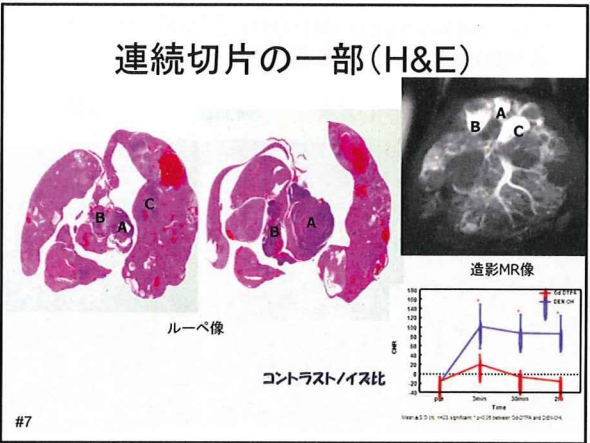
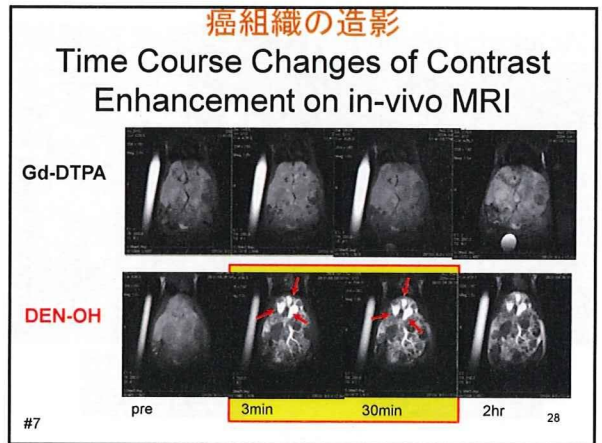


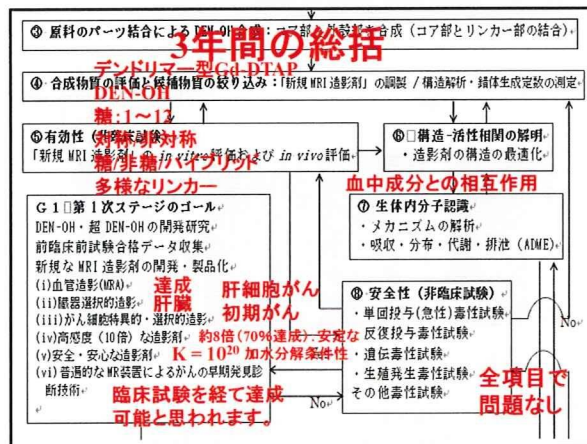
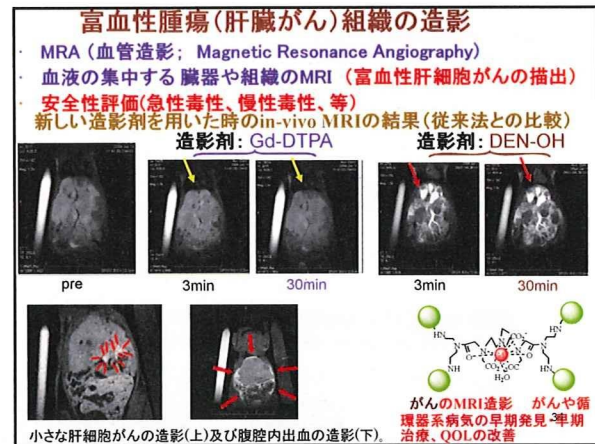
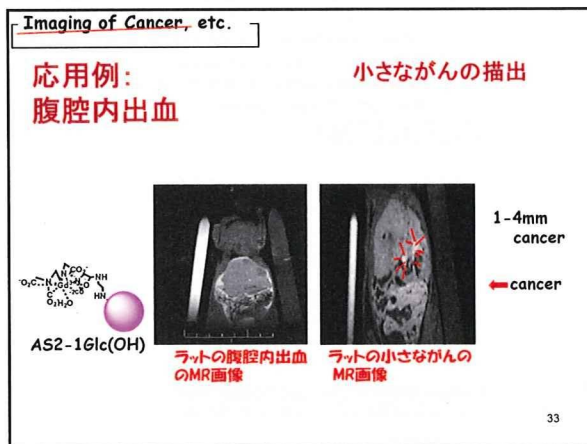
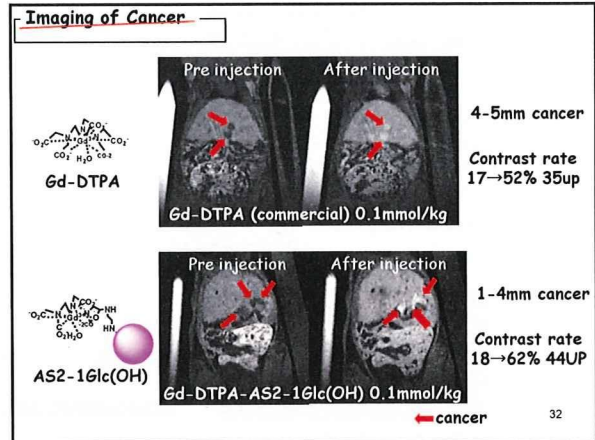
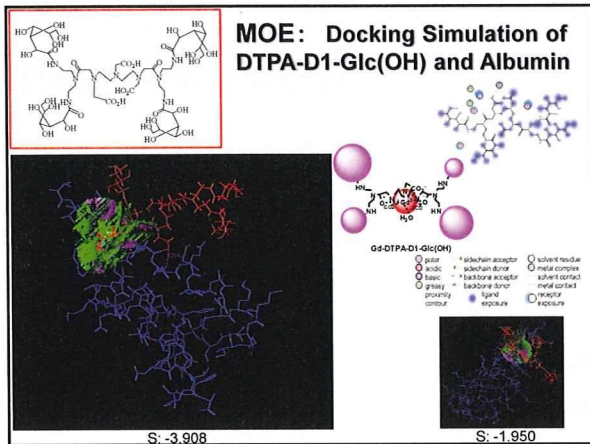
**肝細胞癌画像化技術の背景**

- 肝細胞癌は肝臓の悪性腫瘍中最も高頻度に遭遇する病変であり、早期発見、早期治療が予後の改善に寄与するため、画像診断の役割は大きい
- 富血性肝細胞癌の診断はこれまで、非特異的な血管外漏出性造影剤による造影動脈相(静脈投与後30秒以内)を狙った撮影によるものであり、高磁場の高速MR装置が必要であった
- 投与後数時間にわたり血管内にとどまる傾向のある dendrimers DTPA-D1Glu(OH)により、MR検査で、動脈相に特定しなくても、通常のspin-echo法で肝細胞癌の検出ができるようになる可能性がある(imaging windowを広げることができる)



**メカニズム & 構造-活性相関 & 分子設計と構造最適化**

- 新規造影剤における様々なModification
- In vitro* 評価
- 分子設計ソフト(MOE)  
Molecular Operating Environment
- 緩和率測定
- Gdの定量



**謝辞**

厚生労働科研:  
研究費  
医療機器センター:  
流動研究員: Valluru Krishna Reddy  
於 剛  
B. Siva Kumar  
A. Uma Ravi Sankar  
外国人研究者招聘: Robert N. Muller  
David F. Wiemer

ご静聴誠に有難う御座いました。35

(1-14 資料) 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-D1-2Glc(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

Arigala, Uma Ravi Sankar<sup>a,b</sup>, Mitsuji Yamashita<sup>a</sup>, K. Srinivasulu<sup>a</sup>, Nobuhisa Ozaki<sup>a</sup>, Takashi Aoki<sup>a</sup>, Yasutaka Tanaka<sup>c</sup>, Mothohiko Kimura<sup>c</sup>, Mitsuo Toda<sup>c</sup>, Michio Fujie<sup>d</sup>, Yasuo Takehara<sup>d</sup> and Harumi Takahara<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Graduate School of Science and Technology, Shizuoka University, Hamamatsu 432-8561, Japan  
<sup>b</sup>Japan Association for the Advancement of Medical Equipment (JAAME) Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

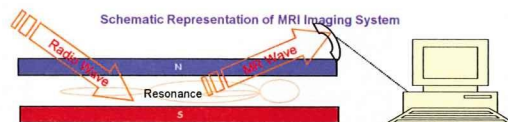


Abstract

The present research was successful in (i) preparation of a new DDS (Drug Delivery System) of Gd-DTPA with sugars, which provide a larger molecular size to remain in blood vessels. (ii) The outer shell part of sugars recognize molecules in a living body, and then (iii) the agents provides more sensitive and safer MRI contrast agent than the original molecule, Gd-DTPA, for imaging the living body. The novel MRI contrast agents remain in blood vessels to provide (iv) higher imaging potential for MRA, and finally Gd-DTPA-D1-2Glc(OH) gives (v) clear images of tumors at the very early stage.

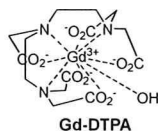
Introduction

MRI is a safe and potential technology to visualize inside tissues of living bodies without an X-ray or radio-active isotopes. Gd-DTPA (Gadolinium Diethylenetriamine pentaacetic acid) complex is currently one of the most frequently used MRI contrast agent. The Gd complex, Gd-DTPA, is a small sized material, and then passes through blood vessel walls. Therefore, the Gd complex has low specificity to organs and is poor at MRA (Magnetic Resonance Angiography). Hence, to improve the weak point of Gd-DTPA, the Gd complex was chemically modified with sugars to be a larger molecule and to provide molecule recognizing sites constructing novel Sugar Compound.



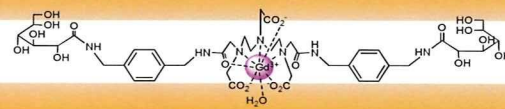
Living body at the center of the magnetic field (Left) is irradiated by Radio Wave and emits MR Waves, which is analyzed by a computer (Right) and give us MR images.

Molecular Design



Gd-DTPA Has Certain Weaknesses

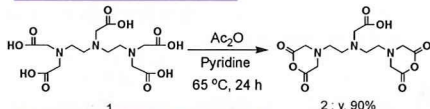
1. Retention time of Gd-DTPA is short in blood vessels
2. Gd-DTPA has no specificity for organs



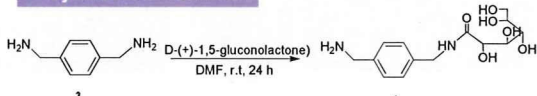
Concept of Gd-DTPA-Sugar Complexes

1. Larger molecule with blood vessel pool character
2. Molecular recognition by sugar
3. Clearer description for MRI by larger Relaxivity of the contrast agent derived

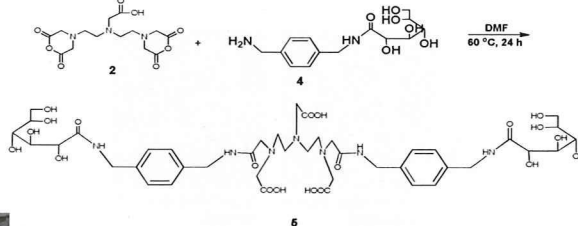
Synthesis of Core



Synthesis of Terminal



Synthesis of ligand



*In-vitro* Evaluation of Gd Compounds



Minispec

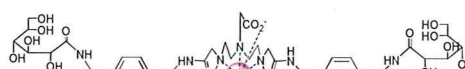
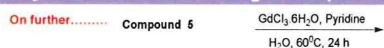


ICP-AES

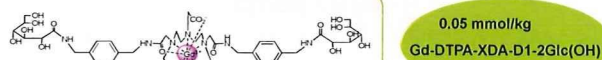
Table 1. Comparison of  $r_1$  relaxivity

Gd complexes	$r_1$ [ $\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}$ ]	
	in $\text{H}_2\text{O}$	in albumin
Gd-DTPA	3.5	3.5
1	10.0	19.25

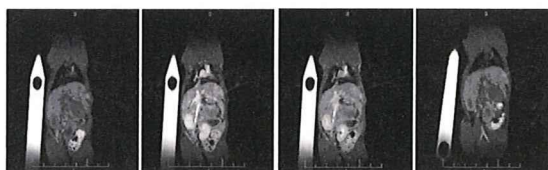
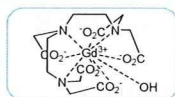
Synthesis of Gd-DTPA-Sugar Compound



*In-vivo* Evaluation of Gd Compounds



MR Imaging in Rats



Pre 1 min 5 min 20 min



Pre 1 min 5 min 20 min

Summary

- Gd-DTPA-XDA-D1-2Glc(OH) has a longer retention time in blood vessels than Gd-DTPA.
- Gd-DTPA-XDA-D1-2Glc(OH) can create a clearer image under lower concentration.
- Gd-DTPA-XDA-D1-2Glc(OH) has the potential ability to locate tumors.

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

Y. Takehara <sup>1</sup>, T. Aoki <sup>2</sup>, M. Yamashita <sup>2</sup>, M. Fujie <sup>3</sup>, K. Muramatsu <sup>1</sup>, H. Sakahara <sup>1</sup>, N. Sadatoh <sup>4</sup>, H. Takeda <sup>1</sup>  
 1) Radiology and 3) Research Equipment Center, Hamamatsu Univ. School of Medicine, Hamamatsu, Japan,  
 2) Department of Materials Science and Chemical Engineering, Hamamatsu, Japan,  
 4) National Institute for Physiological Science, Okazaki, Japan

**INTRODUCTION:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common liver neoplasm causing one million cancer deaths annually worldwide<sup>1</sup>. MR diagnosis of HCC has been traditionally made by whole liver dynamic study using fast gradient echo sequence with non-specific extravascular gadolinium chelates<sup>2</sup>.

**PURPOSE:** In this study, we have tested whether our newly developed blood pool contrast agent, dendrimers DTPA-D1Glc(OH)<sup>3</sup> can show improved and sustained contrast enhancement of the hypervascular hepatocellular carcinoma with less amount of gadolinium chelate as compared to conventional Gd-DTPA.

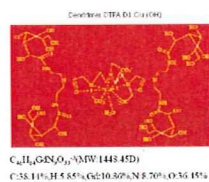


Fig. 1: Structure of dendrimers DTPA-D1Glc(OH)

T1 relaxivity in Bovine serum (4.5g/dl) (at 1.5T, 37°C)

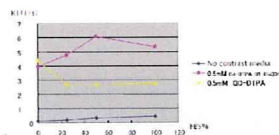


Fig. 2: Dendrimers DTPA-D1Glc(OH) shows improved T1 relaxivity in the bovine serum protein solutions, which is considered to be based on the agent's weak affinity to serum protein to behave as a blood pool agent.

**MATERIALS AND METHODS:** Dendrimers DTPA-D1Glc(OH) functionalized ligand for a lanthanide ion based on dendritic architecture (fig. 1) was synthesized by our group<sup>3</sup>. Dendritic frameworks were applied as a paramagnetic metal support. These ligands are composed of diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) and glycodendrimers. The molecular weight of the contrast agent is 1448.45D. In the preliminary in-vitro study, the compound is known to show a weak affinity to serum protein (Fig. 2). Six male F344/N Slc rats (age 5 weeks, 80g BW) were housed in animal quarters with free access to standard pellet diet and distilled water containing 100ppm diethylnitrosamine (DEN). After three months, HCCs and hyperplastic or dysplastic nodules were induced in the cirrhotic liver of the rats. All procedures were carried out with the approval of our institutional ethical committee for the care and use of laboratory animals which is consistent with standards required by the UKCCCR guidelines<sup>4</sup>. Six tumor bearing rats underwent contrast enhanced MRI with two different contrast media consecutively [i.e.: Gd-DTPA (0.1 mmol/kg, Magnevist, Bayer Pharma.) first, and more than 6 hours later, dendrimers DTPA-D1Glc(OH) (0.0125mmol/kg) was given]. A 3.0T imager (Magnetom Allegra 3.0T, Siemens Medical Solutions, Erlangen, Germany) together with a homemade surface coil (5 inch in diameter) were used for imaging. Under general anesthesia induced by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg), axial and coronal T1-weighted conventional spin-echo images and T2-weighted fast spin-echo images were acquired before contrast administration. T1-weighted coronal fat saturated 3 dimensional fast spoiled GRASS (3D-VIBE) was performed before and immediately after the contrast administration. Image acquisitions were repeated every 51 seconds for three times and at 30 min and at 1 hour after the contrast administration. The parameters used for T1-weighted imaging were: TR(ms)/TE(ms); 4.4/1.8, NEX: 1, FOV(mm);120. Matrix: 256x208, 56 partitions, slice th (mm);0.7. For T2-weighted imaging, the parameters were TR (ms) / TE (ms) of 2000 / 86, image matrix of 256 × 128, slice thickness (mm) of 2, and slice gap (mm) of 0.6. Rats were injected intravenously with 0.1 mmol/kg of Gd-DTPA and 0.0125 mmol/kg of dendrimers DTPA-D1Glc(OH) via the tail vein consecutively with an interval of more than 6 hours. After completion of image acquisitions, the rats were sacrificed with intraperitoneal injection of an overdose of sodium pentobarbital, and the livers were excised from the rats, and then, fixed in the 10% formaldehyde solution for two days. The livers were embedded in paraffin, and then sliced identically to the axial or coronal planes of the MR imaging planes. The axial histological sections were stained with hematoxylin and eosin (H-E) for photomicroscopic investigations. The histological sections were correlated with MR images and the hypervascular HCCs more than 5 mm in diameter were picked out and numbered. The lesions were histopathologically diagnosed based on the general rules for the clinical and pathological study of primary liver cancer. On photomicroscopic images, HCCs were diagnosed when the nodules were composed of hepatocytic lesions exhibiting advanced atypia and structural derangements. All HCCs induced with DEN were extremely hypervascular (Fig. 3); therefore, they were depicted as hyperenhanced nodules on contrast enhanced MR imaging at the arterial dominant phase, and also on photomicroscopic images, numerous primitive arteries were defined within the tumors. Mean signal intensities and standard deviations (SD) were measured by focusing circular regions of interest on the each tumor, adjacent liver parenchyma, and the background air. The contrast to noise ratio (CNR) was then calculated for each HCCs. A total of 25 hypervascular HCCs were identified in the liver of the 6 rats.

HCC H&E

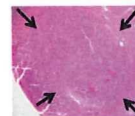


Fig. 3: Photomicroscopy of representative HCC (arrows) induced in this model (H&E). The tumor is highly vascularized with many dilated arteries.

Time Course Changes of CNR of HCC

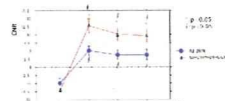


Fig. 5: Time course changes of HCCs after administration of two contrast media. Note stronger and sustained enhancement with Dendrimers DTPA-D1Glc(OH).

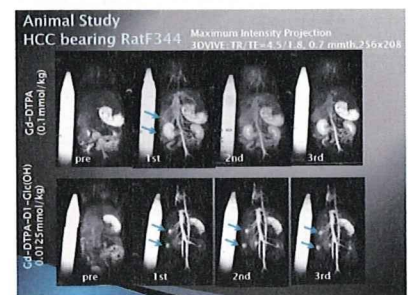


Fig. 4: Representative in-vivo contrast enhanced MR study performed on one individual rat with regular Gd-DTPA(0.1mmol/kg) and Dendrimers DTPA-D1Glc(OH) (0.0125mmol/kg). The images shown were acquisitions performed every 51 seconds after injection. Two histopathologically proven HCCs were identified in the right lobe of the liver, which were more clearly depicted with Dendrimers DTPA-D1Glc(OH) (lower row) as two hyper-enhanced lesions (arrows) compared to those identified with regular Gd-DTPA (upper row). Note improved contrast regarding vascular structures also with dendrimer DTPA-D1Glc(OH).

**RESULTS:** All HCCs were clearly identified as strongly enhanced tumors with use of T1-weighted 3D-VIBE sequence after administration of dendrimers DTPA-D1Glc(OH) in all three acute phases after contrast injection (Fig. 4). The CNR of the tumor at 30s after injection of dendrimers DTPA-D1Glc(OH) was 13.1±/−6.4 as compared to Gd-DTPA (5.3±/−4.5) (p<0.01). The lesion contrast was improved only at 1<sup>st</sup> phase after injection of Gd-DTPA, and no significant contrast improvement was created thereafter. Whereas, dendrimers DTPA-D1Glc(OH) continued to reveal stronger and sustained contrast enhancement of the HCCs at least for three acute phases (i.e.; at least for 3 minutes) after contrast administration, which were reflected by the time-course changes of the CNR (Fig. 5).

**DISCUSSION:** Blood pool agents are basically designed to create paramagnetic or superparamagnetic substance bound to macromolecule. Macromolecular agents do not leak into the interstitium; therefore, stays within the vessels for an extended period of time. They also have higher relaxivity than extracellular agents due to the multiplicity of the paramagnetic ions attached to each macromolecule and to slowing of molecular rotation of each paramagnetic subunit (5). According to preceding study, our dendrimers DTPA-D1Glc(OH) show prolonged enhancement of the blood at least for one hour after administration. Considering the low molecular weight of the agent, our agent is speculated to have an affinity to serum protein after intravenously injected. Hepatocellular carcinoma is one of the most vascular rich tumors. The improved and sustained tumor-background liver contrast is based on the VEGF mediated inductions of primitive arteries within the HCCs. The use of blood pool agent may be helpful not only in improving the tumor detection but in determining the indication of anti-VEGF drugs or assessment of the effectiveness of such therapeutic strategies (6).

**CONCLUSION:** Newly developed blood pool contrast agent dendrimers DTPA-D1Glc(OH) can show improved and sustained contrast enhancement of hypervascular HCC using 1/8 amount of gadolinium chelate as compared to Gd-DTPA at molecular basis.

## REFERENCES

- [1] Rustgi VK. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 1987;16(4):545-51.
- [2] Muramatsu Y, Nawano S, Takayasu K, et al. Early hepatocellular carcinoma: MR imaging. *Radiology* 1991;181(1):209-13.
- [3] Takahashi M, Hara Y, Aoshima K, et al. Utilization of dendritic framework as a multivalent ligand: a functionalized gadolinium (III) carrier with glycoside cluster periphery. *Tetrahedron Lett* 2000;41:8485-8.
- [4] United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research (UKCCCR) Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia (Second Edition). *Br J Cancer* 1998;77(1):1-10.
- [5] Vexler VS, Clément O, Brasch RC. A macromolecular contrast agent for magnetic resonance imaging. Effect of molecular weight on blood pharmacokinetics and enhancement patterns for polylysine-gadopentetate dimeglumine. *Invest Radiol*. 1994 Jun;29 Suppl 2:S62-4.
- [6] Wu XZ. New strategy of antiangiogenic therapy for hepatocellular carcinoma. *Neoplasia*. 2008;55(6):472-81.

## QCM法を用いた細胞に対する 薬物の毒性評価法

静岡大学工学部 木村元彦、大橋和義  
静岡大学大学院工学研究科 岡本 真悟  
静岡大学創造科学技術大学院 山下光司

### 従来の毒性評価法と解決案

シャーレまたは微小滴定プレート上に細胞を培養したのを用い、光学顕微鏡等を用いて細胞を数えて評価

薄層  
コロニー試験法

最終的な情報のみ  
寒天重層法

時間による薬物濃度の変化

細胞脱離量を測定し、薬物の細胞組織への影響を定量的、リアルタイムで評価

### QCM法の原理

水晶振動子は逆圧電効果のはたらきにより発振

発振周波数を測定する微小重量測定法 → QCM法

<交流電圧印加>

電極板

水晶

振動

物質付着

物質脱離

振動

水晶は固有の周波数で振動する

物質の付加による質量増加で周波数が減少する

### 実験方法

細胞を水晶振動子に付着させた薬物水溶液を滴下

毒性なし

細胞に影響なし

水晶振動子上の質量変化なし

測定周波数に変化なし

毒性あり

細胞に影響あり

水晶振動子上の質量変化あり

測定周波数が変化

NaOHの毒性評価

薬物濃度：0.5 ~ 10 wt% - ラット線維芽細胞

新規MRI造影剤(Gd-DTPA錯体)の毒性評価

薬物濃度：0.1 ~ 30 mmol・l<sup>-1</sup> - ヒト血管内皮細胞

### 実験装置

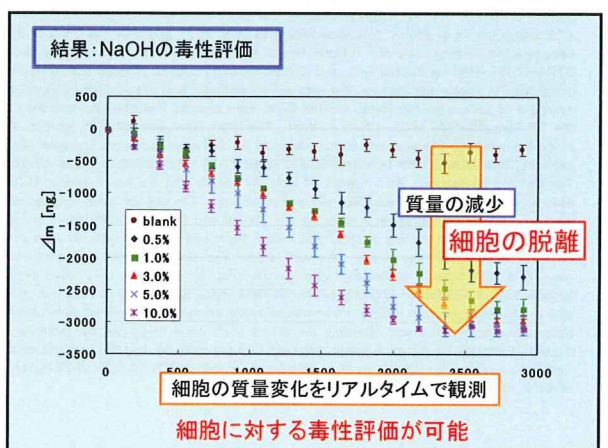
- 細胞を付着させておいた水晶振動子をセルに組み込み、加温した培養液 15 mlを加え、37°Cの恒温室内で攪拌しながら基本周波数を測定
- 各濃度に調製した水溶液 1 mlを入れ、周波数変化を測定
- Sauerbreyの式で周波数変化を質量変化に換算

<Sauerbreyの式>

$$\Delta m = -\frac{A\sqrt{\rho \cdot \mu}}{2f_0^2} \Delta f$$

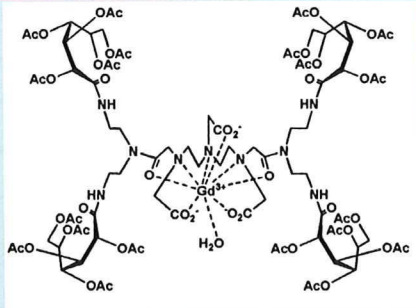
$\Delta f$ : 周波数変化 [Hz]  
 $A$ : 電極表面積  $1.327 \times 10^{-4} \text{ [m}^2\text{]}$   
 $\rho$ : 水晶密度 (ATCut)  $2.648 \times 10^3 \text{ [kg} \cdot \text{m}^{-3}\text{]}$   
 $\mu$ : 水晶のせん断応力  $2.947 \times 10^{10} \text{ [N} \cdot \text{m}^{-2}\text{]}$   
 $f_0$ : 基本周波数 [Hz]  
 $\Delta m$ : 水晶表面の質量変化 [kg]

① Cell ② Stirrer ③ Quartz Crystal  
 ④ Oscillator ⑤ Counter  
 ⑥ Computer ⑦ Temperature-controlled room

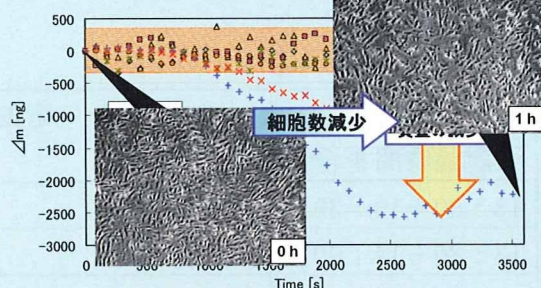


テストした新規MRI造影剤の構造

Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)



結果: 新規MRI造影剤の毒性評価



5 mmol·l<sup>-1</sup>以上で細胞死または細胞の脱離を引き起こす

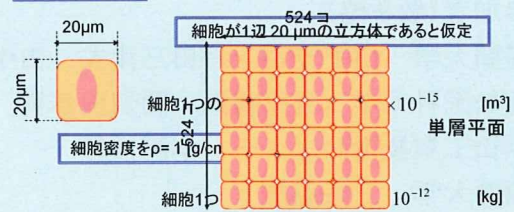
結論

- QCM法により、NaOH、新規MRI造影剤の細胞毒性を定量化
- 薬物の細胞影響をリアルタイムで測定
- 比較的短時間の測定



QCM法を用いた細胞毒性評価法は薬物の定量的な毒性評価法として期待できる

細胞剥離量

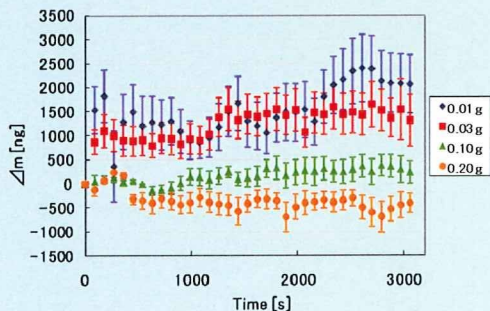


MRI造影剤の毒性評価実験より2200 ngの質量変化を確認  
水晶振動子に付着していた細胞面積:  $A = 1.103 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{]}$   
剥離した細胞数:  $n = 2.75 \times 10^3$

約83%脱離

水晶振動子電極の表面積:  $A = 1.327 \times 10^{-4} \text{ [cm}^2\text{]}$

シリカナノ粒子の毒性評価



## データ集2 研究会

### 2-1 第1回研究会 (2009年9月10日)

#### 研究会スケジュール

時間 (討論時間を含)	発表者	タイトル
13:00-13:30	竹原先生	海外学会報告
13:30-14:00	山下先生	海外学会報告
14:00-16:00	間賀田先生 山下先生 Uma Ravi Shankar (10分) 杉山雅紀 (10分) 小倉貴章 (10分)	昨年度の報告書について 昨年度の成果と今年度の状況、方針並びに研究について

場所：静岡大学イノベーション共同研究センター 2階 218室

#### 参加者(敬称略)

静岡大学 山下光司, 戸田三津夫, 田中康隆

浜松医科大学 阪原晴海, 間賀田泰寛, 竹原康雄, 藤江三千男

浜松工業技術センター 本間信行

福井大学 三好憲雄

山下研究室 Uma Ravi Shankar, Kambam Srinivasulu, 杉山雅紀, 安部聡一郎,  
石田真吾, 小倉貴章, 澤田亜季歩, 都築靖隆, 山岡真弓



様式A(3)

厚生労働科学研究費補助金交付申請書

厚生労働大臣 殿

平成21年4月18日

住所 〒432-8013 静岡県浜松市中区広沢1丁目31-3

フリカ・ナ ヤマシタ ミツジ  
氏名 山下 光司 印  
生年月日 1944年7月28日生

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) 交付申請について

標記について、次により国庫補助金を交付されるよう関係書類を添えて申請する。

1. 申請金額 : 金 21,922,000 円也 (うち間接経費 0 円)
2. 研究課題名 (課題番号) : がんを安全・高感度で鮮明に画像化できるナノサイズシミュレーション型新規MRI造影剤の開発研究 (H19-71-般-015)
3. 研究事業予定期間 : 平成21年4月1日から平成22年3月31日まで (3) 年計画の (3) 年目

4. 申請者及び経理事務担当者

①所属研究機関	国立大学法人 静岡大学	
②所属局	創造科学技術大学院	
③職名	教授	
④所属研究機関所在地	〒432-8561 静岡県浜松市中区城北3-5-1 Tel: 053-478-1144 Fax: 053-478-1144 E-mail: tcmyma@ipc.shizuoka.ac.jp	
⑤最終卒業校	名古屋大学大学院工学研究科	⑥学位 工学博士
⑦卒業年次	昭和47年	⑧専攻科目 医用材料工学
⑨氏名	タナカ ヒロカズ 田中 宏和	
⑩連絡先	〒422-8017 静岡県駿河区大谷836 国立大学法人 静岡大学 財務施設 Tel: 054-238-4420 Fax: 054-238-5406 E-mail: ohizumak@ipc.shizuoka.ac.jp 財務施設課	
⑪研究承諾の有無	⑬事務委任の有無	⑭所属研究機関における間接経費の受入の可否
有	有	可
⑫利益相反委員会の有無	⑮COI委員会の有無	⑯本研究に関連する経済的利益関係の有無
有	有	有

5. 研究組織情報

①研究者名	②分担する研究項目	③最終卒業校・卒業年次・学位及び専攻科目	④所属研究機関(研究実施場所)	⑤所属研究機関における職名	⑥研究費配分額(千円)
山下 光司	研究の総括 新規MRI造影剤の調製・総合評価	名古屋大学大学院工学研究科博士課程・S47・工学博士・医用材料工学	静岡大学工学部創造型工学(静岡大学)	教授	18,422
木村 元彦	動物実験、in vivo評価	静岡大学大学院電子科学研究科・S62・工学博士・化学工学	静岡大学工学部・医用材料工学(静岡大学)	教授	研究代表者 一括計上
田中 康隆	新規MRI造影剤の調製・精製・構造解析	静岡大学大学院工学部・H1・工学博士・材料科学	静岡大学工学部・生体機能化学(静岡大学)	准教授	研究代表者 一括計上
戸田 三津夫	新規MRI造影剤の調製・Gd錯体の構造解析	大阪大学大学院理学研究科・H1・博士(理学)・化学	静岡大学工学部・グリーンケミストリー(静岡大学)	准教授	研究代表者 一括計上
阪原 晴海	新規MRI造影剤のin vivo評価	京都大学大学院医学研究科・放射線医学	浜松医科大学医学部・放射線医学(浜松医科大学)	教授	600
間賀田 泰寛	新規MRI造影剤の構造・活性関連	京都大学大学院薬学研究所・放射線医学	浜松医科大学薬品化学(浜松医科大学)	教授	500
竹原 康雄	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	浜松医科大学医学部・放射線医学(浜松医科大学)	准教授	1,000
藤江 三千男	Gd錯体の構造解析とin vivo評価	静岡大学工学部・H20・工学博士・医用材料工学	浜松医科大学工学部・放射線医学(浜松医科大学)	技術専門職員	400
三好 憲雄	新規MRI造影剤の体内内分取・代謝・排泄試験方法	九州大学大学院農学研究科・農学博士・博士(農学)・生物物理学	静岡県立大学医学部病態生理学(静岡県立大学)	助教	350
岡野 孝	構造・活性相関、生体内分子認識、最適化	名古屋大学大学院工学研究科博士課程・S59・工学博士・応用化学	東京慈恵会医科大学医学部・有機化学(東京慈恵会医科大学)	教授	350
押川 達夫	新規MRI造影剤の調製・精製	静岡大学工業系専攻・S52・工学博士・生体機能材料	南沼津高等学校・高分子化学(沼津高等学校)	教授	300
本間 信行	新規MRI造影剤の構造解析及びイメージング	静岡大学・H1・理学学士・無機化学	静岡県工業技術研究所・繊維高分子材料センター(浜松工業技術支援センター)	主任研究員	研究代表者 一括計上

6. 政府研究開発データベース  
研究者番号及びエフオーワード

研究者名	性別	生年月日	研究者番号(8桁)	エフオーワード(%)
山下光司	男	1944年07月28日	60110748	30
木村元彦	男	1958年11月16日	20195382	10
田中康隆	男	1962年09月18日	10240798	10
戸田三律夫	男	1959年04月28日	70217511	10
阪原晴海	男	1953年11月09日	10187031	10
間寛田泰寛	男	1960年03月30日	20209399	5
竹原康雄	男	1959年02月10日	70188217	10
藤江三千男	男	1954年06月23日	90397373	10
三好寛雄	男	1949年04月09日	40209961	20
岡野孝	男	1956年05月23日	90194373	20
押川達夫	男	1954年03月18日	40342498	10
本間信行	男	1967年12月18日	70513886	5

研究分野及び研究区分

コード番号	重点研究分野	研究区分
研究主分野 102	ライフサイエンス	医学・医療
研究副分野 1 189	ライフサイエンス	共通基礎研究
研究副分野 2 404	ナノテク・材料	ナノ医療
研究副分野 3		

研究キーワード

コード番号	研究キーワード
研究キーワード1 4	糖
研究キーワード2 29	糖
研究キーワード3 113	分子認識
研究キーワード4 70	先端機能デバイス
研究キーワード5 37	ハイオケルシス機器

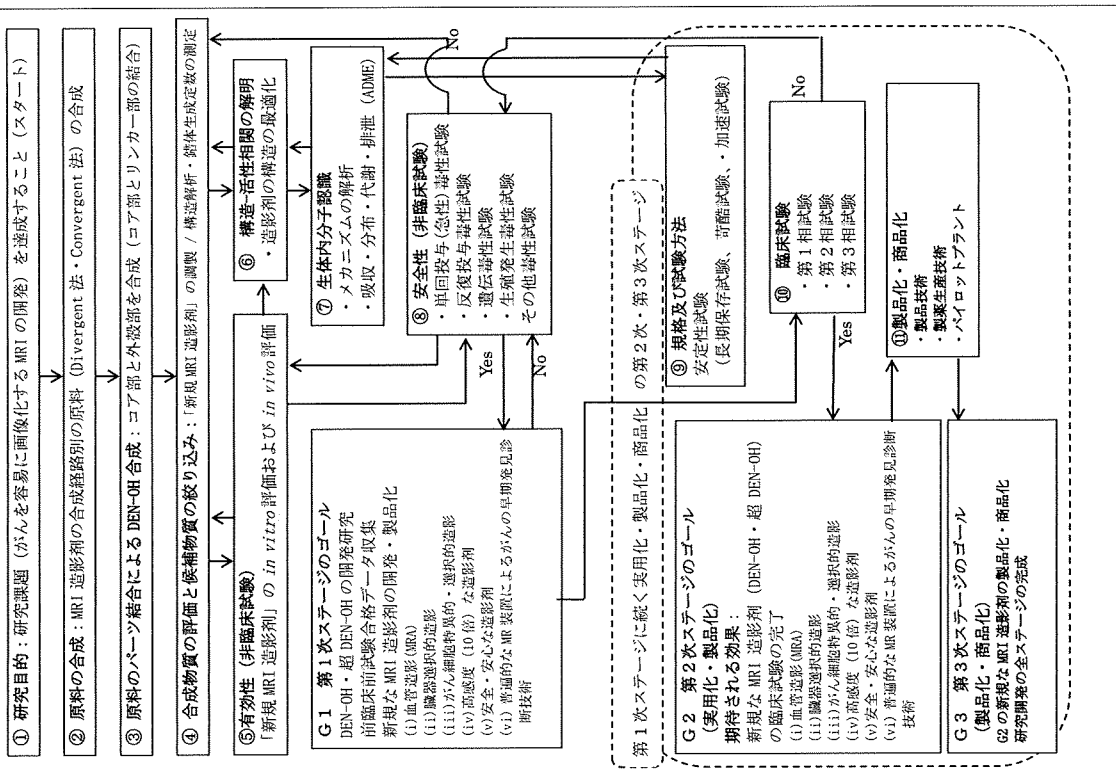
研究開発の性格

基礎研究	応用研究	開発研究
		○

7. 研究の概要

<p>(1) 「8. 研究の目的、必要性及び特色・独創的な点」から「1.1. 倫理面への配慮」までの要旨を1,000字以内で簡潔に記入すること。</p> <p>(2) 複数年度にわたる研究の場合には、研究全体の計画と当該事業年度の計画との関係が分かるように記入すること。</p> <p>(3) 研究の目的、方法及び期待される効果の流れ図を記入又は添付すること。</p>	<p>研究の目的： 研究の目的は、ナノサイズのシユルガーポリアルマンドリマー型 Gd-DTPA 錯体を創製して、安全・高感度で初期がんを普遍的に画像診断できる MRI 造影剤とすることである。当該の造影剤は従来の MRI 造影剤に結合させた糖の分子認識機能を活用することにより、造影剤のコア部分は汎用の Gd-DTPA でありながら、糖が生体内分子認識することにより、生体内で造影機能が顕著に増強され、血管造影・臓器選択性・特異性、がん組織造影等所望の機能を備えた新しい MRI 造影剤の開発が期待される。そのため、通常の病院の現有設備の MRI 装置のままで、がんの早期発見等の技術革新を齎す研究である。当該研究では、流れ図に示す様に、前臨床試験のデータを収集する第1ステージの目標を達成して、続く第2ステージ、第3ステージに於ける臨床試験・安全性試験・プロセスマニファクチャー・製品化・商品化を行う。</p> <p>研究方法（流れ図参照）： (第1ステージ) 1. 研究課題をスタート 2. 原料の合成（合成パターン別（鏡式/非鏡式、対称型/非対称型、糖誘導体/非糖誘導体/糖誘導体複合誘導体、加水分解経路/非加水分解経路、主鎖置換/非置換基） 3. 原料のパーツの結合（Divergent 法/Convergent 法） 4. 合成物質の評価と候補物質の絞り込み（加水分解・非加水分解、構造解析、物理的性質、化学的性質） 5. 有効性評価（<i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 評価）（非臨床試験） 6. 構造・活性相関の解明（造影剤の最適化） 7. 生体内分子認識（非臨床試験） 8. 安全性評価（非臨床試験） 9. 申請及び試験方法 10. 臨床試験 11. 第2ステージのゴール 12. 製品化・商品化 13. 第3ステージのゴール</p> <p>結果と考察： 加水分解経路の DEN-OH が緩和率 <math>r_1=80 [s^{-1} \cdot \mu M^{-1}]</math> で従来品 Gd-DTPA（緩和率 <math>r_1=3.5 [s^{-1} \cdot \mu M^{-1}]</math>）との比較において9倍程度の造影効果があった。非加水分解経路対称型では <math>r_1=24 [s^{-1} \cdot \mu M^{-1}]</math>（従来品用する造影剤の1/2の濃度で極めて鮮明な画像を与えた。非対称型の Gd-DTPA 誘導体はラットの初期がん（約1mm）を描出した。安全性試験により安全性が保証された。平成21年度は、糖の生体内分子認識機序の解明、糖以外の分子認識残基等との複合化により、更に高感度の MRI 造影剤（超及び複合化 DEN-OH）の開発、前臨床試験データ収集を行い、第2ステージ以降の臨床試験、等の研究に継続する。</p>
--	---

(流れ図)



## 2-2 第2回研究会 (2010年2月15日)

### 研究会スケジュール

時間 (討論時間を含)	発表者	タイトル
13:00-13:20	(開会) 山下光司	平成21年度の厚労科研、3年間の研究成果及び厚労科研の取りまとめについて
13:20-13:40	Dr. Arigala Uma Ravi Sankar	R & D of MRI contrast agents during 2009-2010
13:40-14:00	Dr. Kambam Srinivasulu	R & D of MRI contrast agents
14:00-14:20	藤江 三千男 共同研究の先生方	
14:20-14:40	杉山 雅紀	糖修飾 Gd-DTPA 錯体の開発: 新規な誘導体の合成及び MRI 造影剤としての <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 評価
14:40-14:48	小倉 貴章	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
14:48-14:56	石田 真吾	MOE 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 MRI 造影剤の合成と評価
14:56-15:10	河合 文雄	厚労科研報告書について
15:10-15:42	(休憩)	(休憩)
15:42-15:47	都築 靖隆	糖デンドリマー型 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
15:47-15:52	山岡 真弓	新規リン糖誘導体と MRI 造影剤の複合医用材料と生理活性評価
15:52-16:00	共同研究の先生方	

場所: 静岡大学イノベーション共同研究センター 2階 218室

#### 参加者(敬称略)

静岡大学 山下光司, 戸田三津夫, 田中康隆, 木村元彦

東京慈恵会医科大学 岡野孝

浜松医科大学 藤江三千男

浜松工業技術センター 本間信行

福井大学 三好憲雄

山下研究室 Uma Ravi Shankar, Kambam Srinivasulu, 杉山雅紀, 安部聡一郎,



平成21年度第2回厚生労働科学研究会

Mitsuji Yamashita

2010年2月15日(月)

静岡大学浜松キャンパスIJRC

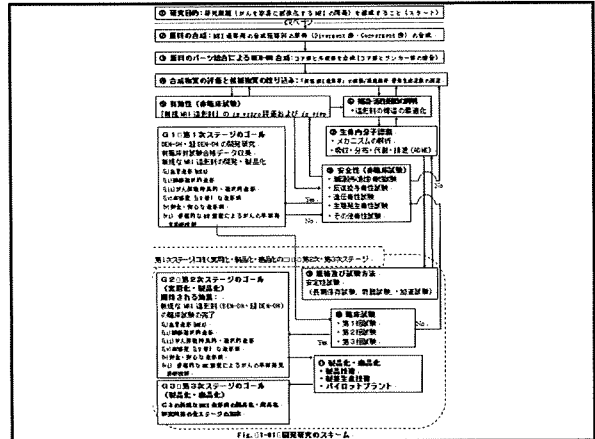


Table 1-1-1 MRI Contrast Agent Research Molecular Design Categories

Category	1-1	1-2	1-3	1-4	2	3-1	3-2	4-a	4-b
i. Ring type	○	○	○	○	○	×	×	○	○
ii. Symmetry	○	○	×	×	○	○	×	○	○
iii. Chelation type	×	×	○	○	×	×	○	○	○
iv. Hydrolysis pathway	×	×	×	×	○	×	×	×	×
v. Substitution of the main chain	×	×	×	×	×	×	×	○	○

Legend:  
 ① Most emphasized MRI contrast agent (indicated by ○)  
 ② Next emphasized MRI contrast agent (indicated by ○)  
 ③ Third emphasized MRI contrast agent (indicated by ○)  
 ④ Others: (a) Substitution of the main chain with a substituent (indicated by ○)  
 (b) Hybridized MRI contrast agent (indicated by ○)

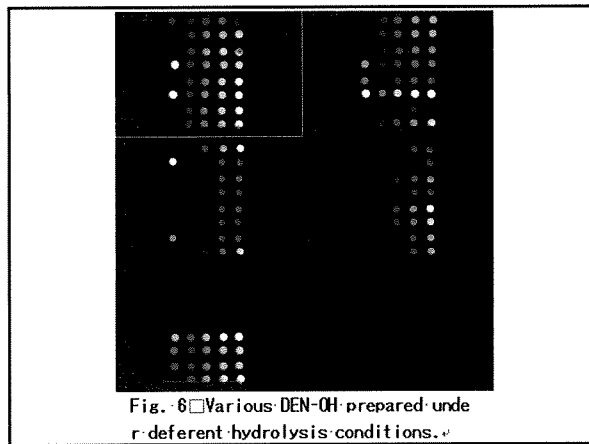
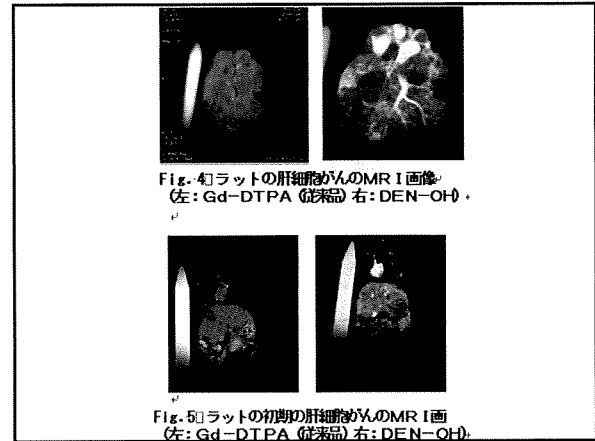


Table 2-1-01 Relaxivity of various Gd complexes in water (r<sub>1</sub>)

Entry	Compound No. & Abbreviation	r <sub>1</sub> [s <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> ] (37°C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	17a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.4
3	17b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	5.8
4	18 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(4OAc)(1OH)	5.9
5	19a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.3
6	19b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	5.8
7	20 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	8.1
8	21 Gd-DTPA-Phenylalanine	5.8
9	22 Gd-DTPA-Glycine	5.5
10	23 Gd-DTPA-Aspartic acid	5.4
11	24 Gd-DTPA-2-Aminophenol	4.8

Table 2-1-02 血清アルブミン溶液中における各 Gd 錯体の緩緩和率 ( $r_1$ )

Entry <sup>a</sup>	Compound No. & Abbreviation <sup>a</sup>	$r_1$ [ $s^{-1}mM^{-1}$ ] (37°C) <sup>a</sup>
1 <sup>a</sup>	Gd-DTPA (Magnevist) <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>
2 <sup>a</sup>	17a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>
3 <sup>a</sup>	17b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>
4 <sup>a</sup>	18 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(4OAc)(1OH) <sup>a</sup>	5.6 <sup>a</sup>
5 <sup>a</sup>	19a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) <sup>a</sup>	6.8 <sup>a</sup>
6 <sup>a</sup>	19b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) <sup>a</sup>	6.9 <sup>a</sup>
7 <sup>a</sup>	20 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) <sup>a</sup>	7.7 <sup>a</sup>
8 <sup>a</sup>	21 Gd-DTPA-Phenylalanine <sup>a</sup>	11.0 <sup>a</sup>
9 <sup>a</sup>	22 Gd-DTPA-Glycine <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>
10 <sup>a</sup>	23 Gd-DTPA-Aspartic acid <sup>a</sup>	10.4 <sup>a</sup>
11 <sup>a</sup>	24 Gd-DTPA-2-Aminophenol <sup>a</sup>	6.2 <sup>a</sup>

### 2-1-2-6 合成したGd錯体のin vivo評価

2-5からin vitroにおいて合成したGd錯体は現在臨床に用いられているGd-DTPA (Magnevist) よりも造影剤として高機能であることが示唆された。現段階において合成したGd錯体の実用性を評価するためにラットを用いたin vivo評価を行なった。

3.0T超伝導磁気共鳴画像撮影装置Signa 3.0Tを用いてMR画像を撮像した。in vivo評価においてもin vitro評価と同様にGd-DTPA (Magnevist) をスタンダードとした (Table 2-1-01, 02)。in vivo評価にはGd錯体はin vitro評価において高い緩和率を示したGd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) 20 と基本骨格が同じであるために比較が容易なGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) 19 を用いた (Table 2-1-01, 02)。

### 2-1-2-6 合成したGd錯体のin vivo評価

in vivo評価にはGd錯体はin vitro評価において高い緩和率を示したGd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) 20 と基本骨格が同じであるために比較が容易なGd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) 19 を用いた (Table 2-1-01, 02)。Gd-DTPA, Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) 19, Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) 20 はそれぞれ0.1 mmol/kg, 0.05 mmol/kg, 0.05 mmol/kgとなるように生理食塩水を用いて造影剤の濃度を調整した。

in vivo評価からGd錯体 19 および 20 は共にGd-DTPAの濃度の半分でありながらもより強いコントラストを示し、中でもGd錯体 20 は非常に強いコントラストを示した。この結果は2-1-2-5-4で述べたGd-DTPAと比較して低濃度での使用が可能という仮説を支持するものであり、臨床の現場で求められている条件を満たす新規MRI造影剤としてのポテンシャルを有していると言える。

### 2-1-2-6 合成したGd錯体のin vivo評価

また、この結果は糖とDTPAを結ぶスペーサーの長さがGd錯体 20の高い緩和率に影響を及ぼしているのではないかと、この仮説も指示するものであり、これを確認するためにさらにスペーサーを長くしたGd-DTPA糖錯体の合成は必要不可欠だと考えられる。

### 前回研究会以降～現在及び今後の予定

前回研究会 (2009年9月10日 (木))  
大学サイエンスフェスタ (東京国立科学博物館) 9月20日～29日 (?)  
In vitro評価 (2010年2月10日 (水))

第2回研究会 (2月15日)  
糖及びその他の官能基の複合化  
MOEの活用  
NHSの導入  
リン糖との複合化  
その他

今後の予定  
安全性試験 (2月末まで)  
医療機器センター研究成果報告会 (2月23日)  
厚労科研報告書 (原稿締め切り: 3月?)

15:15-16:15 (Session III; Nanotechnology/Polymer)

### 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 phosphorus 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

Mitsuji Yamashita

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

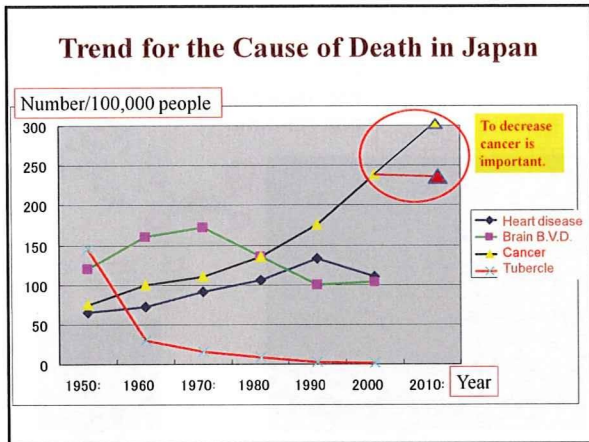
tcmyama@ipc.shizuoka.ac.jp

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

February 5, 2010; Hamamatsu Meitetsu Hotel;  
Hamamatsu, Japan

<http://www.hamamatsu-navi.jp/shiro/index.html>





### Objective

- R & D of Materials for Early Stage Finding and Curing Cancer (**diagnosis and therapy**)
- Innovation on Medicinal Materials

### Contents

- 1) Sugar Ball Dendritic MRI Contrast Agents (for Finding Cancer at Early Stage)
- 2) Novel Anti-Cancer Agents of Phosha Sugars or Phosphorus Heterocycles (for Curing Tumors)

### Outline of MRI

Equipment of MRI

Mechanism of MR Imaging

#### Core Ligands

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

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

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

### Molecular Design

**Objective:** Introduction of sugar(s) to add (i)-(iii) characters to Gd-DTPA complex

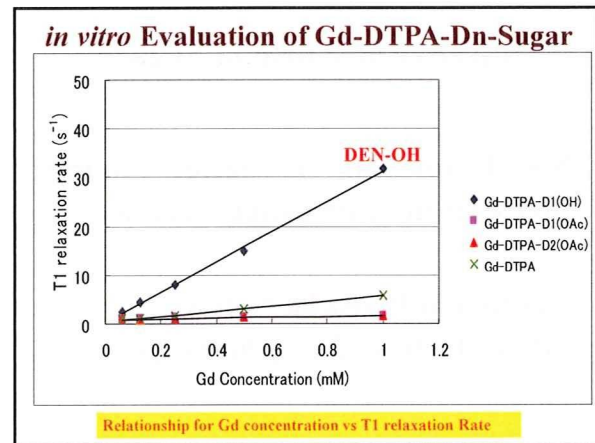
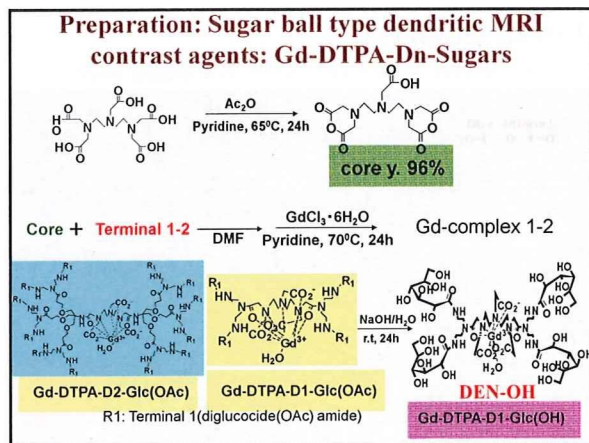
- Larger molecule with blood vessel pool character
- Molecular recognition by sugar(s)
- Clearer description for MRI by larger relaxivity of the contrast agent derived

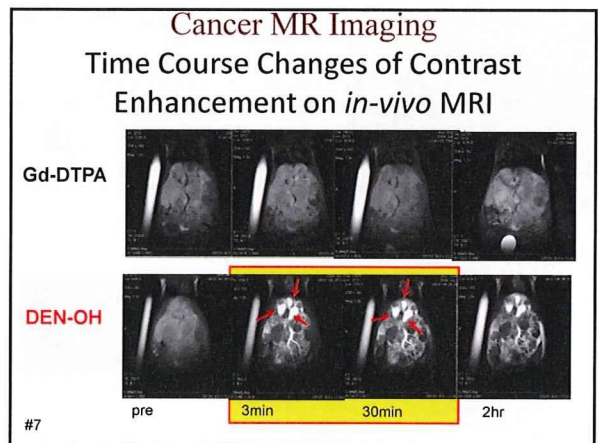
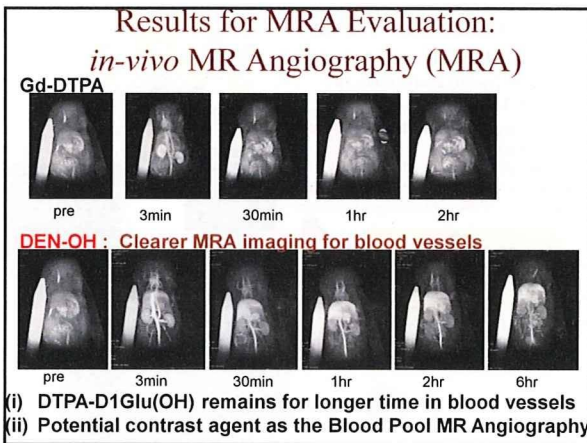
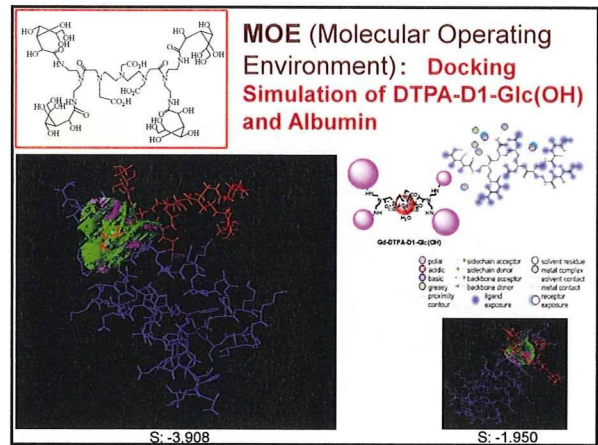
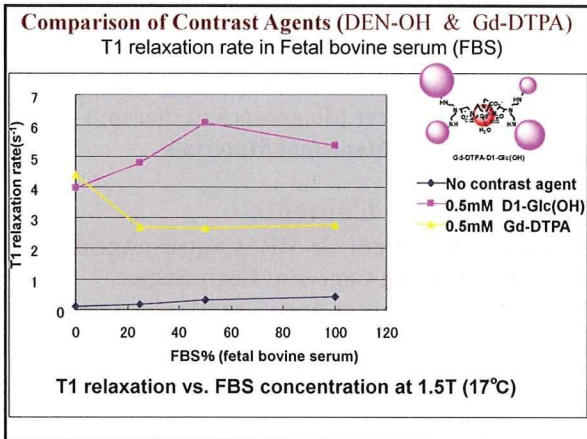
**Gd-DTPA (Magnevist)**

**Gd-DTPA-D1-Sugar** **DEN-OH**

**Gd-DTPA-D2-Sugar**

:Sugar

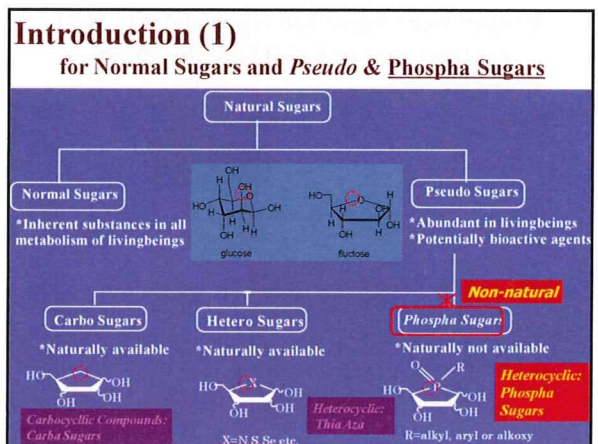




## Objective of Phospha Sugars

### Novel Molecular Targeting Chemotherapeutic Anti-cancer Agents

- \* Anhydro *Phospha* Sugars
- \* Dehydrohalo *Phospha* Sugars





## Examples of Pseudo Sugar Nucleosides

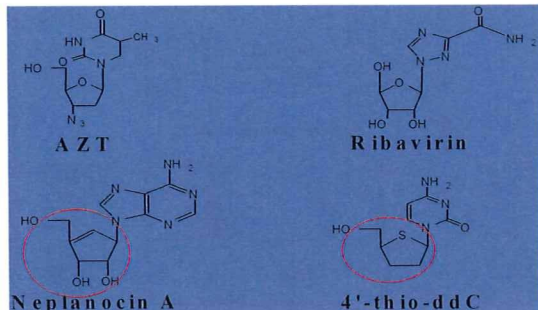


Figure. Structures of **antitumor drugs** or **antiviral active substances** related to nucleosides and **pseudo sugar nucleosides**.

## Introduction (2)

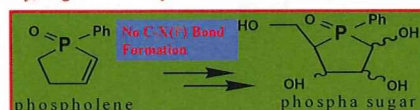
for Phospha Sugar (Pseudo Sugar) Preparation

- **Syntheses of phospha sugar derivatives by using sugars and by using 1-phenyl-2-phospholenes.**

**Previous Approach (from Sugars):** Longer synthetic pathway, Low overall yield



**This Approach (from Phospholenes):** Shorter synthetic pathway, Higher overall yield



## Examples of Biologically Active P-C Bond Compounds

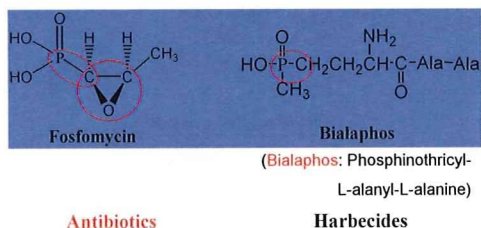
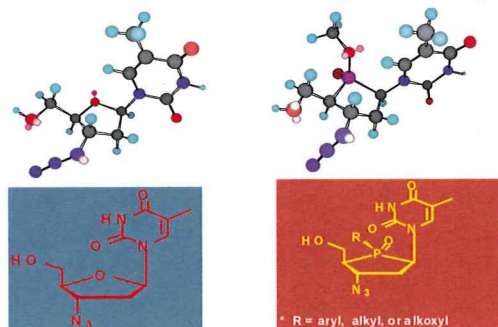


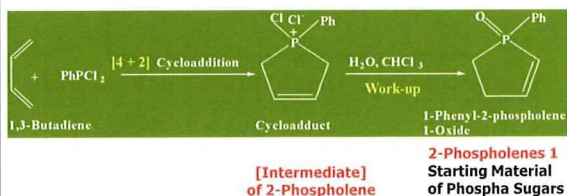
Figure. Biologically active compounds with P-C compounds.

## Nucleosides (AZT and the Phosphors Analogue)



**Phospha sugars**, being the class of hetero sugars, possessing a **phosphorus atom in the hemiacetal ring** instead of an **oxygen atom** of normal sugars may have bioactivity.

## Synthesis of 2-Phospholene 1-Oxides



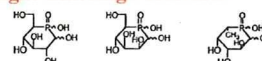
**McCormac Reaction:** preparation of 2- or 3-phospholenes from dienes and P(III) halides

When P(III) bromides were used, 3-phospholene adducts were formed instead of 2-phospholenes from P(III) chlorides such as phenylphosphorous dichloride and phosphorus trichloride.

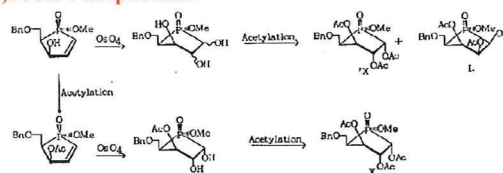
Quin, L. D.; Gratz, J. P.; Barket, T. P. *J. Org. Chem.* 1968, 33, 1034-1041.

## Previous Works

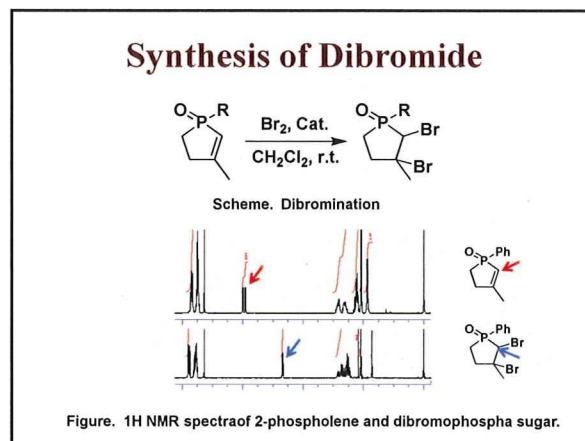
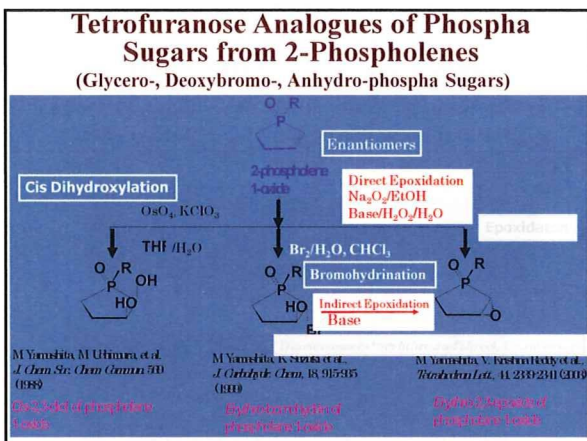
### 1) From Sugar Starting Materials



### 2) From Phospholenes



Pentoses: Ribose, Arabinose, Xylose, Lyxose



### Synthesis of dibromide with catalyst

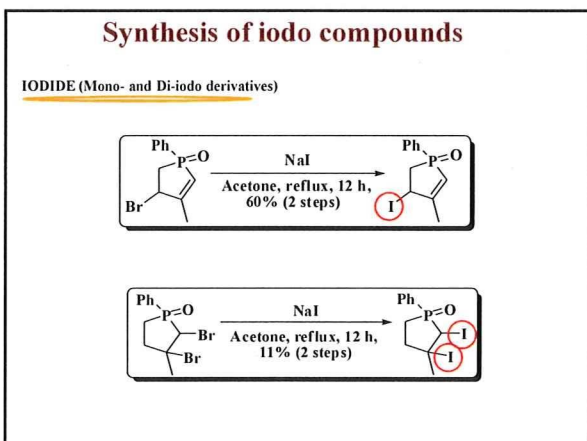
Table. Dibromination

Compound	R	Catalyst	eq.	Time [h]	Yield [%]	
					Column chromatography	Recrystal
10	Ph	MnO <sub>2</sub>	2	8	78	-
10	Ph	MnBr <sub>2</sub>	2	12	-	(24)
10	Ph	MnBr <sub>2</sub>	1	12	92	(16)
10	Ph	MnBr <sub>2</sub>	0.5	12	94	-
11	OMe	MnO <sub>2</sub>	2	16	64	-
12	<i>m</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	MnO <sub>2</sub>	2	16	65	-
12	<i>m</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub>	MnBr <sub>2</sub>	1	12	97	-
13	<i>m</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br	MnO <sub>2</sub>	2	16	65	-
13	<i>m</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br	MnBr <sub>2</sub>	1	12	73	-
14	<i>m</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CN	MnO <sub>2</sub>	2	16	62	-
15	<i>p</i> -C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Br	MnBr <sub>2</sub>	1	12	84	-

### Synthesis of mono-halo compounds

Table. Mono-halo compounds.

R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	yield
H	H	Br	26%
H	H	Cl	26%
CH <sub>3</sub>	H	Br	65%
CH <sub>3</sub>	H	Cl	30%
CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	Br	68%
CH <sub>3</sub>	NO <sub>2</sub>	Cl	33%



### Synthesis of tribromo compounds

### Synthesis of 3,5-disubstituted compounds

Table. 3,5-disubstituted compounds.

Reagent	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	X	Yield (crude)
<i>n</i> -BuLi	CHO	CH <sub>3</sub>	DMF	32%
LDA	CHO	CH <sub>3</sub>	DMF	39%
<i>n</i> -BuLi	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> I	50%
LDA	H	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	CH <sub>3</sub> I	37%

