

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390015
 研究課題名(和文) サイクロトロンを必要としないPET用分子イメージング薬剤製造システムの構築
 研究課題名(英文) Development of production-system of PET imaging agents without cyclotron.
 研究代表者
 中山 守雄 (NAKAYAMA MORIO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：60164373

研究成果の概要：

PET (positron emission tomography) による画像診断は、短半減期放射性核種を使用するため、サイクロトロン施設の併設を必用とする。我々は、サイクロトロンを使わない ^{68}Ga の製法である $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ジェネレータシステムの構築を目的に、物理的構造特性の異なる有機高分子母体に、N-メチルグルカミン(MG)を導入した ^{68}Ge 吸着剤を合成し、高分子母体がジェネレータの性能に与える影響と、ジェネレータから得られた ^{68}Ga のPET用薬剤調製への適用について検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

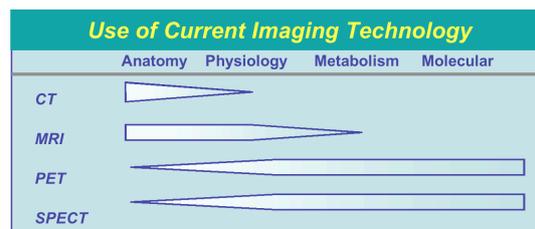
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：ジェネレータ、ガリウム、放射性薬剤、PET、分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

右図は、現在の画像診断技術の特徴を示したものである。なかでも、positron emission tomography (PET) は、ポジトロン(β^+)放出核種によって標識された生理活性物質等を、生体に投与することにより、分子レベルでの生体機能画像を提供できるという他の画像診断法にない大きな特徴を有している。ただ、 β^+ 放出核種は極めて短寿命で、PET撮像装置と同一施設内にサイクロトロンを設置する必要があるため、臨床応用等への広範な利用は、つい最近まで制約を受けてきた。しかし、2002年のPET検査の保健適用をきっかけとして、



PETの普及が、急速な勢いで進みつつある今、サイクロトロンを必要としない β^+ 放出核種の製法としての $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ ジェネレータによる ^{68}Ga 標識画像診断薬剤製造システムの構築は、将来的にPETの臨床応用をさらに発展させるための非常に重要な支援技

術の一つと考えられる。

2. 研究の目的

サイクロトロンを必要としない β^+ 放出核種の製法としての臨床用 ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータの構築を主軸として、 ^{68}Ga 標識 PET 用標識画像診断薬剤製造システムの構築を進めることを目的としている。

3. 研究の方法

Glycidyl methacrylate (GMA) 及び Ethylene glycol dimethacrylate (EG) に、Methyl *iso*-butyl ketone (MIBK, 多孔化剤) を混合し、高分子母体 (PGMA-EG, 粒子径 0.25 ~ 0.50 mm) を合成した。さらに、*N*-メチルグルカミン (MG) を付加させ PGMA-EG-MG へ誘導した。比表面積は、 N_2 ガス吸着法により測定した。非放射性 Ge の吸着はフェニルフルオロン法で、 ^{68}Ge の吸脱着率は ^{68}Ga の放射活性から算出した。PGMA-EG-MG を充てんしたカラム (8 × 20 mm) に ^{68}Ge 溶液を通液して吸着させ、ジェネレータを作製した。放射平衡到達後、溶離剤を通液して ^{68}Ga のみを溶出した。得られた ^{68}Ga 溶液に 1, 4, 7, 10-tetraazacyclododecane-*N, N', N'', N'''*-tetraacetic acid-D-Phe¹-Tyr³-octreotide (DOTATOC) 溶液を混合し、95°C で 20 分間反応後、放射能及び紫外検出器を連結装着した逆相高速液体クロマトグラフィー (RPLC) で分析した。

4. 研究成果

(1) Ge 吸着剤としての PGMA-EG-MG の評価

ジェネレータによる放射性核種の製造は、長半減期親核種-短半減期娘核種の組み合わせで放射平衡が成立する場合に可能となる。 ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータは、半減期 271 日の長寿命核種である ^{68}Ge とその放射崩壊によって産生される半減期 68 分の短寿命 β^+ 放出核種である ^{68}Ga が、理想的な放射平衡の関係にある。従って、 ^{68}Ge のみを吸着した吸着剤から、 ^{68}Ge の壊変によって生成した ^{68}Ga のみを溶離できれば、簡単な操作で β^+ 放出核種を製造するための、いわゆるジェネレータが完成する。当然、多くの研究者によって、これまでも ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータシステムの開発が試みられてきたが、製品化されたものは無機系吸着剤によるものだけである。市販されているジェネレータは、担体に酸化チタンを用い、 ^{68}Ga の溶離剤には HCl が使用されている。従って、標識化合物を調製する際に HCl の中和操作が必要であることや、担体からの金属イオンの混入などの問題を抱えている。さらに、臨床応用するためには、ジェネレータの効率化、小型化を達成する必要がある、その成否を決める要は、 ^{68}Ge の吸着剤にあるといえる。すなわち、吸着剤が Ge に対して高

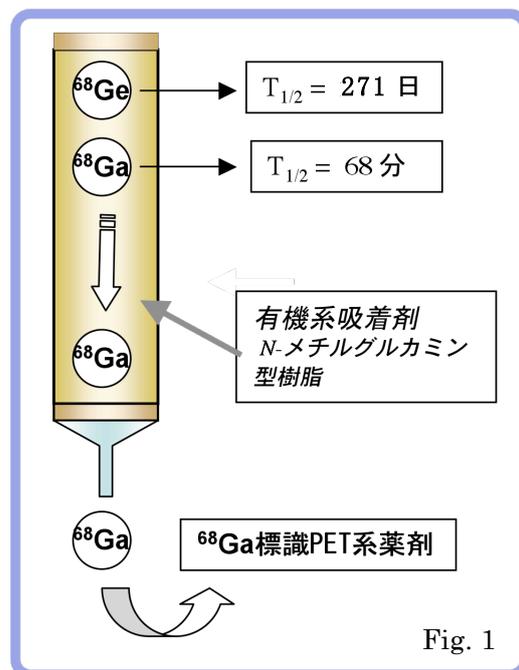
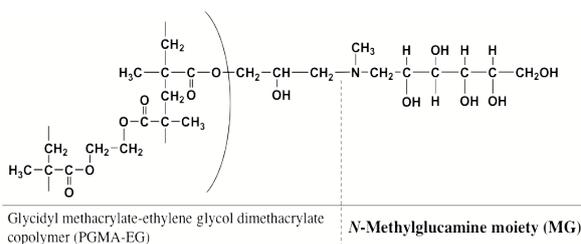


Fig. 1



い親和性を有し、一方 Ga に対しては低い親和性を有することが不可欠であり、従来の無機系吸着剤ではそれが達成し得ない。当研究室では、 $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ジェネレータ開発のための ^{68}Ge の吸着剤として MG を有する有機系吸着剤が有望であることを既に明らかにし、市販の MG 型樹脂 (CRB-02, 三菱化成) が、ジェネレータの担体としての ^{68}Ge 吸着および ^{68}Ga の脱着機能を示すことを報告している。本研究では、まず、架橋剤および多孔化剤の添加量の変化による物理的構造の異なる高分子母体 PGMA-EG を合成し、Ge 吸着部位として MG を導入した PGMA-EG-MG が、Ge 吸着性能に与える影響について検討した。

① 物理的構造の異なる高分子母体 (PGMA-EG) の合成

本研究では、グリシジルメタクリレート (GMA) と架橋性モノマーであるエチレングリコールジメタクリレート (EG) の共重合体 (PGMA-EG) を高分子母体として選択した。CRB-02 が疎水性のスチレン-ジビニルベンゼン共重合体を高分子母体としているのに対し、PGMA-EG は親水性の高い高分子母体であり、反応性の高いエポキシ基を有しているため、官能基の導入も容易である。また、モノマーの混合比や多孔化

剤の添加量を変化させることで、多様な物理的構造を有する高分子母体を容易に合成することができる。そこで、架橋剤および多孔化剤の添加量の変化による物理的構造の異なる高分子母体 PGMA-EG を 6 種類合成した。

合成は、三頸球状のセパラブルフラスコに精製水 500 ml, 1%ゼラチン水溶液 20 ml, および硫酸ナトリウム 6 g を溶解させ、分散溶媒とする懸濁重合により行った。一方、GMA, EG および MIBK を Table 1 に示すような割合で混合し、モノマー相とした。このモノマー相に 0.5 g の AIBN を添加し、溶解した。このモノマー相を分散溶媒中に分散させ、800 rpm で攪拌しながら、1 時間室温で放置した。1 時間放置後、10 分毎に 10°C 間隔で 30 分を要して 50°C まで液温を上昇させ、そのまま 50°C を 30 分間維持した。次に、10 分毎に 5°C 間隔で 50 分を要して 75°C まで液温を上昇させ、そのまま 75°C を 40 分間維持した。さらに、20 分毎に 5°C 間隔で 1 時間を要して液温を 90°C にまで上昇させ、そのまま 90°C を 1 時間 30 分維持させ、重合反応を完了させた。得られた重合体 PGMA-EG を温水 (40-50°C) で三回、エタノールで二回、最後にアセトンで二回洗浄後、風乾させた。得られた PGMA-EG 樹脂を篩過し、粒子径 0.25-0.50 mm の PGMA-EG 樹脂を分取した。

Table 1. PGMA-EG の重合条件

	GMA	EG	MIBK
	(ml)		
PGMA-EG30 (150)	35	15	75
PGMA-EG40 (100)	30	20	50
PGMA-EG40 (150)	30	20	75
PGMA-EG50 (50)	25	25	25
PGMA-EG50 (100)	25	25	50
PGMA-EG50 (150)	25	25	75

PGMA-EG の比表面積を Table 2 に示す。PGMA-EG の比表面積は、多孔化剤の混合割合を増加させると増大し、その増加傾向は、架橋度の高い PGMA-EG において顕著であった。

Table 2. PGMA-EG の比表面積

	Specific surface area (m ² /g)
PGMA-EG30 (150)	43.0
PGMA-EG40 (100)	44.0
PGMA-EG40 (150)	71.7
PGMA-EG50 (50)	16.2
PGMA-EG50 (100)	58.8
PGMA-EG50 (150)	101.1

②PGMA-EG への MG の導入

上記の PGMA-EG を DMSO に浸潤させて膨潤させた後、MG を添加し、80°C で 4 時間反応させ、Ge 吸着部位である MG を導入し、PGMA-EG-MG を合成した。

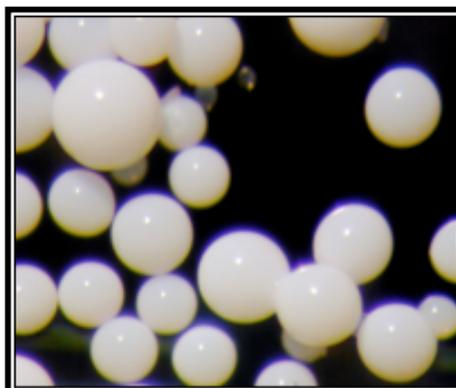
一般に、架橋剤の割合が低いと、ポリマーの物理的強度が弱くなり、膨潤、収縮が大きくなる。吸着剤を密閉カラムに充てんしたジェネレータに、水系溶媒を通液して ⁶⁸Ge を吸着、そして ⁶⁸Ga を脱離させるため、溶媒中での吸着剤の容積変化が小さいことが望ましい。そこで、吸着剤の膨潤性を検討した結果を Table 3 に示す。乾燥容積と湿潤容積の比で表される膨潤度は、PGMA-EG-MG において、1.10 から 1.20 の範囲であった。架橋度を増大させると、膨潤度は低下し、架橋度が最も高い PGMA-EG 50 (150)-MG が膨潤度 1.10 で最小の値を示した。

Table 3. PGMA-EG-MG の膨潤度

	V _d ^{a)} (ml/g)	V _w ^{b)} (ml/g)	膨潤度 V _d /V _w
PGMA-EG30 (150)	2.09	2.51	1.20
PGMA-EG40 (100)	1.82	2.16	1.19
PGMA-EG40 (150)	2.28	2.68	1.18
PGMA-EG50 (50)	1.65	1.84	1.12
PGMA-EG50 (100)	2.07	2.29	1.11
PGMA-EG50 (150)	2.49	2.75	1.10

V_d: 乾燥容積, V_w: 湿潤容積

下に、PGMA-EG50 (150)-MG の実体顕微鏡写真を示す。多孔化剤の添加割合を増加させると、ポリマー粒子の白色度は増大し、透明度は低下した。これは粒子内での光の散乱に基づく現象であり、細孔構造の形成を示す一つの結果であると考えられた。



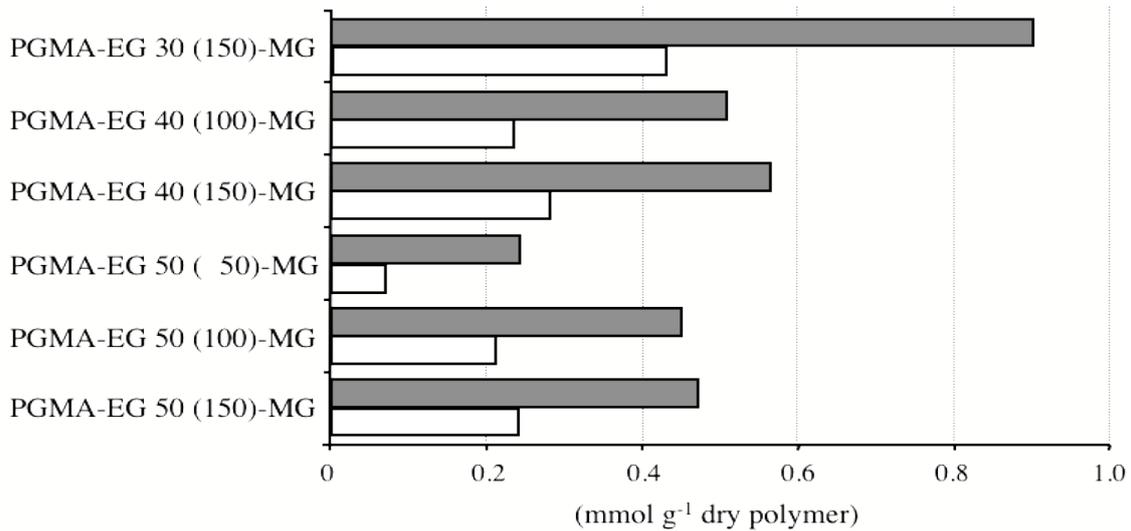


Fig. 2. PGMA-EG-MG の窒素含有量と Ge 吸着量： ■ 窒素含有量 □ Ge 吸着量

MG 導入量の指標として、PGMA-EG-MG の窒素含有量および Ge 吸着容量を Fig. 2 に示した。PGMA-EG 50 (100)-MG や PGMA-EG 50 (150)-MG のように高い架橋度でも、良好に MG が導入された。通常、架橋度が高くなるにつれて、高分子母体 PGMA-EG の化学的編み目構造が密になるため、MG の導入量は減少すると考えられる。しかし、架橋度を増大させた場合でも、比表面積を増大させることで、MG の導入量が改善されたといえる。

臨床用の ⁶⁸Ge/⁶⁸Ga ジェネレータでは、吸着剤に、およそ 740 MBq の ⁶⁸Ge をジェネレータに負荷することを想定している。この 740 MBq という放射能を化学量に換算すると 4.15×10^{-8} mol と、極めて微量であり、いずれの PGMA-EG-MG も、臨床で利用されるような ⁶⁸Ge の負荷に対しても十分な Ge 吸着容量 (Fig. 2) を有している。

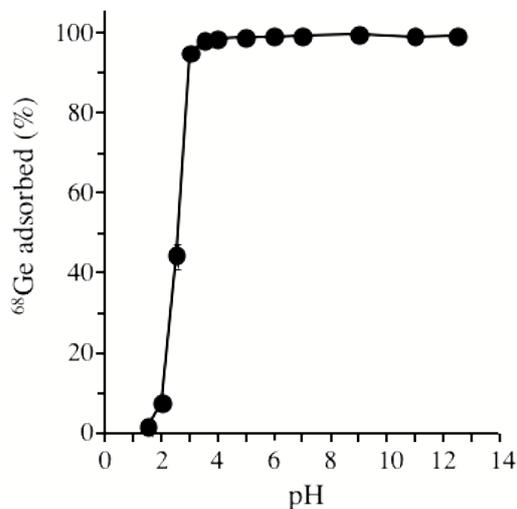


Fig. 3. PGMA-EG-MG への Ge 吸着に及ぼす pH の影響。

③ Ge 吸着挙動の検討

⁶⁸Ge 溶液の pH と吸着率との関係を Fig. 3 に示す。⁶⁸Ge 溶液は 0.01 M リン酸緩衝液及び塩酸あるいは水酸化ナトリウムを用いて pH を調整した。⁶⁸Ge は pH 5 以上ではほぼ 100% 吸着することが明らかとなった。この結果は Ge の存在状態(イオン形)に依存しているものと考えられる。すなわち、Ge は強酸性域では陽イオン(Ge⁴⁺)として存在するが、弱酸性から中性領域ではゲルマニウム酸 Ge(OH)₄ として溶存する。つまり Ge(OH)₄ のイオン形で存在する pH において高い吸着性を示すことが確認された。

PGMA-EG-MG に Ge 溶液を添加して接触振盪し、Ge の吸着速度について検討した。架橋度を一定にし、多孔化剤の添加量を増加させ多孔化度を増大させる (Fig. 4-A) と、Ge の吸着速度は増大した。通常 PGMA-EG 50 (150)-MG のように架橋度の高いポリマーでは、物理的編み目構造が密になるため、高分子母体内への Ge の拡散が遅くなり Ge 吸着速度は小さくなると考えられるが、多孔化したことで架橋度が低い PGMA-EG 30 (150)-MG と同等の迅速な Ge の吸着挙動を示した (Fig. 4-B)。

さらに、最も迅速な Ge の吸着挙動を示した PGMA-EG 50 (150)-MG と市販の CRB-02 の吸着速度を、放射性の ⁶⁸Ge をトレーサとして用いる吸着実験によって比較した。PGMA-EG 50 (150)-MG は、非放射性の Ge を用いて検討した場合と同様に、迅速な ⁶⁸Ge の吸着を示した。さらに、キャリアの有無に関わらず、迅速な ⁶⁸Ge 吸着が認められた。なお、多孔性の樹脂である CRB-02 も、迅速な ⁶⁸Ge 吸着を示し、バッチ法による検討では、⁶⁸Ge の吸着速度に大きな差異は認められなかった。

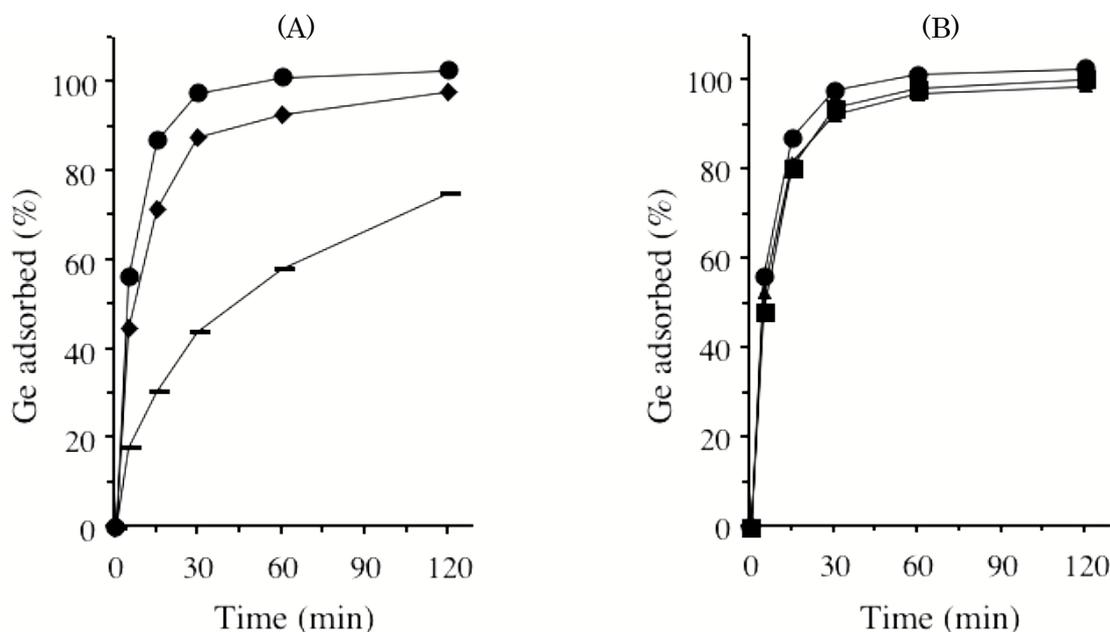


Fig. 4. 多孔化度(A)及び架橋度の PGMA-EG-MG 上への Ge 吸着速度に与える影響。

Initial pH: 7, Initial Ge concentration: 25 μ M, polymer: 25 mg;

— PGMA-EG50(50)-MG, ◆ PGMA-EG50(100)-MG, ● PGMA-EG 50(150)-MG,

▲ PGMA-EG 30(150)-MG, ■ PGMA-EG 40(150)-MG

(2) PGMA-EG-MG を用いた ^{68}Ge - ^{68}Ga ジェネレータの構築とその評価

そこで、この PGMA-EG 50 (150)-MG を充てんしたカラムに、 ^{68}Ge 溶液を通液してジェネレータを作製した。カラムに添加した ^{68}Ge のほぼ 100%がカラムに保持された。 ^{68}Ge と ^{68}Ga の放射平衡に到達後、0.1 M Na_3 citrate 溶液を溶離剤とし、ジェネレータからの流出液を 1 ml ずつ分画した。各分画の ^{68}Ga 及び ^{68}Ge の放射活性を測定すると、ジェネレータ内の ^{68}Ga の 56.9 \pm 1.9%が第一分画に溶出した。また、 ^{68}Ge の漏出は、 $4.9 \times 10^{-4}\%$ 以下であり、ジェネレータに求められる ^{68}Ga の選択的かつ迅速な溶離が達成された。0.1 M Na_3 citrate 溶液で溶出させた ^{68}Ga を用いて、引き続き DOTATOC の標識を行った。DOTATOC はソマトスタチン受容体に対して選択的結合性を示し、腫瘍診断を目的とした薬剤として使用される。DOTATOC の ^{68}Ga 標識では、ジェネレータから溶出した溶液の一定量と DOTATOC を混合し、配位子交換を利用した標識後のサンプルを RPLC で分析した。標識後のサンプルの放射活性は、ジェネレータから溶出した Ga citrate の保持時間 (1.5 min) とは異なる保持時間 (8 min) に放射活性のピークが観察された。さらに、MALDI-TOF 質量スペクトルにより確認した非放射性 Ga で標識された DOTATOC を同条件下で分析すると、220 nm における UV 吸収ピークは、放射活性のピークと同様の保持時間 (8 min) に観察された。これらのことは、 ^{68}Ga による DOTATOC 標識体

が生成したことを示している。

以上のように、DOTATOC の ^{68}Ga 標識体の生成を確認したことから、PGMA-EG-MG を吸着剤として用いたジェネレータは、 ^{68}Ga 標識した PET 用薬剤の調製に適用できることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Y. Maya, M. Ono, H. Watanabe, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama, Novel Radioiodinated Aurones as probes for SPECT imaging of β -amyloid plaques in the brain, *Bioconjugate Chemistry*, 20, 95-101, 2009, 査読有
- ② M. Ono, M. Haratake, H. Saji, M. Nakayama, Development of novel β -amyloid probes based on 3,5-diphenyl-1,2,4-oxadiazole, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6867-6872, 2008, 査読有
- ③ M. Ono, Y. Maya, M. Haratake, K. Ito, H. Mori, M. Nakayama, Aurones serve as probes of β -amyloid plaques in Alzheimer's disease, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 361, 116-121, 2007, 査読有
- ④ M. Ono, M. Hori, M. Haratake, T. Tomiyama, H. Mor, M. Nakayama, Structure-activity relationship of chalcones

and related derivatives as ligands for detecting of β -amyloid plaques in the brain, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 6388-6396, 2007, 査読有

- ⑤ M. Ono, M. Haratake, H. Mori, M. Nakayama, Novel chalcones as probes for *in vivo* imaging of β -amyloid plaques in Alzheimer's brains, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 15, 6802-6809, 2007, 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 畠中瑛介、原武 衛、小野正博、中山守雄、五十嵐 隆、*N*-メチルグルカミン型樹脂を用いる $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ ジェネレータの開発と応用、第 47 回日本核医学会学術総会、2007 年 11 月 4 日、仙台市
- ② 原武 衛、畠中瑛介、中山守雄 $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ ジェネレータ製造のための新規グルカミン型樹脂の開発、日本分析化学会第 57 年会、2008 年 9 月 11 日、福岡市

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：Ge 吸着剤、
発明者：中山守雄、原武 衛、五十嵐 隆
権利者：長崎大学、第一 RI
種類：特許権
番号：特願 2007-053504
出願年月日：2007 年 3 月 2 日
国内外の別：国内特許

名称：Ge 吸着剤、
発明者：中山守雄、原武 衛、五十嵐 隆
権利者：長崎大学、第一 RI
種類：特許権
番号：PTC/JP2008/53697
出願年月日：2008 年 2 月 29 日
国内外の別：国外特許

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 守雄 (NAKAYAMA MORIO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：60164373

(2) 研究分担者

原武 衛 (HARATAKE MAMORU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：40325668

(3) 連携研究者

小野 正博 (ONO MASAHIRO)
京都大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：80336180

(4) 連携研究者

荒野 泰 (ARANO YASUSHI)
千葉大学・大学院薬学研究院・教授
研究者番号：90151167

(4) 連携研究者

古嶋 昭博 (KOJIMA AKIHIRO)
熊本大学・生命資源研究支援センター・准教授
研究者番号：20161903