

## 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29日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791179

研究課題名（和文）放射性金属－八臭素化ポルフィリンを用いた新規核医学診断・治療薬剤の開発と応用

研究課題名（英文）Development and application of radiometal-octabromoporphyrines for a new nuclear medicine diagnosis and radioisotope therapy agent

研究代表者

北村 陽二（KITAMURA YOJI）

金沢大学・学際科学実験センター・准教授

研究者番号：10368483

研究成果の概要（和文）：本研究では、新規「放射性金属－八臭素化ポルフィリン錯体」を開発し、腫瘍の新規核医学診断・治療薬剤への応用について検討した。その結果、Octabromotetrakis (4-carboxyphenyl)porphine (OBTCPP) が、診断用核種の  $^{111}\text{In}$  で短時間で標識可能なこと、colon26 細胞、B16/BL6 細胞を移植した担癌マウスにおいて、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP は投与 24 時間後、いずれの腫瘍へも約 7% dose/g の集積を示すことを見出した。

研究成果の概要（英文）：In this study, a new radiometal-octabromoporphyrines was developed and the possibility of application for a new nuclear medicine diagnosis and radioisotope therapy agent was examined. As a result, it was found that Octabromotetrakis (4-carboxyphenyl)porphine (OBTCPP) could be radiolabelled by  $^{111}\text{In}$ , a radio nuclear for diagnosis, in short times. It was also found that, in tumor bearing mice which transplanted colon26 tumor cell and B16/BL6 tumor cell,  $^{111}\text{In}$ -OBTCPP was accumulated in both tumors at about 7% dose/g.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：放射性医薬品

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，ポルフィリン，腫瘍，錯体

## 1. 研究開始当初の背景

ポルフィリンは4個のピロールからなる環状構造を基本構造としており、その環の中心に様々な金属元素が結合し、錯体を形成することが出来る。近年、このポルフィリンが腫瘍に集積する性質を持つこと、加えて、レーザー光照射により蛍光や活性酸素を発生することを利用した、腫瘍の蛍光診断や、治療

を目的とした光線力学療法が開発され、普及しつつある。しかし、このような可視光を用いた診断、治療法では、光の生体組織透過性が劣ることから、内視鏡光ファイバーでレーザー光を照射できる表層癌に適用が限定されるという欠点がある。そこで、ポルフィリンを放射性同位元素で標識出来れば、外部からの光照射は不要となり、深部層の腫瘍の診

断や治療にも適用可能となる。放射性同位元素の中には、金属元素も存在し、 $^{111}\text{In}$  や  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  は SPECT 診断に、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Zn}$  や  $^{55}\text{Co}$  などは PET 診断に、 $^{64}\text{Cu}$  や  $^{90}\text{Y}$  などは内用放射線治療に用いることができる。そこで、報告者は、ポルフィリンに放射性金属を結合させた錯体を開発すれば、腫瘍の放射性医薬品としての新たな可能性を開拓できると思い至った。

一方、放射性医薬品として臨床で使用するためには、放射性同位元素による標識から精製までを短時間で行わなければならない。特に、PET 診断においては、半減期の非常に短いポジトロン放出核種を用いるため、標識と精製に要する時間の短縮は非常に重要である。報告者は、ポルフィリン誘導体の開発、及び、その分析学的、臨床的応用に関する研究を行ってきた。その研究成果から、八臭素化ポルフィリン誘導体は、これまでのポルフィリンに比べ、金属との結合が非常に速いといった性質を有していることを見出し、さらに、報告者はこれまでに、八臭素化ポルフィリン誘導体の一つである Octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine (OBTCP) が  $^{65}\text{Zn}$  と常温で速やかに錯体を形成することを明らかにしてきた。この性質は放射性医薬品としての臨床応用に非常に有用であると考えられた。

光線力学療法で用いられるポルフィリン誘導体は腫瘍だけでなく正常組織にも集積する。正常組織からは時間の経過と共に排出されるが、腫瘍においてはポルフィリン代謝が低下しているため、最終的に腫瘍に選択的に集積する。従って、腫瘍/正常組織比が最大になるまでに時間を要することがポルフィリン誘導体の欠点といえる。一方、報告者はこれまでに、放射性キレート化合物の側鎖修飾により物性を変化させることで体内動態を制御することに成功している。その研究成果に基づき、今回着目している八臭素化ポルフィリンに関しても、体内動態を制御する修飾を化合物に施すことで、より優れた腫瘍選択性を示す化合物の開発に繋げることが可能であると考えられた。

放射性医薬品による腫瘍診断は、保険適用されている FDG-PET が普及しつつあるが、腫瘍の種類によっては発見しにくいものもあり、その有効性が問われている。それに対し、ポルフィリン誘導体の重要な性質として、様々な種類の腫瘍に対して親和性を有することが挙げられる。従って、八臭素化ポルフィリンを利用した放射性医薬品が開発できれば、腫瘍の検診に有用な薬剤となりうると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、金属との結合が非常に速い八臭

素化ポルフィリン誘導体に着目し、新規「放射性金属-八臭素化ポルフィリン錯体」を開発し、腫瘍の新規核医学診断・治療薬剤への応用の可能性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) $\text{H}_2$ -OBTMPyP の合成

( 1 ) - ① Cu-tetrakis  
(N-methylpyridinium-4-yl) porphine  
(Cu-TMPyP) の合成

$\text{H}_2$ -TMPyP (東京化成社) 100 mg と  $\text{CuCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100 mg に、Methanol- $\text{H}_2\text{O}$  混液 (10 : 1 v/v) 55 mL を加え溶解させ、40~50°C で 1 時間還流した。得られた反応液を放冷した後、減圧濃縮を行い、約 15 mL まで濃縮した。濃縮液に 2-Propanol を添加して Cu-TMPyP を沈殿させ、吸引ろ過により結晶をろ取し、2-Propanol で洗浄後、減圧乾燥して Cu-TMPyP を得た。

(1) -② Cu-octabromotetrakis(N-methylpyridinium-4-yl) porphine (Cu-OBTMPyP) の合成

Cu-TMPyP 410 mg を室温で Dimethylformamide (DMF) 30 mL に懸濁し、 $\text{Br}_2$  0.5 mL を DMF 10 mL に加えた溶液を 30 分以上かけて滴下し、更に 12 時間攪拌した。反応液に超純水 40 mL を加え沈殿を生成させ、吸引ろ過した。ろ取した結晶を DMF- $\text{H}_2\text{O}$  混液 (1 : 10 v/v) で 1 回、水 5 mL で 3 回、Ethanol-2-Propanol 混液 (1 : 1 v/v) で 1 回洗浄した後、減圧下、100°C、1 時間の乾燥を行い Cu-OBTMPyP を得た。

### (1) -3 $\text{H}_2$ -OBTMPyP の合成

Cu-TMPyP 350 mg を 10°C に冷却した濃硫酸 5.0 mL に溶解し、氷冷下、2 時間攪拌した。超純水で調製した氷を 50 g 加え、完全に氷が溶けるまで攪拌した。溶液にヘキサフルオロリン酸アンモニウム 0.6 g 添加して沈殿を生成させ、吸引ろ過により結晶をろ取した。結晶を少量のヘキサフルオロリン酸アンモニウムを溶かした水 10 mL で 2 回洗浄し、さらに、Diethylether-2-propanol 混液 (1 : 1 v/v) でろ液が無色透明になるまで洗浄した。得られた結晶を風乾して  $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$   $\text{PF}_6$  塩を得た。次に、 $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$   $\text{PF}_6$  塩をアセトン 50 mL に溶解し、tetrabutylammonium chloride 100 mg を添加し、沈殿を生成させた。結晶を吸引ろ過し、結晶をアセトンで洗浄した後、減圧下、100°C、1 時間の乾燥を行い、 $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$  Cl 塩を得た。

### (2) $\text{H}_2$ -OBTCP の合成

(2) -① Cu-Tetrakis (4-carboxyphenyl) porphine (Cu-TCPP) の合成

TCPP (ALDRICH 社) 50 mg を 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液に溶かし、1 時間還流した後、酢酸銅 20 mg を加えてさらに 30 分間還流した。放冷後、反応液に濃塩酸を加え、生じた沈殿物を PTFE 製のメンブランフィルター(孔径; 0.45  $\mu\text{m}$ ) を用いてろ取し、結晶を酸化リン(V) 上で減圧乾燥させ、Cu-TCPP を得た。

(2) -② Cu-octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine (Cu-OBTCPP) の合成

Cu-TCPP 40 mg を DMF 30 mL に溶解し、臭化コハク酸イミド(NBC) を 144 mg 加え、70°C で 1 時間加熱攪拌した。放冷後、反応液に水を加え、生じた沈殿物をろ取し、結晶を酸化リン(V) 上で減圧乾燥させて、Cu-OBTCPP を得た。

(2) -③ Octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine ( $\text{H}_2$ -OBTCPP) の合成

Cu-OBTCPP 40 mg を氷酢酸 20 mL に溶解し、濃硫酸 5 mL を添加して一晩攪拌した。攪拌後、砕いた氷を加え、沈殿物を生成させた。沈殿物をろ取し、水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、さらにろ過した。得られたろ液に少量の濃塩酸を加え、生じた沈殿物をろ取した。結晶を酸化リン(V) 上で減圧乾燥させて  $\text{H}_2$ -OBTCPP を得た。

(3) 放射性金属を用いた標識反応の検討

(3) -① ヒートブロックを用いた検討

$5 \times 10^{-4}$  M の  $\text{H}_2$ -OBTMPyP または  $\text{H}_2$ -OBTCPP の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液 0.3 mL に、 $^{111}\text{InCl}_3$ ,  $^{67}\text{GaCl}_3$  を添加し、室温、60°C、90°C で 10~30 分間加熱した。反応液中の各化合物の標識率を薄層クロマトグラフィーにより分析した。アルミシートシリカゲル 60 (メルク社製) を用い、展開溶媒は OBTMPyP の分析にはメタノール:10%塩化アンモニウム水溶液=1:1 を、OBTCPP の分析にはメタノール:0.5 M 水酸化ナトリウム水溶液=3:1 を用いた。

(3) -② マイクロ波合成装置を用いた検討

$1 \times 10^{-4}$ ~ $1 \times 10^{-3}$  M の  $\text{H}_2$ -OBTMPyP または  $\text{H}_2$ -OBTCPP の 0.2 M 酢酸ナトリウム溶液 0.3 mL に、 $^{111}\text{InCl}_3$ ,  $^{67}\text{GaCl}_3$  を添加し、100~170°C で 5 分間加熱した。反応液中の各化合物の標識率を (3) -① と同様に薄層クロマトグラフィーにより分析した。

(4) 担癌マウスの作製

10% FBS 含有 RPMI 培地で培養した colon26 細胞、および、B16/BL6 細胞を、ddY マウス(雄性、5 週齢)あるいは BALB/c マウス(雌性、5 週齢)の大腿部、および肩に、それぞれ  $5 \times 10^6$  個移植した。

(5) 担癌マウスにおける放射性金属-八臭

素化ポルフィリン錯体の体内分布の検討

(4) で作製した担癌マウスに、尾静脈から放射性金属-八臭素化ポルフィリン錯体を投与し、設定時間後にマウスを屠殺し、血液及び関心臓器を採取し、重量と放射能を測定した。

#### 4. 研究成果

ヒートブロックを用いた加熱による  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  の標識反応では、いずれの温度においても、OBTMPyP, OBTCPP とともに十分な標識率で標識体を得ることができなかった。一方、マイクロ波合成装置を用いた場合、OBTMPyP では  $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  とともに十分な標識率で標識体を得られなかったが、OBTCPP では  $^{111}\text{In}$  を用いた場合に、高い標識率で標識体を得ることができた。そこで、標識反応の条件検討を行った結果、OBTCPP 30 nmol, 160°C, 5 分間の加熱で、標識率 97%で標識体 ( $^{111}\text{In}$ -OBTCPP) を得ることに成功した。

次に、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP の担癌マウスにおける腫瘍集積性と、体内分布に関する検討を行った。担癌マウスとして、colon26 細胞、および、B16/BL6 細胞を移植した BALB/c マウスを用い、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP を尾静脈から投与した後の体内分布を検討した。その結果、いずれの担癌マウスにおいても、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP の血液クリアランスは比較的遅かったが、投与 24 時間後では 0.5% dose/g にまで低下した。また、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP は肝臓、腎臓に高い集積を示したが、腫瘍へも集積し、投与 24 時間後で、いずれの腫瘍へも約 7% dose/g の集積を示し、腫瘍/筋肉比は、9 以上であった。

以上の結果は、 $^{111}\text{In}$ -OBTCPP が腫瘍の種類によらずに集積する可能性を示しており、腫瘍の検診のための診断薬となり得る可能性を有していることを示唆している。

#### 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 Sugihara T., Munesue S., Yamamoto Y., Sakurai S., Akhter N., Kitamura Y., Shiba K., Watanabe T., Yonekura H., Hayashi Y., Hamada J. I. and Yamamoto H.: Endogenous Secretory Receptor for Advanced Glycation End-Products Inhibits Amyloid-beta1-42 Uptake into Mouse Brain. J Alzheimers Dis, 28(3) (2012), 709-720, 査読有  
DOI : 10.3233/jad-2011-110776
- ② Ogawa K., Takai K., Kanbara H., Kiyada

T., Kitamura Y., Shiba K. and Odani A. : Preparation and evaluation of a radiogallium complex-conjugated bisphosphonate as a bone scintigraphy agent. Nuclear Medicine and Biology, 38(2011), 631-636, 査読有  
DOI : 10.1016/j.nucmedbio.2010.12.004

〔学会発表〕(計 22 件)

- ① 北村陽二, 佐藤恭子, 小阪孝史, 小川数馬, 鶴野いずみ, 道関美祐希, 三輪大輔, 斎藤 寛, 柴 和弘, 食品添加物の赤外スペクトル測定における ATR 法の適用に関する検討, 日本薬学会 第132年会, 2012年3月31日, 北海道大学(北海道)
- ② 小阪孝史, 三輪大輔, 北村陽二, 鶴野いずみ, 道関美祐希, 小川数馬, 川井恵一, 柴 和弘, PETによるアルツハイマー病の早期診断を目的とした新規 VChT イメージング剤の開発, 日本薬学会 第132年会, 2012年3月30日, 北海道大学(北海道)
- ③ 北村陽二, 道関美祐希, 小阪孝史, 鶴野いずみ, 三輪大輔, 太田朱音, 小川数馬, 柴 和弘, 自閉症の治療に効果があるとされるオキシトシンの脳内移行性と代謝に関する検討, 日本薬学会 第132年会, 2012年3月29日, 北海道大学(北海道)
- ④ 小阪孝史, 北村陽二, 鶴野いずみ, 道関美祐希, 三輪大輔, 小川結加, 小川数馬, 柴 和弘, 福島第一原発事故で汚染した野菜の放射能除去法の検討, 日本薬学会 第132年会, 2012年3月29日, 北海道大学(北海道)
- ⑤ 大島伸宏, 秋澤宏行, 趙 松吉, 趙 莞, 西嶋剣一, 北村陽二, 荒野 泰, 久下裕司, 大倉一枝, アスパラギン酸で負電荷を付与した  $^{111}\text{In}$ -DTPA-D-Phe<sup>1</sup>-オクトレオチド誘導体の受容体親和性および体内動態の評価, 日本薬学会 第132年会, 2012年3月29日, 北海道大学(北海道)
- ⑥ Shiba K, Kitamura Y., Kozaka T, Shimizu K, Masumoto K, Hirota M, Higaki S. The radioactivity removal of contaminated vegetables caused by the Fukushima nuclear accident. The 7th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring, Oarai, 2011.12.3, Oarai Park Hotel, (Ibaraki)
- ⑦ 神原弘弥, 小川数馬, 清野 泰, 森哲也, 柴和弘, 北村陽二, 小阪孝史, 黄檗達人, 小谷明, シグマ受容体を標的とした放射性薬剤開発に向けた基礎検討, 第11回放射線医学薬品・画像診断薬研究会, 2011年12月3日, 京都テルサ(京都府)
- ⑧ 鶴野いずみ, 小阪孝史, 北村陽二, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴 和弘, VChT イメージング用新規プローブの合成とその評価, 第11回放射線医学薬品・画像診断薬研究会, 2011年12月3日, 京都テルサ(京都府)
- ⑨ 北村陽二, 小阪孝史, 小川結加, 鶴野いずみ, 太田朱音, 榎本和義, 柴 和弘, 福島第一原発事故により汚染した野菜の放射能除去の可能性, 第10回日本放射線安全管理学会学術大会, 2011年12月2日, 東京工業大学(すずかけホール)(神奈川県)
- ⑩ 小阪孝史, 鶴野いずみ, 北村陽二, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴 和弘, Vesamicol 誘導体を用いた新規 VChT イメージング剤の開発, 第51回日本核医学会学術総会, 2011年10月29日, 筑波大学(茨城県)
- ⑪ 神原弘弥, 小川数馬, 清野 泰, 森 哲也, 北村陽二, 小阪孝史, 柴 和弘, シグマ受容体イメージングを目的とした放射性臭素標識化合物の開発, 第51回日本核医学会学術総会, 2011年10月29日, 筑波大学(茨城県)
- ⑫ Ogawa K, Kanbara H, Shiba K, Kiyono Y, Mori T, Kitamura Y., Kozaka T, Kiwada T, Odani A, Development and evaluation of a radiobromine labeled sigma ligand for tumor imaging, EANM'11 - Annual Congress of the European Association of Nuclear Medicine 2011.10.17, Birmingham (UK)
- ⑬ 小阪孝史, 鶴野いずみ, 北村陽二, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴 和弘, アルツハイマー病の早期診断を目的としたデカリンベサミコール誘導体の開発, 第9回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 2011年9月12日, ホテル箱根アカデミー(神奈川県)
- ⑭ Kadowaki S, Kitamura Y., Hiromura M, Kamino S, Taniguchi M, Mifune M, Yoshikawa Y, Saji H, Enomoto S, Development of Zn-DTS complexes for antidiabetic agent on oral administration, The 5th International Conference on Metals and Genetics (ICMG2011), 2011.9.7, KOBE (Japan)
- ⑮ Takenaka F, Kitamura Y., Kamino S, Akizawa H, Arano Y, Enomoto S, Study on the reduction of renal uptake of radio-labeled octreotide derivatives, The 5th International Conference on Metals and Genetics (ICMG2011), 2011.9.7, KOBE (Japan)
- ⑯ 門脇沙緒莉, 北村陽二, 廣村 信, 神野伸一郎, 谷口将済, 御船正樹, 吉川 豊,

佐治英郎, 榎本秀一, 経口糖尿病治療薬を目的とした Zn-DTS 錯体の開発, 第 22 回日本微量元素学会学術集会, 2011 年 7 月 2 日, 京都テルサ (京都府)

- ⑰ 北村陽二, 安部 潤, 上田真史, 小川数馬, 小阪孝史, 柴 和弘, 佐治英郎, 脳虚血時における亜鉛の挙動と神経細胞への影響に関する基礎的検討, 第 22 回日本微量元素学会学術集会, 2011 年 7 月 2 日, 京都テルサ (京都府)
- ⑱ Takenaka F, Kitamura Y, Akizawa H, Arano Y, Enomoto S, Study on the reduction of renal uptake of radio-labeled octreotide derivatives, 3rd International Symposium on Metallomics 2011 (ISM2011), 2011.6.18, Munster (Germany)
- ⑲ Takenaka F, Kitamura Y, Kamino S, Akizawa H, Arano Y, Enomoto S, Development of radiogallium- DOTA complex conjugated bone seeking compounds for PET bone imaging, 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム SRM2011, 2011 年 6 月 25 日, 千葉大学 (千葉県)
- ⑳ 大島伸宏, 秋澤宏行, 趙 松吉, 趙 莞, 藤岳夕歌, 西嶋剣一, 北村陽二, 荒野泰, 久下裕司, 大倉一枝, アスバラギン酸で負電荷を付与した <sup>111</sup>In-DTPA-オクトレオチドの腎集積性および *in vitro* における腫瘍集積性の評価, 日本薬学会北海道支部第 136 回例会, 2011 年 5 月 22 日, 札幌コンベンションセンター (北海道)
- ㉑ 竹中文章, 北村陽二, 神野伸一郎, 秋澤宏行, 荒野 泰, 榎本秀一, 放射標識 DOTA 結合 octreotide 誘導体の腎集積低減に関する検討, 第 6 回 日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2011 年 5 月 27 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)
- ㉒ 小阪孝史, 鶴野いずみ, 北村陽二, 太田朱音, 小川結加, 小川数馬, 川井恵一, 絹谷清剛, 柴 和弘, o-Iodo-trans-decalinvesamicol (OIDV); 新規 VAcHt イメージング剤としての可能性, 第 6 回 日本分子イメージング学会総会・学術集会, 2011 年 5 月 27 日, 神戸国際会議場 (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://ri-center.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 陽二 (KITAMURA YOJI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号: 10368483

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし