

平成22年 4月20日現在

研究種目：基盤研究 (C)
研究期間：2006～2008
課題番号：18591374
研究課題名 (和文) 固形癌の放射線感受性を評価するための PET 薬剤の開発及び実用化
研究課題名 (英文) The development and practical use of the PET pharmaceuticals to evaluate radiosensitivity of the solid carcinoma.
研究代表者
田沢 周作 (TAZAWA SHUSAKU)
財団法人先端医療振興財団・分子イメージング研究グループ・客員研究員
研究者番号：80393346

研究成果の概要：癌治療の一つである放射線治療では低酸素状態の腫瘍細胞は放射線に対する感受性が低くなり、固形癌、特に、肺癌、頭頸部癌及び子宮頸癌において十分な治療効果が得られない。PET によって非侵襲的にイメージングすることは、固形腫瘍における低酸素領域の機能を把握し、放射線治療の治療方針を決定する上で、重要な診断方法である。本研究では、F-18 フルオロミソナダゾールの臨床応用を実現し、Cu-64 ATSM の臨床応用の道筋を付けることができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,800,000	0	2,800,000
2007年度	300,000	0	300,000
2008年度	300,000	0	300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

研究分野：分子イメージング

科研費の分科・細目：基盤研究 (C)

キーワード：ATSM、FMISO、固形癌、放射線治療、治療効果予測

1. 研究開始当初の背景

癌治療方法の一つとして放射線治療が存在するが、日本においては欧米に比べその有用性を十分に活用できていない。現在は、放射線治療の技術革新が活発であり、重量子線及び陽子線治療、強度変調放射線治療 (IMRT)、3Dピンポイント照射など新しい治療機器が開発されている。一方、固形癌、特に、肺癌、頭頸部癌及び子宮頸癌において、低酸素状態の腫瘍細胞は放射線に対する感受性が低くなり、十分な治療効果が得られない。また、低酸素状態にある腫瘍細胞は、化学療法に対する耐性や癌の進行とも関連があり、再発及び転移の割合が高い。そのため、非侵襲的な方法として固形腫瘍の低酸素領

域を機能の面からイメージングすることは、放射線治療を行う上では治療方針を決定する重要な診断方法となる。

2. 研究の目的

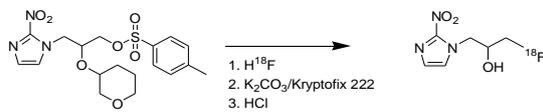
PET は、陽電子放出核種にて標識した薬物を生体に投与し、放射能の分布やその経時的な変化を PET カメラにて撮像することにより、機能的な画像を得る診断法で、非侵襲的に生化学、生理学的情報が得られること、2本のγ線を計測することによって高い分解能と定量性に優れること、更には撮像にコリメーターを使用しないために感度の高い画像を得ることを上げることができる。本研究は、F-18 フルオロミソナダゾールと

Cu-64 ATSM について、細胞や動物を用いて集積機序に関する研究を推進し、それらの実用性を評価することを目的とする。また、F-18 フルオロミソナダゾールについては品質および有効性、安全性に関する非臨床のデータを収集し、臨床応用を実現し、臨床の有用性の評価を実施する。臨床的有用性の評価基準は、1) 放射線感受性を評価することにより治療成績を向上できるか、2) 重点照射部位が明確になり放射線による副作用を低減できるか、3) 外科的手術による無駄な機能損失を低減できるか、4) 外来可能で、安価で一般的放射線治療の適応が増えることにより医療費を低減できるかの4点とする。

3. 研究の方法

(1) F-18 フルオロミソナダゾール

①製造方法



H₂¹⁸O に陽子を照射し、生成した ¹⁸F を陰イオン交換樹脂に吸着させ炭酸カリウム水溶液を用いて溶出させ、得られた ¹⁸F 溶液を濃縮乾固した後、クリプトフィックス 222 の存在下、1-(2'-ニトロ-1'-イミダゾリル)-2-O-テトラヒドロピラニル-3-O-トシルプロパンジオールとアセトニトリル中で加熱し、1-(2'-ニトロ-1'-イミダゾリル)-2-O-テトラヒドロピラニル-3-O-トシルプロパンジオールのトシル基を ¹⁸F で置換した。この反応液を濃縮乾固した後、塩酸水溶液を用いて加水分解し、その溶液を酢酸ナトリウムで中和し、オクタデシル化樹脂を充填したカラムで未反応の ¹⁸F を除いた後に、オクタデシル化シリカゲルを充填したカラムを装着した高速液体クロマトグラフを用い、アセトニトリル/水混液を移動相として分離精製した。安定化剤としてベンジルアルコールを加え、移動相を留去し、生理食塩液を加え放射能濃度を調整した後、ろ過滅菌してガラス製バイアルに充填した。

②品質試験方法

1) 容量：本品の液の質量を測定し、比重換算して容量を求めた。2) 放射能：「放射性薬剤の基準 ガンマ線測定法」により測定した。3) 性状：鉛ガラス越しに肉眼にて無色澄明であることを確認した。4) 不溶性異物：鉛ガラス越しに肉眼にて不溶性異物を認めないことを確認した。5) 確認試験 1 (核種)：「放射性薬剤の基準 ガンマ線測定法 ガンマ線スペクトルの測定法」により 511keV にピークを認めることを確認した。6) 確認試験 2 (半減期)：「放射性薬剤の基準 ガンマ線測定法」により、放射能を経時的に測定し、その減衰から放射能の半減期を算出し、105～115 分の範囲であることを確認した。7) 確認

試験 3 (有効成分)：「放射性薬剤の基準 液体クロマトグラフ法」により、カラムとして YMC-Pack ODS A-302 φ4.6 mm×15 cm を用い、移動相としてアセトニトリル：水混液 (15：85) を用い、流速 1 mL/min、カラム温度 30°C で溶出したとき、フルオロミソナダゾールの保持時間 3.9 分と一致することを確認した。8) 純度試験 1 (異核種)：「放射性薬剤の基準 ガンマ線測定法 ガンマ線スペクトルの測定法」により 511keV と 1022keV 以外にピークを認めないことを確認した。9) 純度試験 2 (有効成分)：「放射性薬剤の基準 液体クロマトグラフ法」により、確認試験 3 と同様に試験するとき、F-18 フルオロミソナダゾールのピークが 95%以上であることを確認した。10) 純度試験 3 (残留溶媒)：「放射性薬剤の基準 ガスクロマトグラフ法」により、カラムとして TSG-1 15% SHINCARBON A60/80 3.2×3100 mm を用い、カラム温度 90°C、インジェクター温度 180°C、FID 温度 180°C、キャリアガス N₂ 70kPa の条件で測定したとき、エタノールは 2000ppm 以下、アセトニトリルは 164ppm 以下であることを確認した。11) pH：「放射性薬剤の基準 pH 試験法」により 5～8 の範囲であることを確認した。

③マウス体内分布とヒト被曝線量推定

ddY マウス (N=3、雄 26～30g、雌 23～26g) をペントバルビタールナトリウム (30mg/kg) 腹腔内投与により麻酔し、F-18 フルオロミソナダゾール (7.4MBq/匹) を尾静脈から投与した 5、10、30、60、120、240 分後に頸動脈瀉血により安楽死させた。血液、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、副腎、脾臓、胃、小腸、大腸上部、大腸下部、精巣 (卵巣)、骨、筋肉、脂肪、甲状腺、膀胱、尿、糞を摘出し、各臓器の放射能を測定した。

各臓器の時間放射能曲線から Residence time (hr) を求め、MIRDose 3.0 ソフトウェアに入力し、成人 70kg における吸収線量 (mGy/MBq) を推定した。

④安全性試験

1) ラットによるフルオロミソナダゾールの単回静脈内投与試験

フルオロミソナダゾールの臨床最大投与量は 0.0015mg/kg である。フルオロミソナダゾールの毒性を評価するために臨床最大投与量の 100 倍量として 0.15mg/kg を 200 倍量として 0.30mg/kg を投与量として設定した。SD ラットを検疫馴化した後に生理食塩液 (対照群) またはフルオロミソナダゾール (低濃度群および高濃度群) を投与 (N=5) し、全例について検疫馴化期間中、投与日、観察期間中および剖検日 (投与 14 日後) に生死の確認と合わせて一般状態の観察と体重測定を行った。剖検日には、体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム (32.4mg/kg) を腹腔内投与し麻酔した後、放血安楽死させ、

外表、内部器官および組織を肉眼的に観察した。

2) ラットによる F-18 フルオロミソナダゾールの単回静脈内投与試験

製造後 6 時間以上たった F-18 フルオロミソナダゾール 37MBq を正常マウス (ddY) に静脈内投与し、生理食塩液を投与した対照群と投与 24 時間後における一般状態および剖検結果を比較することにより急性毒性を評価した。これは、ヒト成人 60kg に換算して 130 (雄) ~160 (雌) 倍の投与量である。

⑤臨床研究

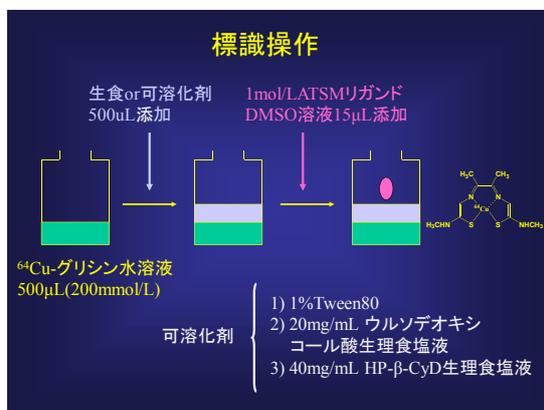
F-18 フルオロミソナダゾール 185~555 MBq を静脈内投与し、1~4 時間後、PET 装置で撮影し、体内動態および安全性を評価した。

(2) Cu-64 ATSM

①標識および製剤化に関する検討

$^{64}\text{CuCl}_2$ に 200mmol/L のグリシン水溶液を添加して調製した ^{64}Cu -グリシン溶液 500 μL に生理食塩液または可溶化剤を添加した生理食塩液 500 μL を添加した後、1mmol/L の ATSM-DMSO 溶液 15 μL を添加し、Cu-64 ATSM 溶液を調製した。生理食塩液のみで調製したものは滅菌ろ過用フィルター (マイルックス GV) にすべて吸着されたのでフィルターろ過は行わなかった。可溶化剤を添加したものはすべてフィルターろ過を行った。

Cu-64 ATSM は、委託合成し TOF-MS で同定した Cu-ATSM と HPLC の保持時間を比較することにより確認した。



②EMT6 移植担癌マウスによる体内分布

EMT6 移植担癌マウス (N=3、雌) をペントバルビタールナトリウム (30mg/kg) 腹腔内投与により麻酔し、Cu-64 ATSM (0.3~2.0MBq/0.1mL) を尾静脈から投与した。投与 5、10、30 分、1、3、6、23 時間後に頸動脈瀉血により安楽死させた。血液、脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、小腸、大腸上部、大腸下部、卵巣、骨、筋肉、皮膚、脂肪、甲状腺、膀胱 (尿含む)、糞、尿を摘出し、各臓器の放射能を測定した。なお、投与した Cu-64 ATSM 注射液には可溶化剤を添加し

なかった。

③正常ラットの PET イメージング

正常ラットに Cu-64 ATSM 注射液 7.4MBq を投与し、投与直後、投与 3 時間後および投与 24 時間後に PET イメージングを 30 分間行い、Cu-64 ATSM 注射液を生理食塩液のみで調製した場合と可溶化剤として 1% Tween または 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンを用いた場合を比較した。

④安全性試験：ラットによる Cu-ATSM の単回静脈内投与試験

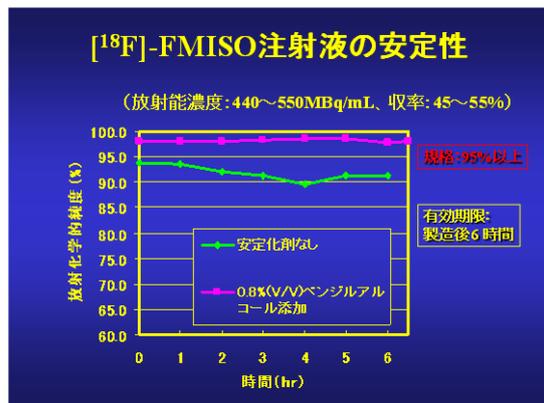
Cu-ATSM の臨床最大投与量は 0.002mg/kg である。Cu-ATSM の毒性を評価するために臨床最大投与量の 100 倍量として 0.02mg/kg を 200 倍量として 0.04mg/kg を投与量として設定した。なお、可溶化剤として 2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリンを用いた。SD ラットを検疫馴化した後、2-ヒドロキシプロピル- β -シクロデキストリン溶液 (対照群) または Cu-ATSM 注射液 (低濃度群および高濃度群) を投与 (N=5) し、全例について検疫馴化期間中、投与日、観察期間中および剖検日 (投与 14 日後) に生死の確認と合わせて一般状態の観察と体重測定を行った。剖検日には、体重を測定後、ペントバルビタールナトリウム (32.4mg/kg) を腹腔内投与し麻酔した後、放血安楽死させ、外表、内部器官および組織を肉眼的に観察した。

4. 研究成果

(1) F-18 フルオロミソナダゾール

①製造および品質試験結果

製造した F-18 フルオロミソナダゾール注射液に安定化剤としてベンジルアルコール (50 μL /バッチ) を添加することにより製造直後から 7 時間、放射化学的純度 95%以上を維持し、有効期限 6 時間を設定することができた。



また、連続して製造した 3 ロットの F-18 フルオロミソナダゾール注射液は、すべて品質試験の規格に適合し、臨床使用に適する品質であることが明らかになった。

[¹⁸F]-FMISO注射液規格設定

試験項目	規格	No.1	No.2	No.3
放射能(MBq)	—	3929.4	4528.8	4876.6
容量(mL)	—	9.1	9.8	8.9
性状	澄明	適合	適合	適合
不溶性異物	認めない	適合	適合	適合
確認試験(1)放射能の確認試験	511keV	適合	適合	適合
確認試験(2)放射能半減期	105~115分	109.1	109.5	109.5
確認試験(3)有効成分(¹⁸ F)FMISO)	FMISOの保持時間と一致	適合	適合	適合
純度試験(1)異核種	511keV, 1022keV以外にピークを認めず	適合	適合	適合
純度試験(2)放射化学的純度	85%以上	99.1	98.0	98.9
純度試験(3)	エタノール	30.0	23.3	15.2
	アセトニトリル	36.5	34.5	12.0
残留溶媒	164ppm以下	—	—	—
エンドキノン試験	0.28EU/mL以下	適合	適合	適合
細菌試験	菌の発育を認めない	適合	適合	適合
pH	5.0~8.0	5.73	6.38	6.43
比放射能	—	35.0	56.0	61.1

②マウス体内分布とヒト被曝線量推定

血液の放射能推移は、雄マウスで 4.9 (5分)、4.1 (10分)、2.8 (30分)、2.1 (60分)、1.5 (120分)、0.6 (240分) %Dose/g、雌マウスで 6.8 (5分)、5.3 (10分)、4.5 (30分)、3.8 (60分)、2.2 (120分)、0.9 (240分) %Dose/g であった。また、各臓器は、血液の放射能推移に対応して分布し、正常臓器への特異的集積は低いことが示唆された。ただし、脳は 60 分まで徐々に集積が、雄マウスで 2.5、雌マウスで 3.6 %Dose/g と上昇し、その後低下した。腎臓から膀胱への排泄は、240 分で 40~50 %Dose、肝臓から大腸への排泄は、20~30 %Dose であった。

マウス体内分布から推定したヒト吸収線量は、小腸、大腸、膀胱においてヒトイメージングによる報告値より高かった。

吸収線量(mGy/MBq)の推定結果

Organ	¹⁸ F-FMISO	¹⁸ F-FMISO	¹⁸ F-FDG	^{99m} Tc-MIBI	¹²⁵ I-MIBG
	マウス	ヒト文献値	ICRP Publication 80		
Kidneys	0.030	0.016	0.021	0.036	0.014
Liver	0.023	0.018	0.011	0.011	0.067
Bone surfaces	0.003	0.008	0.011	0.008	0.011
Red marrow	0.006	0.011	0.011	0.006	0.006
ULI wall	0.146	0.014	0.012	0.027	0.009
Small intestine	0.066	0.013	0.013	0.015	0.008
LLI wall	0.169	0.014	0.015	0.019	0.008
Bladder	0.202	0.021	0.160	0.011	0.048
Total body	0.007	0.013	—	—	—
Effective dose (mSv/MBq)	0.052	0.013	0.019	0.009	0.013

CFR (連邦規則集) : 造血器官、全身は30mGy/回及び50mGy/年、膀胱壁は50mGy/回及び150mGy/年

③安全性試験

1) ラットによるフルオロミソナダゾールの単回静脈内投与試験

フルオロミソナダゾールを 0.15mg/kg および 0.30mg/kg で各群雌雄各 5 匹のラットに単回静脈内投与したときの毒性変化をそれぞれ調べた。

投与日および観察期間中に死亡は見られず、一般状態にもフルオロミソナダゾール投与によると考えられる変化はみられなかった。また、観察期間中、体重にもフルオロミソナダゾールによると思われる変化はみられなかった。

今回実施したすべての検査においてフル

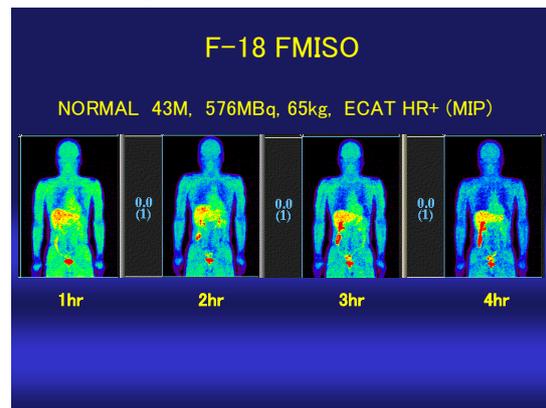
オロミソナダゾール投与に起因すると考えられる変化はみられず、本試験条件下ではフルオロミソナダゾールは毒性を示さないと判断した。

2) ラットによる F-18 フルオロミソナダゾールの単回静脈内投与試験

製造後 6 時間以上たった F-18 フルオロミソナダゾール 37MBq を正常マウス(ddY)に静脈内投与し、生理食塩液を投与した対照群と剖検結果を比較することにより急性毒性を検討した。これは、ヒト成人 60kg に換算して 130 (雄)~160 (雌) 倍の投与量である。その結果、投与 24 時間後において、行動、剖検結果に全く差がなく、本製造工程で製造した F-18 フルオロミソナダゾールの本試験条件下での毒性は示さないと判断した。

⑤臨床研究

成人男性健常人に F-18 フルオロミソナダゾール 576 MBq を静脈内投与し、1~4 時間後、PET 装置で撮影し、体内動態および安全性を評価した。その結果、肝胆道系と尿中排泄が観察され、臓器特異的な集積は少ないことが示唆された。

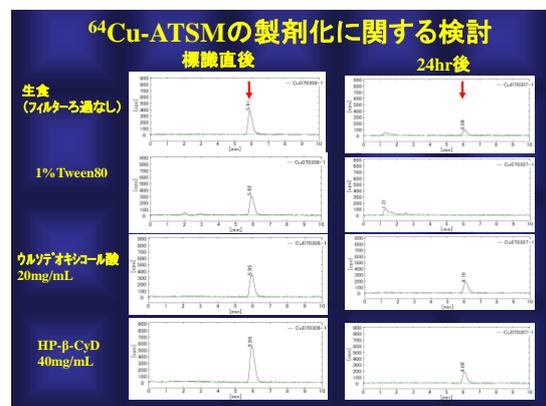


(2) Cu-64 ATSM

①標識および製剤化に関する検討

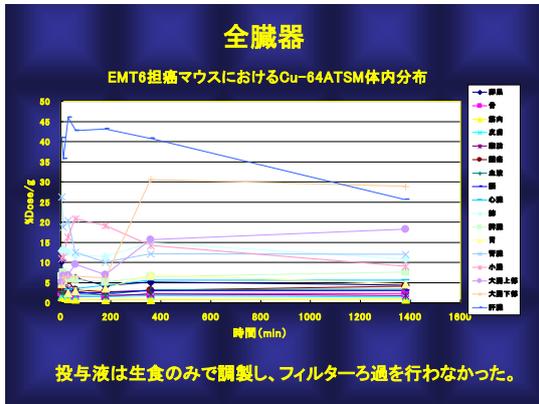
Cu-64 ATSM の標識反応は、室温でほぼ定量的に反応が進行した。

可溶化剤としてウルソデオキシコール酸と 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンを加えることによって水溶液中で安定な錯体となった。



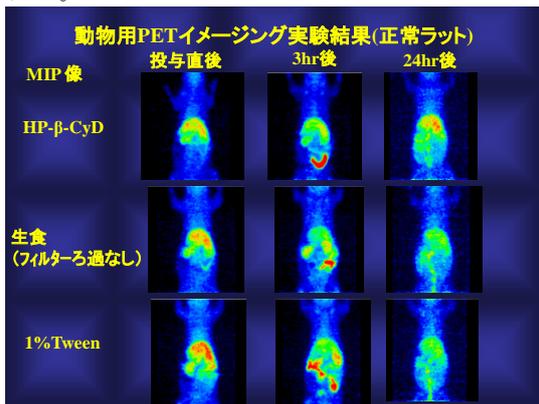
②EMT6 移植担癌マウスによる体内分布

低酸素腫瘍モデルである EMT6 移植担癌マウスによる体内分布試験の結果、腫瘍への集積は認められるが肝臓、肺の集積が高く、各臓器、組織、血液からのクリアランスが遅かった。



③正常ラットの PET イメージング

ラットを用いた PET イメージングでは、肝臓集積後、肝胆道系で排泄され、マウスに比べて正常臓器からのクリアランスが示唆された。



④安全性試験：ラットによる Cu-ATSM の単回静脈内投与試験

Cu-ATSM を 0.02mg/kg および 0.04mg/kg で各群雌雄各 5 匹のラットに単回静脈内投与したときの毒性変化をそれぞれ調べた。また、対照群には生理食塩液を、媒体対照群には 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液を同様に投与した。

投与日および観察期間中に死亡は見られず、一般状態にも Cu-ATSM 投与によると考えられる変化はみられなかった。なお、投与日の投与後 15 分から 3 時間までの間に、雌雄全例で赤色尿（潜血反応陽性）がみられたが、媒体投与群の 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液投与群の雌雄全例でも同じ変化がみられているため、媒体として用いている 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンの持つ溶血作用に起因する変化であると判断した。また、観察期間中、体重にも Cu-ATSM によると思われる変

化はみられなかった。

今回実施したすべての検査において Cu-ATSM 投与に起因すると考えられる変化はみられず、本試験条件下では Cu-ATSM は毒性を示さないと判断した。

(3) 総括

本研究では、F-18 フルオロミソニダゾールの臨床応用を実現し、Cu-64 ATSM の臨床応用の道筋を付けることができた。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

田沢周作、固形癌の放射線感受性イメージング剤 Cu-64 ATSM の安全性試験用高濃度サンプルの可溶化、日本薬学会、2007、富山

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田沢 周作 (TAZAWA SHUSAKU)
独立行政法人理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・研究員
研究者番号：80393346

(2) 研究分担者

富永 英之 (HIDEYUKI TOMINAGA)
群馬大学大学院医学系研究科・分子画像学講座・準教授

研究者番号：00393348

松本 圭一 (KEIICHI MATSUMOTO)
京都医療科学大学・医療科学部・放射線技術学科・助教

研究者番号：60393344

千田 道雄 (SENDA MICHIO)
財団法人先端医療振興財団・分子イメージング研究グループ・グループリーダー

研究者番号：00216558

坂本 攝 (SETSU SAKAMOTO)
財団法人先端医療振興財団・分子イメージング研究グループ・客員研究員

研究者番号：40344402