

JAERI -Research

2004-001



JP0450266



がん治療医薬の開発を目指した
放射性レニウムに関する研究(第2次報告)
—製造・標識化合物の合成とその体内動態—

2004年2月

アイソトープ専門部会
放射性レニウムに関する研究グループ

日本原子力研究所
Japan Atomic Energy Research Institute

本レポートは、日本原子力研究所が不定期に公刊している研究報告書です。
入手の問合せは、日本原子力研究所研究情報部研究情報課（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村）あて、お申し越しください。なお、このほかに財団法人原子力弘済会資料センター（〒319-1195 茨城県那珂郡東海村日本原子力研究所内）で複写による実費頒布をおこなっております。

This report is issued irregularly.

Inquiries about availability of the reports should be addressed to Research Information Division, Department of Intellectual Resources, Japan Atomic Energy Research Institute, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 〒319-1195, Japan.

©Japan Atomic Energy Research Institute, 2004

編集兼発行 日本原子力研究所

がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究（第2次報告）
—製造・標識化合物の合成とその体内動態—

日本原子力研究所東海研究所研究炉部
アイソトープ専門部会
放射性レニウムに関する研究グループ

(2004年1月6日受理)

本研究は、アイソトープ専門部会の放射性レニウムに関する研究グループ（原研及び協力研究機関）の下で行われたものであり、1998年3月の第1次報告（JAERI-Research 98-015）以降に得られた放射性レニウム ^{186}Re 及び ^{188}Re の製造、放射性レニウムを用いた標識化合物の合成及びその標識化合物のマウス体内動態に関する成果をまとめたものである。

放射性レニウムの製造に関して、原子炉を用いた ^{186}Re 製造法の改良、加速器を用いた $^{186}\text{W}(\text{d}, 2\text{n})^{186}\text{Re}$ 反応による無担体 ^{186}Re の励起関数の測定、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる無担体 ^{188}Re の濃縮法の検討及びPZCを利用した $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの調製に関する検討を行った。次に、放射性レニウム標識化合物合成における穏和な条件の探索、腫瘍骨転移の疼痛治療に関する新規製剤の開発、放射性レニウム標識抗体・ペプチドにおける母体化合物となる有機レニウム化合物の開発、放射免疫療法による癌転移巣の制御に関して検討を行った。また、基礎的検討として、二官能性配位子として有用な MAG3, MAMA の ^{188}Re 標識及び ^{188}Re 標識アミノメチレンリン酸化合物のヒドロキシアパタイトへの吸着挙動に関する研究を行った。

Development of Pharmaceuticals with Radioactive Rhenium for Cancer Therapy

(The Second Report):

Production of ^{186}Re and ^{188}Re , Synthesis of Labeled Compounds
and Their Biodistributions

Isotope Research and Development Division

Consultative Committee of Research on Radioisotopes

and

Working Group on Radioactive Rhenium

Department of Research Reactor

Tokai Research Establishment

Japan Atomic Energy Research Institute

Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken

(Received January 6, 2004)

This work was carried out by the Working Group on Radioactive Rhenium, consisting of researchers of JAERI and some universities, in the Consultative Committee of Research on Radioisotopes. The results on production of the radioactive rhenium isotopes, synthesis and biodistribution of their labeled compounds, obtained after the first report (JAERI-Research 98-015) published in March, 1998 were collected in this report.

For production of radioactive rhenium, production method of ^{186}Re using a reactor was improved. Excitation functions of the $^{186}\text{W}(\text{d}, 2\text{n})^{186}\text{Re}$ reaction was measured. Concentration method of ^{188}Re obtained from a $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generator and preparation of $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators using PZC were investigated. Researches on search for moderate conditions in the synthesis of rhenium labeled compounds, development of ^{186}Re -labeled compounds for palliation of metastatic bone pain, development of organometallic rhenium compounds for tumor radiotherapy, and radioimmunotherapy of cancer metastases with ^{186}Re labeled monoclonal antibody were carried out. Radiolabeling of bifunctional ligands - MAMA and MAG3 with generator-produced ^{188}Re and adsorption of ^{188}Re complexes with aminomethylenephosphonate (EDTMP, EDBMP and NTMP) on hydroxyapatite were also investigated.

Keywords: Radioactive Rhenium, ^{186}Re , ^{188}Re , RI Production, Labeled Compound, Biodistribution, Radiopharmaceuticals, Cancer Therapy

著者一覧

荒野 泰¹、石岡 典子²、石川 幸治³、出雲 三四六^{4,a}、上原 知也¹、内田 昇二⁵
小川 数馬^{6,b}、絹谷 清剛⁷、小林 勝利^{4,c}、小西 淳二⁸、佐治 英郎⁶、関根 俊明^{2,a}
反田 孝美⁴、蓼沼 克嘉³、照沼 仁³、利波 紀久⁷、野川 憲夫⁹、橋本 和幸⁴、菱沼 行男³
ホリウチ・スズキ・カズコ^{6,d}、間賀田 泰寛^{6,e}、巻出 義紘⁹、松岡 弘充⁴、向 高弘⁸
本石 章司⁴、森川 尚威¹⁰、横山 邦彦⁷、渡辺 智²、Fitri Yunita Djamhur⁴

¹ 千葉大学大学院薬学研究院

² 日本原子力研究所イオンビーム生物応用研究部

³ (株) 化研

⁴ 日本原子力研究所研究炉部

⁵ 東京ニュークリアサービス (株)

⁶ 京都大学大学院薬学研究科

⁷ 金沢大学大学院医学系研究科

⁸ 京都大学大学院医学研究科

⁹ 東京大学アイソトープ総合センター

¹⁰ 原研アイソトープ専門部会

^a 現 (財) 放射線利用振興協会

^b 現 京都府立医科大学

^c 現 日本原子力研究所国際原子力総合技術センター

^d 現 浜松ホトニクス株式会社中央研究所

^e 現 浜松医科大学光量子医学研究センター

編集委員会 委員

荒野 泰 (千葉大学大学院薬学研究院)
遠藤 啓吾 (群馬大学医学部核医学科)
佐治 英郎 (京都大学大学院薬学研究科)
利波 紀久 (金沢大学大学院医学系研究科)
橋本 和幸 (日本原子力研究所研究炉部)
巻出 義紘 (東京大学アイソトープ総合センター)
森川 尚威 (原研アイソトープ専門部会)
横山 陽 (原研アイソトープ専門部会)

編集実行委員会 委員

上原 知也 (千葉大学大学院薬学研究院)
絹谷 清剛 (金沢大学大学院医学系研究科)
小林 勝利 (日本原子力研究所研究炉部)
坂本 文徳 (日本原子力研究所研究炉部)
野川 憲夫 (東京大学アイソトープ総合センター)
橋本 和幸 (日本原子力研究所研究炉部)
向 高弘 (京都大学大学院医学研究科)
本石 章司 (日本原子力研究所研究炉部)

目 次

Contents

1. Introduction	1
2. Production of Radioactive Rhenium	2
2.1 Improvement of Production Method of ^{186}Re Using a Reactor	2
2.2 Excitation Functions of Rhenium Isotopes on the nat.W(d,xn) Reactions and Production of No-carrier-added ^{186}Re	8
2.3 Concentration of ^{188}Re Obtained from a $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generator	12
2.4 Application of PZC to $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ Generators.....	15
3. Radiolabeling with Radioactive Rhenium and its Biodistribution	21
3.1 Search for Moderate Conditions in the Synthesis of Rhenium Labeled Compounds.....	21
3.1.1 Human Serum Albumin Diethylenetriaminepentaacetic Acid	21
3.1.2 D-Penicillamine (3-Mercapto-D-valine)	26
3.1.3 Meso-2,3-dimercaptosuccinic Acid (DMSA)	30
3.1.4 Hydroxymethylene Diphosphonate (HMDP)	32
3.1.5 Conclusions	34
3.2 Development of ^{186}Re-labeled Compounds for Palliation of Metastatic Bone Pain.....	35
3.2.1 ^{186}Re-MAMA-BP	35
3.2.2 ^{186}Re-MAMA-HBP	41
3.2.3 ^{186}Re-MAG3-HBP	46
3.3 Development of Organometallic Rhenium Compounds for Tumor Radiotherapy	51
3.4 Feasibility of Radioimmunotherapy with ^{186}Re-labeled Monoclonal Antibody in Treating Minimal Disease of Cancer Patients	69
3.4.1 Radioimmunotherapy as an Adjuvant Treatment for Minimal Residual Disease: Evaluation in a Liver Metastasis Model.....	69
3.4.2 Comparative Therapeutic Study with ^{131}I-labeled Monoclonal Antibody at Maximum Tolerated Doses: Evaluation in a Liver Metastasis Model.....	73
3.4.3 Therapeutic Effectiveness in a Peritoneal Carcinomatosis Model.....	75
3.5 Radiolabeling with Generator-produced ^{188}Re	91
3.5.1 Mercaptoacetyltriglycine (MAG3)	91
3.5.2 Monoamine-monoamide Dithiols (MAMA)	98
3.5.3 Adsorption of ^{188}Re Complexes with Aminomethyleneephosphonate (EDTMP, EDBMP and NTMP) on Hydroxyapatite	107
4. Conclusions	116
Acknowledgement	117

配位子略号一覽

DMSA : meso-2,3-dimercaptosuccinic acid

DTPA : diethylenetriamine-N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid

D-Pen : D-penicillamine (3-mercaptop-D-valine)

EDBMP : ethylenediamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid)

EDTMP : ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methyleneephosphonic acid)

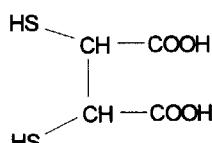
HEDP : 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonic acid

HMDP : 1-hydroxymethylene-1,1-diphosphonic acid

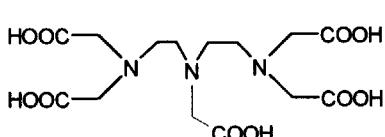
MAG3 : N-[N-[N-[(benzoylthio)acetyl] glysvl]glycyl]glycine

MAMA : monoamine-monoamide dithiols

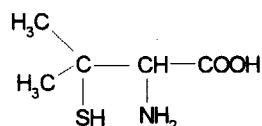
NTMP : nitrilotris(methylenephosphonic acid)



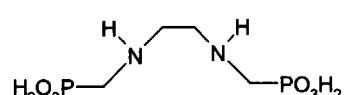
DMSA



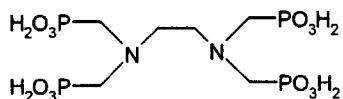
DTPA



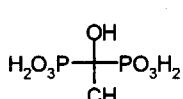
D-Pen



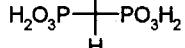
FDBMP



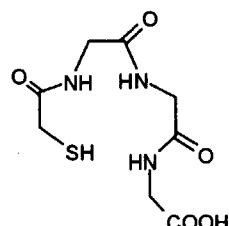
EDTMP



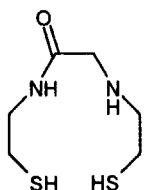
HEDP



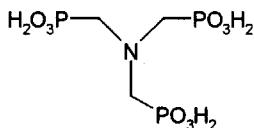
HMDP



MAG3



MAMA



NTMP

This is a blank page.

1. 緒 言

約40年にわたって、種々の放射性同位元素（R I）を製造・頒布する事業を実施してきた日本原子力研究所において、10年前から原研アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会の要請する「今後の開発が期待される医療用R Iの製造・標識」に関する研究の一環として、当時わが国では製造されていない、また輸入が難しい放射性レニウム製造技術の開発研究に取り組み、平成5年に¹⁸⁶Reの定常的製造・製品化に成功した。これを機に、国内の関係分野の研究者が連携して、原研アイソトープ部製造課を軸とした「がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究」の協力研究体制を構築した。また、情報の伝達、実験技術の整合、研究成果の考察と評価のための放射性レニウムに関する研究会が活動してきた。

平成11年度より原研アイソトープ研究員会は新たに設けられた原研施設利用協議会アイソトープ専門部会に改組された。また現在の放射性レニウムに関する研究体制はアイソトープ部製造課から引き継いだ研究炉部アイソトープ研究開発課と千葉大学大学院薬学研究院、東京大学アイソトープ総合センター、金沢大学大学院医学系研究科、京都大学大学院薬学研究科とで構成されている。

協力研究の各グループは原子炉を利用した¹⁸⁶Reの製造及び¹⁸⁸W/¹⁸⁸Reジェネレータの製作とそれを用いた無担体¹⁸⁸Reの調製ならびに加速器を利用して¹⁸⁶W(p, n)¹⁸⁶Re反応による無担体¹⁸⁶Reの製造、¹⁸⁶,¹⁸⁸Reを用いた種々の標識化合物の合成とそれらのマウス体内動態の研究を開始した。レニウムはテクネチウムと周期表上同族であり、^{99m}Tc標識化合物については合成・構造・反応・体内動態がかなり解明されているので、テクネチウムの場合と類似した手法で放射性レニウムも取り扱えるであろうと考えていたが、実際には予期に反することが多く当初は難渋した。しかし、次第に適切に取り扱えるようになったので、試行錯誤の時期を含め、平成9年までの放射性レニウムに関する知見を取りまとめ、「がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究—製造・標識化合物の合成とその体内動態—」を第1次の報告としてJAERI-Research 98-015に発表した。

協力研究の各グループは引き続きそれぞれ独自の観点から、原子炉用いた¹⁸⁶Reの使用の目的・方法に合致した製造方法の改良、加速器を用いた¹⁸⁶W(d, 2n)¹⁸⁶Re反応あるいは¹⁸⁸W/¹⁸⁸Reジェネレータから得られる無担体の放射性レニウム製造技術開発、レニウム標識化合物の穏和で簡便な合成条件の基礎的検討、骨転移癌の疼痛緩和¹⁸⁶Re標識薬剤の開発、がん組織に長時間選択的に留まる有機金属化合物を母体構造とする放射性レニウム標識抗体等の開発、種々の標識化合物の体内動態、大腸癌肝転移モデルを用いた¹⁸⁶Re標識抗体による放射免疫療法などの実験・研究を開拓している。これらの研究は着実に進展し、その成果は更なる展開を期待させるが、一方では成果を集約して現段階における放射性レニウムのがん治療医薬としての可能性を問題点の摘出とともに明らかにすることが重要と考えられる。ここに平成15年までの研究成果を第2次報告として取りまとめた。

2. 放射性レニウムの製造

2. 1 原子炉を用いた¹⁸⁶Reの製造法の改良

(1) はじめに

これまでに、濃縮度 97.4% の ¹⁸⁵Re 金属を用いた ¹⁸⁵Re(n, γ)¹⁸⁶Re 反応による高比放射能 ¹⁸⁶Re の製造法及びその検定技術を確立し、すでに詳細を報告している^{1, 2)}。

¹⁸⁶Re は、原子炉として、通常、JRR-3 の水力照射孔 HR-1 (熱中性子束: $1 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を利用し、5 日間の連続照射を行って製造している。照射直後の比放射能が約 20 TBq · g⁻¹ で、使用時の放射性核種純度が 99% 以上の高純度 ¹⁸⁶Re 製品を年 4~5 回協力研究先に供給している。また、JRR-3 の運転中止などに備え、材料試験炉 (JMTR) の水カラビット照射孔 HR-2 (熱中性子束: $2 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) を利用した製造試験を行い、7 日間の照射直後では、約 3 倍以上の高比放射能 (65 TBq · g⁻¹) の製品が得られることを確認した。

定常的な製造作業においては、遠隔操作の容易さ、高い効率性、製造収率の向上、利用者のニーズに対応する高品質化などが求められる。本稿では、その後に改良を進めてきた溶解方法、濃縮・乾固中のアルゴンガスの導入および出荷用輸送容器への詰替えミスを防止するためのダブルチェック法などについて詳述する。

(2) 製造方法の改良

1) ターゲットの溶解方法

照射済みアルミニウムキャップセルを開封した後、ターゲットの入った石英アンプルを未開封のまま電離箱 (㈱アロカ製) により測定することにより、製造前に全放射能量を求めることができ、製造後の原液の放射能濃度と溶液量から製造収率を容易に評価できる。従来のターゲットの溶解方法は、石英アンプルを開封した後、照射済みレニウムターゲットを直接溶解槽に投入し、さらに少量の 6 M 硝酸で石英アンプル内面を洗い流しながら移し替え、溶解槽を緩やかに加熱して溶解する方法であった。この場合、石英アンプルおよび溶解槽の内面に ¹⁸⁶Re が残存し、製造収率は、60~70% 程度であった。

そこで、溶解槽を用いないで、6 M 硝酸 1 ml ずつ 2 回を直接石英アンプルに加え、約 30 分かけて完全に溶解させた後、原液およびその洗浄液を濃縮装置に導入するように改良した。その結果、原液の回収率が高まり、製造収率は 80% 程度に向上し、その上製造時間も 1 時間程度短縮された。新しく改造した製造装置を Photo 2.1-1 に示す。

2) 濃縮・乾固方法

従来の方法は、硝酸を完全に追い出すため、水 5 ml を加えて濃縮・乾固操作を 5 回ほど繰り返し行い、最終的に水約 10 ml を加えて過レニウム酸溶液 (原液) として回収した。回収した原液の放射能濃度を測定した後、原液の一部を希釀して製品の配分量が約 1 ml 以上になるように放射能濃度に調整した。この後、製品の pH を測定するが、カタログの pH 規格は 3~5 以内と比較的狭い範囲に定めているので、硝酸イオンを取り除くことが出来ず酸性側 (pH < 2) となる場合があった。この場合には、再度原液と製品を濃縮装置に戻し、水を加えて濃縮・乾固を繰り返

し行い、硝酸イオンを完全に取り除く必要がある。そこで、濃縮・乾固を行う際にアルゴン (Ar) ガスを流しながら硝酸イオンを追い出す方法に改めた。これにより濃縮操作に要する時間が軽減されるとともに、製品の pH はいずれも 3~5 以内に再現よく収まるようになった。

3) 出荷用輸送容器の詰替えミスの防止対策

通常、出荷先の放射能量に応じて製品を配分後、それぞれ再度電離箱で測定することにより、放射能から配分量をチェックしている。次いで、出荷先に応じて鉛容器に収納し、A型輸送ダンボール箱に梱包後、専用車両によりアイソトープ協会まで輸送する。東京都内には製造日の翌日（火曜日）、遠距離地では翌々日（水曜日）までに到着するようになっている。研究協力先（6 大学）毎に使用数量と配分量が異なるので、詰替えミス防止のためのダブルチェック法を検討した。

先ず、鉛容器を並べる位置と詰替え順序とを入れ違えなどを防止するため、詰替え手順（マニュアル）を統一し、鉛容器の配列を明示して収納先を確認出来るように改善した。さらに、製品収納後の鉛容器及びその鉛容器を梱包した A 型輸送ダンボール箱両者の放射能量当たりのその表面位置の放射線（漏洩）線量率 [MBq / (μ Sv/h)] を測定し、これを換算率と定義した。鉛容器（5mm 厚）および A 型輸送ダンボール箱におけるそれぞれの換算率の一例を、Table 2.1-1 および Table 2.1-2 に示す。鉛容器表面の換算率は 3% 以内で一致しているが、A 型輸送ダンボール箱表面の場合には鉛容器内の線源から約 15 cm 離れていることから、8% 程度のばらつきがあった。別なロット製造番号での A 型輸送ダンボール箱での換算率は、 132 ± 6 [MBq / (μ Sv/h)] であり、そのばらつきは 4% 程度であった。したがって、表面放射線線量率を測定することにより、¹⁸⁶Re 製品の放射能量を評価することができ、詰め替えミスを防ぐことが可能になった。

参考文献

- 1) “がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究-製造・標識化合物の合成とその体内動態”，原研アイソトープ部 アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会放射性レニウムに関する研究会, JAERI-Research 98-015 (1998).
- 2) K. Kobayashi, S. Motoishi, K. Terunuma A. A. Rauf, K. Hashimoto, *Radiochemistry* 42(6), 495(2000).

This is a blank page.

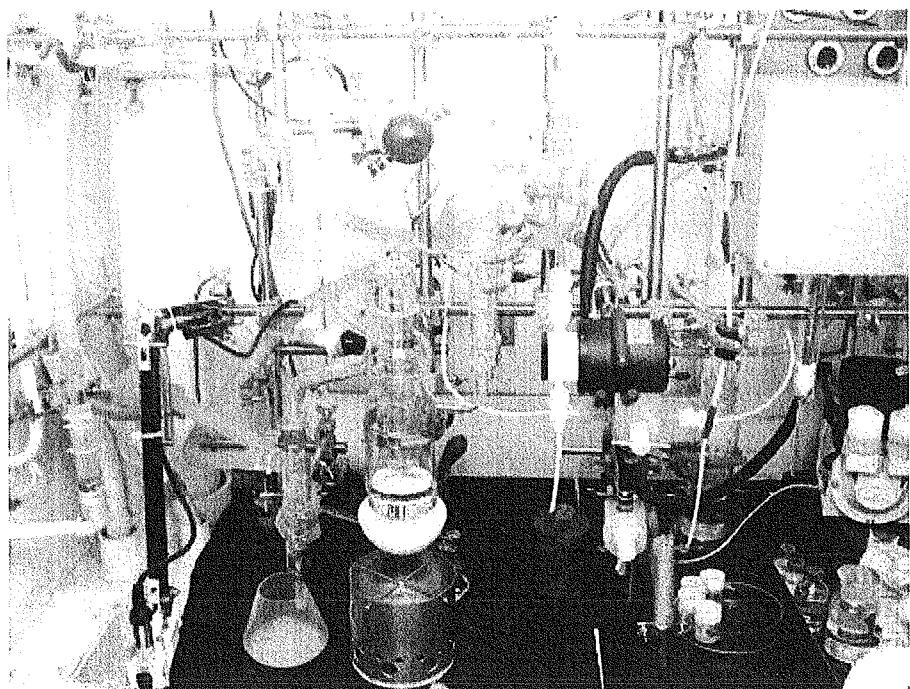


Photo-2.1-1. Apparatus for the production of Re-186.

This is a blank page.

Table 2.1-1. Conversion factor [(MBq)/(μ Sv/h)] of the shipment container (lead: 5mmt).

注文先	配分量 (MBq)	表面線量率 (μ Sv/h)	換算率 (MBq)/(μ Sv/h)
東京大	491	22	22.3
京都大	578	25	23.1
金沢大	1130	50	22.6
千葉大	540	25	21.6
群馬大	578	25	23.1
平均値			22.5±0.63 (2.8%)

Table 2.1-2. Conversion factor [(MBq)/(μ Sv/h)] of the A-type transportation container.

注文先	配分量 (MBq)	表面線量率 (μ Sv/h)	換算率 (MBq)/(μ Sv/h)
東京大	491	3.5	140
京都大	578	4.6	126
金沢大	1130	9.0	126
千葉大	540	4.3	126
群馬大	578	3.9	148
平均値			133±10 (7.7%)

2. 2 $^{nat}W(d,xn)$ 反応におけるレニウム同位体の励起関数と無担体 ^{186}Re の製造¹⁾

(1) はじめに

我々は、イオンビームを用いて β^- 放出核種の製造技術の開発を行っている。これまで、放射性治療薬剤として有用な ^{186}Re を無担体で得るために $^{186}W(p,n)^{186}Re$ 反応における励起関数の測定および化学分離法を確立した²⁾。しかし、放射性治療薬剤として ^{186}Re を臨床応用するためには、この反応では充分な使用量が確保できない。そこで、 ^{186}Re を無担体で効率よく得るために、より多くの生成量が期待できる $^{186}W(d,2n)^{186}Re$ 反応における製造法を検討することとした。これまで、この反応における励起関数の報告はいくつかあり、21 MeVまでの入射エネルギーで実験値が得られている³⁻⁶⁾。これらの報告では、重陽子による最大反応断面積は、陽子を利用した反応における最大反応断面積の少なくとも4倍であると評価されている。しかしながら、報告されている励起関数間には差があり、入射エネルギーの設定および生成量の評価など検証が必要である。

本報告では、我々が測定した $^{186}W(d,2n)^{186}Re$ 反応における 34 MeVまでの励起関数について述べ、すでに得られている $^{186}W(p, n)^{186}Re$ 反応の励起関数と比較する。また、ALICE コードを用いて計算した理論値と実験値についても比較、検討する。

(2) 実験

天然同位体組成のタンクステン箔を KOCH Chemical LTD より購入し、ターゲットとして用いた。タンクステン箔(28.95 mg/cm²)と一緒に、数種類の厚さのアルミニウム箔および薄い銅箔を重ねて積層ターゲットとして調製した。照射は、原研高崎 AVF サイクロトロンの 35 MeV の重陽子ビームを用いて行った。各タンクステン箔への入射エネルギーは、Ziegler's の式⁷⁾に基づいて作られた OSCAR コード⁸⁾による計算から決定した。入射エネルギーの調節は、アルミニウム箔を用いて行った。照射中の平均ビーム電流は銅箔中に生成した ^{65}Zn の放射能から決定した。照射は、0.5 μA のビーム電流で 1 分間行った。照射後の試料は化学分離せずに、HPGe 検出器を用いて各試料中の放射能量を γ 線スペクトルから求めた。検出効率はアマシャム社によって供給された混合 γ 線源を用いて決定した。

(3) 結果と考察

反応断面積は、Fulmer ら⁹⁾によって報告されている $^{65}Cu(d,2n)^{65}Zn$ 反応の励起関数を用いて、 ^{186}Re と ^{65}Zn の放射能量から求めた。Fig.2.2-1 に得られた励起関数とすでに報告されている実験値を示す。我々の励起関数曲線は、13MeV で最大 450 mb に達する。これは、Szelecsényi ら⁶⁾の結果と良く一致する。Zhenlan ら⁵⁾によって与えられた反応断面積は、最大量に関して良く一致しているが、その曲線は Szelecsényi らによってエネルギーがわずかにシフトしている。Fig.2.2-2 は、 $^{186}W(d,2n)^{186}Re$ 反応における励起関数の実験値と理論値を示した。理論的な励起関数はハイブリッドモデル ALICE コードを用いて計算した。その結果、理論値は良く実験を再現しているということが結論づけられる。

(4) まとめ

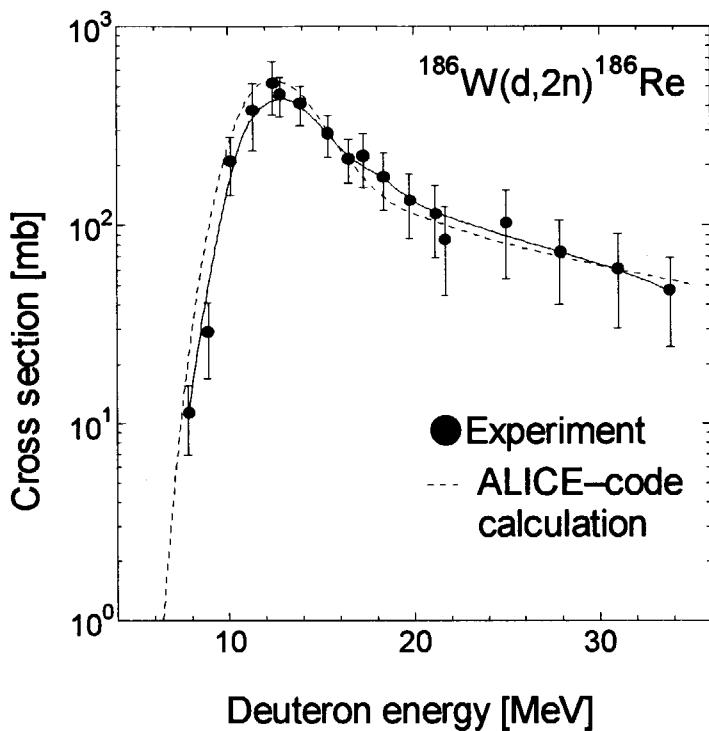
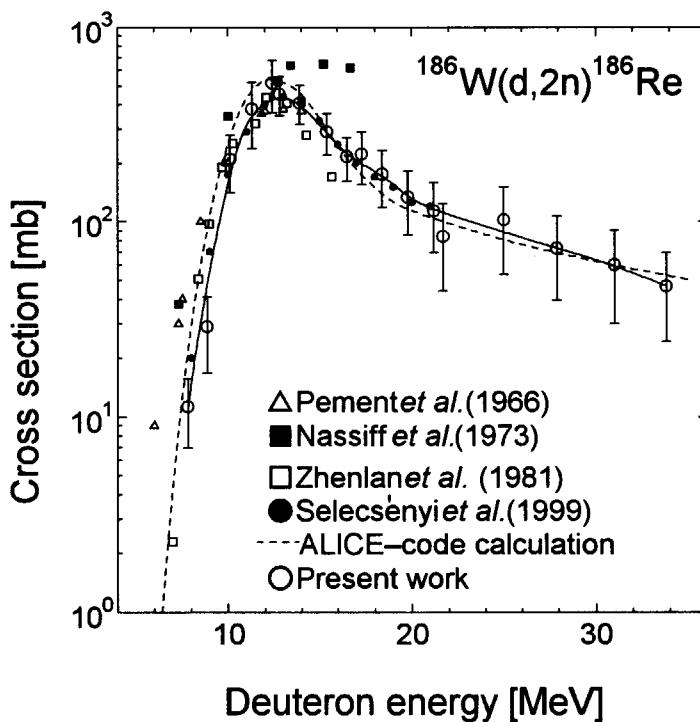
$^{186}\text{W}(\text{d},2\text{n})^{186}\text{Re}$ 反応における反応断面積を、広いエネルギー範囲において実験的に得た。得られた実験値と計算によって求めた理論値は良く一致した。これらの結果から、無担体 ^{186}Re 製造のために適した入射エネルギーを決定した。

参考文献

- 1) N. S. Ishioka, S. Watanabe, A. Osa, M. Koizumi, H. Matsuoka and T. Sekine, "Excitation Functions of Rhenium Isotopes on the natW(d,n) Reactions and Production of No-carrier-added ^{186}Re ", Proc. Int. Conf. on Nucl. Data for Science and Technology ND-2001, *J. Nucl. Sci. Tech.* Supplement 2, 1334-1337 (2002).
- 2) N. Shigeta, H. Matsuoka, A. Osa, M. Koizumi, M. Izumo, K. Kobayashi, K. Hashimoto, T. Sekine and R. M. Lambrecht, *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, 205, 85 (1996).
- 3) S. J. Nassiff and H. Munzel, *Radiochim. Acta.*, 19, 97 (1973).
- 4) F. W. Pement and R. L. Wolke, *Nucl. Phys.*, 86, 429 (1966).
- 5) T. Zhenlan, Z. Fuying, Q. Huiyuan and W. Gongqing, *Chinese J Nucl. Phys.*, 3, 242 (1981) (in Chinese).
- 6) F. Szelecsényi, S. Takács, F. Tárkányi, M. Snock and A. Hermanne, *J Labelled Cpd. Radiopharm.*, 42, S912 (1999).
- 7) J. F. Ziegler, J. P. Biersack and U. Littmark, "The stopping and range of ions in solids, Volume 1 of the stopping and ranges of ions in matter", Pergamon Press (1985).
- 8) K. Hata and H. Baba, *JAERI-M* 88-184 (1988).
- 9) C. B. Fulmer and I. R. Williams, *Nucl. Phys.*, A155, 40 (1970).

Table 2.2-1. Radioactive products and energetics of deuteron induced reactions on ^{nat}W targets.

Radio-Nuclide	Half-life	Contributing reaction	Q-value (MeV)
¹⁸⁷ W	23.9 h	¹⁸⁶ W(d,p) ¹⁸⁷ W	+3.2
¹⁸⁶ Re	90.6 h	¹⁸⁶ W(d,2n) ¹⁸⁶ Re	-3.6
¹⁸⁴ Re	38 d	¹⁸³ W(d,n) ¹⁸⁴ Re	+2.9
^{184m} Re	169 d	¹⁸⁴ W(d,2n) ¹⁸⁴ Re ¹⁸⁶ W(d,4n) ¹⁸⁴ Re	-4.5 -17.5
		¹⁸² W(d,n) ¹⁸³ Re	+2.6
¹⁸³ Re	71 d	¹⁸³ W(d,2n) ¹⁸³ Re ¹⁸⁴ W(d,3n) ¹⁸³ Re ¹⁸⁶ W(d,5n) ¹⁸³ Re	-3.6 -11.0 -23.9
¹⁸² Re	64.0 h	¹⁸² W(d,2n) ¹⁸² Re	-5.8
^{182m} Re	12.7 h	¹⁸³ W(d,3n) ¹⁸² Re ¹⁸⁴ W(d,4n) ¹⁸² Re	-12.0 -19.4
¹⁸¹ Re	19.9 h	¹⁸² W(d,3n) ¹⁸¹ Re ¹⁸³ W(d,4n) ¹⁸¹ Re	-12.9 -19.1

Fig.2.2-1. Excitation functions of the $^{186}\text{W}(\text{d},2\text{n})^{186}\text{Re}$ reaction.Fig.2.2-2. Comparison of experiment and theory for the $^{186}\text{W}(\text{d},2\text{n})^{186}\text{Re}$ reaction.

2. 3 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから得られる ^{188}Re の濃縮についての予備的検討

(1) はじめに

^{188}Re (半減期 17.0 時間) は、 ^{188}W (半減期 69.4 日) の娘核種として、 $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから生理食塩水の溶離によって無担体の形で得られる。原研では、アルミナカラム法により $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータを調製し、標識実験を行っている。一方、協力研究相手先から、動物実験用として、より高い放射能濃度の ^{188}Re が要望されている。ジェネレータから溶出した ^{188}Re は、生理食塩水溶液であるため、そのまま溶媒を蒸発させると NaCl 濃度が増加する。そのため、溶媒の蒸発によって ^{188}Re を濃縮するのは望ましくない。そこで、 ^{188}Re の放射能濃度を高める方法として、溶媒抽出法を検討した。有機溶媒としては、これまでに、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ の溶媒抽出挙動が数多く調べられているメチルエチルケトン (MEK)^{1,2)}を用いた。

(2) 実験

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの調製

三酸化タンゲステン $^{186}\text{WO}_3$ (^{186}W 濃縮度 : 99.79%、ISOTEC) の粉末約 20~50 mg を石英アンプルに封入し、所定のアルミニウムキャップセルに密封後、日本原子力研究所 JMTR (熱中性子束 : $2.7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) または JRR-3 (熱中性子束 : $9 \times 10^{13} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) にて、26~52 日間照射を行った。照射後は、大量に生成する ^{187}W (半減期 : 23.8h) の放射能を減衰させるために、4 週間以上放置した。

照射済みターゲット (WO_3) は 2 M 水酸化ナトリウム溶液で加熱溶解後、室温で放置した。その後、塩酸溶液 (0.1~4 M) を用いて、ターゲット溶解溶液の pH を約 2 に調整し、あらかじめ 0.01 M HCl により調製したアルミナカラム (10 mm I.D. × 60 mm L : BIO-RAD, AG-4, 100-200 mesh) に添加した。さらに、生理食塩水約 40 ml でカラムを洗浄し、ジェネレータとした。 ^{188}Re の溶出は、生理食塩水 (流速 : 約 2 ml/min) により行った。

分配比 (抽出率) の測定

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータから生理食塩水により溶出させた ^{188}Re 溶液 5 ml をバイアル瓶に取り、所定量の水酸化ナトリウムを加えた。そこへ、5 ml の MEK を加えて栓をし、マグネットクスターによって攪拌した。一定時間後、両相から $50 \mu\text{l}$ 分取し、10 ml エタノール (または蒸留水) を入れたバイアル瓶に添加し、 ^{188}Re による溶媒中のチエレンコフ光を液体シンチレーションカウンターで測定して³⁾ ^{188}Re の分配比を求めた。

回収率 (分離収率) の測定

上記方法により ^{188}Re を抽出した MEK 相をバイアル瓶に分取し、ホットプレート上 (表面温度 80~90°C) で窒素ガスを吹き付けて MEK を完全に蒸発させた。その後、一定量の生理食塩水に ^{188}Re を溶解し、放射能を測定し、初期放射能量との比較から、回収率を算出した。

(3) 結果及び考察

最初に、抽出時間と ^{188}Re の抽出率の関係を調べた (Fig. 2.3-1 参照)。その結果、水相の NaOH 濃度が 2 M 及び 4 M の場合共に、5 分~30 分の抽出時間で抽出率は一定であり、抽出時間は 5

分で十分であることがわかった。

次に、抽出時間 5 分での抽出率の NaOH 濃度依存性を調べた (Fig. 2.3-2 参照)。NaOH 濃度を 0~6 M まで変化させて調べたところ、NaOH 濃度が高いほど抽出率が高いことが認められた。抽出率は、2 M で 95%、4 M で 97%、6 M で 98% であった。また、抽出後の MEK を蒸発させた残査について調べたところ、4 M 以上の NaOH を用いた場合では、白色（白黄色）の残査が認められた。以上の結果から、NaOH 濃度としては、2 M が最適であると思われる。また、MEK の除去方法として、窒素気流のみ、加熱のみ (80~90°C, MEK の沸点 79.6°C) 及び両者の併用について検討した結果、5 ml の MEK を蒸発させるのに要する時間は、窒素気流のみでは約 50 分、加熱のみでは 2.5 時間経過後も乾固せず、両者の併用（加熱 + 窒素気流）では約 20 分であった。

抽出前の ^{188}Re 量を 100% としたときの ^{188}Re の回収率について調べた。MEK 除去条件としては、窒素気流のみ及び加熱 + 窒素気流で検討した。その結果、MEK 除去条件の違いによらず、回収率は平均で 93% であった。回収率には、抽出率、MEK 相と水相の分離時のロス及び MEK 除去時のロスが含まれるが、抽出率が 95% であることを考えると他の段階でのロスはほとんどなかったことがわかる。

操作に要する時間について述べると、抽出時間が 5 分、MEK 相の分取に約 9 分（抽出後の放置時間を含む）、MEK の除去に約 20 分を要し、全体としても 40 分あれば全ての操作が終了する。濃縮度については、最終的に何 ml の生理食塩水を蒸発後の ^{188}Re に添加するかで決まるが、5 ml の ^{188}Re 溶液から ^{188}Re を MEK に抽出し、MEK 蒸発後の ^{188}Re に、0.5 ml の生理食塩水を添加する場合を考えてみる。回収率 (93%) 及び操作にかかる時間 (40 分) での半減期補正を考慮すると、濃縮度は、 $(5/0.5) \times 0.93 \times 0.5^{\Delta((40/60)/17)} = 9.1$ になる。

最後に、濃縮操作によって得られた ^{188}Re 溶液の pH を測定したところ、pH 6.1~6.8 ほどであり、ジェネレータから得られた ^{188}Re 溶液の pH (5.8) からわずかに上昇しているが、大きな変化は見られず、使用した NaOH の影響はほとんど見られなかった。また、5 ml から 0.5 ml に濃縮した ^{188}Re 溶液を使用して、MAG3 の標識実験を行ったところ、標識率は、濃縮前の ^{188}Re を用いた場合と同等の値であり、標識にも問題がないことが確かめられた。

参考文献

- 1) E. P. Belkas and D. C. Perricos, *Radiochim. Acta* **11**, 56(1969).
- 2) D. V. S. Narasimhan and R. S. Navi, *J. Radioanal. Chem.* **33**, 81(1976).
- 3) K. N. Kushita and J. Du, *Appl. Radiat. Isot.* **49**, 1069 (1998).

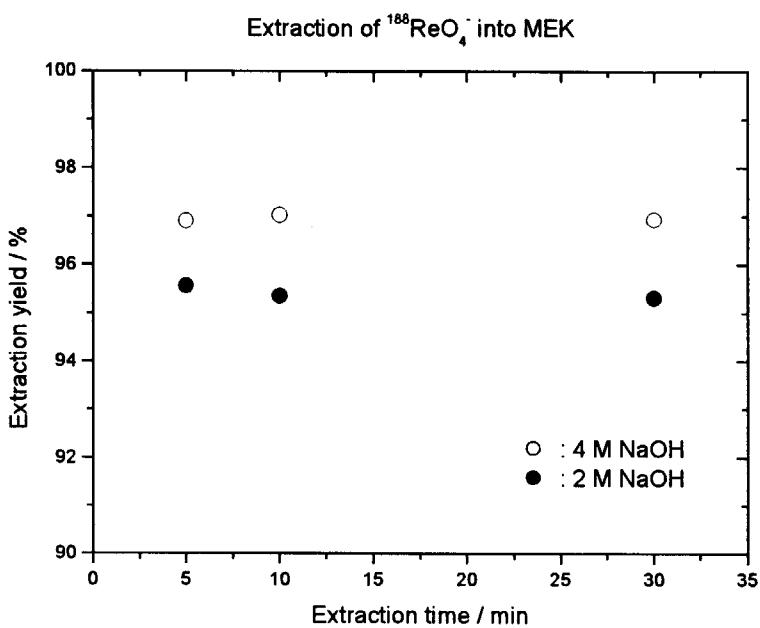


Fig. 2.3-1. Influence of extraction time on extraction yield of ^{188}Re .

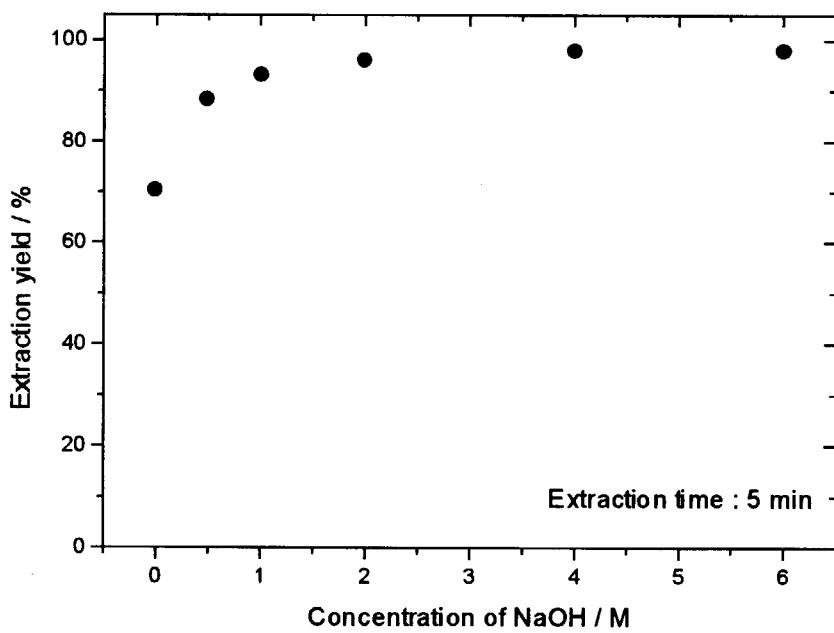


Fig. 2.3-2. Influence of concentration of NaOH on extraction yield of ^{188}Re .

2. 4 PZC を利用した $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの開発

(1) はじめに

各種の癌は進行した場合、多くは骨転移し激しい痛みを患者に与え、この痛みを緩和するのに、高エネルギーの β 線を放出する放射性医薬品が注目されている。放射性核種としては、 β 線に加え画像化に適した γ 線も放出する ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{186}Re および ^{188}Re などが有望視されている。中でも ^{188}Re は、半減期が 17.00 時間、 β 線の最大エネルギーが 2.11 MeV で、さらに、画像化に適した 155 keV の γ 線も放出するなど優れた核的性質を有し、さらに親核種である ^{188}W (半減期 69.4 日) の β^- 崩壊により生成する娘核種であるため、入手が容易である。しかしながら、 ^{188}W は、 ^{186}W の二重中性子捕獲反応により生成するため、比放射能が低い。そのため、従来から使用されているアルミナカラムを使用したジェネレータでは、カラム容積が大きくなり、溶出した ^{188}Re の放射能濃度が低くなる問題点がある。そこで、2. 3 節では、アルミナカラムから溶出した ^{188}Re の濃縮について溶媒抽出法を用いて検討した。さらに、本節では、余計な操作を必要としない、 ^{188}Re の放射能濃度の向上を目指して、原研と株化研が共同で開発したモリブデンの吸着容量がアルミナの 100 倍以上もあるジルコニウム系無機高分子 PZC (Poly-Zirconium Compound)¹⁾ が $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータへ応用可能かどうか、基礎的な検討を行った。特に、 ^{188}W の PZC カラムへの吸着、 ^{188}Re の PZC カラムからの溶離について長期安定性などを調べた。また、PZC カラムから溶離した ^{188}Re の Hydroxyethylidene Diphosphonic Acid (HEDP) と Mercaptoacetyltriglycine (MAG3) への標識を試み、従来のアルミナカラムとの比較を行った。

(2) 実験

^{188}W の生成

親核種 ^{188}W の生成には、 ^{186}W の二重中性子捕獲反応 $^{186}\text{W}(\text{n}, \gamma)^{187}\text{W}(\text{n}, \gamma)^{188}\text{W}$ を利用した。中性子照射は、石英管に封入した 99.79% 濃縮 三酸化タンクス滕 ($^{186}\text{WO}_3$) ターゲット 20 ~ 50 mg を原子炉 JMTR (中性子束 $2.7 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) で 1 または 2 サイクル行った。照射済みのターゲットは ^{187}W の減衰を待ってから 2 M NaOH に加熱溶解し $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ とした。 ^{188}W の生成量は中性子照射終了直後において、100~500 MBq (比放射能 : 5~13 MBq/mg WO_3) であった。

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの調製

ジェネレータ (カラム-A、カラム-B) の調製手順を Fig. 2.4-1 に示した。PZC は、塩化ジルコニウム (ZrCl_4) とイソプロピルアルコールの加熱縮合反応により合成したが、合成のロットにより W 吸着量が少し異なるため、あらかじめ PZC 1 g に対する W の最大吸着量を測定しておき、その量に相当する W キャリアー (500 mg 前後) と、PZC 1 g そして $\text{Na}_2^{188}\text{WO}_4$ 溶液を混合した後、0.1M HCl で pH を 7 前後に保ち、ゆっくり攪拌しながら 90°C、3 時間の吸着反応を終了させた。反応終了後、微粉末化した PZC をデカンテーションにより取り除き、ガラス管 (10 mm ϕ × 100 mm) に入れ、0.9 % NaCl で洗浄してジェネレータとした。

^{188}Re の放射能は、HPGe 検出器を用いて γ 線スペクトルから求めた。

¹⁸⁸Re-HEDP と ¹⁸⁸Re-MAG3 の合成

¹⁸⁸Re-HEDP の合成では、HEDP (35.8 mg/280 μl) 溶液、H₂O (504 μl)、アスコルビン酸 (4.56 mg) 溶液、1M HCl (336 μl)、¹⁸⁸Re 溶液 (400 μl) そして塩化スズ (II) (3.80 mg/120 μl) 溶液の順にポリエチレンバイアルに加え、沸騰水中で 30 分加熱反応させた。そして、¹⁸⁸Re-HEDP の薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析では展開溶媒にアセトンを用いてシリカゲルプレートで、ペーパークロマトグラフィー (PC) 分析では展開溶媒に生理食塩水を用いて Whatman No.1 Paper で行った。

¹⁸⁸Re-MAG3 は、Bz-MAG3 (0.55 mg)、0.1M HCl (450 μl)、Sn-citrate (6 mg SnCl₂/2H₂O/0.1 M citrate[pH=5]) そして ¹⁸⁸Re 溶液 (400 μl) の順にポリエチレンバイアルに加え、沸騰水中で 30-60 分反応させた。反応物は高速液体クロマトグラフィー (カラム: Hypersil C18 BDS-5, [4.6 mm φ × 150 mm]、溶離液: 4% エタノール-0.01 M リン酸溶液 (pH=7)) により分析した。

(3) 結果

1) ¹⁸⁸W の PZC への吸着収率

吸着反応時に加えた ¹⁸⁸W の放射能から、デカンテーションとカラム洗浄液中の ¹⁸⁸W を差し引いて吸着収率を求めた結果、カラム-A で 92%、カラム-B で 95% であった。

2) ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re ジェネレータからの ¹⁸⁸Re の溶離安定性

¹⁸⁸W の β⁻崩壊により生成する ¹⁸⁸Re が最大値を示すのは、ジェネレータ調製後、約 114 時間後である。充分に放射平衡に達した後、154 日間に 0.9% NaCl による 5 回のミルキングを行い ¹⁸⁸Re の溶離安定性を調べた。

¹⁸⁸Re の溶離挙動の例を Fig. 2.4-2 に示した。全てのミルキングにおいて、初めの 4 ml までに大部分の ¹⁸⁸Re が溶離しプロファイルも安定していた。また、溶離液は自然落下であり、その流速は、カラム-A では 0.4 ml/min、カラム-B では 1.9 ml/min であったが流速の影響は無いと判断できた。

溶離収率を Fig. 2.4-3 に示した。溶離収率は約 60~75% の範囲で、長期間安定していた。

3) ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re ジェネレータにおける ¹⁸⁸W の吸着安定性

¹⁸⁸W が PZC カラムから脱離して、¹⁸⁸Re 溶液中に存在するか否かは、溶離液中の ¹⁸⁸W の γ 線を測定する方法と、娘核種 ¹⁸⁸Re の半減期を測定する方法が考えられるが、¹⁸⁸W の γ 線 (290 keV) は、分岐比が 0.8% と小さく Ge 検出器等による測定が困難なため、¹⁸⁸Re の半減期を測定する方法で確認し吸着安定性を調べた。

仮に ¹⁸⁸W が脱離していれば、¹⁸⁸Re の半減期が 17.00 時間より長く観測されることになる。¹⁸⁸Re の半減期の 7 倍に相当する時間測定した結果、カラム-A では、17.07 時間、カラム-B では 16.99 時間であり ¹⁸⁸Re 本来の半減期と良い一致を示した。従って ¹⁸⁸W のカラムからの脱離は観察されなかった。

4) PZC カラムとアルミナカラムから溶離した ¹⁸⁸Re を用いた HEDP と MAG3 の標識

Fig. 2.4-4, 5 に示したように、PZC カラムから溶離した ¹⁸⁸Re を用いた場合も、¹⁸⁸Re-HEDP 及び ¹⁸⁸Re-MAG3 は高い標識率で得られ、従来のアルミナカラムから溶離した ¹⁸⁸Re を使用した結果と大きな差はなかった。

(4) おわりに

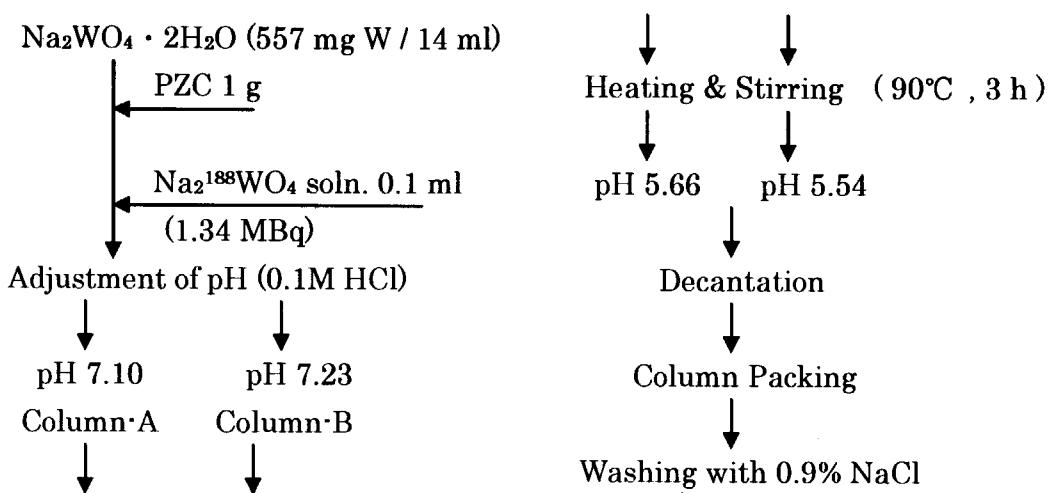
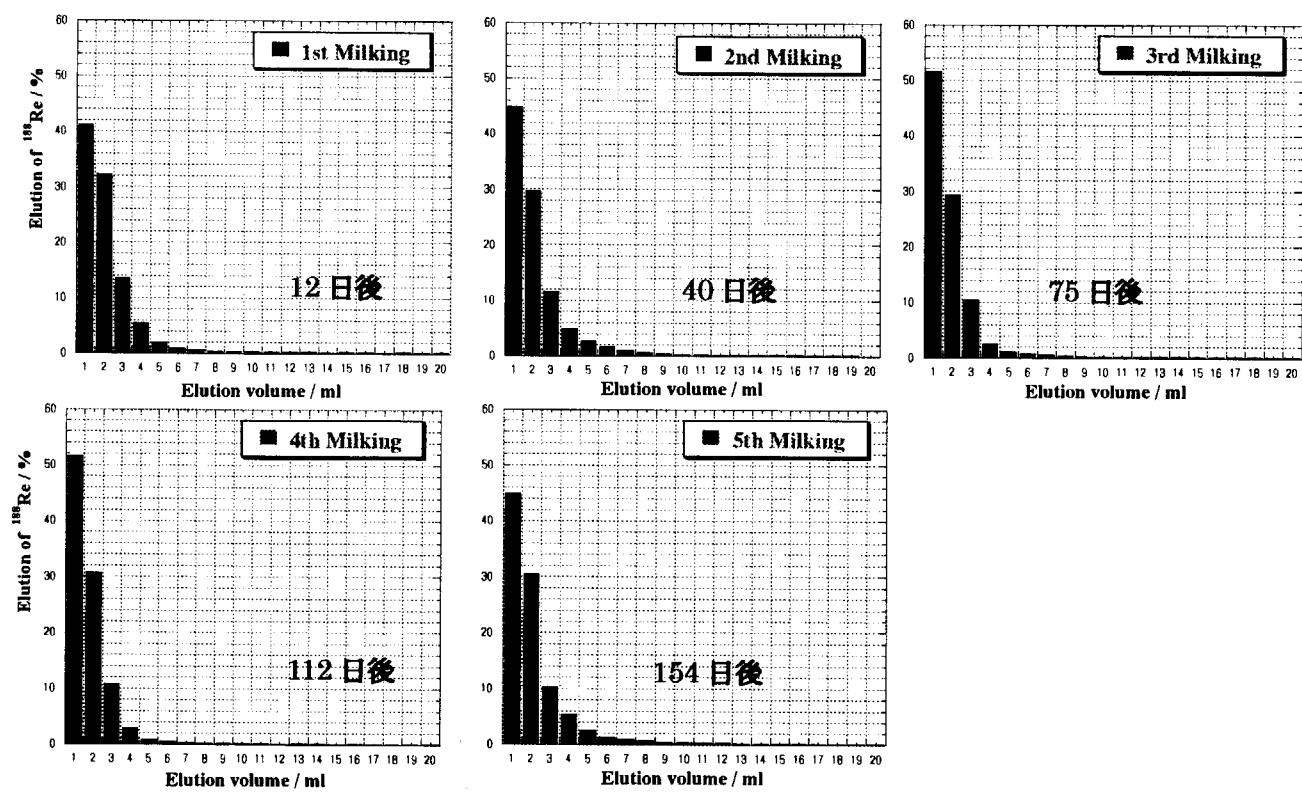
^{188}W の PZC への吸着収率は 90% 以上であった。また、 ^{188}Re は、全てのミルкиングにおいて最初の 4 ml 中に 90% 以上溶離し、溶離収率も時間の経過と共に減少の傾向にあるが 60% 以上で、長期間安定した溶離を示した。

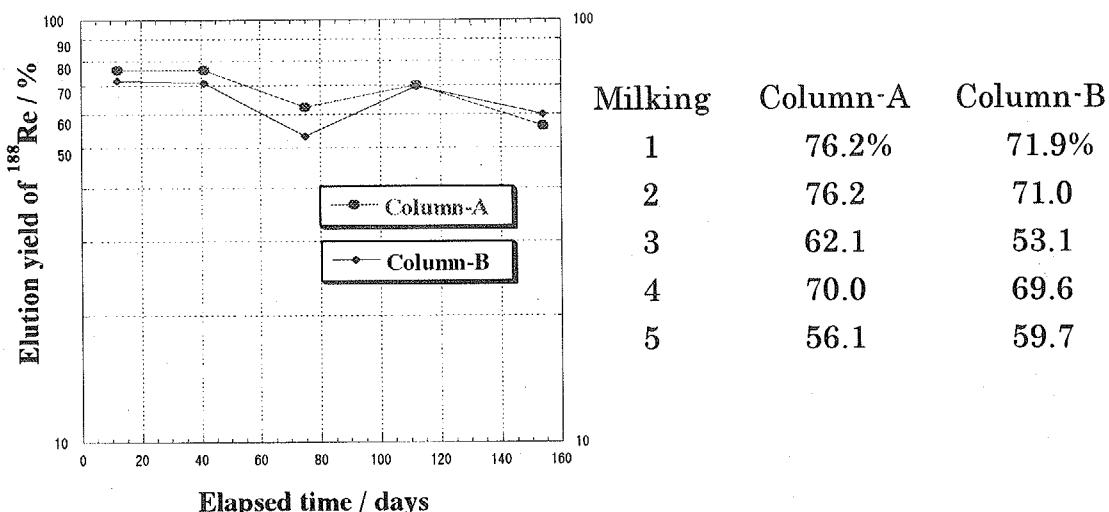
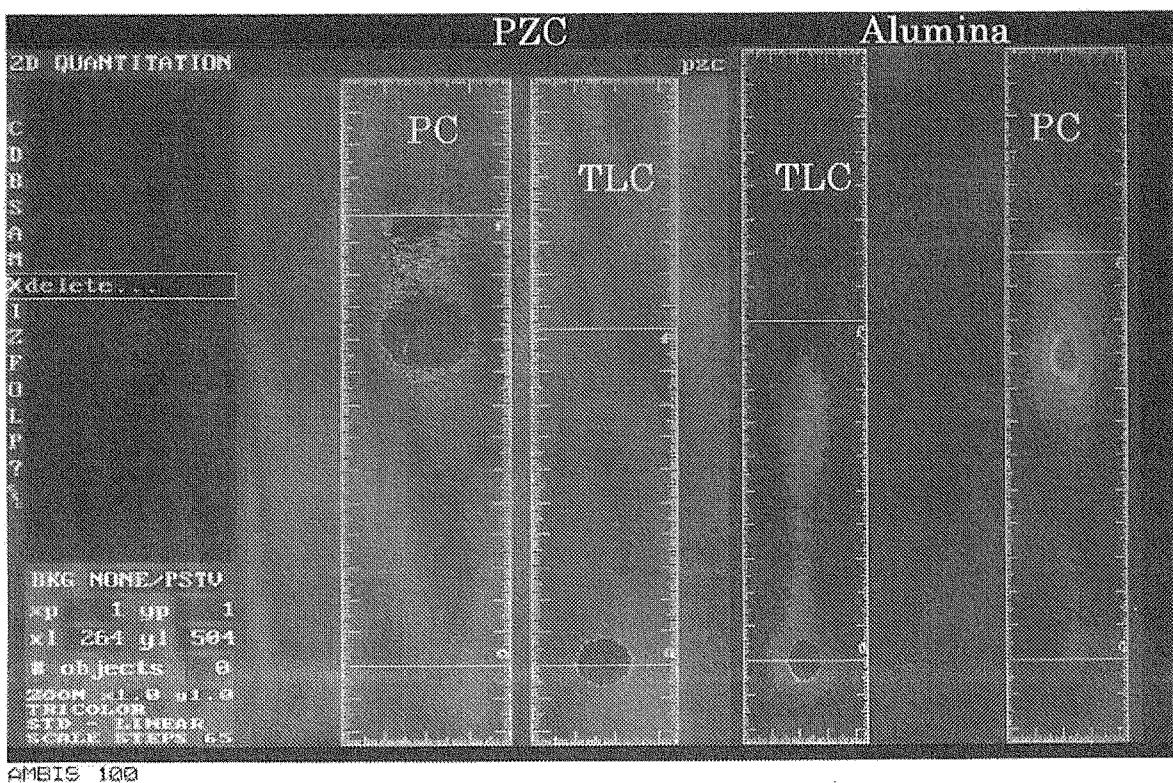
^{188}W の PZC カラムからの脱離は認められなかった。しかし、今後の課題として、放射性医薬品基準に対応させるためには、さらに厳密な分析が必要であると考える。また、 ^{188}W の放射能量を増やした場合の各種特性の検討が必要である。

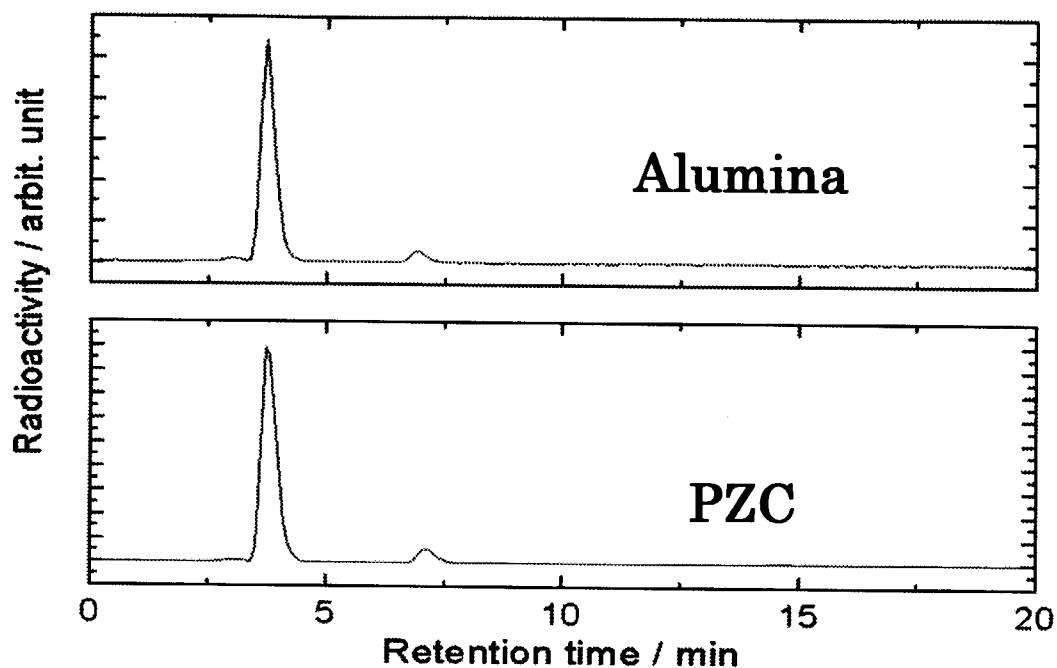
以上のように、長期間における ^{188}W の PZC への吸着、 ^{188}Re の PZC からの溶離安定性および良好な標識率が確認でき実用化の可能性が示唆された。

参考文献

- 1) M. Tanase, et al, *Appl. Radiat. Isot.* **48**, 607(1997).

Fig. 2.4-1. Preparation of $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ generators based on PZC.Fig. 2.4-2. Elution behavior of ^{188}Re from the generator.

Fig. 2.4-3. Elution yield of ^{188}Re .Fig. 2.4-4. Analysis of ^{188}Re -HEDP by TLC and PC.



Column : Hypersil C18 BDS-5, 4.6 mm ϕ \times 150 mm

Solvent : 4% Ethanol-0.01 M Phosphate buffer (pH=7)

Fig. 2.4-5. Analysis of ^{188}Re -MAG3 by HPLC.

3. 放射性レニウム標識化合物の合成及び体内動態の研究

3. 1 レニウム標識化合物合成における穏和な反応条件の探索

レニウム(Re)は、テクネチウム(Tc)と周期表同族の遷移元素であるが、Tc と異なり、多い還元剤量、高い反応温度、長い反応時間など Tc に比べて厳しい条件でなければ反応しない。Re 標識化合物がガン疼痛緩和・ガン治療に利用された場合、治療現場で標識し易いように、合成法は穏和でかつ簡便であることが望ましい。本研究では、反応液の組成、反応温度、溶媒の種類などを替えて穏和で簡便な反応条件を見出すための基礎的実験を行った。対象にした標識化合物は、人血清アルブミン-ジエチレントリアミン5酢酸(HSA-DTPA)、D-ペニシラミン(D-Pen)、メソ-2,3-ジメルカプトコハク酸(DMSA)およびヒドロキシメチレンジホスホン酸(HMDP)である。

3.1.1 人血清アルブミン-ジエチレントリアミン5酢酸(HSA-DTPA)

人血清アルブミン-ジエチレントリアミン5酢酸 (Human Serum Albumin Diethylenetriaminepentaacetic Acid) は、HSA に DTPA が 4 ~ 6 分子結合している化合物で、心疾患、脳疾患、肝疾患等、各種臓器・部位の血行動態及び血管性病変用診断薬である。

(1) 実験材料

人血清アルブミン-ジエチレントリアミン5酢酸は、日本メジフィジックス（株）より購入した。

(2) 実験

反応条件

組成比 (HSA と HSA-DTPA、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、Re の割合)、温度 (室温／15-18°C、37°C、約 100°C (沸騰水中)、溶媒 (軽水、重水) などを変えて放射化学的収率 (以下、収率) を求めた。

組成比は、HSA と HSA-DTPA (10 mg/mL) : 200 μL 、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (18.68 mg/mL · 0.1 N HCl) : 50 μL 、Re(1.67 $\mu\text{g}/\text{mL}$) : 10 μL 、溶媒 : 240 μL として実験した。なお、Re は ReO_4^- 化学形で使用した。

収率の算出法

収率は、アセトンを溶媒として薄層クロマトグラフィー (TLC、Merck 社 Aluminum sheets (Silica gel 60 F254)) を用いて反応液を分離後、反応物(放射能 A)、未反応 Re-186 (B) 及び原点 (C) の放射能をバイオ・イメージングアナライザー(FUJIFILM、BAS-1500)を用いて測定し、 $A/(A+B+C)*100$ を計算して求めた。

(3) 結果と考察

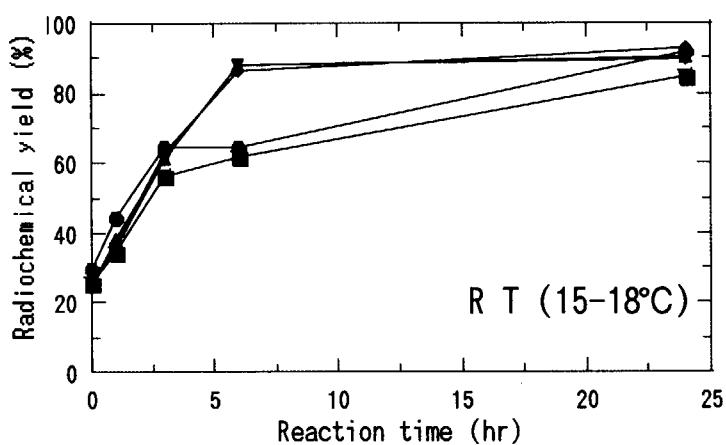
Fig.3.1.1-1、2 に HSA と HSA-DTPA に対して Re (7+) の量を変えた場合の収率を示す。Re (7+) のいずれの濃度においても室温に比べて沸騰水中の方が収率は高い。同じ温度では Re (7+)

量の多い方が高い収率を示した。なお、表中の Re は Re (7+) を示す。

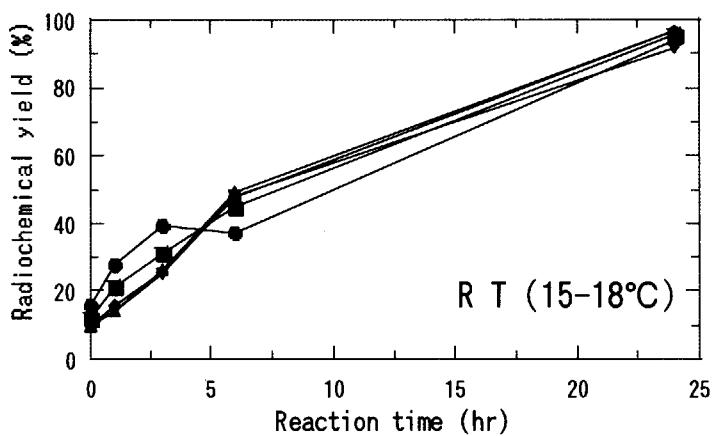
Fig.3.1.1-3 に $^{186}\text{Re}\cdot\text{HAS}$ 合成において、溶媒を軽水、重水、酢酸に変えた場合の収率を示す。室温、37°Cともに溶媒に軽水を用いると重水を用いた場合に比べ収率が高い。酢酸を用いると軽水に比べ高い収率を示した。

Fig.3.1.1-4 に $^{186}\text{Re}\cdot(\text{HAS}\cdot\text{DTPA})$ 合成において、溶媒を軽水、重水、酢酸に変えた場合の収率を示す。室温、37°Cともに重水より軽水を用いたほうが収率は高い。酢酸を用いると軽水に比べ高い収率を示した。

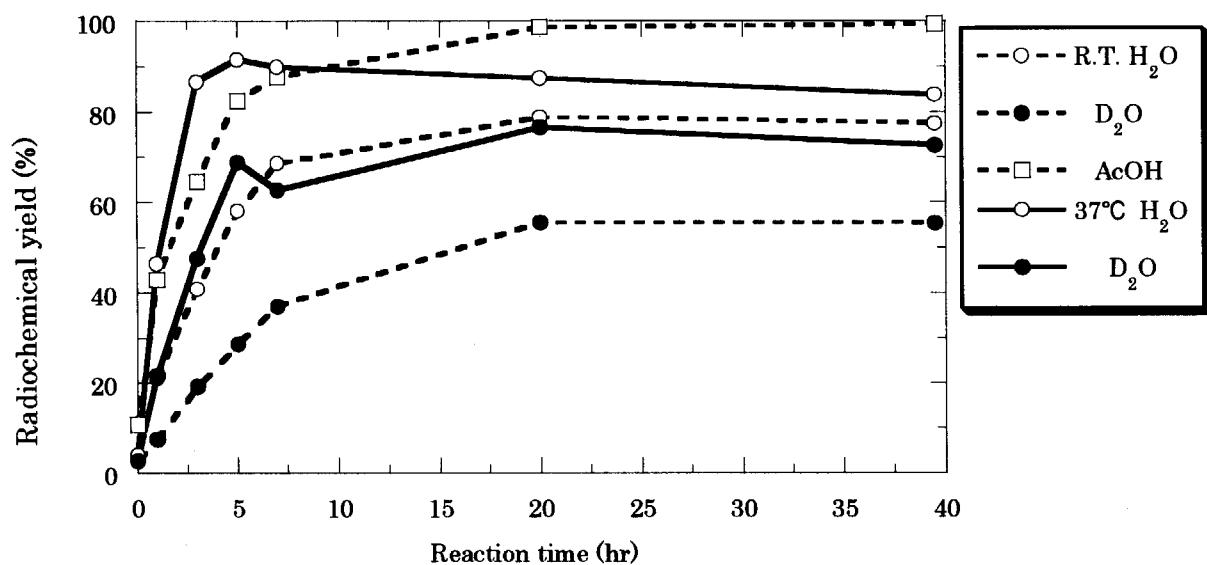
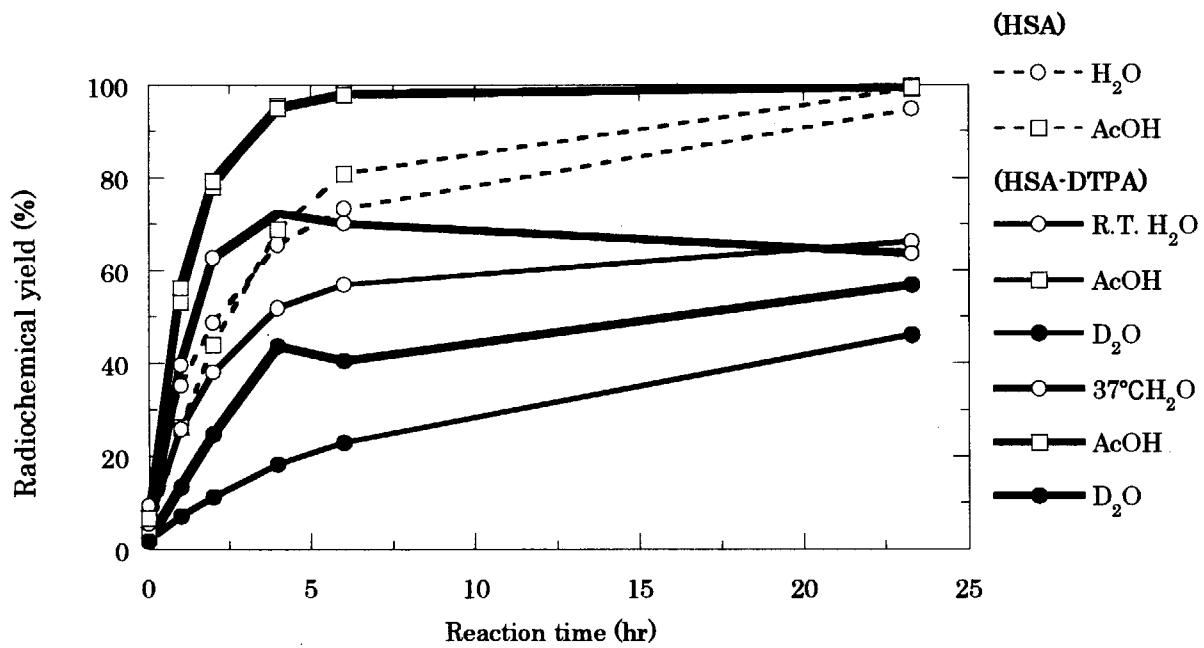
Fig.3.1.1-5 に 100°Cで合成した $^{186}\text{Re}\cdot\text{HSA}$ と $^{186}\text{Re}\cdot(\text{HAS}\cdot\text{DTPA})$ の酢酸バッファー中での安定性を示す。 $^{186}\text{Re}\cdot\text{HSA}$ 、 $^{186}\text{Re}\cdot(\text{HAS}\cdot\text{DTPA})$ 共に溶媒に軽水を用いて合成した標識物は安定していた。

Fig.3.1.1-1. Effect of the amount of Re on radiochemical yield of $^{186}\text{Re}\text{-HSA}$

Symbol	▼	▲	◆	■	●
HSA(mg)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{mg})$	0.0934	0.934	0.934	0.934	0.934
Re(μg)	0.0017	0.0033	0.0167	0.0833	0.1667

Fig.3.1.1-2. Effect of amount of the Re on radiochemical yield of $^{186}\text{Re}\text{-}(\text{HSA}\text{-DTPA})$

Symbol	▼	▲	◆	■	●
HSA-DTPA(mg)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}(\text{mg})$	0.0934	0.934	0.934	0.934	0.934
Re(μg)	0.0017	0.0033	0.0167	0.0833	0.1667

Fig.3.1.1-3. Effect of solvents on radiochemical yield of ¹⁸⁶Re-HASFig.3.1.1-4. Effect of solvents on radiochemical yield of ¹⁸⁶Re-(HSA-DTPA)

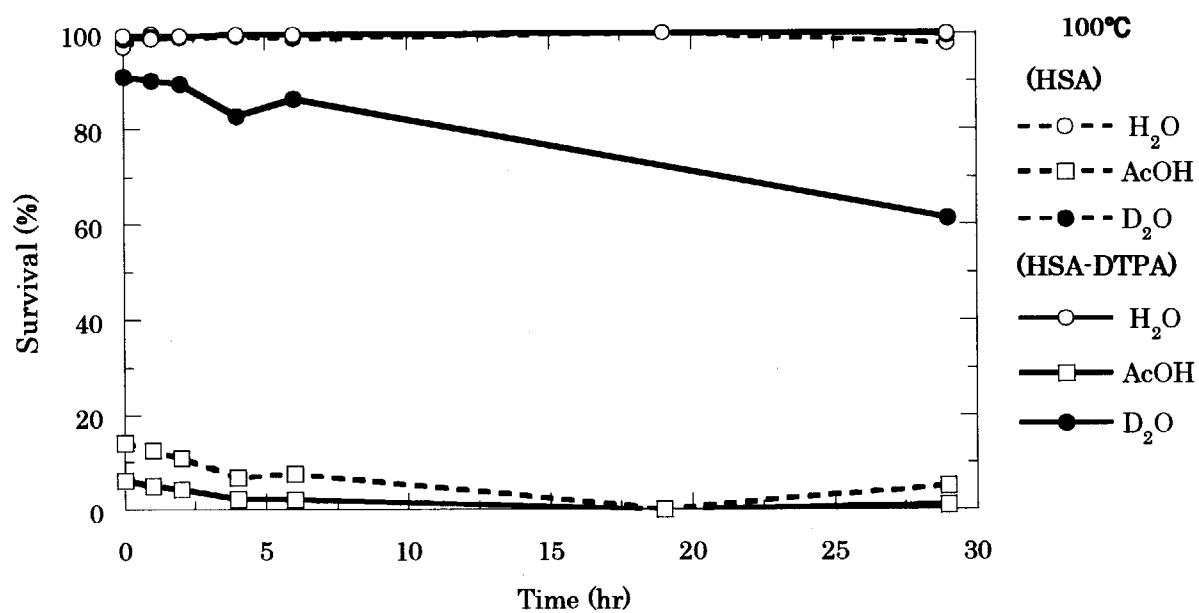


Fig.3.1.1-5. Stability of ^{186}Re -HSA and ^{186}Re -(HSA-DTPA) in sodium acetate buffer (pH:6.2)
at R.T

3.1.2 D-ペニシラミン(D-Pen)

(1) 実験材料

D-Pen は、Aldrich Chemical Company 社から購入した。

(2) 化学実験

塩酸濃度の影響

80 または 120 μL の $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 (0.055 mol/L)、100 μL の ReO_4^- (0.050 mol/L) 及び 100 μL の D-Pen (0.13 mol/L) の順に 7 mL のガラスバイヤルに入れ室温で反応した。その際溶媒としての塩酸濃度を 0.01、0.05、0.1、1 M に変えた。反応開始後、10、20、30、40、50、60 分後に反応液を 3 μL 採取し以下の方法で収率を求めた。

収率の算出法

反応液は、1-ブタノール：酢酸：水 (4:1:1) を溶媒として薄層クロマトグラフィー (TLC、Merck 社 Aluminum sheets (Silica gel 60 F254)) を用いて展開分離した。乾燥後、バイオ・イメージングアナライザー(FUJIFILM、BAS-1500)を用い標識物 ($R_f=n_1, n_2, \dots$)、未反応 Re-186 ($R_f=1$) 及び原点 ($R_f=0$) の放射能を A、B、C としてそれぞれ求めた。収率は、 $(An_1+An_2+\dots)/(An_1+An_2+\dots+B+C) \times 100$ で算出した。

塩類の添加の影響

反応は、5.1 mol/L の NaCl 、5.9 mol/L の MgCl_2 、9.5 mol/L の CaCl_2 、1 mol/L の NaNO_3 、1 mol/L の $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1 mol/L の $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 、1.3 mol/L の Na_2SO_4 、2.2 mol/L の Mg SO_4 、0.012 mol/L の $\text{Ca SO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の 0.1 M 塩酸溶液を溶媒とした。

(3) 結果と考察

$\text{Re}(7+)$ と $\text{Sn}(2+)$ 及び D-Pen のモル比が 1:0.9:2.7 の場合と 1:1.3:2.7 の場合の収率に対する HCL 濃度の影響を Fig. 3.1.2-1 に示す。塩酸濃度すなわち Cl^- 濃度が高い程収率が向上する。

収率が 90% を越える場合の $\text{Re}(7+)$ 濃度に対する $\text{Sn}(2+)/\text{Re}(7+)$ の比をプロットしたのが Fig. 3.1.2-2 である。なお、 MgCl_2 の 2 点のデータは NaCl の線上の Re 濃度が濃い 2 点のデータと重なっている。溶媒に塩化物を添加すると収率が向上する。収率が 90% を越える領域はグラフ線上の右上に相当する。溶媒が HCL のみの場合に比べて塩類を添加すると反応に要する $\text{Sn}(2+)$ 量を減らす事ができる。Fig. 3.1.2-3 は、収率を向上するには $\text{Cl}^-/\text{Re}(7+)$ の比を高めなければならないことを示している。

$\text{Re}(7+)$ 濃度が 9.3×10^{-9} mol/L で、 $\text{Re}(7+)$ と $\text{Sn}(2+)$ 及び D-Pen のモル比が 1:4.2 $\times 10^{-5}$: 6.7 $\times 10^{-6}$ の条件で硝酸塩を加えた場合の収率を Fig. 3.1.2-4 に示す。 $\text{Re}(7+)$ 濃度が 8.7×10^{-9} mol/L で、 $\text{Re}(7+)$ と $\text{Sn}(2+)$ 及び D-Pen のモル比が 1:48.3 $\times 10^{-5}$: 6.7 $\times 10^{-6}$ の条件で硫酸塩を加えた場合の収率を Fig. 3.1.2-5 に示す。両図より、反応液中の NO_3^- と SO_4^{2-} は、収率の低下をもたらす。

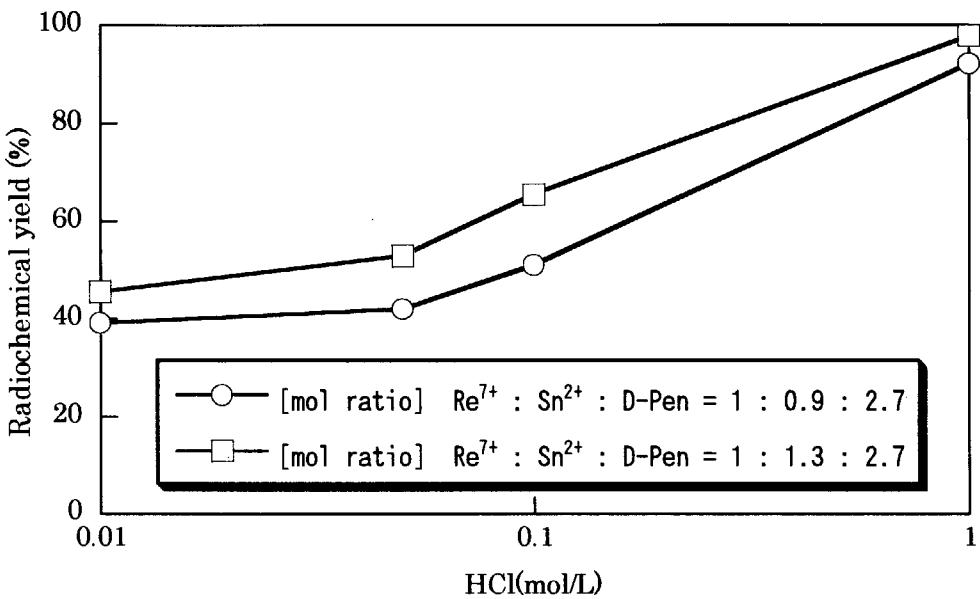


Fig. 3.1.2-1. The effect of the HCl concentration on the radiochemical yield.

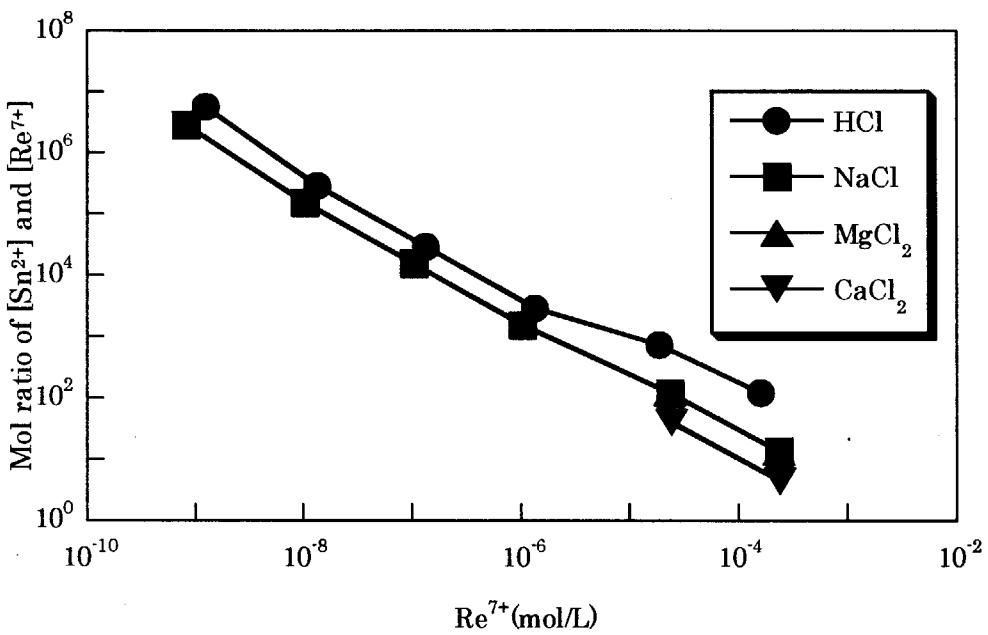


Fig. 3.1.2-2. The mol ratio of [Sn²⁺] and [Re⁷⁺] as the yield exceeds 90%.

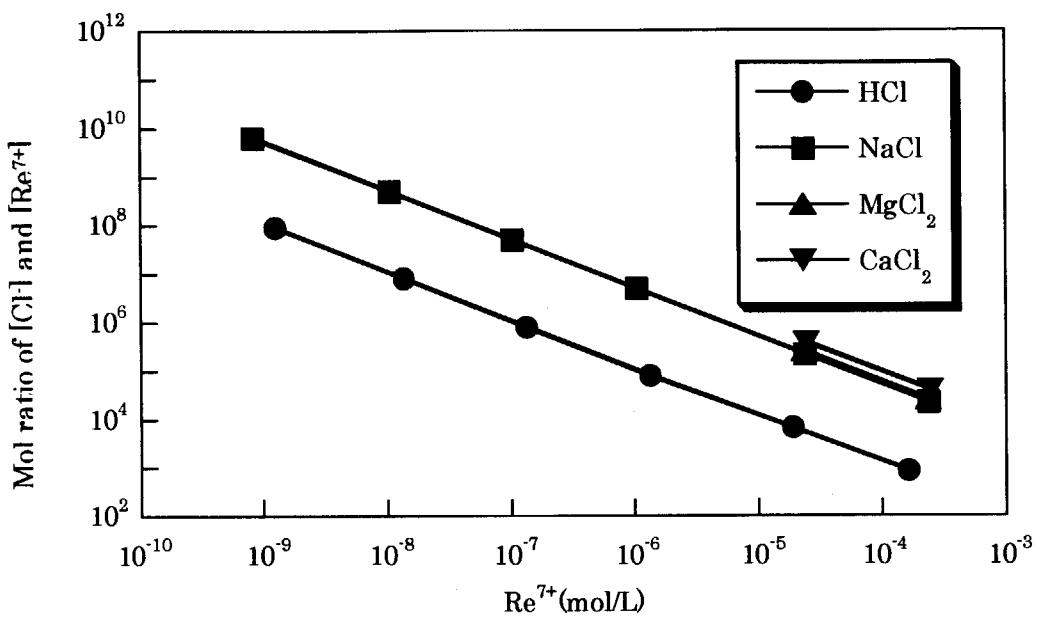


Fig. 3.1.2-3. The ratio of $[\text{Cl}]$ and $[\text{Re}^{7+}]$ as the yield exceeds 90%.

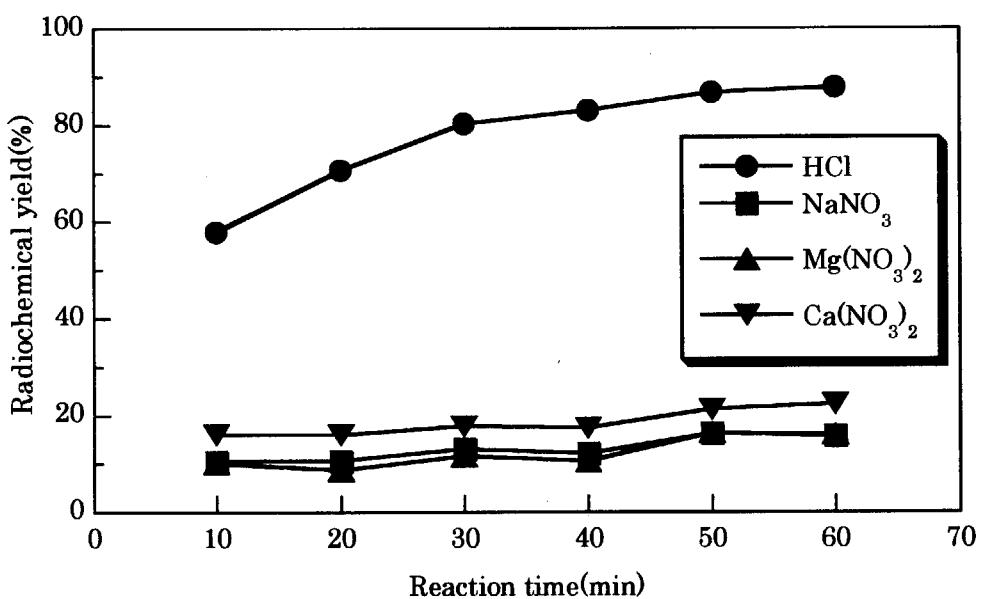


Fig. 3.1.2-4. The effect of the nitrate on the yield.

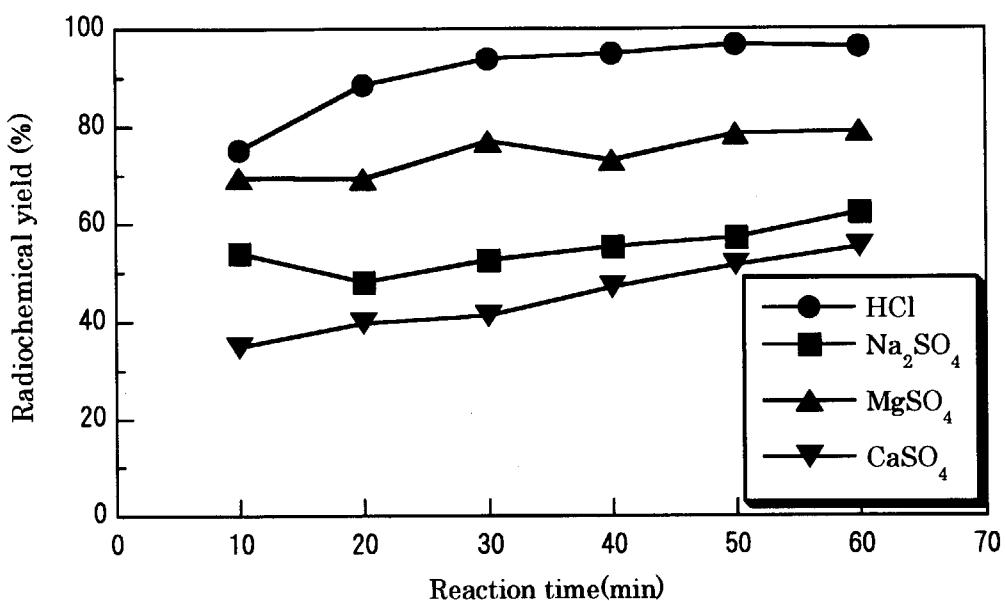


Fig. 3.1.2-5. The effect of the sulfate on the yield.

3.1.3 メソ-2,3-ジメルカプトコハク酸 (DMSA)

(1) 実験材料

DMSA は、Aldrich Chemical Company 社から購入した。

(2) 化学実験

0.1 mol/L HCl と 5.1 mol/L NaCl の 0.1 M HCl を溶媒とし、各溶液を次のように調整した。

ReO_4^- 溶液 : 2.0×10^{-8} 、 2.0×10^{-7} 、 2.0×10^{-6} mol/L

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 : 1.1×10^{-5} mol/L

DMSA 溶液 : 0.015 mol/L

14 mg の DMSA を 1ml の 0.25 mol/L NaOH 溶液で溶解後、0.1 mol/L HCl または 5.1 mol/L NaCl の 0.1 M HCl を加えて、濃度を調整した。

L-アスコルビン酸 : 2.8×10^{-3} mol/L

7 mL のガラスバイヤルに L-アスコルビン酸 20 μL 、 $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 1~50 μL 、 ReO_4^- 溶液 50 μL 、DMSA 溶液 32 μL を入れた。0.1 mol/L HCl または 5.1 mol/L NaCl の 0.1 M HCl を加えて、全量を 200 μL に調整した。90~95°Cに加熱し、10、20、30、40 分後に 3 μL 採取し以下の方法で収率を求めた。

収率の算出法

反応液は、アセトンを溶媒として薄層クロマトグラフィー (TLC、Merck 社 Aluminum sheets (Silica gel 60 F254)) を用いて反応液を分離後、反応物(放射能 A)、未反応 Re-186 (B) 及び原点 (C) の放射能をバイオ・イメージングアナライザー(FUJIFILM、BAS-1500)を用いて測定し、 $A/(A+B+C) \times 100$ を計算して求めた。

(3) 結果と考察

0.1 M HCl と 0.1 M HCl に NaCl を 5.1 mol/L で溶解した溶媒を用いた場合の収率を求め、収率が 90% を越える場合の溶液中の $\text{Sn}(2+)/\text{Re}(7+)$ の比をプロットしたのが Fig. 3.1.3-1 である。図中●が溶媒として 0.1 M HCl を用いた場合、■が 0.1 M HCl に NaCl を 5.1 mol/L で溶解した溶媒を用いた場合である。収率が 90% を越える領域はグラフ線上の右上に相当する。溶媒が HCl のみの場合に比べて NaCl を添加すると $\text{Sn}(2+)/\text{Re}(7+)$ が小さくとも収率が向上している。標識に用いる $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 量を少なくしても収率が高いことを示している。

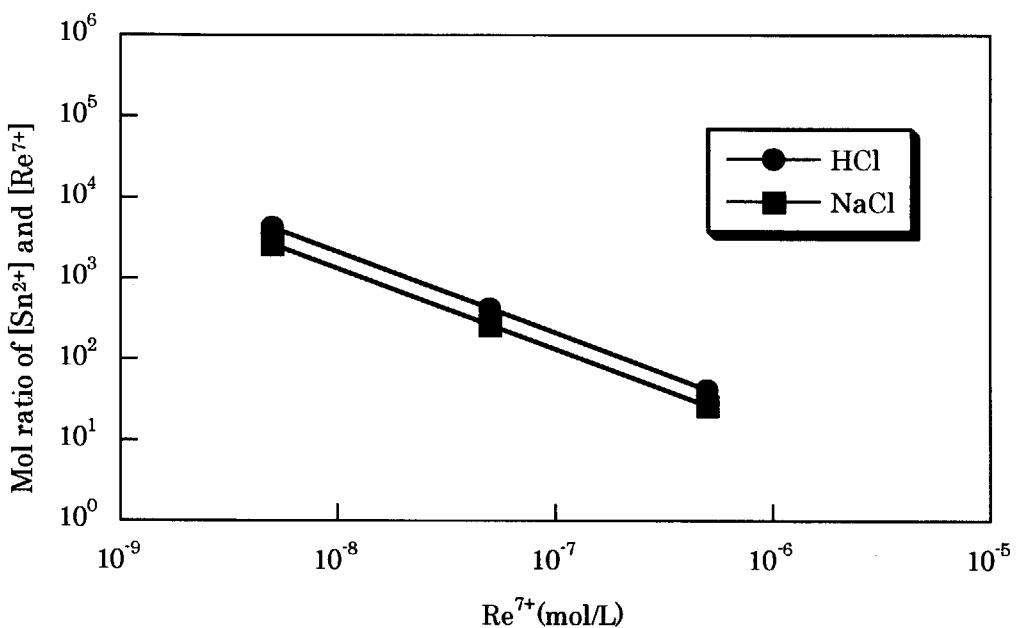


Fig. 3.1.3-1. The mol ratio of $[Sn^{2+}]$ and $[Re^{7+}]$ as the yield exceeds 90%.

3.1.4 ヒドロキシメチレンジホスホン酸 (HMDP)

(1) 実験材料

HMDP は、日本メジフィジックス（株）製である。

(2) 化学実験

0.01 mol/L HCl と 5.1 mol/L NaCl の 0.01 M HCl を溶媒とし、各溶液を次のように調整した。

ReO_4^- 溶液 : 2.0×10^{-6} mol/L

$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 : 0.044 mol/L

HMDP 溶液 : 0.045 mol/L

5.1 mol/L NaCl の 0.01 M HCl 溶液 については、予め 34.4 mg の HMDP を 1 ml の 0.01 M HCl に溶解後、5.1 mol/L NaCl の 0.01 M HCl を加えて調整した。

7 mL のガラスバイヤルに $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液 15、30、60 μL 、 ReO_4^- 溶液 20 μL 、HMDP 溶液 27 μL を入れた。0.01 mol/L HCl または 5.1 mol/L NaCl の 0.01 M HCl を加えて、全量を 200 μL に調整した。90~95°Cに加熱し、10、20、30、40 分後に 3 μL 採取し以下の方法で収率を求めた。

収率の算出法

反応液は、アセトンを溶媒として薄層クロマトグラフィー (TLC、Merck 社 Aluminum sheets (Silica gel 60 F254)) を用いて反応液を分離後、反応物(放射能 A)、未反応 Re-186 (B) 及び原点 (C) の放射能をバイオ・イメージングアナライザー(FUJIFILM、BAS-1500)を用いて測定し、 $A/(A+B+C)*100$ を計算して求めた。

(3) 結果と考察

溶媒が 0.1 M HCl の場合 (●) と 0.1 M HCl に NaCl を 5.1 mol/L で溶解した溶媒 (■) についての収率の時間変化を Fig. 3.1.4-1 に示す。反応液中の Cl⁻濃度を高くすると収率が向上することを示している。

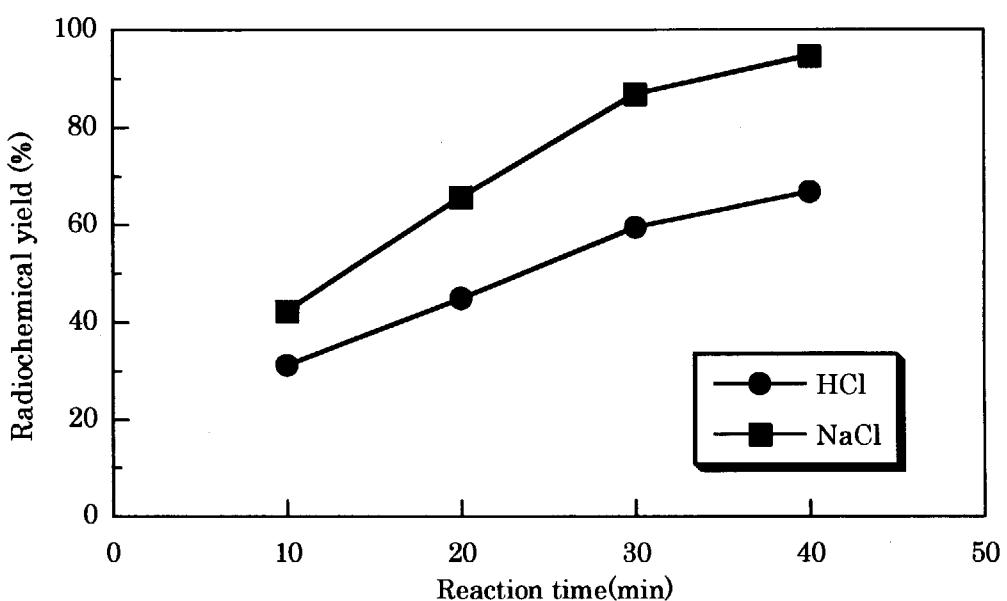
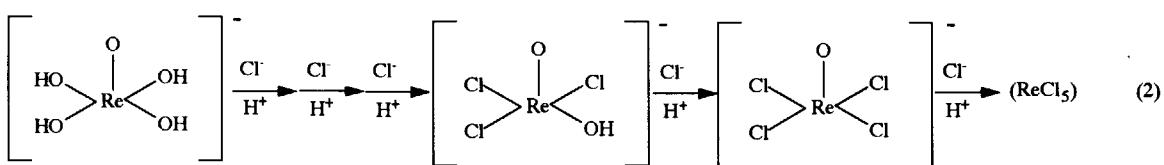
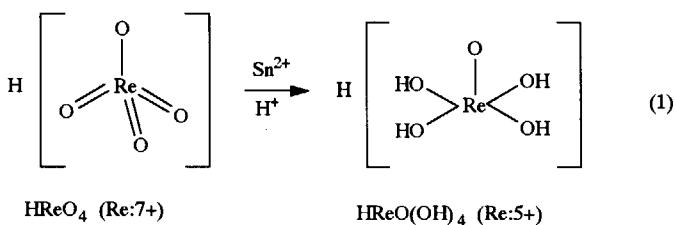


Fig. 3.1.4-1. The effect of the NaCl on the yield.

3.1.5 まとめ

(1) D-Pen の場合の反応過程を以下に示す。塩酸塩濃度を上げると収率が向上するのは、 H^+ 存在下で(2)式は右側に進行し、Re(5+)に配位する Cl⁻が多くなり分子内に Re-Cl 量の多い反応性の高い Re(5+)が生成するためと考えられる。従来、放射化学的収率を上げるために過剰の SnCl₂・2H₂O を加えたのは、結果的には Cl⁻濃度を高めるためであったと考えられる。 H^+ 濃度を高めると収率が向上するのは、Sn(2+)の還元力を高める他に、(1)式で H^+ が Re=O を Re-OH に変える量を多くする、(2)式で Re-OH から Re-Cl への割合を高めるためと考えられる。



硫酸塩、硝酸塩を加えると収率が低下するのは、Re の配位子が SO_4^{2-} 又は NO_3^- に入れ変わることにより立体障害が大きくなるためと考えられる。Tc が中性、室温で容易に反応するのは、Re に比べて $TcOCl_4^-$ 又は $TcOCl_5^{2-}$ が生成し易いと考えらる。

一連の実験の結果から、硫酸塩、硝酸塩が反応液に含まれると収率が低下するので、¹⁸⁶Re の製造過程および標識過程でこれらの混入を極力防ぐことが重要である。

塩酸塩を加える本方法は、強塩酸で分解し易い生体関連物質の標識に有効であると考えられる。また、過剰な $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ を必要とせず収率を向上できるので、投与液中の Sn 量を少なくでき体内に入る有害な Sn 量を少なくできる。

(2) ¹⁸⁶Re-HSA 及び ¹⁸⁶Re-(HAS-DTPA) 合成において、溶媒に酢酸を用いると収率が向上することも考慮して、反応溶液を Cl⁻以外の F⁻、Br⁻、I⁻に変えた場合の収率に与える影響を調べる必要がある。

3. 2 腫瘍骨転移の疼痛治療を目的とする ^{186}Re 標識製剤の開発

細胞殺傷性の高エネルギー β -線放出核種である ^{186}Re と 1-hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (HEDP)との多核錯体である $^{186}\text{Re}\text{-HEDP}^1$ は、近年、癌患者における骨転移の疼痛緩和効果を有することが示され、現在、欧米において臨床応用が検討されている²⁻⁴⁾。しかし、 $^{186}\text{Re}\text{-HEDP}$ 錯体は生体内での安定性が乏しいため、体内で錯体が解離し、 $^{186}\text{ReO}_4^-$ が生成する結果、血液からの放射能消失の遅延^{5,6)}、胃への放射能集積^{7,8)}を示すことが問題として提起されている。

本研究では、骨への親和性を損なうことなく血液からの速やかな放射能消失を示す ^{186}Re 標識骨疼痛緩和剤の開発を目的として、二官能性放射性薬剤の概念に基づき、骨に高い親和性を有するビスホスホネート分子内に、生体内で安定な ^{186}Re 単核錯体形成部位を導入した化合物の開発を計画した。

3.2.1 $^{186}\text{Re}\text{-MAMA-BP}$ の開発

(1) はじめに

本薬剤設計において重要な点は、ビスホスホネート構造に由来する骨への親和性を損なうことなく安定な ^{186}Re 錯体を導入することである。そこで、まず電気的に中性の ^{186}Re 錯体を導入することとした。N₂S₂型四座配位子である monoaminemonoamidedithiols (MAMA)構造が、 ^{186}Re と化学的な性質が類似している $^{99\text{m}}\text{Tc}$ と安定な中性の錯体を形成する⁹⁾ことから、MAMA のアミン窒素原子に酪酸の ω 炭素原子が結合した *N*(((2-mercaptopropyl)amino)-carbonyl)-methyl)-*N*(2-mercaptopropyl)amino-4-butrylic acid と、炭素側鎖にアミノ基を有するビスホスホネート誘導体である 3-amino-propane-1,1-bisphosphonate とをアミド結合させた化合物、*N*(2-((3-(3,3-diphosphonopropylcarbamoyl)propyl)(2-mercaptopropyl)amino)acetyl)-2-aminoethane-thiolate (MAMA-BP)を設計、合成した。次いで、MAMA-BP を ^{186}Re とキレートさせ得た錯体 $^{186}\text{Re}\text{-MAMA-BP}$ をマウスに投与し、その体内動態を $^{186}\text{Re}\text{-HEDP}$ と比較検討することにより、ビスホスホネート構造と独立してキレート部位を有する、新しい ^{186}Re 標識ビスホスホネート薬剤の設計の有用性を評価した。

(2) 方法

試薬・機器

[^{186}Re]perrhenate ($^{186}\text{ReO}_4^-$)は、日本原子力研究所より提供された。薄層クロマトグラフィー (TLC)は Merck 社 Art 5553 を用い、アセトンを展開溶媒として分析した。セルロースアセテート膜電気泳動(CAE)は、富士写真フィルム社の Separax-SP を使用し、ベロナール緩衝液(pH 8.6, $I=0.05$)、0.8 mA/cm で泳動した。1-Hydroxyethylidene-1,1-diphosphonate (HEDP)は岸田化学より購入し、その他の試薬は、特級試薬を用いた。

Tr-MAMA-BP の合成(Scheme 3.2.1-1)

MAMA のチオール基をトリチル(Tr)基で保護した Tr-MAMA (**4**) は、既報に従って合成した⁹⁾。Tr-MAMA に 4-ブロモ-n-酪酸エチルを反応させ、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製し、化合物 (**5**) を得た後、加水分解により化合物 (**6**) を合成した。ビスホスホネート誘導体である化合物 (**10**) は、既報に従って合成した^{10,11)}。化合物 (**6**) と化合物 (**10**) を、縮合剤として dicyclohexylcarbodiimide を用い反応させ、シリカゲルクロマトグラフィーを用いて精製することにより化合物 (**11**) を得た。次いで、bromotrimethylsilane を用いて化合物 (**10**) 由来のエチル基を脱保護した後、逆相 HPLC により精製し、Tr-MAMA-BP (**12**) を得た。逆相 HPLC は、ナカライトスク社の Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (20 × 150 mm) カラムを用いて、0.1% の trifluoroacetic acid (TFA) を含有する水：アセトニトリルを 70 : 30 から 30 分で 20 : 80 へ変換するグラディエント法にて、流速 16 mL/min の条件で行った。

¹⁸⁶Re-MAMA-BP の作製(Scheme 3.2.1-2)

Tr-MAMA-BP (**12**) の Tr 基を triethylsilane 存在下、TFA により脱保護し、MAMA-BP (**13**) とした後、塩化スズのクエン酸溶液存在下、¹⁸⁶ReO₄⁻溶液を加え、沸騰水浴中 1 時間反応後、逆相 HPLC により精製し、¹⁸⁶Re-MAMA-BP (**14**) を得た。¹⁸⁶Re-MAMA-BP の放射化学的純度は、TLC、CAE、および逆相 HPLC を用いて測定した。逆相 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (4.6 × 150 mm) カラムを用いて、10 mM の tetrabutylammoniumhydroxide (TBAH) を含有する 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0)：エタノール = 85 : 15 を移動相として、流速 1 mL/min の条件で行った。

¹⁸⁶Re-HEDP の作製

¹⁸⁶Re-HEDP は既報に従って作製した⁶⁾。

緩衝液中における安定性の検討

¹⁸⁶Re-MAMA-BP、¹⁸⁶Re-HEDP を 95% O₂/5% CO₂ で飽和した 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 中、37°C でインキュベートし、経時的（1、3、6、24 時間後）に分析することにより、インビトロ 安定性を評価した。

体内分布の検討

¹⁸⁶Re-MAMA-BP、¹⁸⁶Re-HEDP を 6 週齢 ddY 系雄性マウス (27 - 30 g) に投与して、経時的 (10, 30 分, 1, 3, 6, 24 時間後) に屠殺、臓器を摘出し、それぞれの重量と放射能を測定した。

(3) 結果・考察

Tr-MAMA-BP は、Scheme 3.2.1-1 に示す方法で合成した。塩化トリチルとシステアミンを出発物質とする Tr-MAMA-BP の全合成路において、総収率は 2.7% であった。また、¹⁸⁶Re-MAMA-BP は、Scheme 3.2.1-2 に示す方法で標識し、放射化学的純度 95% 以上で得られた。

¹⁸⁶Re-MAMA-BP、¹⁸⁶Re-HEDP をリン酸緩衝液中でインキュベートし、インビトロにおける安定性を評価した結果(Fig. 3.2.1-1)、¹⁸⁶Re-HEDP は経時に ¹⁸⁶ReO₄⁻への分解が認められ、24 時間後において、未変化体の割合は 30% 以下であった。それに対して、¹⁸⁶Re-MAMA-BP は、24 時間

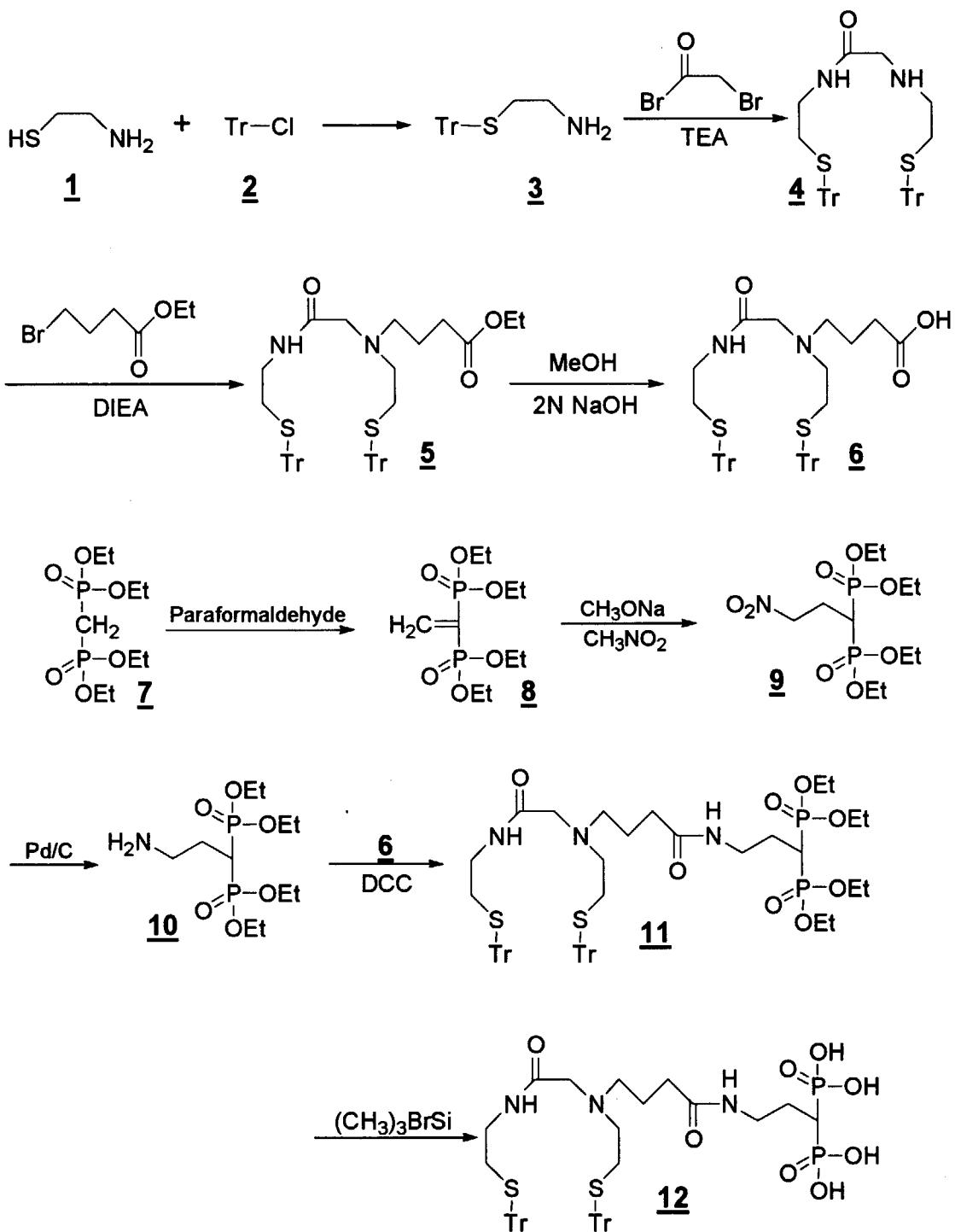
後においても、約80%以上が未変化体として存在した。これによりインビトロにおいて、¹⁸⁶Re-MAMA-BPは、¹⁸⁶Re-HEDPと比べて、より安定であることが示された。

また、¹⁸⁶Re-MAMA-BPのマウス体内分布を、¹⁸⁶Re-HEDPの場合と比較検討した結果、共に投与後速やかに骨に集積したものの、¹⁸⁶Re-HEDPでは、胃への放射能集積の増加と血液からの放射能消失の遅延が認められ、生体内で¹⁸⁶Re-HEDP錯体の分解が進行して¹⁸⁶ReO₄⁻が生成するものと考えられた。一方、¹⁸⁶Re-MAMA-BPは、所期の通り、胃への放射能集積を示すことなく、¹⁸⁶Re-HEDPに比べて、骨への集積放射能量の増加と速やかな血液からの放射能消失を達成し、その結果、骨と血液との放射能集積比を大きく向上した。しかしながら、¹⁸⁶Re-MAMA-BPは、非標的組織である肝臓、腎臓において、¹⁸⁶Re-HEDPと比べて高い放射能集積を示し、この化合物の問題点となった(Fig. 3.2.1-2)。

以上の結果は、ビスホスホネート構造と独立して生体内で安定な¹⁸⁶Re 単核錯体形成部位を導入することにより、ビスホスホネートの骨への集積性を保持し、かつ血液からの速やかな放射能消失を達成することが可能であることを示すものであり、本薬剤設計は、¹⁸⁶Re 標識骨疼痛緩和剤の開発に有用な指針を与えるものと考えられる。

参考文献

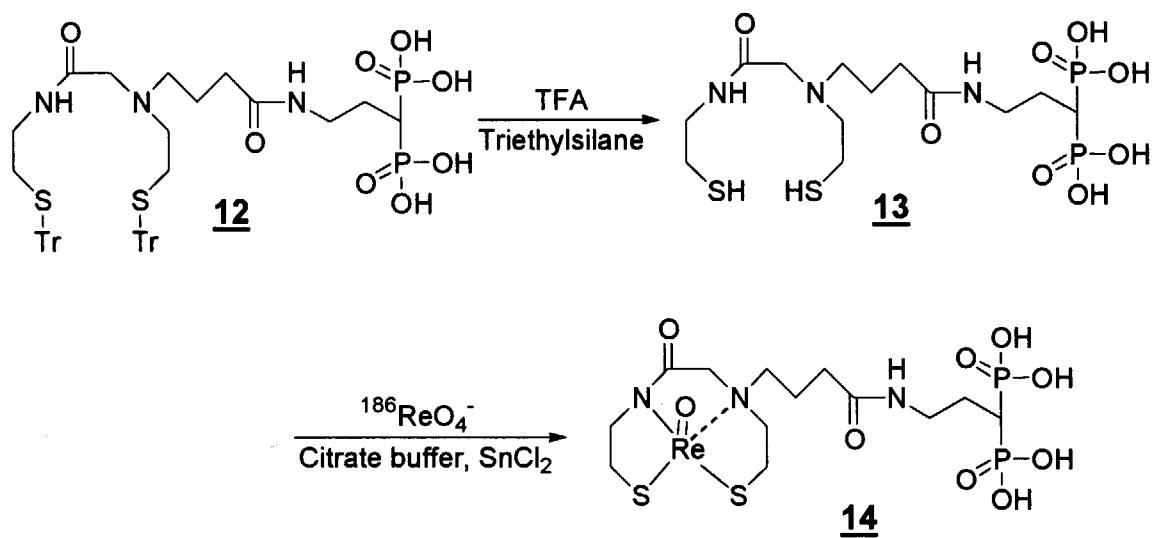
- 1) Elder R. C., Yuan J., Helmer B., Pipes D., Deutsch K. and Deutsch E., *Inorg. Chem.*, **36**, 3055 (1997)
- 2) Schoeneich G., Palmedo H., Dierke-Dzierzon C., Muller S. C. and Biersack H. J., *Scand. J. Urol. Nephrol.*, **31**, 445 (1997)
- 3) Limouris G. S., Shukla S. K., Condi-Paphiti A., Gennatas C., Kouvaris I., Vitoratos N., Manetou A., Dardoufas C., Rigas V. and Vlahos L., *Anticancer Res.*, **17**, 1767 (1997)
- 4) de Klerk J. M., Zonnenberg B. A., van het Schip A. D., van Dijk A., Han S. H., Quirijnen J. M., Blijham G. H. and van Rijk P. P., *Eur. J. Nucl. Med.*, **21**, 1114 (1994)
- 5) de Klerk J. M., van Dijk A., van het Schip A. D., Zonnenberg B. A. and van Rijk P. P., *J. Nucl. Med.*, **33**, 646 (1992)
- 6) 荒野泰, 小野正博, 脇坂孝治, 上園崇, 秋沢浩行, 元成祐司, 間賀田泰寛, 小西淳二, 横山陽, *RADIOISOTOPES*, **44**, 514 (1995)
- 7) Limouris G. S. and Skukla S. K., *Anticancer Res.*, **17**, 1779 (1997)
- 8) De Winter F., Brans B., Van De Wiele C. and Dierckx R. A., *Clin. Nucl. Med.*, **24**, 898 (1999)
- 9) Yamamura N., Magata Y., Arano Y., Kawaguchi T., Ogawa K., Konishi J. and Saji H., *Bioconjugate Chem.*, **10**, 489 (1999)
- 10) Degenhardt C. R. and Burdsall D. C., *J. Org. Chem.*, **51**, 3488 (1986)
- 11) Winckler W., Pieper T. and Keppler B. K., *Phosphorus Sulfur*, **112**, 137 (1996)



Tr: -C(C₆H₅)₃. TEA: Triethylamine. DIEA: Diisopropylethylamine.

DCC:Dicyclohexylcarbodiimide.

Scheme 3.2.1-1. Synthesis of Tr-MAMA-BP.



Scheme 3.2.1-2. Preparation of ^{186}Re -MAMA-BP.

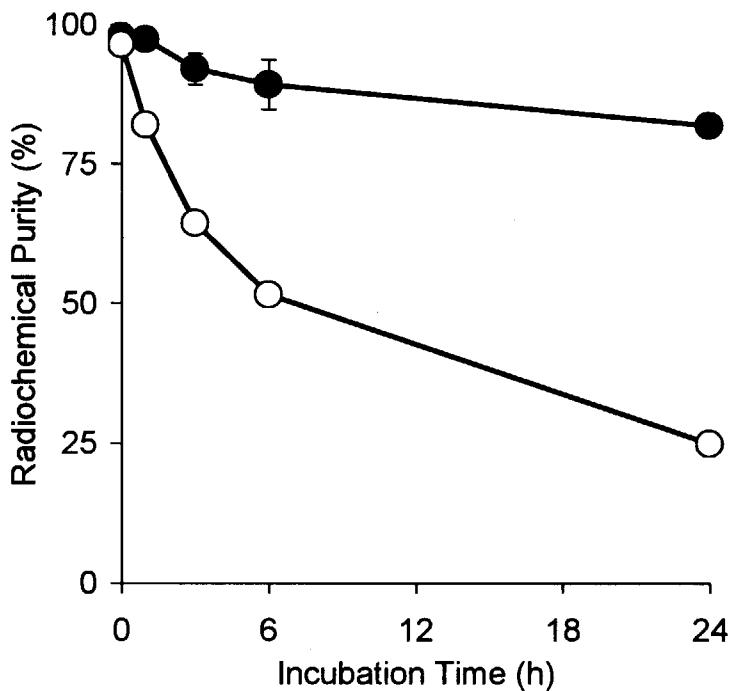


Fig. 3.2.1-1. Stability of $^{186}\text{Re}\text{-MAMA-BP}$ (●) and $^{186}\text{Re}\text{-HEDP}$ (○) in buffered solution. Each value represents the mean \pm SD for three experiments.

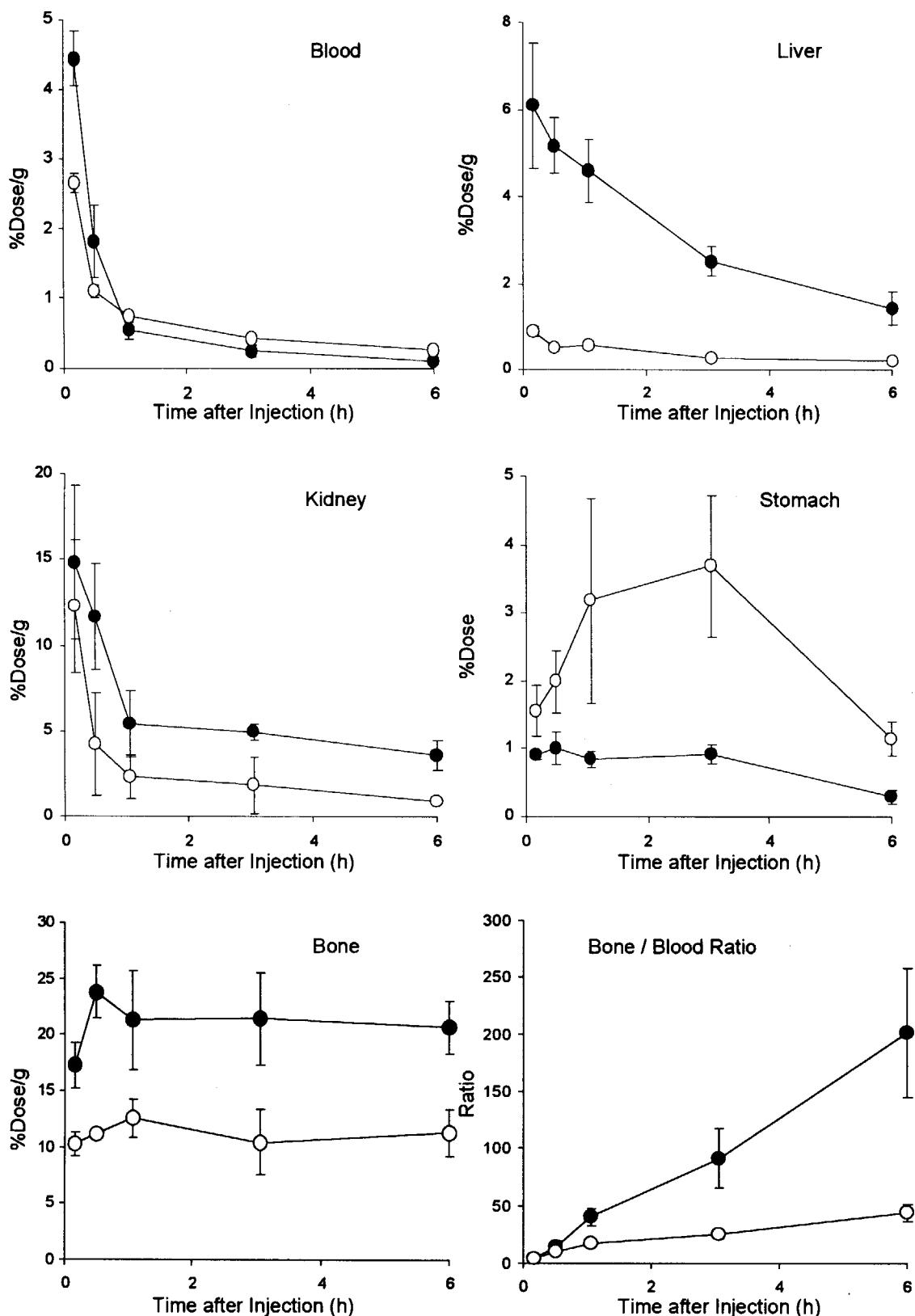


Fig. 3.2.1-2. Comparative distribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -MAMA-BP (●) and ^{186}Re -HEDP (○) in normal mice.
Each value represents the mean \pm SD for five mice.

3.2.2 ^{186}Re -MAMA-HBP の開発

(1) はじめに

前節において、二官能性放射性薬剤の概念に基づき、骨に高い親和性を有するビスホスホネート分子に、生体内で安定な ^{186}Re -MAMA 錯体を結合した化合物、 ^{186}Re -MAMA-BP について報告した。 ^{186}Re -MAMA-BP は高い安定性を示し、その結果、マウス体内分布実験において、 ^{186}Re -HEDP に比べて高い骨と血液との放射能集積比を達成した。

一方、ビスホスホネートの central carbon に水酸基を有する化合物は、水酸基を有していない化合物と比べて骨への親和性が高いことが報告されている^{1,2)}。そこで、骨への放射能集積をより向上させることを目的として、ビスホスホネートの central carbon に水酸基を導入した [*N*-(2-((3-(4-hydroxy-4,4-diphosphonobutylcarbamoyl)propyl)-(2-mercaptopethyl)amino)acetyl)-2-amino-ethanethiolate] oxorhenium(V) (^{186}Re -MAMA-HBP)を設計、合成し、骨疼痛緩和薬剤としての有用性を基礎的に評価した。

(2) 方法

試薬・機器

ヒドロキシアパタイトは Bio-Rad 社から購入し、本節で使用する他の試薬、機器は前節と同様の試薬、機器を用いた。

Tr-MAMA-HBP の合成(Scheme 3.2.2-1)

前節で合成した化合物 (1) のカルボキシル基を tetrafluorophenol (TFP)を用いて活性エステル化し、別途合成した 4-amino-1-hydroxybutylidene-1,1-bisphosphonate (9) のアミノ基と反応させた後、逆相 HPLC により精製し、Tr-MAMA-HBP (10) を得た。逆相 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (10 x 150 mm)カラムを用いて、0.1%の TFA を含有する水：アセトニトリルを 95:5 から 30 分で 0:100 へ変換するグラディエント法にて、流速 4.7 mL/min の条件で行った。

^{186}Re -MAMA-HBP の作製(Scheme 3.2.2-2)

前節の ^{186}Re -MAMA-BP の標識方法と同様の方法で行った。

ヒドロキシアパタイトとの親和性の評価

ヒドロキシアパタイトを 100 μL の TBS (150 mM NaCl、50 mM Tris-HCl、pH 7.4)に懸濁させ、この懸濁液に TBS で希釈した各 ^{186}Re 標識化合物 100 μL を加えた。1 時間振盪した後、10,000g で 5 分間遠心し (SCR 20B、日立製作所)、ヒドロキシアパタイトに結合している放射能の割合を求めた³⁾。

緩衝液中における安定性の検討

前節と同様の方法で行った。

体内分布の検討

前節と同様の方法で行った。

(3)結果・考察

Tr-MAMA-HBPは、Scheme 3.2.2-1 に示す方法で合成した。塩化トリチルとシステアミンを出発物質とするTr-MAMA-HBPの全合成路において、総収率は3.1%であった。また、¹⁸⁶Re-MAMA-HBPは、Scheme 3.2.2-2 に示す方法で標識し、放射化学的純度95%以上で得られた。

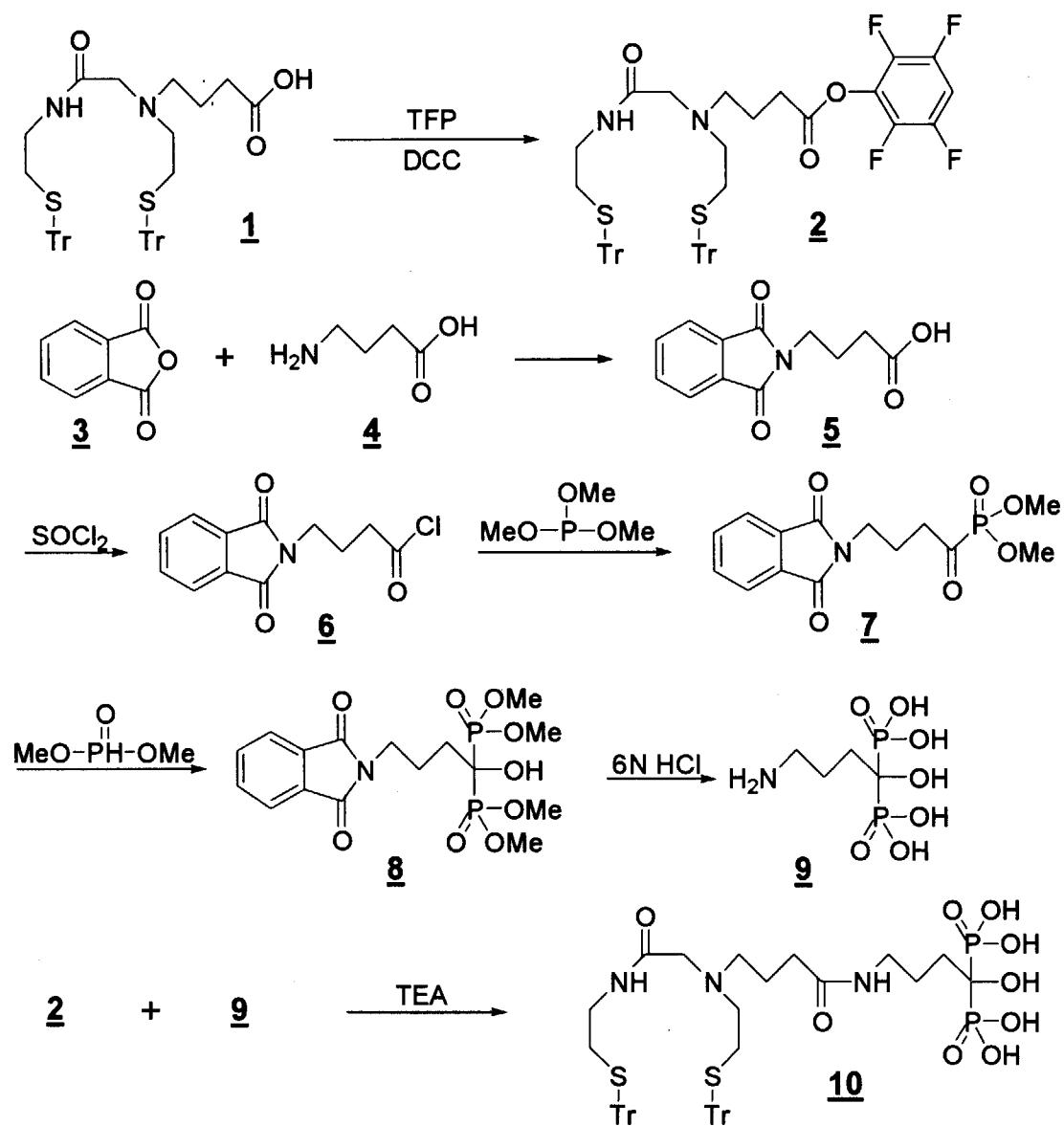
¹⁸⁶Re-MAMA-HBPのインビトロ安定性を評価するために、酸素で飽和した緩衝液中でインキュベートした結果、¹⁸⁶Re-MAMA-HBPは、同じキレート部位を有する¹⁸⁶Re-MAMA-BPと同程度に高い安定性を示した(Table 3.2.2-1)。また、マウスに投与した場合、¹⁸⁶Re-MAMA-HBPの胃への放射能集積は低く、¹⁸⁶Re-MAMA-BPと同様、生体内において安定であることが示唆された(Fig. 3.2.2-1)。

骨の無機質の主成分であるヒドロキシアパタイトに対する各¹⁸⁶Re 標識化合物の親和性を評価するために、ヒドロキシアパタイト懸濁液中で各標識体をインキュベートしたところ、ビスホスホネート分子の central carbon に水酸基を有する¹⁸⁶Re-MAMA-HBP は、水酸基を有していない¹⁸⁶Re-MAMA-BP と比べて、有意に高いヒドロキシアパタイトとの結合親和性を示した(Figure 3.2.2-1)。また、このインビトロ実験の結果を反映し、¹⁸⁶Re-MAMA-HBP は、¹⁸⁶Re-MAMA-BP と比較して、インビオにおいても高い骨への集積傾向を示した(Figure 3.2.2-2)。以上の結果より、本薬剤設計において、ビスホスホネート分子の central carbon への水酸基の導入は、骨への集積性に有効であることが示された。

しかし、¹⁸⁶Re-MAMA-HBP の投与では、¹⁸⁶Re-MAMA-BP と同様に、非標的組織である肝臓、腎臓への高い放射能集積を認めた(Fig. 3.2.2-2)。したがって、¹⁸⁶Re-MAMA-HBP および¹⁸⁶Re-MAMA-BP で認められる肝臓、腎臓への放射能集積には、¹⁸⁶Re-MAMA 部位に由来する化合物の物理化学的性質が影響している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Van Beek E., Hoekstra M., Van De Ruit M., Löwik C. and Papoulos S., *J. Bone Miner. Res.*, 9, 1875 (1994)
- 2) Meyer J. L. and Nancollas G. H., *Calc. Tiss. Res.*, 13, 295 (1973)
- 3) Fujisawa R. and Kuboki Y., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1075, 56 (1991)



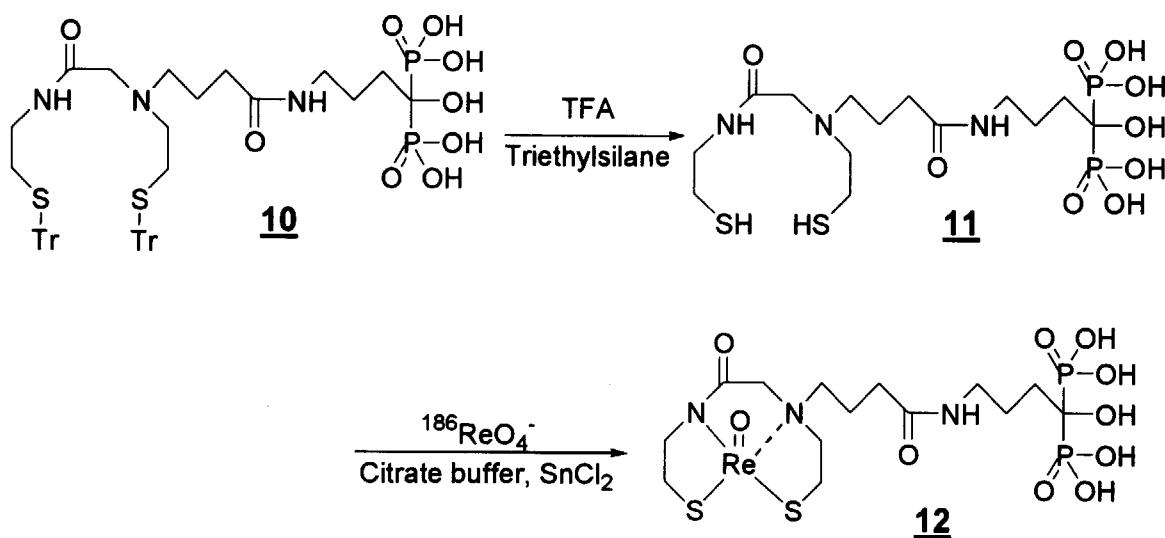
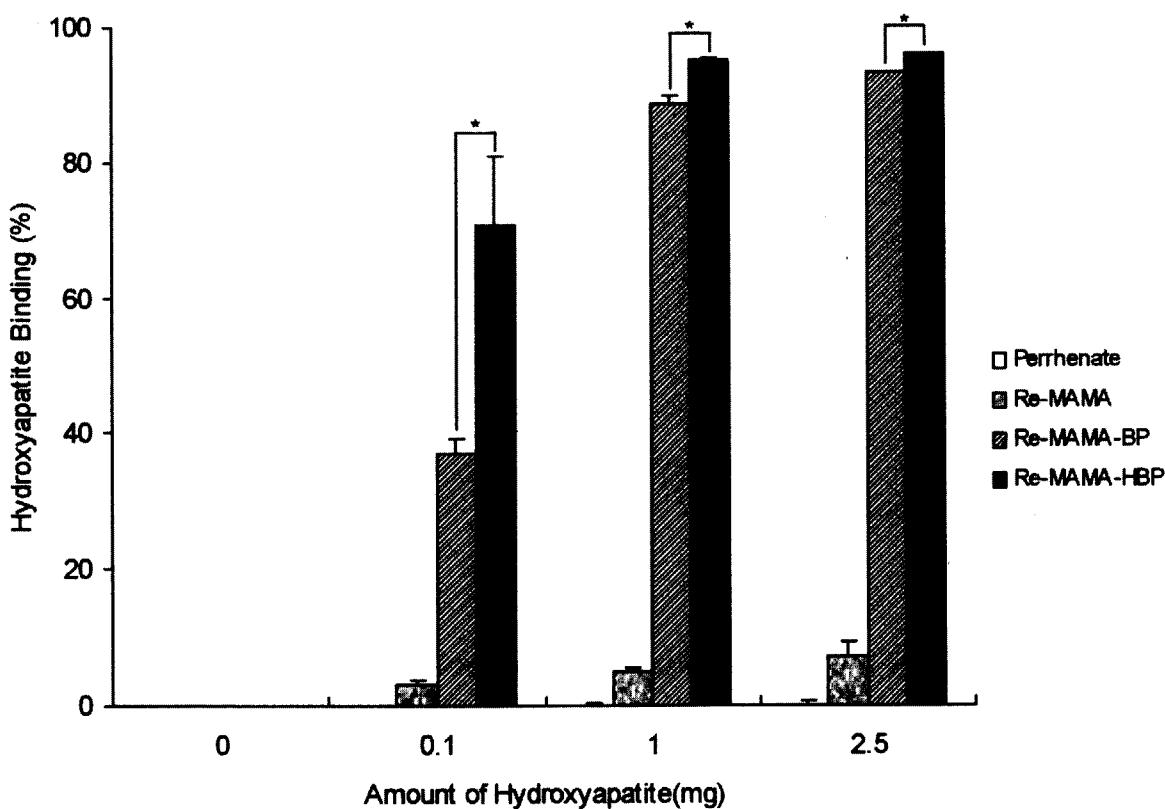
TFP: Tetrafluorophenol.

Scheme 3.2.2-1. Synthesis of Tr-MAMA-HBP.

Table 3.2.2-1. Stability of ^{186}Re -MAMA-HBP in buffered solution.

Incubation time (h)	Radiochemical purity (%)	SD
0	97.95	0.33
1	98.50	0.65
3	97.55	1.17
6	94.91	0.27
24	75.55	1.57

Each value represents the mean (SD) for three experiments.

Scheme 3.2.2-2. Preparation of ^{186}Re -MAMA-HBP.Fig. 3.2.2-1. Hydroxyapatite binding of ^{186}Re -labeled compounds.

Each value represents the mean \pm SD for three experiments. Significance was determined by unpaired Student's *t*-test (**p* < 0.01).

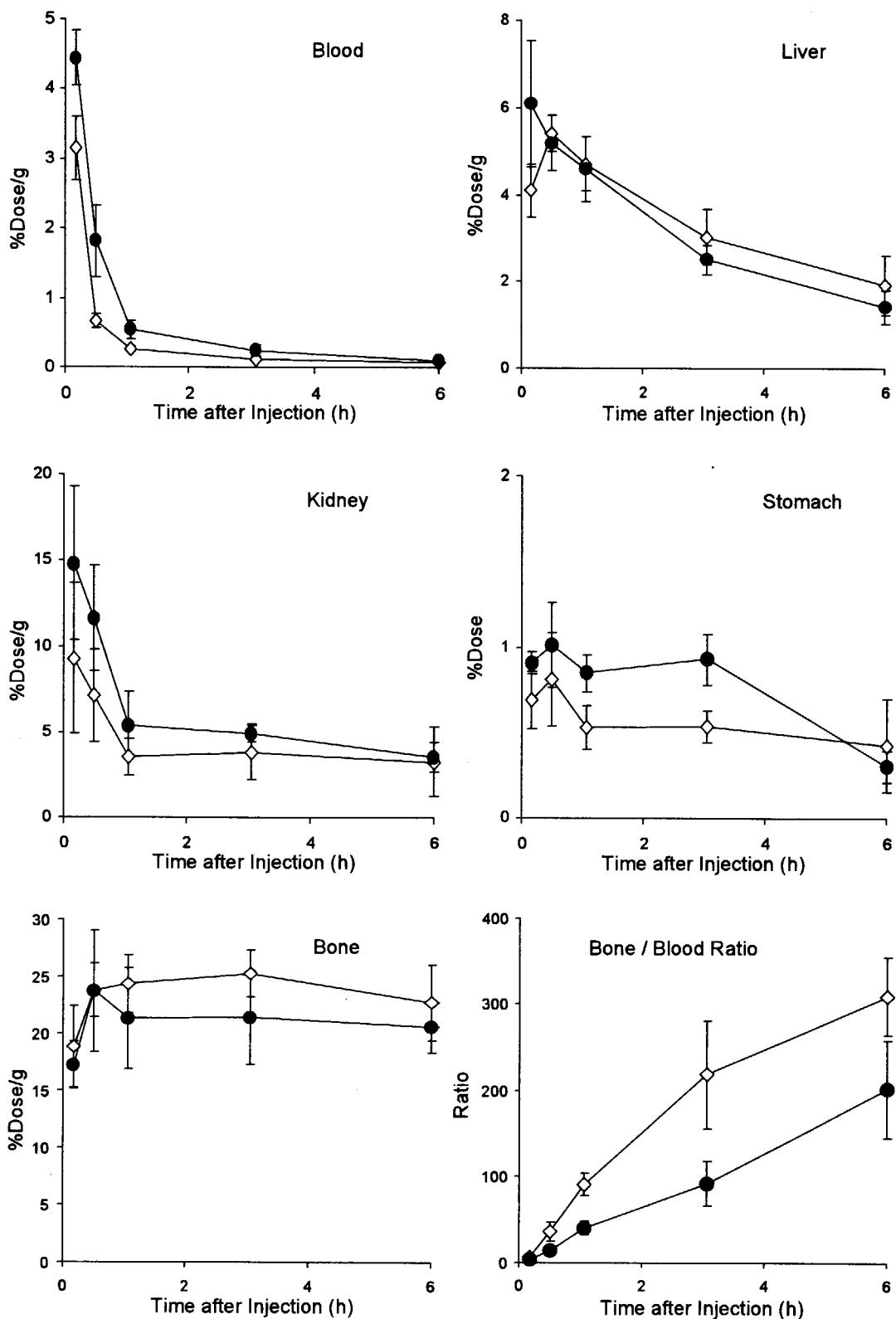


Fig. 3.2.2-2. Comparative distribution of radioactivity after intravenous administration of $^{186}\text{Re}\text{-MAMA-HBP}$ (\diamond) and $^{186}\text{Re}\text{-MAMA-BP}$ (\bullet) in normal mice. Each value represents the mean \pm SD for five mice.

3.2.3 ^{186}Re -MAG3-HBP の開発

(1) はじめに

前節において、ビスホスホネート分子の central carbon への水酸基を導入した化合物 ^{186}Re -MAMA-HBP について報告し、水酸基の導入が、骨への集積性に有効であることを示した。しかし、 ^{186}Re -MAMA-HBP の投与では、 ^{186}Re -MAMA-BP と同様に、非標的組織である肝臓、腎臓への高い放射能集積を認め、この集積性には、 ^{186}Re -MAMA 部位に由来する化合物の物理化学的性質が影響している可能性が示唆された。

特に ^{186}Re -MAMA 錯体の導入に起因する化合物の脂溶性の向上が、肝臓、腎臓への集積性に影響していると考え、本節においては、標識化合物の水溶性を向上させることを計画した。そこで、 ^{186}Re 錯体形成部位として、 ^{186}Re -MAMA 錯体より水溶性が高く、-1 価の電荷を有する ^{186}Re -MAG3 錯体¹⁾を結合した、[(((4-hydroxy-4,4-diphosphonobutyl)carbamoylmethyl)carbamoylmethyl)carbamoylmethyl] oxorhenium(V) (^{186}Re -MAG3-HBP) を合成し、骨疼痛緩和薬剤としての有用性を基礎的に評価した。

(2) 方法

試薬・機器

本節で使用する試薬、機器は前節と同様の試薬、機器を用いた。

Tr-MAG3-HBP の合成(Scheme 3.2.3-1)

塩化トリチル(1)との反応により、メルカブト酢酸(2)のチオール基を Tr 基で保護した。さらに、N-hydroxysuccinimide によりカルボキシル基を活性エステル化した後、glycylglycyl-glycine と反応させることにより、Tr-MAG3(5)を得た。その後、Tr-MAG3 のカルボキシル基を TFP を用いて活性エステル化し、別途合成したビスホスホネート誘導体(7)との反応後、逆相 HPLC により精製し、Tr-MAG3-HBP(8)を得た。逆相 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (10 x 150 mm)カラムを用いて、0.1%の TFA を含有する水：アセトニトリルを 75 : 25 から 30 分で 60 : 40 へ変換するグラディエント法にて、流速 4.7 mL/min の条件で行った。

^{186}Re -MAG3-HBP の作製(Scheme 3.2.3-2)

^{186}Re -MAMA-BP の標識方法と同様の方法で行った。逆相 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (4.6 x 150 mm)カラムを用いて、10 mM の TBAH を含有する 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) : エタノール = 90 : 10 を移動相として、流速 1 mL/min の条件で行った。

分配係数

各 3 mL の 1-オクタノールと 0.1 M のリン酸緩衝液(pH 7.4)を加えた試験管に、10 μL の各標識体を含む溶液を添加し、1 分 x 3 回のボルテックス後、20 分間室温で放置する操作を 3 回繰り返し、1,000g で 5 分間遠心分離した。その後、各層から等量ずつ採取し、放射能を測定することにより分配係数を求めた²⁾。

緩衝液中における安定性の検討

前節と同様の方法で行った。

体内分布の検討

前節と同様の方法で行った。

(3)結果・考察

Tr-MAG3-HBPは、Scheme 3.2.3-1に示す方法で合成した。塩化トリチルとメルカプト酢酸を出発物質とするTr-MAG3-HBPの全合成路において総収率は1.5%であった。また、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPはScheme 3.2.3-2に示す方法で標識し、放射化学的純度95%以上で得られた。

¹⁸⁶Re-MAG3-HBPのインビトロ安定性を評価するために、酸素で飽和した緩衝液中でインキュベートした結果、インキュベート24時間後においても95%以上が未変化体として存在し、インビトロにおいて非常に安定であることが示された(Table 3.2.3-1)。また、マウスに投与した場合、胃への放射能集積は低く、生体内においても安定であることが示唆された(Fig. 3.2.3-1)。

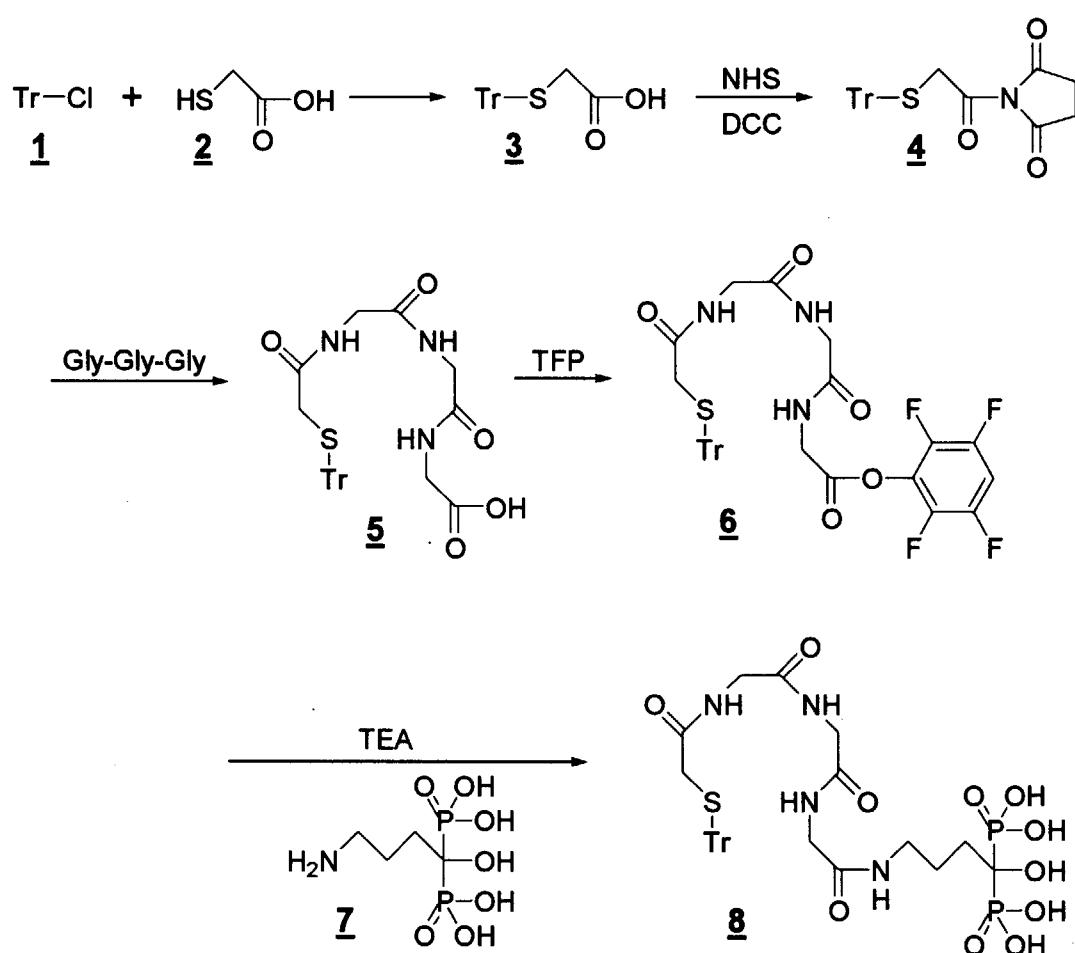
ヒドロキシアパタイト結合実験の結果、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPは、¹⁸⁶Re-MAMA-HBPと同様、水酸基を有していない¹⁸⁶Re-MAMA-BPと比べて、有意に高いヒドロキシアパタイトとの結合親和性を示した(Table 3.2.3-2)。また、このインビトロ実験の結果を反映し、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPは、¹⁸⁶Re-MAMA-BPと比較して、インビボにおいても有意に高い骨への集積を示した(Figure 3.2.2-1)。

分配係数を測定した結果、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPは、¹⁸⁶Re-MAMA-HBP、¹⁸⁶Re-MAMA-BPと比べて、高い水溶性を有することが示された(Table 3.2.3-3)。また、マウス体内分布実験の結果、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPの肝臓、腎臓へ集積性は、¹⁸⁶Re-MAMA-HBP、¹⁸⁶Re-MAMA-BPに比べて有意に低く、¹⁸⁶Re-HEDPと同程度の値を示した(Fig. 3.2.3-1)。したがって、¹⁸⁶Re錯体形成部位として水溶性の高い¹⁸⁶Re-MAG3錯体を用い、化合物の水溶性を向上させたことにより、これらの非標的臓器への集積が低減された可能性が示された。

以上、ビスホスホネート分子内に安定な¹⁸⁶Re 単核錯体形成部位を導入する、二官能性放射性薬剤の概念に基づいた薬剤設計により、骨への集積性と生体内における安定性が両立可能であることが示された。また、central carbonに水酸基を有するビスホスホネート構造に、水溶性の高い¹⁸⁶Re 錯体を導入した¹⁸⁶Re-MAG3-HBPは、骨への選択的な集積と、速やかな血液クリアランスを達成した。従って、¹⁸⁶Re-MAG3-HBPは、癌の骨転移の疼痛緩和薬剤としてより、有用な薬剤である可能性が示された。

参考文献

- 1) Hansen L., Cini R., Taylor A. and Marzilli L.G., *Inorg. Chem.*, **31**, 2801 (1992)
- 2) Yamamura N., Magata Y., Arano Y., Kawaguchi T., Ogawa K., Konishi J. and Saji H., *Bioconjugate Chem.*, **10**, 489 (1999)

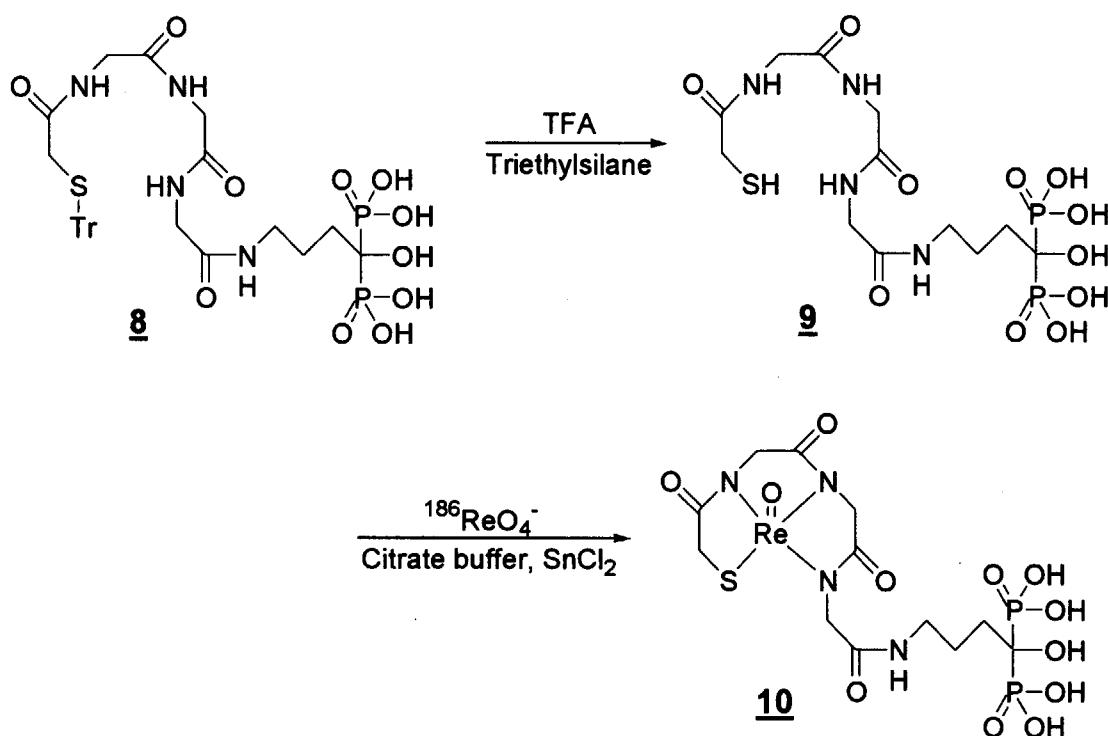
NHS: *N*-Hydroxysuccinimide

Scheme 3.2.3-1. Synthesis of Tr-MAG3-HBP.

Table 3.2.3-1. Stability of ¹⁸⁶Re-MAG3-HBP in buffered-solution.

Incubation time (h)	Radiochemical purity (%)	SD
0	98.69	0.43
1	93.95	0.91
3	94.91	0.50
6	98.62	0.18
24	96.01	0.56

Each value represents the mean (SD) for three experiments.

Scheme 3.2.3-2. Preparation of ^{186}Re -MAG3-HBP.Table 3.2.3-2. Hydroxyapatite binding of ^{186}Re -MAG3-HBP.

Amount of hydroxyapatite (mg)	Hydroxyapatite binding (%)	SD
0.1	65.20	(13.94)
1.0	98.51	(0.09)
2.5	99.20	(0.09)

Each value represents the mean (SD) for three experiments.

Table 3.2.3-3. Partition coefficient of ^{186}Re -labeled compounds.

Compound	logPC	SD
$^{186}\text{ReO}_4^-$	-0.766	(0.004)
^{186}Re -HEDP	-1.538	(0.022)
^{186}Re -MAMA-BP	-0.962	(0.010)
^{186}Re -MAMA-HBP	-1.016	(0.006)
^{186}Re -MAG3-HBP	-2.682	(0.014)

Each value is log(1-octanol/0.1 M phosphate buffer pH 7.4).

Mean (SD) for three experiments.

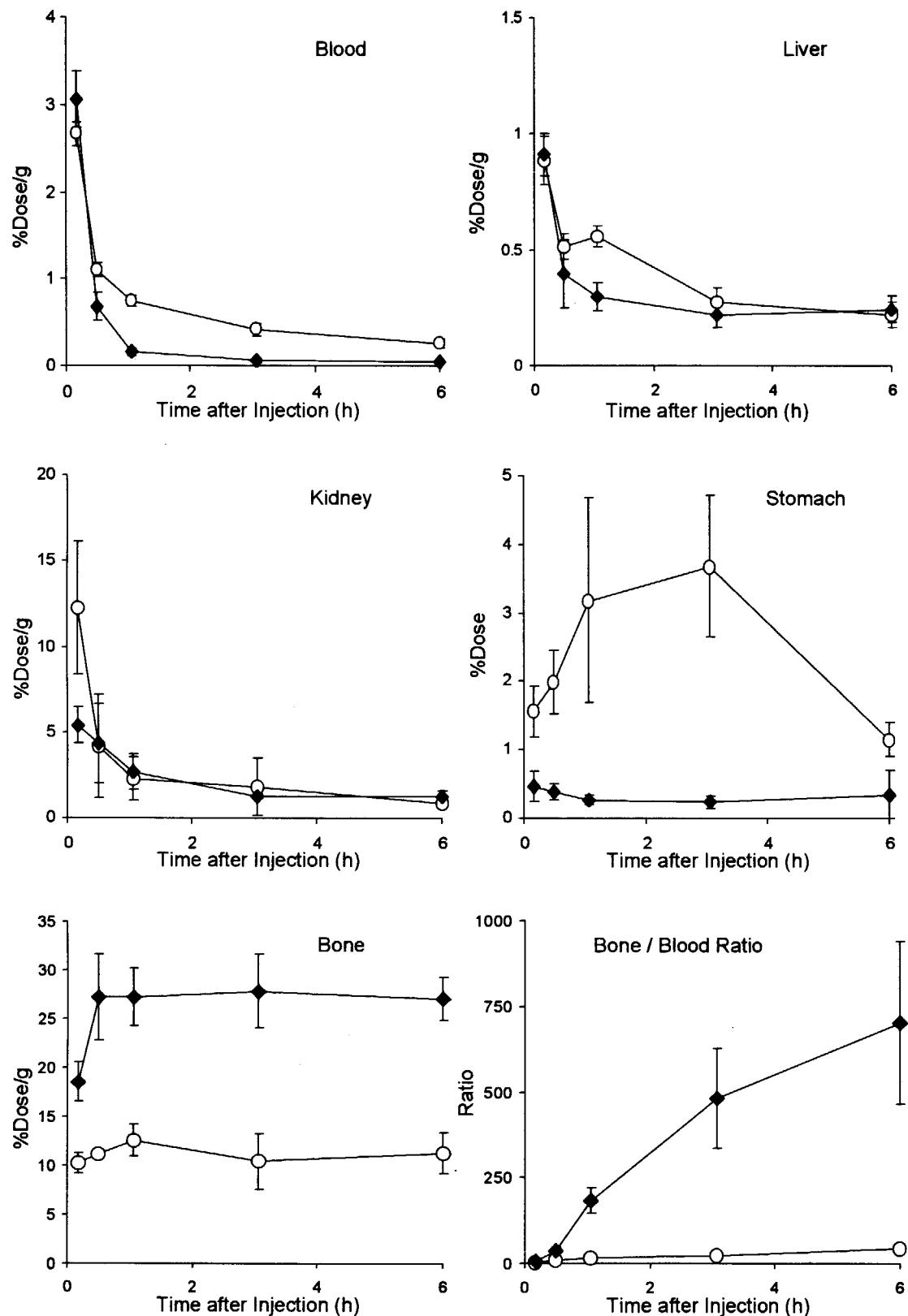


Fig. 3.2.3-1. Comparative distribution of radioactivity after intravenous administration of ^{186}Re -MAG3-HBP (◆) and ^{186}Re -HEDP (○) in normal mice. Each value represents the mean \pm SD for five mice.

3. 3 がん治療を目的とする有機レニウム化合物の開発

(1) 緒言

抗腫瘍モノクローナル抗体はインビビオ画像診断や治療への応用が期待されながら、その多くは実験レベルの域を出なかつたが、最近になって悪性リンパ腫に対する抗 CD20 抗体に β^- 線放出核種 ^{90}Y を結合した内用放射線治療薬剤(Zevalin)がアメリカの FDA の認可を受けるなど、今後更なる薬剤の認可が期待される。さらにタンパク質工学の進展に伴い、従来使用してきた IgG 抗体から、Fab や Fv フラグメントの画像診断や内用放射線治療への応用が進められている。これらの抗体フラグメントをはじめとする低分子ポリペプチドやペプチド（以下、ペプチドと総称する）は、標的組織に対する速やかな移行性と均一な組織分布を示すなど¹⁾、核医学診断や内用放射線治療におけるラジオアイソotope (RI)の運搬体として優れた性質を有する。しかし、RI 標識ペプチドを生体に投与した場合、投与早期から腎臓での長時間にわたる非特異的な放射能滞留が認められ、診断や治療応用への大きな障害となる^{2,3)}。このような非特異的な放射能滞留が解消されれば、RI 標識抗体を用いた画像診断精度を大きく向上する。さらに内用放射線治療においても、その安全性の向上と治療効果の増強につながる。

RI 標識ペプチドを投与した際に観察される腎臓での放射能滞留について、これまで多くの検討がなされており、そして近年、その機序が明らかになった (Fig. 3.3-1)。生体に投与された RI 標識ペプチドの多くは糸球体濾過を受けた後、近位尿細管において腎細胞に再吸収され、リソソームで代謝を受ける^{4,5)}。このとき生成する放射性代謝物の多くは、リソソーム内での残留性が高く、これが腎臓での放射能滞留の原因となっている^{2,6)}。これは、ペプチドの標識核種に金属 RI を用いた場合に、より顕著に観察される。

一方、腎臓におけるペプチドの代謝研究から、ある種の低分子量ペプチドは、糸球体濾過を受けて細胞内に取り込まれる過程で、近位尿細管細胞の管腔側に存在する刷子縁膜酵素によりアミノ酸にまで分解されることが報告されている⁴⁾。したがって、この生体反応を利用して、糸球体濾過を受けた RI 標識抗体フラグメントが腎細胞へ取り込まれる前に、刷子縁膜酵素の作用により抗体から尿排泄性の高い放射性化合物を速やかに遊離すれば、腎臓の非特異的な放射能集積を投与初期から大きく低減できると期待される。我々はこれまでに刷子縁膜酵素の一つ、carboxypeptidase M の基質である Gly-Lys 配列⁷⁾を介して抗体 Fab フラグメントとメタヨード安息香酸とを結合する放射性ヨウ素標識試薬 3'-[^{131}I]iodohippuryl N^c-maleoyl-L-lysine ($[^{131}\text{I}]$ HML)を開発した。 $[^{131}\text{I}]$ HML を用いて作製した標識 Fab は、Fig. 3.3-2 に示すように、carboxypeptidase M の作用により、糸球体濾過を受けた RI 標識 Fab フラグメントから ^{131}I 標識メタヨード馬尿酸を遊離することにより、投与初期から腎臓への放射能集積を大きく低減し、画像診断精度を大きく向上した⁸⁻¹⁰⁾。

一方、核医学に使用される放射性核種では、物理学的性質や経済性、汎用性などの観点から、金属放射性核種の使用が望ましく、標識ペプチドにおいても放射性ヨウ素を用いた HML で達成された研究成果を金属放射性核種であるテクネチウム-99m ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)やレニウム-186 および 188 ($^{186/188}\text{Re}$)へ展開することが強く要望される。この場合、ヨード馬尿酸に対応する生物学的性質を具備する $^{99\text{m}}\text{Tc}$ および $^{186/188}\text{Re}$ 標識錯体を設計し、その錯体が腎臓刷子縁膜酵素によって母体ペ

ペチドから遊離されるように、錯体構造とペプチドとを酵素の基質認識部位で架橋することが必要となる。

近年 ^{99m}Tc や $^{186/188}\text{Re}$ を用いて生体内活性物質を標識する方法として、安定な化学構造をとる有機金属化合物 (organometallic compound)を導入する方法が報告されてきた¹¹⁻¹⁵⁾。有機金属化合物とは錯体中に少なくとも一つ以上の金属炭素間結合をもつ化合物と定義されており、Fig. 3.3-3A 示した (cyclopentadienyl)tricarbonylmetal (CpTM) 誘導体は、5員環である cyclopentadiene と金属原子、3つのカルボニルから構成されている。金属原子は1価の酸化状態をとり、3つのカルボニルの炭素原子と共有結合している一方で、不安定な共鳴構造をとる cyclopentadiene に電子を供給することで、cyclopentadiene が Hückel の $4n+2$ 則を満たして芳香族性を獲得し、全体として中性で脂溶性が高く、かつ化学的に安定な構造を形成する。またこれまでの研究から、CpTM の金属原子として Tc を用いた場合も Re を用いた場合も、生成する化合物の性質は類似することが知られている^{16,17)}。そこで、本研究では、 ^{99m}Tc に比べて半減期が長い $^{186/188}\text{Re}$ を放射性核種として用いて、有機 Re 化合物である (cyclopentadienyl) tricarbonylrhenium (CpTR)を母体構造として選択した。そして、放射性ヨウ素標識馬尿酸と類似した体内動態を示す有機 Re 化合物として、CpTR-COOH (Fig. 3.3-3B), CpTR-COOH に glycine が結合した CpTR-Gly (Fig. 3.3-3C)を設計、合成した。そして、両化合物の生体内における安定性、脂溶性、さらに体内動態を比較した。

次いで CpTR-COOH に腎刷子縁膜酵素の一つである carboxypeptidase M の基質 Gly-Lys 構造を導入した CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH (Fig. 3.3-3D)を合成し、ラットより調整した刷子縁膜小胞 (brush border membrane vesicles : BBMVs) を用いて、carboxypeptidase M による基質認識性を検討し、ペプチド標識薬剤としての応用性を評価した。

(2) 実験材料

$^{186}\text{ReO}_4$ 溶液 (19~20 TBq/g Re, 0.67~0.73 GBq/mL) は日本原子力研究所より HReO₄水溶液 (pH 3.5~4.2) として供給されたものを用いた。 $^{188}\text{ReO}_4$ 溶液は日本原子力研究所より供給された $^{188}\text{WO}_4^{2-}$ (2.3~3.9 GBq/g W, 17~29 MBq/mL) 溶液を用いて Callahan らの報告¹⁸⁾により $^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレーターを調整して用いた。逆相 HPLC は、Cosmosil 5C₁₈-AR-300 (6.4 x 150 mm, Nacalai Tesque) を用い、0.1% trifluoroacetic acid (TFA) を含有する水 (A)と 0.1% TFA を含有する acetonitrile (B)を A:B = 80:20 から A:B = 20:80 へ 30 分間で変換する gradient 法 (solvent system 1)により、流速 1.0 mL/min で溶出した。溶出液はフラコションコレクター (Amersham Biosciences, RediFrac)により 0.5 分間隔で分取後、Auto well γ system (ARC-380M, Aloka) で放射能を測定した。薄層クロマトグラフィー (TLC) は、シリカゲルプレート (Silica gel 60F₂₅₄, Merck) を使用し、chloroform (solvent system 2) あるいは、chloroform:methanol:acetic acid = 30:10:1 (solvent system 3), saline (solvent system 4) を展開溶媒として 10 cm 展開後、0.5 cm ずつ 21 個の切片に切断し Auto well γ system (ARC-380M) で放射能を測定した。SepPak カートリッジは SepPak plus (C18 short body; 360 mg/cartridge および C18 long body; 840 mg/cartridge, Waters)を用いた。Short body では ethanol 6 mL を流した後、H₂O 6 mL を流して、また long body では ethanol 10 mL を流した後、H₂O 10 mL を流して前処理した後

に使用した。共にサンプルを添加後 H_2O 5mL でカラムの洗浄をして、次いで ethanol 2~3 mL で溶出した。その際最初の ethanol 画分の 100 μL は廃棄した。 ^{1}H -NMR は JEOL 社製の JEOL JNM-ALPHA 400 spectrometer を使用した。FAB-MS は JEOL 社製の JEOL JMS-HX-110A mass spectrometer を使用した。レニウムを含む化合物では ^{185}Re と ^{187}Re の両方の質量ピークが観察された。これらのピーク比は同位体存在比に等しく観察された。その他の試薬は、全て特級のものをそのまま使用した。本研究において ^{186}Re と ^{188}Re は同様の反応収率、挙動を示したことから以下 $^{186/188}Re$ として記した。

(3) 実験方法

[1] (Cyclopentadienyl)tricarbonylrhenium 誘導体の合成

1,1'-Bis (carbomethoxy)ferrocene (2)の合成

Methanol 4 mL を丸底ナスフラスコに入れ、10~15°Cに冷却し、そのまま冷却攪拌しながら thionyl chloride 1 mL を徐々に滴下した。10 分後、この溶液に 1,1'-ferrocenedicarbonic acid 1 100 mg を一気に加え、氷浴中の氷がなくなるまで攪拌した後、5 時間還流した。溶媒を留去し、sat. $NaHCO_3$ と ethyl acetate で分液した。有機層を無水 $CaSO_4$ で乾燥させた後、溶媒を減圧留去し、橙色の結晶 0.1052 g (収率: 95.4%)を得た。

1H NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 4.80 [t, 4H, $CH_3\cdot CO\cdot Cp\cdot H_2(\alpha)$], 4.39 [t, 4H, $CH_3\cdot CO\cdot Cp\cdot H_2(\beta)$], 3.80 [s, 6H, $(Cp\cdot COO\cdot CH_3)_2$], MS (FAB): m/z 302 ($M+H$)⁺. Found: 302.

Tricarbonyl (carbomethoxycyclopentadienyl)rhenium ($CpTR\cdot COOMe$) (3)の合成

本化合物は Spradau らの方法¹⁶⁾である double ligand transfer 反応を少し修正して合成した。ボータブルリアクター (内径 0.8 x 8.5 cm; 耐圧ガラス工業)に化合物 2 315 mg (1.0 mmol), ammonium perrhenate 89 mg (0.33 mmol), chromhexacarbonyl 410 mg (0.41 mmol), tin (II) chloride anhydrous 0.106 mg (0.67 mmol)を入れた後、乾燥 methanol 1.0 mL を加えた。反応容器を完全に密封し、180 °Cのシリコンオイル中で 60 分間反応させ、その後 10 分間氷冷し、常温に戻った後、ナスフラスコに反応液を移し、溶媒を減圧留去した。セライト濾過した後、chloroform : hexane = 1 : 1 を溶出液としたシリカゲルクロマトグラフィーによって精製することにより、58.6 mg の化合物 3 を白色結晶として得た (収率 58.6 %)。

1H NMR ($CDCl_3$) δ ppm: 5.94 [t, 2H, $-CO\cdot Cp\cdot H_2(\alpha)$], 5.30 [t, 2H, $-CO\cdot Cp\cdot H_2(\beta)$], 3.74 [s, 3H, $Cp\cdot COO\cdot CH_3$], MS (FAB): m/z 392/394 ($M+H$)⁺. Found: 392/394.

Tricarbonyl (cyclopentadienylcarbonate)rhenium ($CpTR\cdot COOH$) (4)の合成

化合物 3 106 mg (0.27 mmol) を dioxane 400 μL に溶解し、そこへ 2 N $NaOH$ 1.4 mL をゆっくり滴下して 30 分間攪拌した。氷冷後、conc. HCl 240 μL を加え pH を 3 とした。反応溶媒を減圧で留去した後、ethyl acetate 5 mL に再溶解させ 1% HCl 15 mL (5 mL x 3)で洗浄した。有機層を乾燥させ、減圧留去して 化合物 4 の白色結晶 72.3 mg を得た (収率 70.9%)。

1H NMR (CD_3OD) δ ppm: 6.02 [t, 2H, $-CO\cdot Cp\cdot H_2(\alpha)$], 5.48 [t, 2H, $-CO\cdot Cp\cdot H_2(\beta)$], MS (FAB): m/z 378/380 ($M+H$)⁺. Found: 378/380.

**Tricarbonyl[methyl (cyclopentadienylcarbonyl amino)-acetate]rhenium
(CpTR-Gly-OMe) (5)の合成**

化合物4 67.2 mg (0.177 mmol), glycine methyl ester hydrochloride 44.3 mg (0.353 mmol), 1-hydroxybenzotriazole (HOt) 25.4 mg (0.188 mmol)を dimethylformamide (DMF) 1.0 mL に溶解し、氷冷後 1-[3-(dimethylamino)propyl]-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) 40.8 mg (0.213 mmol), triethylamine (TEA) 79 μ L (0.565 mmol)を加え、3 時間氷冷下にて、次いで室温で 6 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、chloroform 5 mL に再溶解し、1% HCl 15 mL (5 mL x 3), sat. NaHCO₃ 15 mL (5 mL x 3)で洗浄した。有機層を無水 CaSO₄ で乾燥後、溶媒を留去して化合物5の白色結晶 77.3 mgを得た (収率 89.5%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 6.24 [s, 1H, Cp-CO-NH], 5.94 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(α)], 5.38 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(β)], 4.13 [d, 2H, -NH-CH₂-COO-CH₃], 3.80 [s, 3H, -NH-CH₂-COO-CH₃], MS (FAB): m/z 450/452 (M+H)⁺. Found: 450/452.

**Tricarbonyl [(cyclopentadienylcarbonyl amino)-acetic acid] rhenium
(CpTR-Gly-OH) (6)の合成**

化合物5の 67.2 mg (0.150 mmol)を dioxane 300 μ L に溶解し、その溶液へ 2 N NaOH 600 μ L をゆっくり滴下して 30 分間攪拌した。Conc. HCl 120 μ L を加え pH を 3 とした。溶媒を減圧留去した後、ethyl acetate 5 mL に再溶解して、1% HCl 15 mL (5 mL x 3)で洗浄した。有機層を無水 CaSO₄ で乾燥後、減圧留去して化合物6の白色結晶 51.5 mgを得た (収率 79.1%)。

¹H NMR (CD₃OD) δ ppm: 6.21 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(α)], 5.60 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(β)], 3.99 [s, 2H, -NH-CH₂-COO-CH₃], MS (FAB): m/z 436/438 (M+H)⁺. Found: 436/438.

Z-Gly-Lys(Boc)-OMe の合成

Z-Gly-OH 84 mg (0.402 mmol), H-Lys(Boc)-OMe·HCl 100 mg (0.337 mmol), HOt 54 mg (0.402 mmol)を DMF 5 mL に溶解して氷冷した。EDC 77 mg (0.402 mmol), TEA 56 μ L (0.402 mmol)を加え、3 時間氷冷中で反応後、室温にて 6 時間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、chloroform 5 mL に再溶解し、1% citric acid 15 mL (5 mL x 3), sat. NaHCO₃ 15 mL (5 mL x 3)で洗浄した。有機層を乾燥させた後、溶媒を減圧留去して、目的物を白色結晶 141 mgを得た (収率 89.1%)。

¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 7.31 [multi, 5H, C₅H₅CH₂-OCO-NH-], 6.88, 5.76 [each 1H, s, C₅H₅-CH₂-OCO-NH-CH₂-CO-NH-], 5.12 [s, 2H, C₅H₅-CH₂-OCO-NH-], 4.77 [s, 1H, -(CH₂)₄-NH-Boc], 4.59 [d, 1H, -NH-CH((CH₂)₄-NH-Boc)-COOCH₃], 3.91 [d, 2H, C₅H₅-CH₂-OCO-NH-CH₂-CO-NH-], 3.71 [s, 3H, -NH-CH((CH₂)₄-NH-Boc)-COOCH₃], 3.06 [d, 2H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], 1.83-1.12 [overlapped, 15H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], MS (FAB): m/z 452 (M+H)⁺, Found: 452.

H-Gly-Lys(Boc)-OMe の合成

Z-Gly-Lys(Boc)-OMe 67.7 mg (150 mmol)を 5%含水 methanol 2 mL に溶解し、10%

Pd/activated carbon 15 mg を加えた後、反応系を H₂ ガスで充満して 12 時間室温で攪拌した。触媒を除去した濾液を減圧留去して H-Gly-Lys(Boc)-OMe を得た。本化合物は、未精製のまま次の反応に使用した。

CpTR-Gly-Lys(Boc)-OMe (7) の合成

未 精 製 の Gly-Lys(Boc)-OMe 47.6 mg (150 mmol), tricarbonyl (cyclopenta-dienylcarbonate)rhenium **4** 68.3 mg (180 mmol), HOBr 24.3 mg (0.180 mmol) を DMF 5 mL に溶解し氷冷した。EDC 48.3 mg (0.252 mmol), TEA 35 μl (0.168 mmol) を加え、3 時間氷冷下にて攪拌後、室温で 6 時間攪拌した。溶媒を減圧留去した後、chloroform 5 mL に再溶解し、1% H₂SO₄ 15 mL (5 mL × 3)，次いで sat. NaHCO₃ 15 mL (5 mL × 3) で洗浄した。有機層を無水 CaSO₄ で乾燥した後、溶媒を減圧留去して CpTR-Gly-Lys(Boc)-OMe 53 mg (収率 53.5%)を得た。

¹H NMR (CDCl₃) δ ppm: 7.61, 7.10 [each 1H, s, Cp-CO-NH-CH₂-CO-NH], 5.99 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(α)], 5.32 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(β)], 4.77 [s, 1H, -(CH₂)₄-NH-Boc], 4.46 [d, 1H, -NH-CH((CH₂)₄-NH-Boc)-COOCH₃], 3.96 [d, 2H, C₅H₅-CH₂-OCO-NH-CH₂-CO-NH-], 3.66 [s, 3H, -NH-CH((CH₂)₄-NH-Boc)-COOCH₃], 3.01 [d, 2H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], 1.82-1.29 [overlapped, 15H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], MS (FAB): m/z 680 (M+H)⁺, Found: 680.

CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH (8) の合成

CpTR-Gly-Lys(Boc)-OMe **7** 53 mg (14.7 μmol) を dioxane 300 μl に溶解し、次いで 2 N NaOH 600 μl をゆっくり滴下して 30 分間攪拌した。5.6 N H₂SO₄ 240 μl を加え pH を 3 として、long body の SepPak カラムで精製した。溶媒を減圧留去して CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH 51.5 mg (収率 57.1%)を得た。

¹H NMR (CD₃OD) δ ppm: 6.12 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(α)], 5.60 [t, 2H, -CO-Cp-H₂(β)], 4.42 [d, 1H, -NH-CH((CH₂)₄-NH-Boc)-COOCH₃], 3.85 [d, 2H, Cp₅CO-NH-CH₂-CO-NH-], 3.04 [t, 2H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], 1.90-1.44 [overlapped, 15H, -NH-CH(COOCH₃)-(CH₂)₃-CH₂-NH-Boc], MS (FAB): m/z 688 (M+Na)⁺, Found: 688.

Tricarbonyl (carbomethoxycyclopentadienyl)[^{186/188}Re]rhenium ([^{186/188}Re]CpTR-OMe) (9) の合成

本化合物は、Spradau らの方法¹⁶⁾に準じて、double ligand transfer 反応により合成した。ポータブルリアクター（内径 0.3 x 15 cm; 耐圧ガラス工業）に化合物 **2** 10 mg, chromhexacarbonyl 14 mg, tin (II) chloride 11 mg を加えた。[^{186/188}Re]ReO₄ 水溶液の溶媒を留去した後、残渣を methanol 500 μl で抽出し、反応容器に加えた。反応容器を完全に密封した後、180~190 °C の油浴中で 20 分間反応した。氷冷で 10 分冷却し、室温に戻し、反応液を 10 mL 容器に移し、減圧留去した。残渣を chloroform に再溶解させた後、chloroform を溶出液としたシリカゲルクロマトグラフィーで精製することで放射性レニウム標識化合物 **9** を得

た。放射化学的収率、放射化学的純度はそれぞれ TLC (solvent system 2)により求めた。

Tricarbonyl (cyclopentadienylcarbonate)[^{186/188}Re]rhenium ([^{186/188}Re]CpTR-COOH) (4)の合成

^{186/188}Re 標識化合物 3 を dioxane 200 μ l に溶解した後、2 N NaOH sol. 600 μ l を加えて室温で 10 分間攪拌した。反応液を conc. HCl 120 μ l で酸性にした後、short body の SepPak カラムで精製して ^{186/188}Re 標識化合物 4を得た。放射化学的純度は逆相 HPLC (solvent system 1) と TLC (solvent system 3)により求めた。

Tricarbonyl [(cyclopentadienylcarbonyl amino)-acetate] [^{186/188}Re]rhenium ([^{186/188}Re]CpTR-Gly) (6)の合成

^{186/188}Re 標識化合物 4 を dichloromethane 200 μ l に溶解し、この溶液へ *N,N*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC) 1 mg, HOBT 1 mg を加え、室温で 5 分間攪拌した。N₂ガスにて溶媒を留去した後、DMF 200 μ l に溶解した glycine methyl ester hydrochloride 1 mg を加え、攪拌下 *N,N*-diisopropylethylamine 1 μ l を加え室温で 20 分間攪拌した。次いで、反応溶液に 2 N NaOH 600 μ l をゆっくり滴下して 10 分間攪拌した後、conc. HCl 120 μ l を加え反応溶液を酸性にしてから short body の SepPak カラムに付し、[^{186/188}Re]CpTR-Glyを得た。放射化学的純度は逆相 HPLC (solvent system 1) と TLC (solvent system 3)により求めた。

[^{186/188}Re]CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH (8)の合成

^{186/188}Re 標識化合物 4 を dichloromethane 200 μ l に溶解し、DCC 1 mg, HOBT 1 mg を順次加え、室温で 5 分間攪拌した。反応溶媒を減圧留去した後、そこへ未精製の Gly-Lys(Boc)-OMe を 5 mg/mL となるよう DMF に溶解した溶液 200 μ l を加え、20 分間室温で攪拌した。反応終了後、2 N NaOH 600 μ l をゆっくり滴下して更に 10 分間攪拌した。反応溶液に 5.6 N H₂SO₄ 240 μ l を加えて酸性にした後、short body の SepPak カラムで精製することで [^{186/188}Re]CpTR-Gly-Lys(Boc)-OHを得た。放射化学的純度は逆相 HPLC (solvent system 1) と TLC (solvent system 3)により求めた。

[2] *in vitro*における安定性の検討と分配係数

生理食塩水に溶解した [^{186/188}Re]CpTR-COOH および [^{186/188}Re]CpTR-Gly (40 μ l)を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4)あるいはマウス血漿 (360 μ l)に加え、37 °Cでインキュベートした。1, 3, 6 時間後にそれぞれの試料の一部を TLC (solvent system 4) により分析し、緩衝液中および血漿中での安定性、ならびに血漿タンパク質との結合を調べた。

また、1-octanol と 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) それぞれ 2 mL よりなる混液に、生理食塩水に溶解した [^{186/188}Re]CpTR-COOH あるいは [^{186/188}Re]CpTR-Gly 溶液 10 μ l を加え、10 分間振とう後、遠心分離 (1000–2000 g) にて 1-octanol とリン酸緩衝液とに分離し、それぞれの放射能を測定して比を求めた。次いで、1-octanol 層を取り出し、この溶液に同量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を新たに加え、10 分間振とう、遠心分離を行い、1-octanol 層と水層と

の放射能の比が一定となるまで、この操作を繰り返した。分配係数は 1-octanol の放射能を水層の放射能層で割った値として求めた。

[3] マウス体内動態の検討

$[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$, $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}$ をそれぞれ生理食塩水に溶解し、一群 3 匹の 6 週齢 ddY 系雄性マウスに一匹あたり $0.3 \mu\text{Ci}$ ($100 \mu\text{l}$) になるように尾静脈から投与した。投与 10, 30 分, 1, 3, 6 時間後に屠殺、臓器を摘出し、重量と放射能を測定した。また、投与後 6 時間までに排泄された糞便と尿を採取し、放射能を測定した。更に投与後 6 時間までに排泄された尿を 10-kDa の限外濾過膜で濾過し、濾液を逆相 HPLC (solvent system 1) で分析して尿中に排泄された放射能の化学形を検討した。

[4] 刷子縁膜小胞とのインキュベート

刷子縁膜小胞 (BBMVs) はラット腎臓から Hori らの方法に従い作製した¹⁹⁾。BBMVs は、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) にてタンパク質濃度が 10 mg/mL になるように調整して用いた。BBMVs 溶液 ($20 \mu\text{l}$) を 4°C で 2 時間プレインキュベートした後、 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}\cdot\text{Lys}(\text{Boc})\cdot\text{OH}$ 溶液 ($20 \mu\text{l}$) を加え、 37°C でインキュベートした。経時的に、TLC (solvent system 3) で分析した。また溶液を $0.45 \mu\text{m}$ の膜で濾過した濾液を逆相 HPLC (solvent system 1) に付し、溶出液を分析した。なお、carboxypeptidase M の活性化物質である Co^{2+} (CoCl_2) および阻害剤である DL-2-mercaptomethyl-3-guanidinoethylthiopropanoic acid (MGTA) は、プレインキュベートの時点で、いずれも 1 mM となるように加えた後 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}\cdot\text{Lys}(\text{Boc})\cdot\text{OH}$ を加え、溶液中に存在する放射能を逆相 HPLC (solvent system 1), TLC (solvent system 4) で分析した。

(4) 結果

[1] $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$, $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}$, $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}\cdot\text{Lys}(\text{Boc})\cdot\text{OH}$ の合成
CpTR 誘導体は Scheme 3.3-1 に示す経路で合成した。 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$ は $1,1'\text{-bis}(\text{carbomethoxy})\text{ferrocene}$, ammonium perrhenate, chromhexacarbonyl, tin (II) chloride anhydrous を用いた double ligand transfer 反応によって $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOMe}$ を合成し、次いでエステル加水分解を経て、放射化学的収率 18.7%、放射化学的純度 95% 以上で得た。 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}$ は $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$ と glycine methyl ester との縮合反応、エステル加水分解を経て放射化学的収率 89.5%、放射化学的純度 95% 以上で得た。

$[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}\cdot\text{Lys}(\text{Boc})\text{OH}$ は $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$ と H-Gly-Lys(Boc)-OMe のと縮合反応、エステル加水分解を経て、放射化学的収率 92.1%、放射化学的純度は 95% 以上で得た。非放射性 Re を用いて合成、構造確認を行ったそれぞれの化合物と放射性 Re を用いた標識体の逆相 HPLC による分析の結果を Fig. 3.3-4 に示す。

[2] $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$, $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}$ の分配係数と安定性の評価

$[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{COOH}$ と $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\cdot\text{Gly}$ を 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) およびマウス

血漿中でインキュベートした際の未変化体の割合を Fig. 3.3-5 に示す。[^{186/188}Re]CpTR-COOH, [^{186/188}Re]CpTR-Gly は共に、6 時間後においてもその 95%以上が未変化体として存在した。また血漿中 6 時間インキュベート前後の TLC の結果を Fig. 3.3-6 に示すが、両者共にインキュベート前後で相違は見られなかった。

[^{186/188}Re]CpTR-COOH, [^{186/188}Re]CpTR-Gly の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) と 1-octanol 間での分配係数を測定したところ、[^{186/188}Re]CpTR-COOH の 7.12 (± 0.12) に対して、[^{186/188}Re]CpTR-Gly は 2.02 (± 0.05) と低い値を示した。

[3] [^{186/188}Re]CpTR-COOH, [^{186/188}Re]CpTR-Gly のマウスにおける体内動態

[^{186/188}Re]CpTR-COOH および [^{186/188}Re]CpTR-Gly をマウスに投与後の放射能分布の経時変化を Table 3.3-1 に示す。両化合物は共に、血液からの速やかな放射能の消失を示し、排泄系の臓器以外への放射能の集積は見られなかった。投与早期において、[^{186/188}Re]CpTR-COOH は [^{186/188}Re]CpTR-Gly に比べて肝臓や腎臓への高い集積を示した。また、[^{186/188}Re]CpTR-COOH では、[^{186/188}Re]CpTR-Gly に比べて腸管への放射能の集積が経時に増加した。一方、投与後 6 時間までに両者は主に尿中へと排泄されたが、[^{186/188}Re]CpTR-COOH では [^{186/188}Re]CpTR-Gly に比べて糞便中への高い排泄を示した。

[^{186/188}Re]CpTR-COOH および [^{186/188}Re]CpTR-Gly の投与 6 時間後まで採取した尿に存在する標識化合物の化学形を逆相 HPLC を用いて調べた結果を Fig. 3.3-7 に示す。[^{186/188}Re]CpTR-COOH は未変化体である保持時間 14 分のピーク以外に、保持時間 10.5 分と 7.5 分前後に新しいピークが観測された。10.5 分のピークは標品を用いた分析から [^{186/188}Re]CpTR-Gly であることが明らかになった。一方、[^{186/188}Re]CpTR-Gly では、尿中に存在するすべての放射能が未変化体である 10.5 分のピークとして検出された。なお、尿サンプルの前処理に使用した 10-kDa の限外濾過の前後において、放射能の減少は観察されなかった。

[4] 刷子縁膜小胞とのインキュベート

[^{186/188}Re]CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH を BBMVs の存在下でインキュベートし、反応溶液を経時に分析を行った結果を Fig. 3.3-8 に示す。インキュベート前の [^{186/188}Re]CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH (Fig. 3.3-8A) と比較して、時間経過に伴い、逆相 HPLC において保持時間 10.5 分、TLC では Rf 0.5 付近に新しいピークが観察され、6 時間後では、11.5%の放射能が検出された。また、標品を用いた分析から、新たに検出された放射能ピークは、[^{186/188}Re]CpTR-Gly の保持時間および Rf 値と一致した。

刷子縁膜酵素の一つであり Gly-Lys 配列を基質として認識する carboxypeptidase M の活性化剤である Co²⁺および阻害剤である MGTA をインキュベート溶液中に添加した際の反応溶液の分析結果を Fig. 3.3-9C, D に示す。活性化剤の添加で [^{186/188}Re]CpTR-Gly 画分の放射能が 33.9%に増加し、阻害剤の存在下では [^{186/188}Re]CpTR-Gly 画分の放射能が 0.74 %まで低減した。なお、0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で [^{186/188}Re]CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH をインキュベートした場合、RP-HPLC および TLC における放射能のピークに変化が見られなかった。

(5) 考察

ペプチドの放射性ヨウ素標識薬剤である HML で達成された投与初期からの腎臓での放射能滞留の低減を、金属 RI である ^{99m}Tc や $^{186/188}\text{Re}$ へと展開するには、ヨード馬尿酸と類似の体内動態を示す ^{99m}Tc および $^{186/188}\text{Re}$ 化合物を選択し、本化合物が腎臓刷子縁膜酵素の作用により母体ペプチドから速やかに遊離されるよう酵素認識部位を導入した化合物の設計が必要である。ヨード馬尿酸と類似した体内動態を示す ^{99m}Tc 錯体として、これまで $^{99m}\text{Tc}\text{-mercaptoacetyltriglycine}$ ($^{99m}\text{Tc}\text{-MAG}_3$) や $^{99m}\text{Tc}\text{-}N,N\text{-ethylene dicysteine}$ ($^{99m}\text{Tc}\text{-CD}$) が開発され、医薬品としても使用されている。しかし $^{111}\text{In}\text{-DTPA}$ 誘導体を用いた検討から、金属キレート構造と carboxypeptidase M の基質である Gly-Lys 配列とを直接結合した場合、基質としての認識性は著しく低下した。一方 HML 分子内の Gly-Lys 配列では、glycine にヨード安息香酸が結合しているが、その配列は酵素による認識を受けて速やかに切断される。そこで、芳香族性を有する CpTM (M = Tc および Re) 構造を母体とする CpTR-COOH に glycine を導入した CpTR-Gly をヨード馬尿酸の構造類似体として考案した。

ペプチド標識へ応用する場合、錯体構造が生体内、とりわけ血液中で安定に存在することが基本的に要求される。また最近ペプチドの ^{99m}Tc 標識で汎用されている 6-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid (HYNIC) を用いた検討から、 ^{99m}Tc や $^{186/188}\text{Re}$ 錯体構造と血漿タンパク質との結合が、標識ペプチドの血液クリアランスを遅延する原因であることが示された^{20,21)}。 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH および $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly は血漿中で高い安定性を示し (Fig. 3.3-5)、また血漿タンパク質との結合を認めない (Fig. 3.3-6) ことから、ペプチド標識に基本的に必要な要求を満たすことが明らかとなった。

$[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH および $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly の生体内代謝に対する安定性を評価するため、マウスに投与して、その動態を追跡した。血漿タンパク質との低い結合性を反映して、両者は血液からの速やかな消失を示した。しかし、両者の体内動態には相違が観察され、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH は胆汁排泄と尿排泄により体外へ排泄されたのに対して、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly では尿排泄が主たる排泄経路であった (Table 3.3-1)。この相違には $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH に glycine が結合したことによる水溶性の増加の関与が推察され、それは両化合物の分配係数や RP-HPLC の保持時間 (Fig. 3.3-4) の相違からも支持される。さらに、尿中へ排泄された放射能の分析から、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH は未変化体の他に、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly を含む複数の水溶性代謝物を示し (Fig. 3.3-7A)、glycine 抱合を含めた様々な代謝反応を受けることを示す。それに対して、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly は、尿中へ未変化体として排泄され (Fig. 3.3-7B)、生体内代謝反応に対しても高い安定性を有することが確認された。以上の検討から、 $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly は生体内で高い安定性を有し、またヨード馬尿酸と極めて類似した体内動態を示すことから、腎臓の刷子縁膜酵素の作用により母体ペプチドから本化合物を遊離することが可能となれば、 $^{186/188}\text{Re}$ 標識ペプチドの投与によく腎臓での放射能滞留を投与初期から大きく低減することが可能と期待される。

先の検討から、HML の構成成分である 3'-iodohippuryl- N^{ϵ} -Boc-L-lysine は、ラット腎臓から調整した BBMVs によりヨード馬尿酸を遊離することが確認されている。そこでリジンの N^{ϵ} -アミノ残基を Boc 保護し、分子内に Gly-Lys 配列を有する $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly-Lys(Boc)-OH を用

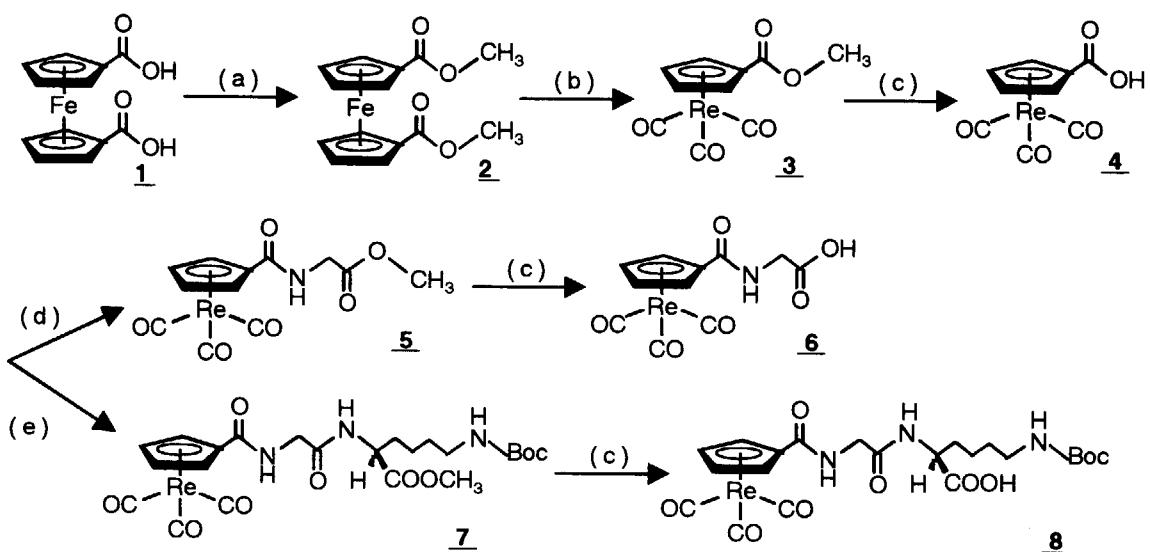
いて検討を行った。そして、 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR}\text{-Gly-Lys(Boc)-OH}$ は、BBMVs の存在下で、 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR-Gly}$ を実際に生成することを確認した (Fig. 3.3-8B)。さらに $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR-Gly}$ の生成は、carboxypeptidase M の活性化剤の添加で有意に増加し (Fig. 3.3-8C)、阻害剤の存在では大幅な抑制を受けた (Fig. 3.3-8D)。これらの結果は、 $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR-Gly-Lys(Boc)-OH}$ は BBMVs に存在する carboxypeptidase M の作用で $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR-Gly}$ を遊離することを強く示唆する。

以上の結果から、CpTR を基本構造にすることで、刷子縁膜酵素の作用により母体ペプチドからヨード馬尿酸と似た体内動態を示す $[^{186/188}\text{Re}]Cp\text{TR-Gly}$ を遊離する可能性が強く示され、本検討により、これまで困難とされていた放射性ヨウ素標識 HML で達成された成果を ^{99m}Tc や $^{186/188}\text{Re}$ へと実際に展開できる可能性が示された。Carboxypeptidase M はラットのみならずヒト刷子縁膜にも存在することから⁷⁾、本研究をさらに進展することにより、臨床においても、投与初期から腎臓への放射能集積を解消し、標的組織である癌への選択的な放射能集積を与えることが期待される。

参考文献

- 1) Yokota T, Milenic DE, Whitlow M, Wood JF, Hubert SL, Schloss J., *Cancer Res.*, **53**, 3776 (1993).
- 2) Choi CW, Lang L, Lee JT, Webber KO, Yoo TM, Chang HK, Le N, Jagoda E, Paik CH, Pastan I, et al., *Cancer Res.*, **55**, 5323 (1995).
- 3) Behr TM, Becker WS, Bair HJ, Klein MW, Stuhler CM, Cidlinsky KP, Wittekind CW, Scheele JR, Wolf FG., *J Nucl Med.*, **36**, 430 (1995).
- 4) Silbernagl S., *Physiol Rev.*, **68**, 911 (1988).
- 5) Maack T, Johnson V, Kau ST, Figueiredo J, Sigulem D., *Kidney Int.*, **16**, 251 (1979).
- 6) Schott ME, Milenic DE, Yokota T, Whitlow M, Wood JF, Fordyce WA, Cheng RC, Schloss J., *Cancer Res.*, **52**, 6413 (1992).
- 7) Skidgel RA., *Trends Pharmacol Sci.*, **9**, 299 (1988).
- 8) Arano Y, Fujioka Y, Akizawa H, Ono M, Uehara T, Wakisaka K, Nakayama M, Sakahara H, Konishi J, Saji H., *Cancer Res.*, **59**, 128 (1999).
- 9) Fujioka Y, Arano Y, Ono M, Uehara T, Ogawa K, Namba S, Saga T, Nakamoto Y, Mukai T, Konishi J, Saji H., *Bioconjug Chem.*, **12**, 178 (2001).
- 10) Nakamoto Y, Sakahara H, Saga T, Sato N, Zhao S, Arano Y, Fujioka Y, Saji H, Konishi J., *Br J Cancer.*, **79**, 1794 (1999).
- 11) Egli A, Alberto R, Tannahill L, Schibli R, Abram U, Schaffland A, Waibel R, Tourwe D, Jeannin L, Iterbeke K, Schubiger PA., *J Nucl Med.*, **40**, 1913 (1999).
- 12) Spradau TW, Edwards WB, Anderson CJ, Welch MJ, Katzenellenbogen JA., *Nucl Med Biol.*, **26**, 1 (1999).

- 13) Skaddan MB, Wust FR, Jonson S, Syhre R, Welch MJ, Spies H, Katzenellenbogen JA., *Nucl Med Biol.*, 27, 269 (2000).
- 14) Spradau TW, Katzenellenbogen JA., *Bioorg Med Chem Lett.*, 8, 3235 (1998).
- 15) Tamagnan G, Baldwin RM, Kula NS, Baldessarini RJ, Innis RB., *Bioorg Med Chem Lett.*, 10, 1113 (2000).
- 16) Spradau TW, Katzenellenbogen JA., *Organometallics.*, 17, 2009 (1998).
- 17) Spradau TW, Katzenellenbogen JA., *Bioconjug Chem.*, 9, 765 (1998).
- 18) Callahan AP, Rice DE, Knapp FFJ., *NUC-COMPACT.*, 20, 3 (1989).
- 19) Hori R, Tomita Y, Katsura T, Yasuhara M, Inui K, Takano M., *Biochem Pharmacol.*, 45, 1763 (1993).
- 20) Ono M, Arano Y, Uehara T, Fujioka Y, Ogawa K, Namba S, Mukai T, Nakayama M, Saji H., *Bioconjug Chem.*, 10, 386 (1999).
- 21) Ono M, Arano Y, Mukai T, Fujioka Y, Ogawa K, Uehara T, Saga T, Konishi J, Saji H., *Nucl Med Biol.*, 28, 215 (2001).



Scheme 3.3-1.

Reagents: (a) MeOH, SOCl_2 ; (b) NH_4ReO_4 , $\text{Cr}(\text{CO})_6$, SnCl_2 ; (c) NaOH ; (d) DCC / EDC, HOBT, H-Gly-OMe; (e) DCC / EDC, HOBT, H-Gly-Lys(Boc)-OMe.

Table 3.3-1. Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of [^{186/188}Re]CpTR-COOH and [^{186/188}Re]CpTR-Gly in mice^a.

	Time after Injection				
	10 min	30 min	1 h	3 h	6 h
[^{186/188} Re]CpTR-COOH					
Blood	0.92 (0.10)	0.31 (0.07)	0.30 (0.11)	0.25 (0.11)	0.24 (0.07)
Kidney	37.70 (8.28)	16.09 (3.34)	7.90 (0.67)	3.68 (0.33)	3.27 (0.91)
Liver	16.14 (3010)	13.20 (2.81)	9.50 (0.71)	6.43 (0.51)	3.96 (0.19)
Intestine	4.10 (1.62)	5.02 (1.46)	8.17 (2.41)	9.56 (2.57)	13.67 (1.34)
Stomach ^b	0.68 (0.14)	0.85 (0.46)	0.77 (0.45)	0.55 (0.16)	0.74 (0.39)
Urine ^b					55.25 (5.93)
Feces ^b					8.91 (2.44)
[^{186/188} Re]CpTR-Gly					
Blood	0.73 (0.06)	0.40 (0.11)	0.18 (0.09)	0.14 (0.05)	0.11 (0.04)
Kidney	21.08 (4.70)	12.07 (5.68)	4.80 (0.73)	2.44 (0.32)	1.86 (0.62)
Liver	4.08 (0.76)	2.17 (0.85)	1.41 (0.62)	0.77 (0.04)	0.74 (0.19)
Intestine	1.86 (0.10)	1.79 (0.63)	2.52 (1.13)	2.70 (0.84)	4.64 (1.85)
Stomach ^b	0.63 (0.40)	0.84 (0.14)	1.07 (0.46)	1.89 (0.41)	0.76 (0.43)
Urine ^b					77.56 (1.43)
Feces ^b					6.58 (1.53)

^aExpressed as %ID/g.

^bExpressed as %ID.

Mean (S.D.) of three to four animals for each point.

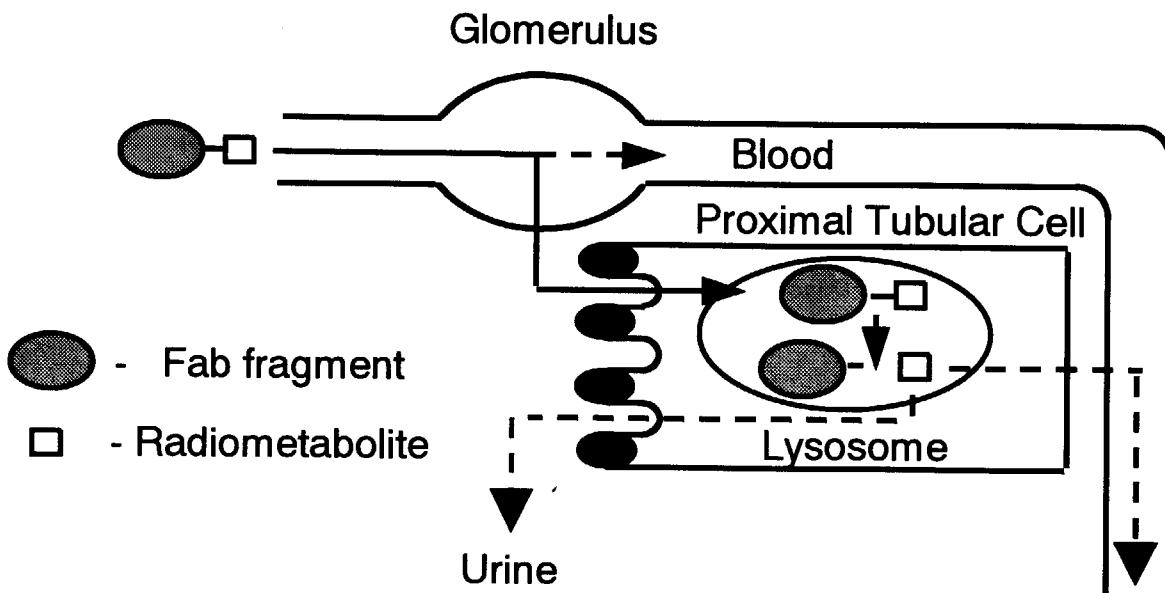


Fig. 3.3-1. Mechanism of renal radioactivity localization of radiolabeled low molecular weight polypeptides. Slow elimination rates of radiometabolite (□) from the lysosomal compartments would be responsible for the long residence time of the radioactivity in the kidney.

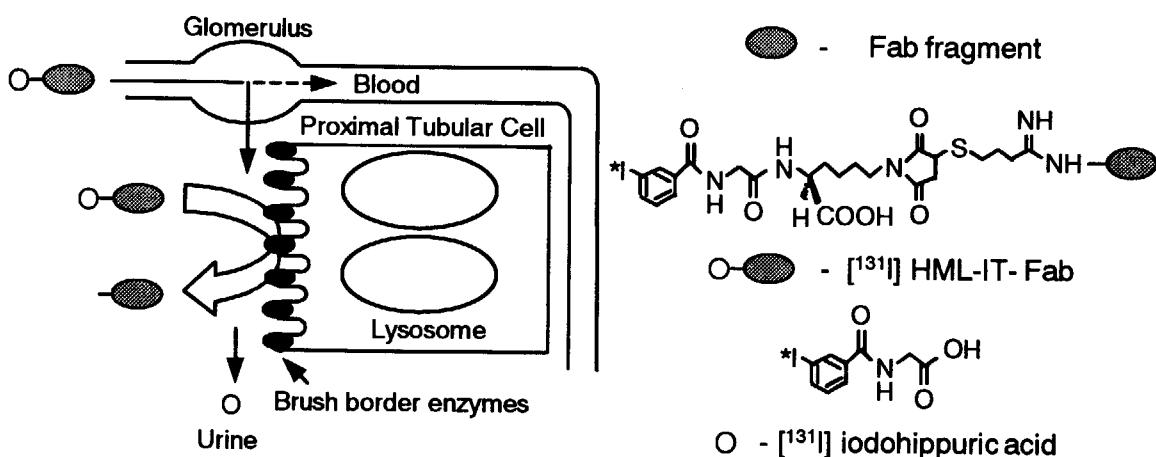


Fig. 3.3-2. Renal handling of $[^{131}\text{I}]$ HML-conjugated-Fab. $[^{131}\text{I}]$ iodohippuric acid (○) is released before the antibody fragments are incorporated into the renal cells by the action of the brush border enzymes present on the lumen of renal tubules.

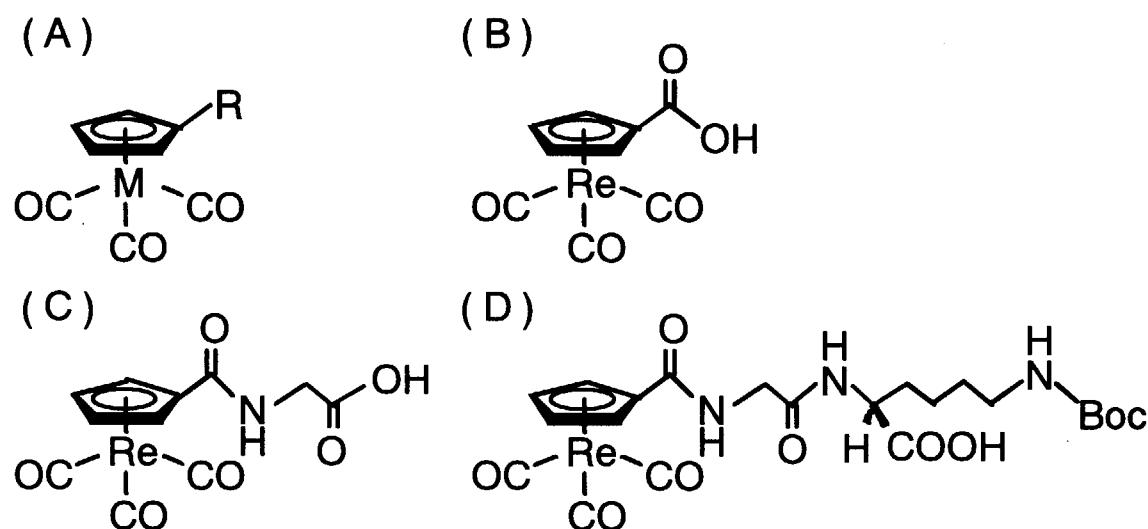


Fig. 3.3-3. Chemical structure of (A) CpTM, (B) CpTR-COOH, (C) CpTR-Gly and (D) CpTR-Gly-Lys(Boc)OH.

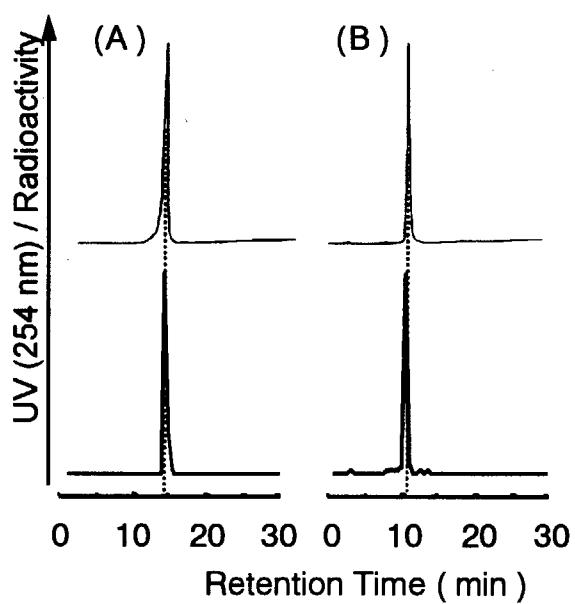


Fig. 3.3-4. RP-HPLC elution profiles of $[^{185/187}\text{Re}]$ CpTR-COOH (A) and $[^{185/187}\text{Re}]$ CpTR-Gly (B) as determined by UV (254 nm) trace (upper). Radioactivity trace of $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-COOH (A) and $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly (B) (bottom) showed retention times identical to those of non-radioactive counterparts.

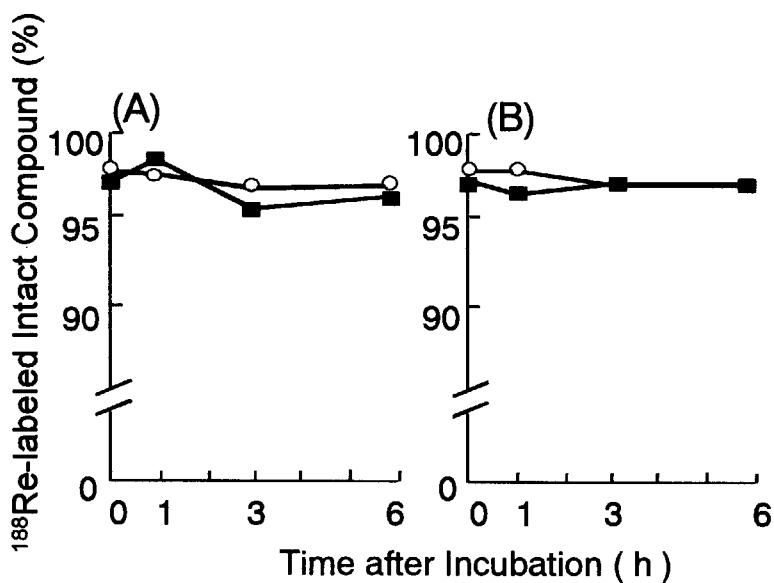


Fig. 3.3-5. Stability of $[^{186/188}\text{Re}] \text{CpTR-COOH}$ (\circ), and $[^{186/188}\text{Re}] \text{CpTR-Gly}$ (\blacksquare) in buffered solution (A) and murine plasma (B).

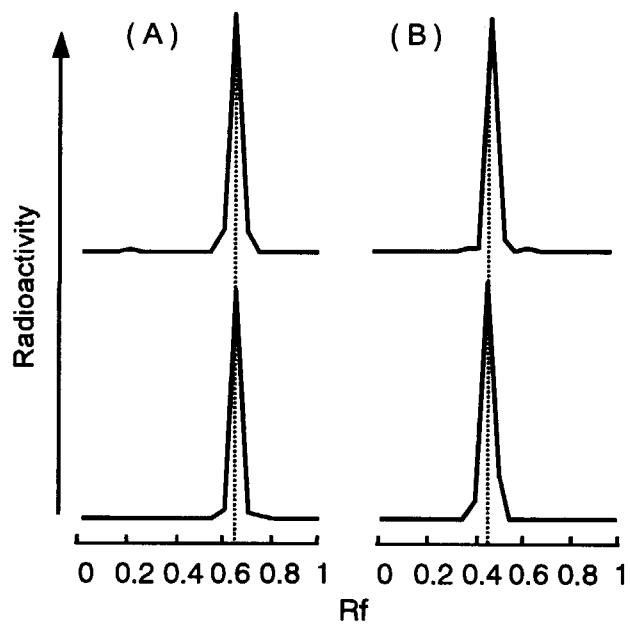


Fig. 3.3-6. TLC radioactivity profiles of $[^{186/188}\text{Re}] \text{CpTR-COOH}$ (A) and $[^{186/188}\text{Re}] \text{CpTR-Gly}$ (B) before (upper) and after 6 h (bottom) incubation in murine plasma.

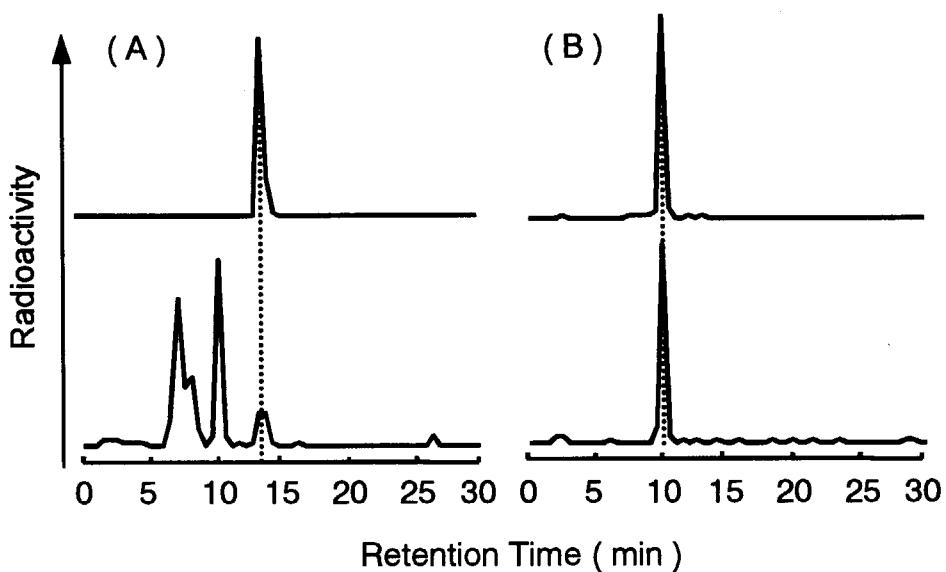


Fig. 3.3-7. (A) RP-HPLC radioactivity profiles of $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-COOH}$ (upper) and urine samples obtained by 6 h postinjection of $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-COOH}$ (bottom). (B) RP-HPLC radioactivity profiles of $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-Gly}$ (upper) and urine samples obtained by 6 h postinjection of $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-Gly}$ (bottom). $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-COOH}$ had a retention time of 14 min, while $[^{186/188}\text{Re}]\text{CpTR-COOH}$ had a retention time of 10 min.

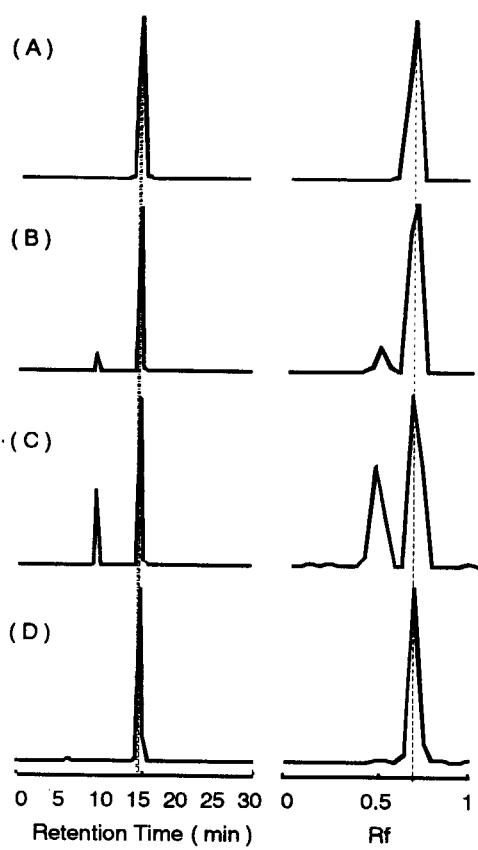


Fig. 3.3-8. RP-HPLC (left) and TLC (right) radioactivity profiles of $[^{186/188}\text{Re}]$ CpTR-Gly-Lys(Boc)OH before incubation (A), after 6 h incubation with BBMVs (B), in the presence of 1 mM Co^{2+} (C) and in the presence of 1 mM MGTA (D) at 37 °C.

3. 4 ^{186}Re 標識抗体を用いた放射免疫療法による微小残存腫瘍の制御の可能性

3.4.1 微小残存腫瘍に対する補助療法としての可能性の検討：肝転移モデル

(1) 抄訳

微小腫瘍に対する内照射療法において β 線核種を用いた場合、線量の多くが病巣外に分布してしまうという限界が指摘されている。しかし、微小残存腫瘍に対する β 線核種標識放射免疫療法の有用性がこれまで主に卵巣癌患者において報告されている。本研究では、ヒト大腸癌細胞を経脾的に移植して作成した大腸癌肝転移モデルにおいて ^{186}Re 標識抗大腸癌抗体A7による放射免疫療法の有効性を検討した。このモデルでは移植1週後に1mm以下の腫瘍結節が見られ、2週後には数mmの大きさとなり互いに融合する状態となる。 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ は効果的に転移腫瘍に集積し、抗体投与の2日後に $25.9 \pm 13.4\% \text{ID/g}$ の値を示した。移植2週後に7MBqの $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ で行った放射免疫療法により、転移腫瘍の増殖は未治療群と比較し著明に抑制された。移植4週後の肝転移腫瘍重量は未治療群の $5.96 \pm 0.87\text{ g}$ に対し、治療群では $1.25 \pm 0.75\text{ g}$ であった($p<0.0001$)。放射免疫療法を移植1週後に行うことにより、より効果的な増殖抑制効果が得られた($0.08 \pm 0.05\text{ g}$; $p<0.002$)。移植1週後に行った非特異的抗体 $^{186}\text{Re}\text{-HPMS-1}$ による放射免疫療法では、軽度の増殖抑制効果を示したもの($3.39 \pm 0.25\text{ g}$)、その効果は $^{186}\text{Re}\text{-A7 RIT}$ による特異的放射免疫療法に比べ効果は明らかに小さかった($p<0.0001$)。これらの結果より、微小残存腫瘍の存在する癌患者における補助療法としての、 ^{186}Re 標識抗体による放射免疫療法の可能性が示されたと考える。小病巣では抗体分布が均一であること、血流がよいこと、そのため腫瘍細胞の酸素化がよいこと等の因子が、 β 線エネルギーが病巣の外に分布してしまう欠点を補っているものと考えられる。

(2) はじめに

大きな固形癌に対する β 線核種による放射免疫療法の臨床結果は不十分であることが多い¹⁾。しかし、微小腫瘍が残存した患者における補助療法としての放射免疫療法の役割の重要性を示す報告が多々見られる²⁻⁸⁾。さらに、血管新生のない単一の腫瘍細胞に対する標識抗体の有用性も示されている^{3,9)}。卵巣癌患者において多くの検討がなされており、放射免疫療法による微小残存腫瘍患者の生存期間改善が報告されている¹⁰⁾。

一方、数学的モデル解析により、 β 線核種を用いた放射免疫療法の欠点が示されている¹¹⁾。つまり、 β 線飛程が数mmであるため、小さい腫瘍において線量の多くが腫瘍病巣外に分布してしまい十分な腫瘍線量が得られないという点である。

^{186}Re の半減期は3.7日であり、腫瘍への抗体分布に好都合であることに加え、不必要的全身被曝を避けることが可能である¹²⁾。また、 ^{186}Re は β 線(71%, 1.07 MeV; 21%, 0.94 MeV; mean range 0.92 mm)に加え、 γ カメラによる撮像に適した γ 線(137 KeV)も放出する。補助療法が行われるであろう患者においては、不顕性病巣から数cmの大きさにわたる種々の大きさの腫瘍が混在していることが考えられ、もしも ^{186}Re 標識抗体で微小病巣に対する治療効果が十分に得られるものであれば、比較的大きい病巣に対しては現在頻用されている ^{131}I よりも ^{186}Re の β 線エネルギーの方が有効であると考えられ、メリットが大きいと考えられる^{13, 14)}。

以上の背景から、本研究では、微小残存病巣の存在する臨床状態を模倣した実験的転移モデルにおいて、¹⁸⁶Re 標識抗体による放射免疫療法の意義を検討した。

(3) 方法および材料

抗体

大腸癌細胞表面に発現する 45-kD の糖タンパクを認識するマウス IgG1 抗体 A7¹⁵⁾ を用いた。対照として胎盤 alkaline phosphatase を認識するマウス IgG1 抗体 HPMS-1¹⁶⁾ を用いた。日本原子力研究所において ¹⁸⁵Re(n, γ) 反応で生成された ¹⁸⁶Re-perrhenate を S-benzoyl-mercaptoacetyltriglycine (MAG3) により抗体に標識した。^{17,18)} 標識抗体の安定性は以前報告した¹⁹⁾。¹⁸⁶Re-A7 の免疫活性は、LS180 ヒト大腸癌細胞により、抗原過剰条件下で測定した²⁰⁾。

肝転移モデル

$2 \times 10^7/\text{ml}$ の濃度の LS180 大腸癌細胞浮遊液を PBS で調整した。Balb/c ヌードマウス（雌、20g）をエーテル麻酔下に開腹し、0.1 ml の細胞浮遊液を経脾的に移植した⁵⁾。脾臓は細胞移植 2 分後に摘出した。このモデルでは移植 1 週後に 1 mm 以下の腫瘍結節が見られ、2 週後には数 mm の大きさとなり互いに融合する状態となる。

肝転移モデルにおける抗体体内分布

腫瘍細胞移植 2 週後に、370 kBq (10 μCi) の ¹⁸⁶Re-A7 を静注し、1、2、5 日後に屠殺した (n=4-6)。臓器を摘出し、湿重量、放射能を測定し体内分布を観察した。肝転移腫瘍は可視腫瘍を正常肝から分離し、重量、放射能を測定した。転移腫瘍サイズと ¹⁸⁶Re-A7 集積の関係を観察する目的で、抗体投与 2 日後に屠殺したマウスから種々の大きさの腫瘍結節を無作為に選択し、重量に対する放射能取り込み率をプロットした。¹⁸⁶Re-HPMS-1 の分布も抗体投与の 2 日後に観察した (n=4)。

¹⁸⁶Re-抗体の毒性観察

非担癌マウスに、13.3 MBq (360 μCi) まで 2-3 MBq のステップで ¹⁸⁶Re 抗体投与量を増加させ、放射免疫療法の主たる投与量決定毒性である血液毒性を観察した。経時的に尾静脈から採血し各々の投与量のマウス血液をプールした。赤血球数、白血球数、血小板数を測定した。

放射免疫療法

腫瘍細胞移植 1 週後 (n=7) あるいは 2 週後 (n=5) に、7 MBq (190 μCi) の ¹⁸⁶Re-A7 を静注した。細胞移植 4 週後に屠殺し、転移腫瘍重量を測定した。未治療群には PBS を静注した (n=6)。また、非特異的治療コントロールとして 7 MBq (190 μCi) の ¹⁸⁶Re-HPMS-1 を腫瘍細胞移植 1 週後に投与した。結果は、one-way ANOVA によって行った。

(4) 結果

¹⁸⁶Re-A7 の比放射能は 155 MBq/mg、免疫活性は 65% であった。免疫活性は ¹³¹I-A7 と同程度であった^{21,22)}。¹⁸⁶Re-HPMS-1 の比放射能は 42 MBq/mg であった。

¹⁸⁶Re-A7 は肝転移巣に高度の集積性を示した。抗体投与 2 日後の腫瘍集積は $24.1 \pm 8.73\% \text{ID/g}$ であった (Fig. 3.4-1)。腫瘍結節への放射能集積は、腫瘍サイズが小さいものほど高値を示した (Fig. 3.4-2)。¹⁸⁶Re-HPMS-1 は特異的な腫瘍集積を示めなかつた (Fig. 3.4-3)。腫瘍対正常組

織放射能比は、¹⁸⁶Re-A7 が 3.8 倍高値であった (Fig. 3.4·4)。

末梢血血球数は¹⁸⁶Re 抗体投与量依存性に減少した。抗体投与 2 週後に最低値を示した (Fig. 3.4·5)。マウスは最大投与量である 13.3 MBq でも生存したが、10.6 MBq あるいは 13.3 MBq 投与群の白血球減少と血小板減少が著しいため、治療は 7.7 MBq 付近の投与量で行った。

未治療のマウスにおいて、細胞移植 4 週後には肝のほぼ全体が腫瘍に置換され、全てのマウスに大量の腹水が観察された (Fig. 3.4·6A)。1 匹は 26 日目に死亡した。残りの 5 匹における 4 週後 (28 日後) の腫瘍重量は 5.96 ± 0.87 g であった。肝転移腫瘍の発育は¹⁸⁶Re-A7 による放射免疫治療により効果的に抑制された。細胞移植の 2 週間後に治療を行ったマウスでは、腫瘍重量は 1.25 ± 0.75 g (Fig. 3.4·6B) ($p < 0.0001$)、1 週後に行ったマウスでは 0.08 ± 0.05 g (Fig. 3.4·6C) に過ぎなかった ($p < 0.005$; 2 週目の治療との比較)。非特異的抗体¹⁸⁶Re-HPMS-1 により移植 1 週後に治療をおこなったマウスにおいては、腫瘍重量は 3.39 ± 0.25 g と未治療群と比べ若干の治療効果を示したもののが¹⁸⁶Re-A7 による治療に比べ効果はわずかなものであった ($p < 0.0001$)。

(5) 考察

¹⁸⁶Re-A7 による放射免疫療法は、大腸癌細胞肝転移発育を効果的に抑制した。治療効果は、転移腫瘍が数 mm になる移植 2 週目より、転移腫瘍の直径が 1 mm 以下である移植 1 週目に行った場合がより効果的であった。これらの結果は、¹⁸⁶Re 標識抗体による微小残存癌の治療の可能性を示すものであるといえる。

一方で転移腫瘍の大きさを考慮すると、 β 線エネルギーの腫瘍結節外への漏出は、腫瘍細胞移植 2 週目より 1 週目のほうが大きいと考えられる。たとえば、腫瘍辺縁に抗体が不均一に集積した場合を仮定すると、直径 5 mm の腫瘍ではエネルギーの約 30%が腫瘍外に分布するのに対し、1 mm の腫瘍では 75%が腫瘍外に分布してしまうことになる²³⁾。それゆえ、¹⁸⁶Re-A7 による治療結果は β 線飛程以外の別の因子に影響されているものと推定される。

第一に、 β 線の腫瘍治療効果を論じた数学的モデルは、腫瘍集積が腫瘍サイズに関係なく一定であると仮定しているが^{11, 23)}、実際は抗体の腫瘍集積は腫瘍サイズが小さいほど増加する。この現象は、10 g ぐらいまでの比較的大きな腫瘍でよく認識されている^{24, 25)}。さらに、今回の研究で 0.1-100 mg の微小腫瘍でもこの結果が得られた。第二に、小さい腫瘍では抗体の均一な分布が期待できる⁸⁾。第三に、小さい腫瘍ほど血流が良く、その結果よく酸素化されており、放射線感受性が高いと考えられる²⁷⁾。また、血流がよければ腫瘍細胞の細胞周期回転がよく、このことは放射線感受性に相關することが知られている²⁸⁾。さらには、このモデルでは、腫瘍結節が互いに近傍に存在する多いため、いわゆる β 線の cross-fire 効果も関与しているものと考えられる。これら複数のプラスの因子の結果として、小さい腫瘍における β 線分布の細胞外漏出が補われているものと考える。

興味深いことに、¹⁸⁶Re より β 線飛程の長い⁹⁰Y の標識抗体による放射免疫療法を術後の補助療法として卵巣癌患者に行うことにより、患者の生存期間の改善が得られたという報告¹⁰⁾がある。実際の臨床条件においては、顎微鏡レベルの不顎性転移とマクロレベルの比較的大きな転移腫瘍が同時に混在して存在する事が起りうる。通常の画像診断で検出可能な転移腫瘍サイズが一般的に 1 cm であることを考慮すると、このような状態は、いわゆる絶対治癒手術をうけた患

者でも起こりうることである。1 cm 程度の腫瘍は、まさに ^{186}Re の β 線による治癒可能サイズであり¹¹⁾、これらのこととは、 ^{186}Re が微小残存腫瘍に対する補助療法に有用であろうことを示すものであると考える。

我々は以前の報告で、データはまだ不十分であるものの、今回用いた肝転移モデルにおいて ^{186}Re による放射免疫療法による治療効果が ^{131}I による放射免疫療法のそれに匹敵するものであることを示した³⁰⁾。この点に関するより詳細な検討を現在行っているところである。

(6) 結語

今回の検討により、直径 1 mm 以下の微小肝転移病巣に対する ^{186}Re 放射免疫療法の治療効果が示された。微小残存腫瘍に対する補助療法としての ^{186}Re 放射免疫療法の可能性を示唆する結果である。

3.4.2 最大耐容投与量における¹³¹I 標識抗体との治療効果比較：肝転移モデル

(1) 抄訳

以前の大腸癌肝転移モデルを用いた検討で、微小病巣への可能性がしめされた。同じモデルを用いて、最大耐容投与量における治療効果を¹³¹I 標識抗体の効果と比較した。¹⁸⁶Re 標識 A7 抗大腸癌抗体の投与量を増加し、血液毒性を観察した結果、21 MBq が最大耐容投与量と決定された。以前決定した¹³¹I 標識 A7 の最大耐容投与量は、7 MBq である。細胞移植 2 週後に行った放射免疫療法の結果、移植 4 週後の肝転移総重量は¹⁸⁶Re 標識 A7 投与群では 0.04 ± 0.04 g に抑制されたのに対し、¹³¹I-A7 投与群では 0.85 ± 0.68 g であり、¹⁸⁶Re 標識 A7 による治療がより効果的であった($p < 0.0001$)。移植 1 週後に治療を行い、マウスの生存期間を観察した結果、未治療群、¹³¹I-A7 投与群、¹⁸⁶Re-A7 投与群の各々の平均生存期間は 27.6 ± 1.7 日、 78.3 ± 5.2 日、 103.8 ± 5.5 日であり、¹⁸⁶Re-A7 投与群の治療効果がより優れていた ($p < 0.002$)。以上の結果より、微小肝転移の治療における¹⁸⁶Re 標識抗体による内照射療法の有用性が示唆された。

(2) はじめに

3.4.1 における予備的検討の結果、 β 線による内照射療法の欠点として指摘されている微小病巣における線量の病巣外漏出の問題(Table 3.4-1)¹¹⁾は、小さい病巣ほど高い抗体集積を示す(Fig. 3.4-2)等の理由により、補完可能であろうと考えられた³⁰⁾。そこで、微小転移巣治療における¹⁸⁶Re 標識抗体による内照射療法の効果の詳細をさらに理解するために、最大耐容投与量における治療効果を、現在最も頻用されている核種である¹³¹I で標識された抗体による治療効果と比較した。

(3) 方法および材料

抗体・肝転移モデル

3.4.1 の項に準じる

最大耐容投与量の決定

21 MBq までの¹⁸⁶Re-A7 を 2-3 MBq のステップで段階的に増加させ、マウスの体重変化を観察した。

放射免疫療法の治療効果比較

前項で決定した最大耐容投与量における治療効果を観察した。効果を¹³¹I-A7 と比較した。¹³¹I-A7 の投与量は、以前決定した最大耐容投与量である 7 MBq である。

検討 1：細胞移植 2 週後に抗体を投与し、移植 4 週後に屠殺し肝転移重量を測定した ($n=8$)。

検討 2：細胞移植 1 週後に抗体を投与し、マウスの生存期間を観察した ($n=8$)。

血液毒性の比較

¹⁸⁶Re-A7 投与群、¹³¹I-A7 投与群で、最大耐容投与量の投与後経時的に尾静脈から採血し末梢血球数を観察した。

腫瘍線量推定

3.4.1 の項で得られた体内動態結果と、報告されている腫瘍径毎の線量分布データ²³⁾を利用し、

最大耐容投与量における転移巣線量を推定し、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群、 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 投与群で比較した。

(4) 結果

2.9 MBq から 21 MBq の範囲で $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ を投与した結果、投与量依存的に体重減少が生じた (Fig. 3.4-7)。全マウスにおいて、最終的に体重の回復が観察された。この結果と、マウスにおける ^{186}Re 標識抗体の LD50/30 が 600 μCi (22.2 MBq) とする報告³¹⁾をあわせ考慮し、21 MBq を最大耐容投与量と設定した。

細胞移植 2 週後に行った、最大耐容投与量における放射免疫療法の結果、移植 4 週後の肝転移総重量は ^{186}Re 標識 A7 投与群では $0.04 \pm 0.04 \text{ g}$ に抑制されたのに対し、 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 投与群では $0.85 \pm 0.68 \text{ g}$ であり、 ^{186}Re 標識 A7 による治療がより効果的であった ($p < 0.0001$)。

細胞移植 1 週後に行った放射免疫療法のマウス生存期間を Fig. 3.4-8 に示す。未治療群、 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 投与群、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群の各々の平均生存期間は 27.6 ± 1.7 日、 78.3 ± 5.2 日、 103.8 ± 5.5 日であり、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群の治療効果がより優れていた ($p < 0.002$)。また、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群の 8 匹中 2 匹が、施設利用の制限故に設定されたエンドポイント (120 日)まで生存した。

$^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群の末梢血の低下は $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 投与群のそれより強くみられたものの、最終的に回復した (Fig. 3.4-9)。

各群における種々のサイズの腫瘍への推定照射線量は、腫瘍径が小さいほど両群間の差が小さくなるものの、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 投与群で明らかに高値である (Table 3.4-2)。

(5) 考察

3.4.1 における予備的検討で推定された微小肝転移巣に対する $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 放射免疫療法の有効性が、本項の検討結果により裏付けられたものと考える。すなわち、最大耐容投与量において、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ の治療効果は $^{131}\text{I}\text{-A7}$ のそれに比べ、有意に優れていた。 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 群の骨髓抑制が $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 群より若干軽度であった事実は、 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ の投与量を今回用いた 7 MBq からもうすこし増加させることも可能であったことを示している。しかし、以前の検討において 9 MBq 投与で約半数のマウスが放射線毒性により死亡したことを考えると、可能な投与量増加は 2 MBq 未満であり、腫瘍線量にして <28% の増加を得るにすぎずない。したがって、Table 3.4-2 から明らかなごとく、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ の優位性に変わりはないであろう。

(6) 結語

本研究により、微小肝転移巣に対する治療において、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ の有効性がより強固に示されたものと考える^{32,33)}。

3.4.3 腹腔内播種モデルにおける治療効果

(1) 抄訳

肝転移の有無に加え、大腸癌患者の予後に非常に大きく関わっている因子の一つに、腹膜播種の有無が挙げられる。播種腫瘍に対する治療として放射免疫療法を考えた場合、静脈内へ全身投与するより、腹腔内局所に標識抗体を投与する方が有利であることが示されている。これらのことから、¹⁸⁶Re 標識抗体による腹腔内局所免疫療法の意義の検討を試みた。LS180 大腸癌細胞を腹腔内に投与することにより、腹膜播種モデルを作成した。腹腔内投与された ¹³¹I-A7、¹⁸⁶Re-A7 は播種腫瘍へ同等の集積性を示した。決定した最大耐容投与量(¹³¹I-A7 11 MBq、¹⁸⁶Re-A7 21 MBq)における骨髓毒性は同程度であった。最大耐容投与量における腹腔内投与放射免疫療法の効果観察は現在進行中であるものの、投与 30 日後の時点における生存率は¹³¹I-A7 治療群で 75%、¹⁸⁶Re-A7 治療群で 89% であり、¹⁸⁶Re-A7 治療群がより良好な印象である。

(2) はじめに

3.4.1 および 3.4.2 の各項で検討した肝転移の有無に加え、大腸癌患者の予後に非常に大きく関わっている因子の一つに、腹膜播種の有無が挙げられる³⁴⁻³⁶。この状態に対して、腹膜切除による腫瘍重量軽減と術後腹腔内化学療法が試みられているものの、その効果には限界があるのが現状である³⁴⁻³⁶。播種腫瘍に対する治療として放射免疫療法を考えた場合、静脈内へ全身投与するより、腹腔内局所に標識抗体を投与する方が有利であることが示されている(Fig. 3.4-10)³⁷⁻⁴²。以上の背景から、¹⁸⁶Re 標識抗体による腹腔内局所免疫療法の意義の検討を試みた。

(3) 材料および方法

¹⁸⁶Re-A7 抗体腹腔内投与の最大耐容投与量の決定

18 MBq、21 MBq、24 MBq の¹⁸⁶Re-A7 を Balb/c ヌードマウスに腹腔内投与し、経時的に末梢血白血球数、血小板数を測定した。

¹⁸⁶Re-A7 抗体の播種腫瘍への集積性の検討

LS180 ヒト大腸癌細胞 1×10^7 個を Balb/c ヌードマウス腹腔内に移植し、10 日後に¹⁸⁶Re-A7 を腹腔内投与し、放射能の体内分布を観察した。

大腸癌腹腔内播種モデルにおける放射免疫療法の治療効果観察

LS180 ヒト大腸癌細胞 1×10^7 個を Balb/c ヌードマウス腹腔内に移植し、9 日後に¹³¹I-A7、¹⁸⁶Re-A7 を各々最大耐容投与量で腹腔内投与し、生存期間を観察した。¹³¹I-A7 の腹腔内最大耐容投与量は、以前の検討で決定された 11 MBq である。また、¹⁸⁶Re-A7 の投与量は、上記 1 の検討で決定した腹腔内最大耐容投与量に設定した。¹³¹I-A7 と¹⁸⁶Re-A7 の比放射能は、各々 147 MBq/mg、132 MBq/mg、免疫活性は各々 66.1%、67.8% であり、両者に差はなかった。

(4) 結果

Fig. 3.4-11 に示すとく¹⁸⁶Re-A7 の投与量に依存して骨髓毒性が増強した。21 MBq までの投与では、投与後 4 週頃までに投与前のレベルまで回復したが、24 MBq の投与による血算数の低

下は著しく高度であり、投与 2 週後に 2 / 3 のマウスが死亡した。この結果から、21 MBq を $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ の最大耐容投与量と設定した。

$^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 抗体の腹腔内投与により、投与早期から $^{131}\text{I}\text{-A7}$ と同様に高い腫瘍集積が認められた (Fig. 3.4-12)。

最大耐容投与量における腹腔内投与放射免疫療法の効果観察は現在進行中であるものの、投与 30 日後の時点における生存率は $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 治療群で 75%、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 治療群で 89% であり、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 治療群がより良好な印象である。最大耐容投与量における病巣への投与 3 日後までの累積線量は、 $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ 抗体の場合 3611 cGy、 $^{131}\text{I}\text{-A7}$ 抗体の場合 1152 cGy と推定された。最大耐容投与量における骨髄毒性に差は認められない (Fig. 3.4-13)。

(5) 考察

先に書いたごとく、微小病巣を対象とした内照射療法において β 線核種を用いた場合、その線量のかなりの部分が病巣外に分布してしまう欠点が指摘されている。しかし、実際には微小病巣ほど抗体の集積性が高くかつ腫瘍内の抗体分布不均一性が低くなること、小さい腫瘍ほど酸素化が良好であること、clonogenic な細胞の数が限定されることなどの因子がこの欠点を補完することにより、これらのサイズより小さいものに対しても十分抗腫瘍効果が発現しうると考えられる。 ^{131}I 標識抗体と ^{186}Re 標識抗体の治療効果を比較すると、昨年報告した肝転移モデルにおいても、今年度検討が進行中である腹膜播種モデルにおいても、病巣径が数ミリメートル以下の状態で ^{186}Re 標識抗体の効果がより良好であった。この結果は、両者の最大耐容投与量の差に起因するところが大きいと考えられる。

大腸癌患者において、肝転移と腹腔内播種腫瘍が併存することがあり得る。腹腔内投与された標識抗体の肝転移巣集積は、静脈内全身投与の場合と同程度であると報告されており、腹腔内投与による局所放射免疫療法はこのような状態における治療としても有効に働くものと考えられる。

(6) 結語

本項の検討で、前項とは別の微小残存病巣モデルにおいても、 ^{186}Re 標識抗体用いた放射免疫療法の有用性が示唆されたと考える。したがって、補助療法としての ^{186}Re 標識抗体による放射免疫療法の意義は大きいものであろうと考えられる。

参考文献

- 1) Imam S.K. Status of radioimmunotherapy in the new millennium. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 16,237 (2001).
- 2) Sharkey R.M., Weadock K.S., Natale A., et al. Successful radioimmunotherapy for lung metastasis of human colonic cancer in nude mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, 83,627 (1991).
- 3) Blumenthal R.D., Sharkey R.M., Haywood L., et al. Targeted therapy of athymic mice bearing GW-39 human colonic cancer micrometastases with ^{131}I -labeled monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, 52,6036 (1992).
- 4) Dunn R.M., Juweid M., Sharkey R.M., Behr T.M., Goldenberg D.M. Can occult metastases be treated by radioimmunotherapy? *Cancer* (suppl.), 80,2656 (1997).
- 5) Vogel C.-A., Galmiche M.C., Buchegger F. Radioimmunotherapy and fractionated radiotherapy of human colon cancer liver metastases in nude mice. *Cancer Res.*, 57,447 (1997).
- 6) Behr T.M., Blumenthal R.D., Memtsoudis S., et al. Cure of metastatic human colonic cancer in mice with radiolabeled monoclonal antibody fragments. *Clin. Cancer Res.*, 6,4900 (2000).
- 7) Saga T., Sakahara H., Nakamoto Y., et al. Radioimmunotherapy for liver micrometastases in mice: pharmacokinetics, dose estimation, and long-term effect. *Jpn. J. Cancer Res.*, 90,342 (1999).
- 8) Sato N., Saga T., Sakahara H., et al. Intratumoral distribution of radiolabeled antibody and radioimmunotherapy in experimental liver metastases model of nude mouse. *J. Nucl. Med.*, 40,685 (1999).
- 9) Ong G.L., Elsamra S.E., Goldenberg D.M., Mattes M.J. Single-cell cytotoxicity with radiolabeled antibodies. *Clin. Cancer Res.*, 7,192 (2001).
- 10) Hird V., Maraveyas A., Snook D., et al. Adjuvant therapy of ovarian cancer with radioactive monoclonal antibody. *Br. J. Cancer*, 68,403 (1993).
- 11) O'Donoghue J.A., Bardies M., Wheldon T.E. Relationships between tumor size and curability for uniformly targeted therapy with beta-emitting radionuclides. *J. Nucl. Med.*, 36,1902 (1995).
- 12) Fritzberg A.R., Meares C.F. Radioimmunotherapy of Cancer, Abrams P.G. and Fritzberg A.R. (Eds.), Marcel Dekker, New York, 2000, 57.
- 13) Langmuir V.K., Mendonca H.L., Vanderheyden J.-L., Su F.-M. Comparison of the efficacy of ^{186}Re - and ^{131}I -labeled antibody in multicell spheroids. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 24,127 (1992).
- 14) Kievit E., van Gog F.B., Schluper H.M.M., van Dongen G.A.M.S., Pinedo H.M., Boven E. Comparison of the biodistribution and the efficacy of monoclonal antibody 323/A3 labeled with either ^{131}I or ^{186}Re in human ovarian cancer xenografts. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 38,813 (1997).

- 15) Kotanagi H., Takahashi T., Masuko T., Hashimoto Y., Koyama K. A monoclonal antibody against human colon cancers. *Tohoku J. Exp. Med.*, 148, 353 (1986).
- 16) Hirano K., Iizumi Y., Hayashi Y., et al. A highly sensitive assay method for human placental alkaline phosphatase involving a monoclonal antibody bound to a paper disk. *Anal. Biochem.*, 154, 624 (1986).
- 17) Visser G.M.W., Gerretsen M., Herscheid J.D.M., Snow G.B., van Dongen G.A.M.S. Labeling of monoclonal antibodies with rhenium-186 using MAG3 chelate for radioimmunotherapy of cancer: a technical protocol. *J. Nucl. Med.*, 34, 1953 (1993).
- 18) Kinuya S., Yokoyama K., Kobayashi K., et al. Experimental radioimmunotherapy with ¹⁸⁶Re-MAG3-A7 anti-colorectal cancer monoclonal antibody: comparison with ¹³¹I-counterpart. *Ann. Nucl. Med.*, 15, 199 (2001).
- 19) Kinuya S., Yokoyama K., Tega H., et al. Rhenium-186-mercaptoacetyltriglycine labeled monoclonal antibody for radioimmunotherapy: in vitro assessment, in vivo kinetics and dosimetry in tumor-bearing nude mice. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 870 (1998).
- 20) Lindmo T., Boven E., Cuttitta C., Fedorko J., Bunn A. Jr. Determination of the immunoreactive fraction of radiolabeled monoclonal antibodies by linear extrapolation to binding at infinite antigen excess. *J. Immunol. Methods*, 72, 77 (1984).
- 21) Kinuya S., Yokoyama K., Konishi S., et al. Improved response of colon cancer xenografts to radioimmunotherapy with pentoxifylline treatment. *Eur. J. Nucl. Med.*, 28, 750 (2001).
- 22) Kinuya S., Kawashima A., Yokoyama K., et al. Anti-angiogenic therapy and radioimmunotherapy in colon cancer xenografts. *Eur. J. Nucl. Med.*, 28, 1306 (2001).
- 23) Fujimori K., Furudate M. Dosimetry and radiation dose distribution in tumors for radioimmunotherapy: the effect of tumor size. *Jpn. J. Nucl. Med. (KAKU IGAKU)*, 31, 241 (1994).
- 24) Hagan P.L., Halpern S.E., Dillman R.O., et al. Tumor size: effect on monoclonal antibody uptake in tumor models. *J. Nucl. Med.*, 27, 422 (1986).
- 25) Behr T.M., Shrkey R.M., Juweid M., et al. Variables influencing tumor dosimetry in radioimmunotherapy of CEA-expressing cancers with anti-CEA and anti-mucin monoclonal antibodies. *J. Nucl. Med.*, 38, 409 (1997).
- 26) Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Med.*, 1, 27 (1995).
- 27) Okunieff P., Dols S., Lee J., et al. Angiogenesis determines blood flow, growth rate, and ATPase kinetics of tumors growing in an irradiated bed: ³¹P and ²H nuclear magnetic resonance studies. *Cancer Res.*, 51, 3289 (1991).
- 28) Hall E.J. Radiobiology for the Radiologist, 5th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
- 29) Sgouros G. Radioimmunotherapy of micrometastases: sidestepping the solid-tumor hurdle. *J. Nucl. Med.*, 36, 1910 (1995).

- 30) Kinuya S., Yokoyama K., Izumo M., et al. Radioimmunotherapy with ^{186}Re -labeled monoclonal antibody to treat liver metastases of colon cancer cells in nude mice. *J. Nucl. Med.* (Suppl.), 43, 269P (2002).
- 31) Beaumier PL, Venkatensan P, Vanderheyden JL, Burgua WD, Kunz LL, Fritzberg AR, Abrams PG, Morgan AC Jr. ^{186}Re radioimmunotherapy of small cell lung carcinoma xenografts in nude mice. *Cancer Res.*, 81:676 (1991).
- 32) Kinuya S, Yokoyama K, Kawashima A, et al. Radioimmunotherapy with ^{186}Re -labeled monoclonal antibody to treat liver metastases of colon cancer cells in nude mice. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 17, 681 (2002).
- 33) Kinuya S, Yokoyama K, Izumo M, et al. Feasibility of ^{186}Re -radioimmunotherapy for treatment in an adjuvant setting of colon cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 129, 392 (2003).
- 34) Yamaguchi A, Tsukioka Y, Fushida S, et al. Intraperitoneal hyperthermic treatment fro peritoneal dissemination of colorectal cancers. *Dis. Colon Rectum.*, 35, 964 (1992).
- 35) Markmam M. Intraperitoneal chemotherapy in the management of colon cancer. *Semin. Oncol.*, 26, 536 (1999).
- 36) Pestieau SR, Sugarbaker PH. Treatment of primary colon cancer with peritoneal carcinomatosis. *Dis. Colon Rectum.*, 43, 1341 (2000).
- 37) Rowlinson G, Snook D, Busza A, Epenetos AA. Antibody-guided localization of intraperitoneal tumors following intraperitoneal or intravenous antibody administration. *Cancer Res.*, 47, 6528 (1987).
- 38) Larson SM, Carrasquillo JA, Colcher DC, et al. Estimates of radiation absorbed dose for intraperitoneally administered iodine-131 radiolabeled B72.3 monoclonal antibody in patients with peritoneal carcinomatoses. *J. Nucl. Med.*, 32, 1661 (1991).
- 39) Quadri SM, Malik AB, Tang XZ, et al. Preclinical analysis of intraperitoneal administration of ^{111}In -labeled human tumor reactive monoclonal IgM AC6C3-2B12. *Cancer Res.*, 55, 5736s (1995).
- 40) Quadri SM, Malik AB, Chu HB, Freedman RS, Vriesendorp HM. Intraperitoneal indium-111- and yttrium-90-labeled human IgM (AC6C3-2B12) in nude mice bearing peritoneal carcinomatosis. *J. Nucl. Med.*, 37, 1545 (1996).
- 41) Safavy A, Khazaeli MB, Safavy K, Mayo MS, Buchsbaum DJ. Biodistribution study of ^{188}Re -labeled trisuccin-HuCC49 and trisuccin-HuCC49deltaCh2 conjugates in athymic nude mice bearing intraperitoneal colon cancer xenografts. *Clin. Cancer Res.*, 5, 2994s (1999).
- 42) Kinuya S, Li X-F, Yokoyama K, et al. Intraperitoneal radioimmunotherapy in treating peritoneal carcinomatosis of colon cancer in mice compared with systemic radioimmunotherapy. *Cancer Sci.*, 94, 650 (2003).

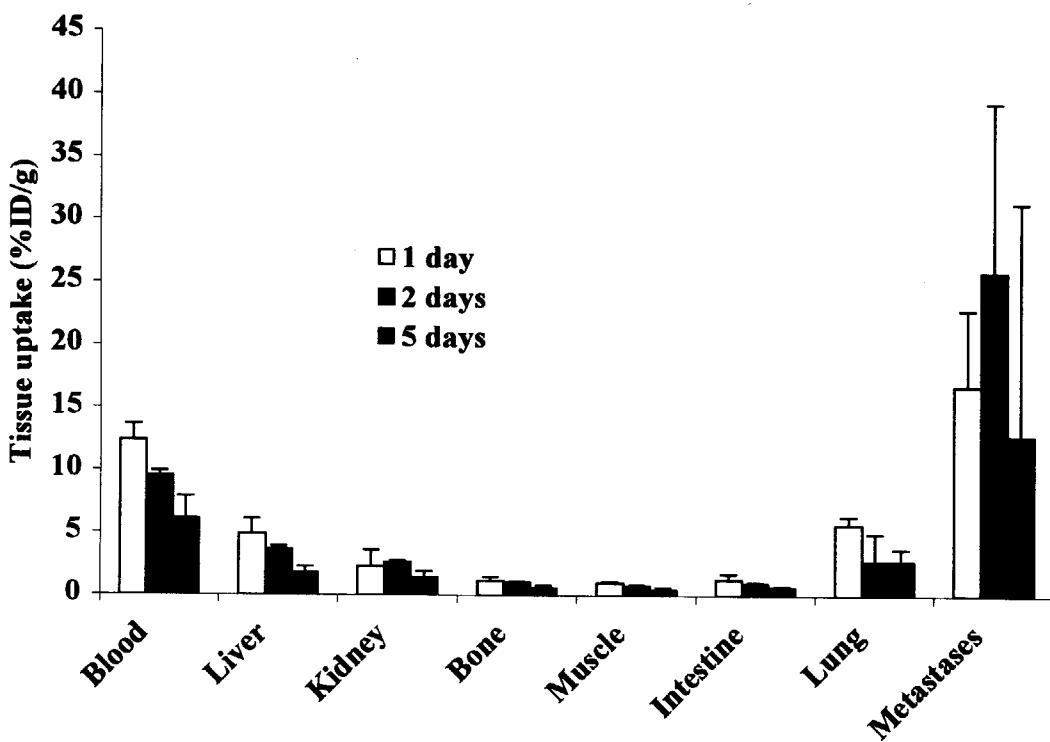


Fig. 3.4-1. Biodistribution of ^{186}Re -A7 in mice bearing liver metastases of LS180 colon cancer cells.

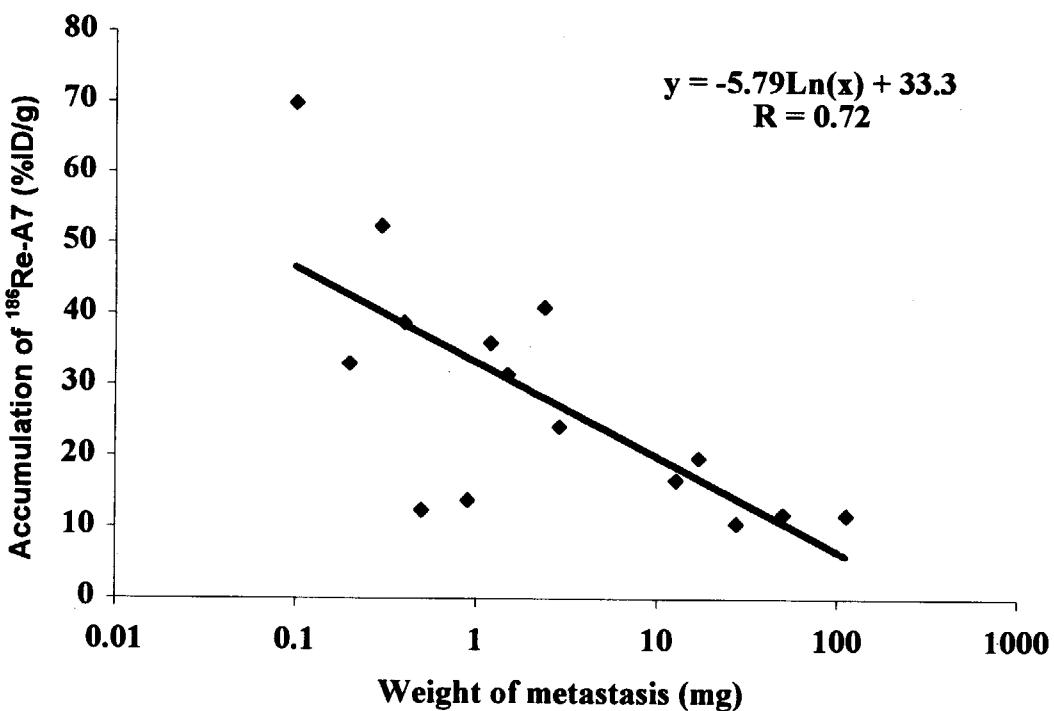


Fig. 3.4-2. Size-effect of metastatic nodules on accumulation of ^{186}Re -A7.
Metastatic nodules of various sizes were selected at random.

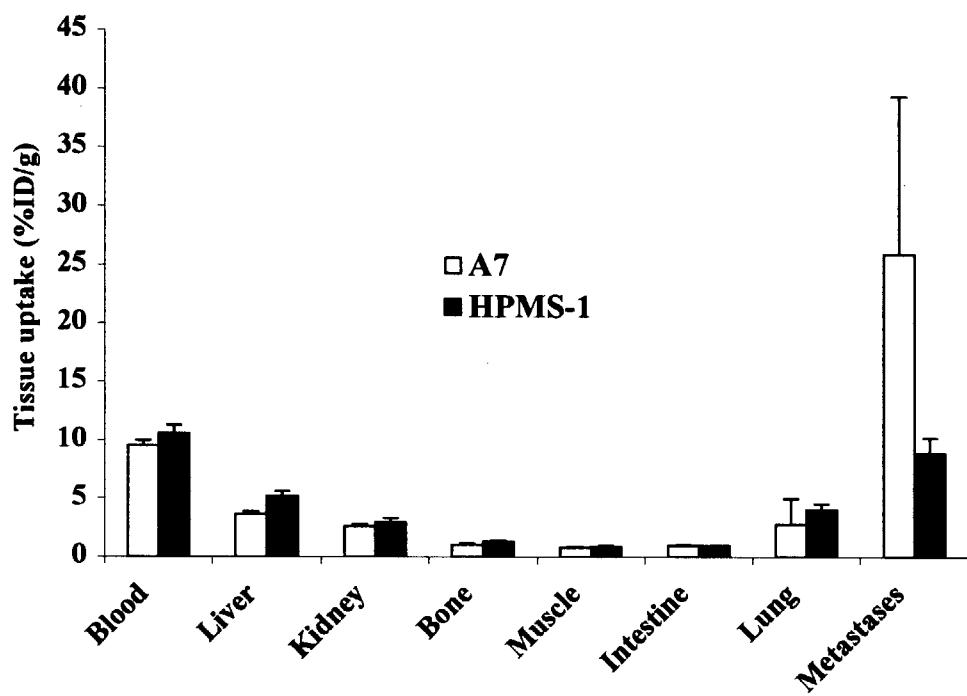


Fig. 3.4-3. Comparison of biodistribution of ^{186}Re -A7 and ^{186}Re -HPMS-1 in mice bearing liver metastases of LS180 colon cancer cells at 2 days.

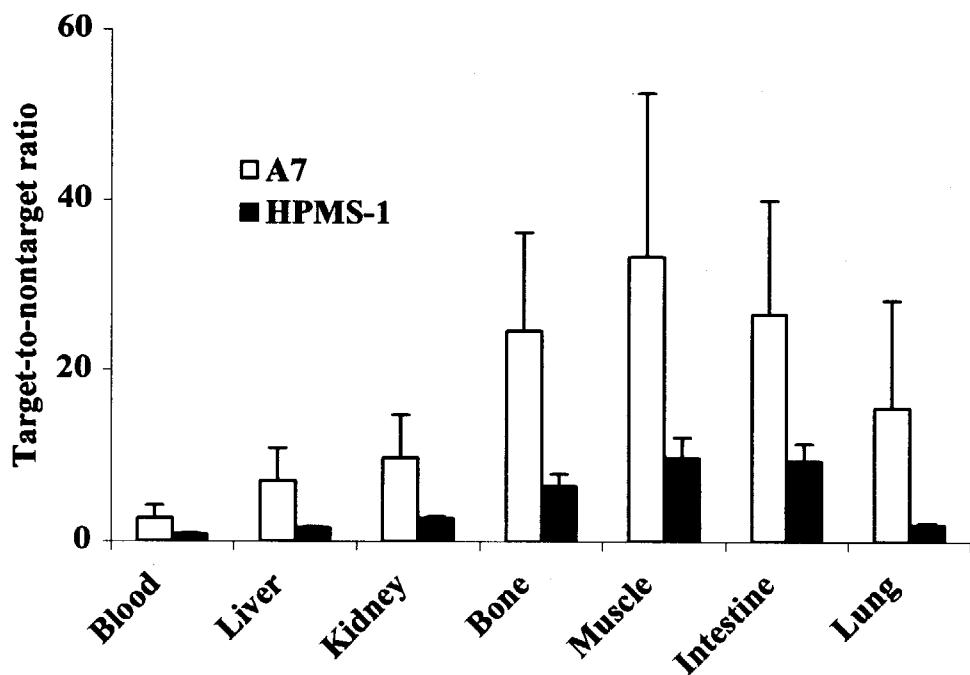
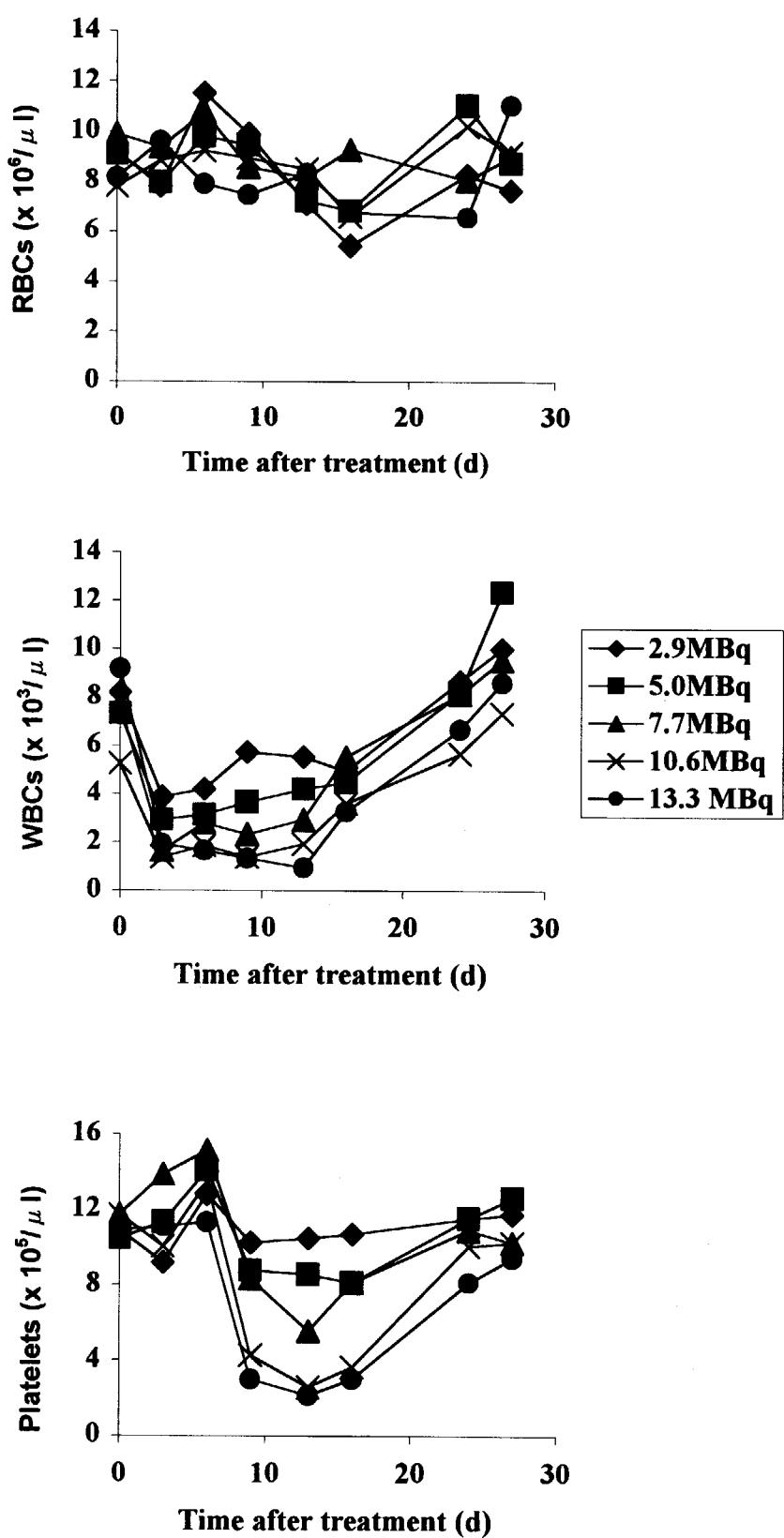


Fig. 3.4-4. Target-to-nontarget ratios of ^{186}Re -A7 and ^{186}Re -HPMS-1.

Fig. 3.4-5. Myelotoxicity of ^{186}Re -MAb.

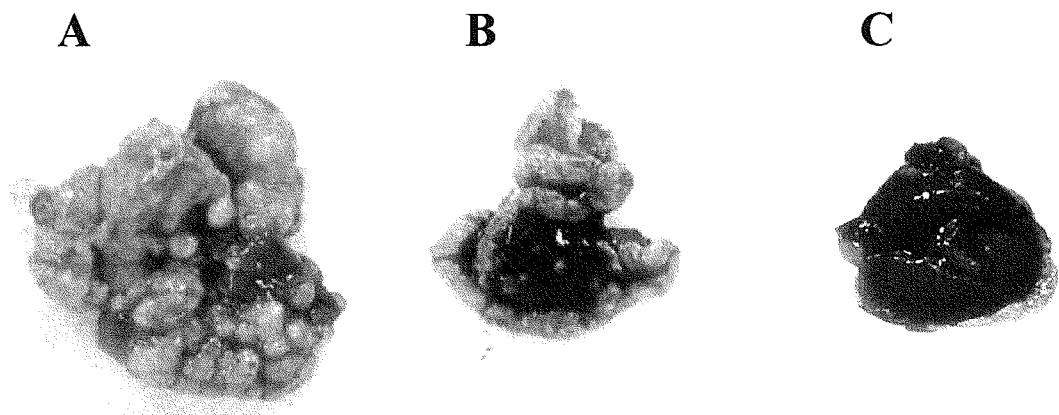


Fig. 3.4-6. Therapeutic efficacy of radioimmunotherapy (RIT) with $^{186}\text{Re}\text{-A7}$ in mice bearing liver metastases of LS180 colon cancer cells. Livers were excised four weeks after the intrasplenic inoculation of cells. A, non-treated control; B, RIT at two weeks following cell inoculation; and C, RIT at one week following cell inoculation.

Table 3.4-1. Optimum tumor size for curability¹¹⁾

Radionuclide	Optimum size (mm)
Cu-67	1.6-2.8
Y-90	28-42
I-131	2.6-5.0
Lu-177	1.2-3.0
Re-186	7-12
Re-188	23-32

O'Donoghue J.A., et al. J. Nucl. Med. 36, 1902 (1995).

This is a blank page.

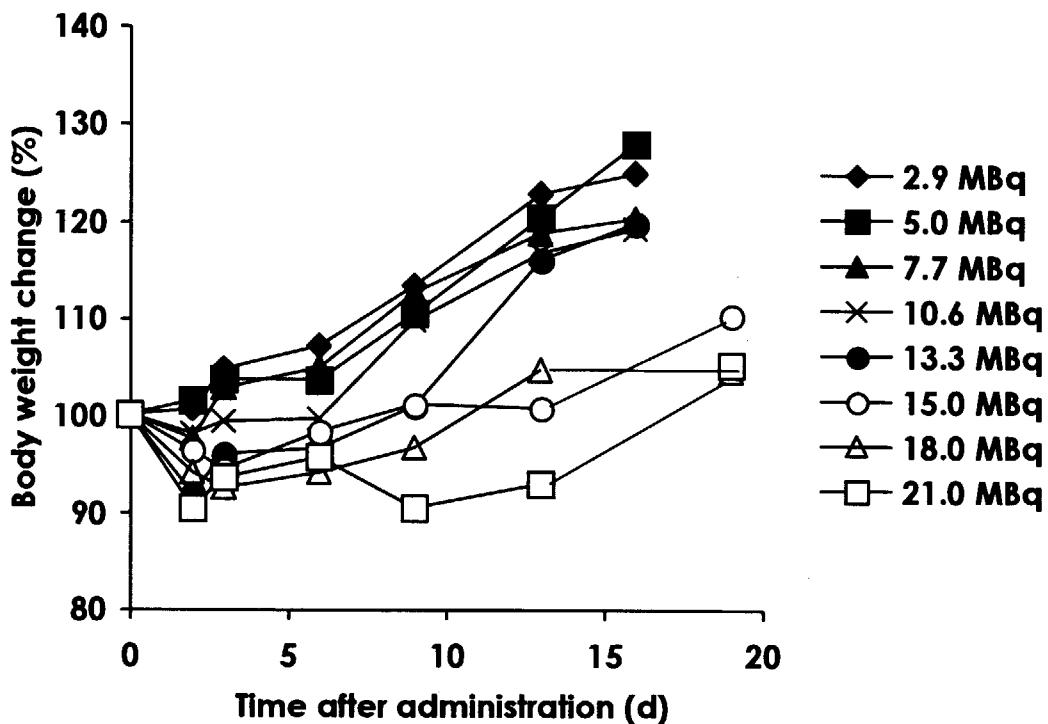


Fig. 3.4-7. Determination of the maximum tolerated administration dose of ^{186}Re -A7 assessed by body weight change of mice.

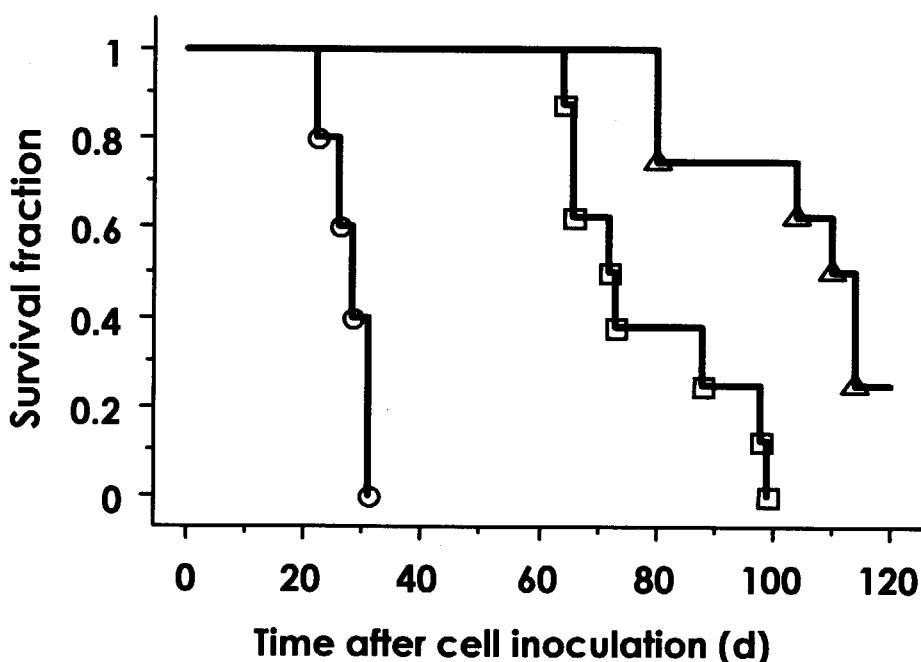


Fig. 3.4-8. Survival of mice treated with radioimmunotherapy of ^{186}Re -A7 21 MBq or ^{131}I -A7.
 ○, Non-treated control; □, ^{131}I -A7; △, ^{186}Re -A7.

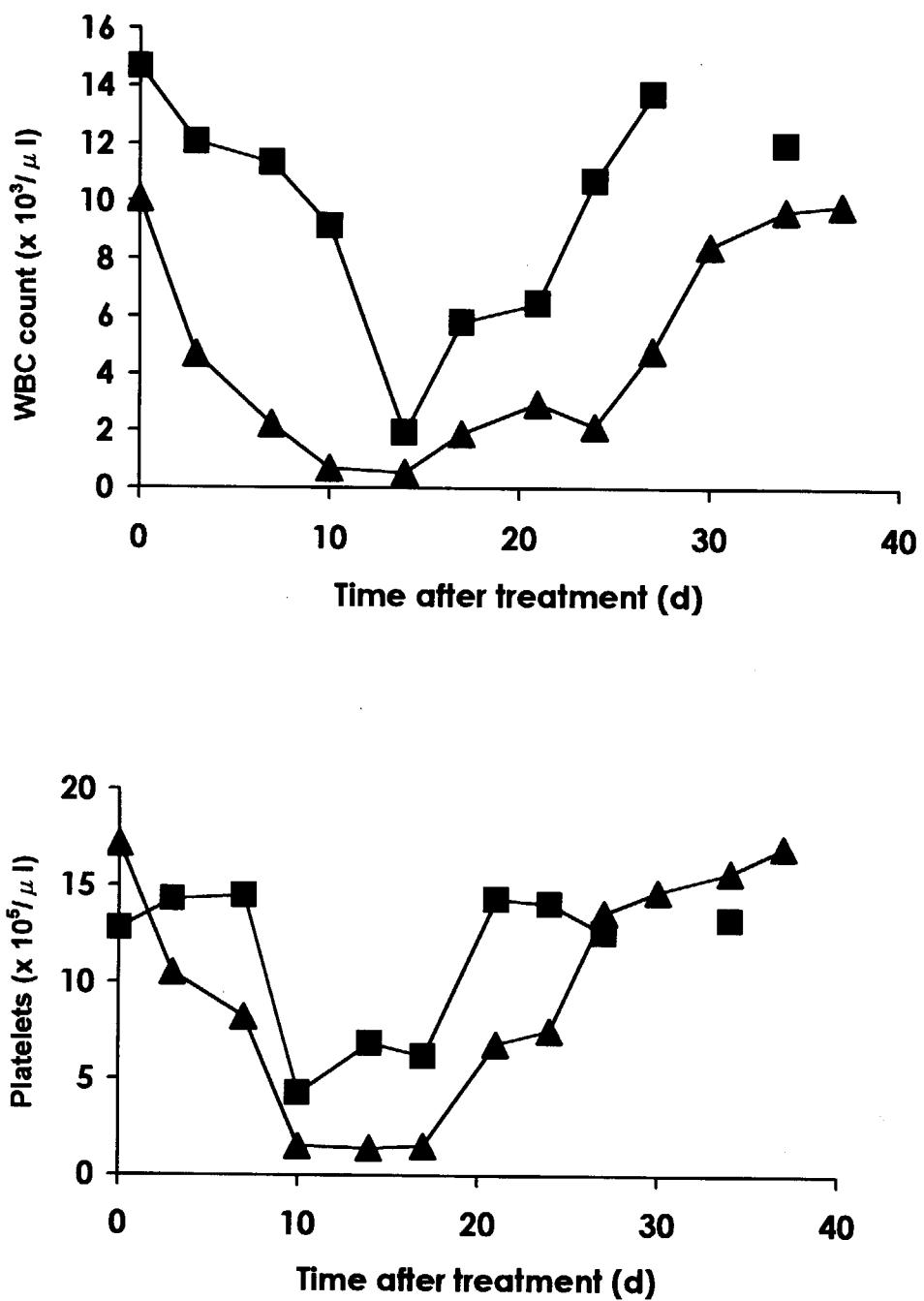


Fig. 3.4-9. Toxicity of radioimmunotherapy with ^{186}Re -A7 (▲) or ^{131}I -A7 (■).

Table 3.4-2. Estimated radiation dose to metastases (cGy)

		Nodule size		
		1 mm	5 mm	10 mm
¹⁸⁶ Re-A7	21 MBq	1315	3694	4435
¹³¹ I-A7	7 MBq	775	1431	1570
Ratio ^a		1.7	2.6	2.8

Calculated by the data previously reported regarding A7 accumulation in metastases.

Assuming exponential distribution from the periphery of lesions (Fujimori et al. 1994).

^a Ratio of radiation dose with ¹⁸⁶Re-A7 to that with ¹³¹I-A7.

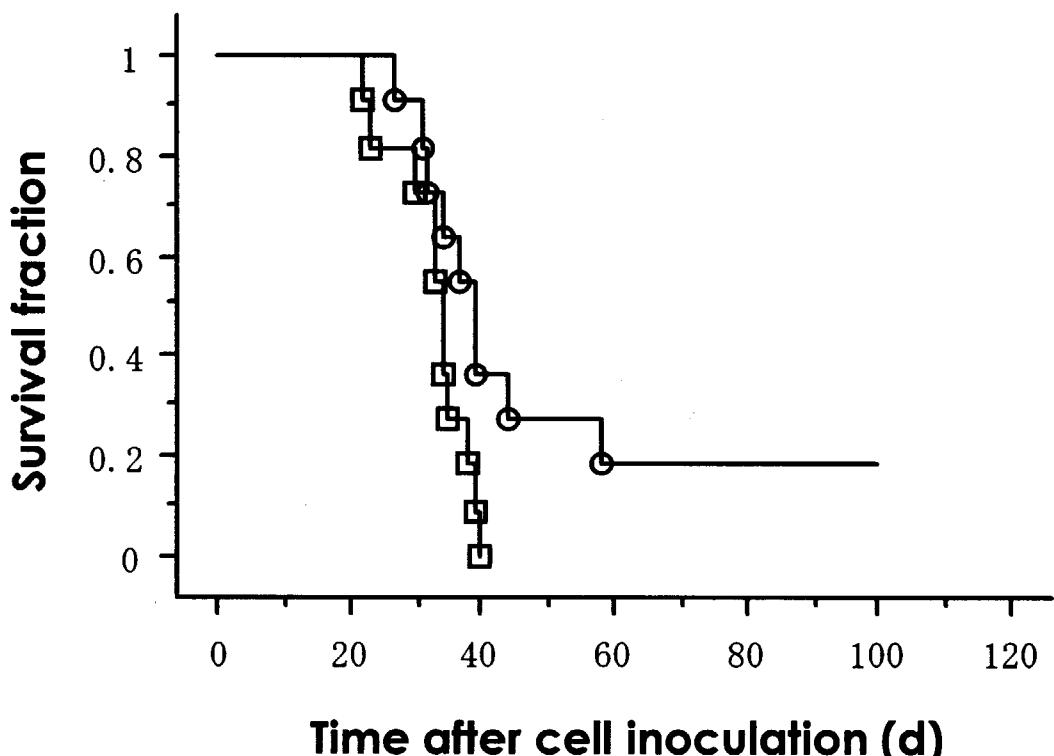


Fig. 3.4-10. Survival of mice bearing peritoneal metastases.
Radioimmunotherapy (RIT). □, i.v. RIT with ¹³¹I-A7; ○, i.p. RIT with ¹³¹I-A7.

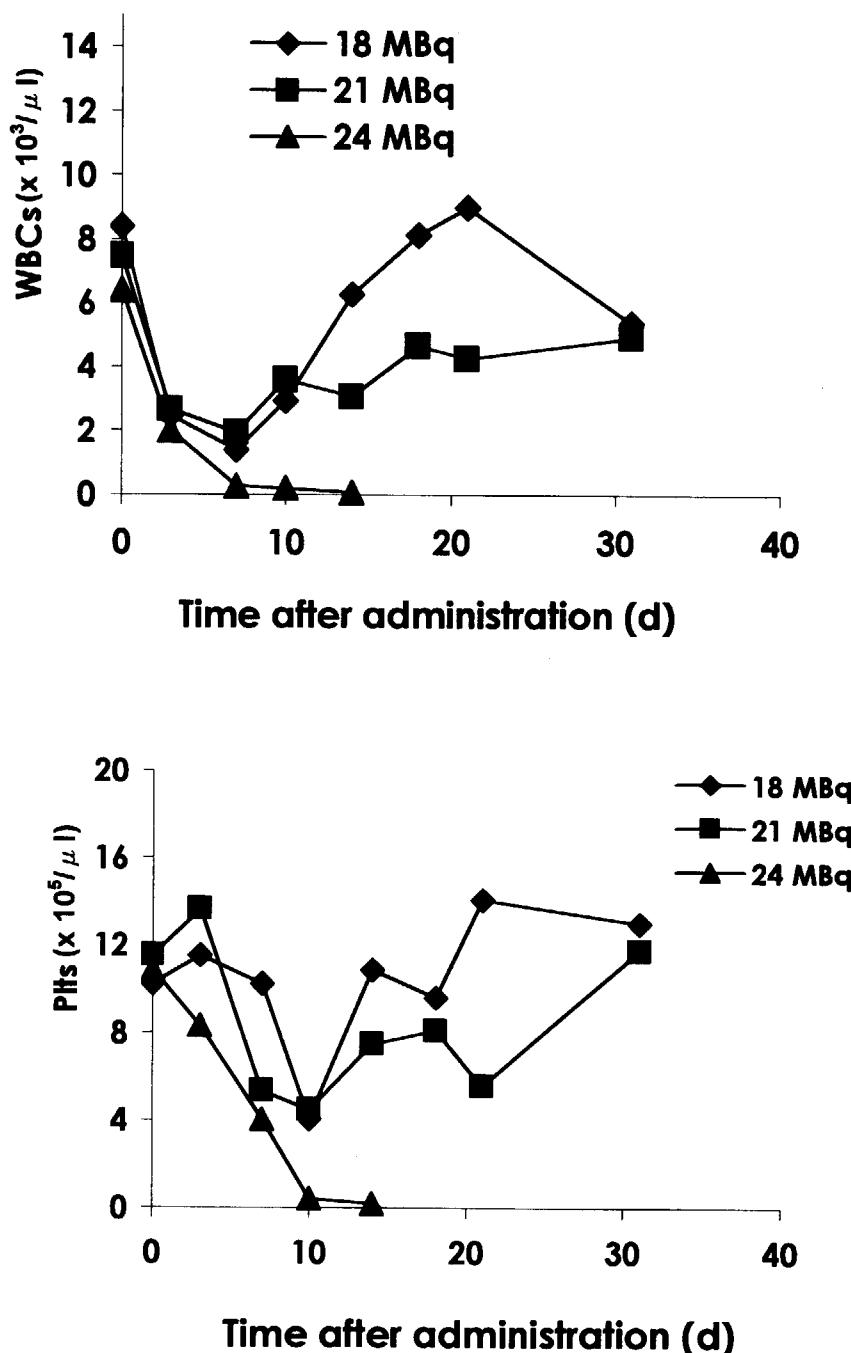


Fig. 3.4-11. Determination of the maximum tolerated intraperitoneal administration dose of $^{186}\text{Re}\text{-A7}$.

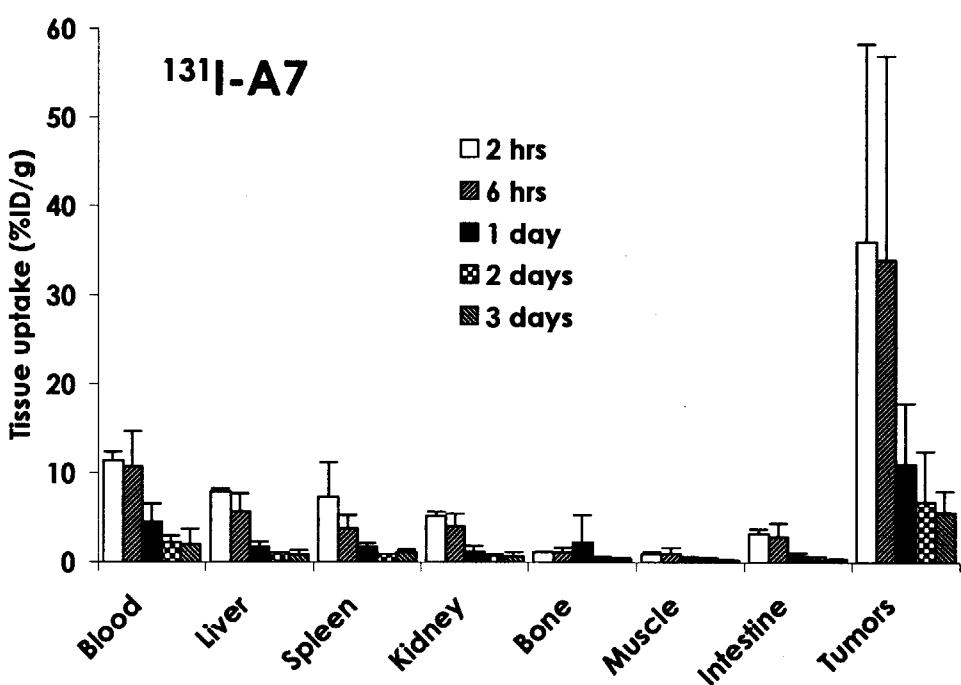
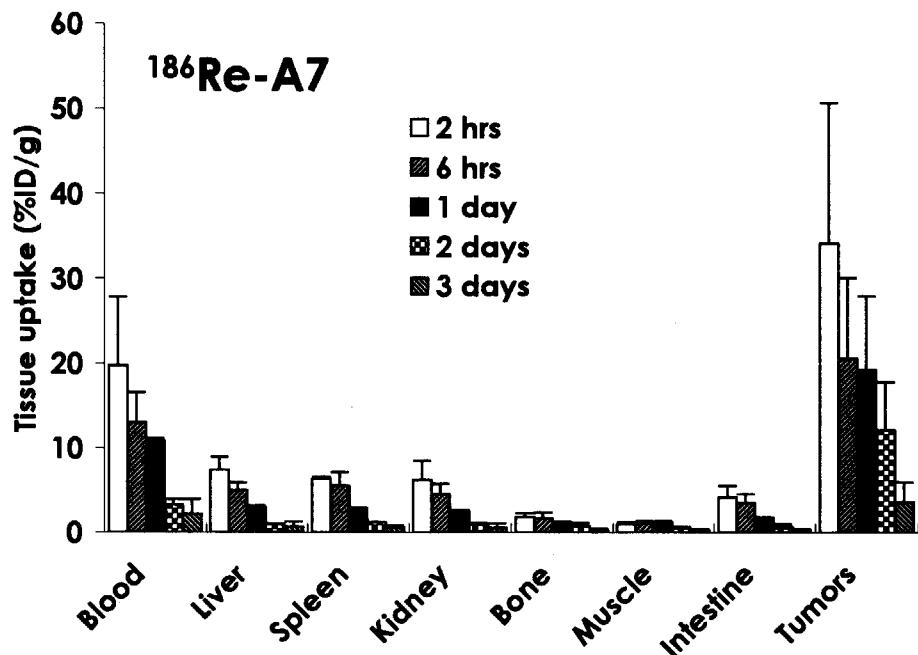


Fig. 3.4-12. Biodistribution of A7 in mice bearing peritoneal tumors.

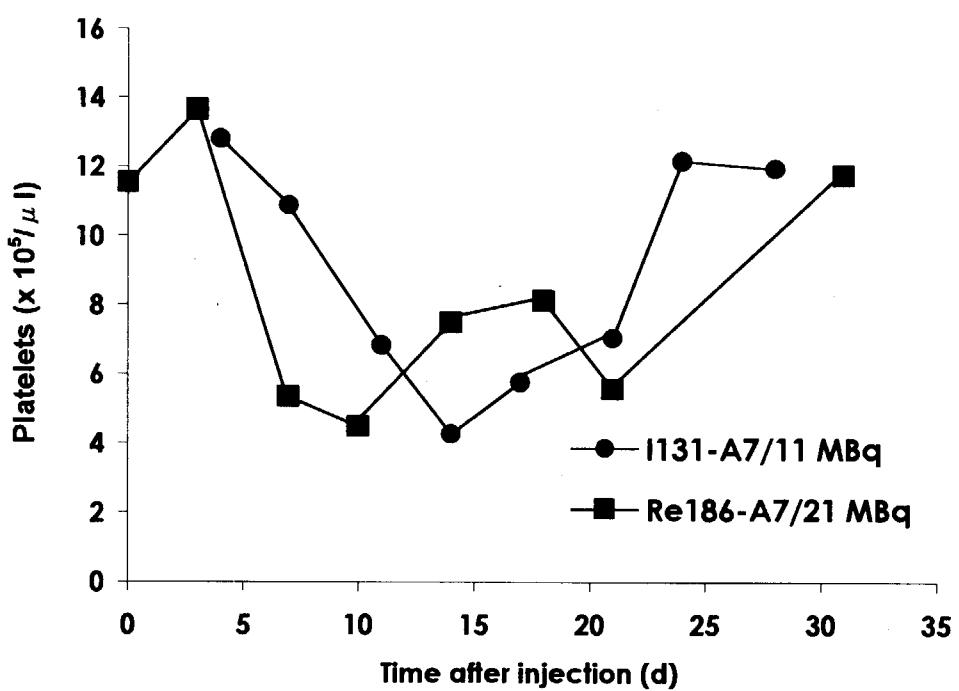
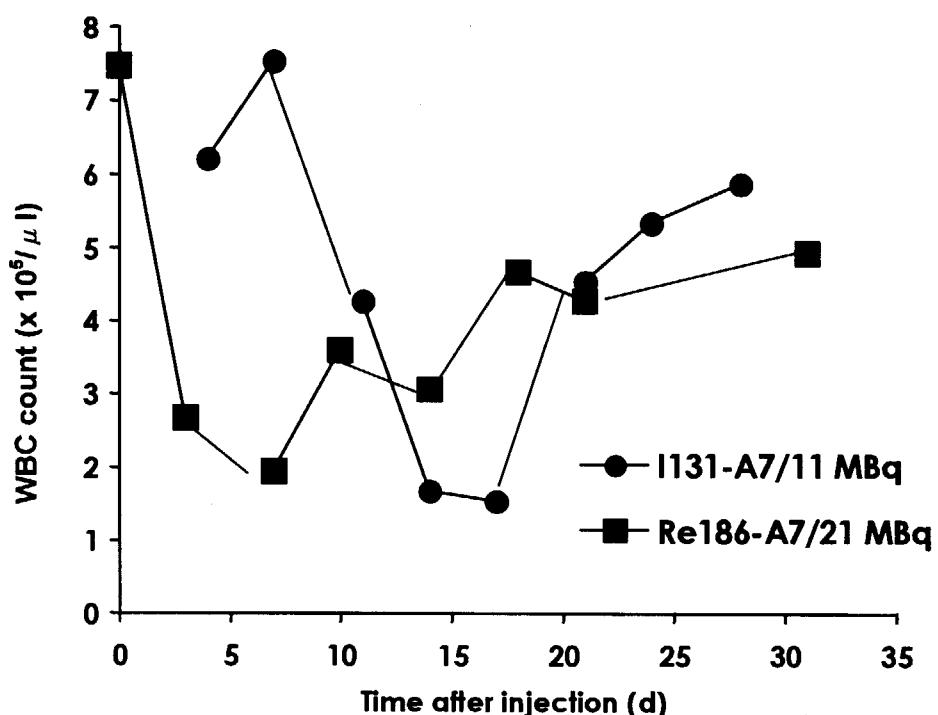


Fig. 3.4-13. Myelotoxicity of intraperitoneal radioimmunotherapy with ¹⁸⁶Re-A7 and ¹³¹I-A7.

3. 5 ジェネレータ製無担体 ^{188}Re を用いた標識研究

3.5.1 メルカプトアセチルトリグリシン (MAG3) の標識

(1) はじめに

がん治療に有効な核的特性を有するラジオアイソotopeにより生理活性物質（モノクローナル抗体やペプチド等）を標識した化合物は、がんの内用放射線治療への応用が期待されている。生理活性物質の RI 標識化には、二官能性配位子が有用である。MAG3 は放射性レニウム標識に有効な二官能性配位子として有望視されている化合物であり、 ^{186}Re を用いた標識法として、固相合成による方法 (solid-phase synthesis)¹⁾、クエン酸を Transfer 配位子として用いた方法²⁾が報告されている。本研究では、両方法を用いて無担体の ^{188}Re による MAG3 標識条件の検討を詳細に行い、さらに、得られた $^{188}\text{Re}\text{-MAG3}$ の安定性についても調べた。

(2) 実験

MAG3 のチオール基をベンゾイル基 (Bz-) で保護した Bz-MAG3 は BATAN (インドネシア原子力庁) で合成したものを使用した。また、MAG3 のチオール基をトリフェニルメチル基 (Tr-) で保護した Tr-MAG3 は、千葉大学大学院薬学研究院で合成したものを持ち合していただいた。

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの調製

2.3 項に述べた通り。

標識法

1) 固相合成を利用した方法 (solid-phase synthesis)¹⁾

バイアル瓶に 1 M Na_2CO_3 150 μl 、 $^{188}\text{ReO}_4$ 500 μl 、pH 調整用溶液 (NaOH または HCl) 75 μl 、Bz-MAG3 (2 mg/ml MeCN/H₂O(9:1)) 25 μl 及び塩化スズ(II)水溶液 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 mg/H₂O 1ml) 100 μl を加え、100°Cで 10 分間加熱した。その後、N₂ 気流中 (100°C) で溶媒を蒸発させた。15 分間余分に加熱後、氷中で数分間冷却し、500 μl の水を加え析出物を溶解させた。1 N H₂SO₄ を適量加えて pH を 5.7-6.3 に調節した後、フィルター (0.22 μm) でろ過し、HPLC 分析を行った。Bz-MAG3 の代わりに、フリーのチオール基を持つ MAG3 を使用した実験も行った。その場合、Tr-MAG3 をトリフルオロ酢酸及びトリエチルシランによって処理して Tr-基の脱保護を行い、MAG3 を生成させた。

2) transfer 配位子 (クエン酸) を用いた方法²⁾

バイアル瓶に Bz-MAG3、pH 調整用溶液 450 μl 及び塩化スズ(II)のクエン酸溶液 ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ を 0.1 M citrate-buffer (pH=5) に溶解) 450 μl を加えた。溶液を超音波によって十分懸濁させた後、 $^{188}\text{ReO}_4$ 溶液 300 μl を加えた。さらに、vortex にて溶液をかくはん後、沸騰水中で 1 時間反応させた。反応溶液は 5-10 分間水冷し、フィルター (0.22 μm) にてろ過した後、HPLC 分析を行った。pH 調整用溶液としては、0.1~0.6 M HCl, 0.2 M CH₃COOH, 0.2 M CH₃COONa, 0.2 M NaOH を単独または、混合して使用した。また、Re 担体を添加した実験は、ジェネレータから溶離した無担体 ^{188}Re 溶液に所定濃度の NH₄ReO₄ を生理食塩水に溶解した溶液を加えて行った。最終反応溶液中の Re 濃度が、20 $\mu\text{g Re/ml}$ になるように調製した。

HPLC 分析

HPLC システムとして、Waters 2690 分離モジュール、Waters 996 フォトダイオード検出器及び Packard Radiomatic 515TR HPLC 放射能検出器を用いた。 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ は、逆相クロマトグラフィー(Hypersil C18 BDS-5, 4.6 mm $\phi \times 150$ mm)により分析した。溶離は、4%エタノール-0.01 M リン酸溶液 (pH=7)、流速 1.0 ml/min で行った。この条件で、 $^{188}\text{ReO}_4$ が 2.4 min, $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ が 3.7-3.8 min に溶出した (Fig. 3.5.1-1)。

溶液内安定性

反応後の溶液 100 μl に pH 調製用溶液 (HCl, CH₃COONa, NaOH 等) 400 μl を加え、一定時間後に HPLC 分析及び pH 測定を行った。

(3) 結果及び考察

1) 固相合成を利用した方法

塩化スズ(II)濃度依存性

添加時の塩化スズ(II)濃度を 0.5~10 mg/ml に変化させたところ、標識率は 2 mg/ml 以上で一定値を示した。従って、塩化スズ濃度は 2 mg/ml とした。

MAG3 濃度依存性

添加時の MAG3 濃度として、1 mg/ml 及び 2 mg/ml で比較したところ ($[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2$ mg/ml, pH=12.5)、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の収率は、1 mg/ml MAG3 の場合 83.4%、2 mg/ml の場合 89.0% であった。従って、MAG3 濃度は、2 mg/ml とした。

pH 依存性 (Fig. 3.5.1-2)

塩化スズ濃度及び MAG3 濃度を 2 mg/ml に固定して、pH 依存性を調べた。その結果を Fig.3.5.1-1 に示した。 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ 錯体の生成は、pH の影響を強く受けており、初期 pH が 12.1 ~12.6 の範囲で、90%以上の収率で合成できることがわかった。pH 依存性は、S-Bz-MAG3 のベンゾイル基の脱保護反応、 ^{188}Re の塩化スズによる還元反応、 ^{188}Re と MAG3 の反応等の影響を反映していると考えられる。一般に、Bz-MAG3 のベンゾイル基の脱保護は、NaOH 溶液中で行われることから、もしこの最適 pH が、ベンゾイル基の脱保護を強く反映していれば、フリーの MAG3 を用いた場合、pH 依存性が異なることが予想される。そこで、Tr-MAG3 から調製したフリーの MAG3 を用いて同じ実験を行った。その結果、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ 生成収率の pH 依存性は、S-Bz-MAG3 を用いた場合とほぼ同じであることが認められた (Fig.3.5.1-1 参照)。従って、この最適 pH は、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の生成反応それ自身の影響を反映しているものと考えられる。しかしながら、本標識法は、溶液を加熱乾固する事により反応させているため、反応中の pH は当然変化しており、どの時点での pH が $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の生成に対して有効に働いているかは定かではない。

2) クエン酸を transfer 配位子として用いた方法

MAG3 濃度依存性 (Fig. 3.5.1-3)

pH 1.7 - 1.8, $[\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}] = 2.25$ mg/ml で、MAG3 濃度依存性 (0.45~1.67 mg/ml) を調べた。その結果、無担体 ^{188}Re の場合は、Bz-MAG3 濃度に依らず収率は一定値 (約 90%) を示し

た。しかしながら、担体を含む場合 ($20 \mu\text{g Re/ml}$) は、Bz-MAG3 濃度が 0.45 mg/ml では 70% 台の収率であり、無担体の場合と同等の収率(約 90%)を得るために、Bz-MAG3 濃度 1.67 mg/ml が必要であった。

塩化スズ(II)濃度依存性 (Fig. 3.5.1-4)

pH 1.6 – 1.9, [Bz-MAG3] = 0.45 mg/ml で、塩化スズ(II)濃度依存性 ($0.38 \sim 2.25 \text{ mg/ml}$) を調べた。その結果、無担体の場合及び担体を含む場合共に、塩化スズ(II)濃度が $4.5 \sim 1.1 \text{ mg/ml}$ ($2.0 \times 10^{-2} \sim 4.9 \times 10^{-3} \text{ M}$) までは収率の低下は見られなかったが、 0.38 mg/ml ($1.7 \times 10^{-3} \text{ M}$) では、収率の低下が見られた。

pH 依存性 (Fig. 3.5.1-5)

塩化スズ(II)濃度を 2.25 mg/ml 、Bz-MAG3 濃度を無担体の場合 0.45 mg/ml 、担体を含む場合 1.67 mg/ml の条件で、pH 依存性を調べた。その結果、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ 錯体の生成は、pH の影響を強く受けしており、pH が 2~5 の範囲では 90% 以上の収率であったが、pH 5 を超えると急激な収率の低下が観察された。最適 pH は、3.8~5 であることが明らかになった。

クエン酸の効果 (Fig. 3.5.1-6)

クエン酸を用いない場合 (塩化スズ(II)のみ) での実験を塩化スズ(II)濃度 2.25 mg/ml で行った。その結果、無担体の場合及び担体を含む場合共に、クエン酸を使用した時の方が塩化スズのみの時よりも標識率が高く、クエン酸が、transfer 配位子として働いていることが確かめられた。

溶液内安定性 (Fig. 3.5.1-7 : 無担体、Fig. 3.5.1-8 : 担体添加)

得られた $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の溶液内安定性について、反応後の溶液の pH を変化させて調べた。その結果、無担体の場合及び担体を含む場合ともに、pH 10~11 以上では分解が観察され、pH の増加及び経過時間につれてその程度は大きくなかった。しかしながら、pH 6~7 では 70 時間経過後も $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の残存率 (Survival yield) は、97% 以上であり、安定性が高いことが認められた。

(4) まとめ

固相合成を利用した方法 (固相合成法) 及び transfer 配位子を利用する方法 (transfer 配位子法) 共に最適条件下での $^{188}\text{Re}\cdot\text{MAG3}$ の収率は、90% 以上であり、差は見られなかった。ただ、固相合成法には窒素気流中での溶媒除去の操作が含まれるが、transfer 配位子法では必要がないため、操作上は、transfer 配位子法の方が簡単であると言える。

参考文献

- 1) G. W. M. Visser, M. Gerretsen, J. D. M. Herscheid, G. B. Snow and G. van Dongen, *J. Nucl. Med.* 34, 1953(1993).
- 2) S. Guhlke, A. Schaffland, P.O. Zamora, J. Sartor, D. Diekmann, H. Bender, F.F. Knapp and H.-J. Biersack, *Nucl. Med. Biol.* 25, 621(1998).

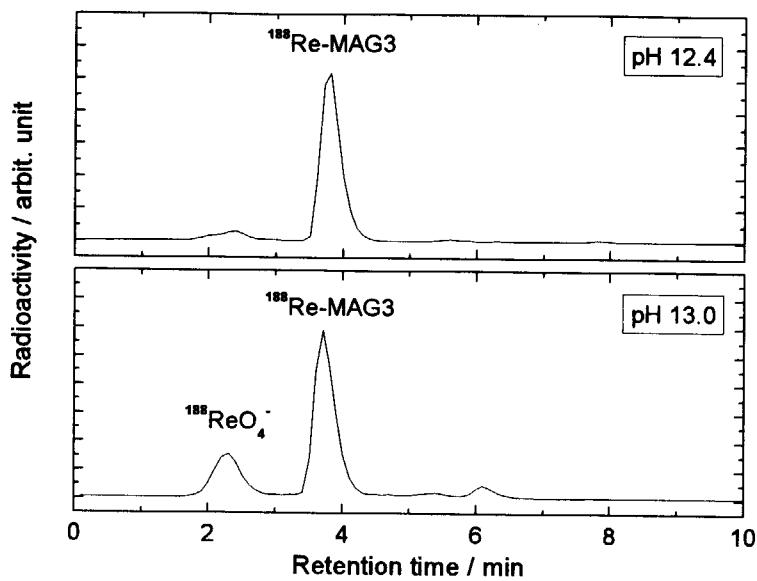


Fig. 3.5.1-1. Typical chromatograms of ^{188}Re -MAG3 synthesized at different pH by the solid-phase synthesis.

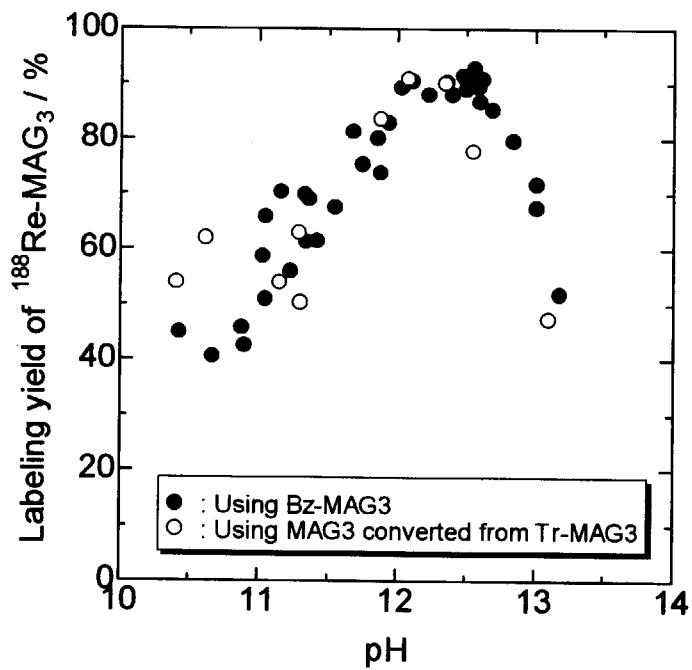


Fig. 3.5.1-2. Influence of pH on the labeling yield of ^{188}Re -MAG3 by the solid-phase synthesis.

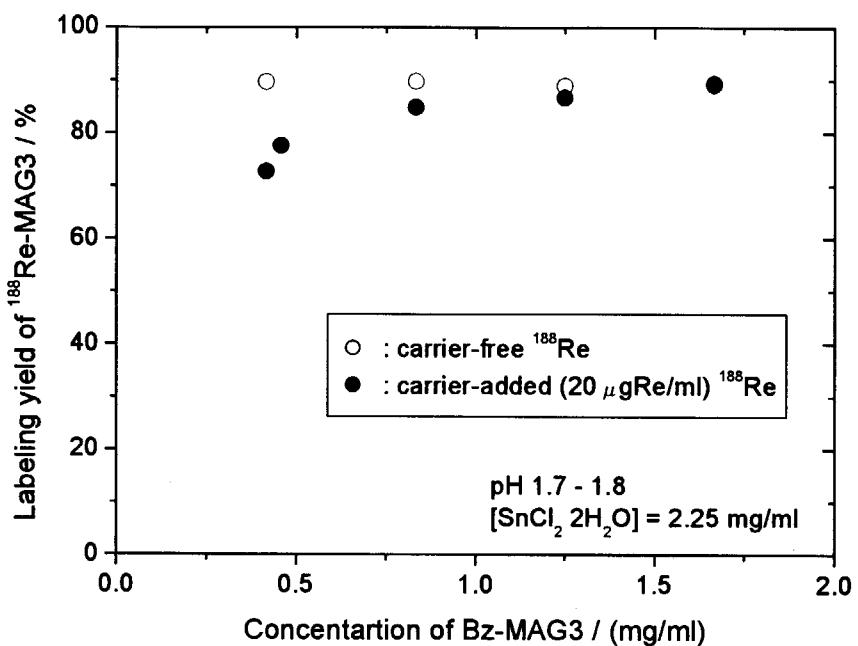


Fig. 3.5.1-3. Influence of MAG3 concentration on the labeling yield of ^{188}Re -MAG3.

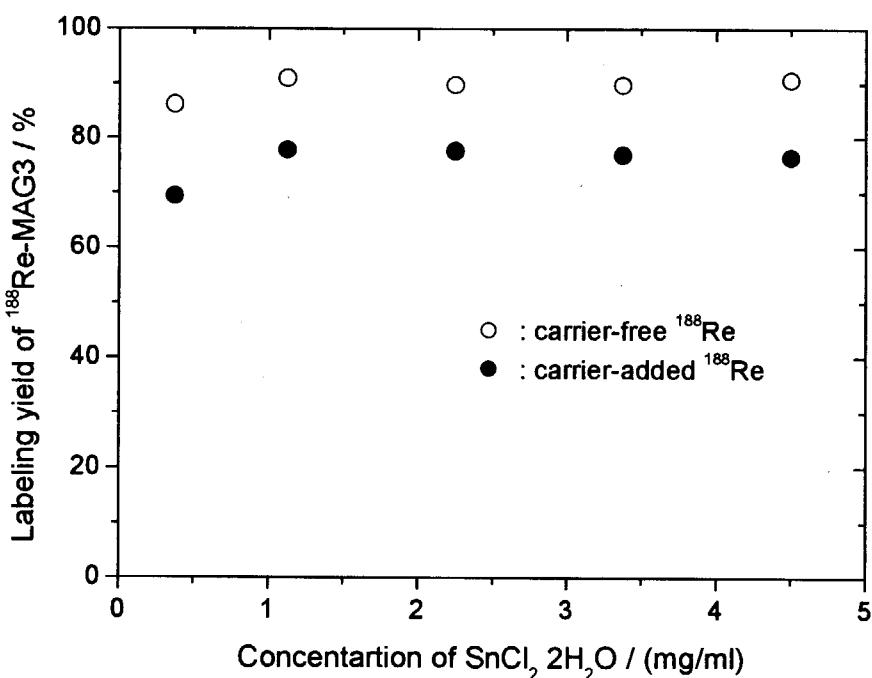


Fig. 3.5.1-4. Influence of SnCl_2 concentration on the labeling yield of ^{188}Re -MAG3

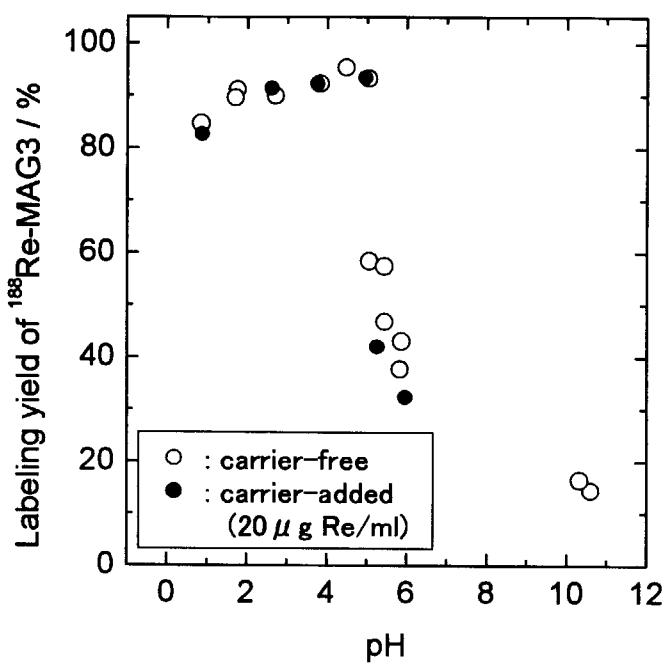


Fig. 3.5.1-5. Influence of pH on the labeling yield of ^{188}Re -MAG3.

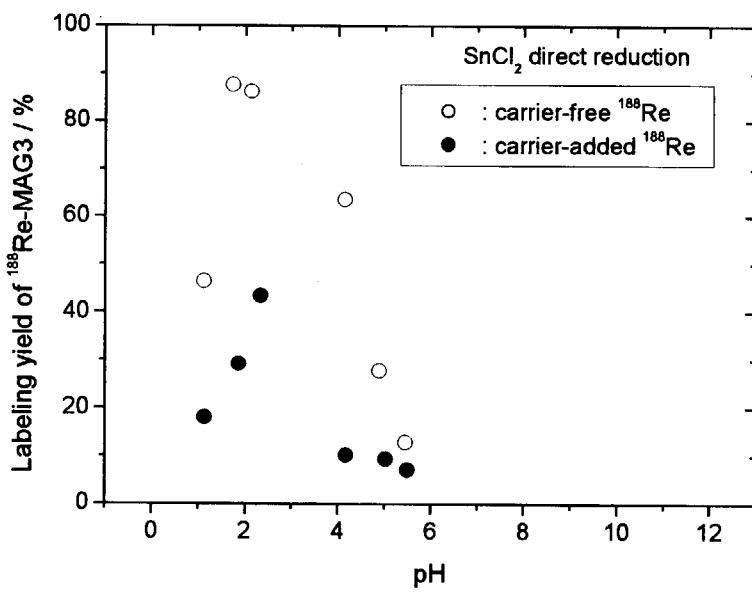


Fig. 3.5.1-6. Synthesis of ^{188}Re -MAG3 by the SnCl_2 direct reduction (effect of citric acid).

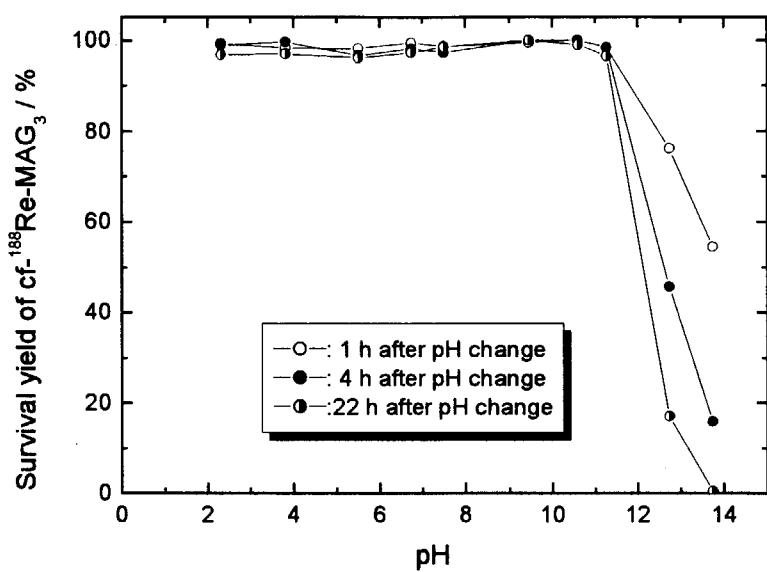


Fig. 3.5.1-7. Stability of carrier-free (cf-) ^{188}Re -MAG₃.

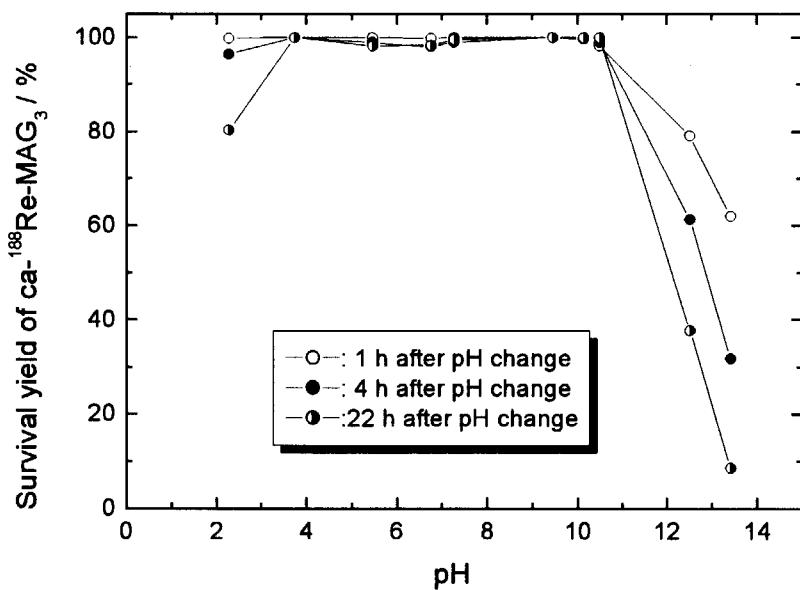


Fig. 3.5.1-8. Stability of carrier-added (ca-) ^{188}Re -MAG₃.

3.5.2 モノアミンモノアミドジチオール (MAMA) の標識¹⁾

(1) はじめに

N_3S や N_2S_2 配位子のオキソレニウム (V) 錯体及びオキソテクネチウム (V) 錯体は、放射性医薬品として使用されている。 N_3S 配位子である MAG3 の ^{188}Re 標識化については、3.5.1 項で詳細に検討した。 N_2S_2 配位子であるモノアミンモノアミドジチオール (MAMA) も $M(V)O(N_2S_2)$ 錯体を生成し、放射性医薬品の基本骨格として有用である。京都大学で新規に開発された化合物 MAMA·APB (Fig. 3.5.2-1 参照) は、その ^{186}Re 標識化合物が骨疼痛緩和剤として優れた性質を持つことが明らかになった²⁾。しかしながら、その標識率の向上が課題の一つである。そこで、協力研究の一環として、MAMA·APB の前駆体である MAMA のトリフェニルメチル誘導体 (Tr·MAMA) 提供を受け、 ^{186}Re -MAG3 合成法として報告されたクエン酸を transfer 配位子に用いる方法³⁾ を用いてジェネレータ製 ^{188}Re を用いた MAMA 標識について詳細に検討した。

(2) 実験

$^{188}W/^{188}Re$ ジェネレータの調製

2.3 項に述べた通り。

標識法

バイアル瓶に、Tr·MAMA 及びトリフルオロ酢酸 (TFA) 200 μl を加えて、vortex にてかくはん後、トリエチルシラン 10 μl を加え、再度かくはんして、Tr 基の脱保護を行った。 N_2 ガスで TFA 溶液をしっかりと飛ばした後、pH 調整用溶液 450 μl 及び塩化スズ(II)のクエン酸溶液 ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$ を 0.1 M citrate-buffer (pH=5)に溶解) 450 μl を加え、超音波により溶液を十分懸濁させた。そこへ、 $^{188}ReO_4$ 溶液 300 μl を加え、vortex にて溶液をかくはん後、沸騰水中で 1 時間反応させた。反応溶液を 5~10 分間水冷し、フィルター (0.22 μm) でろ過した後、HPLC 分析を行った。pH 調整用溶液としては、0.1~0.6 M HCl, 0.2 M CH₃COOH, 0.2 M CH₃COONa, 0.2 M NaOH を単独または、混合して使用した。また、Re 担体を添加した実験は、ジェネレータから溶離した無担体 ^{188}Re 溶液に所定濃度の NH₄ReO₄ を生理食塩水に溶解した溶液を加えて行った。最終反応溶液中の Re 濃度が、20 μg Re/ml になるように調製した。

HPLC 分析

HPLC システムとして、Waters 2690 分離モジュール、Waters 996 フォトダイオード検出器及び Packard Radiomatic 515TR HPLC 放射能検出器を用いた。 ^{188}Re -MAG3 は、逆相クロマトグラフィー (Hypersil C18 BDS-5, 4.6 mm ϕ × 150 mm) により分析した。溶離は、0.1%TFA 含有 Water/0.1%TFA 含有アセニトリルのグラジエント (0 min 95/5→30 min 0/100)、流速 1.0 ml/min で行った。この条件で、 $^{188}ReO_4$ が 2.4 min, ^{188}Re -MAMA が 10.2 min に溶出した (Fig. 3.5.2-2)。

溶液内安定性

反応後の溶液 100 μl に pH 調製用溶液 (HCl, CH₃COONa, NaOH) 400 μl を加え、一定時間後に HPLC 分析及び pH 測定を行った。

(3) 結果及び考察

pH 依存性 ($[SnCl_2 \cdot 2H_2O] = 2.25 \text{ mg/ml}$) (Fig. 3.5.2-3)

担体添加及び無担体の場合共に pH が 3 以下 (pH 調整用溶液として、0.1 – 0.6 M HCl を用いた場合) でほぼ定量的に、 $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ が生成していることが明らかになった。

塩化スズ濃度(II)依存性 (Fig. 3.5.2-4)

pH 1.8 – 2.3, $[\text{MAMA}] = 0.83 \text{ mg/ml}$ で、塩化スズ(II)濃度依存性 (0.023~2.25 mg/ml) を調べた。その結果、無担体の場合及び担体を含む場合共に、塩化スズ(II)濃度が 2.25~0.23 mg/ml ($1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ M}$) までは収率の低下は見られなかったが、 $2 \times 10^{-7} \text{ M}$ では、担体を含む場合が収率 67%、無担体の場合が 92% にそれぞれ低下した。塩化スズ(II)濃度 0.2 mg/ml は、Tc-99m-N₂S₂ 誘導体錯体 (ethylene dicysteine (EC)⁴⁾, ethylene dicysteine diethylester (ECD)^{5, 6)} の合成に必要な塩化スズ(II)量に比べて 10 から 100 倍に相当する。

MAMA 濃度依存性 (Fig. 3.5.2-5)

pH 1.7 – 1.8, $[SnCl_2 \cdot 2H_2O] = 2.25 \text{ mg/ml}$ で、MAMA 濃度依存性 (0.042~0.83 mg/ml) を調べた。その結果、無担体 ^{188}Re の場合は、MAMA 濃度に依らず収率は一定値 (約 98%) を示した。一方、担体を含む場合 ($20 \mu\text{g Re/ml}$) は、MAMA 濃度が 0.083 mg/ml 以上では一定値を示したが、それ以下では減少した。担体濃度 $20 \mu\text{g Re/ml}$ の場合、MAMA 濃度 0.083 mg/ml は、MAMA と Re のモル比が約 1 に相当し、MAMA とレニウムが等モルの条件で定量的に $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ が生成することになる。この結果は、MAMA とレニウムの錯形成能が非常に強いことが示している。

以上の結果から、最適条件下では、無担体の場合及び担体を含む場合共に $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ の生成はほぼ定量的 (98%以上の収率) であることが明らかになった。

クエン酸の効果 (Fig. 3.5.2-6 : 担体添加, Fig. 3.5.2-7 : 無担体)

クエン酸の transfer 配位子としての効果をはっきりさせるため、クエン酸を用いない場合 (塩化スズのみ) での実験を行った。塩化スズ(II)濃度は、2.25 mg/ml で行った。その結果、無担体の場合は、クエン酸の使用に関わらず、ほぼ同じ標識率であった。しかしながら、担体を含む場合は、明らかにクエン酸を使用した時の方が、塩化スズ(II)のみの時よりも標識率が高く、クエン酸の効果が認められた。この事から、レニウムの化学量が非常に少ない無担体の場合は、塩化スズ(II)のみでレニウムの還元が十分に行われたのに対して、Re 担体を含む場合は、塩化スズ(II)のみでは不十分であり、クエン酸による Re(V)-クエン酸錯体の寄与が必要であったと思われる。

溶液内安定性 (Figs. 3.5.2-8, 3.5.2-10 : 無担体、Figs. 3.5.2-9, 3.5.2-11 : 担体添加)

得られた $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ の溶液内安定性について、反応後の溶液の pH を変化させて調べた。その結果、無担体の場合及び担体を含む場合共に、pH 2 – 7 では分解はほとんど観察されなかったが、pH 8 以上では分解が認められ、pH の増加及び経過時間につれてその程度は大きくなつた。さらに、pH と経過時間の関係について調べたところ、pH 12–14においては、 $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ の放射化学的収率は経過時間と共に減少したが、pH 6–7 では 70 時間経過後も 97% 以上が $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ であり、無担体の場合及び担体を含む場合共に、安定性が高いことが認められた。

(4) まとめ

最適条件下では、無担体の場合及び担体を含む場合共に $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ の生成はほぼ定量的（98%以上の収率）であることが明らかになり、クエン酸は、 $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ の合成に関しても優れた transfer 配位子であることが示された。

さらに、 $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ は、無担体の場合及び担体を含む場合共に中性溶液（pH 6・7）中では、非常に安定であることが明らかになった。

以上のように $^{188}\text{Re}\text{-MAMA}$ は、低濃度の MAMA を用いて高収率で合成でき、さらに高い安定性を示す事から、MAMA が二官能性配位子として優れた性質を持つことが再確認された。

参考文献

- 1) K. Hashimoto, H. Matsuoka, K. Ogawa, T. Mukai and H. Saji, "Extended Synopses of The Third Russian-Japanese Seminar on Technetium, June 23 – July 1, 2002, Dubna, Russia", Paper 2616.
- 2) T. Mukai, K. Ogawa, Y. Arano, M. Ono, Y. Fujioka, M. Izumo, J. Konishi and H. Saji, *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 44, Suppl. 1, S617(2001).
- 3) S. Guhlke, A. Schaffland, P.O. Zamora, J. Sartor, D. Diekmann, H. Bender, F.F. Knapp and H.-J. Biersack, *Nucl. Med. Biol.* 25, 621(1998).
- 4) A. M. Verbruggen, D. L. Nosco, C. G. Van Nerom, G. M. Bormans, P. J. Adriaens and M. J. De Roo, *J. Nucl. Med.* 33, 551(1992).
- 5) J. Léveillé, G. Demonceau, M. De Roo, P. Rigo, R. Taillefer, R. A. Morgan, D. Kupranick and R. C. Walovitch, *J. Nucl. Med.* 30, 1902(1989).
- 6) 第一ラジオアイソトープ研究所製 ニューロライト 第一、インビボ放射性医薬品添付文書集, p. 78 (平成 6 年 7 月 1 日現在)

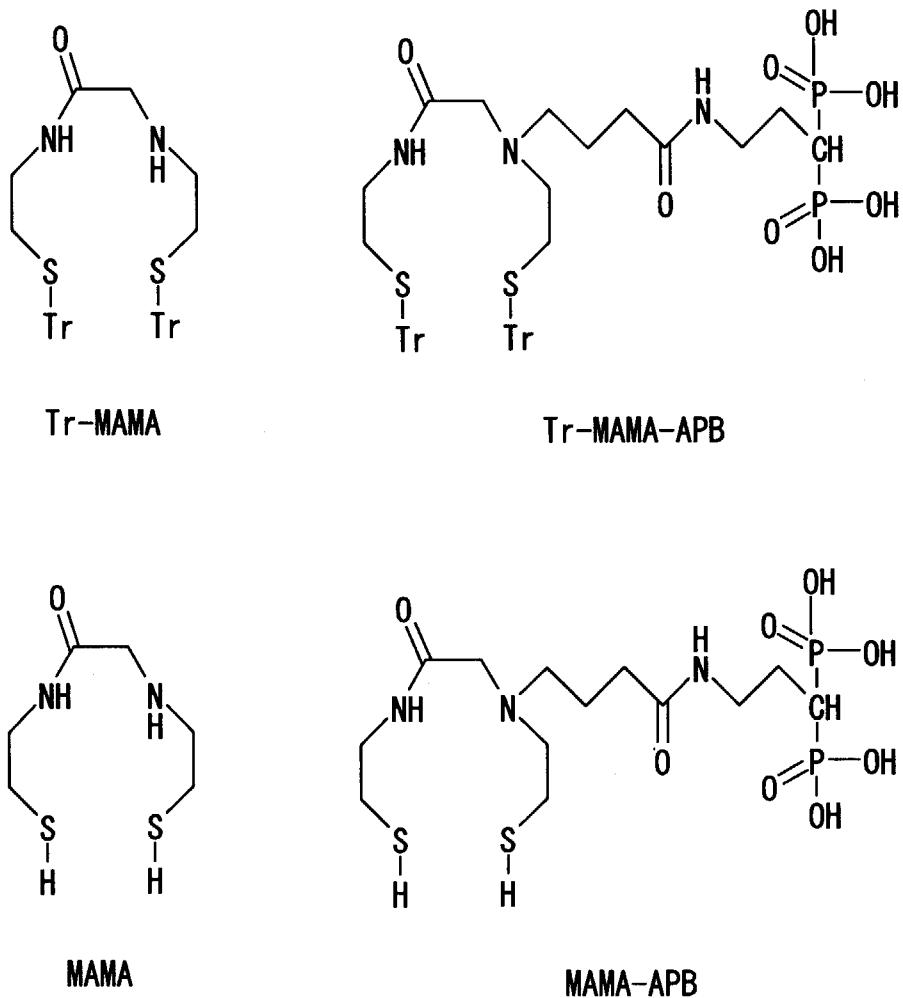


Fig. 3.5.2-1. Chemical structures of MAMA and its derivatives.

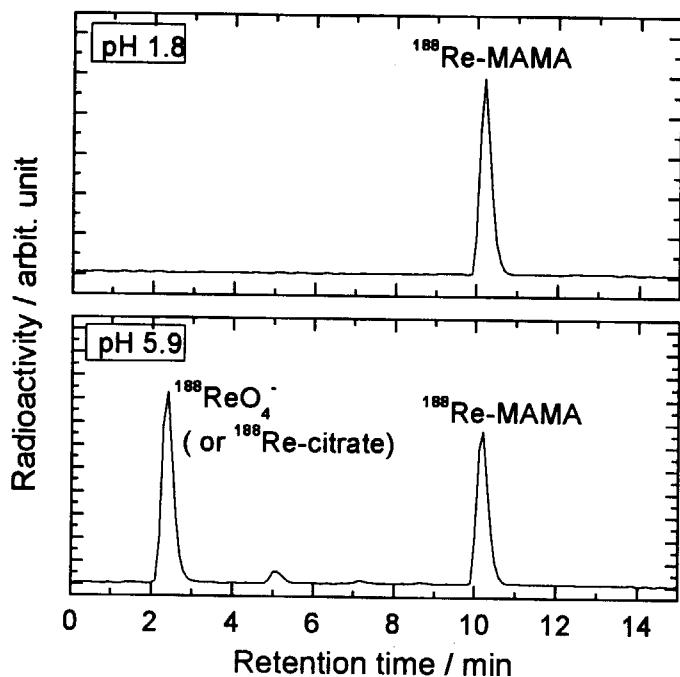


Fig. 3.5.2-2. Chromatograms of carrier-added ¹⁸⁸Re-MAMA synthesized at different pH.

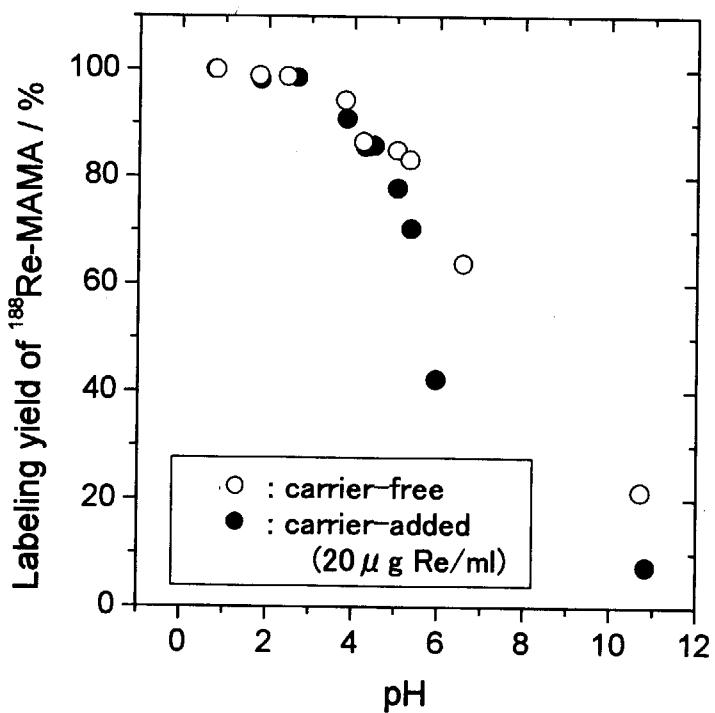


Fig. 3.5.2-3. Influence of pH on the labeling yield of ¹⁸⁸Re-MAMA.

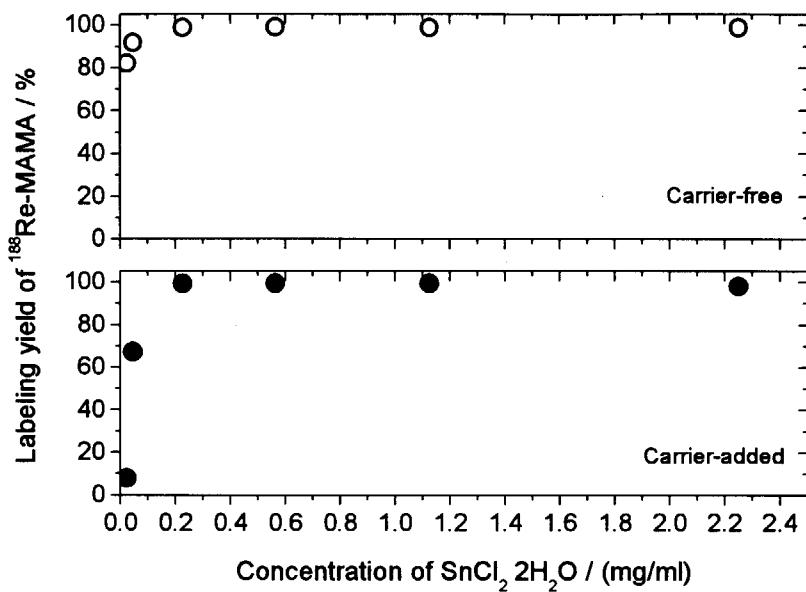


Fig. 3.5.2-4. Influence of SnCl_2 concentration on the labeling yield of ^{188}Re -MAMA.

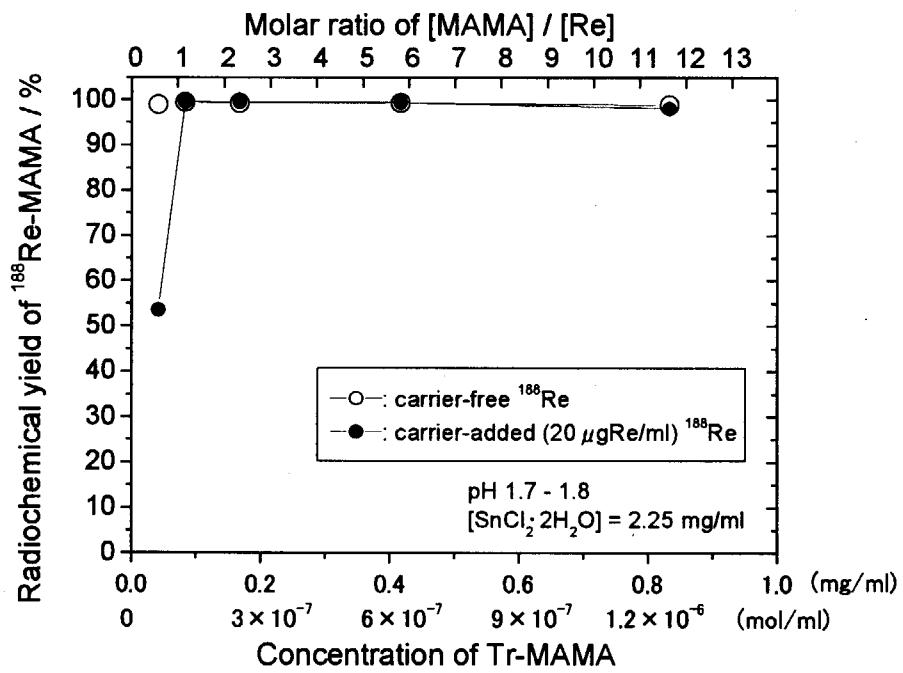
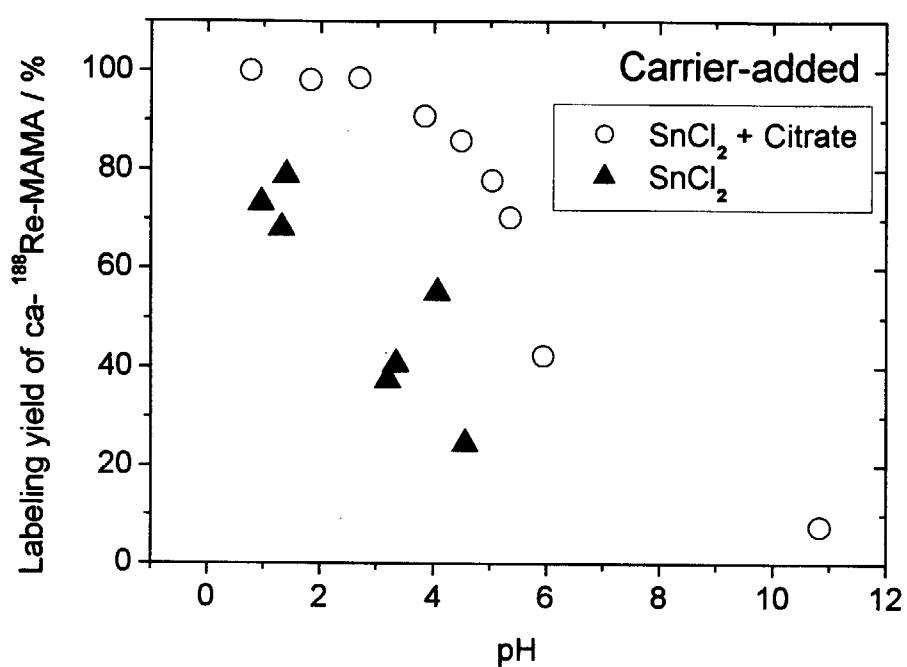
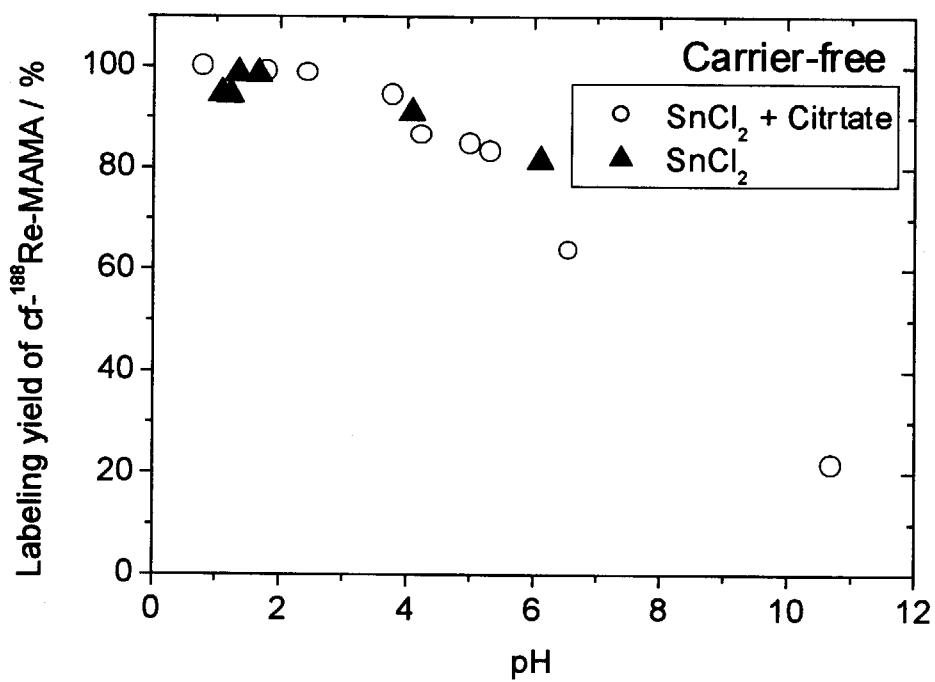
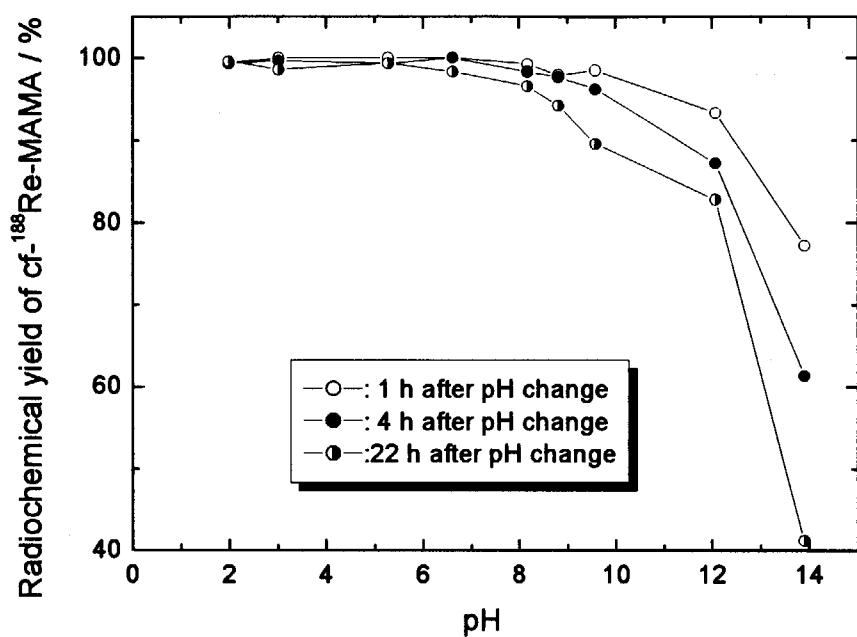
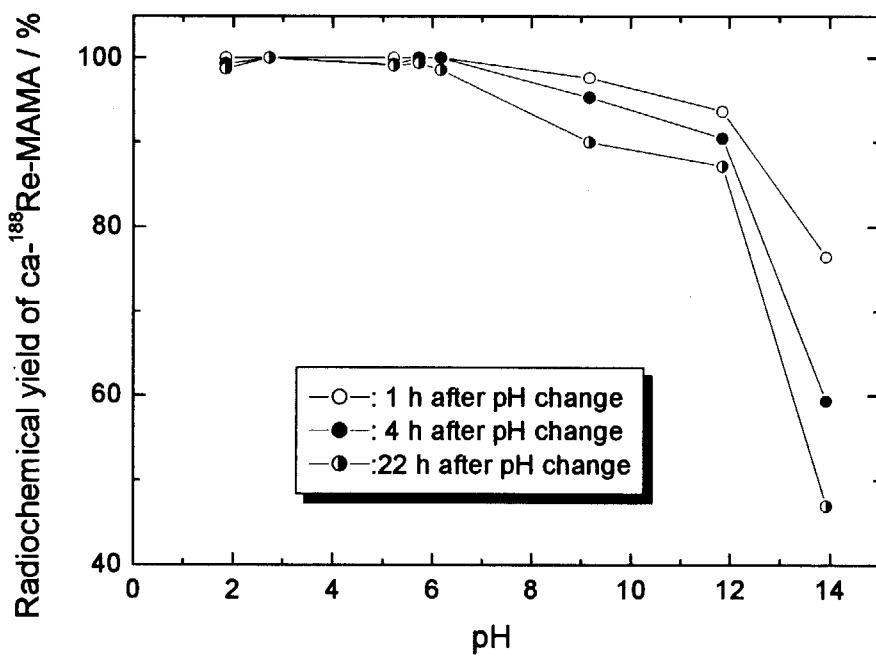


Fig. 3.5.2-5. Influence of MAMA concentration on the labeling yield of ^{188}Re -MAMA.

Fig. 3.5.2-6. Effect of citric acid on synthesis of carrier-added ^{188}Re -MAMA.Fig. 3.5.2-7. Effect of citric acid on synthesis of carrier-free ^{188}Re -MAMA.

Fig. 3.5.2-8. Stability of carrier-free (cf-) ^{188}Re -MAMA.Fig. 3.5.2-9. Stability of carrier-added (ca-) ^{188}Re -MAMA

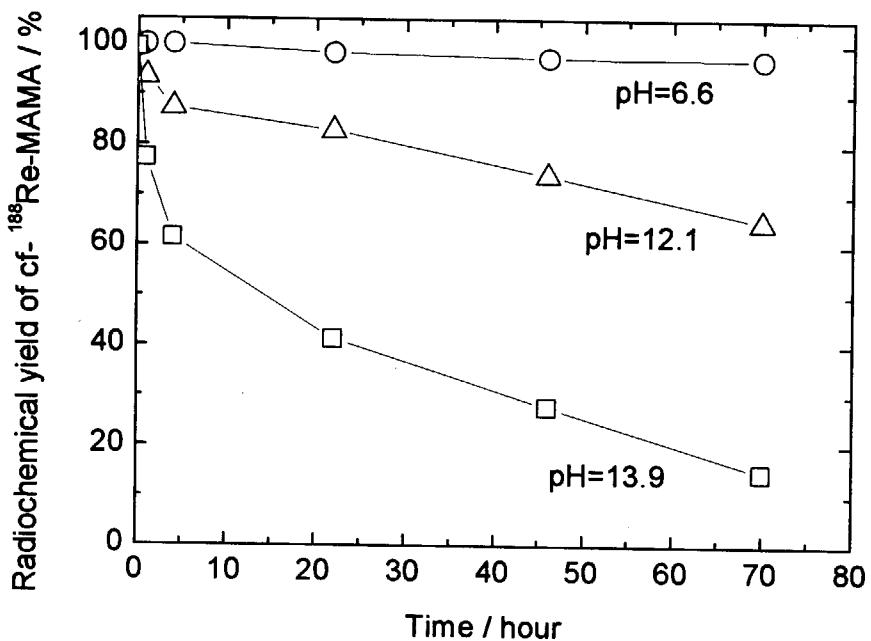


Fig. 3.5.2-10. Stability of carrier-free (cf-) ¹⁸⁸Re-MAMA in different pH solutions.

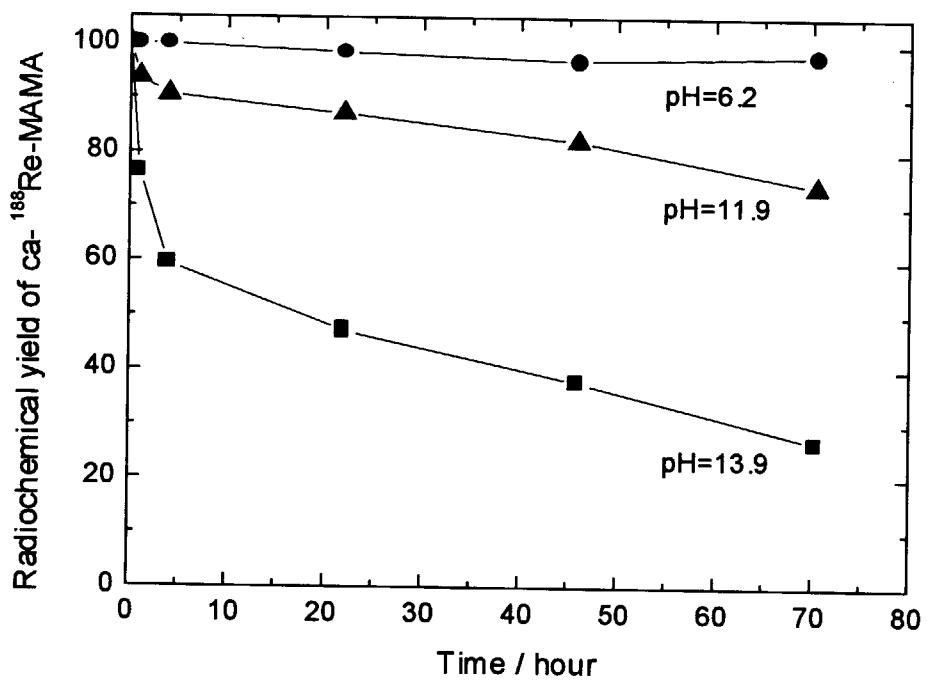


Fig. 3.5.2-11. Stability of carrier-added (ca-) ¹⁸⁸Re-MAMA in different pH solutions.

3.5.3 ^{188}Re -アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP, NTMP) 化合物のヒドロキシアパタイトへの吸着挙動¹⁾

(1) はじめに

リン酸基を含む化合物を配位子とする放射性レニウム錯体は骨集積性を示し、転移性骨がんの疼痛緩和効果が期待されている。本研究では、前報^{2, 3)}でその合成法を報告したアミノメチレンリン酸 {EDTMP: Ethylenediamine-N,N,N',N'-tetrakis(methylenephosphonic acid), EDBMP: Ethylene-diamine-N,N'-bis(methylenephosphonic acid), NTMP: Nitrilotris(methylene phosphonic acid)} (Fig. 3.5.3-1 参照) を配位子とする ^{188}Re 錯体の骨集積機構の基礎的な検討として、骨の無機質の主成分であるヒドロキシアパタイトへの ^{188}Re -EDTMP の吸着挙動をバッチ法により調べ、吸着係数に対する振とう時間、pH、イオン強度及び担体の有無などの影響を調べた。さらに、 ^{188}Re -EDBMP 及び ^{188}Re -NTMP の吸着挙動と比較検討した。

(2) 実験

$^{188}\text{W}/^{188}\text{Re}$ ジェネレータの調製

2.3 項に述べた通り。

^{188}Re -アミノメチレンリン酸誘導体錯体 (^{188}Re -amp) の合成

アミノメチレンリン酸誘導体 (EDTMP, EDBMP 及び NTMP) は、同仁化学研究所製を用いた。EDTMP, EDBMP は、0.5 M NaOH 5ml に加熱溶解し、NTMP は水に溶解し、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。塩化スズ(II) ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬製 0.38 g に 0.5 ml の濃塩酸を加えて溶解後、蒸留水を加えて 10 ml にして使用した。

^{188}Re -amp 錯体合成は、0.2 M アミノメチレンリン酸溶液、pH 調整用溶液 (HCl)、アスコルビン酸水溶液 (38 mg/ml)、 ^{188}Re 溶液及び塩化スズ(II)溶液 (38 mg/ml) を加えて攪拌後、沸騰水中で 30 分間静置して行った。最終反応溶液中のアミノメチレンリン酸、アスコルビン酸及び塩化スズ(II)の各濃度は、0.1 M、2.85 mg/ml 及び 0.57 mg/ml であり、反応溶液の pH は、0.8-0.9 に調整した。最終レニウム濃度は、 NH_4ReO_4 を ^{188}Re 溶液に添加することにより、無担体レベルから 0.02 mgRe/ml まで変化させた。 ^{188}Re -amp の生成は、シリカゲル薄層クロマトグラフィー (Merck No.5735 または Gelman Sciences ITLC SG／アセトン) による分析で確認した。シリカゲル薄層シートは、乾燥後、イメージスキャナー (AMBIS-100) により ^{188}Re の放射能分布を求めた。

^{188}Re -amp のヒドロキシアパタイトへの吸着実験

ヒドロキシアパタイトは、和光純薬製液体クロマトグラフ用 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ を用いた。ヒドロキシアパタイト (HAP) 100 mg に pH 調整用溶液 (蒸留水、HCl、NaOH または酢酸ナトリウム溶液) 及びイオン強度調整用 NaCl 溶液 (計 1.5 ml) を加えて懸濁させた溶液に、 ^{188}Re 錯体溶液 (0.5 ml) を加えて湯浴中 (37°C) で振とうした。一定時間後、遠心分離を行い、上澄みから一定量分取し、 ^{188}Re の放射能を測定した。また、溶液中の ^{188}Re 錯体の存在割合をシリカゲル TLC により求め、溶液中の ^{188}Re 錯体の放射能量を補正した。溶液中の放射能量と添加放射能量との比較により ^{188}Re 錯体の吸着量を求めた。 ^{188}Re の放射能は、水中におけるチェレンコフ

光を液体シンチレーション計数器 (Beckman LS3801) で測定して求めた⁴⁾。

¹⁸⁸Re-EDTMP の HPLC 分析

¹⁸⁸Re-EDTMP は、逆相イオン対クロマトグラフィー(Hypersil C18 BDS-5, 4.6 mm φ × 150 mm)により分析した。溶離は、流速 1.0 ml/min、0.008 M テトラブチルアンモニウムハイドロオキサイド(TBA) / 10% メタノール(pH 6.0) (溶媒 A) 及び 0.008 M TBA / 60% メタノール(pH 6.0) (溶媒 B)のグラジエント(分-%B: 0·0, 5·85, 30·100)で行った。HPLC システムとして、Waters 2690 分離モジュール、Waters 996 フォトダイオード検出器及び Packard Radiomatic 515TR HPLC 放射能検出器を用いた。

(3) 結果及び考察

¹⁸⁸Re-EDTMP の HAP に吸着した割合の振とう時間依存性を Fig. 3.5.3-2 に示す。¹⁸⁸Re-EDTMP の吸着割合は時間と共に増加し、振とう時間 24 時間以上でほぼ一定値を示した。したがって、以降の吸着実験は振とう時間 24 時間で行った。前報において^{2,3)}、無担体 ¹⁸⁸Re-amp 錯体の安定性は、担体添加 ¹⁸⁸Re-amp 錯体よりも低いことが明らかになった。しかしながら本実験条件下では、無担体 ¹⁸⁸Re-EDTMP から過レニウム酸への分解は Fig. 3.5.3-3 に示したようにほとんど観察されず、24 時間経過後も 3·4% 以下であった。さらに、過レニウム酸は HAP へ吸着しないことが認められた。

次に、¹⁸⁸Re-EDTMP 中の Re 担体量を変化させて吸着量を求めた。Fig. 3.5.3-4 に示すように、溶液中の Re 濃度に対する吸着相中の Re 濃度の関係は原点を通る直線関係を示した。したがって本実験条件下では直線的吸着平衡が成立しており、吸着係数 [ml/g] { = (HAP 単位重量当たりに吸着した ¹⁸⁸Re 錯体量) / (溶液単位体積中の ¹⁸⁸Re 錯体量) } が一定であることを示している。

吸着係数の pH 依存性 (Fig. 3.5.3-5) 及びイオン強度依存性 (Fig. 3.5.3-6) について調べた。吸着係数は、実験を行った pH 範囲 (3~4) では pH が低いほど大きいことがわかった。本実験結果は、^{99m}Tc(Sn)pyrophosphate の Ca₃(PO₄)₂⁵⁾への吸着挙動と一致している。pH は、HAP の表面電荷 (ゼータ電位) に影響を与える。つまり、HAP の表面はプラス電荷とマイナス電荷が存在するが、pH はその電荷密度に影響を与える。したがって、pH が point of zero charge (pzc) よりも高ければゼータ電位はマイナスであり、HAP 表面はマイナス電荷が支配的である。また、pH が pzc よりも低ければゼータ電位はプラスであり、HAP 表面はプラス電荷が支配的である。文献によると⁶⁻¹⁰⁾、HAP の pzc は pH 6.4~8.5 である。したがって、本実験の pH 条件 (pH 3~4.5) では、pzc よりも pH が低いため、HAP 表面はプラス電荷が支配的と考えられる。電気泳動の結果から^{2,3)}、¹⁸⁸Re-amp はマイナス電荷を持っていることを考慮すると、¹⁸⁸Re-amp の HAP への吸着の一要因は ¹⁸⁸Re-amp のマイナス電荷と HAP 表面のプラス電荷間の静電力であると考えられる。

Fig. 3.5.3-6 に示したように、吸着係数はイオン強度が増加するにつれて減少している。これらの結果も、本吸着は静電的であることを示唆している。すなわち、NaCl を添加することにより、静電遮蔽効果が大きくなること (¹⁸⁸Re-amp のマイナス電荷と HAP 表面のプラス電荷が Na イオンと Cl イオンによって減少する) 及び競争的吸着反応 (Cl イオンと HAP 表面との間で吸着反応) が増加することの 2 つの要因により ¹⁸⁸Re-amp の吸着係数が減少すると考えられる。

さらに、アミノメチレンリン酸配位子の違いによる ^{188}Re 錯体の吸着挙動を比較した結果 (Fig. 3.5.3-7)、同一条件下では、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDBMP} < ^{188}\text{Re}\cdot\text{NTMP} < ^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ の順に吸着係数が増大することが明らかになった。しかしながら、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ の吸着係数は、大過剰に存在するアミノメチレンリン酸配位子からも影響を受けると考えられる。すなわち、本実験では、2つの競争的吸着反応が起きていると考えられる。一つは $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ と HAP の吸着、もう一つはアミノメチレンリン酸と HAP の吸着反応である。したがって、アミノメチレンリン酸の HAP への吸着効果を調べるために、アミノメチレンリン酸をさらに添加して $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ の吸着係数を測定した。その結果、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ の吸着係数はアミノメチレンリン酸を加えることにより減少し、その度合いは $\text{EDBMP} \leq \text{NTMP} < \text{EDTMP}$ の順に大きくなつた。すなわち、 $\text{EDBMP} \leq \text{NTMP} < \text{EDTMP}$ の順でアミノメチレンリン酸の HAP への吸着力が増加すると考えられる。以上の結果を考慮に入れると、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ 錯体それ自身の HAP への吸着力は、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDBMP} < ^{188}\text{Re}\cdot\text{NTMP} < ^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ の順に大きくなると結論づけられる。 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ 錯体の HAP への吸着力の大きさは、アミノメチレンリン酸配位子中のリン酸基の数が増えるほど大きくなつており、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ 錯体の HAP への吸着は、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{amp}$ 錯体中のリン酸基と HAP 表面上のカルシウムイオンとの間の相互作用が要因の一つである事が示唆される。

Fig. 3.5.3-5, 6 に見られるように、同一条件下において無担体の $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ の吸着係数は、担体を含む ($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 場合の吸着係数よりも大きいことが認められた。直線的吸着平衡が成立していることから (Fig. 3.5.3-4)、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体の吸着係数は、錯体濃度 (Re 担体濃度) と無関係であるはずである。そこで Re 担体の効果を明らかにするために、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ の吸着係数の Re 担体濃度依存性について詳細に調べた。Fig. 3.5.3-8 に示したように、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 試料中の Re 担体濃度が無担体レベルから $0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$ では、吸着係数は一定であったが、 $0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では担体濃度が増加するにつれて吸着係数は減少した。レニウム-ニリン酸錯体は、HPLC 分析^{11,12)}及び EXAFS 分析¹³⁾の結果から、テクネチウム錯体と同じくスズを含む高分子錯体の混合物であると考えられている。テクネチウム-ニリン酸錯体の各成分の割合は、pH、担体の添加、ニリン酸濃度や還元剤の違い (SnCl_2 or NaBH_4)¹⁴⁻¹⁷⁾ 等によって異なることが知られている。我々は以前、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体のイオン対逆相カラムクロマトグラフ法による分析から、無担体錯体と担体を含む錯体では、クロマトグラムが異なることを報告した¹⁸⁾。そこで、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体のクロマトグラムの担体濃度依存性について詳細に調べた結果 (Fig. 3.5.3-9)、担体濃度が無担体から $0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$ までは、クロマトグラムは一定であったが、Re 担体濃度が $0.002 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上では徐々にクロマトグラムが変化する事が観察された。Re 担体濃度変化による $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体のクロマトグラム変化は、吸着係数の変化と傾向が一致した。したがって、 $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体の HAP への吸着係数の Re 担体濃度依存性は、担体濃度の違いによる $^{188}\text{Re}\cdot\text{EDTMP}$ 錯体 (混合物) 中の成分分布の違いによって生じていると考えられる。

参考文献

- 1) K. Hashimoto, H. Matsuoka, M. Izumo, *J. Nucl. Radiochem. Sci.*, **2**, 5 (2001).
- 2) “がん治療医薬の開発を目指した放射性レニウムに関する研究・製造・標識化合物の合成とその体内動態-”，原研アイソトープ部 アイソトープ研究委員会アイソトープ製造・標識専門部会

- 放射性レニウムに関する研究会, JAERI-Research 98-015 (1998).
- 3) K. Hashimoto, *Appl. Radiat. Isot.* 51, 307 (1999).
 - 4) K. N. Kushita and J. Du, *Appl. Radiat. Isot.* 49, 1069 (1998).
 - 5) J. Kroesbergen, A. M. P. van Steijn, W. J. Gelsema, and C. L. de Ligny, *Int. J. Nucl. Med. Biol.* 12, 411 (1986).
 - 6) P. Somasundaran and Y. H. C. Wang, In: D. N. Misra, ed. *Adsorption on and Surface Chemistry of Hydroxyapatite*. New York, USA: Plenum Press, 129 (1984).
 - 7) H. Tanaka, Y. Nuno, S. Irie, and S. Shimomura, *Talanta* 39, 893 (1992).
 - 8) P. Ducheyne, C. S. Kim, and S. R. Pollack, *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 147 (1992).
 - 9) T. V. Vasudevan, P. Somasundaran, C. L. Howie-Meyers, D. L. Elliott, and K. P. Ananthapadmanabhan, *Langmuir* 10, 320 (1994).
 - 10) D. T. H. Wassell, R. C. Hall, and G. Embrey, *Biomaterials* 16, 697 (1995).
 - 11) M. Eisenhut, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 33, 99 (1982).
 - 12) E. Deutsch, K. Libson, J.-L. Vanderheyden, A. R. Ketring, and H. R. Maxon, *Nucl. Med. Biol.* 13, 465 (1986).
 - 13) R. C. Elder, J. Yuan, B. Helmer, D. Pipes, K. Deutsch, and E. Deutsch, *Inorg. Chem.* 36, 3055 (1997).
 - 14) S. Tanabe, J. P. Zodda, E. Deutsch, and W. R. Heineman, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* 34, 1577 (1983).
 - 15) M. V. Mikelson and T. C. Pinkerton, *Anal. Chem.* 58, 1007 (1986).
 - 16) J. P. Zodda, S. Tanabe, W. R. Heineman, and E. Deutsch, *Appl. Radiat. Isot.* 37, 345 (1986).
 - 17) G. J. de Groot, H. A. Das, and C. L. de Ligny, *Appl. Radiat. Isot.* 38, 611 (1987).
 - 18) K. Hashimoto, Abstract of Papers, The Second Japanese-Russian Seminar on Technetium, Shizuoka, Japan, Nov. 29-Dec. 2, 1999; paper 3006.

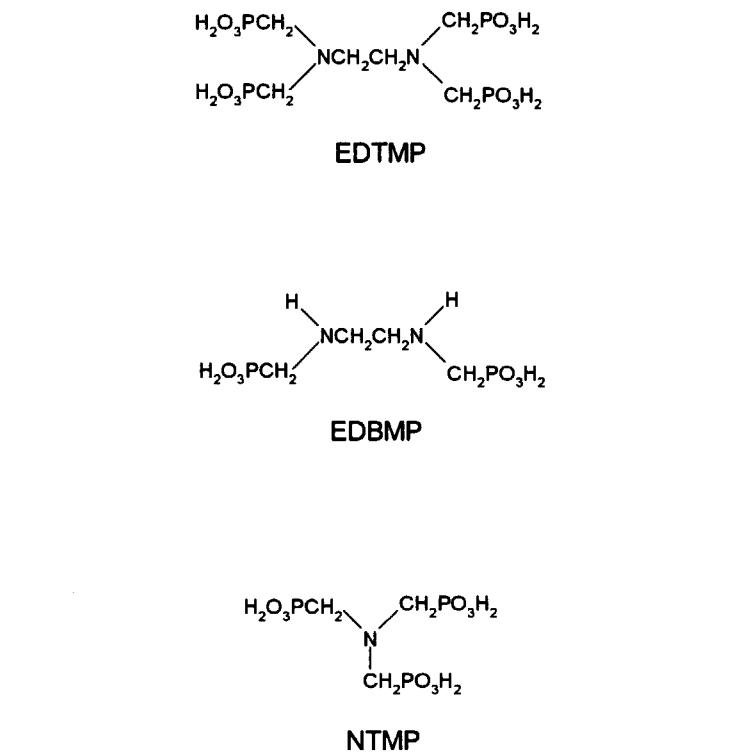


Fig. 3.5.3-1. Structures of the aminomethylenephosphonate ligands used in this study.

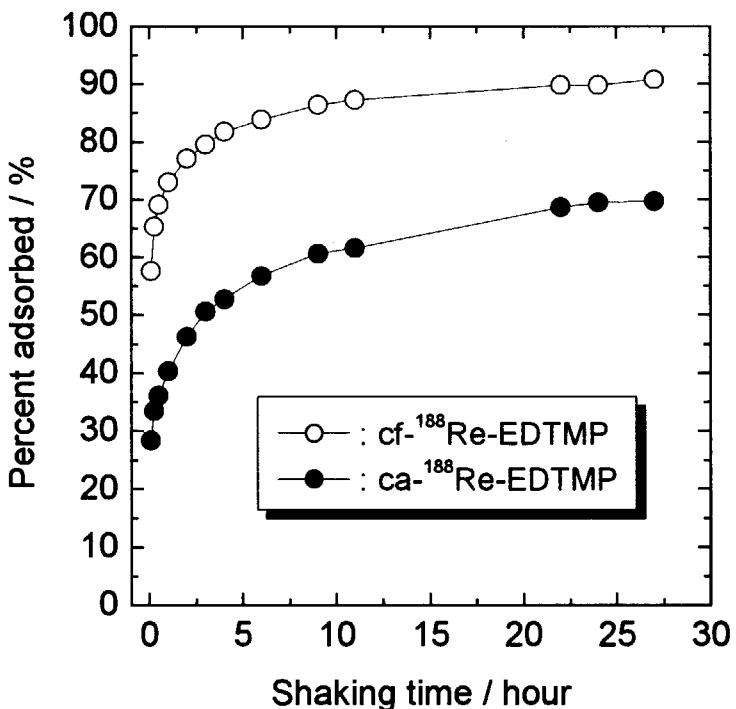


Fig. 3.5.3-2. Typical time variation in the adsorption of carrier-free (cf-) and carrier-added (ca-) ¹⁸⁸Re-EDTMP (pH 3.5, HAP 100 mg, I=1.0).

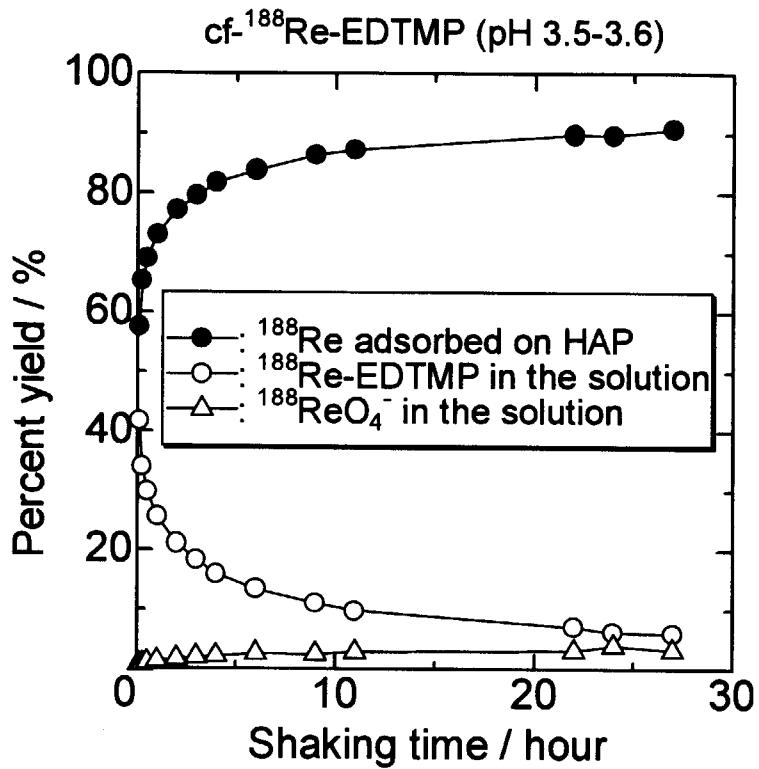


Fig. 3.5.3-3. Chemical species during the adsorption experiment using carrier-free ¹⁸⁸Re-EDTMP (pH 3.5-3.6, HAP 100 mg, I=1.0).

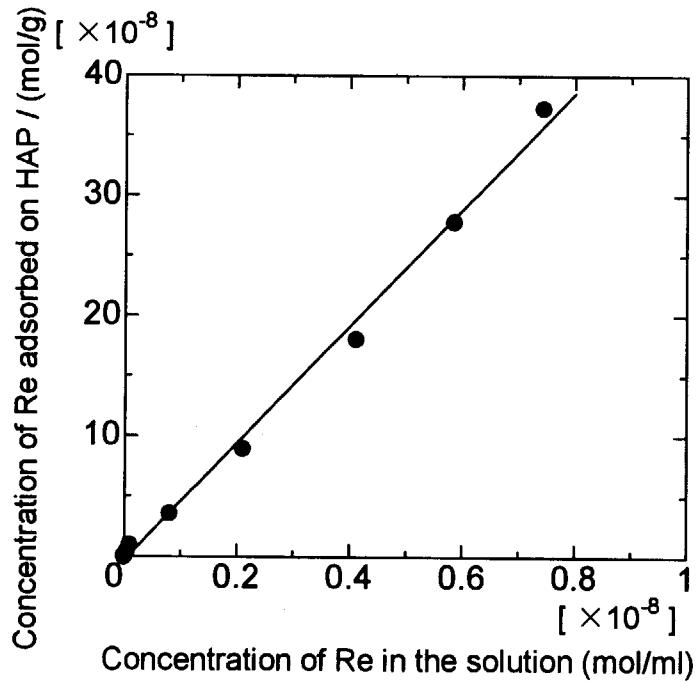


Fig. 3.5.3-4. Adsorption isotherm of ¹⁸⁸Re-EDTMP (Re final concentration: 1.36×10^{-11} mol/l (carrier-free; 92.5 kBq/ml) $\sim 2.85 \times 10^{-5}$ mol/l). Correlation coefficient R=0.997.

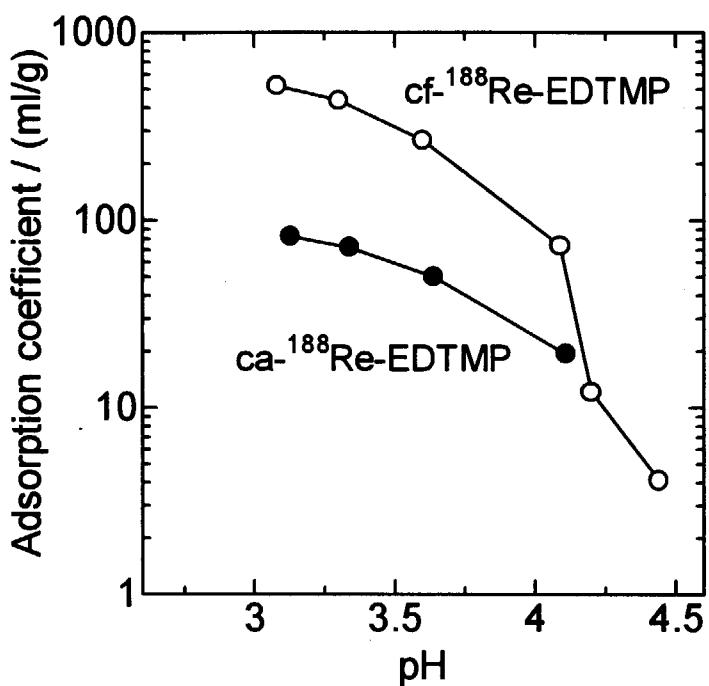


Fig. 3.5.3-5. Influence of pH on the adsorption coefficient of ^{188}Re -EDTMP
(HAP 100 mg, I=1.0, 24 h).

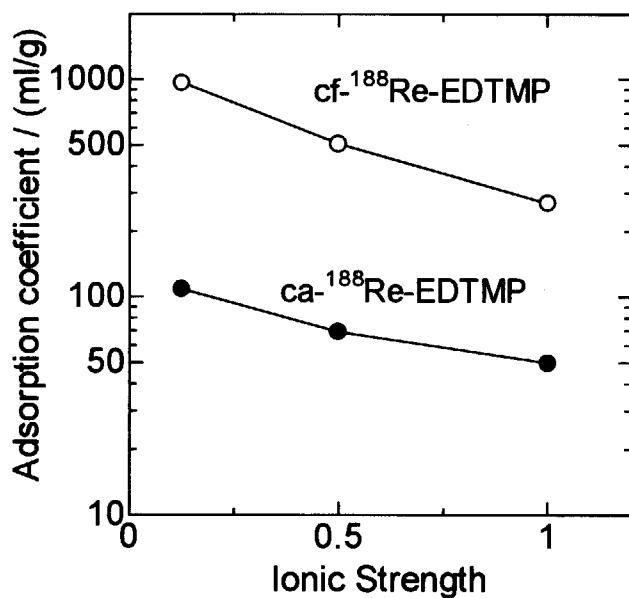


Fig. 3.5.3-6. Influence of ionic strength on the adsorption coefficient of ^{188}Re -EDTMP
(pH 3.6, HAP 100 mg, 24 h).

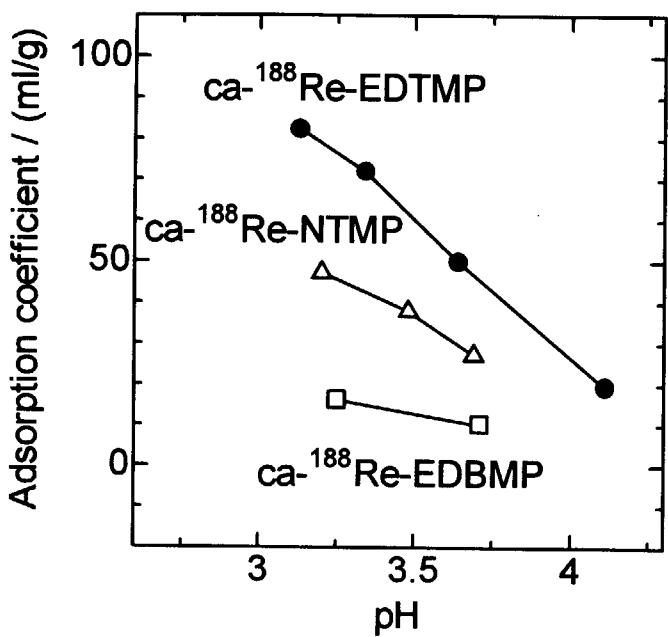


Fig. 3.5.3-7. Comparison of the adsorption coefficient of the carrier-added ($20 \mu\text{g Re ml}^{-1}$) ^{188}Re -amp complex (HAP 100 mg, I=1.0, 24 h).

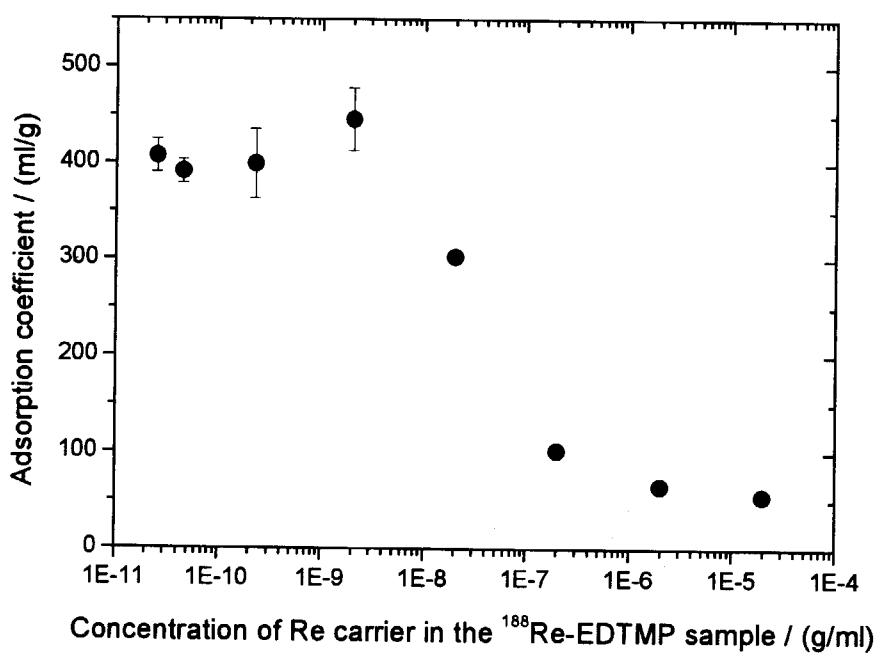


Fig. 3.5.3-8. Effect of the carrier concentration on the adsorption coefficient of ^{188}Re -EDTMP (HAP 100mg, pH 3.6, 24 h).

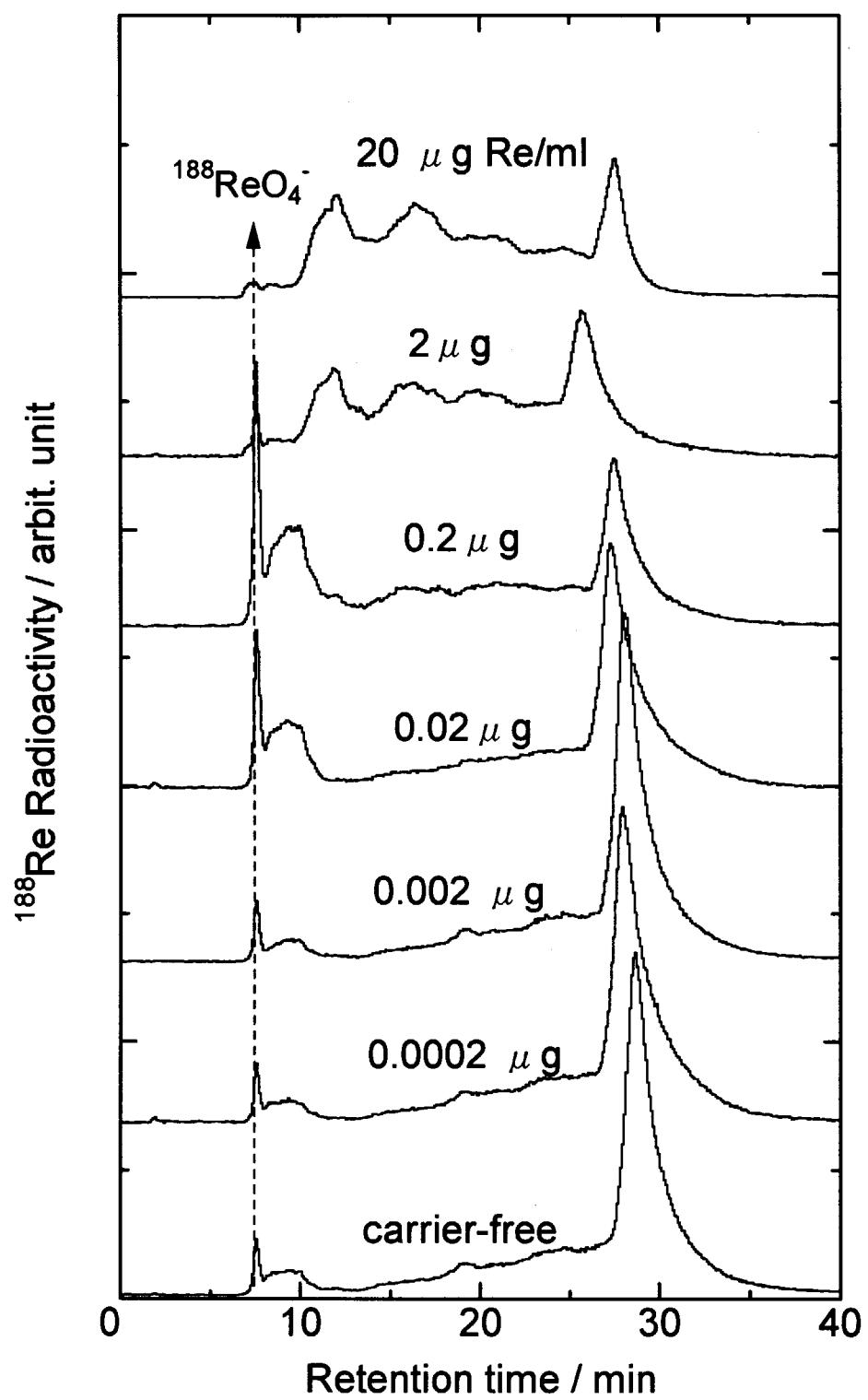


Fig. 3.5.3-9. Effect of the carrier concentration on the ion-paired reversed phase HPLC chromatogram of ^{188}Re -EDTMP.

4. 結 語

原研東海研研究所 研究炉部アイソトープ研究開発課及びアイソトープ専門部会放射性レニウムに関する研究グループでは、がんの治療のための医薬品の開発を目指した放射性レニウムに関する研究として、¹⁸⁶Re 及び ¹⁸⁸Re の製造・標識化合物の合成及びその体内動態の研究を進めてきた。平成9年度末には、その第1次報告として取り纏めた。今回、その後の成果を第2次報告として報告する。成果の要約は次の通りである。

原子炉を用いた ¹⁸⁶Re の製造に関して、製造法の改良を行った結果、製造収率の向上、製造時間の短縮及び製品 pH の再現性の向上等が得られた。加速器を用いた無担体 ¹⁸⁶Re の製造に関して、より多くの生成量が期待される ¹⁸⁶W(d,2n)¹⁸⁶Re 反応における励起関数を求め、生成量の評価を行った。また、¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re ジェネレータから得られる無担体 ¹⁸⁸Re の濃縮について、メチルエチルケトンを用いて検討した。さらに、高性能 Mo 吸着剤である PZC を利用した ¹⁸⁸W/¹⁸⁸Re ジェネレータの開発に関する基礎的検討を行い、各種性能を確認した。

レニウム標識化合物合成において、穏和で簡便な反応条件を見出すための基礎的検討を、人血清アルブミン-ジエチルトリアミン5酢酸、D-ペニシルアミン、メソ-2,3-ジメルカプトコハク酸、ヒドロキシメチレンジホスホン酸を用いて行った。

骨への集積性を損なうことなく血液からの速やかな放射能消失を示す ¹⁸⁶Re 標識骨疼痛緩和剤の開発を目的として、二官能性放射性薬剤の概念に基づき、骨に高い親和性を有するビスホスホネート分子内に、生体内で安定な ¹⁸⁶Re 単核錯体形成部位 (MAMA, MAG3) を導入した化合物の開発を行った。これまでの結果、ビスホスホネートの中心炭素に水酸基を有する化合物に、水溶性の高い ¹⁸⁶Re-MAG3 錯体を導入した ¹⁸⁶Re-MAG3-HBP は、骨への選択性的集積と速やかな血液クリアランスを示し、癌の骨転移の疼痛緩和薬剤としてより有用であることが認められた。

腎臓への集積を示さず、がん組織に長時間選択性に留まるがん治療用放射性レニウム標識低分子抗体やペプチドの開発を目指して、有機金属化合物である (Cyclopentadienyl) tricarbonylrhenium を母体構造とする放射性レニウム化合物を合成し、体内動態を調べた。その結果、投与初期から腎臓での放射能滞留を大きく低減できる可能性を示した。

ヒト大腸癌細胞の移植により作成した大腸癌肝転移モデルを用いて、¹⁸⁶Re 標識抗大腸癌抗体 (¹⁸⁶Re-A7) による放射免疫療法の有効性を調べた。その結果、¹⁸⁶Re-A7 は、効果的に転移腫瘍に集積し、転移腫瘍の増殖は未治療群と比較して著明に抑制された。したがって、微小残存腫瘍の存在する癌患者における補助療法としての ¹⁸⁶Re 標識抗体による放射免疫療法の可能性が示された。

¹⁸⁸Reを用いた研究では、放射性レニウムによる生理活性物質への標識化に有効と考えられる二官能性配位子であるMAG3及びMAMAの標識研究を行った結果、クエン酸をtransfer配位子として用いる合成法が有用であることが示された。また、¹⁸⁸Re標識アミノメチレンリン酸化合物の骨への集積の基礎的検討として、ヒドロキシアパタイトへの吸着挙動を詳細に調べた。その結果、吸着挙動に影響を与える因子 (pH, イオン強度等) を明らかにすると共に、アミノメチレンリン酸の違いや担体濃度の違いにより吸着率が異なることを明らかにした。

第1次報告では、放射性レニウムの基礎的な製造及び標識技術に関する成果が主であったが、今回は、より具体的な放射性レニウム薬剤の候補に関する研究成果や治療効果に関する研究成果も得られ、実用化へ一步近づいたと言える。もちろん、実用化までには、基礎的な検討に加え、臨床応用研究や薬事承認など多くの解決すべき課題があり、さらに時間と労力が必要であることも事実である。こうしたことを踏まえ、関係者一同、実用化に向けた努力を今後もさらに続けていく必要がある。

謝 辞

^{186}Re の運搬をお引き受けいただいた社団法人日本アイソトープ協会の諸氏、HMDPをご提供いただいた日本メジフィジックス株式会社の諸氏、モノクローナル抗体A7を提供していただいた京都府立医科大学 高橋俊雄前教授、山口俊晴先生に深謝いたします。また、放射性レニウムの原子炉照射でご協力いただいた研究炉部及び材料試験炉部、加速器照射では放射線高度利用センターの関係諸氏に深謝いたします。

This is a blank page.

国際単位系(SI)と換算表

表1 SI基本単位および補助単位

量	名称	記号
長さ	メートル	m
質量	キログラム	kg
時間	秒	s
電流	アンペア	A
熱力学温度	ケルビン	K
物質量	モル	mol
光度	カンデラ	cd
平面角	ラジアン	rad
立体角	ステラジアン	sr

表3 固有の名称をもつSI組立単位

量	名称	記号	他のSI単位による表現
周波数	ヘルツ	Hz	s ⁻¹
力	ニュートン	N	m·kg/s ²
圧力、応力	パスカル	Pa	N/m ²
エネルギー、仕事、熱量	ジュール	J	N·m
功率、放射束	ワット	W	J/s
電気量、電荷	クーロン	C	A·s
電位、電圧、起電力	ボルト	V	W/A
静電容量	ファラード	F	C/V
電気抵抗	オーム	Ω	V/A
コンダクタンス	ジemens	S	A/V
磁束	ウェーバ	Wb	V·s
磁束密度	テスラ	T	Wb/m ²
インダクタンス	ヘンリー	H	Wb/A
セルシウス温度	セルシウス度	°C	
光束度	ルーメン	lm	cd·sr
照度	ルクス	lx	lm/m ²
放射能	ベクレル	Bq	s ⁻¹
吸収線量	グレイ	Gy	J/kg
線量当量	シーベルト	Sv	J/kg

表2 SIと併用される単位

名称	記号
分、時、日	min, h, d
度、分、秒	°, ', "
リットル	L, l
トントン	t
電子ボルト	eV
原子質量単位	u

$$1 \text{ eV} = 1.60218 \times 10^{-19} \text{ J}$$

$$1 \text{ u} = 1.66054 \times 10^{-27} \text{ kg}$$

表5 SI接頭語

倍数	接頭語	記号
10 ¹⁸	エクサ	E
10 ¹⁵	ペタ	P
10 ¹²	テラ	T
10 ⁹	ギガ	G
10 ⁶	メガ	M
10 ³	キロ	k
10 ²	ヘクト	h
10 ¹	デカ	da
10 ⁻¹	デシ	d
10 ⁻²	センチ	c
10 ⁻³	ミリ	m
10 ⁻⁶	マイクロ	μ
10 ⁻⁹	ナノ	n
10 ⁻¹²	ピコ	p
10 ⁻¹⁵	フェムト	f
10 ⁻¹⁸	アト	a

表4 SIと共に暫定的に維持される単位

名称	記号
オングストローム	Å
バーン	b
バール	bar
ガル	Gal
キュリー	Ci
レントゲン	R
ラド	rad
レム	rem

$$1 \text{ Å} = 0.1 \text{ nm} = 10^{-10} \text{ m}$$

$$1 \text{ b} = 100 \text{ fm}^2 = 10^{-26} \text{ m}^2$$

$$1 \text{ bar} = 0.1 \text{ MPa} = 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ Gal} = 1 \text{ cm/s}^2 = 10^{-2} \text{ m/s}^2$$

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$$

$$1 \text{ R} = 2.58 \times 10^{-4} \text{ C/kg}$$

$$1 \text{ rad} = 1 \text{ cGy} = 10^{-2} \text{ Gy}$$

$$1 \text{ rem} = 1 \text{ cSv} = 10^{-2} \text{ Sv}$$

(注)

- 表1～5は「国際単位系」第5版、国際度量衡局1985年刊行による。ただし、1eVおよび1uの値はCODATAの1986年推奨値によった。
- 表4には海里、ノット、アール、ヘクタールも含まれているが日常の単位なのでここでは省略した。
- barは、JISでは流体の圧力を表わす場合に限り表2のカテゴリーに分類されている。
- EC開発理事会指令ではbar、barnおよび「血圧の単位」mmHgを表2のカテゴリーに入れている。

換算表

力	N(=10 ⁵ dyn)	kgf	lbf
1	0.101972	0.224809	
9.80665	1	2.20462	
4.44822	0.453592	1	

$$\text{粘度 } 1 \text{ Pa}\cdot\text{s}(N\cdot\text{s}/\text{m}^2) = 10 \text{ P(ボアズ)}(\text{g}/(\text{cm}\cdot\text{s}))$$

$$\text{動粘度 } 1 \text{ m}^2/\text{s} = 10^4 \text{ St(ストークス)}(\text{cm}^2/\text{s})$$

圧	MPa(=10 bar)	kgf/cm ²	atm	mmHg(Torr)	lbf/in ² (psi)
力	1	10.1972	9.86923	7.50062 × 10 ³	145.038
0.0980665	0.0980665	1	0.967841	735.559	14.2233
0.101325	0.101325	1.03323	1	760	14.6959
1.33322 × 10 ⁻⁴	1.33322 × 10 ⁻⁴	1.35951 × 10 ⁻³	1.31579 × 10 ⁻³	1	1.93368 × 10 ⁻²
6.89476 × 10 ⁻⁵	6.89476 × 10 ⁻⁵	7.03070 × 10 ⁻²	6.80460 × 10 ⁻²	51.7149	1

エネルギー・仕事・熱量	J(=10 ⁷ erg)	kgf·m	kW·h	cal(計量法)	Btu	ft · lbf	eV	1 cal = 4.18605 J(計量法)
1	0.101972	2.77778 × 10 ⁻⁷	0.238889	9.47813 × 10 ⁻⁴	0.737562	6.24150 × 10 ¹⁸	= 4.184 J(熱化学)	
9.80665	1	2.72407 × 10 ⁻⁶	2.34270	9.29487 × 10 ⁻³	7.23301	6.12082 × 10 ¹⁹	= 4.1855 J(15 °C)	
3.6 × 10 ⁶	3.67098 × 10 ⁵	1	8.59999 × 10 ⁵	3412.13	2.65522 × 10 ⁶	2.24694 × 10 ²⁵	= 4.1868 J(国際蒸気表)	
4.18605	0.426858	1.16279 × 10 ⁻⁶	1	3.96759 × 10 ⁻³	3.08747	2.61272 × 10 ¹⁹	仕事率 1 PS(仮馬力)	
1055.06	107.586	2.93072 × 10 ⁻⁴	252.042	1	778.172	6.58515 × 10 ²¹	= 75 kgf·m/s	
1.35582	0.138255	3.76616 × 10 ⁻⁷	0.323890	1.28506 × 10 ⁻³	1	8.46233 × 10 ¹⁸	= 735.499 W	
1.60218 × 10 ⁻¹⁹	1.63377 × 10 ⁻²⁰	4.45050 × 10 ⁻²⁶	3.82743 × 10 ⁻²⁰	1.51857 × 10 ⁻²²	1.18171 × 10 ⁻¹⁹	1		

放射能	Bq	Ci	吸収線量	Gy	rad
1	2.70270 × 10 ⁻¹¹	1	1	100	
3.7 × 10 ¹⁰	1		0.01	1	

照射線量	C/kg	R
1	3876	
2.58 × 10 ⁻⁴	1	

線量当量	Sv	rem
1	100	
0.01	1	

(86年12月26日現在)

がん治療医薬の開発を目指した放射性レーコムに関する研究(第2次報告)——製造・標識化合物の合成とその体内動態——

R100

古紙配合率100%
白色度70%再生紙を使用しています。