

し、加水分解ルートを探究することと並行して、DEN-OH の予想される化合物を非加水分解経路にて、糖残基のみでなく様々な残基をターミナルに備える分子設計を行い、標的化合物の合成を開始した。③及び④については、特許の関係で、本報告書には、詳細な記述を行うことができない。以下に、①および②を中心として平成 20 年度の開発研究成果を纏める。この成果を、最終年度の平成 21 年度の開発研究の方針に反映させ、前臨床前データを収集し、更に、前臨床および臨床試験の第 2 次ステージを経て、製品化・商品化の為の第 3 次ステージへ発展させる研究を行った。

(1) 所謂「青島サンプル」はカテゴリ②の加水分解タイプの Gd 錯体である。当該の Gd-DTPA-糖錯体は、Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)の加水分解（あるいは「小川サンプル」の Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)加水分解（但し、OAc あるいは OH 体の加水分解速度は異なる）によっても類似体は得られる）の誘導体と推測される。従って、Gd-DTPA-DETA-AS2-3Glc(OH, or OAc)誘導体あるいは Gd-DTPA-DETA-D2-nGlc(OH)と推定される。この Gd-DTPA 錯体は、今までに調製された Gd-DTPA-糖構造のデンドリマー型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。安全性評価試験（サンプル B）結果では特に問題はなく（下記（5）項目参照）、当該研究の現段階ではベストの造影剤である。しかし、平成 21 年度では、先ず、当該のサンプルを復刻する再現性及び加水分解反応の条件を探究する必要がある。また、血管貯留性を短めに調整する問題点と構造決定、合成方法の確立、別途合成の検討、構造-活性相関、生体内分子との相互作用とその作用機序の解明、等の諸問題を解決する必要がある。

(2) 所謂「小川サンプル」Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)は、カテゴリ①の非加水分解タイプの Gd 錯体である。糖あるいはリンカー部に反応位置選択性を与えるための保護基の導入反応及び反応性に戻すための脱保護反応を経由しないので、簡便かつ効率的な合成方法である。この「小川サンプル」調製方法を確立したことにより、様々なシュガーボールデンドリマー型 Gd-DTPA-糖錯体の設計および合成プロセスの variation と validation が可能となった。当該研究の安全性試験では、サンプル A と表記され、安全性試験結果は全く問題がないことが示された。この合成戦略では、糖の種類及び数、リンカー部分の化学的修飾、生体機能性分子認識サイトの導入等様々な変形が可能であり、平成 20 年度ではカテゴリ①「青島サンプル」の復刻とカテゴリ②の「小川サンプル」に顕著な進捗があり、新規に創製された様々なサンプルの *in vitro* および *in vivo* 評価を行った。

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)は、グルコース (Glc) 以外の糖に於いてもこの合成方法が応用可能である。また、このサンプルは、合成プロセスにおいて保護・脱保護なしに、短経路により高収率で化学合成され得ると言う利点に加えて、最終生成物の精製も容易且つ、高純度で Gd-DTPA-糖錯体の構造を持つ MRI 造影剤が簡便に調製可能であると言うメリットも備えている。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、「青島サンプル」には及ばなかったが、ラットを用いた *in vivo* 評価に於いてかなり鮮明な MRI 画像を描出した。

また、この造影剤の緩和率 (r_1) は $10.0 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$ であり、基本的には、 r_1 が $5.0 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$ 超であるので、MRI 造影剤として十分な造影効果を有することを明らかにした。

(3) 「青島サンプル」の非常に長い体内貯留性を改善するため、構造と活性相関を解明する必要があった(上記(1)に記載)。カテゴリー①の Gd-DTPA-糖錯体は、*in vivo* 評価においてラットの尾静脈に造影剤を注入後 2 時間程度以内で体外排出された。また、カテゴリー①の Gd-DTPA-糖錯体の *in vitro* 評価において、媒体として生理食塩水あるいはヒトまたは牛血清、アルブミン、グロブリンなど媒体を変化させて造影効果を測定した結果、あるいは *in vivo* 評価の結果を分子計算ソフトである Molecular Operating Environment (MOE) で検討した結果は、現段階では、特許等の関係で本報告書では記述できない部分があるが、当該開発研究の目指す MRI 造影剤の構造-活性相関に関する未知データであるが、糖の分子認識機能をサポートする官能基の導入が示唆された。このことは、平成 21 年度以降の研究を推進する上において、非常に有効な情報であると言える。

(4) 平成 20 年度までの開発研究を纏めて以下に述べる。

平成 20 年度までの開発研究によって、例えば、Gd-DTPA-EDA-AS1-1G1c(OH) (カテゴリー①の「尾崎サンプル」) は、がん化ラットの 1 mm 程度の小さな肝細胞がんを低濃度で描出した。また、「青島サンプル」は、約 1/8 倍の低濃度の Gd-DTPA 誘導体錯体によっても肝細胞がんを極々鮮明に描出した。また、その剖検サンプルと MRI 画像は見事な一致をみた。

(5) 平成 21 年度の研究成果及び総括について

平成 21 年度は、加水分解ルート及び非加水分解ルートの両方のルートから、研究を行った。加水分解ルートでは、DEN-OH を調製する加水分解反応の条件を、触媒及びその濃度、反応時間・温度等を変化させて検討した。その結果、ナトリウムメトキシド (NaOMe) を用いた時に、加水分解反応を制御することが出来た。

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 造影剤の開発を試みた。

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、 $r_1 = 35 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$) 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-2G1c(OH) または Gd-DTPA-BHMTA-D2-4G1c(OH) は r_1 値が約 $20 \text{ [s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}]$ と大きく、目標値の約 7 倍の r_1 値を得た。こられの化合

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。

この様な大きな r1 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。

(6) 安全性試験

(6-1) サンプル A の評価(平成 19 年度)

サンプル A は、①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。委託試験結果の報告書によれば、検体の雄ラットにおける単回静脈内投与による LD₅₀ 値は、2000 mg/kg 以上であると報告された。また、②反復投与毒性試験結果より、「観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。」と報告された。③抗原性試験の結果では、「惹起後 30 分間及び 24 時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4 例中 3 例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。」と報告された。④変異原性試験結果では、「本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。」と報告された。

(6-2) サンプル B の評価(平成 19 年度)

安全性試験の為に平成 19 年度に調製された「青島サンプル」の復刻版のサンプル B は、①単回投与による急性毒性試験では、検体投与群においては投与後 30 分以内に一般状態の悪化が認められたがその後回復し、観察期間中に死亡例は認められなかった。それ故、特に問題のある急性毒性を示さず、安全な MRI 造影剤であることが示された。試験結果の報告書によれば、「検体の雄ラットにおける単回静脈内投与による LD₅₀ 値は、2000 mg/kg 以上であると考えられた。」と報告された。また、②反復投与毒性試験結果では、「観察期間中に一般状態の異常及び死亡例は認められず、体重変化、尿検査、器官重量及び剖検でも異常は認められなかった。」と報告された。また、「血液学的検査及び血液生化学的検査の結果、網赤血球数 (RET)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 及び乳酸脱水素酵素 (LDH) が用量依存的に増加した。その他の項目では統計学的な差は認められなかった。この変化が検体投与に起因するか否かを特定することは、本試験条件のみでは困難であった。」と言う結果であった。③抗原性試験の結果では、「惹起後 30 分間及び 24 時間の観察において、試験群では呼吸困難、虚脱又は死亡が見られず、陽性対照群では全例でこれらの症状が見られ、4 例中 3 例が死亡したことから、検体は本試験において抗原性試験陰性であった。」と報告された。④変異原性試験結果では、「本試験条件下における検体の突然変異誘起性は陰性と結論した。」と報告された。

(6-3) サンプル C の評価(平成 20 年度)

今年度の安全性試験の結果は、①急性経口毒性試験、②抗原性試験、③変異原性試験、④反復投与毒性試験とも、問題はなかった。詳しくは第8章を参照のこと。

(6-4) 水野サンプルの評価 (平成21年度)

Arigala Uma Ravi Sankar 博士が調製した30gの水野サンプルを日本食品安全センターに委託して平成21年度の研究項目として安全性評価を実施した。その結果からは、「問題が無い」という判定であった。詳細は、第8章を参照されたい。

(6-5) 安全性評価のまとめ

サンプルAでは、特記すべき毒性は報告されなかった。また、サンプルBに於いては、サンプルAと比較すると、投与により因子に若干の変化が見られたが、特記すべき毒性とは報告されなかった。また、平成20年度に実施したサンプルCの安全性試験結果に於いても「問題はない」と判定された。水野サンプルについても平成20年度と同様の安全性評価試験を平成21年度に実施し、「問題が無い」という判定が出た。これらの結果と以下の(7)の研究の纏めから、当該の研究プロジェクトに於いては、研究の目標値に対して約80%の進捗度を得たと言え、この第1ステージに続く第2ステージ～第3ステージの臨床試験及び実用化・商品化へ研究を発展できる研究成果を挙げることが出来た。

(7) 平成19年度～平成21年度の研究成果の纏め

平成19年度～平成21年度の3年間では、加水分解ルートにより所謂青島サンプルと言われるDEN-OHを開発し、*in vitro*及び*in vivo*評価に於いて、当該プロジェクトの約80%の進捗度で目標を達成出来た。当該のサンプルは、血管造影及び肝細胞がん造影に顕著な造影効果を示した (Fig. 10-01)。非加水分解ルートでは、所謂小川サンプル、尾崎サンプル、青木サンプル、水野サンプル等を開発し、*in vitro*及び*in vivo*評価を行った。小川サンプルの構造-活性は青島サンプルとは一致をみななかった。小川サンプル、尾崎サンプル、青木サンプル、水野サンプル等糖で化学修飾したGd-DTPAはGd-DTPAと比較して、*in vitro*及び*in vivo*共に優れたMRI造影剤となる性質を示し、これらのサンプルの調製においては再現性や構造解析、安全性に問題はなかった。尾崎サンプルは、肝細胞の初期がんの集団の個別の塊(直径1mm程度)を描出した (Fig. 10-02)。また、青木サンプルは腹腔内出血を鮮明に描出した (Fig. 10-03)。水野サンプルは長鎖のリンカー(C6)で最高のr1値を示した。青島サンプル、小川サンプル、水野サンプル等のサンプルの安全性試験結果は、「問題がない」という判定であり、これらのサンプルは、Gd-DTPA錯体と比較して*in vitro*及び*in vivo*評価に於いて十分良好な評価であったので、今後の研究ステージとして研究開発Schemeに計画されている第2ステージ及び第3ステージの臨床試験及び実用化・商品化を経て、実現できると思われる。

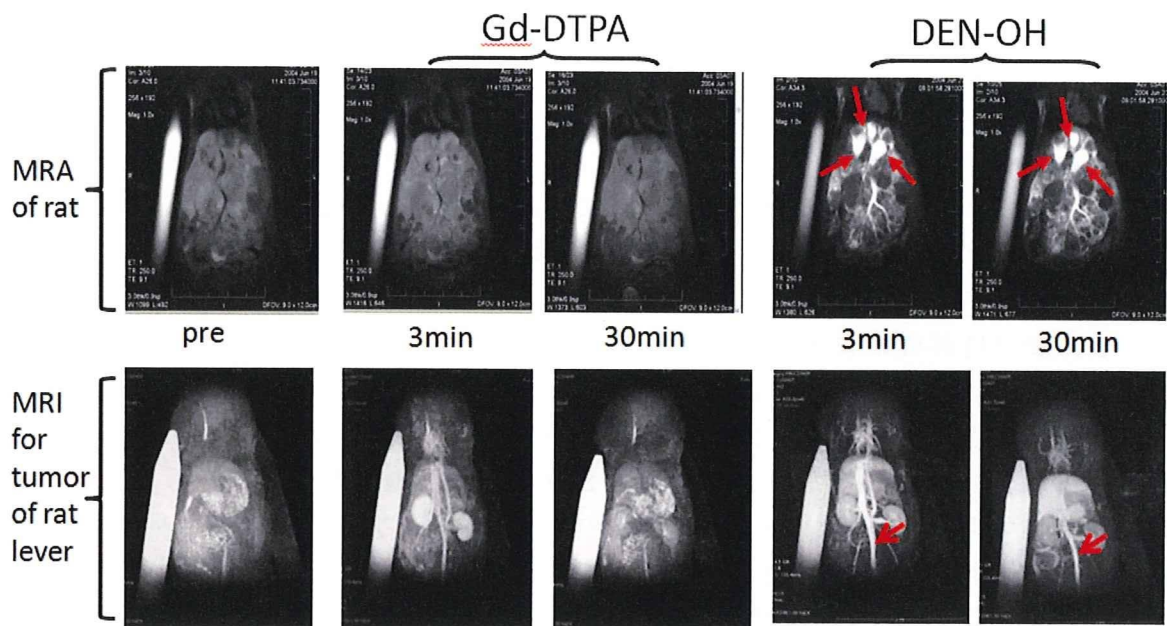


Fig. 10-01. Comparison of MR imaging for blood vessels and tumors of rats with Gd-DTPA complex and DEN-OH.



Fig. 10-02. MR imaging for tumors of liver of rat at their early stage.

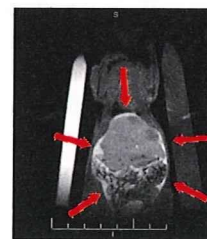


Fig. 10-03. MR imaging for abdominal apoplexy of rat.

以上の纏めにより、当該プロジェクトの「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デンドリマー型新規 MRI 造影剤の開発研究 (H19-ナノ一般-015)」の第1ステージは約80%の完成度(進捗度)ではあるが、十分な研究成果である。それ故、次の第2および第3ステージへと繋いで、「がんの超早期発見を普遍的に実現する医療技術の革新を図ることを可能にできると思われる。

データ集

データ集 1 学会等での発表

1-1 9th International Conference on Heteroatom Chemistry (ICHAC-9)

「Medical Materials for Earlier Finding and Curing Tumors: Syntheses and Evaluation of Sugar-Ball-Dendritic MRI Contrast Agents and Deoxybromophospha Sugars for Tumors」

日 付：2009/6/30-7/4

場 所：オビエド(スペイン)

発表者：山下 光司

1-2 15th European Carbohydrate Symposium (EuroCarb 15)

「STUDIES ON DENDRITIC SUGAR-BALL-Gd-DTPA-COMPLEXES AS NOVEL MRI CONTRAST AGENTS FOR BLOOD VESSELS AND TUMOURS」

日 付：2009/7/19-24

場 所：ウィーン(オーストリア)

発表者：山下 光司

1-3 22nd International Congress on Heterocyclic Chemistry (IHC-22)

「MEDICAL MATERIALS FOR EARLY FINDING AND CURING TUMORS: SYNTHESIS AND EVALUATION OF DEOXYBROMO-PHOSPHA SUGARS FOR ANTI-TUMOR AGENTS」

日 付：2009/8/2-7

場 所：セント ジョーンズ(カナダ)

発表者：山下 光司、山下 純子

1-4 第44回ヘテロ原子化学セミナー

「Medicinal Materials for Early Finding and Curing Tumor: Synthesis and Evaluation of *Phospha* Sugars for Anti-cancer Agents (がんの早期発見・早期治療の為に新規な糖デンドリマー型MRI造影剤及びリン糖抗がん剤)」

日 付：2009/9/3-5

場 所：紀伊勝浦(和歌山)

発表者：山下 光司

1-5 8th Inter-Academia 2009(IA 2009)

「R & D of Novel Medicinal Materials for Curing Cancer: Sugar Modified Gd-DTPA MRI Contrast Agents and Phospha Sugar Anti-cancer Agents」

日 付：2009/9/14-16

場 所：ワルシャワ(ポーランド)

発表者：山下 光司、山下 純子

1-6 イノベーションジャパン 2009

「がんの早期発見・早期治療のための医用材料のイノベーション」

日 付：2009/09/16-18

場 所：東京

発表者：山下 光司

1-7 第 39 回複素環化学討論会

「新しい抗がん剤並びに MRI 造影剤の研究開発 — プロモ基を有する含リン複素環化合物あるいはデオキシプロモリン糖誘導体の合成と抗がん活性並びに肝細胞がんの画像化の評価」

日 付：2009/10/14-16

場 所：柏（千葉）

発表者：山下 光司

1-8 第 40 回中部科学関係学協会支部連合秋季大会

「がんの早期発見・早期治療の技術革新のための医工連携による医用材料開発研究」

日 付：2009/11/7-8

場 所：岐阜

発表者：山下 光司、山下 純子

1-9 Germany-Japan Joint Symposium and Graduate Students Forum for the Promotion of the DDP

「Research and development of medicinal materials for early stage finding and curing tumors (がんの早期発見・早期治療のための医用材料の研究開発)」

日 付：2009/11/25

場 所：静岡

発表者：山下 光司

1-10 第 36 回有機典型元素化学討論会

「がんの早期発見・早期治療を目指す医用材料—新規なリン糖誘導体の合成と生理活性評価」

日 付：2009/12/10-12

場 所：鳥取

発表者：山下 光司

1-11 第 2 回リン化合物討論会

「がんの早期発見・早期治療の為の医用材料開発研究-糖デンドリマー型 Gd-DTPA 錯体の調製と *in vitro* 及び *in vivo* 評価」

日 付：2009/12/5 場 所：浜松

発表者：山下 光司、杉山 雅紀

1-12 Pusan National University-Shizuoka University Joint Symposium and Graduate Students Forum for Promotion of the DDP

「Research on medicinal materials for diagnosis and therapy of cancer in collaboration with medicinal sciences --- Syntheses and evaluation of novel sugar-dendritic MRI contrast agents and phospho sugar anti-cancer agents (医学との連携によるがんの診断・治療のための医用材料の研究---新規な糖デンドリマー型 MRI 造影剤及びリン糖抗がん剤の合成と評価)」

日 付：2010/2/5

場 所：浜松

発表者：山下 光司

1-13 ナノメディシン研究成果発表会

「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デンドリマー型新規 MRI 造影剤の開発研究」

日 付：2010/02/24

場 所：東京

発表者：山下 光司

1-14 Pusan National University-Shizuoka University Joint Symposium and Graduate Students Forum for Promotion of the DDP

「Synthesis of Gd-DTPA-XDA-D1-2Glc(OH) Complex and *in vitro* and *in vivo* Studies as a New Potential MRI Contrast Agent (Gd-DTPA-XDA-D1-Glc(OH) 錯体の合成と新規高性能 MRI 造影剤としての *in vitro* 及び *in vivo* 研究)」

日 付：2010/2/5

場 所：浜松

発表者：Arigala Uma Ravi Sankar

1-15 17th International Society for Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM)

「Improved Contrast Enhancement of Experimentally Induced Rat Hepatocellular Carcinoma Using New Blood Pool Contrast Agent, Dendrimers DTPA-D1Glc(OH)」

日 付：2009/4/18-22

場 所：ホノルル (ハワイ)

発表者：竹原 康雄

1-16 平成 21 年度日本生体医工学東海支部大会

「QCM 法を用いた細胞に対する薬物の毒性評価法」

日 付：2009/10/17

場 所：名古屋

発表者：木村 元彦

シュガーボールデンドリマー型新規Gd-DTPA
錯体の研究開発の成果

OC-112; July 22, 2009

STUDIES ON DENDRITIC SUGAR-BALL-Gd-DTPA-COMPLEXES AS NOVEL MRI CONTRAST AGENTS FOR BLOOD VESSELS AND TUMOURS

Mitsuji Yamashita^{1,*}, Takashi Aoki¹, Keisuke Ogawa¹, Nobuhisa Ozaki¹, Michio Fujie^{1,2}, Siva Kumar Bitragunta¹, Uma Ravi Sankar Arigala³, Sayaka Mizuno¹, Junko Yamashita¹, Keita Kiyofuji¹, Gang Yu¹, Kengo Aoshima¹, Yasuo Takehara², Harumi Sakahara², Sofie Laurent⁴, Carmen Burtea⁴, L. Vander Elst⁴, and Robert N. Muller⁴

¹ Graduate School of Science and Engineering, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan

² Faculty of Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, Hamamatsu 431-3192, Japan

³ Japan Association for the Advancement of Medical Equipment (JAMME), Hongo 3-42-6, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

⁴ NMR Laboratory, Department of Organic Chemistry, University of Mons-Hainaut, B-7000 Mons, Belgium

tcmyama@ipc.shizuoka.ac.jp

EuroCarb 15, July 19-24, 2009, Vienna, Austria

MRI – Safe Technology for Diagnosis

Outline for MRI
Electric wave transmitter → Electric wave receiver
MR signal
N Magnet MR Imaging
Resonance
Magnet
Instrument with permanent magnet Imaging by computer

<Equipment of MRI>
Core Ligands

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

Gd(DOTA)
(DOTA=1,4,7,10Tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetate)

Gd(DTPA-BMA)
(BMA=Bis(methylamide))

<Mechanism of MR Imaging>

○ **Gd Complex:** Safe (NSF) ○ **Short retention** in blood vessels ○ **Non-specific** (Defect(s))

Molecular Design

Gd - DTPA
↓
Larger Molecular Size
Sugar Functionality Sugar

DEN-OH Gd-DTPA-D1 **Gd-DTPA-D2** **Gd-DTPA-D3**

Sugars
Glucosylactone Galactosylactone Mannosylactone

Modification:
Symmetric
Asymmetric
Small(er)
Large(r)

Molecular recognition

Molecular design

Objective:
Sugar-Ball Dendrimer of Gd-DTPA
(i) Improvement of blood pool character
(ii) Molecular recognition by sugar
(iii) Improvement of relaxivity (r1)

Gd complex: Safe & Stable
Effect of modification of Gd complex on Imaging:
(1) Exchange rate of H₂O molecule on Gd(III)
(2) Number of H₂O
(3) Mobility of contrast agent

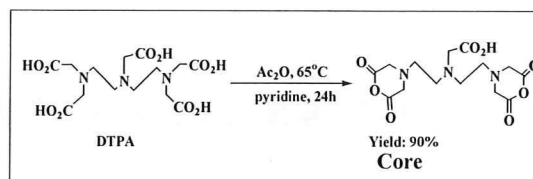
→ Clearer imaging with lower concentration of Gd(III) contrast agent

Gd-DTPA **Gd-DTPA-D1-Sugar** **Gd-DTPA-D2-Sugar**

Synthesis

《 Synthesis of Core 》

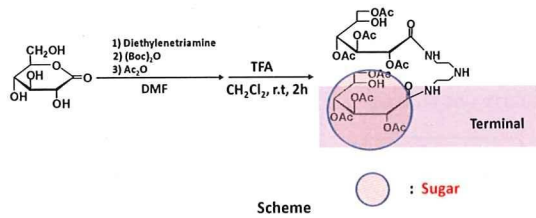
Activation of DTPA



Scheme

Synthesis

« Synthesis of Terminal (outer shell parts) »



D1 Type:

Symmetric 4-sugar

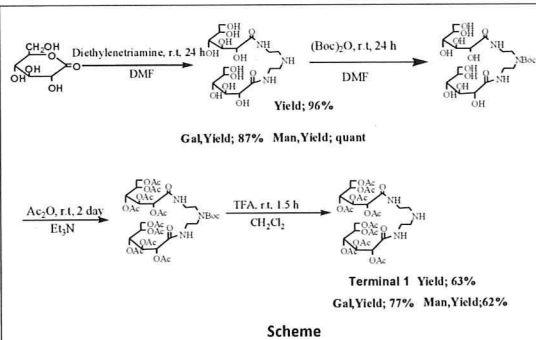


Gd-DTPA-D1-Sugar

DEN-OH

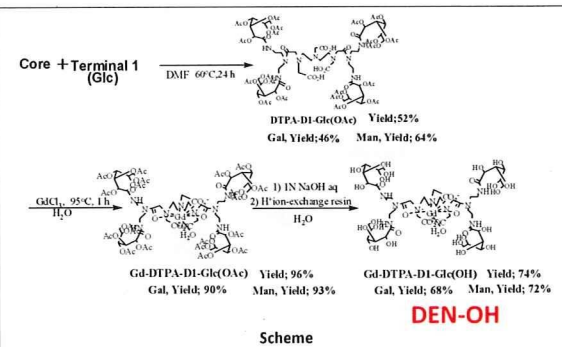
« Preparation of Gd-DTPA-D1-Glc(OH) »

Syntheses of Terminal



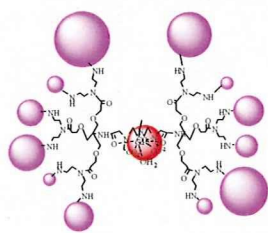
« Preparation of Gd-DTPA-D1-Glc(OH) »

Syntheses of Gd-DTPA-D1-Glc(OH): (via hydrolysis)



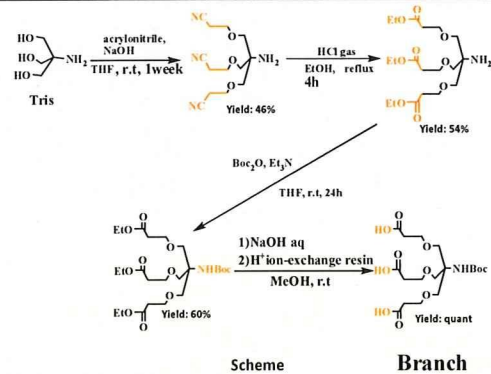
D2 Type:

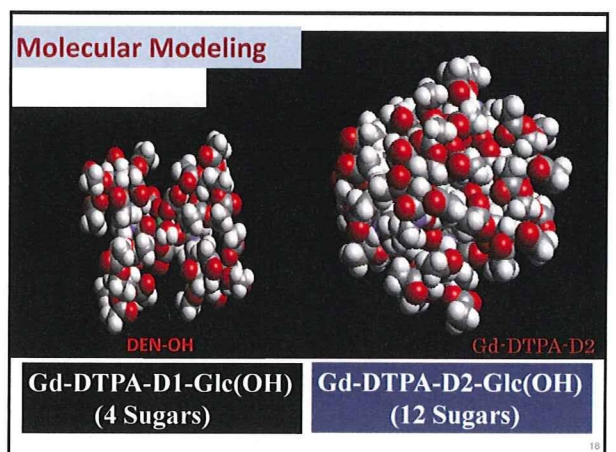
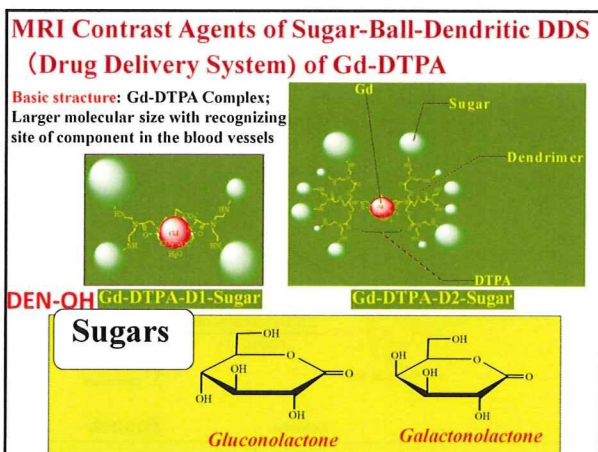
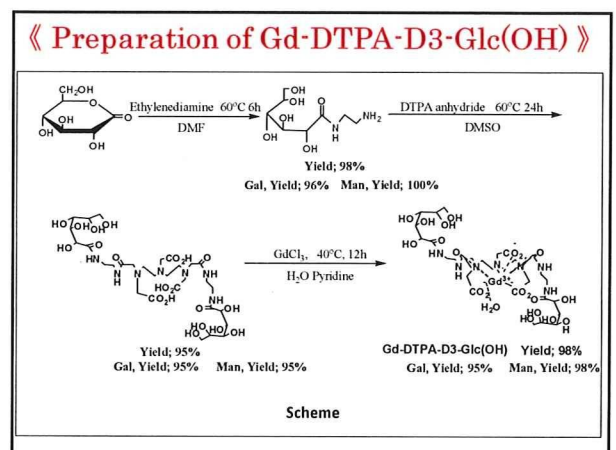
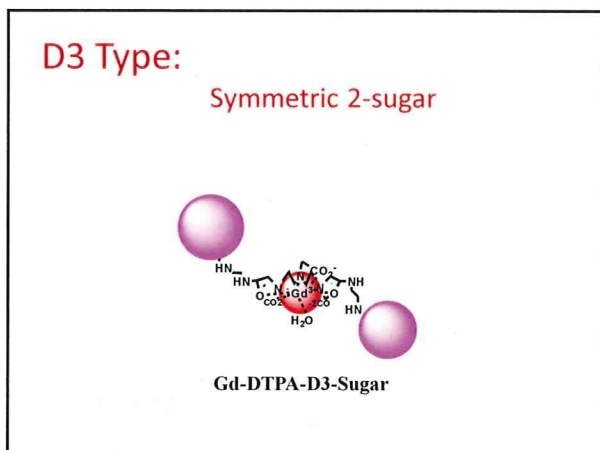
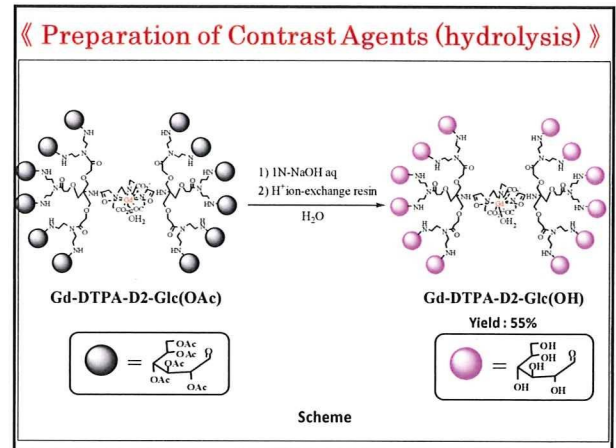
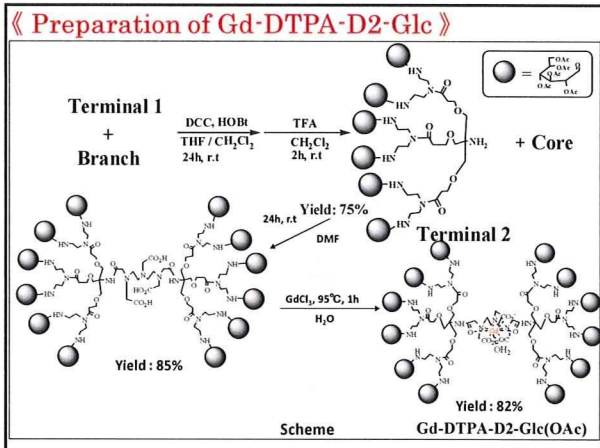
Symmetric 12-sugar



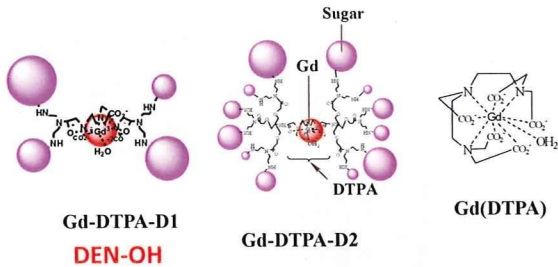
Gd-DTPA-D2-Sugar

« Preparation of Branch »



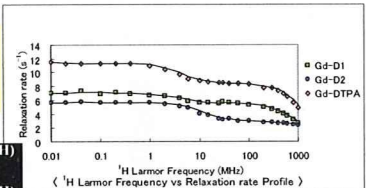


Evaluation of Gd-DTPA-Dn-Sugar



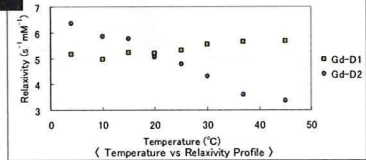
In vitro Evaluation of Gd-DTPA-Dn-Sugar

Larmor Profile:
Magnetic field vs
Relaxation rate



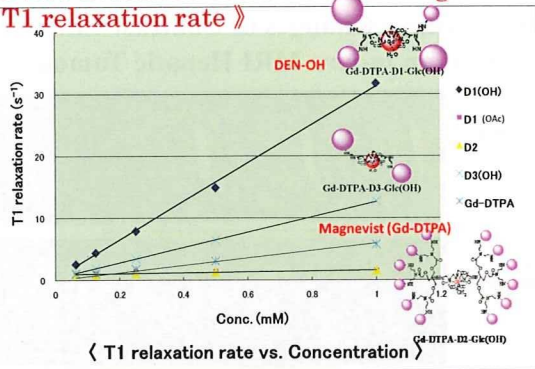
Gd-D1: Gd-DTPA-D1-Glc(OH)
DEN-OH
Gd-D2: Gd-DTPA-D2-Glc(OH)
Gd-DTPA: Currently used contrast agent

Profile for
Temperature vs
Relaxivity



in vitro Evaluation of Gd-DTPA-Dn-Sugar

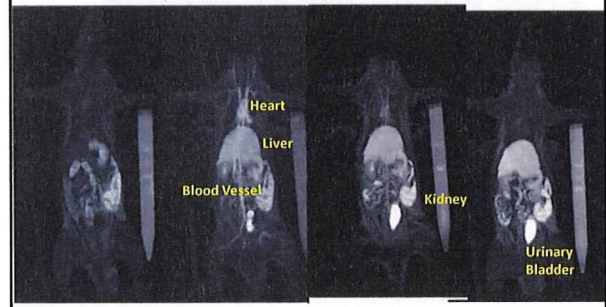
« T1 relaxation rate »



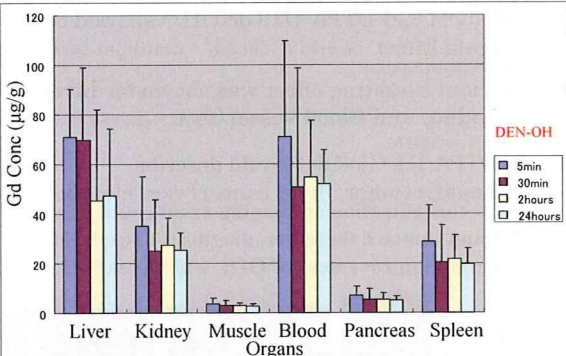
Relationship for Gd concentration vs T1 relaxation Rate

« MRI of Rat with Gd-DTPA-Sugar (D1(OH)) (DEN-OH) »

Pre 10-15 min 1 h 2 h
(after injection)



Gd Concentration -- (in vivo Organ Specificity) Gd-D1-Glu(OH)

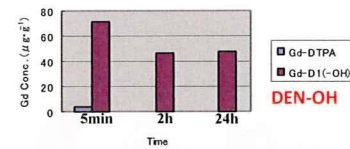


Sample numbers n=19

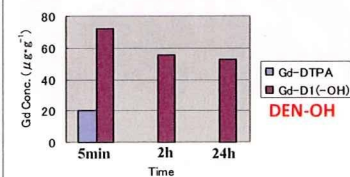
Gd concentration vs time course

Comparison of selected organs by Gd-DTPA & Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (DEN-OH)

Liver

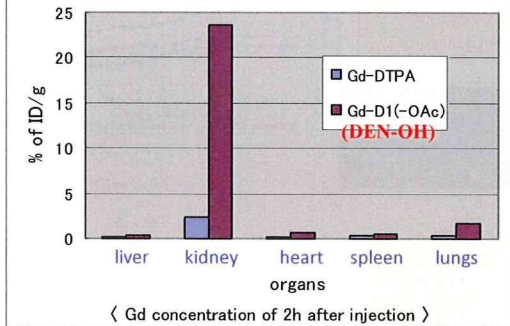


Blood



Gd concentration vs time course

Comparison of Gd at the selected organs by using Gd-DTPA & Gd-DTPA-D1-Glc(OH) (DEN-OH)

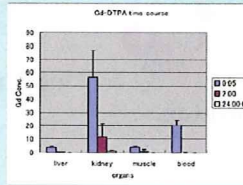


Comparison of Contrast Agents by Time

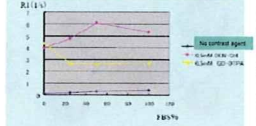
DEN-OH & Gd-DTPA

- * Bio-distribution
- * T1 in Fetal bovine serum (FBS)

Biodistribution analysis

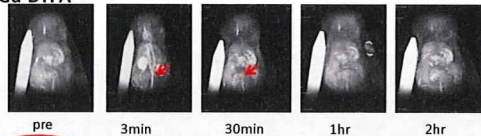


R1 relaxivity (for T1) in FBS (Protein 4.5 g/dl) at 1.5 T

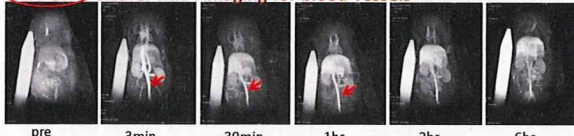


Results for MRA Evaluation *in-vivo* MR Angiography (MRA)

Gd-DTPA



DEN-OH: Clearer MRA imaging for blood vessels

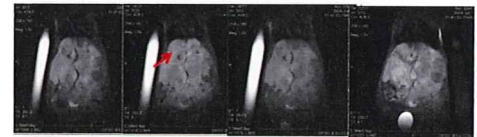


- (i) DEN-OH (DTPA-D1-Glc(OH)) showed good blood pool character.
- (ii) Good MRA (Angiography) imaging with wide imaging windows.

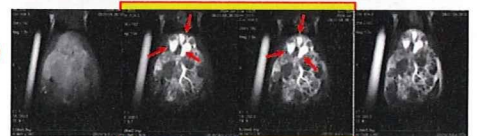
MR Imaging for Cancer

Time Course Changes of Contrast Enhancement on *in-vivo* MRI Hepatic Tumour

Gd-DTPA



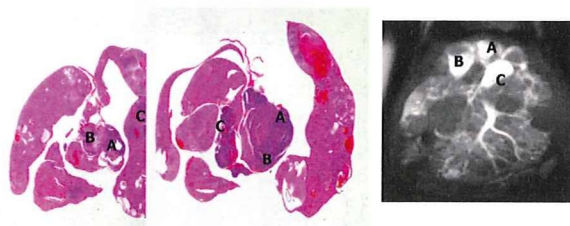
DEN-OH



#7

← Tumour

A Part of Series of Sliced Tissue (H&E)



Magnifier Images

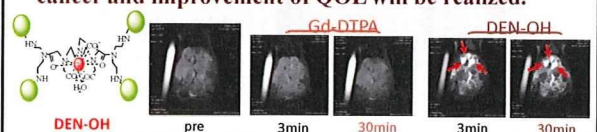
MRI for Liver Cancer

#7

29

Summary

- I. DEN-OH (Gd-DTPA-D1-Glc(OH)) showed best Imaging Effect (Gd-DTPA-D1-Glc(OH) > Gd-DTPA-D1-Glc(OAc) > Gd-DTPA-D2-Glc(OAc)
- II. Efficient targeting effect was shown for Liver, Kidney and Blood Vessel (MRA: Magnetic Resonance Angiography).
- III. Gd-DTPA-D1-Glc(OH) could describe hepatic tumor (liver cancer) very clearly.
- IV. Lower concentration of imaging agent could draw good MRA and tumour, therefore, diagnosis of early stage cancer and improvement of QOL will be realized.



がんの早期発見・早期治療のための

医用材料のイノベーション

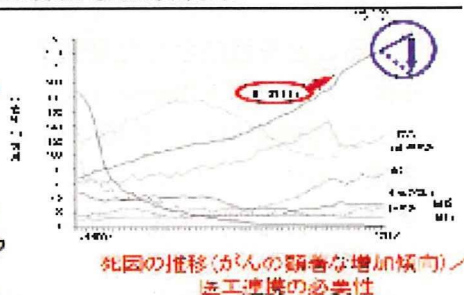
静岡大学: 山下 光司、木村 元彦、戸田 三津夫、田中 康隆、尾崎 伸久、山下 純子、清藤 圭太、山田 学、杉山 雅紀、安部 聡一郎、平井 麻祐子

浜松医科大学: 阪原 晴海、間賀田 泰宏、竹原 康雄、中村 悟己、藤江 三千男

財医療機器センター: Arigala Uma Ravi Shankar, Kambam Srinivasulu

(1) バックグラウンド(医療ニーズ&医工連携)

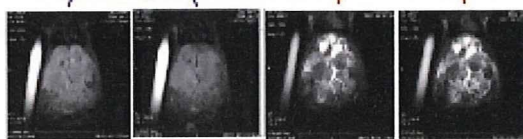
- ・死因の第1位はがんで、1/3程度を占め、その増加傾向は顕著です。
- ・がんの治療技術のイノベーションには、様々な医工連携による技術開発が必要です。(「第3次対がん10か年総合戦略」の達成)



(2) 早期発見を支える技術(新規なMRI造影剤)

- [新聞報道: 中日新聞2005年9月1日(第1面)「MRI造影剤を改良長時間化」]
- ・血管及びがんを画像化できる造影剤の開発に成功し、優れた*in vitro*及び*in vivo*評価が得られました。
 - ・従来のMRI造影剤を化学的に改良しました。その結果、がん化したラットの肝臓がんのMR画像が得られました。
 - ・厚生労働省のH19~H21年度科学研究費補助金課題「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ポール dendリマー型新規MRI造影剤の開発」

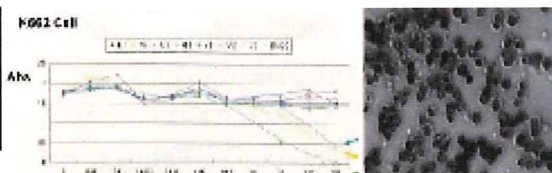
造影剤: Gd DTPA 造影剤: DEN-OH



肝臓がんのMR画像の比較(従来の造影剤(左)と改良した造影剤(右))

(3) 早期治療の為に新しいリン糖抗がん剤(白血病細胞に特異的・選択的)に関する技術

- ・擬似糖類・複素環化合物による白血病培養細胞に特異的に効果のある薬剤を発見しました。
- ・MTT法(*in vitro*評価)
- (Gleevecとの比較)広いスペクトル/高い活性/特異性・選択性/優れた性質
- ・細胞周期解析(アポトーシスを誘起)
- Investigational New Drugs (2009年 印刷)
- ・固形がんに対しても有効



白血病K562細胞に対するMTT *in vitro*評価 リン糖投薬後の白血病細胞

(4) 超親水性材料(医療器具の曇り止め材料)・湿润時潤滑性材料(カテーテル)に関する技術

- [新聞報道: 中日新聞2005年9月17日(科学)「内視鏡の汚れ防ぐ「コート剤」開発」]
- ・内視鏡・腹腔鏡などのレンズの曇り止めコート剤として、超親水性材料を開発しました。
 - ・湿润時潤滑性医用材料の調製法を開発しました。

(5) まとめ

- ・がんの早期発見・早期治療の為に様々な技術が必要です。
- ・標題の医療材料について幾つかの技術を開発しました。
- 発明の名称: 「親水性組成物、親水性基材およびその製造方法」; 「エポキシ化合物の製造方法」; 「含リン化合物及び抗腫瘍剤」、その他本研究開発、発明・関連特許・技術移転: 静岡大学知的財産本部

Investigational New Drugs (2009) (印刷発行)

Development and pharmacologic characterization of deoxybromophospho sugar derivatives with antileukemic activity

Satoshi Nakamura, Mitsuyuki Yamashita, Osamu Yokota, Tomo Hirose, Takashi Hara, Michio Fujie, Ichiro Shibano, Tetsu Niimi, Takao Sasama, Katsuhiko Madaki, Kazuhiko Arai, Junko Yamashita, Yukiko Iguchi, Kazumasa Ohtsuka

Bioconjugate Chem 2009, Accepted 11 March 2009
© Springer Science + Business Media B.V. 2009

静岡大学創造科学技術大学院 教授 山下光司

<http://www.ipc.shizuoka.ac.jp/~tcmyama/index.html>

問い合わせ先 (invjp08@cjr.shizuoka.ac.jp)

(1-13 資料) ナノメディシン研究成果発表会

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デンドリマー型 新規 MRI 造影剤の開発研究

静岡大学創造科学技術大学院 教授 山下 光司

【開発研究の目的と研究成果の概要】

がんの早期発見を可能とする安全・高感度な MRI 造影剤を開発することを目的とした研究である。本研究では、コア部に従来の Gd-DTPA (Magnevist) を基本骨格として有し、外殻部に生体機能材料を認識する糖を配置して血管内成分を認識するナノサイズシュガーボールデンドリマー型の血管内貯留性及び緩和率に優れた新規な MRI 造影剤を調製した。調製した造影剤の *in vitro* および *in vivo* 評価を行った結果、この造影剤は高い信号強度と血管内貯留性を示し、ラットの富血性肝細胞がんあるいは小さな（直径約 1 mm 程度）初期がんの鮮明な画像を得ることに成功した。また、がんなどによる腹腔内出血の画像化にも成功した。

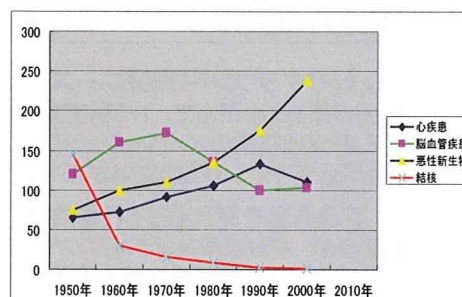


図1. 死因別死者数(対人口 10 万人)の推移(厚労省統計に基づく)

1. はじめに

MRI(核磁気共鳴画像診断法)は、安全な生体内可視化技術の一つである。我が国に於けるがんによる死亡率は高く、がん撲滅(あるいは、がんによる罹病率と死亡率の激減)は最重要課題の一つである(図1)。それ故、がんの早期発見・早期治療が非常に重要であり、がんの早期発見を普遍的に可能とする MRI に対する高い医療ニーズがある。また、死亡率第2位及び第3位の心疾患及び脳血管疾患も大変危険な病気である。本研究では、現在臨床的に最も一般的に用いられている Gd-DTPA (ガドリニウム-ジエチレントリアミン五酢酸)の欠点を克服し、高感度で高選択的・特異的に、鮮明・容易かつ安全に生体内画像情報を描出できる血管内貯留型の優れた MRI 造影剤を開発し、血管造影更にはがんを画像化できる造影剤の実用化に向けた研究開発を行った。

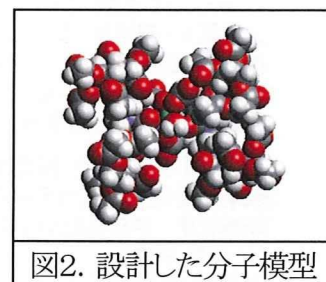


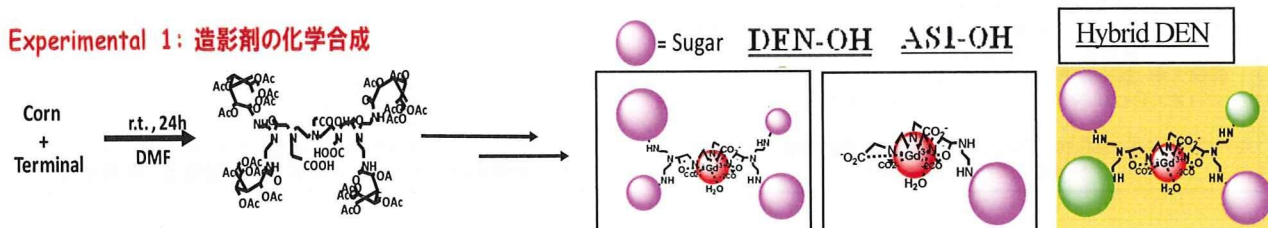
図2. 設計した分子模型

2. 本開発研究に於ける分子設計のコンセプトと分子モデル

本研究では、新規な分子設計のコンセプトとしては、(i)安全且つ優れた MRI 造影剤である Gd-DTPA を基本骨格とし、(ii)分子サイズを大きくし、(iii)生体内分子認識部位として糖を備えた新規な分子構造とした。その結果、新規な造影剤が(iv)血管内成分を認識することができ、(v)見掛けの分子量が更に大きくなり、(vi)分子運動が抑制され、(vii)血管内貯留性が改善され、(viii)造影剤の感度が顕著に高くなる。それ故、低濃度の造影剤により、(ix)血管造影、(x)富血性がん造影、(xi)腹腔内出血の造影ができ、(xii)安心・

安全且つ普遍的な MRI 造影剤の開発が可能となる。当該の分子設計のコンセプトを実現するために、Gd-DTPA をコア部とし外殻部に糖鎖を持つ dendriマー型の分子のモデリングと化学合成並びに評価を行った(図2及び Scheme 1. Experimental 参照)。

3. 新規 MRI 造影剤の配位子とガドリニウム錯体の調製

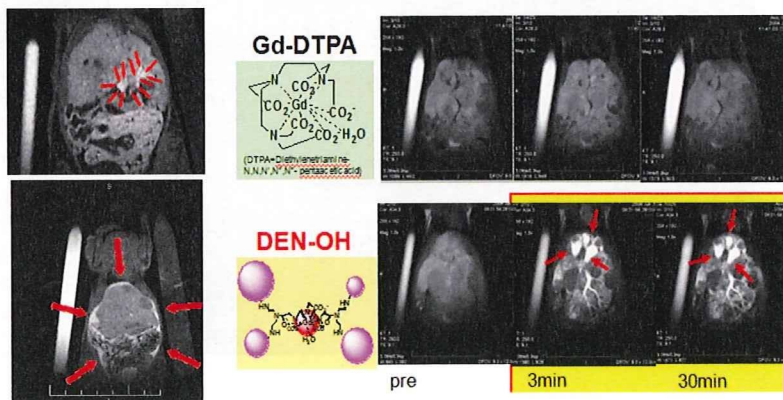


Scheme 1. Experimental (ナノサイズシュガーボール dendriマー型新規 MRI 造影剤の調製)。

DTPA 二無水物(コア部)およびジエチレントリアミン糖誘導体(ターミナル部)を用いて、分子設計した標的化合物(DEN-OH 等)を調製した(Experimental)。

4. 新規 MRI 造影剤の評価

調製した ASI-OH は小さながんを描出した(図3(上))。また、DEN-OH は従来の造影剤では描出が難しかった血管造影(MRA)や腹腔内出血の描出に適し、ラットの肝細胞がんの極めて鮮明な画像を与えた(図3(下)、図4(Gd-DTPA との比較))。



5. まとめ

新規な MRI 造影剤(DEN-OH 等)は血管内貯留性に優れ、*in vivo* 評価において、ラットの血管造影のイメージングウィンドーを拡張することが出来た。また、肝細胞がん・腹腔内出血等を低濃度・高感度で鮮明に描出した。

図3. 小さな肝細胞がんの造影(上)及び腹腔内出血の造影(下)。

図4. 従来品(上)の肝細胞がん造影及び DEN-OH(下)の肝細胞がん造影の比較(左から、(上下共)Pre, 3 min, 30 min)。

37 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ドリーマー型新規MRI造影剤の開発研究

(H19-ナノ一般-015) 3年度の最終年度

厚生労働科学研究費補助金
医療機器開発推進研究事業
ナノメディン研究 研究成果発表会

(③疾患の超早期診断・治療システム開発に関する研究(19080301))

平成21年2月24日(水) 16:50~17:00

於 財団法人 がん研究振興財団 国際研究交流会館 国際会議場

東京都 中央区 築地5-1-1 国立がんセンター内

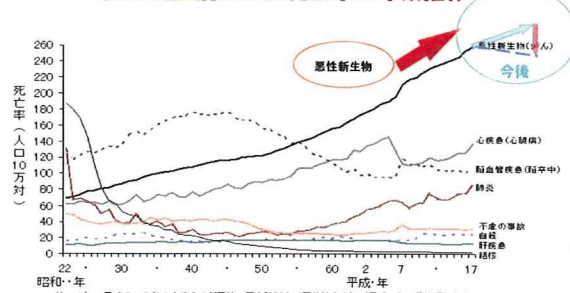
静岡大学 創造科学技術大学院 研究部 ナノマテリアル部門

バイオメディカルマテリアル研究室 (研究代表者) 山下光司

メール tcmyama@ipc.shizuoka.ac.jp

キーワード: MRI造影剤、デンドリマー、糖質、血管貯留性、がん、血管造影、高感度、安全・安心

主な死因別にみた死亡率の年次推移



注: 1) 平成6・7年の心疾患の低下は、死亡診断書(死因体系書) (平成7年1月施行) において「死亡の原因には、疾患の終末期の状態としての心不全、呼吸不全等が不在でください」という記載の横行からの増加の影響によるものと考えられる。
2) 平成7年の脳血管疾患の上昇の主な原因は、ICD-10 (平成7年1月適用) による原死因診断コードの明確化によるものと考えられる。

・がんは日本人の死亡原因の第1位・年間約30万人ががんにより死亡
がん治療のイノベーションが必要: 早期発見・早期治療

研究組織

研究者名	分担する研究項目	所属及び現在の専門	職名
山下 光司	研究の総括・新規MRI造影剤の調製・総合評価 in vivo評価	静岡大学創造科学技術大学院校・医用材料工学	教授
木村 元彦		静岡大学工学部・医用工学	教授
田中 康隆	新規MRI造影剤の調製・精製・構造解析	静岡大学工学部・生体有機化学	准教授
戸田 三津夫	新規MRI造影剤の調製・Gd錯体の構造解析	静岡大学工学部・グリーンケミストリー	准教授
阪原 晴海	新規MRI造影剤のin vivo評価	浜松医科大学医学部・放射線医学	教授
間賀田 泰寛	他のモデルとの比較	浜松医科大学量子医学研究センター・放射線	教授
竹原 康雄	新規MRI造影剤のin vivo評価と構造活性相関	東京化学	准教授
藤江 三千男	Gd錯体の構造解析とin vitro解析	浜松医科大学機器センター・構造解析	技術専門職員
三好 意雄	新規MRI造影剤の生体内動態・分布・代謝・排泄(ADCF)解析及び評価方法	福井大学医学部病態医学講座・生体分光	助教
岡野 孝	構造・活性相関、生体内分子認識、構造の最適化	東京慈恵会医科大学医学部・有機材料化学	教授
押川 達夫	新規MRI造影剤の調製・精製	沼津工業高等専門学校・有機・高分子化学	教授
本間 信行	新規MRI造影剤の調製・精製・評価	静岡工業技術研究所・繊維高分子材料(浜松	主任研究員
V.K.Reddy	新規MRI造影剤の調製・総合評価	工学技術支援センター)	工学研究員
於 剛	新規MRI造影剤の調製・総合評価	静岡大学創造科学技術大学院校・医用材料工学	准教授

現状(従来)のMRI造影剤



非特異的、血管外漏出性(血管貯留性に乏しい)

望ましいMRI造影剤

1. 造影効果が高いこと。造影効果は緩和現象によって決定。少量でもMR画像上で大きな造影効果。投与量はmmolのオーダー。
2. 安全であること。副作用が少なく、組織結合性などが無い化合物で、速やかに排泄される。保存期間中に物性変化しない。
3. 使いやすいこと。ガドリニウム製剤は静脈内投与するために粘稠度の低い注射しやすい剤形。

血管造影剤の背景

MR Angiography (MRA)/がんのMR描出

- ・ 現在MR造影剤の主力(Gd-DTPA)は、血管外漏出性
- ・ 投与後早期(1分~3分以内)に撮影を行わないと良好なMRAが得られない
- ・ 血管内に留まる造影剤を使用すればMRAの画質が向上、至適撮像タイミングの範囲を広げることが可能 (Imaging Windowを広げる)
- ・ 高感度のMRI造影剤/がん等病変部の早期発見/MRA
- ・ 腎性全身性線維症(Nephrogenic Systemic Fibrosis (NSF)対応可

新規な分子設計のコンセプト

- ・ (i)安全且つ優れたMRI造影剤であるGd-DTPAを基本骨格
- ・ (ii)分子サイズを大きく
- ・ (iii)生体内分子認識部位として糖を備えた新規な分子構造

分子設計の結果・効果(1)

- (iv)血管内成分を認識
- (v)見掛けの分子量が更に大きい
- (vi)分子運動の抑制
- (vii)血管内貯留性の改善
- (viii)造影剤の感度が顕著に高い

7

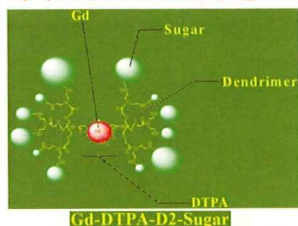
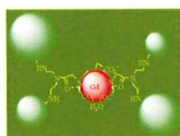
分子設計の結果・効果(2)

低濃度の造影剤により

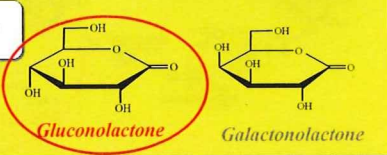
- (ix)血管造影
- (x)富血性がん造影
- (xi)腹腔内出血の造影
- (xii)安心・安全且つ普遍的なMRI造影剤の開発が可能

8

シュガーボールドンドリマータイプのGd-DTPAコアをコアにしたMRI造影剤



Sugars



様々なGd錯体の調製と評価(1)

- (i)鎖式あるいは環式
- (ii)対称型あるいは非対称型
- (iii)糖誘導体及び/あるいは非糖誘導体
- (iv)加水分解経路あるいは非加水分解経路
- 糖の種類/数
- リンカーの種類/長さ/硬さ
- その他、様々な合成部品の修飾

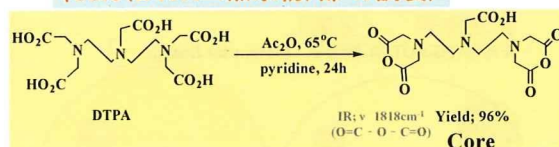
10

様々なGd錯体の調製と評価(2)

- 次の4つのカテゴリーに相当する。
- 最も注力したMRI造影剤: (i)鎖式、(ii)対称型及び非対称型、(iii)糖誘導体及び非糖誘導体、(iv)非加水分解経路
- 次に注力したMRI造影剤: (i)鎖式、(ii)対称型、(iii)糖誘導体、(iv)加水分解経路
- 第3番目に注力したMRI造影剤: (i)環式、(ii)対象型あるいは非対称型、(iii)糖誘導体、(iv)非加水分解経路
- その他: (a)配位子の主鎖に置換基を導入するMRI造影剤: (i)鎖式、(ii)非対称型、(iii)糖誘導体、(iv)非加水分解経路; (b)複合機能化MRI造影剤
- *In vitro* 評価
- *In vivo* 評価 → 前臨床前試験

11

〈Core(DTPA二無水物)部の調製〉



〈Gd-DTPA-D1-Sugarの調製〉

