

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20790898  
 研究課題名（和文） 新規腫瘍放射性医薬品としての放射性金属－八臭素化ポルフィリン錯体の開発  
 研究課題名（英文） Development of radiometal-octabromoporphyrin complex as a new radiopharmaceuticals for cancer  
 研究代表者  
 北村 陽二（KITAMURA YOJI）  
 金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
 研究者番号：10368483

研究成果の概要（和文）：本研究では、金属との結合が非常に速い八臭素化ポルフィリン誘導体に着目し、新規「放射性金属－八臭素化ポルフィリン錯体」を開発し、腫瘍の放射性医薬品としての新たな可能性を開拓することを目的とした。カチオン性化合物として、側鎖に N-メチルピリジニウム基を持つ OBTMPyP と、アニオン性化合物として、側鎖に p-カルボキシフェニル基をもつ OBTCPP を合成し、OBTCPP は放射性  $^{65}\text{Zn}$  と常温で錯体を形成することを見出した。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop radiometal-octabromoporphyrin complex as a new radiopharmaceuticals for cancer. OBTMPyP and OBTCPP were synthesized as a cationic compound, and as an anionic compound respectively. It is found that OBTCPP make complex with  $^{65}\text{Zn}$  at a room temperature.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分析科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射性医薬品、ポルフィリン、腫瘍、錯体

## 1. 研究開始当初の背景

ポルフィリンは4個のピロールからなる環状構造を基本構造としており、その環の中心に様々な金属元素が結合し、錯体を形成することが出来る。近年、このポルフィリンが腫瘍に集積する性質を持つこと、加えて、レーザー光照射により蛍光や活性酸素を発生す

ることを利用した、腫瘍の蛍光診断や、治療を目的とした光線力学療法が開発され、普及しつつある。しかし、このような可視光を用いた診断、治療法では、光の生体組織透過性が劣ることから、内視鏡光ファイバーでレーザー光を照射できる表層癌に適用が限定されるという欠点がある。そこで、ポルフィリ

ンを放射性同位元素で標識出来れば、外部からの光照射は不要となり、深部層の腫瘍の診断や治療にも適用可能となる。放射性同位元素の中には、金属元素も存在し、 $^{111}\text{In}$  や  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  は SPECT 診断に、 $^{52}\text{Fe}$ 、 $^{62}\text{Zn}$  や  $^{55}\text{Co}$  などは PET 診断に、 $^{64}\text{Cu}$  や  $^{90}\text{Y}$  などは内用放射線治療に用いることができる。そこで、報告者は、ポルフィリンに放射性金属を結合させた錯体を開発すれば、腫瘍の放射性医薬品としての新たな可能性を開拓できると思い至った。

一方、放射性医薬品として臨床で使用するためには、放射性同位元素による標識から精製までを短時間で行わなければならない。特に、PET 診断においては、半減期の非常に短いポジトロン放出核種を用いるため、標識と精製に要する時間の短縮は非常に重要である。報告者は、ポルフィリン誘導体の開発、及び、その分析学的、臨床的応用に関する研究を行ってきている。その研究成果から、八臭素化ポルフィリン誘導体は、これまでのポルフィリンに比べ、金属との結合が非常に速いといった性質を有していることを見出しており、この性質は放射性医薬品としての臨床応用に非常に有用であると考えられた。

光線力学療法で用いられるポルフィリン誘導体は腫瘍だけでなく正常組織にも集積する。正常組織からは時間の経過と共に排出されるが、腫瘍においてはポルフィリン代謝が低下しているため、最終的に腫瘍に選択的に集積する。従って、腫瘍/正常組織比が最大になるまでに時間を要することがポルフィリン誘導体の欠点といえる。一方、報告者はこれまでに、放射性キレート化合物の側鎖修飾により物性を変化させることで体内動態を制御することに成功している。その研究成果に基づき、今回着目している八臭素化ポルフィリンに関しても、体内動態を制御する修飾を化合物に施すことで、より優れた腫瘍選択性を示す化合物の開発に繋げることが可能であると考えられた。

放射性医薬品による腫瘍診断は、保険適用されている FDG-PET が普及しつつあるが、腫瘍の種類によっては発見しにくいものもあり、その有効性が問われている。それに対し、ポルフィリン誘導体の重要な性質として、様々な種類の腫瘍に対して親和性を有することが挙げられる。従って、八臭素化ポルフィリンを利用した放射性医薬品が開発できれば、腫瘍の検診に有用な薬剤となりうると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、金属との結合が非常に速い八臭素化ポルフィリン誘導体に着目し、新規「放射性金属-八臭素化ポルフィリン錯体」

を開発し、腫瘍の放射性医薬品としての新たな可能性を開拓することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) $\text{H}_2$ -OBTMPyP の合成

#### (1)-1 Cu-tetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl) porphine (Cu-TMPyP) の合成

$\text{H}_2$ -TMPyP (東京化成社) 100 mg と  $\text{CuCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  100 mg に、Methanol- $\text{H}_2\text{O}$  混液 (10 : 1 v/v) 55.0 ml を加え溶解させ、40~50°C で 1 時間還流した。得られた反応液を放冷した後、減圧濃縮を行い、約 15 ml まで濃縮した。濃縮液に 2-Propanol を添加して Cu-TMPyP を沈殿させ、吸引ろ過により結晶をろ取し、2-Propanol で洗浄後、減圧乾燥して Cu-TMPyP を得た。

#### (1)-2 Cu-octabromotetrakis (*N*-methylpyridinium-4-yl) porphine (Cu-OBTMPyP) の合成

Cu-TMPyP 410 mg を室温で Dimethylformamide (DMF) 30.0 ml に懸濁し、 $\text{Br}_2$  0.5 ml を DMF 10 ml に加えた溶液を 30 分以上かけて滴下し、更に 12 時間攪拌した。反応液に超純水 40 ml を加え沈殿を生成させ、吸引ろ過した。ろ取した結晶を DMF- $\text{H}_2\text{O}$  混液 (1 : 10 v/v) で 1 回、水 5 ml で 3 回、Ethanol-2-Propanol 混液 (1 : 1 v/v) で 1 回洗浄した後、減圧下、100°C、1 時間の乾燥を行い Cu-OBTMPyP を得た。

#### (1)-3 $\text{H}_2$ -OBTMPyP の合成

Cu-TMPyP 350 mg を 10°C に冷却した濃硫酸 5.0 ml に溶解し、氷冷下、2 時間攪拌した。超純水で調製した氷を 50 g 加え、完全に氷が溶けるまで攪拌した。溶液にヘキサフルオロリン酸アンモニウム 0.6 g 添加して沈殿を生成させ、吸引ろ過により結晶をろ取した。結晶を少量のヘキサフルオロリン酸アンモニウムを溶かした水 10 ml で 2 回洗浄し、さらに、Diethylether-2-propanol 混液 (1 : 1 v/v) でろ液が無色透明になるまで洗浄した。得られた結晶を風乾して  $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$   $\text{PF}_6$  塩を得た。次に、 $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$   $\text{PF}_6$  塩をアセトン 50 ml に溶解し、tetrabutylammonium chloride 100 mg を添加し、沈殿を生成させた。結晶を吸引ろ過し、結晶をアセトンで洗浄した後、減圧下、100°C、1 時間の乾燥を行い、 $\text{H}_2$ -OBTMPyP  $\cdot$  Cl 塩を得た (図 1)。

### (2) $\text{H}_2$ -OBTCPyP の合成

#### (2)-1 Cu-Tetrakis (4-carboxyphenyl) porphine (Cu-TCPyP) の合成

TCPP (ALDRICH 社) 50 mg を 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液に溶かし、1 時間還流した後、酢酸銅 20 mg を加えてさらに 30 分間還流した。放冷後、反応液に濃塩酸を加え、生じた

沈殿物を PTFE 製のメンブランフィルター(孔径; 0.45  $\mu$ m) を用いてろ取し、結晶を酸化リン(V)上で減圧乾燥させ、Cu-TCPPを得た。

#### (2) -2 Cu-octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine (Cu-OBTCPP) の合成

Cu-TCPP 40 mg を DMF 30 mL に溶解し、臭化コハク酸イミド (NBC) を 144 mg 加え、70  $^{\circ}$ C で 1 時間加熱攪拌した。放冷後、反応液に水を加え、生じた沈殿物をろ取し、結晶を酸化リン(V)上で減圧乾燥させて、Cu-OBTCPP を得た。

#### (2) -3 Octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine ( $H_2$ -OBTCPP) の合成

Cu-OBTCPP 40mg を氷酢酸 20 mL に溶解し、濃硫酸 5 mL を添加して一晩攪拌した。攪拌後、砕いた氷を加え、沈殿物を生成させた。沈殿物をろ取し、水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、さらにろ過した。得られたろ液に少量の濃塩酸を加え、生じた沈殿物をろ取した。結晶を酸化リン(V)上で減圧乾燥させて  $H_2$ -OBTCPP を得た (図 1)。

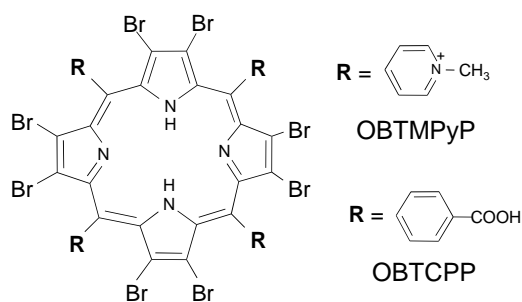


図 1. 八臭素化ポルフィリンの構造

#### (3) 非放射性金属との錯体生成反応の検討

$5 \times 10^{-4}$  M の  $H_2$ -OBTPMPyP または  $H_2$ -OBTCPP 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液 0.3 mL,  $5 \times 10^{-4}$  M の各種金属塩化物の 0.02 M 塩酸溶液 0.3 mL, および、0.1 M リン酸 buffer (pH 5, 6, 7) 0.9 mL を混合し、室温で放置し、5, 10, 30, 60 分後に反応液を 0.12 mL 取り、pH 8.0 または 9.0 リン酸 buffer を 1.68 mL 加えて 15 倍希釈し、吸光スペクトルを測定した。

#### (4) 放射性金属を用いた標識反応の検討

$5 \times 10^{-4}$  M の  $H_2$ -OBTPMPyP または  $H_2$ -OBTCPP 0.2 M 酢酸ナトリウム水溶液 0.3 mL に、 $^{111}\text{InCl}_3$ ,  $^{67}\text{Ga}$ , または  $^{65}\text{Zn}$  の 0.02 M 塩酸溶液を添加し、室温で 10 分間放置した。反応液を薄層クロマトグラフィーにより分析した。

#### 4. 研究成果

本研究は、金属との結合が非常に速い八臭

素化ポルフィリン誘導体に着目し、新規「放射性金属-八臭素化ポルフィリン錯体」を開発し、腫瘍の放射性医薬品としての新たな可能性を開拓することを目的として検討を行った。八臭素化ポルフィリン誘導体としては、正電荷を持つ八臭素化ポルフィリンとして、Octabromotetrakis(N-methylpyridinium-4-yl)porphine (OBTPMPyP) を、負電荷を持つ八臭素化ポルフィリンとして Octabromotetrakis(4-carboxyphenyl)porphine

(OBTCPP) を合成した。これらの化合物について、非放射性金属を用いて、錯体生成反応の検討を行った結果、OBTPMPyP, OBTCPP ともに、非放射性の In, Zn, Mn, Co や Cu と、中性付近の pH で、常温で速やかに錯体を形成することを見出した (図 2)。

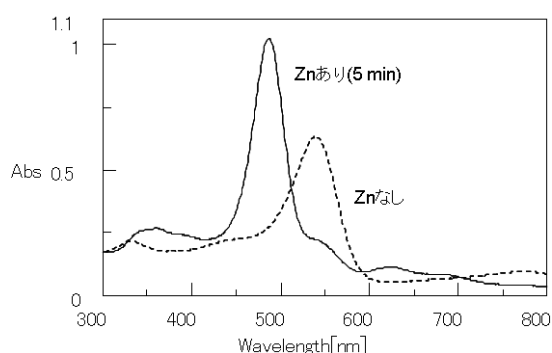


図 2. Zn 添加による OBTPMPyP の吸収スペクトル変化

そこで、これらの化合物について、放射性金属を用いた検討を行った。 $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{65}\text{Zn}$  を用いて常温で放射性金属錯体の合成を試みたところ、 $^{111}\text{In}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  に関しては、OBTPMPyP, OBTCPP ともに、十分な標識率で標識体を得ることはできなかった。この原因として、放射性金属を用いた反応は、トレーサー量、すなわち、極微量での反応であり、非放射性の In を用いた検討とは異なり、十分な量の金属が存在しないため、錯体生成反応が進みにくかった可能性が考えられる。一方、 $^{65}\text{Zn}$  は、OBTCPP と常温で速やかに錯体を形成した。これらの結果は、トレーサー量での反応においては、金属によって錯体形成反応に差があることを示している。今後、各金属核種ごとに至適標識反応条件の検討が必要と考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. M. Ueda, Y. Iida, Y. Kitamura, H. Kawashima, M. Ogawa, Y. Magata and H. Saji: **5-Iodo-A-85380, a specific ligand for  $\alpha 4 \beta 2$  nicotinic**

acetylcholine receptors, prevents glutamate neurotoxicity in rat cortical cultured neurons, *Brain Res.*, **1199**, 46-52 (2008) 査読有

2. Y. Kitamura, M. Mifune, T. Takatsuki, T. Iwasaki, M. Kawamoto, A. Iwado, M. Chikuma and Y. Saito: **Ion-exchange resins modified with metal-porphyrin as a catalysis for oxidation of epinephrine (adrenaline)**, *Catal. Commun.*, **9**, 224-228 (2008) 査読有
3. Y. Kitamura <sup>(corresponding author)</sup>, K. Mori, M. Yamamoto, A. Nozaki, M. Saito, I. Tsukamoto, M. Mifune and Y. Saito: **Peroxidase-like catalytic activity of aqueous- and immobilized-Mn<sup>3+</sup>-octabromoporphyrins on ion-exchange resin supplied as mimetic of horseradish peroxidase**, *Chem. Pharm. Bull.*, **56**, 1364-1366 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 門脇 沙緒莉<sup>1</sup>, 巽 朝菜<sup>1</sup>, 神野 伸一郎<sup>1</sup>, 中島 聡<sup>1</sup>, 北村 陽二<sup>2</sup>, 廣村 信<sup>3</sup>, 御船 正樹<sup>1</sup>, 吉川 豊<sup>4</sup>, 佐治 英郎<sup>5</sup>, 榎本 秀一<sup>1,3,1</sup> 岡山大院医歯薬, <sup>2</sup>金沢大際科学セ, <sup>3</sup>理研 CMIS, <sup>4</sup>京都薬大, <sup>5</sup>京大院薬: 糖尿病治療薬剤としての Zn-DTS 錯体の開発, 日本薬学会第130年会, 2010年3月30日, 岡山県総合グラウンド体育館 (岡山)
2. 竹中 文章<sup>1</sup>, 神野 伸一郎<sup>1</sup>, 北村 陽二<sup>2</sup>, 金山 洋介<sup>3</sup>, 榎本 秀一<sup>1,3</sup>, 秋澤 宏行<sup>4</sup>, 荒野 泰<sup>(51)</sup> 岡山大院医歯薬, <sup>2</sup>金沢大際科学セ, <sup>3</sup>理研 CMIS, <sup>4</sup>北医療大薬, <sup>5</sup>千葉大院薬: N 末アミノ酸を置換した <sup>111</sup>In-DOTA 結合 octreotide 誘導体の体内動態に関する検討, 日本薬学会第130年会, 2010年3月29日, 岡山県総合グラウンド体育館 (岡山)
3. 門脇 沙緒莉<sup>1</sup>, 北村 陽二<sup>2</sup>, 廣村 信<sup>3</sup>, 神野 伸一郎<sup>1</sup>, 中島 聡<sup>1</sup>, 御船 正樹<sup>1</sup>, 吉川 豊<sup>4</sup>, 佐治 英郎<sup>5</sup>, 榎本 秀一<sup>1,3,1</sup> 岡山大院医歯薬, <sup>2</sup>金沢大学際科学セ, <sup>3</sup>理研 CMIS, <sup>4</sup>京都薬大, <sup>5</sup>京大院薬: 経口糖尿病治療薬としての Zn-DTS 錯体の開発, 第8回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム, 2010年3月26日, 岡山大学五十周年記念館 (岡山)
4. 北村陽二, 秋澤宏行, 八木美知枝, 清水隆也, 中島 聡, 秋吉佑美, 御船正樹, 斎藤 寛, 荒野 泰, 榎本秀一, 佐治英郎: N 末アミノ酸を置換した <sup>111</sup>In-DOTA 結合 octreotide 誘導体の腎放射能集積に関する検討, 第1回メタロミクス研究

フォーラム 2008 年 11 月 28 日, 昭和女子大学 学園本部館 (東京)

5. 谷口将済, 青砥真央, 橋本早矢香, 清水隆也, 北村陽二, 御船正樹, 斎藤 寛: 金属ポルフィリン固定化シリカゲルとそのグルタチオンペルオキシダーゼ様機能, 第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2008年11月9日, 岡山コンベンションセンター (岡山)
6. 清水貴子, 中島由香里, 横山直子, 森 勝也, 清水隆也, 北村陽二, 御船正樹, 斎藤 寛: 金属-八臭素化ポルフィリン固定化シリカゲルの残存極性基修飾とその HPLC に及ぼす影響, 第47回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会, 2008年11月9日, 岡山コンベンションセンター (岡山)

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.kanazawa-u.ac.jp/~med60/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北村 陽二 (KITAMURA YOJI)

金沢大学・学際科学実験センター・准教授  
研究者番号: 10368483

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし