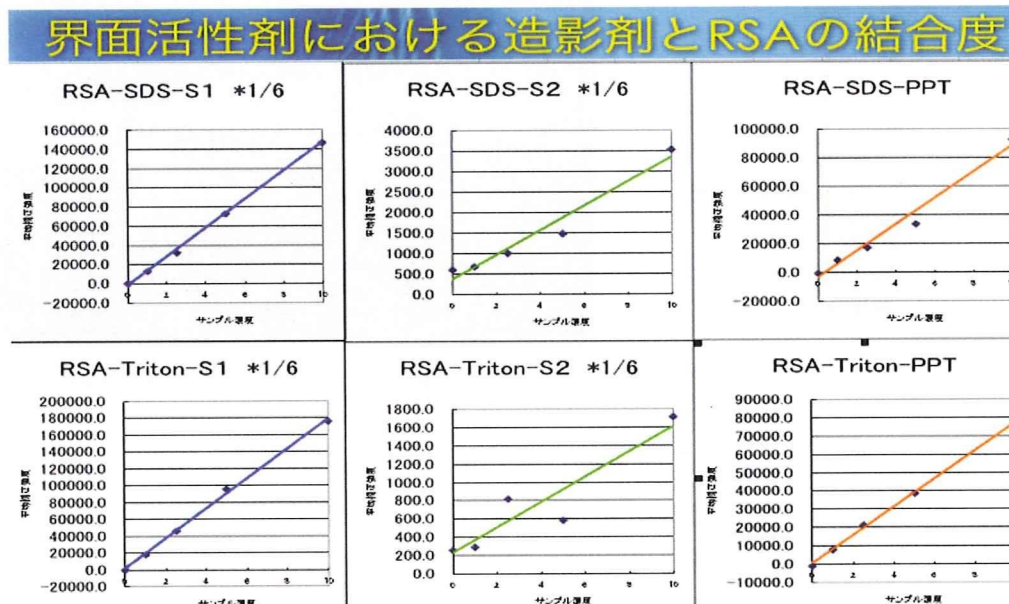


Fig. 6-1-24 界面活性剤 (SDS, TritonX100) によるラット血清アルブミン (RSA) と Gd-DTPA-D1-Glc (OH) との結合性への影響測定

6-1-4-1 SDS-PAGE ゲルから切出し分離した血清タンパク並びに血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討

新規造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) が陰イオン性界面活性剤や非イオン性界面活性剤存在下であったとしても、Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とラット血清アルブミンの結合性が損なわれないことが、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でのガドリニウム測定から得られた (Fig. 6-1-24)。そのことよりドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ない、染色ののちタンパクバンド所のゲルを切り出し、切り出したゲルからタンパクを電氣的に抽出し、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定して、タンパク質と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討を行なった。

SDS-PAGE で分離したタンパク質のバンドをカッターで切り出し、切り出したゲルから中から SDS 化したタンパクを電気泳動エリ्यूター装置でゲルから Buffer 液へ抽出を行なう。電気泳動エリ्यूター装置は BioRad 製 Modle420 で行なった (Fig. 6-1-25)。

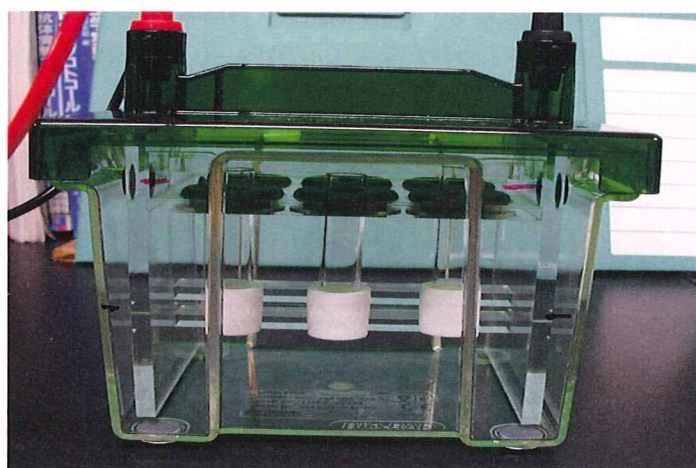
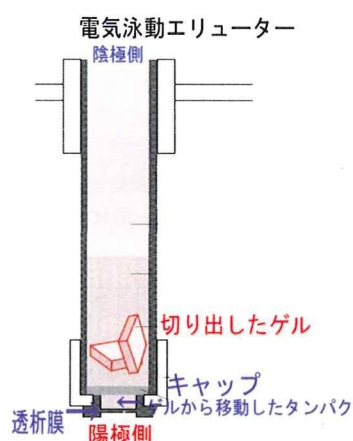


Fig. 6-1-25 ガラス管内の模式図と電気泳動エリ्यूター装置 BioRad 製 420

ガラス管の中で SDS-PAGE から切り出したゲルの中のタンパクは、陰性の SDS に包まれているので、電圧をかけると陽極側に引かれゲル中から外に出て、透析膜で仕切られたキャップの中に移動する。電気は流れるが透析膜で仕切られているので、徐々にタンパクだけがキャップの中で濃縮される。キャップの中で濃縮されたタンパク溶液を誘導結合プラズマ発光分光分析でガドリニウム元素の測定をすれば、タンパク質と Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性の検討が行なえる。ガドリニウム元素が検出されれば Gd-DTPA-D1-Glc(OH) とそのタンパク質と何らかの結合性があったと考えられる (Fig. 6-1-25)。

ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離した、血清アルブミン及び血清タンパク質のゲルのバンドをカッターで切り出し、電気泳動エリ्यूター装置でそれぞれのタンパクを回収し、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定した (Scheme 6-1-01)。

- (1) $0.058 \mu\text{mol/ml}$ ラット血清アルブミン + 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (2) 正常ラット血清 + 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (3) 肝細胞癌ラット血清 + 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

実験手順

1. $0.058 \mu\text{mol/ml}$ Rat Serum Albumin , Normal Rat Serum And Cancer Rat Serum $50 \mu\text{l}$
add 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-Glc(OH) $50 \mu\text{l}$

↓

37°C 30min Incubate

↓ ← Lysis buffer $100 \mu\text{l}$

SDS-PAGE

↓ ← Cut Gel

Electric Elution

↓ Protein (Albumin etc)

ICP-AES

Scheme 6-1-01 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と血清タンパクとの結合性を ICP を用いての

測定手順

SDS-PAGE ゲルから切出し分離した血清タンパク並びに血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との結合性を検討した。

SDS-PAGE 分離ゲル中の (□) 箇所を切出しの誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定した。

- (□) Blank : 空レーンの切り出した分離ゲル
- (□) R1 : ラット血清アルブミン + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S1 : 正常ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S2 : 正常ラット血清 (アルブミン) + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) S3 : 正常ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C1 : 癌ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C2 : 癌ラット血清 (アルブミン) + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
- (□) C3 : 癌ラット血清タンパク + Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

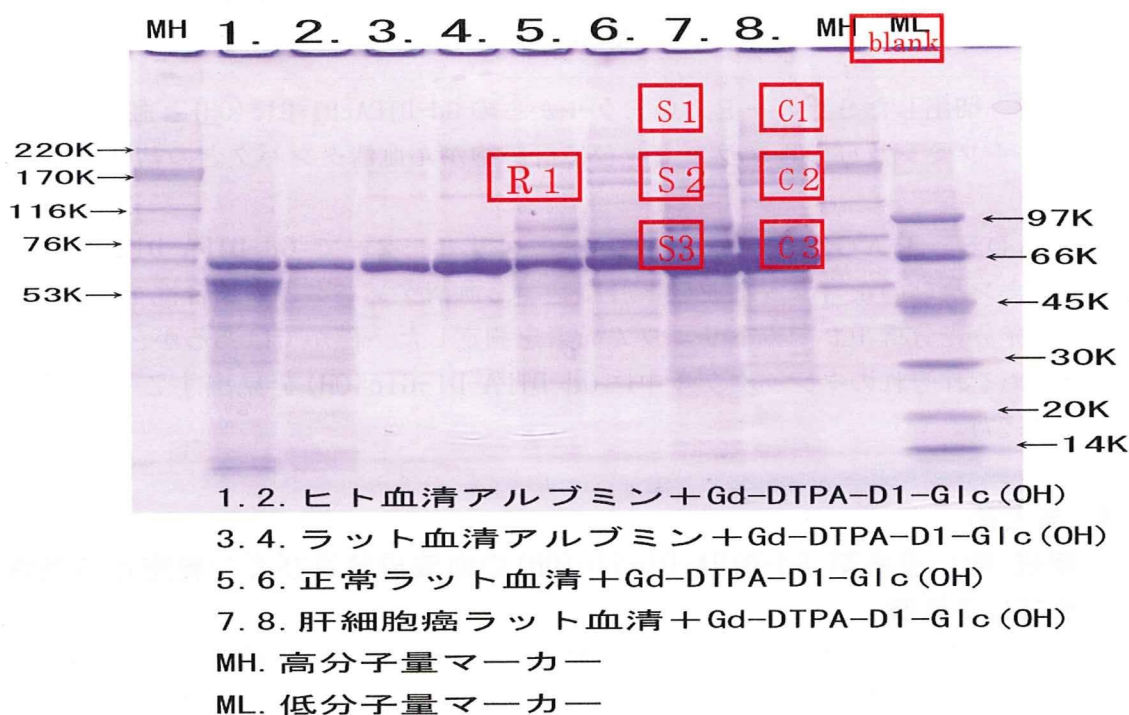


Fig. 6-1-26 SDS-PAGE □ 切出したゲル、ラット血清、血清タンパク及び血清アルブミンと Gd-DTPA-D1-Glc(OH) との混和ゲルからの切出し箇所

SDS-PAGE 条件

ゲル濃度 : 5~20% グラジエントゲル 泳動電流 : 20mA 泳動時間 : 90 分

固定時間 : 30 分 染色液 : 和光クイック CBB 染色時間 : 60 分

脱色の終了したゲルは蒸留水による洗浄、不要部分の切除の後、蒸留水で湿らせた濾紙上に配置し、張り付き防止用ラップを被せて、乾燥をさせ、その後必要箇所をカッターで切り出す (Fig. 6-1-26)。

Control : 0.05mmol/ml Gd-DTPA-D1-G1c(OH)

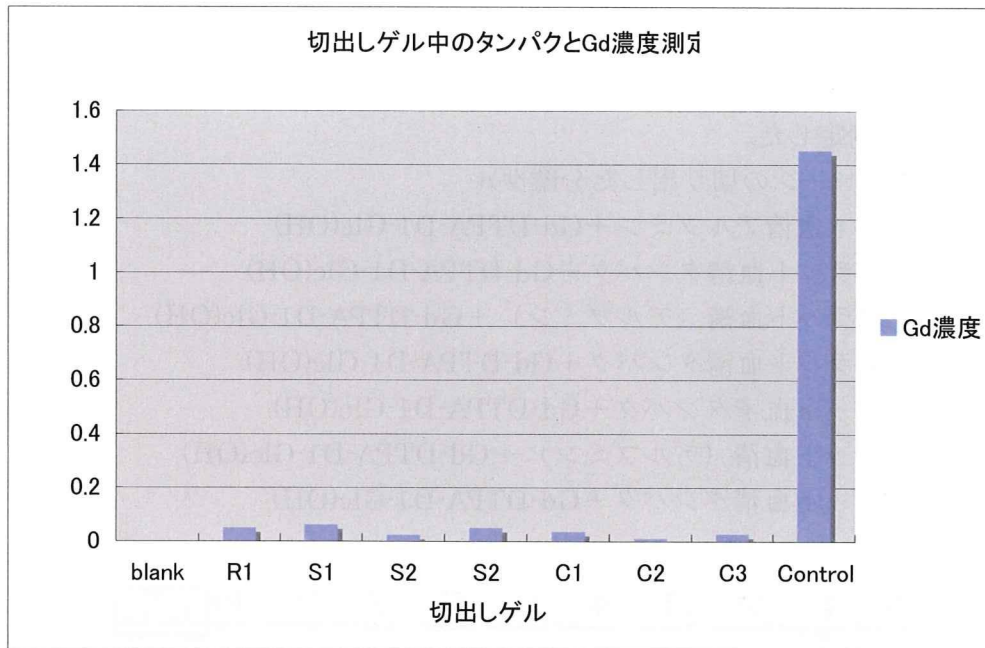


Fig. 6-1-27 切出した SDS-PAGE ゲルからの Gd-DTPA-D1-G1c(OH) と血清アルブミン及びの正常ラット並びに肝細胞がん血清タンパクとの結合性の測定

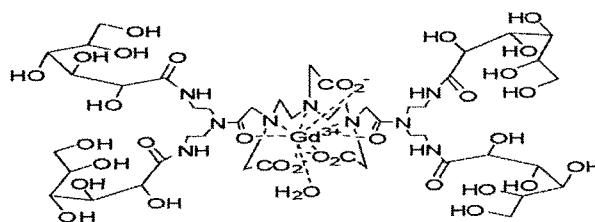
切出した SDS-PAGE ゲルから、電気泳動エリ्यूターで Gd-DTPA-D1-G1c(OH) と血清アルブミン及びの正常ラット並びに肝細胞がん血清タンパクとの結合性を、誘導結合プラズマ発光分光分析 ICP でガドリニウム元素を測定した。僅かではあるが、血清アルブミンをはじめそれぞれのタンパクゲル中に Gd-DTPA-D1-G1c(OH) を見出すことができた (Fig. 6-1-27)

6-1-4 まとめ

(1) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) の血液成分及びガン細胞との結合性及び分子認識

新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) は実験用ラットの Invivo 評価結果から肝臓がん組織や大小血管の造影効果が高いことが判明した。このことはこの新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) は肝臓がん細胞や血液成分と何らかの分子との結合性があるのではないかと考えられ、複合電子顕微鏡システムや磁場勾配型核磁気共鳴装置 (ミニスペック) 並びに誘導結合プラズマ発光分光分析装置 (ICP-AES) を用いて検討を行ない、下記の実験結果を得たので報告する。

MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-G1c(OH) の実験結果より以下のことが云える



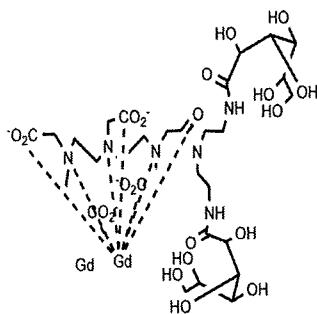
Chemical Formula: $C_{45}H_{82}GdN_9O_{32}^-$
Exact Mass: 1430.43

Molecular Weight: 1430.43

m/z: 1430.43 (100.0%), 1428.43 (62.4%), 1429.43 (80.3%), 1432.43 (68.4%), 1427.43 (45.4%), 1431.43 (42.5%), 1433.44 (37.0%), 1434.44 (13.5%), 1432.44 (12.7%), 1430.44 (10.5%), 1431.44 (10.3%), 1426.43 (6.3%), 1429.44 (5.9%), 1435.44 (3.8%), 1433.43 (2.5%), 1434.43 (1.1%)
Elemental Analysis: C, 38.62; H, 5.78; Gd, 10.99; N, 8.81; O, 35.79

- (1) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は赤血球、白血球及び血小板との結合性は認められなかった。
- (2) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は白血病細胞（慢性骨髄性白血病 K562、単球性白血病 U937）との結合性は認められなかった。
- (3) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は胃がん細胞（MKN-45）との結合性は認められなかった。
- (4) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) はラット血清アルブミンとの結合性は少量ながら認められた。
- (5) 新規 MRI 造影剤 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) はいくつかのラット血清タンパクとの結合性は少量ながら認められた。

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



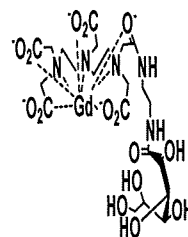
Chemical Formula: $C_{30}H_{50}GdN_6O_{21}^{4-}$

Exact Mass: 988.23

Molecular Weight: 988.00

m/z: 988.23 (100.0%), 986.23 (78.9%), 990.23 (76.0%), 987.23 (74.2%), 985.23 (47.7%), 989.23 (31.9%), 991.23 (25.1%), 984.22 (6.7%), 992.24 (4.0%), 992.23 (3.4%), 989.22 (1.7%), 987.22 (1.4%), 993.24 (1.4%), 988.22 (1.1%), 991.24 (1.1%), 986.22 (1.1%)
Elemental Analysis: C, 36.47; H, 5.10; Gd, 15.92; N, 8.51; O, 34.01

Gd-DTPA-AS1-2Glc(OH)



A name could not be generated for this structure.

Chemical Formula: $C_{22}H_{35}GdN_5O_{15}^{5-}$

Exact Mass: 767.14

Molecular Weight: 766.79

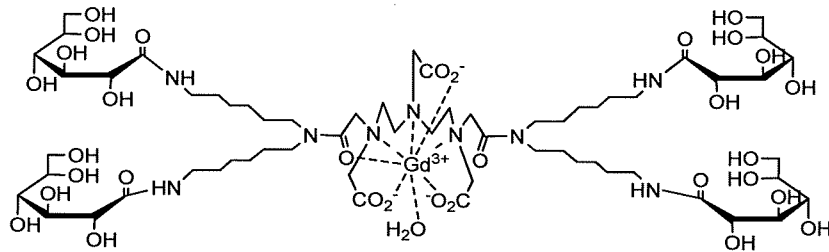
m/z: 767.14 (100.0%), 765.14 (80.4%), 769.14 (78.2%), 766.14 (71.9%), 764.14 (50.8%), 768.14 (24.3%), 770.14 (19.7%), 763.13 (7.2%), 771.14 (2.6%), 771.15 (2.3%), 768.13 (1.5%), 766.13 (1.3%)
Elemental Analysis: C, 34.46; H, 4.60; Gd, 20.51; N, 9.13; O, 31.30

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。

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



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

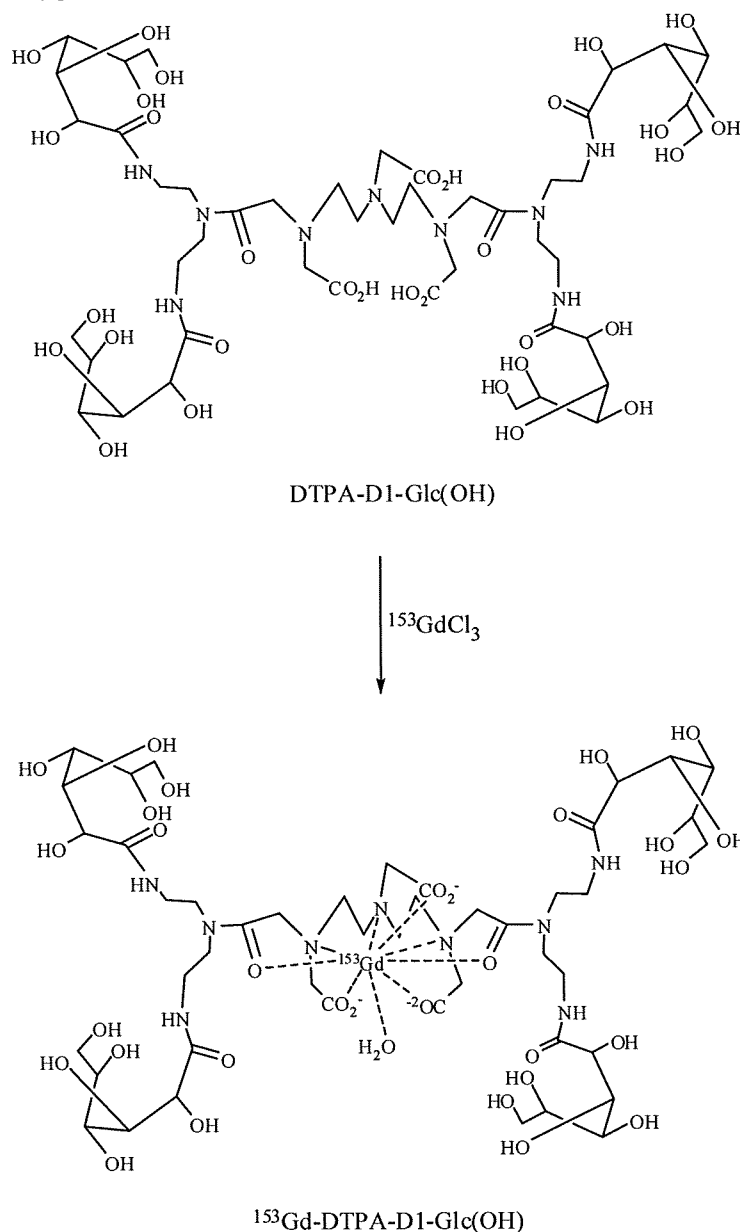
Fig. 6-1-08 直線型特性 X 線集合分光器と特性 X 線の K ラインの相対強度
(月刊 細胞 VOL.10 NO.4 pp514 pp528 1978 年より転載)

6-2 放射性ガドリニウムによる生体分子認識

阪原 晴海

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 のユーロピウム 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 (PerkinElmer 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 :16.8pmol 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

回収された放射能は1時間のインキュベーションで91.2%、24時間のインキュベーションで90.9%と差が認められなかったため、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間は1時間とした。なお対照ではそれぞれ6.4%、5.8%の放射能が濾液に回収された。

- 7) ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間を1時間として、試料とChelex100とのインキュベーション時間を検討した(Fig. 6-2-02)。濾液に回収された放射能は1時間のインキュベーションで93.3%、12時間のインキュベーションで91.2%と差が認められなかったため、Chelex100とのインキュベーション時間は1時間とすることにした。なお対照ではそれぞれ6.5%、6.4%の放射能が濾液に回収された。
- 8) 以上の結果から、 ^{153}Gd をDTPA-D1-Glc(OH)に配位する条件は60°C、1時間とし、今後、標識率を確認する必要がある場合にはChelex100を加えた後、室温、1時間の振盪とすることにした。
- 9) あとで示す血清とインキュベートした後のHPLCの分析から、 ^{153}Gd は実質上100% DTPA-D1-Glc(OH)に配位されたと考えられるので、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)を混和後の精製は行わないこととした。
- 10) 標識率を100%とすると ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH)の比放射能は2.98kBq/mgまたは3.81MBq/mmolであり、DTPA-D1-Glc(OH)約6万分子あたり1個の ^{153}Gd が配位されていると計算される。

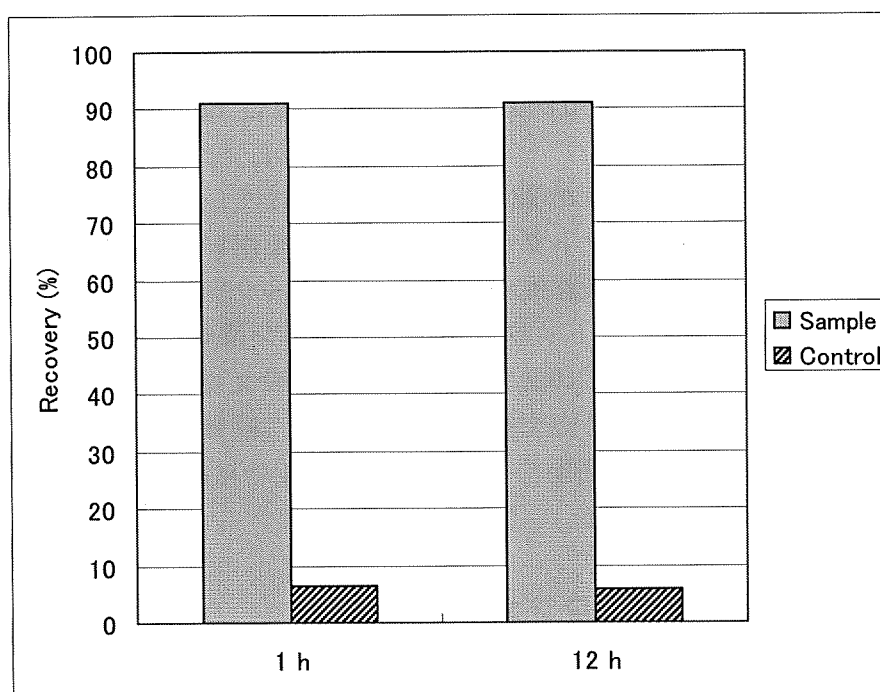


Fig. 6-2-01 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間の検討

Chelex100とのインキュベーションは12時間に固定した。濾液に回収された放射能に差が認められないため、 ^{153}Gd とDTPA-D1-Glc(OH)のインキュベーション時間は1時間とした。

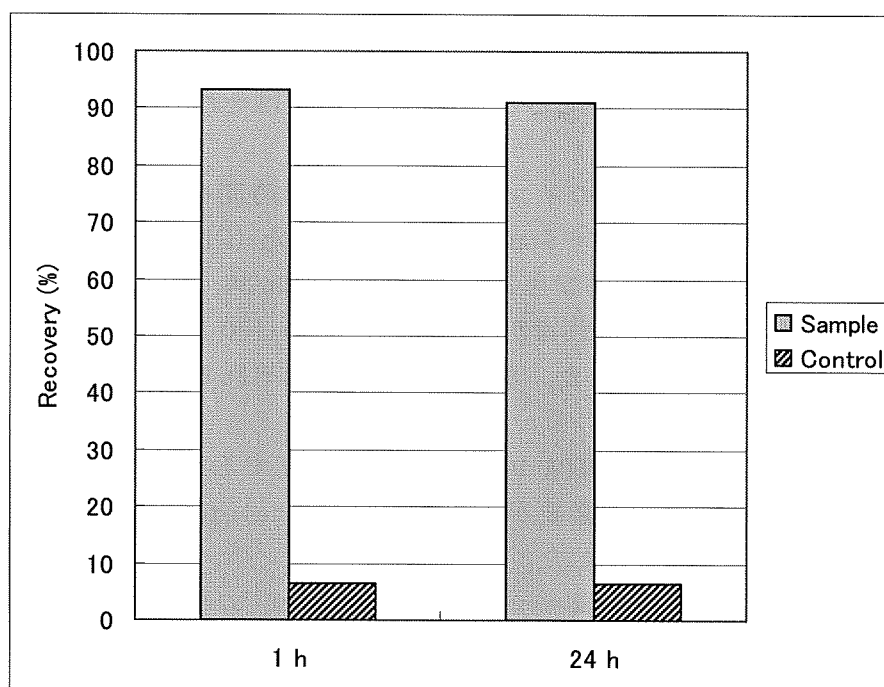


Fig. 6-2-02 Chelex100 とのインキュベーションの条件の検討

^{153}Gd と DTPA-D1-Glc(OH) のインキュベーションは 1 時間に固定した。濾液に回収された放射能に差が認められないため、Chelex100 とのインキュベーションは 1 時間とした。

6-2-2 HPLC による ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH) と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の分析

作成した ^{153}Gd -DTPA-D1-Glc(OH) が MRI 造影剤の非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) と同一のものであるか、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いて確認した。用いたカラムはガードカラムをつけたゲル濾過用カラム TSK-GEL G3000SW_{XL} (TOSOH, Tokyo, Japan) である。溶出液は 0.05% アジ化ナトリウム添加 0.01M リン酸緩衝液 pH7.4、溶出速度は 1ml/min とした。試料の添加量は 10 μL とし、280nm の吸光度と放射能をモニタした。なお同一グラフ上で吸光度と放射能を表示するために、縦軸のスケールは相対値を表す。また試料は吸光度の検出器を通過約 0.5 分後に放射能の検出器を通過するので 0.5 分のずれを持ってグラフに表示される。

(1) 正常ラット血清の溶出プロファイル

タンパクの溶出時間を確認するために正常ラット血清 (CedarLane Laboratories, Ontario, Canada) をこの HPLC システムで分析した (Fig. 6-2-03)。最初のピークは分子量 90 万以上、3 番目のピークは IgG、4 番目のピークはアルブミンである。

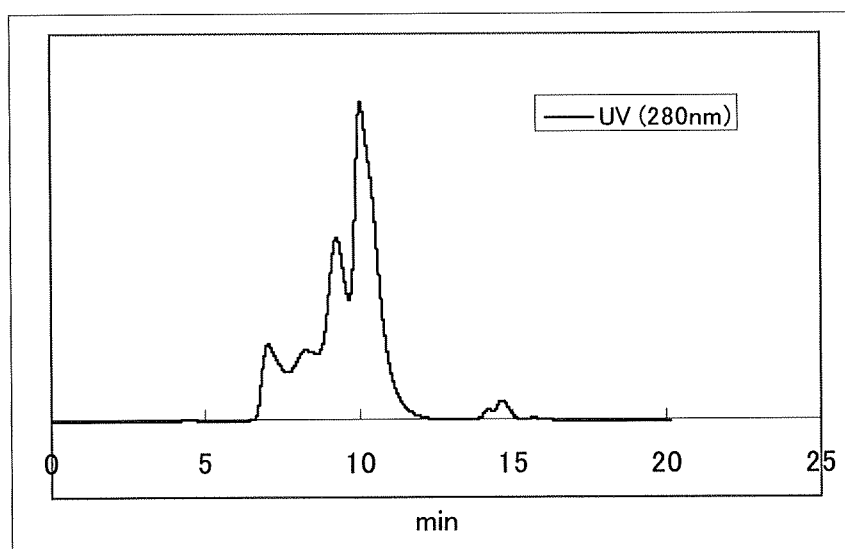


Fig. 6-2-03 正常ラット血清の溶出プロファイル

アルブミンの溶出時間は 10.05 分、15 分前に溶出される 2 つの小さなピークはそれぞれ 14.19 分、14.62 分であった。

(2) 非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH)

TSK3000SW_{XL} は本来タンパク分析用のカラムなので低分子量の試料には向かないが、非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) をこのシステムで分析した (Fig. 6-2-04)。Gd-DTPA-D1-Glc(OH) は 280nm の吸収を有し、溶出時間が 12.83 分の単一のピークを示した。このピークはアルブミンの溶出時間より遅く、ラット血清で認められる 5 番目のピークより早い。

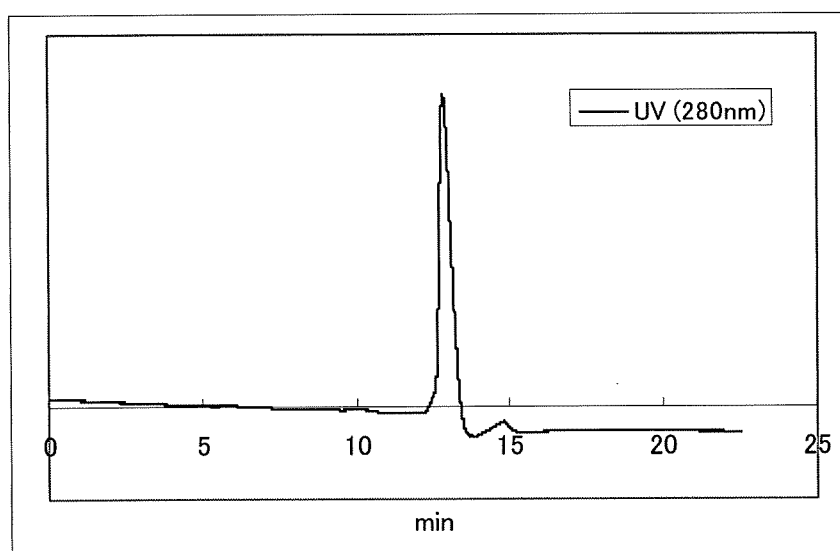


Fig. 6-2-04 非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の溶出プロファイル

Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を 0.2M クエン酸緩衝液 pH5.4 に溶解し、¹⁵³Gd を添加するときと同様 0.1N 塩酸を加え、1N 水酸化ナトリウムで pH を 7 に調整した後、0.26mg/10 μ L をかけた。12.83 分に単一のピークを認める。

(3) $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$

^{153}Gd を DTPA-D1-Glc(OH) に配位させたものを HPLC で分析した (Fig. 6-2-05)。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ は吸光度では 12.81 分に単一のピークとして溶出され、非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の溶出時間に一致した。放射能は 13.32 分に単一のピークとして溶出され、放射化学的に不純物が含まれていないことが確認された。吸光度のピークと放射能のピークの位置がずれているが、試料が吸光度と放射能のそれぞれの検出器を通過する時間のずれに起因する。

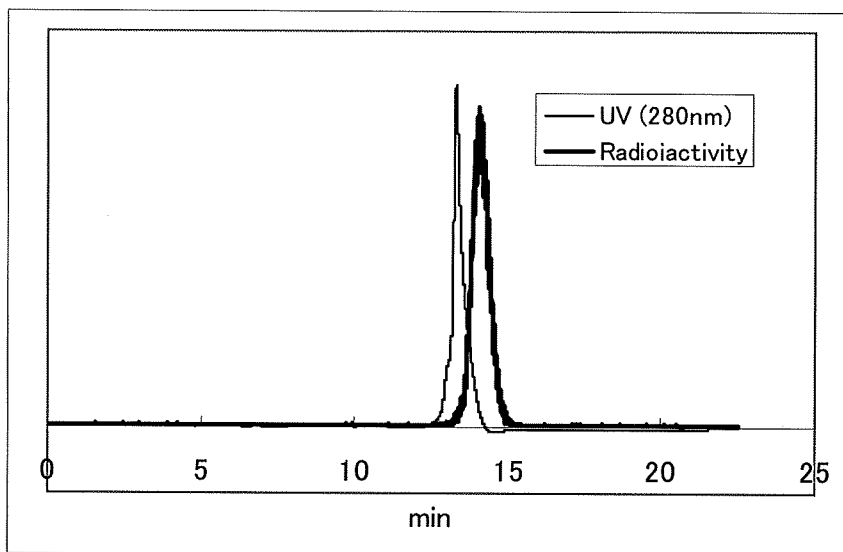


Fig. 6-2-05 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の溶出プロファイル

63.5kBq/0.21mg/10 μL をかけた。12.81 分に吸光度のピーク、13.32 分に放射能のピークを認める。

(4) $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) の混合物

さらに $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と非放射性 Gd-DTPA-D1-Glc(OH) を混ぜて、HPLC で分析した (Fig. 6-2-06)。吸光度のピークは完全に単一であり、放射能もすべてこのピークに一致した。

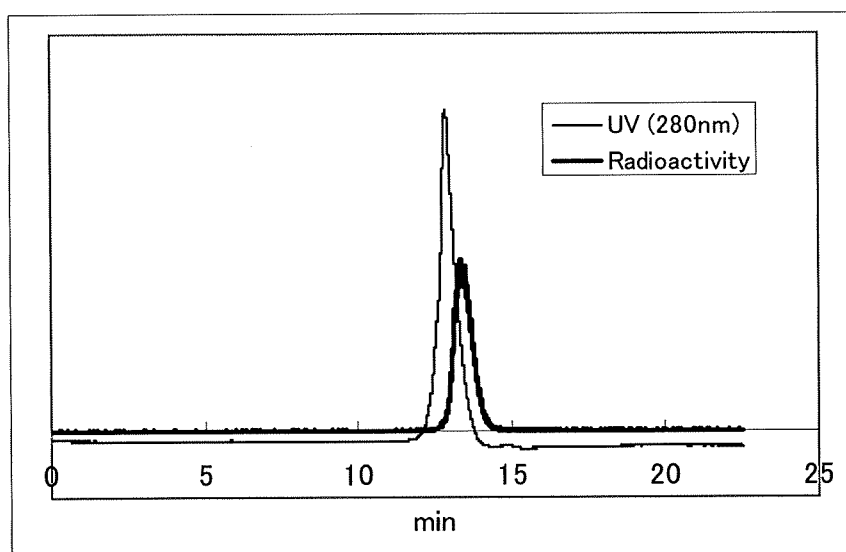


Fig. 6-2-06 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と非放射性 $\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の混合物の溶出プロフィール

(2)と(3)の試料を等量混和した。吸光度のピークは12.85分、放射能のピークは13.37分に溶出された。

6-2-3 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血中での挙動のインビトロ解析

$\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ はラットに静脈内投与された場合、長時間血管のMRI信号強度を変化させ続ける。血管の信号強度を長時間変化させる原因を明らかにするために、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血清中での挙動をインビトロで検討した。

(1) $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と血清とのインキュベーション

ラット血清1mLに $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を624kBq/10.5mg/100 μL を加え、37°Cでインキュベートし、1時間後、24時間後にHPLCで分析した。

1時間後の試料の放射能は13.43分に単一ピークとして溶出され、インキュベートする前の試料と一致した (Fig. 6-2-07)。すなわち $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ はラット血清中で凝集したり、血清中の高分子物質と結合したり、分解されたりしていないと考えられた。24時間後においても放射能は13.49分に単一ピークとして溶出され、血清とインキュベートする前の $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ と変化がなかった。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ は安定性の高い物質であることが示唆された (Fig. 6-2-08)。

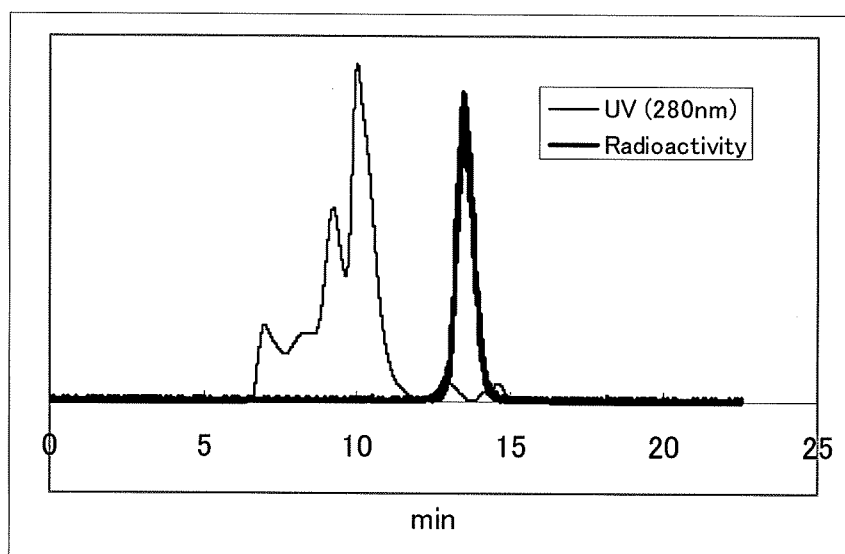


Fig. 6-2-07 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ をラット血清と1時間インキュベートした後の溶出プロファイル

放射能のピークは血清とインキュベートする前の試料 (Fig. 6-2-05) と変化がない。

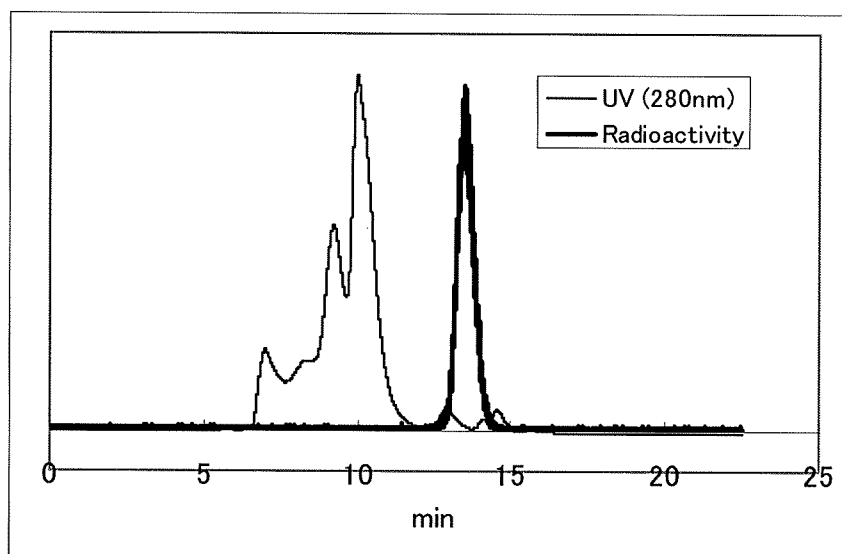


Fig. 6-2-08 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ をラット血清と24時間インキュベートした後の溶出プロファイル

(2) ^{153}Gd と血清とのインキュベーション

試料中に ^{153}Gd が混入していた場合、すなわち ^{153}Gd の標識率が 100% でなかった場合、 ^{153}Gd が HPLC でどのように溶出されるか、検討した。 $^{153}\text{GdCl}_3$ を血清と 1 時間インキュベートしたところ、放射能は分子量 90 万以上のところのところに単一のピークとして溶出された (Fig. 6-2-09)。pH が中性の環境下で ^{153}Gd が加水分解して水和物を形成したと想像

される。 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ をラット血清とインキュベートした後の試料ではこのような大分子を観察していないので、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ の試料中に ^{153}Gd の残存がないことが支持された。

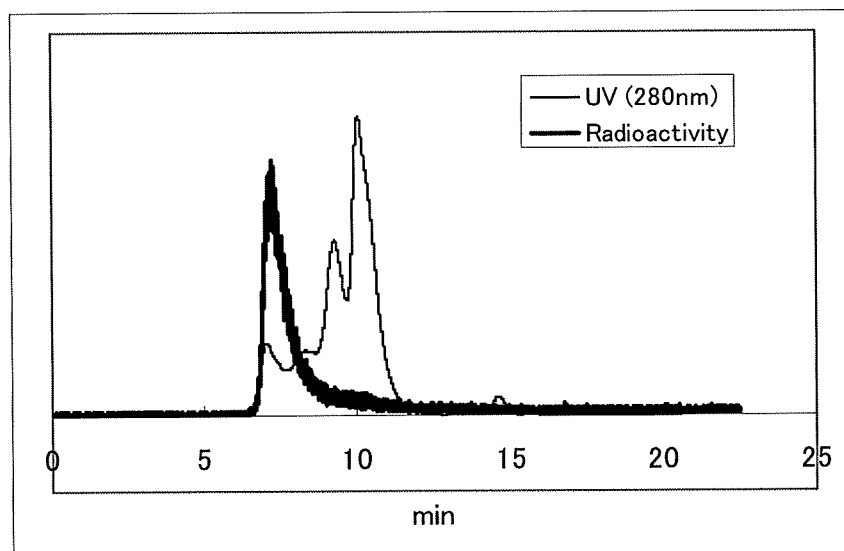


Fig. 6-2-09 $^{153}\text{GdCl}_3$ をラット血清とインキュベートした後の溶出プロファイル
ラット血清 1mL に $^{153}\text{GdCl}_3$ を 761.63kBq/ μL を加え、37°C で 1 時間インキュベート後、HPLC
で分析した。

6-2-4 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ の血中消失速度

インビボにおける $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ の血中消失速度を、ラットに静脈内投与することにより評価した。

- 1) DTPA-D1-G1c(OH) 127.6mg/2mL に $^{153}\text{GdCl}_3$ 3.8MBq/5 μL を加え、6-2-1 (2) の手順で $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ を作成し、6-2-2 (3) に示すごとく標識体を HPLC で解析し、標識に問題がないことを確認した。
- 2) 3 匹の 12 週令雄性 F344/N Slc ラット (体重約 260 グラム) (日本エスエルシー株式会社、静岡、日本) に、一匹あたり 380.7kBq/0.01mmol/240 μL の $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-G1c(OH)}$ を尾静脈より静脈内投与した。この投与量は、MR でイメージングに用いる投与量 0.05mmol/kg と同じである。
- 3) 投与 5 分後、1 時間後、24 時間後にペントバルビタール腹腔内投与により麻酔後、心臓穿刺にてヘパリン採血した。採血後は過量のペントバルビタールの腹腔内投与にて屠殺した。
- 4) 血液の一部は血漿と血球に分離した。
- 5) 全血 0.1mL をチューブに取り、オートウエルガンマカウンタで放射能濃度を測定した。
- 6) 全血 0.2mL から遠心分離した血漿を、全血同様、オートウエルガンマカウンタで放射能濃度を測定した。

(1) $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血中消失速度

標識体は急激に血中から減少し、24 時間後にはほぼ完全に消失していた (Fig. 6-2-10)。

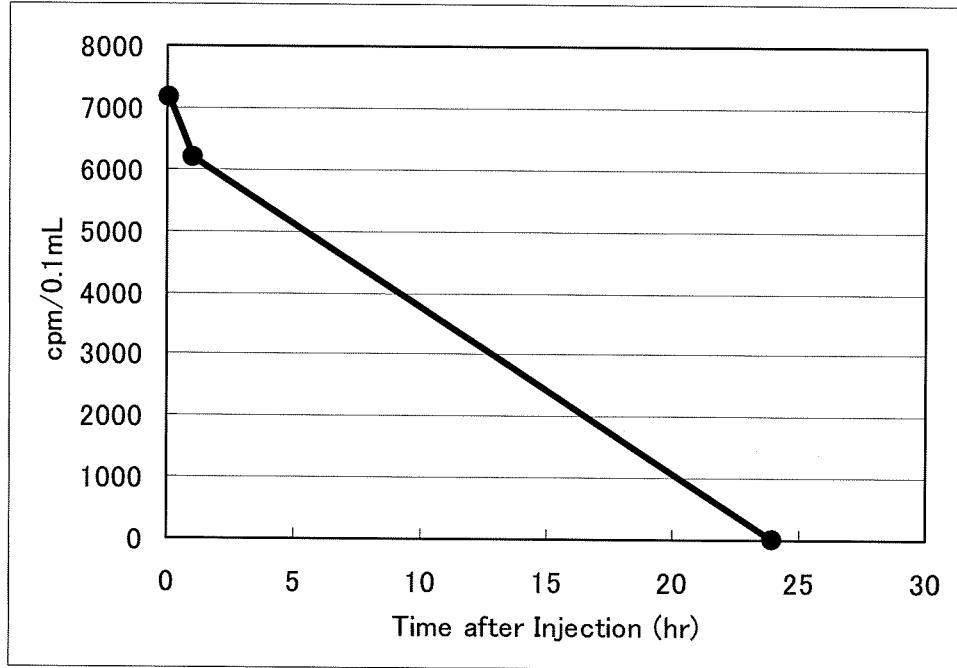


Fig. 6-2-10 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血中消失速度

ラットに $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を静脈内投与した後のラット全血中の放射能濃度の推移。標識体は急激に血中から減少し、24 時間後にはほぼ完全に消失した。

ラットの血液量を体重 1kg あたり 60mL と仮定すると、体重 260 グラムのラットの全身血液量は 15.6mL と計算される。この値を用いて投与量の何%が血中に残存しているか、推定してみた。その結果、投与 5 分後の血中には投与量の 18.4%、1 時間後の血中には 15.9% の放射能が残っていると計算された (Fig. 6-2-11)。

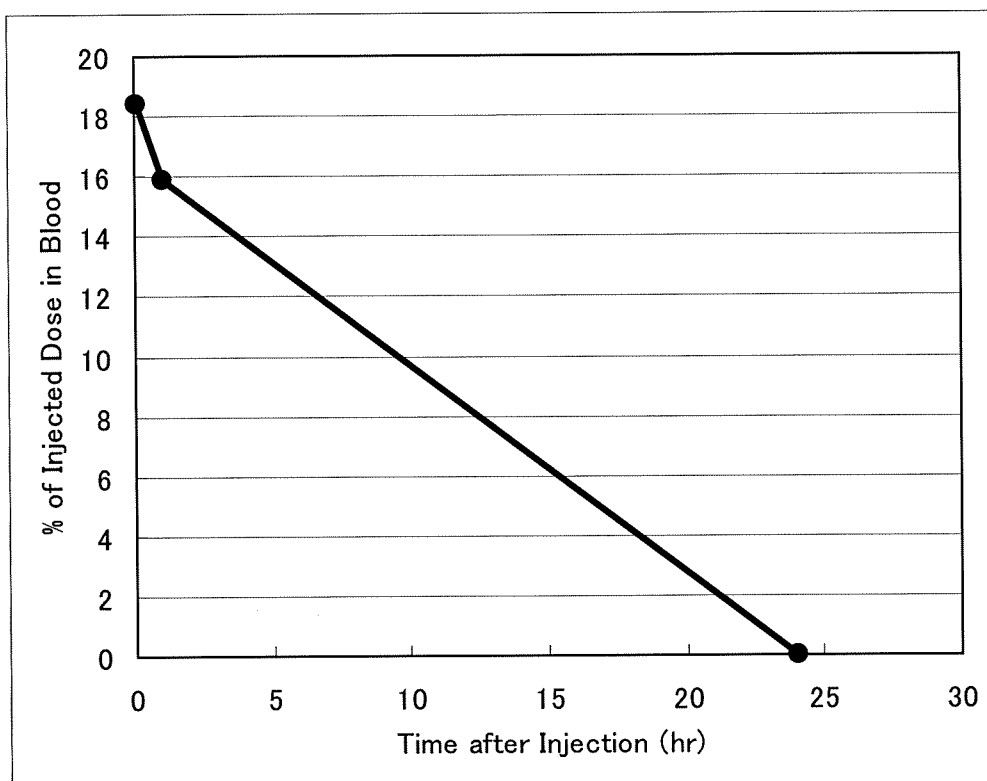


Fig. 6-2-11 血中に残存する放射能の割合

ラットの全身血液量を 15.6mL と仮定した場合に投与量の何%が血中に残存しているか、計算した。投与 1 時間後には投与量の 80%以上が血中から消失していると計算される。

(2) $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の血球成分との結合

$^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ が血球成分と結合していないか、血漿と血球に分離し、放射能を測定した。その結果、血中放射能の約 75%が血漿分画に認められた。血球を洗っておらず単に遠心分離後の血漿をそのまま測定したので、実際は血球分画にかなりの血漿が残っており、血漿中の放射能はもう少し高いと推定される。血漿成分の回収が十分でないことを考慮すると、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ はおそらく血球と結合しておらず、放射能のほとんどは血漿にあると考えられる。

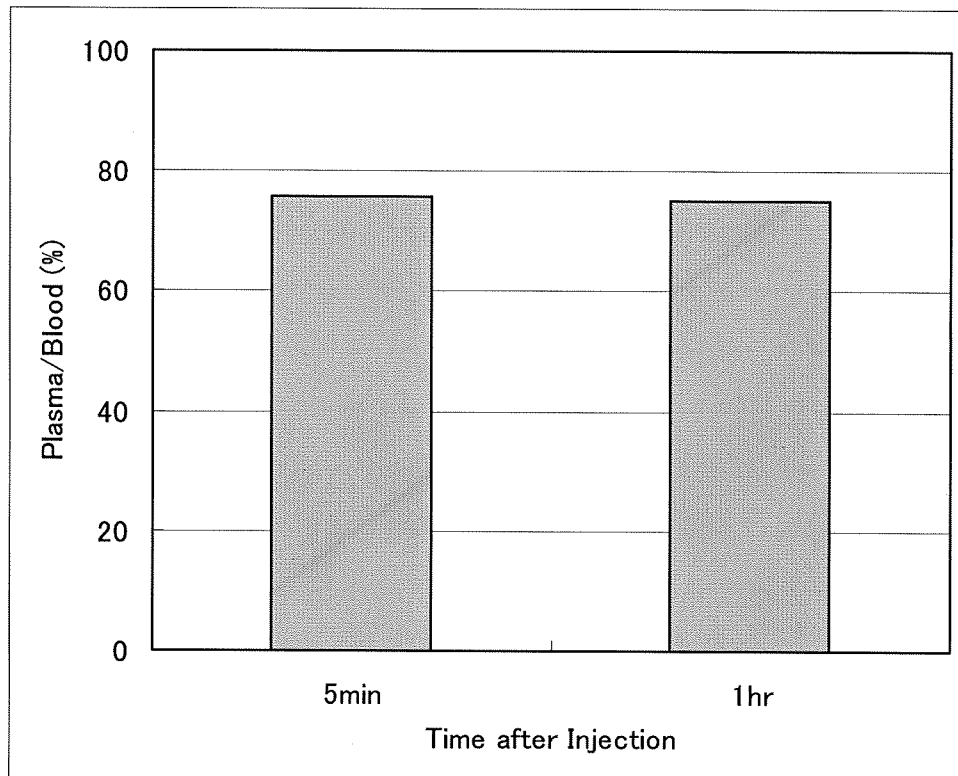


Fig. 6-2-12 血漿中に存在する放射能の全血に対する割合
 血中に存在する $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ のほとんどは血漿中にあると考えられる。

6-2-5 血中 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ の HPLC による分析

血中で $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ が血漿中の成分と結合しているかどうかを確認するために、 $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ をラットに静脈内投与した後採血し、血漿を分離後、HPLC で分析した。

- 1) これまでと同様の手順で $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を作成し、標識体を HPLC で解析した。
- 2) 12 週令雄性 F344/N Slc ラットに $^{153}\text{Gd-DTPA-D1-Glc(OH)}$ を一匹あたり $4.1\text{MBq}/0.01\text{mmol}/300\mu\text{L}$ を尾静脈より静脈内投与した。投与 1 時間後にペントバルビタール腹腔内投与により麻酔後、心臓穿刺にてヘパリン採血した。HPLC にかける試料が $10\mu\text{L}$ と微量であるため、放射エネルギーを確保する必要があり、比放射能をあげて標識し、投与放射エネルギーは 6-2-4 の実験の約 10 倍である。物質質量としては 6-2-4 と同量である。

ラット血漿中の放射能のピークは投与試料に一致し、インビボでも本標識体は血液中のタンパク等の高分子物質との結合はないと考えられた (Fig. 6-2-13、Fig. 6-2-14)。