

---

---

# 放射性核種標識ポルフィリン誘導体の悪性腫瘍集積機序 の解明に関する研究

(課題番号：13670906)

---

---

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金（基礎研究（C）（2））研究成果報告書  
平成15年5月

研究代表者

秀毛範至

（旭川医科大学医学部放射線医学講座）

放射性核種標識ポルフィリン誘導体の悪性腫瘍集積機序  
の解明に関する研究

(課題番号：13670906)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書

平成15年5月

研究代表者

秀毛範至

(旭川医科大学医学部放射線医学講座)

はしがき

## 研究組織

研究代表者 秀毛 範至 (旭川医科大学医学部放射線医学講座)  
研究分担者 大崎 能伸 (旭川医科大学医学部第一内科学講座)  
研究分担者 油野 民雄 (旭川医科大学医学部放射線医学講座)

## 交付決定額 (配分額)

(単位 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	1,000	0	1,000
平成14年度	1,000	0	1,000
総計	1,000	0	1,000

## 研究発表

秀毛範至、他. Tc-99m 標識ポルフィリン誘導体のヒトにおける安全性、薬物動態の検討.  
核医学 39(2), P182, 2002 (第50回日本核医学会北日本地方会抄録)

## 研究成果による工業所有権の出願、取得状況

該当なし

## 研究成果

### 1. はじめに

ポルフィリン誘導体は、古くからその腫瘍親和性ならびに光毒性が注目されており、呼吸器、消化器、泌尿器、婦人科領域における表在癌の診断、治療に用いられてきた。最近では、その新生血管親和性に着目し、眼科領域においても加齢性黄斑症などの血管病変の治療への応用が期待されている。このようにポルフィリン誘導体は、すでに、臨床応用がかなり進んでいる薬剤であるが、その腫瘍親和性を生かした腫瘍イメージング製剤としての臨床応用は、いまだ確立されるにいたっていない。ATN-10は、金属放射性同位元素で標識可能な腫瘍イメージング用ポルフィリン誘導体であり、In-111やTc-99mで標識可能である。In-111標識物、Tc-99m標識物のいずれも腫瘍イメージング製剤としての有用性が認められている。すなわち、投与後数時間で良好な腫瘍集積が得られ、腫瘍/正常臓器集積比も従来のGa-67やTl-201と同等以上の結果が得られている。本薬剤は、臨床上使用しやすいTc-99m製剤であること、投与後数時間でイメージングに十分な腫瘍集積性を示すこと、また毒性に関しても光毒性がないこと、ラット、イヌを用いた毒性試験（投与量：100mg/kg）においても有意な毒性は認められていないことから、臨床に最も近い標識ポルフィリン誘導体として期待される。このTc-99m ATN-10を臨床応用し、臨床腫瘍イメージング用製剤として確立するためには、基礎データとして、ヒトにおける担体の同定とこれに関わる腫瘍集積機序の解明、ヒトにおける薬物動態の把握、安全性の確認が不可欠であり、今回、これらの点について検討を行った。

### 2. 目的

ポルフィリン誘導体の腫瘍集積機序としては、リポ蛋白、ヘモペキシンなどの血漿蛋白を担体とする機序が報告されているが、ヒトにおける腫瘍集積機序は未だはっきりとは、解明されてはいない。本研究の目的は、放射性核種標識ポルフィリン誘導体を用いてヒトにおける担体を検討するとともに、この担体と腫瘍集積性との関連、ヒトにおける薬物動態を解明することを目的とする。

### 3. 対象と方法

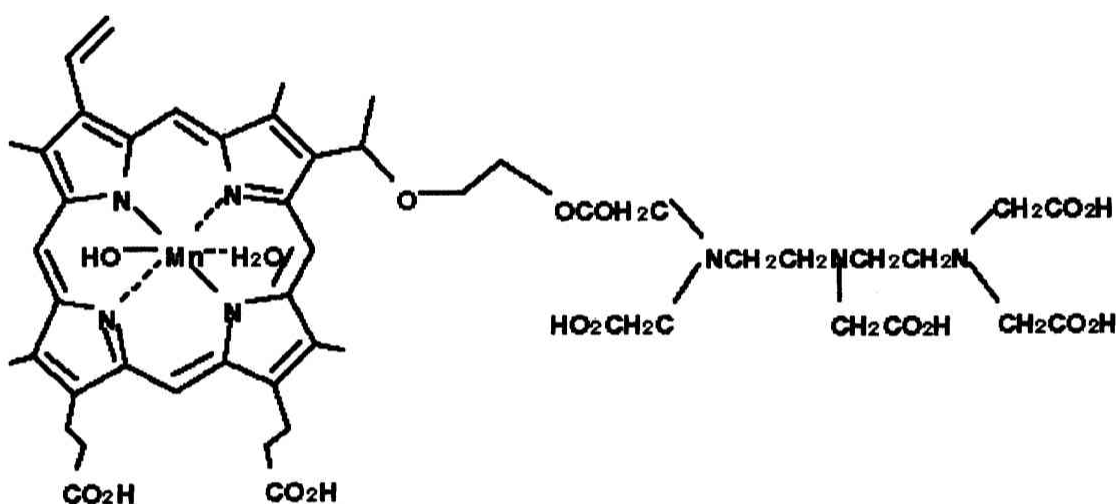
#### 標識ポルフィリン誘導体

使用したポルフィリン誘導体は、Tc-99m や In-111 などの放射性金属で標識可能な DTPA ester of

#### 2-[1-(2-hydroxy-ethoxy)ethyl]-4-vinyl-deuteroporphyrin

(IX) Mn complex (ATN-10, MW: 1088)である。ポルフィリン環の中にマンガンを有するマンガポルフィリン誘導体であり、放射性金属を結合するためのキレートである DTPA をエステル結合によりポルフィリン環に結合

【図1】



する側鎖構造としてもつ (図1)。この ATN-10 (53.9mg) を凍結乾燥したものと塩化スズ (70 $\mu$ g) を真空のガラスバイアルに封入して標識用キットとして調整したもの (光ケミカル、岡山) を、用時、酢酸緩衝液 (PH5.3) で溶解し、これに Tc-99m を加えることにより Tc-99m 標識 ATN-10 を得た。

#### 薄層クロマトグラフィ (TLC)

Tc-99m 標識 ATN-10 の放射化学純度を検討するために薄層クロマトグラフィを行った。シリカゲル 60W プレートと展開溶媒に生食 : 酢酸 = 100 : 1 の溶液を用いる系で、Tc-99m 標識 ATN-10 と解離した Tc-99m-DTPA やフリーの Tc-99m を分離した (ATN-10 とコロイドは原点に残留、

Tc-99m-DTPA やフリーの Tc-99m は移動)。また、セルロースプレートと展開溶媒にメチルアルコール:酢酸:5M 尿素=1:1:1 の溶液を用いる系で、Tc-99m コロイドと Tc-99m 標識 ATN-10 を分離した。展開後、プレートを 10 等分に切離し、それぞれの断片の放射能をウェルカウンター (ARC-380, アロカ社)にて測定した。

#### 高速液体クロマトグラフィ (HPLC)

血漿成分と Tc-99m 標識 ATN-10 との結合を検討するため、ゲルろ過高速液体クロマトグラフィを行った。使用した HPLC システムは東ソー社製、送液ポンプ (CCPM)、紫外可視検出器 (UV-8010)、システムコントローラ (PX8010) である。ゲルろ過 HPLC 用カラムとして、TSK3000SW (東洋ソーダ、東京)を用い、溶離液として、0.05M 磷酸緩衝液 (PH 7, 0.05%NaN<sub>3</sub>, 0.3M NaCl)を用いた。血漿蛋白、ATN-10 の検出はそれぞれ波長 280 nm、380nm の吸光度を測定することにより行い、送液速度は 1ml/min であった。また、フラクションコレクターを用いて、溶出液を分離し、ウェルカウンターにて放射能を測定し、それぞれのピークに含まれる放射能の分画を検討した。

#### In Vitro 細胞結合試験

Tc-99m 標識 ATN-10 と腫瘍細胞の結合に及ぼす血漿成分の影響、代謝阻害薬や温度の影響を検討するために、In vitro で腫瘍細胞と Tc-99m 標識 ATN-10 の結合を検討した。PBS(1% BSA)125  $\mu$ l で一定濃度(1-2 x 10<sup>6</sup>/125  $\mu$ l)に調整したマウス継代白血病細胞(P388)浮遊液中に種々の濃度 (2 - 140 p mole/75  $\mu$ l)に調整した Tc-99m 標識 ATN-10 を加え、1 定時間 (1 - 6 時間) incubation 後、3 ml の PBS(1%BSA)で洗浄後、遠心し、細胞結合 Tc-99m 標識 ATN-10 の放射能をウェルカウンターにて測定した。この系を用いて、代謝阻害剤や血漿成分を加えた場合の影響、incubation 温度の影響を検討した。また、Scatchard モデルを用いて (ATN10 濃度 : 9-140 p mole/75  $\mu$ l)、腫瘍細胞と ATN-10 の親和性、細胞 1 個あたりに結合する ATN-10 の数を推定した。

#### ガンマカメライメージング

ヒトでの体内動態を検討すべく、正常ボランティアに対して、Tc-99m 標識 ATN-10 を投与後、経時的に全身像を撮像した。用いたデジタルガンマカメラシステムは、RC-135E(日立メディコ、千葉)である。低エネルギー高

分解能コリメータを使用し、エネルギーピークは 140keV、ウィンドウ幅 10%、スキャン速度 20cm/min でデータ収集を行った。得られた全身前後像上で、主要臓器に関心領域を設定し、そのカウントを測定した。臓器カウントと全身カウントの相乗平均から、各臓器の放射能を% injected dose として求め、経時的な変化を検討した。

### 血漿成分中の Tc-99m 標識 ATN-10 担体の検討

まず、PBS 中と血漿中での Tc-99m 標識 ATN-10 の放射化学純度の経時的変化を TLC で検討した。次に Tc-99m 標識 ATN-10 が血漿中のどの成分と結合しているのかを検討するため、In vitro で血液中における Tc-99m 標識 ATN-10 の局在を検討した。血漿中と全血液中の放射能を測定し、以下の式により血球中に存在する放射能を計算した。

$$C_{bc} = C_p \frac{H-1+(C_b/C_p)}{H}$$

$C_{bc}$ 、 $C_p$ 、 $C_b$ 、 $H$  は、それぞれ血球中の放射能濃度、血漿中の放射能濃度、血液中の放射能濃度、ヘマトクリット値を表す。

次に PBS 希釈 20%ヒト血漿に Tc-99m ATN-10 を加えて 50  $\mu$ g/ml に調整したものを HPLC にかけて、フラクションコレクターにて溶出液を分離し(40フラクション/30分)、各フラクションを個別の試験管にとり、それぞれのフラクションの放射能を測定することにより、血漿成分のピークと放射能のピークとの関連を調べ、どの血漿成分のピークに一致して ATN-10 が溶出されるかを検討した。同様の検討は、Tc-99m 標識 ATN-10 を静注したヒトの血漿についても行った。

### ATN-10 の腫瘍細胞結合に及ぼす血漿成分および細胞代謝の影響

血漿成分と ATN-10 との結合が腫瘍細胞と ATN-10 との結合に及ぼす影響を In vitro 細胞結合試験により検討した。また、腫瘍細胞と ATN-10 とのみかけの親和性、腫瘍細胞 1 個あたりに結合しうる最大数を Scatchard model を用いて検討した。同時に ATN-10 と腫瘍細胞の代謝との関連を検討すべく、代謝阻害剤として呼吸を阻害する  $\text{NaN}_3$  (10mM)、細胞内への endocytosis を阻害する monensin (0.1mM) を細胞浮遊液中に加えて ATN-10 と腫瘍細胞の結合に及ぼす影響について検討した。また、Incubation 温度(室温と 5 度)が ATN-10 の腫瘍細胞結合に及ぼす影響を検討した。

## In vivo における Tc-99m ATN10 の体内分布

健康成人ボランティア 3 名を対象とした。無菌的に製造された純度 99% 以上の ATN-10 (核酸、発熱物質の混入 (-)) を酢酸緩衝液中に溶解後、凍結乾燥し無菌ヴァイアル中に封入した標識用キット (光ケミカル、岡山) に、Tc-99m generator (Ultra TecneCow, 第一ラジオアイソトープ研究所、東京) より溶出した Tc-99m pertechnetate を加えて Tc-99m ATN-10 を用時調整した。

各対象例につき、投与量を変えて 2 回の検査を行った。Tc-99m ATN-10 の投与量は、0.1mg/kg, 0.5mg/kg の 2 dose とし、順次 dose を上げていき、検査と検査の間隔は、1 週間以上あけた。投与放射エネルギーは、740 MBq とした。各回、各投与量に調整した Tc-99m ATN-10 を 10ml 生食中に希釈混和し 5 分かけて静注した。静注終了直後、30 分、1、3、6、24 時間後に全身像をガンマカメラで撮像し、体内分布を検討した。投与直後から、経時的に採血、蓄尿を行い、血液中の放射能、尿中排泄放射能の測定を行い、画像データと合わせて、薬物動態を検討した。各検査施行前後 (施行前日、施行翌日) に、採血、採尿を行い、抹消血液像、一般生化学試験 (GOT, GPT,  $\gamma$  GPT, LDH, Cr, BUN, CPK, Bil) により、毒性のチェックを行った。また検査施行時には、脈拍、血圧、呼吸数のモニタリングを経時的に行った。

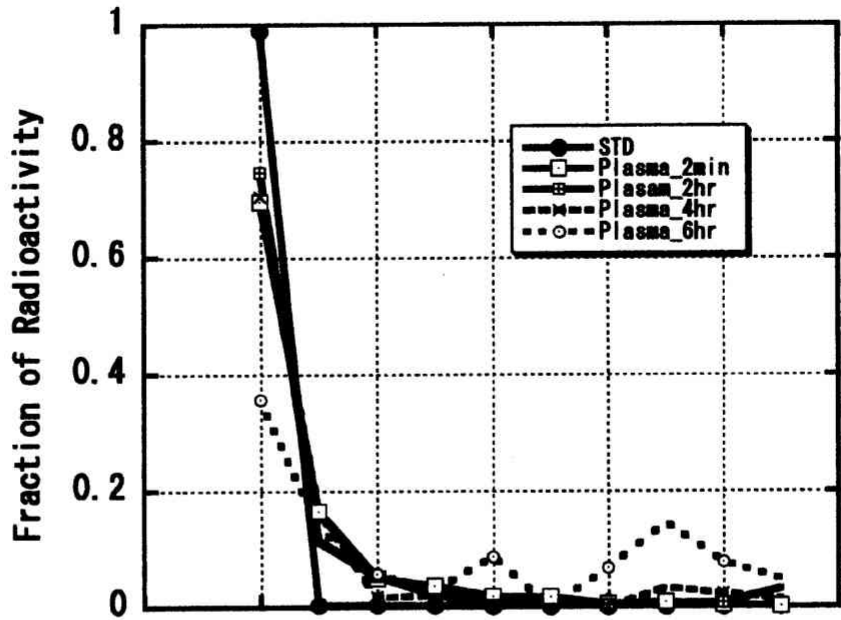
## 結果

### 血漿成分中の Tc-99m 標識 ATN-10 担体の検討

Tc-99m 標識 ATN-10 の PBS 中での放射化学純度をシリカゲル 60W および、セルロースプレートを用いた TLC で検討した結果、コロイド形成、フリーの Tc-99m や Tc-99m DTPA は、標識後ほとんど認められず放射化学純度は 95% 以上であり、標識後 6 時間まで安定であった。しかし、血漿中では不安定で、経時的に放射化学純度は低下していった。血漿中での Tc-99m 標識 ATN-10 の放射化学純度の経時変化を TLC (シリカゲル 60W プレート使用) で検討した結果を図 2 に示す。標識直後 (図中の STD) では、ほぼ 100% が Tc-99m 標識 ATN-10 であったが、血漿中 6 時間 incubation 後では、Tc-99m 標識 ATN-10 の分画は、全放射能の約 40% 程度にまで低下し、逆に Tc-99m DTPA やフリーの Tc-99m の分画が増加した。



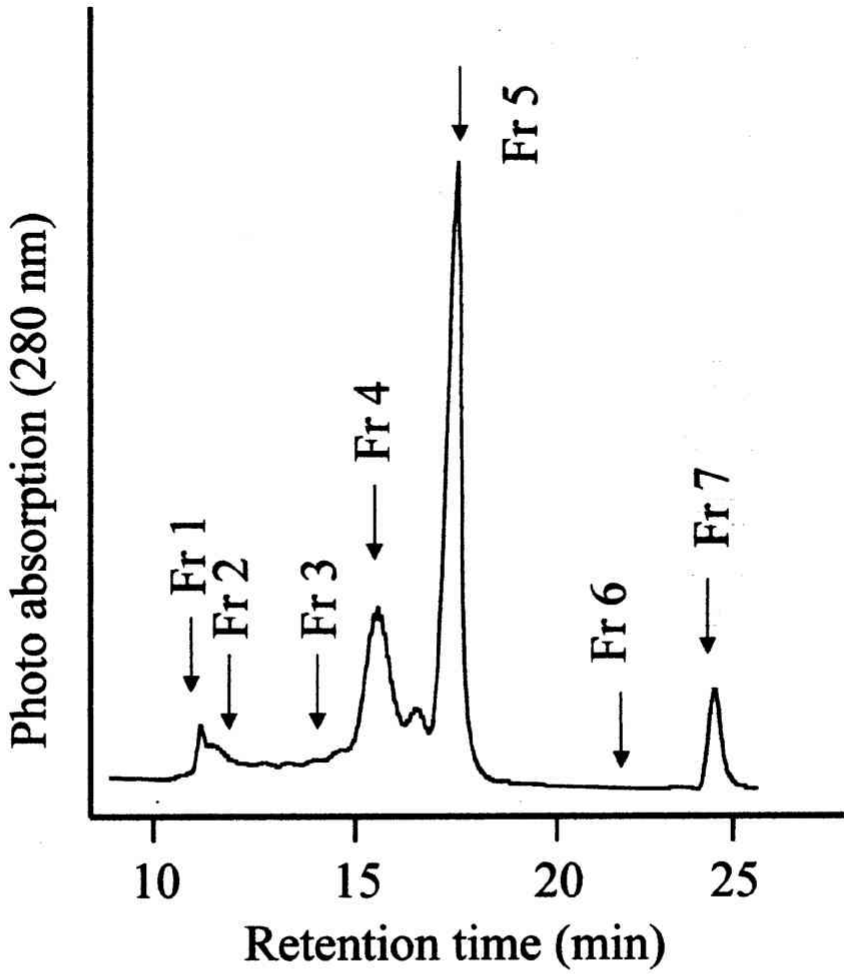
【 図 2 】



次に、PBS 希釈 20%ヒト血漿を用いて  $50 \mu\text{g/ml}$  に調整した ATN-10 のゲル濾過 HPLC による各血漿成分のピーク(波長 280nm)と ATN-10(波長 380nm) のピークの位置を図3に示す。血漿蛋白は 5 分画 (Fr 1:  $\beta$  リポ蛋白、マクログロブリン Fr 2: ハプトグロビン、Fr 3:  $\alpha$  1 リポ蛋白、ハプトグロビン、Fr 4: 免疫グロブリン G, Fr 5: アルブミン) に分けられた。Fr 6 は、380 nm の吸光度で認められた ATN-10 の溶出ピークの位置であり、Fr 7 は、DTPA の溶出ピークの位置である。

ゲル濾過カラムにかけた放射能の回収率は 80%であった。ATN10 を単独でカラムにかけた場合、単一のピーク (Fr 6) に溶出されたが、血漿中で 4 時間 incubation 後にカラムにかけた場合、回収された放射能の 55%は DTPA のピークに存在した。ATN-10 と考えられる残りの放射能 (45%) のうち、21%は ATN-10 のピークに溶出されたが、24%は、蛋白のピークに一致して溶出され、それぞれの分画 (Fr 1-5) の放射能の割合は、2.7、3.2、3.2、4.1、10.8%であった (表1)。  $\text{Tc-99m}$  標識 ATN-10 を静注したヒトの血漿についても同様の検討を行ったが、血漿蛋白のピークと各分画の放射能の関係は In vitro と同様の結果を示した。

【 図 3 】

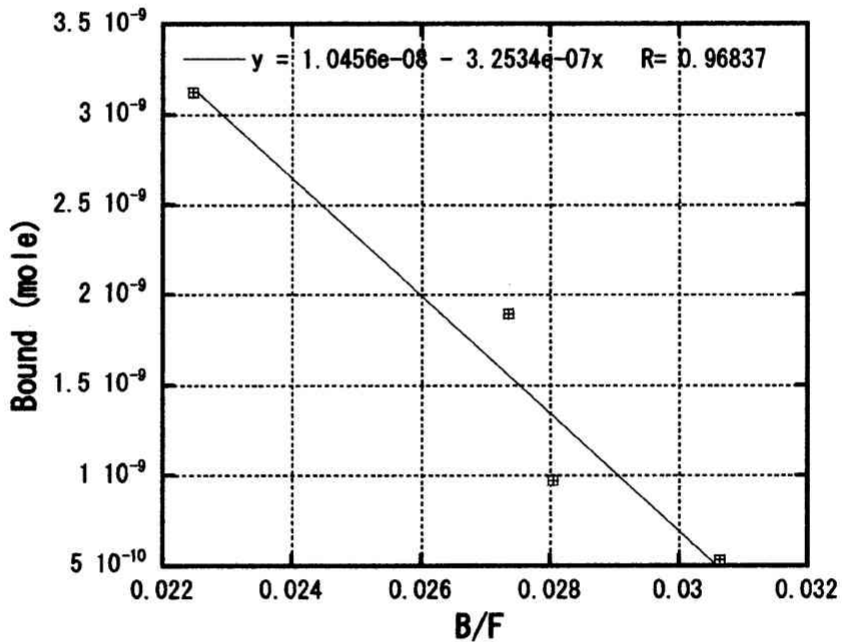


【 表 1 】

分画	分画の構成成分	溶出放射能(%)
Fr 1	$\beta$ リボ蛋白、マクログロブリン	2.7
Fr 2	Fr 2: ハプトグロビン	3.2
Fr 3	$\alpha$ 1リボ蛋白、ハプトグロビン	3.2
Fr 4	免疫グロブリン G	4.1
Fr 5	アルブミン	10.8
Fr 6	フリーの ATN10	21
Fr 7	DTPA	55

In vitro での ATN-10 と P388 の結合のみかけの親和性と最大結合数を推定するために行った Scatchard モデルによる検討の結果、親和性( $K_a$ )は、 $6.2 \times 10^2$ であり、この値は、ポルフィリン誘導体とアルブミン、トランスフェリン、LDL リポ蛋白などの血漿成分との親和性と同じレベルであった。また、P388、1細胞あたりに結合する最大結合 ATN-10 分子数は、 $3.1 \times 10^9$ であった。Scatchard プロットを図4に示す。

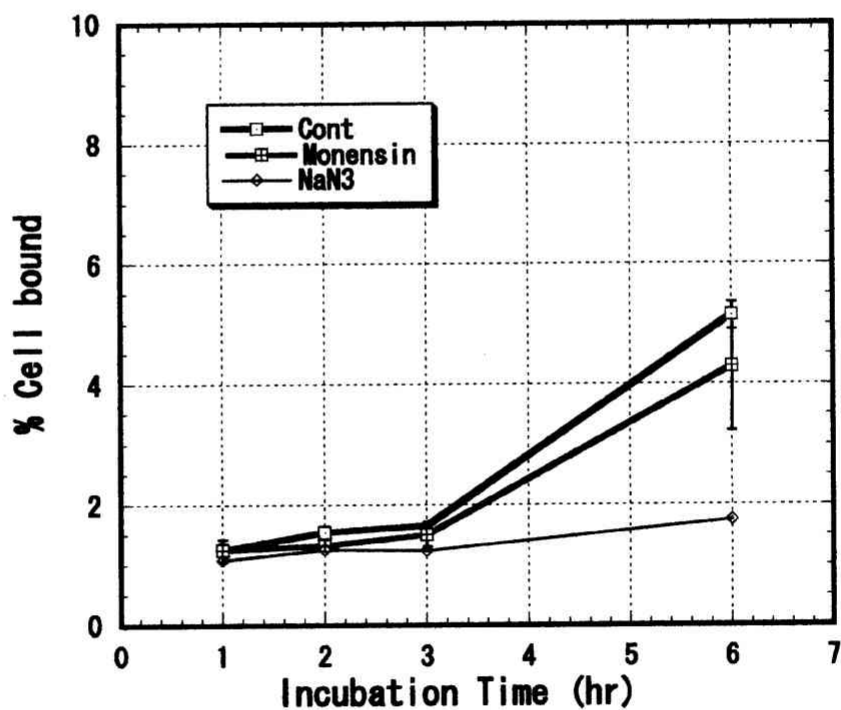
【 図 4 】



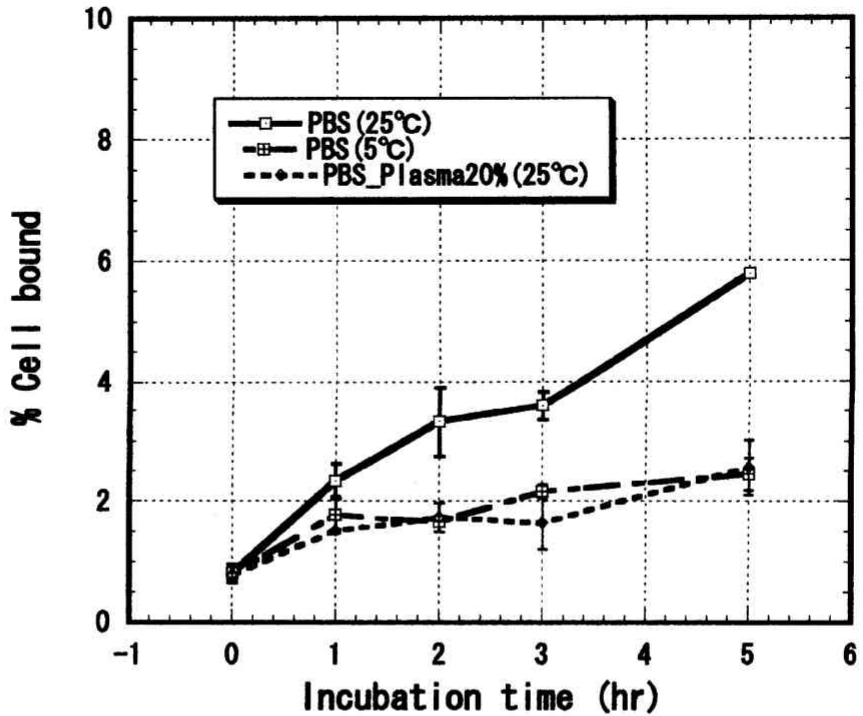
in vitro での腫瘍の代謝活性の変化とポルフィリン誘導体の腫瘍細胞への取り込みとの関連について検討するために、細胞内への endocytosis を阻害する monensin、呼吸を阻害する sodium azide ( $\text{NaN}_3$ ) をそれぞれ 0.1mM, 10mM の濃度となるように細胞浮遊液中に加え、コントロールに比して、結合阻害が認められるか否かを検討した結合、ATN-10 と P388 の結合は、monensin,  $\text{NaN}_3$  で、それぞれコントロールの 84%, 37% に抑制された(図5)。incubation 温度との関係では、室温 (25 度) における Incubation と比して、5 度では腫瘍細胞との結合は室温の約 50% に抑制された。また、細胞浮

遊液中 (PBS) にヒト血漿 (20%) を加えると、腫瘍細胞と Tc-99m 標識 ATN-10 との結合が、血漿を加えない場合の約 50% に抑制された (図 6)。また、この阻害は、結合実験に用いた標識 ATN-10 (2 p mole) の約 300 倍量の大量の非放射性 ATN-10 (585 p mole) を加えると認められなかった。

【 図 5 】



【 図 6 】



#### In vivo における Tc-99m ATN10 の体内分布

健康成人ボランティア 3 名を対象として、Tc-99m ATN-10 を各 2 回づつ、投与量を変えて検査を施行したが、いずれの場合も脈拍、血圧、呼吸数などの他覚的理学所見には、著変は認められなかった。自覚症状として、静注時、一過性の金属臭の訴えが 2 例に認められたが、いずれの例においても 5 分以内に消失した。抹消血液像、一般生化学試験 (GOT, GPT,  $\gamma$  GPT, LDH, Cr, BUN, CPK, Bil)、尿検査上は、いずれにおいても著変認められず、ATN-10 に起因すると考えられる異常変動は認められなかった。

代表例として、1 例における 0.1mg 投与、0.5mg 投与時の経時的ガンマカメライメージングの結果を図 7 に示す。

【 図 7 】

ATN-10: 0.1mg/kg wt.



5min

1 hr

3 hr

6 hr

24 hr

N.S.

ATN-10: 0.5mg/kg wt.



5min

1 hr

3 hr

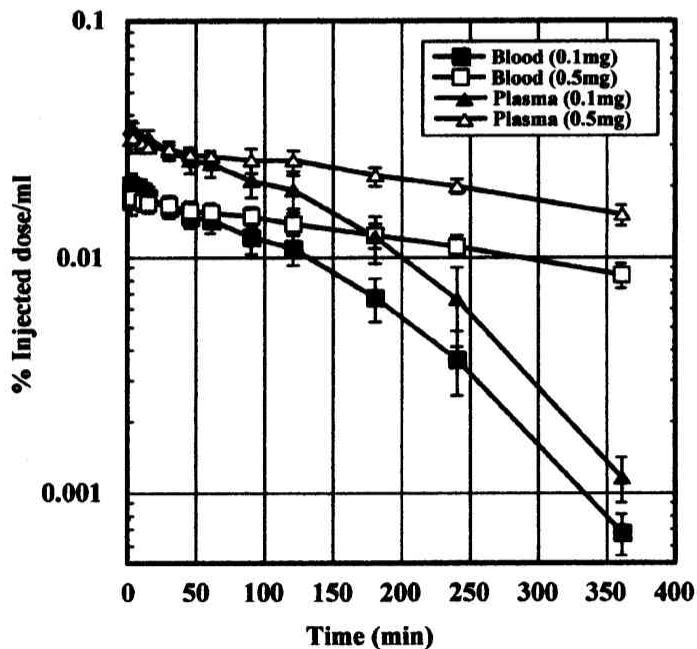
6 hr

24 hr

N.S.

ATN-10 は、投与後初期には、血液プールに主に分布し、経時的に血液中から消失していく様子がわかる。主な分布臓器は、肝、骨髄、腎、膀胱、腸管であった。0.1mg と 0.5mg 投与量のイメージを比較すると、0.1 mg では、投与後6時間では、血液プールの描出が認められないが、0.5mg では、6時間においても明瞭な血液プールの描出が認められ、血液中からの消失が遅延していることがうかがわれる。3例の経時的採血から計算した血液及び血漿の時間-放射能曲線を図8に示し、血漿および尿の TLC の結果から計算された血漿中放射能に占める親化合物である Tc-99mATN-10 の割合の経時的変化を表2に示す。血漿と血液の変化は、0.1mg, 0.5mg ともに、ほぼ平行しているが、血液中からの消失は、0.5mg 投与では、0.1mg 投与に比し、大きく遅延していることが確認できる。血漿中の放射能に占める Tc-99mATN-10 の割合は経時的に減少し、代謝物の割合が増加していくが、投与量による差は認められなかった。尿中の放射能には、ほとんど Tc-99m ATN-10 は含まれず、そのほとんどが代謝物であった。全身像から計算された臓器の時間-放射能曲線を図9に示す。

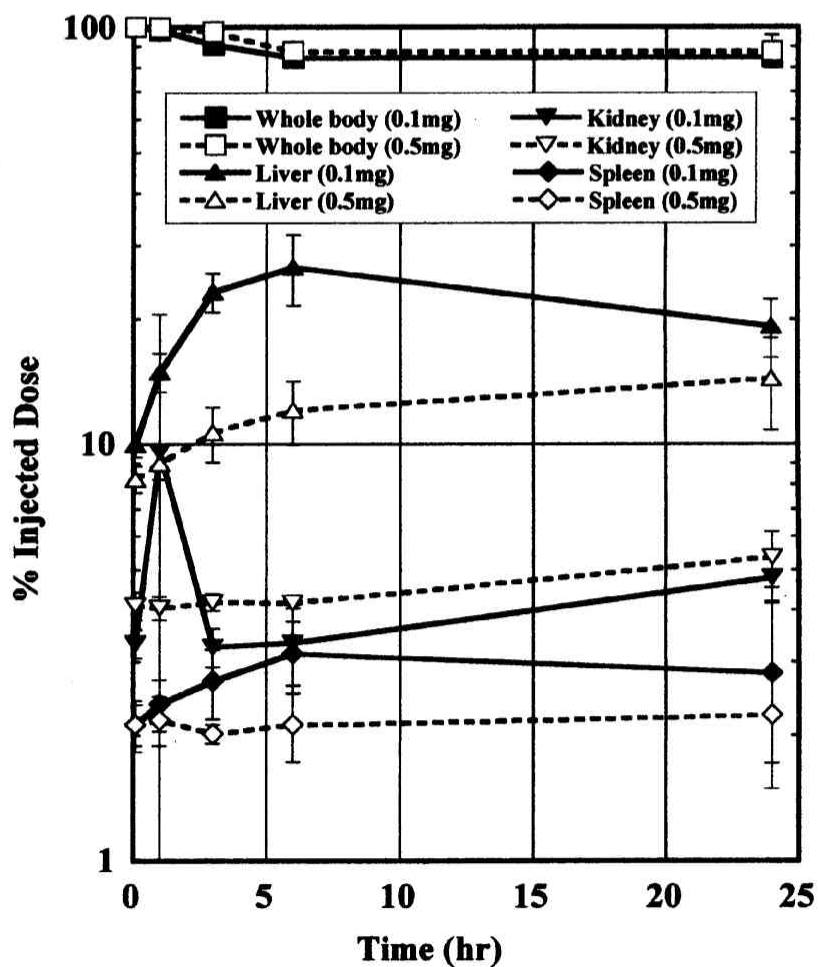
【 図8 】



【表2】

	0.1 mg/kg	0.5mg/kg
Injectate	98.41 ± 0.45	98.63 ± 0.04
Plasma (10 min)	68.70 ± 4.96	73.87 ± 3.52
Plasma (2 hr)	74.11 ± 2.59	76.16 ± 5.96
Plasma (4 hr)	64.51 ± 14.61	62.50 ± 8.39
Urine	6.61 ± 5.12	4.57 ± 1.86

【図9】





全身残留率、腎集積においては、0.1mg と 0.5mg 投与量で差が認められなかったが、肝、脾の集積は、0.5mg では低下した。投与後6時間までの尿中排泄率においては、投与量による差は認められず約10%であった。

## まとめ

ヒト血液における Tc-99m-DTPA-ポルフィリン誘導体(ATN-10)の局在を検討した結果、血球への移行率は6%程度で、残りの94%は血漿中に存在した。次に、ゲル濾過 HPLC カラムを用いて、血漿放射能の溶出分画を検討した。血漿蛋白は5分画(1:  $\beta$ リポ蛋白、マクログロブリン 2: ハプトグロビン、3:  $\alpha$ 1リポ蛋白、ハプトグロビン、4: 免疫グロブリン G, 5: アルブミン)に分けられ、回収された放射能の55%は DTPA のピークに存在した。ATN-10 と考えられる残りの放射能のうち、47%は ATN-10 のピークに溶出されたが、53%は、蛋白のピークに一致して溶出され、それぞれの分画の放射能の割合は、6、7、7、9、24%であった。以上の結果より、ATN-10 は、血液中には、種々の血漿成分と結合しており、ある特定の成分との結合は認められなかった。また、血液中には、おそらくエステラーゼによる DTPA とポルフィリン環との間のエステル結合の分解を受け、容易に Tc-99m DTPA の解離を生じるものと推察される。In vitro で ATN-10 の腫瘍細胞親和性を P388 白血病細胞株を用いて検討したが、P388 と ATN-10 との親和性は、平衡定数( $K_a$ )で  $6.2 \times 10^2$  であり、この値は、アルブミンなどの血漿蛋白との親和性と同レベルであった。また、P388、1細胞あたりに結合する最大結合 ATN-10 分子数は、 $3.1 \times 10^9$  であった。血漿成分の存在下では、P388 と ATN-10 の結合は、PBS 中の50%に抑制され、血漿成分と未結合のフリーの ATN-10 が P388 との結合に関与することが示された。また、この結合は、低温、代謝阻害剤である monensin、 $\text{NaN}_3$  で抑制されることから、細胞の代謝と関連していることが示唆される。ヒトにおける体内動態を3例の健常ボランティアを用いて検討した。Tc-99m ATN-10 の投与により、一過性の自覚症状である異臭は認められたものの、他覚的理学所見、血液、尿検査では、ATN-10 によると考えられる異常変動は認められず、安全にヒトに投与可能であることが確認された。Tc-99m ATN-10 の体内動態を検討したが、体内動態は、投与量に依存する非線形性を示し、主な分布臓器は、肝、骨髄、腎、膀胱、腸管であった。排泄経

路は、投与後初期は、腎を介する尿中排泄（投与量の約10%）、後期は、肝を介する腸管排泄と考えられた。