

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28日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700488

研究課題名（和文） 化学交換飽和移動法を利用する高感度MRI造影剤の開発

研究課題名（英文） Polymeric PARACEST for enhancement of MRI sensitivity

研究代表者

白石 貢一（SHIRAISHI KOICHI）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：40426284

研究成果の概要（和文）：

新たなMRI造影剤として、化学交換飽和移動法（CEST法）を利用する高分子の設計を行い、高分子における水分子の配位環境を制御する高感度PARACEST造影剤の開発を目的とした。本研究において、新たなCEST用配位子としてDOTA(Gly(OEt))₃(CH₂COOH)を合成し、ポリエチレングリコール-ポリL-リシン(PEG-P(Lys))への結合反応条件の最適化を行った。作製した高分子PARACEST造影剤は、キレート基の導入数の増加に伴い、水中における高分子PARACEST造影剤の運動性が低下した。その結果、高分子PARACEST造影剤と水分子との間の交換反応は促進され、ラジオ波照射による飽和移動が非常に早くなってしまった。一方、水中における運動性を適切に保つ設計を行ったPARACEST造影剤は、ラジオ波の照射に伴い、飽和交換が観測された。この飽和交換反応は低分子のキレート化合物よりも、より低濃度、低いラジオ波で観測することができ、高感度なPARACEST造影剤となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We developed novel MRI contrast agent, chemical exchange saturation transfer (CEST) contrast agent, to obtain the image that show high signal to noise ratio by means of magnetization transfer method. A new chelate group for Eu(III) was prepared, and we optimized the condition of the chelate conjugation to PEG-P(Lys) block copolymer. However, NMR experiments indicated that too high extent of chelate conjugation led to lower the mobility of the block copolymer in water. In contrast, appropriate water exchange rate was obtained when we control the composition of block copolymer, and the block copolymer showed CEST effect, effectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：CEST法、高分子ミセル、MRI造影剤、ターゲティング、固形がん

1. 研究開始当初の背景

MRIは重要な医療診断機器の一つである。体内の70%以上を占める水が観測対象であり、水分子の異なる環境によって病状・形態を診断できる。MRI造影剤は観測対象である水の緩和時間を変化させ、画像強度を増高、もしくは減少することによって画像を明瞭化できる。現在、ガドリニウムイオン(Gd^{3+})、または鉄(II)/鉄(III)が造影剤として用いられている。MRIは蛍光・PETと異なり、水が示すバックグラウンドが存在するために明瞭な画像を得るためには十分な量のMRI造影剤を投与する必要がある。しかしながら、MRIの観測対象である水分子は 1H 核を観測するNMRの手法を利用して、新たな画像描出が可能であると期待されている。

MRI造影剤の新しい技術として化学交換飽和移動(Chemical exchange saturation transfer(CEST))法がある。CEST法は観測対象である水分子のプロトンを、化学交換を利用して「一時的に減少させる」ことができる手法であり、画像強度のON-OFF切替えができる。これにより同位置・時間条件において、造影剤存在部位以外の全てがバックグラウンドとなるON画像を得ることができる。

このCEST造影剤の国内における研究例はない。欧米では超偏極法で臨床応用が進められていることから、新しいMRI造影剤の開発・手法への期待は高い。非常に興味深い対象であるが、CEST法の大きな課題は造影剤の感度である。CEST法の原理である水の化学交換を利用する手段は低分子キレート化合物が中心となっており、本申請研究が提案する水の交換速度を合成的及び自己集合ナノ粒子の凝集力の観点から制御し、CEST効果の効率化、及び高感度化につなげる研究例はこれまでにない。このCEST法は自由水の交換反応を制御する必要があり、高分子の遅い運動だけでなく、合成的及び自己会合力(高分子ミセル)の観点から交換速度を制御する点はCEST造影剤の課題を克服できるメリットとなる。

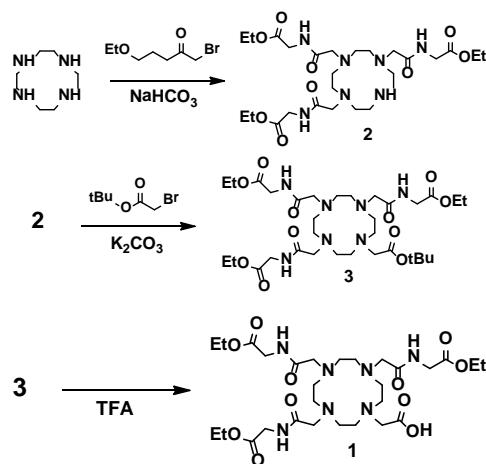
2. 研究の目的

非侵襲的な画像診断方法である磁気共鳴画像(MRI)において、明瞭な画像を得るために高投与量のMRI造影剤濃度が必要とされている。本研究は、低投与量でより明瞭なMR画像を得るために化学交換飽和移動(CEST)法を利用する。水分子の交換速度を高分子合成及び自己集合的ナノ粒子形成法によって制御することで造影剤の高感度化を狙い、バックグラウンドシグナルがなく造影剤存在部位のみが描出され、高いS/N比を有する常磁性金属イオンを用いる高感度PARACEST造影剤の開発を行うことを目的

とした。

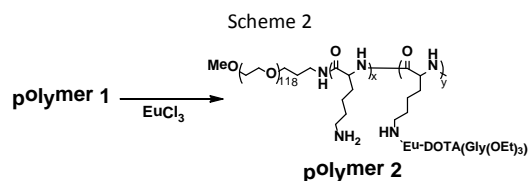
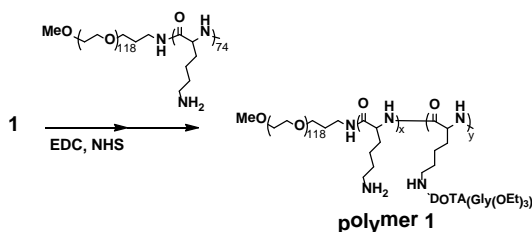
3. 研究の方法

1,4,7,10-Tetraazacyclododecaneから既存の方法を用いて、3置換体化合物**2**を合成した。次に、残りのアミノ基に対してtButoxy bromoacetic acidを反応させ、化合物**3**を得た。**3**の脱tBu化により目的キレート化合物**1**を得



た(Scheme 1)。

1をEDC/NHSを用いて活性化エステルとし、別途合成したPEG-P(L-lysine) (PEG分子量=5,200、Lys重合度74または28、PEG-P(Lys))とをDMF中で反応させ、ポリマー**1**を得た。ポリマー**1**へEu(III)を配位させ、



ポリマー**2**を得た(Scheme 2)。

Eu(III)の定量は誘導プラズマ発光分析(ICP)を用いて行った。合成したポリマー**2**はD-PBS溶液中において、水ピークを中心として+100ppm~-100ppmまでの範囲で 1H -NMRを測定することによりポリマー**2**に含まれるEu(III)キレートへの水分子の配位環境を確認した。また、CEST法は、 1H -NMRスペクトルから得られた情報を基に、照射条件(位置、パワー、時間)を設定し、測定を行った。

4. 研究成果

4. 1 高分子合成

ポリマー**1**の合成はPEG-P(Lys)とキレート基の反応をEDC/NHSを用いて行ったが、フリーのアミノ基を有するPEG-P(Lys)の有機溶媒への溶解性は乏しく、不均一系における反応となり、不溶性となった。一方で、水系における反応においては均一系の反応であるものの、その導入量は非常に低く十分な量のキレート基の導入が困難であった(Table 1)。

Table 1

Run	Polymer /mg	Chelate /eq	Yield /mg	Number
1	54.8	0.20	48.5	<0.2
2	109.5	0.20	146.6	n.d.
3	109.8	0.10	121.4	n.d.
4	20.0	0.20	19.5	1.3
5	20.0	0.20	20.6	n.d.
6	20.0	0.20	21.6	1.4
7	20.0	0.40	21.9	3.1

次に、均一系での反応を行うためにPEG-P(Lys)の有機溶媒への溶解性を高めるために、過剰量のトリフルオロ酢酸(TFA)に溶解させ、PEG-P(Lys-TFA)とし、有機溶媒に可溶にした。キレート基の導入数は¹H-NMRによって決定した(Table 2)。

Table 2

Run	Polymer /mg	Chelate /eq	Yield /mg	Number chelate
Lys=74unit				
1	24.5	0.20	43.5	8.7
2	76.9	0.20	114.7	6.8
3	150.0	0.50	299.1	17.0
Lys=28unit				
4	50.5	1.0	73.3	15.0
5	50.5	2.0	77.9	16.9
6	50.5	1.0	80.6	15.2
7	50.5	2.0	88.6	17.2

Run1-3,6,7は50°C Run4,5は室温における反応

作製したポリマーにおいて、Lys鎖=74の場合には水への溶解性が低下し、ポリマーの運動性が落ちていることが¹H-NMRにより明らかとなった。一方、Lys鎖=28の場合には、水に十分に溶解し、その運動性が保たれていることが明らかとなった。

次に、キレート基へのEu(III)の導入数はICPにより算出され、ほぼキレート基に対してEu(III)が配位されていることが明らかとなった。Eu(III)の配位数はICP測定、キレートの導入数はNMR測定によるものであり、この測定感度の違いが原因と考えられる。キレート基の導入数の増加に伴いポリマーの運動性が悪くなっていることが¹H-NMRより示唆され

た。

4. 2 CEST法

別途合成した4置換体Eu(III)錯体**1**(Eu(III)=150mM)を用いてCEST法を検討した。照射パワー28μT、照射時間10秒として水を基準値の0.0ppm)とした際の前後100ppmを1.0ppmごとに測定を行った。照射された磁場によって、Eu(III)へ配位した水分子は自由な水分子と交換されるためにピークの減少(図1、矢印部分)を伴う。一方、水分子への直接の磁場照射は水分子そのもののピークが減少する(下図●部分)。これによって、CEST効果を確認した。

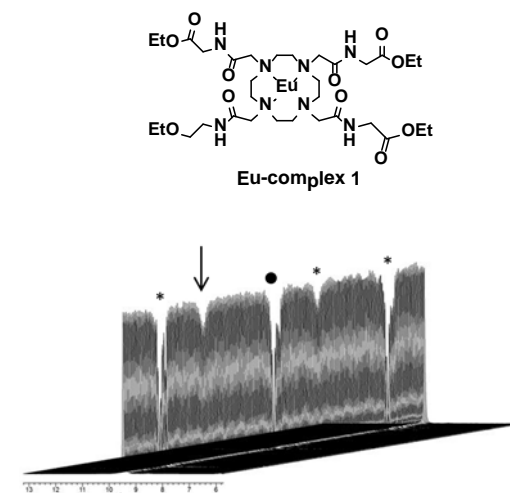


図1 水のピークに対して照射位置を-100~+100ppmまで変化させたときのD-PBS中におけるEu錯体**1**のCESTスペクトル●water peak, * indicates artifacts.

その結果、水(●印)ピークから正方向に50ppmの化学シフトにEu(III)に配位した水分子にCESTが起こり相当するピークの減少が観測された。

一方、高分子にEu(III)をキレート化させたポリマー**2a**

(PEG-P(Lys(74)-Eu(15)-DOTA(Gly(OEt))₃(17)))において、同条件下において測定した結果、非常に不均一でブロードなCEST効果を示した(図2)。この原因として以下のことが考えられる。

1. 高分子の動きが非常に緩慢になり、水分子とEu(III)との間の交換速度が効果的になされ、設定していた水分子の縦緩和時間よりも早くなってしまった。
2. 多量に残存するアミノ基と配位する水分子がEu(III)と水分子の交換反応を阻害してしまった。

作製したポリマー(Lys=74)の水への溶解性(運動性)はキレート基の導入数の増加に伴い、緩慢になった。ポリマー中へのEu(III)錯体濃度を高める必要がある点と相反した関

係となってしまった。アミノ基の残存は高分子ミセルを形成させ、CEST 効果を制御するための官能基であったが、ポリマー自身の緩和時間が非常に早くなってしまったためと考えられる。

水溶性が高く、Lys鎖が短いポリマー**2b**

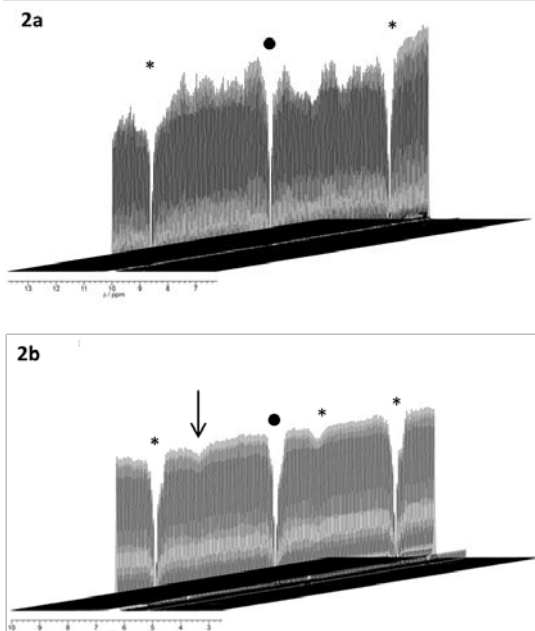


図2 水のピークに対して照射位置を-100~+100pm まで変化させたときの D-PBS 中におけるポリマー**2a** 及び **2b** の CEST スペクトル ●water peak, * indicates artifacts.

(PEG-P(Lys(28)-Eu(11)-DOTA(Gly(OEt))₃(15)))は、ポリマー自身の水中における運動性が向上されたために、水分子とEu(III)の間の交換反応が適切になり、CEST効果を示した(図2、矢印部分)。この際、低分子錯体(Eu-complex **1**)と比較して、低濃度のEu(III)濃度(Eu(III)=100mM)、低いラジオ波照射パワー(16μT)により観測された。CESTスペクトルより、効果的なCEST効果が得られたと考えられるが、さらなる高感度化を目指し、高分子PARACEST造影剤の利点を生かした水分子の交換反応場の作製について現在検討を行っている。本研究において作製したPARACEST造影剤が、高感度なPARACEST造影剤となる可能性が示唆された。

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0件)

[学会発表] (計2件)

1. 白石貢一、急性脳梗塞 t-PA 治療時における出血リスクの高分子ミセルMRI造影剤

による評価、第6回日本分子イメージング学会学術総会、神戸、2011年5月27日

2. 白石貢一、Polymeric micelle MRI contrast agent detects hemorrhage risk of t-PA leakage in acute ischemic stroke、World Molecular Imaging Congress 2011、米国サンディエゴ、2011年9月10日

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白石 貢一 (SHIRAIISHI KOUICHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号: 40426284

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし