

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401  
 研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23701091  
 研究課題名（和文） 小型サイクロトロンを用いた生体高分子プローブ標識用長半減期RIの製造  
 研究課題名（英文） Production of long-lived radioisotopes using small cyclotron for labeling of biomacromolecules  
 研究代表者  
 金山 洋介 (KANAYAMA YOUSUKE)  
 独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員  
 研究者番号：60435641

## 研究成果の概要（和文）：

長時間の追跡が必要となる生体高分子の PET プローブの開発のため、小型サイクロトロンによる長半減期ポジトロン放出金属核種の製造法を検討した。金ディスクを支持体とした簡便な Y 箔照射法を確立し、半減期 78.4 時間の  $^{89}\text{Zr}$  製造に成功した。 $^{89}\text{Zr}$  標識抗体を作成し、担がんマウス PET イメージングにおいて投与後 8 日後の時点でがん部位への集積を確認できた。本金属箔照射法は金属箔を用いた様々な RI 製造に応用が可能と考えられる。

## 研究成果の概要（英文）：

For development of biomacromolecular PET probes which require long-term tracking, a production method for long-lived positron-emitting metal radionuclides was investigated using small cyclotron. We established a convenient method for yttrium-foil irradiation with a gold disc support and succeeded the production of  $^{89}\text{Zr}$ , which has a half-life of 78.4 hours. In a PET imaging of tumor-bearing mouse with the  $^{89}\text{Zr}$ -labeled antibody, high accumulation was observed in tumor regions even 8 days after injection. This metal-foil target irradiation method has a potential for various radioisotope productions.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

## 研究分野：分子イメージング

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍診断学

キーワード： $^{89}\text{Zr}$ 、小型サイクロトロン、RI 製造、PET イメージング、抗体、 $^{65}\text{Zn}$ 

## 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオ工学によりペプチド、核酸、抗体などの生体高分子が様々な疾患の薬剤候補分子として開発が進められる中、分子イメージング法を活用した創薬の高速化と診断への応用に関する期待が高まっている。バイオ医薬品の中でも抗体医薬は、特異性の高さや各種細胞障害活性の存在により分子標的治療薬として重要である一方、治療にかかるコストが高さから、分子イメージング法の適用が果たす役割は大きいと考えられる。国

内外において MRI、超音波、SPECT、PET など様々なモダリティによる分子イメージング法が開発されているが、我々の中でも感度と定量性に優れる PET イメージング法の開発を行ってきた。

抗体は大分子であり、一般に血中滞留性が高く、長期間にわたって追跡・分析が可能な PET プローブ化のために長半減期核種による標識が求められる。このため、物理学的半減期 12.7 時間の  $^{64}\text{Cu}$ 、78.4 時間の  $^{89}\text{Zr}$ 、100.3 時間の  $^{124}\text{I}$  などによる標識法が研究されてい

る。これらは全てサイクロトロンを用いた製造が必要である。 $^{64}\text{Cu}$  は Stanford 大学で製造法が開発され、国内では福井大学が最初に製造法を確立し、その技術を広めることで理化学研究所、放射線医学総合研究所、群馬大学などでの製造が実現してきた。 $^{89}\text{Zr}$  については国外では小型サイクロトロンによる様々な製造法が報告され、整えられている一方で、国内では大型サイクロトロンによる製造例しか報告がなく、利用もごく限られている。また  $^{124}\text{I}$  に関しても同様の状況である。

我々は小型サイクロトロンを用いた  $^{64}\text{Cu}$  製造法を導入し、キレーターを介した抗体への標識法を確立しており、 $^{64}\text{Cu}$  標識抗 HER2 抗体 trastuzumab による HER2 陽性腫瘍のイメージングに関して国内初の臨床試験を国立がんセンター病院との共同研究によって実現した実績がある。しかしながら、 $^{64}\text{Cu}$  では投与後 2-3 日の追跡が限界のため、血中放射能バックグラウンドを十分に低減できない問題がある。また  $^{64}\text{Cu}$  は必須元素であり、キレーターとの結合安定性によっては internalization 後に解離した放射能が生理的集積部位へと再分布され診断に影響する可能性がある。これに関しては  $^{124}\text{I}$  も同様であり、internalization 後容易に抗体から解離するため長い半減期に反して抗体として追跡可能な時間は長くないと考えられている。

これに対し、より長時間の追跡が可能であり、必須元素でないため解離した放射能の再分布の影響が少ないと考えられる  $^{89}\text{Zr}$  は抗体イメージングにおいて理想的な核種と考えられている。例えば Dijkers らは、 $^{89}\text{Zr}$  標識トラスツズマブによる HER2 陽性腫瘍の PET イメージング臨床試験において、投与 7 日後まで撮像を行った結果、投与 4-5 日後にもっとも良好な画像を得たと報告している (*Clin. Pharmacol. Therapeutics*, 87: 586-592, 2010)。小動物実験においても、様々な実験モデルにおいて長期間の検討を可能にする  $^{89}\text{Zr}$  の必要性は高い。この様な背景から、PET イメージング法をより長期間に適用し、様々な抗体、タンパク質などの生体内動態を評価するためには、 $^{89}\text{Zr}$  の汎用的な製造法確立が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究では、理化学研究所分子イメージング科学研究センターに設置されている小型サイクロトロン CYPRIS-HM12 (住友重機械工業株式会社) を用いた  $^{89}\text{Zr}$  及び  $^{65}\text{Zn}$  の製造法の確立を目的として検討を行った。 $^{89}\text{Zr}$  は PET を用いた抗体分子イメージング法をより長期間にわたって実現するために必要である。また一方で、さらに長期間にわたる

追跡を可能にすることは抗体分子の血中半減期の正確な測定や動態評価に有用と考えられ、また理化学研究所で開発中の半導体コンプトンカメラの原理による新しい  $\gamma$  線イメージング装置「GREI」への応用の可能性もあるため、 $^{65}\text{Zn}$  の製造を試みる。

プローブの比放射能がイメージングの成否に重要なため、プローブ標識に適用するためには、実際に投与し撮像する放射能の数倍以上の放射能を、高い比放射能で製造する必要がある。大放射能を得るためには、大型サイクロトロンではなく、PET 核種製造用の大照射電流を利用可能な小型サイクロトロンによる製造が適している。 $^{89}\text{Zr}$  は  $^{89}\text{Y}$  (p,n) 核反応、 $^{65}\text{Zn}$  は  $^{65}\text{Cu}$ (p,n)核反応により生成されるが、両核種とも小型サイクロトロンで照射可能な陽子エネルギーに対し高い核反応断面積を有している。さらに、高比放射能を得るためには、ターゲット核種の純度が高ければ高いほど良いが、 $^{89}\text{Zr}$  のターゲット核種となる  $^{89}\text{Y}$  は天然同位体存在比 100%であり高純度ターゲット材が安価に入手可能である。また、 $^{65}\text{Zn}$  のターゲット核種となる  $^{65}\text{Cu}$  の天然同位体存在比 30.8%であるが、残りは全て  $^{63}\text{Cu}$  であり、 $^{63}\text{Cu}$ (p,n) $^{63}\text{Zn}$  により生成される  $^{63}\text{Zn}$  は半減期 38.1 分のため、安価に入手可能な高純度 Cu を陽子照射後、減衰冷却によってほぼ  $^{65}\text{Zn}$  だけを入手可能である。

本研究ではさらに、 $^{89}\text{Zr}$  標識抗体を用いた担がんモデルマウスの PET イメージングを実施し、どの程度長期間の追跡が可能か検討した。

## 3. 研究の方法

1) ターゲット作成：本研究で使用した小型サイクロトロンは既に  $^{64}\text{Cu}$  製造用の固体照射チャンバーを有しており、 $^{64}\text{Cu}$  製造の際には金ディスク上に  $^{64}\text{Ni}$  を電着メッキすることでターゲット作成を行っている。本研究ではこれに適合したターゲットを作成すること、即ち、金ディスクターゲット上へいかにして標的材料を固定するかが最も大きな課題となる。 $^{89}\text{Zr}$  製造の標的となる  $^{89}\text{Y}$  の照射ターゲットを作成するため、 $\text{Y}_2\text{O}_3$  沈殿法と Y 箔固定法を検討した。沈殿法は Taghilo らの報告 (*Int J Phys Sci.*, 7(14): 2156-216, 2012) を参考に行った。 $\text{Y}_2\text{O}_3$  粉末をエチルセルロースと共にアセトンで懸濁し、金ディスク上に滴下して沈殿させ、乾燥させた。一方 Y 箔固定法は金ディスク上に  $100\ \mu\text{m}$  厚、幅  $10\ \text{mm}$  の八角形状に切断した Y 箔を載せ、その上より  $50\ \mu\text{m}$  厚の Al 箔を貼り付けることで Y 箔固定を行った。この際に金ディスクと Al 箔の間に真空グリースを塗布すること

で Al 箔を固定し、Y 箔の滑落等を防止した。実際のターゲットの写真を図 1 に示す。



図 1.  
 $^{89}\text{Zr}$  製造用ターゲット。  
Al 箔と金ディスクの間に Y 箔を挟み込み固定している。

2)  $^{89}\text{Zr}$  製造・精製： $^{89}\text{Zr}$  製造は Y 箔固定ターゲットに対し 12 MeV, 20  $\mu\text{A}$  のプロトンビーム照射を 45 分行った。また、 $^{65}\text{Zn}$  製造のために Cu 箔を同様に固定したターゲットを 10 分照射した。

$^{89}\text{Zr}$  の精製はイオン交換法とヒドロキサム酸基を付加したキレート分離カラム法の 2 種類を検討した。イオン交換法では Dowex 1X8 陰イオン交換樹脂カラムを用い、12 M HCl 溶液で Zr を結合し、2M HC 溶出させることを試みた。

ヒドロキサム酸カラムに関しては Holland らの手法 (*Nucl Med Biol.*, 36(7): 729–739, 2009) を用いて精製と濃縮を行った。照射した Y 箔は 2 ml の 6M HCl で溶解後、5 ml の水で希釈し、2M HCl で前処理したヒドロキサム酸カラムへと移送しカラムに  $^{89}\text{Zr}$  を吸着させた。2M HCl と水で十分に Y を洗浄後、1M シュウ酸で溶出した。

3) 抗体標識： $^{89}\text{Zr}$  の標識には一般に Fe のキレート薬剤である deferoxamine (以後、Df) が用いられる。Vosjan らの手法 (*Nat Protoc.*, 5(4): 739–743, 2010) により抗体への標識を行った。Df-Bz-NCS (Macrocyclics) を DMSO に溶解し、抗 EGFR 抗体 cetuximab と pH9.0 に調整した生理食塩水溶液中で反応させ、Df-cetuximab とした。PD-10 カラムを用いて未反応の Df-Bz-NCS を除去し、濃縮後、 $^{89}\text{Zr}$  シュウ酸溶液を加え、標識を行った。標識後、限外ろ過カラムを用いて精製し、 $^{89}\text{Zr}$ -Df-cetuximab を得た。標識の際、放射線分解を抑えるためゲンチシン酸を加えた。

4) PET イメージング：担がんマウスを用いて PET イメージングを行った。担がんマウスは BALB/c スードマウスに C6 (EGFR 低発現) と A431 (EGFR 高発現) の 2 種の細胞株をそれぞれ左右の腰部に移植し作成した。 $^{89}\text{Zr}$ -Df-cetuximab を 8 MBq 投与 1、2、4、8 日後に動物用 PET (microPET Focus220, Siemens) を用いて撮像を行った。

#### 4. 研究成果

$\text{Y}_2\text{O}_3$  沈殿法は金ディスク上の狭い領域に対して行った場合にはエチルセルロースが上手く定着せず、指で押すと剥がれる程度の強度しかなかったため、照射には不相当と判断した。このため粉末状の標的の使用は断念し、金属箔形状の Y を用いた照射方法の検討

を行った。その結果、金ディスク上に配置した Y 箔の上から真空グリースを使って Al 箔を被せて押さえとすることで、Y 箔と金ディスクの接触を保ち冷却効率の良好な状態で照射が可能となった。この非常に簡便な手法は Y 箔以外にも応用でき、実際に Cu 箔を使って  $^{65}\text{Zn}$  製造用ターゲットを作製した。

Y 箔ターゲットを使用し、45 分の照射によって照射終了時換算 147 MBq の  $^{89}\text{Zr}$  の製造が可能であった。ヒドロキサム酸カラムによる化学分離によって 99 % 以上の回収率で  $^{89}\text{Zr}$  を精製することができた。高純度 Ge 半導体検出器による精製後の  $^{89}\text{Zr}$  溶液の  $\gamma$  線スペクトルを図 2 に示す。

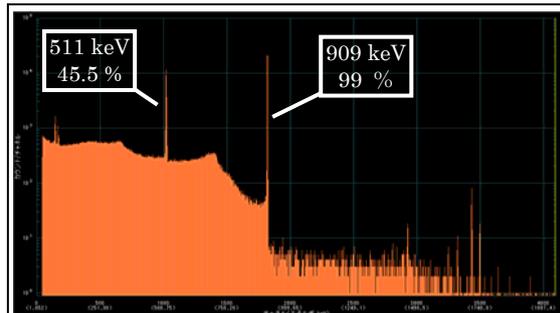


図 2.  $^{89}\text{Zr}$  の  $\gamma$  線スペクトル (精製後) .

また、Cu 箔を使った  $^{65}\text{Zn}$  製造試験も行った。同条件で 10 分間照射を行い、取出し後に同じく  $\gamma$  線スペクトロメトリーを行った所、300 kBq の  $^{65}\text{Zn}$  生成を確認した。本ターゲット作成法によって可能であることを確認した。ただし Cu 箔の溶解、 $^{65}\text{Zn}$  化学分離に関しては環境が整備できておらず、既存の  $^{64}\text{Cu}$  利用に悪影響を及ぼす可能性があるため未だ着手していない。

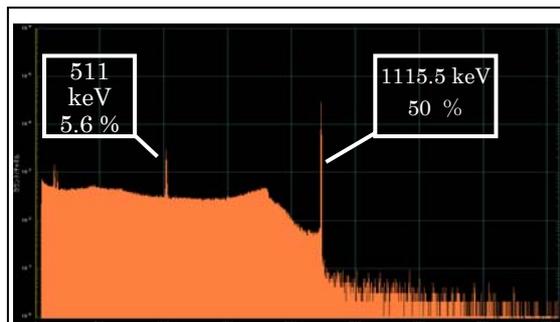


図 3.  $^{65}\text{Zn}$  の  $\gamma$  線スペクトル (Cu 箔) .

抗体への標識に関しては今回の研究では十分な条件検討に至っておらず、標識率は 50% を下回った。この点に関してはキレーター分子導入数などを抗体の活性とのバランスで最適化する必要がある。

PET イメージングの結果を図 4 に示す。投与後 1 日の時点では血中 (心臓)、肝臓中の放射能が高く (SUV=2.1、2.3)、A431 がん部位はこれらより低い値 (1.5) で C6 (1.2) との差も大きくない。投与後 2 日になると血

中放射能は大きく減少し C6 とほぼ変わらない値を示した（心臓=1.3、C6=1.2）。肝臓はやや減少し、A431 はやや増加した。一方、画像から分かるように膝関節や鎖骨部の関節、脊髄に集積増加傾向が見られた。投与後 4 日目では A431 の集積と肝臓の集積が逆転し（A431=2.1、肝臓=1.7）、C6 の集積や血中放射能が減少していることで（C6=1.0、心臓=0.8）、 $^{64}\text{Cu}$  では追跡できない時点で標的部位のコントラストが向上したと言える。しかし一方で関節部、脊髄の集積は大きく増加し、ほぼ A431 と同程度の集積を示した（膝関節=2.1）。投与後 7 日では A431 の集積も若干減少したものの、C6 や肝臓の線量もより減少したために対し、膝関節部の集積は増加した。

これらの結果から、 $^{89}\text{Zr}$  標識によってこれまでより大きく非特異的集積の影響を減少させた状態でのイメージングが可能になったと言える。しかし一方で関節部、脊髄への集積の血中放射能が消失した後も経時的に増加していることから、これらの集積が投

与された  $^{89}\text{Zr}$ -Df-cetuximab としてではないことを示唆している。即ち、 $^{89}\text{Zr}$  は細胞内に取り込まれタンパク質分解を受けた際にキレーターより解離し、細胞内に留まらずに全身循環によってこれらの部位へと集積したと考えられる。このような非特異的な集積は診断精度を悪化させるため、今後  $^{89}\text{Zr}$  標識法を最適化していく上で、この現象が  $^{89}\text{Zr}$ -Df における避けられない集積なのかどうか、検討する必要がある。

本研究により小型サイクロトロンによる金属箔ターゲット照射法を確立し、 $^{89}\text{Zr}$  標識抗体イメージングに成功した。今後、更に  $^{89}\text{Zr}$  の製造・精製・標識法について精度を高めるとともに、他の核種とも比較し、より有用な抗体イメージング法を検討していきたい。本研究で開発した簡便な金属箔照射法は金ディスク等を支持体として使用する固体照射システムを有する多くのサイクロトロンにおいて適用可能なものであり、様々な RI 製造への利用が期待される。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 0 件）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 洋介 (KANAYAMA YOUSUKE)

独立行政法人理化学研究所・分子プローブ動態応用研究チーム・研究員

研究者番号：6 0 4 3 5 6 4 1

(2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者

なし。

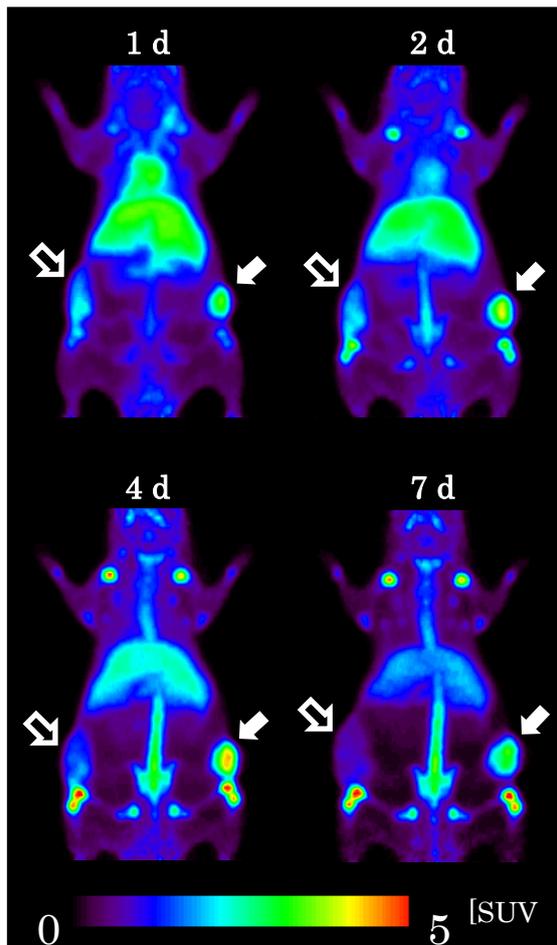


図 4.  $^{89}\text{Zr}$ -Df-cetuximab の担がんマウス PET イメージング像 (MIP). 白矢印：A431 がん部位、黒矢印：C6 がん部位。