

機関番号：12501

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791172

研究課題名 (和文) 骨転移がんの早期診断、治療を目的とした放射性薬剤の設計

研究課題名 (英文) Design of ^{99m}Tc -labeled compound for diagnosis of metastatic tumor in bone

研究代表者

上原 知也 (UEHARA TOMOYA)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号：10323403

研究成果の概要 (和文)：

骨病変部位では血管透過性が充進していることに注目し、正常血管孔の透過性が低く、ヒドロキシアパタイトとの高い結合親和性を有する薬剤として、オリゴアスパラギン酸結合 ^{99m}Tc 標識薬剤を開発した。これらの薬剤は、 ^{99m}Tc -MDP よりも分子サイズが大きく、また、ヒドロキシアパタイトへの高い結合を示し、また病態モデルラットを用いた結果、高い病変骨/正常骨比を示した。本薬剤設計は病変骨への選択的集積に有用と考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Increased permeability of blood vessels in diseased bone suggested that ^{99m}Tc -labeled compound of higher molecular size and hydroxyapatite binding would be useful to detect the diseased bone. Since ^{99m}Tc -labeled oligo-aspartic acid showed higher molecular size and higher hydroxyapatite binding than those of ^{99m}Tc -methylene diphosphonate (^{99m}Tc -MDP), to evaluate the molecular design of ^{99m}Tc -labeled oligo-aspartic acid, the accumulation of ^{99m}Tc -labeled oligo-aspartic acid in bone metastatic tumor of rat was compared with ^{99m}Tc -MDP. The tumor to normal region ratios of ^{99m}Tc -labeled oligo-aspartic acids were higher than those of ^{99m}Tc -MDP. These results suggested that the present molecular design would be useful to image bone metastatic tumor.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 2,300,000 | 690,000 | 2,990,000 |
| 2010 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：放射性医薬品

1. 研究開始当初の背景

乳癌患者及び前立腺癌により死亡した患者の約 70% ががんの骨転移が認められるなど、難治性で強い痛みを伴う骨転移がんの早期診断、治療への関心は高い。現在、骨転移がんの診断に汎用されるテクネチウム-99m (^{99m}Tc) 標識ビスフォスフォネート (^{99m}Tc -BP) やがん性骨転移の疼痛緩和薬

剤として研究されている、 β -線放出核種であるレニウム-186/188 ($^{186/188}\text{Re}$) を用いた $^{186/188}\text{Re}$ -BP などの放射性核種標識 BP は、骨転移後に造骨に転じた疾患部位への集積を示す。がんが骨転移する際、がん細胞は破骨細胞の前駆細胞を活性化し、破骨細胞数を増加させながら、骨部を溶解していく。そこにがん細胞が生着し、骨転移がんが形

成される。従って、がんの骨転移の早期に増加する。破骨細胞を検出することができれば、従来の放射性核種標識 BP よりも早期に骨転移がんの診断、治療が可能となると考えられる。

骨は正常な場合に置いても、骨芽細胞及び破骨細胞により絶えず造骨、溶骨を繰り返していることから、破骨細胞を検出する特異的リガンドを放射性核種で標識する従来の方法では、病変部の特異的な集積は困難である。一方、がん細胞は血管から浸潤し骨部に生着するが、その際、様々な因子を放出している。そのため、骨代謝が亢進した部位では血管透過性が向上している。

2. 研究の目的

破骨細胞は CXCR4 受容体, Integrin- α v β 3 受容体などを発現していることから, CXCR4 受容体阻害薬 (T140), α v β 3 結合ペプチド(cRGDyK)などを血管透過性の向上した部位に選択的に集積させることができれば, 骨転移がんの早期診断, 治療に有用と考えられる。これまでに所属研究室では, ^{99m}Tc 標識直鎖アスパラギン酸が側鎖のカルボン酸の有する電荷により, 嵩高い構造を有することを認めた。通常, 分子サイズが大きくなると, 血液からのクリアランスが遅くなるのが懸念されるが, 本薬剤は, 速やかな血液クリアランスを示し, 分子サイズの増大と速やかな血液クリアランスを併せ持った薬剤であることを認めた。実際, ^{99m}Tc 標識[D-Asp]₅が骨形成部位への集積性を保持したまま, 正常骨への集積を低減することを認めている。本申請課題では, 血管透過性を制御するペプチド鎖による病変骨への選択的集積の評価とこれらの薬剤と T140, cRGDyK などを組み合わせた薬剤設計が, 骨転移がんの診断, 治療薬剤として有用かを評価することを目的とする。

3. 研究の方法

実験試薬と機器

$^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液は, $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ ジェネレーターである Ultra Techne Kow (Fuji RI Pharma, Tokyo, Japan)から溶出された生理食塩水溶出液を用いた。質量分析は ESI-MS (Agilent 6100 (Agilent Japan, Tokyo)を用いた。 ^1H 核磁気共鳴 ($^1\text{H-NMR}$)は JEOL JNM-ALPHA 400 spectrometer (JEOL Ltd.)を用いて測定した。Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT)を用いた撮像は 4 ヘッドガンマカメラ (FX-3200, Gamma Medica Ideas, CA, USA)により行った。逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)による分取用逆相カラムとガードカラムは Mightysil RP-8GP. (20×250 mm, 10×20 mm, 関東化学, Tokyo)を用い

た。移動相には 1%酢酸 /H₂O (A 相)と 1%酢酸/アセトニトリル (B 相)を用い, A 相 : B 相を 90 : 10 を 2 分維持した後, 60 分で 80 : 20 まで変化させる直線 gradient 法により流速 5 mL/min で溶出した。溶出液は 220 nm の吸光度を計測した。分析用逆相カラムは Nacalai Tesque Inc. の Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (4.6×150 mm)を使用した。 ^{99m}Tc 標識化合物の分析には 12.5 mM リン酸 (pH 2.5)とメタノールを移動相として用い, メタノールを 30 分で 0 - 100 % まで変化させる直線 gradient 法により流速 1 mL/min で溶出した。RP-HPLC にオンラインで γ 線検出器 (Gabi Star, Raytest, Yokohama, Japan)を接続することで ^{99m}Tc の放射活性を分析した。薄層クロマトグラフィー (TLC)は, シリカゲルプレート (silica gel 60 F₂₅₄, Merck Japan, Tokyo)を用い, 濾紙クロマトグラフィー (PC)は Whatman No.1 濾紙 (Whatman International Ltd., England)を用いた。また, セルロースアセテート膜電気泳動は泳動膜に SELECA-V (東洋濾紙, Tokyo)を使用し, 0.1 M phosphate buffer pH 7.4において 1 mA/cm, 30 分で泳動した。TLC および電気泳動膜は 0.5 cm ずつ切断し, それぞれの画分の放射活性をオートウエルガンマシステムで測定した。保護ペプチド樹脂 D-Asp-(O^tBu)-Alkoresin と, 側鎖保護基 アミノ酸誘導體 Fmoc-D-Asp(O^tBu)-OH は WATANABE CHEMICAL INC., LTD. (Hiroshima, Japan)から購入した。ハイドロキシアパタイト (HA)は Nippon Bio-Rad Laboratories K.K. (Tokyo)より購入し, Tris-buffered saline (TBS) (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)で 1 日膨潤させた後, 使用した。 ^{99m}Tc -MDP は Fuji RI Pharma 社より購入したテクネ MDP キットを用いて調整した。実験動物は, 雄性 ddy 系マウス 5 週齢 (日本 SLC, Hamamatu, Japan) (27 - 31 g)と雄性 SD ラット (150-180 g, 日本 SLC)を使用した。その他の試薬は特級試薬をそのまま使用した。

化合物の合成

D-Pen(Trt)-OH (1) の合成

D-Penicillamine (1.2 g, 8 mmol) および triphenylmethanol (2.2 g, 8.4 mmol) を trifluoroacetic acid (TFA, 12 mL) に溶解し, 室温で 35 分間攪拌した。TFA を減圧留去した後, 残渣を最小量の Et₂O に溶解させ, 次いで sat. NaHCO₃ (10 mL) を加えることにより沈殿化させた。沈殿をろ取り, water (10 × 2 mL) 次いで Et₂O (10 × 2 mL) により洗浄した。固体を減圧乾燥させることにより白色固体として化合物 1 を得た。

N,N'-Diisopropyl-O-tert-butylisourea (DITBIU, 2)の合成

ナス型 フラスコ中に N,N'-diisopropylcarbodiimide (DIC, 4.08 g, 32.3 mmol) の ^tBuOH (2.78 g, 37.5 mmol) 溶液を調

製し、油浴を用いて 30 °C に加熱した。攪拌しながら CuCl (3.2 mg) を加えた後、N₂ 雰囲気下 30 °C で 3 日間攪拌した。Poly (4-vinylpyridine) (0.65 g) および CH₂Cl₂ (16.5 mL) を加え、懸濁溶液を 15 分間攪拌した。固形物をろ去後、ろ液を減圧留去することで化合物 2 の粗精製物を無色の液体として得た (5.35 g, 粗収率 82%)。この化合物は更なる精製を行わずにそのまま次の反応に用いた。

D-Pen(Trt)-O^tBu (3) の合成

Dry CH₂Cl₂ (31 mL) に溶解した化合物 1 (232 g, 5.94 mmol) を化合物 2 (5.35 g, 26.7 mmol) にゆっくり加え、N₂ 雰囲気下 24 時間攪拌した。diisopropylurea をろ去した後、ろ液を減圧留去した。残渣を *n*-hexane-Et₂O (6 : 1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 3 を白色固体として得た (2.58 g, 92%)。

D-Pen(Trt)-O^tBu-*N*-acetate methyl ester (4) の合成

活性化したモレキュラーシーブス 4 Å (300 mg) および triethylamine (68.4 μL, 0.49 mmol) を dry dimethylformamide (DMF) (18 mL) に加え、室温で 10 分間激しく攪拌した。本懸濁液に化合物 3 (200 mg, 0.45 mmol) の dry DMF 溶液 (8 mL) を加え、30 分間攪拌した。次いで methyl bromoacetate (54.4 mg, 0.36 mmol, 1 mL DMF) を滴下し、40 °C で 24 時間攪拌した後、不溶物をろ去した。ろ液を減圧留去した後、残渣を *n*-hexane-EtOAc (4 : 1) を溶出溶媒とするシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、化合物 4 を無色の油状物として得た。

D-Pen(Trt)-O^tBu-*N*-acetic acid (5) の合成

化合物 4 (120 mg, 0.231 mmol) を dry EtOH (20 mL) に溶解した後、2.5N NaOH (0.37 mL, 0.92 mmol) を加え、室温で 3 時間攪拌した。反応溶液を 5% クエン酸で中和し、CH₂Cl₂ (15 mL) で抽出し、brine (15 x 2 mL) で洗浄した。有機層を無水硫酸ナトリウムにより乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、化合物 5 を白色粉末として得た (110 mg, 95%)。

D-Pen-(D-Asp)₅ (9), D-Pen-(D-Asp)₈ (10) および D-Pen-(D-Asp)₁₂ (11) の合成

N^α-Fmoc 基を脱離した保護ペプチド樹脂 500 mg (0.15 mmol) に側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体 (390 mg, 0.95 mmol) と 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt, 145 mg, 0.95 mmol) を加え、DMF 3 mL に溶解した後、1,3-diisopropyl carbodiimide (DIC, 146 μL, 0.95 mmol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。DMF で洗浄した後、樹脂を一部採取して Kaiser test [23] を行い、陰性を示すまで縮合反応を行った。次いで、保護基ペプチド樹脂に 20% piperidine/DMF (v/v) 3 mL を加え 20 分間室温で攪拌した。反応終了後、DMF で洗浄した後、樹脂を一部採取して Kaiser test [23] を行

い、陽性を示すまで脱保護を行った。以上の N^α-Fmoc 基の脱保護と側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体の縮合反応を繰り返すことにより保護ペプチド鎖 (6), (7) および (8) を構築した。

D-Pen(Trt)-O^tBu-*N*-acetic acid と保護ペプチド鎖の結合と脱保護, 脱樹脂

20% piperidine/DMF (v/v) 処理によって (6) (222 mg, 0.2 mmol) または (7) (292 mg, 0.2 mmol) または (8) (400 mg, 0.2 mmol) の N^α-Fmoc 基を脱離し、DMF 中で HOBt (76.5 mg, 0.5 mmol) と DIC (76.8 μL, 0.5 mmol) の存在下で D-Pen(Trt)-O^tBu-*N*-acetic acid (404 mg, 0.8 mmol) と 5 時間攪拌することで、化合物 (9), (10) および (11) を得た。次いで、氷冷下、TFA: 水: triisopropylsilane = 90: 5: 5 の溶液 (cleavage cocktail) 5 mL を加え、1 分後室温に戻して 24 時間反応した。樹脂を濾取し、TFA を減圧留去した後、氷冷下エーテルを加え、析出した白色固体を水に抽出した。水層をエーテルで 3 回洗浄した後、減圧留去してエーテルを完全に除去し、分取用 RP-HPLC に付した。各目的物を含む画分を集め凍結乾燥して、白色羽毛状の化合物 (12), (13) および (14) を得た。化合物 (12) は 22.9 分に溶出され、収量は 51.6 mg (収率 33%)、化合物 (13) は 23.5 分に溶出され、収量は 26 mg (収率 16.9%)、化合物 (14) は 23.5 分に溶出され、収量は 13 mg (収率 4.1%) であった。

非放射性 Re (^{185/187}Re) 錯体の合成 (Bu₄N)-[^{185/187}ReOCl₄] (15) の合成

Bu₄NReO₄ (1.1 g, 2.2 mmol) を EtOH (20 mL) に溶解し、氷冷下、HCl ガスによりバブリングし、HCl の飽和溶液とした。室温で 2 時間攪拌した後、窒素ガスにより、反応溶液の体積が半量になるまで濃縮した。続いて冷凍庫中で結晶化させ、化合物 15 を淡黄緑色の結晶として得た (0.5 g, 38%)。

^{185/187}Re-[D-Pen-(D-Asp)_n]₂ (n=5 (16), n=8 (17), n=12 (18)) の合成

窒素置換した EtOH (200 μL) に化合物 15 (1.8 mg, 3.1 μmol) を溶解し、攪拌下、ethyleneglycol (15 μL) を加えた。窒素置換した水に溶解した化合物 12, 13 および 14 の水溶液 150 μL (それぞれ 4.9 mg, 6.9 mg, 9.8 mg: 6.2 μmol) を加え、室温で 5 時間攪拌した。得られた淡紫色溶液を分取用 RP-HPLC に付し、化合物 16 (保持時間 13.9 分)、化合物 17 (保持時間 13.6 分) および化合物 18 (保持時間 14.1 分) を得た。

D-Pen-(D-Asp)_n (n=5, 8, 12) の ^{99m}Tc 標識 ^{99m}Tc-glucoheptonate (^{99m}Tc-GH) の作製

α-D-Glucoheptonic acid (GH, 4.0 mg) および SnCl₂ · 2 水和物 1.2 μg からなる凍結乾燥 GH-kit に ⁹⁹Mo/^{99m}Tc-generator より溶出した ^{99m}TcO₄⁻/saline 溶液 1.0 mL を加え、室温で 20 分間反応させることにより、[GH] = 4.0

mg/mL の ^{99m}Tc -GH 溶液を得た。 ^{99m}Tc -GH の生成確認は TLC (acetone: $R_f = 0$, saline: $R_f = 1$) により行った。

^{99m}Tc 標識D-Pen-(D-Asp)_n (n=5, 8, 12)の作製

化合物 12 (0.16 mg, 0.20 μmol), 13 (0.23 mg, 0.20 μmol), および 14 (0.32 mg, 0.2 μmol) を窒素置換した 0.1 M citrate buffer (pH 3.0) 100 μL に溶解し, 2 mM の配位子溶液を調製した。各溶液 100 μL に ^{99m}Tc -GH 溶液 100 μL を加え十分混和した後, 60 °C で 30 分反応させた。

^{99m}Tc -MDPの作製

テクネ MDP キットに, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ 溶液 2.0 mL を加えよく振盪した後, 室温で 5 分静置することにより得た。放射化学的純度は展開溶媒にアセトンを用いた TLC (^{99m}Tc -MDP は $R_f=0$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ は $R_f=1.0$), および展開溶媒に saline を用いた PC (^{99m}Tc -MDP は $R_f=1.0$, $^{99m}\text{TcO}_4^-$ は $R_f=0.6-0.7$) により求めた。実験には saline で 1000 倍希釈して用いた。この時, ^{99m}Tc -MDP に含まれる MDP 濃度は 3.75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (21.3 μM) であった。

マウス血漿中における ^{99m}Tc 標識化合物の安定性

血漿 95 μL を 37 °C で 5 分間インキュベートした後, それぞれの RP-HPLC で精製した ^{99m}Tc 標識化合物 (^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₅]₂, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₈]₂ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₁₂]₂) 5 μL (2.5 μCi) と混和し, 6 時間後における ^{99m}Tc 錯体の化学形を電気泳動において分析した。

マウス血漿タンパク質と ^{99m}Tc 標識化合物との結合性

血漿 190 μL を 37 °C で 5 分間インキュベートした後, RP-HPLC で精製したそれぞれの ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₅]₂, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₈]₂ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₁₂]₂ (10 μL , 1 μCi) と混和し, 60 分後に展開溶媒に saline を用いた PC によりそれぞれの ^{99m}Tc 標識化合物の血漿タンパク質との結合性を評価した。

HA と ^{99m}Tc 標識化合物との結合性

HA 溶液 (1.0, 0.1, 0.01 mg) 150 μL に Tris-buffered saline (TBS) (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) 50 μL とそれぞれの ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₅]₂, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₈]₂, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₁₂]₂ および ^{99m}Tc -MDP を 50 μL (20 nCi) ずつ加え室温で 1 時間振盪した後, 10,000 g で 5 分間遠心し上清 (100 μL) の放射活性を測定することにより HA に結合している ^{99m}Tc 標識化合物の割合を求めた。対照実験としては HA を加えずに同様の操作を行った。

HA binding (%) = 100 - [(unbound fraction cpm) / (control fraction cpm)] × 100.

分子サイズの比較

それぞれの ^{99m}Tc 標識化合物の比較は, Amicon Ultra-4 (Millipore Japan) の 10 kDa 膜 (孔径: 20~40 Å) および 30 kDa 膜を用いて

行った。フィルターの上部に, ^{99m}Tc 標識化合物 (0.1 M phosphate buffer (pH 7.4)) 3 mL を添加し, 1300×g で 3 分間 (30 kDa 膜の場合) 又は 10 分間 (10 kDa 膜の場合) 遠心した。遠心後の透過液および残留液中に含まれる放射活性を測定した。

正常マウスにおける体内動態の検討

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₅]₂, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₈]₂ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp)₁₂]₂ ([peptide] = 50 μM) および ^{99m}Tc -MDP (21.3 μM) をそれぞれ 100 μL (0.5 μCi) ずつマウスに尾静脈投与し, マウス体内での放射活性の挙動を検討した。1 群 4-5 匹とし, 投与 10 分, 1 時間, 3 時間, 6 時間後に屠殺し, 採血, 解剖し, 各臓器の重量と放射活性を測定した。また, 投与後 6 時間までに排泄された尿および糞便の放射活性を測定した。

骨再生モデルラットの作成

雄性 SD ラット (150-180 g) にネブタール注射液 (150 μL) を腹腔内投与することで麻酔した。左後脚の膝関節の下を切開し, 膝関節の下 5 mm の脛骨の真ん中に 23G の針で骨髄まで穴をあけた。次いで, 穴をボーンワックス (瑞徳医科工業, Tokyo) で塞ぎ, 皮膚を縫合した。処置後 3-5 日後に実験に用いた。

HYNIC-BSAの合成

Succinimidyl 6-(*tert*-butoxycarbonyl)-hydrazinopyridine-3-carboxylate (Boc-HYNIC-NHS) を Abram らの方法に従い合成した後, TFA : anisole = 9 : 1 溶液 1 mL を加えて室温で 10 分間反応して HYNIC-NHS の結晶を得た。乾燥 DMF に溶解した HYNIC-NHS (8.3 mg / 100 μL) 10 μL を, 0.25 M borate buffer (pH 8.5) に溶解した BSA (20 mg/mL) 1 mL に攪拌しながらゆっくり滴下した後, 遮光しながら室温で 2 時間穏やかに反応させた。反応液を 10 mM citrate buffer (pH 5.2) で平衡化した Sephadex G-50 を担体とするスピカラムにより精製した。BSA に導入された HYNIC の数は King らの方法に従い, *p*-ニトロベンズアルデヒドと結合したヒドラジル基を測定することにより求めた。

^{99m}Tc -HYNIC-BSA の作製

10 mM citrate buffer (pH 5.2) に溶解した BSA (50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$) を [GH] = 4 mg/mL の ^{99m}Tc -GH 溶液 (100 μL) に加え, pH 5.0 ~ 5.5 に調整し, 室温で 30 分間反応させ, ^{99m}Tc -HYNIC-BSA を得た。

AT-6.1 細胞の培養

骨転移を高度におこすラットの前立腺がん細胞 AT-6.1 は 250nM Dexamethasone および Fetal bovine serum を添加した RPMI 1640 medium 培地に懸濁させて播種し, 加湿, 5%CO₂ 中 37°C 環境下で培養した。造骨性骨転移がんモデルラットの作成

4 週齢 雄性 SD ラットにネンブタール注射液を腹腔内投与することで麻酔した。左後脚の膝関節の下を切開し脛骨に穴をあけ、1.2% アルギン酸ナトリウムに懸濁した AT-6.1 細胞(6×10^6 cell)を移植、右後脚脛骨にはアルギン酸ナトリウムのみを投与し、穴をボーンワックスで塞ぎ 8 週間飼育した。

SPECT/CTによる撮像

骨再生モデルラットあるいは骨転移がんモデルラットに ^{99m}Tc -(D-Pen-(D-Asp) $_{12}$) $_2$ ([peptide] = 250 μM) 300 μL (0.70 mCi), ^{99m}Tc -EC[(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -MDP (1 mM, 0.7 mCi, 100 μL)あるいは ^{99m}Tc -HYNIC-BSA (37 MBq, 0.5 mg/mL, 100 μL)をラットに尾静脈投与し、投与 1 時間後に、イソフルラン(1.5%)による麻酔を行った。麻酔下、骨再生モデルラットを SPECT/CT 装置内に設置した。コリメータはラット用 5 穴 0.5 mm ピンホールコリメータ (75A05)を使用し、回転半径 45 mm, 1 フレーム 480 秒で 8 フレーム撮像することにより SPECT 画像を得た。

4. 研究成果

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ は ^{99m}Tc -GH との配位子交換反応により行った。いずれの ^{99m}Tc 標識化合物は放射化学的純度 97%以上で得られた。

マウス血漿中における安定性

逆相 HPLC により分取した ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ をマウス血漿中で 6 時間インキュベートしたところ、それぞれの未変化体の割合は $89.0 \pm 4.06\%$, $82.5 \pm 2.41\%$ および $84.0 \pm 9.43\%$ であり、いずれも安定であることを認めた。

マウス血漿タンパク質との結合性

マウス血漿中における ^{99m}Tc 標識化合物のタンパク結合率は ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ でそれぞれ $14.3 \pm 2.44\%$, $13.8 \pm 2.59\%$ および $5.8 \pm 2.89\%$ であり、いずれも低値であった。

HAとの結合性

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ の HA 結合率は、HA 1.0 mg の条件ではいずれも 90 %以上の結合率を示した。HA の量を 0.1 mg, 0.01 mg と低下させるにつれて、それぞれの ^{99m}Tc 標識化合物の HA との結合率は減少した。一方、 ^{99m}Tc 標識化合物の HA 結合率はアスパラギン酸の数を増やすにつれて僅かに増加した (Fig. 1)。また、いずれの ^{99m}Tc 標識化合物も ^{99m}Tc -MDP より高い結合率を示した。

分子サイズの検討

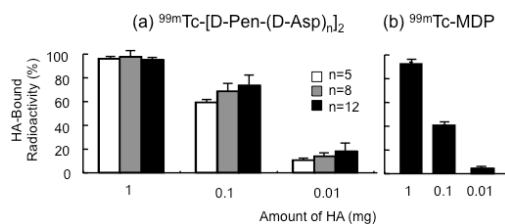


Fig. 1. ^{99m}Tc 標識化合物の HA との結合性の評価. (a) ^{99m}Tc -[(D-Pen-(D-Asp) $_n$)] $_2$ は鎖長が長くなるにつれ結合率は僅かに増加した. (b) ^{99m}Tc -MDP の結合率は ^{99m}Tc -[(D-Pen-(D-Asp) $_n$)] $_2$ に比べ低値であった。

Amicon Ultra-4 (10 kDa 膜又は 30 kDa 膜)を用いて透過率を求めた結果を Fig. 2.に示す。Amicon Ultra-4 (30 kDa 膜)ではいずれの ^{99m}Tc 標識化合物も 80%以上透過した。Amicon Ultra-4 (10 kDa 膜)では、オリゴアスパラギン酸の数を増やすにつれてそれぞれの ^{99m}Tc 標識化合物の透過率は減少した。Amicon Ultra-4

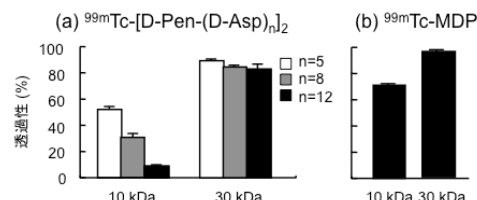


Fig. 2. ^{99m}Tc 標識化合物の再生セルロースアセテート膜透過性の評価. (a) ^{99m}Tc -[(D-Pen-(D-Asp) $_n$)] $_2$ は鎖長が長くなるにつれ 10 kDa 膜の透過性は減少した. (b) ^{99m}Tc -MDP はいずれの膜も透過した。

(10 kDa 膜)における ^{99m}Tc 標識化合物の透過性はいずれも ^{99m}Tc -MDP に比べ低値であった。

正常マウスを用いた検討

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ および ^{99m}Tc -MDP をマウスに投与後の放射活性の経時的変化を Table 1 に示す。 ^{99m}Tc 標識化合物の血中からの消失は差長が長くなるにつれて速やかになり、 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ が最も速かった。一方、腎臓への集積は、 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$ が最も高く、次いで、 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ となり、 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ が最も低値を示した。一方、 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ の骨への集積はいずれも ^{99m}Tc -MDP に比べ低値であり、なかでも ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ が最も低値であった。いずれの ^{99m}Tc 標識化合物も胃への集積は観察されず、また、肝臓や他の臓器への集積も観察されなかった。

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$, および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ の排泄経路

Table 1. ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$, ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$, および ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ をマウスに投与後の体内分布.

| | Time after injection | | | |
|--|----------------------|--------------|--------------|--------------|
| | 10 min | 1 h | 3 h | 6 h |
| ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_5$] $_2$ | | | | |
| Blood | 3.04 (0.17) | 0.82 (0.12) | 0.82 (0.05) | 0.59 (0.12) |
| Bone | 13.61 (1.30) | 14.22 (1.78) | 9.70 (1.10) | 10.62 (0.97) |
| Liver | 0.67 (0.08) | 0.29 (0.04) | 0.24 (0.01) | 0.29 (0.07) |
| Kidney | 26.25 (0.89) | 24.58 (5.42) | 23.71 (4.44) | 31.26 (2.07) |
| Stomach* | 0.41 (0.01) | 0.22 (0.03) | 0.21 (0.03) | 0.19 (0.03) |
| ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_8$] $_2$ | | | | |
| Blood | 2.19 (0.26) | 0.48 (0.10) | 0.30 (0.04) | 0.25 (0.06) |
| Bone | 13.05 (1.65) | 17.71 (1.88) | 13.77 (2.54) | 13.16 (2.17) |
| Liver | 0.59 (0.08) | 0.24 (0.04) | 0.23 (0.05) | 0.29 (0.03) |
| Kidney | 23.32 (2.67) | 28.07 (5.78) | 27.23 (2.70) | 26.07 (5.78) |
| Stomach* | 0.32 (0.03) | 0.19 (0.02) | 0.18 (0.03) | 0.29 (0.13) |
| ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ | | | | |
| Blood | 2.67 (0.34) | 0.23 (0.04) | 0.12 (0.03) | 0.11 (0.07) |
| Bone | 9.48 (2.65) | 11.17 (1.71) | 10.20 (1.52) | 10.06 (2.26) |
| Liver | 0.95 (0.07) | 0.60 (0.03) | 0.71 (0.03) | 0.73 (0.12) |
| Kidney | 19.26 (2.38) | 7.69 (2.38) | 4.69 (1.43) | 5.29 (0.60) |
| Stomach* | 0.48 (0.04) | 0.27 (0.04) | 0.19 (0.04) | 0.14 (0.03) |
| ^{99m}Tc -MDP | | | | |
| Blood | 2.11 (0.27) | 0.19 (0.01) | 0.11 (0.01) | 0.09 (0.01) |
| Bone | 26.49 (2.47) | 26.41 (1.87) | 23.76 (0.89) | 26.82 (1.44) |
| Liver | 0.59 (0.05) | 0.22 (0.03) | 0.13 (0.03) | 0.13 (0.07) |
| Kidney | 7.16 (1.93) | 1.81 (0.22) | 1.03 (0.11) | 0.92 (0.22) |
| Stomach* | 0.89 (0.09) | 0.37 (0.03) | 0.40 (0.03) | 0.27 (0.03) |

*Thymus radioactivity is expressed as %ID/g; all results are reported as means (SD).
*Expressed as %ID.

を検討したところ、投与後6時間まで54%ID以上の放射性物質が尿中に排泄され、糞便中への排泄は0.42 %ID以下であった。

骨再生モデルラットを用いた検討

^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ および ^{99m}Tc -MDP を骨再生モデルラットに投与した後の SPECT/CT 画像を Fig. 3 に示す。 ^{99m}Tc -D-[Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ は明瞭に骨再生部位を画像化した。

骨転移がんモデルラットを用いた検討

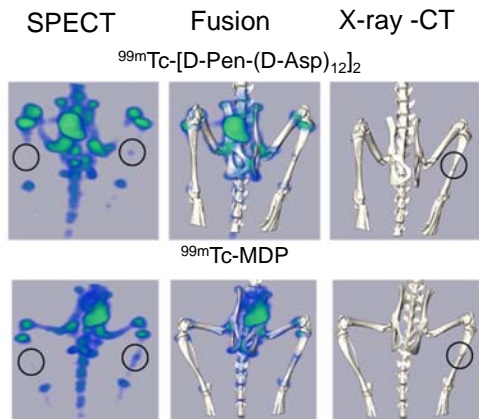


Fig. 3. ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ および ^{99m}Tc -MDP を骨形成モデルラットに投与し、1時間後における SPECT/CT 画像。右側に骨形成部、左側に正常骨の位置を示す。 ^{99m}Tc -[D-Pen-(D-Asp) $_{12}$] $_2$ は明瞭に骨形成部を画像化した。

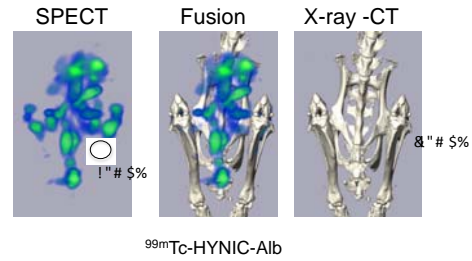


Fig. 4. ^{99m}Tc -HYNIC-Alb を骨転移がんモデルラットに投与し、1時間後における SPECT/CT 画像。右側のがん部、左側に正常骨の位置を示す。がん部への集積が観察されたことから、血管透過性が向上していると考えられる。

^{99m}Tc -HYNIC-BSA を骨転移モデルラットに投与した後の SPECT/CT 画像を Fig. 4 に示す。骨転移部と正常骨部の集積比は約 1.4 であり、骨転移部位での血管透過性の充進が観察された。

^{99m}Tc -EC-[(D-Asp) $_5$] $_2$ および ^{99m}Tc -MDP 投与後における骨転移部と正常骨部の集積比はそれぞれ、2.4 と 1.9 であったことから、骨転移部に選択的に集積したと考えられる。

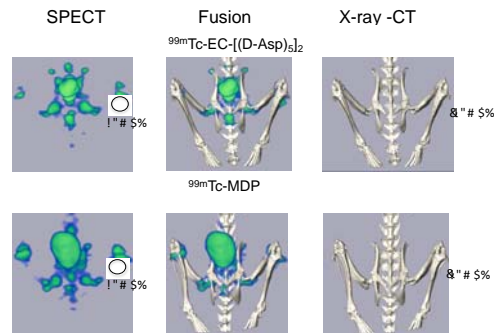


Fig. 5. ^{99m}Tc -EC-[(D-Asp) $_5$] $_2$ および ^{99m}Tc -MDP を骨転移がんモデルラットに投与し、1時間後における SPECT/CT 画像。右側に骨形成部、左側に正常骨の位置を示す。 ^{99m}Tc -EC-[(D-Asp) $_5$] $_2$ はがん部へ集積する一方、正常骨への集積が低かった。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

上原知也, 骨疾患部に選択的に集積する ^{99m}Tc 標識薬剤の開発, 日本核医学会, 2010.11.11, 大宮

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上原 知也 (UEHARA TOMOYA)

千葉大学・大学院薬学研究院・講師

研究者番号: 10323403