

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月15日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390343

研究課題名（和文） 血管内滞留型新規 X 線 CT 用造影剤の開発

研究課題名（英文） Development of novel CT contrast agents with long retention in the vessel

研究代表者

阪原 晴海（SAKAHARA HARUMI）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：10187031

研究成果の概要（和文）：組織の血管構築や虚血性変化、癌の血管新生を画像化するため、血管内滞留性の高い新規 X 線 CT 造影剤の開発を目的とした。造影効果を上げる元素としてヨウ素あるいは金を用いることとし、それらの担体として、血清アルブミンあるいは PEG 修飾 dendrimer を用いた。ヨウ素造影剤はそれぞれインビトロで一定の造影効果を示したが、インビボでは造影効果が得られなかった。金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer はインビボで市販のヨウ素造影剤と比較して長時間血管を造影できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to develop novel CT contrast agent with a longer retention in blood in order to visualize vascular structure in a target tissue or angiogenesis of tumor. For this purpose, we use iodine or gold as a contrast element and human serum albumin or dendrimer modified with PEG as a carrier compound. Iodine modified agent showed a less enhancement effect in vivo because of its instability in blood. Gold modified agent showed a longer enhancement effect in vivo in comparison with a commercially available iodine contrast agent.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	7,700,000	2,310,000	10,010,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：X線、造影剤

1. 研究開始当初の背景

X線 CT は形態学的な診断技術として確

立されているが、質的診断に造影剤の使用は欠かせない。現在多用されている造影剤は血管内に投与された後速やかに血管内から細胞外液に拡散し、血管内から消失する。マルチスライス CT を用いれば、造影剤が血管内に留まっているタイミングで血管像を撮影できるが、ファーストパスで血管外に漏出するため、脳以外での血流測定や血液量の測定は困難である。血管内滞留性の高い造影剤を用いれば、局所の血流測定が容易となり、末梢血管まで高い造影剤濃度が維持されることにより組織の血管構築や虚血性変化、癌の血管新生を明瞭に画像化することができると考えられる。

本学には動物用 PET/SPECT/CT 装置が設置されており、小動物の造影 X 線 CT が行える。しかし、従来の X 線造影剤では、早い血管内からの消失のため十分な造影効果が得られないという問題に直面し、本研究課題の着想に至った。応募者は長年、核医学イメージング製剤の研究に従事し、多くのタンパク質の放射性同位元素標識を行ってきた。また最近では糖鎖で修飾したガドリニウムキレート製剤が MRI 用の血液プール造影剤として有望であることを明らかにしてきた。今回、これらの研究で得た技術、知見を、X 線 CT 造影剤の開発研究に応用する。

X 線 CT 用血液プール造影剤が必要とする条件には、初期の分布容積が血漿量に近いこと、血管内での半減期が長いこと、十分な量のヨウ素原子を含有していること、などが挙げられる。人血清アルブミン (HAS) は血管外に流出せず、血管内に長く留まる性質を有している。ヨウ素原子を直接アルブミンに結合させるのではなく、ヨウ素原子を 4 つ有している甲状腺ホルモン T4 を利用すれば結合させるヨウ素原子を増やすことができる。HAS はリジン残基を 59 個有していることから、活性エステル化した T4 と多数結合することが可能であり、結局のところアルブミン 1 分子に対して非常に多くのヨウ素原子を結合することができる。その結果、従来の造影剤よりも遙かに高い一分子当たりの造影能を有することが期待される。

X 線用血液プール製剤としてはエマルジョン、ミセル、リポソームなどの粒子を利用するものや、ヨード化合物のポリマーなどが海外で研究されてきたが、いまだ実用化には至っていない。最近では、Fu らにより、 dendrimer をベースとした CT 造影剤が報告されており、1 分子当たりの高いヨウ素含有量が達成されている (Bioconjugate Chem., 2006)。アルブミンを担体とした診断薬剤は、SPECT 用放射性診断の ^{99m}Tc -DTPA-HSA や MRI 用造影剤の albumin-Gd-DTPA などが報告されており、drug delivery system (DDS) に用いる基剤としての有用性は確

立されていると考えられる。しかしながら、CT 用造影剤として開発された例は報告されていない。CT 用造影剤は造影効果を発揮するために必要なヨウ素量が高く、これまでの造影剤では高い浸透圧が問題となっていた。本研究のように高い水溶性を有したまま一分子に多くのヨウ素原子を導入させて用いることができれば、非常にその有用性は高いものと考えられる。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究では副作用が少なく、適度に血中に長く留まり、高いコントラストが得られることを目的として、HSA に甲状腺ホルモン T4 をコンジュゲートさせた新規高分子造影剤を開発することを目的とした。そこで、HSA に何個の T4 が結合することができるか、また、反応に再現性があるのか検討する。また、合成した新規 HSA-T4 複合体の X 線 CT 造影剤としてのポテンシャルを正常モデルあるいは病態モデル動物を用いた *in vivo* 動物用 CT イメージング検討にて明らかにすることとした。さらに、病態モデル動物の *in vivo* イメージング研究において、PET あるいは SPECT などの核医学的手法を用いた画像と新規造影剤を用いた X 線 CT とのフュージョン画像を構築して、その相関性について明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1)HSA を母核とした甲状腺ホルモン T4 修飾造影剤の作成と CT 造影能評価: HSA に甲状腺ホルモン T4 をコンジュゲートさせた新規高分子造影剤 (図 1) を開発することとし、その合成検討を行った。すなわち、T4 を出発原料として、HSA の表面に多く存在するリジン残基 ϵ アミノ基に対して結合させることとした。次いで T4 を結合させた HSA が得られれば、これを用いて動物用 CT スキャナー (FLEX system, GMI, Northridge, USA) によってファントムを用いて評価した。

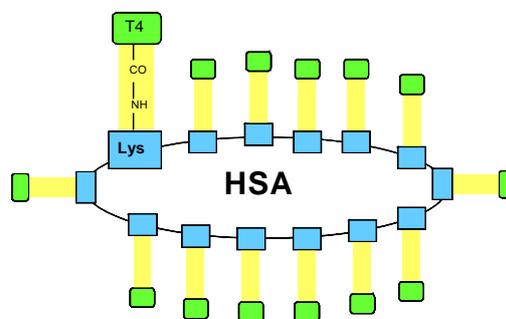


図 1 HSA を母核とする造影剤模式図

(2) PEG 修飾 dendriマー: また、HSA を母核とする造影剤開発以外に、ポリエチレングリコール (PEG) で修飾した球状高分子 (dendriマー) が高い血中滞留性と薬物保持能を有する機能性ナノ粒子であることが知られているので、これを用いた造影剤開発も同時に計画した。すなわち、PEG 修飾 dendriマーがヨウ素、金、ビスマスなどの輸送担体として期待されたので、ヨウ素あるいは金を保持させた PEG 修飾 dendriマーを作成した。

(2)①ヨウ素付加 PEG 修飾 dendriマーの作製と CT 造影能評価: 第7世代のポリアミドアミン (PAMAM) dendriマーの amino 末端 (末端数 512) に分子量 2kDa のポリエチレングリコール (PEG) モノメチル-4-ニトロフェニルカーボネートを結合させた。(図2) PEG の添加量は dendriマーに対して 51 当量とした。次に、ヨウ化メチルを過剰量

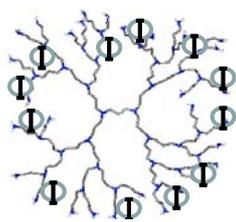


図2 dendriマーを母核とした造影剤模式図

に加え、50℃で2日間反応させることで、dendriマーにヨウ素を付加した。得られた化合物を動物用 CT スキャナーによって評価した。

(2)②金ナノ粒子内包 PEG

修飾 dendriマーの作製と CT 造影能評価: 第4世代の PAMAM dendriマーの amino 末端 (末端数 64) に PEG モノメチル-4-ニトロフェニルカーボネートを過剰量に加え、結合させた。次に、得られた dendriマーに対して 55 当量の塩化金酸を加え、続いて 275 当量の水素化ヨウ素ナトリウムを加えることで、金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendriマーを合成した。さらに、これを核として用い、さらに様々な量の塩化金酸とその 5 当量のアスコルビン酸を加えて dendriマー内で金ナノ粒子を成長させた。得られた金ナノ粒子は透過型電子顕微鏡 (TEM) によって解析した。CT 造影効果についても上記と同様の方法で解析した。さらに、ddY マウスに対して、成長させた金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendriマー (117mg Au/ml) を 200μL 尾静脈投与し、1,5,10,20,60 分後の CT イメージングを行った。これら全ての動物実験は浜松医科大学の動物委員会の承認を得ており、その規定に基づいて行った。

4. 研究成果

(1) HSA を母核とした甲状腺ホルモン T4 修飾造影剤の作成と CT 造影能評価: 甲状腺ホルモン T4 の amino アミノ基を常法に従

い、Boc 保護し、次いで、amino 酸カルボキシル基をタンパクとの結合部位として、サクシニミド化した。その後、Boc 保護基を塩酸性下除去して、サクシニミド化 T4 塩酸塩を得た。得られたサクシニミド化 T4 を dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解し、アルブミンの pH9.0 ホウ酸バッファー溶液に滴下し、アルブミンリジン残基の ε amino 基に結合させた。溶液を透析後、凍結乾燥して目的とする HSA-T4 を得た。T4 の平均結合数をモル吸光度法により測定したところ、合成ロット間により若干のばらつきはあるものの、アルブミン 1 分子当り、T4 が 30~40 個結合したアルブミン誘導体を得ることが出来た。得られた HSA-T4 結合体を用い、ファントムを用いて CT 造影剤としての有用性について検討したところ、母核であるアルブミンと比較して水溶性が大きく低下することが示されたが、既存造影剤の約 1/10 程度の造影能を有することが示された。

(2)①ヨウ素付加 PEG 修飾 dendriマーの合成と CT 造影効果: PAMAM dendriマーの末端の 10% に PEG が結合し、その他の末端一級アミンおよび内部三級アミンをヨウ化メチルで四級化した dendriマーを合成した。150mg I/ml に

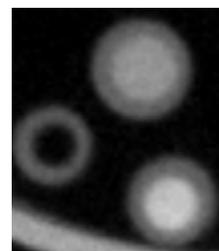


図3 ファントム実験の結果 イオパミロンに比較して 1/10 程度の造影効果が得られた。

なるように調整したヨウ素付加 PEG 修飾 dendriマーの水溶液は市販のヨウ素造影剤 (イオパミロン注、150mg I/ml) と同程度の CT 造影効果を示した。しかし、この dendriマーを PBS 中では限外濾過 (分画 10kDa) したところ、濾液からヨウ素が検出されたことから、生理的条件下においてはヨウ素が dendriマーから速やかに解離していることがわかった。以上よ

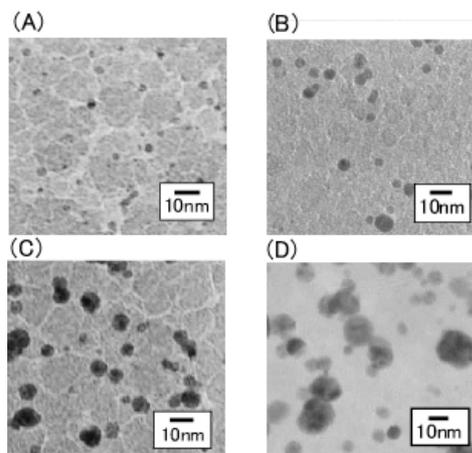


図4 金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendriマーの TEM 像。(A) 55 当量, (B) 165 当量, (C) 550 当量, (D) 1650 当量の塩化金酸を添加した。

り、生体内で安定な造影効果を得るためには、共有結合を介して dendrimer を母核とする場合であっても、dendrimer にヨウ素を付与することが必要であることが明らかとなった。

(2) ② 金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer の作製と CT による血管造影効果：PAMAM dendrimer の全ての末端に PEG が結合した dendrimer を合成した。これを鋳型として用い、その内部で金イオンを還元することで、2nm の金ナノ粒子を内包した PEG 修飾 dendrimer を調製した。次に、この金ナノ粒子を核として用い、その表面で金イオンを還元することによって、PEG 修飾 dendrimer 内で金ナノ粒子を大きく成長させた。加える塩化金酸の量を増加させるにつれて、金ナノ粒子の粒径が増大することがわかった (図 4)。最も大きく成長した金ナノ粒子の平均粒径は 8nm となった。また、塩化金酸の添加量を増加させるにつれて、CT 造影効果が向上することもわかった (図 5A)。さらに、同じモル濃度で比較すると、市販のイオパミロン注 (イオパミドール) よりも金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer の方が高い造影効果を示した (図 5B)。この金ナノ粒子造影剤をマウスに投与し、その CT 造影効果を検討したところ、動脈や心臓が造影されることがわかった。その経時変化を図 3 に示す。市販のイオパミロン注では 1 分後にわずかに血管が造影されるが、5 分後には消失したのに対して、本研究で作製した金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer では 5 分後でも造影効果が持続していることがわかった。

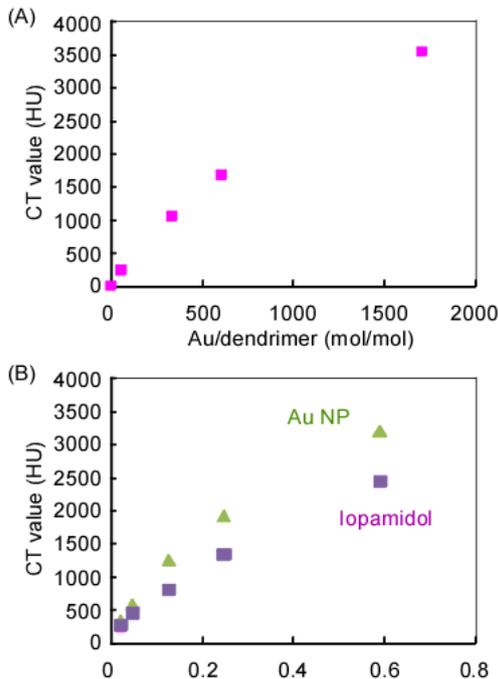


図 5 CT 造影効果。(A) 塩化金酸の添加量を増加させると、CT 造影効果が向上した。[PEG-dendrimer] = 0.35 mM。(B) イオパミロン注と最も大きい金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer の CT 値の比較。

一方、膀胱の CT 値を比較すると、市販のイオパミロン注では著しく上昇したのに対して、金ナノ粒子内包 dendrimer では大きな上昇はみられなかった (図 6)。このことか

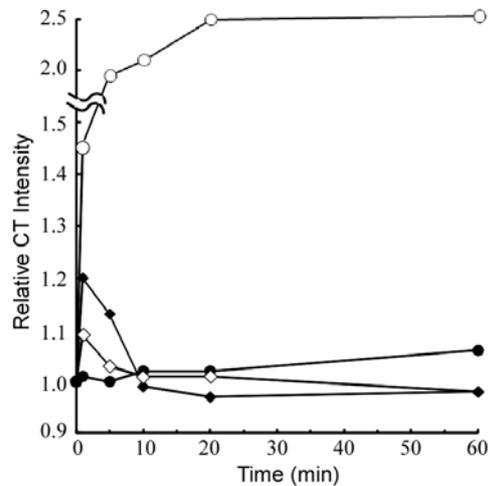


図 6 動脈 (◇) および膀胱 (○) における金ナノ粒子内包 PEG 修飾 dendrimer (黒) とイオパミロン注 (白) の CT 値の経時変化。

ら、金ナノ粒子内包 dendrimer は体外への排出が抑制されるために、長時間造影効果が持続することを考えられた。以上より、この新規造影剤は市販のヨウ素造影剤よりも造影効果が高く、かつ、長時間の CT イメージングが可能な新規 CT 造影剤として利用することができるものと期待された。

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 2 件)

- ① C. Kojima, Y. Umeda, M. Ogawa, A. Harada, Y. Magata, K. Kono, X-ray computed tomography contrast agents prepared by seeded growth of gold nanoparticle in PEGylated dendrimer, *Nanotechnology*, 21, 245104 (2010). 査読有
- ② C. Kojima, S.-H. Cho, E. Higuchi. Gold nanoparticle-loaded PEGylated dendrimers for theragnosis. *Res. Chem. Intermed.*, 38, 1279-1289 (2012). 査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① C. Kojima, Y. Umeda, M. Ogawa, A. Harada, Y. Magata, K. Kono. Gold nanoparticles in PEGylated dendrimer as a CT contrast agent for blood pool. 2010 World Molecular Imaging Congress, 2010/9,

該当なし

Kyoto, Japan

- ② 児島千恵、梅田康仁、小川美香子、原田敦史、間賀田泰寛、河野健司、金ナノ粒子内包PEG修飾デンドリマーを利用したCT造影剤の作製、第26回日本DDS学会学術集会、2010/6/18、大阪
- ③ 児島千恵、ナノカプセル化金ナノ粒子の光応答性を利用した診断・治療、第24回化学とマイクロ・ナノシステム研究会、2011/11/17-18、堺市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阪原 晴海 (SAKAHARA HARUMI)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：10187031

(2) 研究分担者

間賀田 泰寛 (MAGATA YASUHIRO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・教授
研究者番号：20209399

山口 博司 (YAMAGUCHI HIROSHI)
浜松医科大学・光量子医学研究センター・助教
研究者番号：00450841

淵上 剛志 (FUCHIGAMI TAKESHI)
浜松医科大学・光量子医学研究センター・助教
研究者番号：30432206

小川 美香子 (OGAWA MIKAKO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・准教授
研究者番号：20344351

児島 千恵 (KOJIMA CHIE)
大阪府立大学・21世紀科学研究機構・講師
研究者番号：50405346

堺 俊博 (SAKAI TOSHIHIRO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・特任研究員
研究者番号：40585098

高島 好聖 (TAKASHIMA MISATO)
浜松医科大学・メディカルフォトンクス研究センター・助教
研究者番号：70525592

(3) 連携研究者