

博 士 論 文

がんの個別化医療に貢献する
放射性核種標識化合物の開発

金沢大学大学院 医薬保健学総合研究科

薬学専攻

臨床分析科学研究室

氏 名 栗生木 美穂

主任指導教員名 小川 数馬

目次

緒言.....	1
第1章 治療効果判定を目的とした新規細胞死イメージング剤の検討.....	7
1.1 実験方法.....	9
1.1.1 試薬・機器.....	9
1.1.2 標識前駆体 (DPA-NH ₂ 、Tr-MAG3-DPA) の合成.....	10
1.1.3 非放射性 IB-DPA の合成.....	12
1.1.4 非放射性 Re-MAG3-DPA の合成.....	12
1.1.5 [¹²⁵ I]IB-ZnDPA の調製.....	13
1.1.6 [^{99m} Tc]Tc-MAG3-DPA の調製.....	14
1.1.7 分配係数測定.....	15
1.1.8 <i>In vitro</i> における安定性実験.....	15
1.1.9 細胞結合実験.....	15
1.1.10 担がんマウスにおける体内放射能分布実験.....	16
1.1.11 TUNEL 染色.....	17
1.2 結果.....	18
1.2.1 標識実験.....	18
1.2.2 分配係数測定.....	19
1.2.3 <i>In vitro</i> における安定性実験.....	20
1.2.4 細胞結合実験.....	21
1.2.5 担がんマウスにおける体内放射能分布実験.....	22
1.2.6 腫瘍への放射性プローブの集積と TUNEL 染色陽性細胞数の比較.....	23
1.3 考察.....	24
第2章 標的 α 線治療を目的とした Bombesin 誘導体の基礎的検討.....	28
2.1 実験方法.....	30

2.1.1 試薬・機器.....	30
2.1.2 BBN 誘導体の合成.....	31
2.1.3 非放射性 IB-BBN の合成	32
2.1.4 細胞培養条件.....	33
2.1.5 GRPR との親和性評価	33
2.1.6 [²¹¹ At]AB-3 の調製.....	34
2.1.7 <i>In vitro</i> での[²¹¹ At]AB-3 の安定性試験.....	35
2.1.8 <i>in vivo</i> での[²¹¹ At]AB-3 の安定性試験.....	35
2.1.9 [²¹¹ At]AB-3 の細胞内在化の確認.....	35
2.1.10 [²¹¹ At]AB-3 の細胞外流出の確認.....	36
2.1.11 前立腺癌モデルマウスにおける体内放射能分布実験	37
2.2 結果.....	37
2.2.1 非放射性 IB-BBN の合成および <i>in vitro</i> での GRPR への親和性の評価.....	37
2.2.2 [²¹¹ At]AB-3 の合成.....	39
2.2.3 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> での安定性試験	41
2.2.4 [²¹¹ At]AB-3 の細胞内在化及び外在化の確認.....	43
2.2.5 前立腺癌担がんマウスにおける体内放射能分布実験	44
2.3 考察.....	46
結語.....	51
引用文献.....	53
謝辞.....	62

緒言

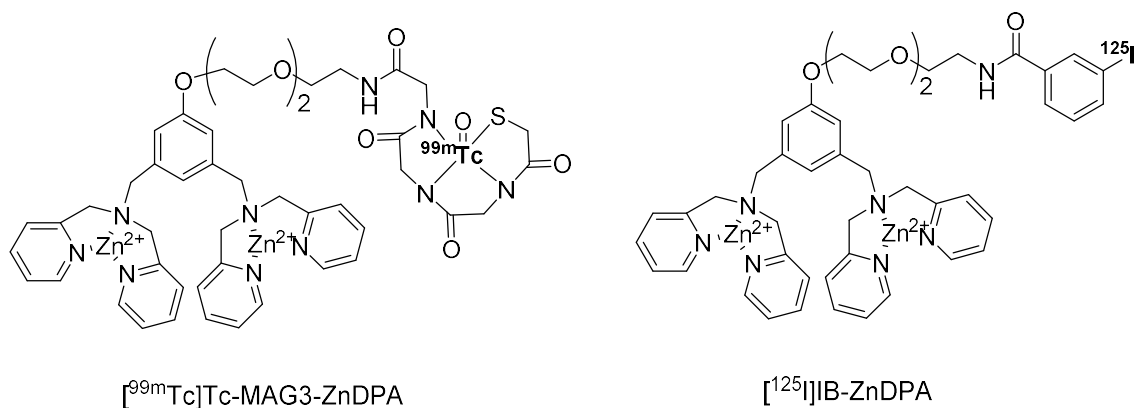
個別化医療（precision medicine/personalized medicine）は患者の遺伝的背景や個々のがん種に特徴的な生物学的・病理学的特性などに基づいて行う医療である。2019年6月に保険収載されたがん遺伝子パネル検査に基づき行う治療はその代表格であり、病気の発生に関わる複数の遺伝子を解析し、正確な診断や抗がん剤の選定などの治療方針の決定に有用な情報を提供する検査として臨床現場で用いられるようになった。核医学においては、分子イメージング技術を用いた Positron Emission Tomography（PET）や Single Photon Emission Computed Tomography（SPECT）といった画像診断によって、治療適格・不適格性の判定、治療効果予測、モニタリングの客観的指標を提供可能であり、個別化医療に貢献できる。また、標的アイソトープ治療は画像診断に使用した核種をβ線やα線を放出する治療用核種に置き換えることで、近年医学分野で広がっている“theranostics”（治療（therapy）と診断（diagnosis）を組み合わせた造語）の概念に沿った治療を提供可能である。本研究では、個別化医療の観点から、細胞死イメージング剤と標的アイソトープ治療用薬剤を例に挙げ、がんの診断・治療を目的とした放射性核種標識化合物の開発を行うことを目的とした。

がん治療を成功のためには、治療法、用量、タイミングの選択が重要であり、その評価のために効果判定が行われる。固形がんの治療効果判定には主に「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン（New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline Version 1.1)(1)」に沿って、CTの形態画像から腫瘍の縮小度を判断することで行われている。しかし、CTで腫瘍の縮小を判断するには月単位の間隔が必要である。一方で、化学療法や分子標的療法などの薬物療法や放射線療法が行われた場合、治療早期から細胞死が誘導される(2)。そのため、抗腫瘍療法の開始後早期に細胞死の増加を検出できれば、最終的な治療成功の予測因子として役立つ可能性がある。

また、治療に無反応の患者の場合、治療方針を早期に変更でき、不要な治療による毒性の回避につながる可能性がある。

PET や SPECT は、放射性同位元素 (RI) で標識した化合物を投与し、その化合物の特性に従って臓器や組織などに分布・集積後、撮像することで、生体内の機能を画像として得る分子イメージング技術である。画像から細胞死を定量できれば、非侵襲的に治療応答の早期判定に役立つ情報を提供でき、「個別化医療」につながると期待されている(3-5)。第 1 章では、抗がん剤による治療後の腫瘍を対象とした細胞死 SPECT イメージングのための放射性核種標識化合物(放射性プローブ)を開発することを目的とした。

細胞死の特徴の一つとして、細胞膜の非対称性の崩壊が起こり、通常は内膜に存在する細胞膜構成脂質のホスファチジルセリン (PS) が外在化する。そのため、PS は細胞死検出の標的分子となり、PS に親和性のある化合物は細胞死検出に使用されている(6, 7)。Zinc-dipicolylamine (Zn-DPA) は PS に親和性を示す低分子化合物であり(8-10)、本研究では細胞死検出のために Zn-DPA を使用した新規放射性プローブを設計・作成した。既報に従って母体化合物 DPA-NH₂ を合成後、^[125I]SIB と結合させることで、^[125I]IB-DPA を放射化学的収率 42%、放射化学的純度 95%以上で得た。一方で、DPA-NH₂ にトリチル (Tr) 基で保護した配位子 Mercaptoacetylglycylglycylglycine (MAG3) を結合させることで、Tr-MAG3-DPA を合成した。Tr-MAG3-DPA の Tr 基を脱保護後、^{99m}TcO₄⁻を加え、Sn²⁺で還元することによって ^{99m}Tc を配位させ、HPLC で精製することで、^[99mTc]Tc-MAG3-DPA を放射化学的収率 71%、放射化学的純度 95%以上で得た。^[125I]IB-DPA および^[99mTc]Tc-MAG3-DPA は硝酸亜鉛水溶液と混合することでそれぞれ Zn²⁺を配位させ、^[125I]IB-ZnDPA および^[99mTc]Tc-MAG3-ZnDPA を得た。



図：作製する新規放射性プローブの構造式

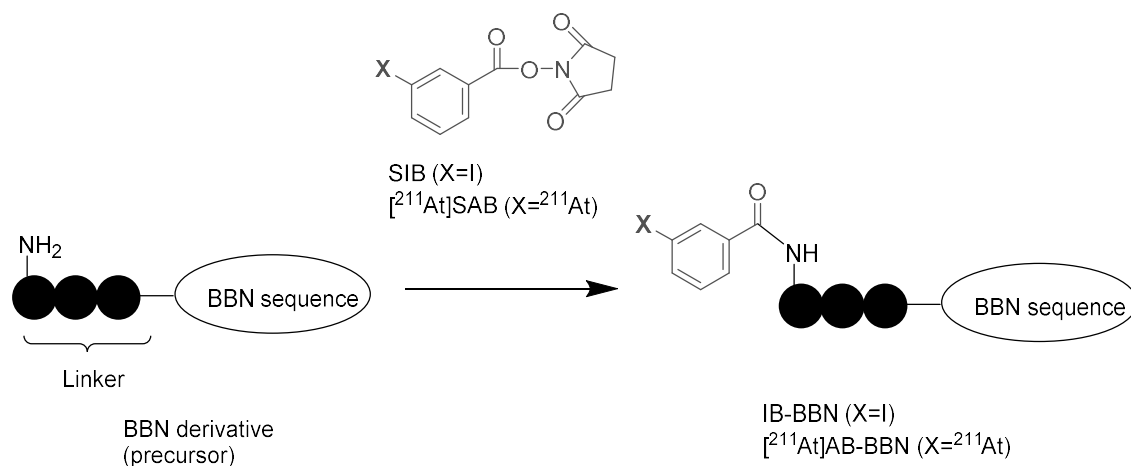
通常の培地、または、細胞死を誘導するため抗がん剤 5-FU を含む培地で前処理したがん細胞に、 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ を曝露させ、5-FU 処理の有無による放射性プローブの細胞結合量を比較した。 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ は 5-FU 処理の有無に寄らず非特異的に細胞に取り込まれた一方で、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ は 5-FU 処理により有意に取り込みが増加した。ついで、担がんモデルマウスを放射性プローブの投与前日に 5-FU 投与した 5-FU 投与群と生理食塩水を投与した未治療群に分け、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ 投与 2 時間後の体内分布を 2 群間で比較したところ、5-FU 投与群の腫瘍の放射能集積が有意に増加した。さらに TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-dUTP nick end labeling) 染色により腫瘍組織切片の死細胞を計数したところ、腫瘍への放射能集積量と TUNEL 陽性細胞の数は有意に相関していた。これらの結果から、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ は細胞死検出が可能であることが示された。

前述の PET や SPECT は“撮像技術”であったが、同様に RI が医療利用されるものとして、標的アイソトープ治療がある。これは体内に RI そのものや RI で標識された薬剤を投与して行う“放射線治療”である。薬剤がその特性に従って分布し、体内から放射線を照射するため、全身に作用し、転移がんの治療に有効である。従来は β 線放出核種が利用されてきたが、近年 α 線放出核種を用いた標的アイソトープ治療、すなわち「標的

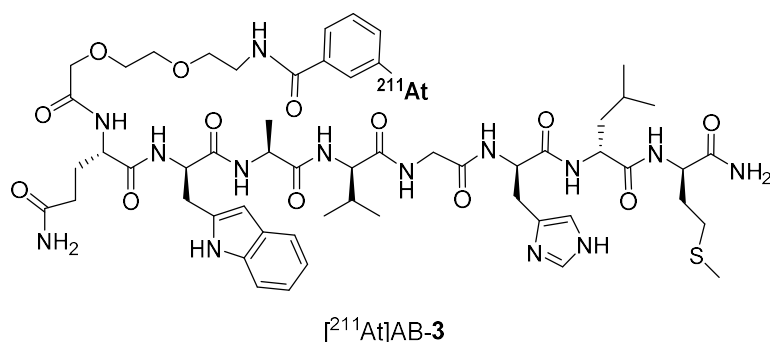
α 線治療 (Targeted Alpha Therapy [TAT])」に注目が集まっている。この理由として、 α 線は β 線よりも約 400-500 倍も線エネルギー付与が高く、DNA をより強力に切断するため高い治療効果が期待できること、また、 α 線の飛程が 100 μm 以下と細胞数個分程度しかないため周辺の正常組織への照射を最小限にし、副作用の軽減が期待できることが挙げられる。TAT の利用が期待されている核種が数種類あるが、そのうちアスタチン-211 (以下、 ^{211}At) は、標識操作や薬剤が標的組織に到達する時間を確保できる程よい半減期 (7.2 時間) を有することや安価な ^{209}Bi を原料としてサイクロトロン等の加速器で製造可能であることから魅力である。既に国内でも ^{211}At 標識化合物の医療応用に向けた取り組みが進められている(11-14)。

アスタチン自体はヨウ素と類似した化学的性質を有し、甲状腺や胃などに集積する性質を持つため(15, 16)、TAT には標的組織に ^{211}At を輸送するドラッグデリバリーの手法が不可欠である。そこで、前立腺癌や乳癌を含むさまざまな腫瘍で過剰発現することが報告されているガストリン放出ペプチド受容体 (以下、GRPR) に着目した(17-19)。GRPR は前立腺癌細胞の膜には高密度に分布する一方で、通常の前立腺や前立腺肥大症の組織においてはほとんど発現していない(18)。また、前立腺癌患者のリンパ節や骨標本でも発現が確認されている(20)。このため、GRPR は前立腺癌の標的分子となる。Bombesin (以下、BBN) はヨーロッパスズガエル (*Bombina bombina*) の皮膚から単離された 14 残基のペプチドで、GRPR に高い親和性を有することが報告されており、BBN は前立腺癌細胞に放射性核種を運搬するキャリア分子として適切である。前立腺癌を対象として、BBN 誘導体を使用した放射性核種標識化合物の報告は多数あるが(19, 21, 22)、 ^{211}At をはじめ α 線放出核種標識 BBN 誘導体の報告はない。第 2 章では、前立腺癌の TAT を目指して、 ^{211}At を BBN に結合させた ^{211}At 標識 BBN 誘導体の作製および評価を目的とした。

アスタチンには安定同位体がないため、 ^{211}At 標識を行う BBN 誘導体の構造決定のため、アスタチンの代わりに同族元素のヨウ素を使用した BBN 誘導体 (IB-BBN) を用いた。N 末端のリンカー配列が異なる 6 種類の IB-BBN を合成し、GRPR 結合親和性を測定したところ、IB-3 が天然 BBN と同程度の親和性を示した。IB-3 のヨウ素を ^{211}At で置換した構造を有する ^{211}At AB-3 を合成するため、末端にアミノ基を有する BBN 誘導体に、別途調製した ^{211}At SAB を反応させ、HPLC で精製することにより、 ^{211}At AB-3 を放射化学的収率 28.2%、放射化学的純度 90%以上で得た。



図：IB-BBN および ^{211}At AB-BBN の合成スキーム



図：評価した ^{211}At AB-3 の構造式

[²¹¹At]AB-3 をヒト前立腺癌細胞 PC-3 に曝露させたところ、[²¹¹At]AB-3 は細胞に取り込まれ、その取り込みは過剰の天然 BBN の同時曝露で抑制された。マウス血漿中での安定性試験により[²¹¹At]AB-3 は経時的に分解することが明らかとなったが、投与早期は未分解体で存在し、担がんマウスの腫瘍に集積した。腫瘍および GRPR 高発現組織である膵臓の集積は天然 BBN の同時投与によって阻害されたことから、[²¹¹At]AB-3 は GRPR 特異的に集積することが示唆された。一方で、他の臓器にも放射能が分布しており、これは[²¹¹At]AB-3 から遊離した ²¹¹At によるものと考えられた。

以上、本研究は、抗がん剤治療後の腫瘍の細胞死イメージングを目的とした新規放射性プローブ、および前立腺癌の標的アイソトープ治療を目的とした α 線放出核種 ²¹¹At 標識化合物の基礎的な検討結果を収めたものであり、今後の研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

これらの結果について以下に詳述する。

第1章

抗がん剤の治療効果判定を目的とした新規細胞死イメージング剤の検討

がん治療を成功のためには、治療法、用量、タイミングの選択が重要であり、その評価のために効果判定が行われる。固形がんの治療効果判定は「固形がんの治療効果判定のための新ガイドライン (New Response Evaluation Criteria in Solid Tumours: Revised RECIST Guideline Version 1.1)」に従って、主に CT の形態画像から腫瘍の縮小度を判断することで行われているが、これには月単位の間隔が必要である。一方、細胞死を検出することにより、“形態変化が起こる前の治療早期から”抗がん剤の効果を予測できると期待されている(3-5)。治療早期で形態変化が起きる前でも治療が有効であれば、薬物療法や放射線療法によって、アポトーシス、または壊死、分裂死、およびオートファジーといった非アポトーシス性の細胞死が細胞に誘導されているためである(2)。したがって、PET や SPECT などの分子イメージング技術を用いて、細胞死の量を定量できれば、最終的な治療の効果予測に役立つ可能性があるだけでなく、治療に無反応の患者の場合には治療方針を早期に変更でき、不要な治療による毒性の回避につながる可能性がある。細胞死を検出する分子イメージング技術として、本研究では RI の入手が容易で、半減期も長く取り扱いのしやすい SPECT を選択した。

細胞死イメージングを SPECT で行うためには、細胞死によって変化する分子を標的とし、特異的に結合あるいは相互作用する放射性核種標識薬剤 (放射性プローブ) の開発が必要となる。細胞死の検出に利用される様々な標的分子が存在するが(23)、本研究では、イメージング剤が細胞内に移行する必要がない細胞表面における変化を標的とした。細胞膜は非対称に分布したリン脂質の二重層であり、通常は両親媒性リン脂質が外膜に、アニオン性リン脂質が内膜に分布している(24)。ホスファチジルセリン (PS) もアニオン性リン脂質の一つであり、大部分が細胞膜の内側に分布している(25)。このような細胞膜の非対称性は floppases、および flippases と呼ばれるトランスポーターによ

って維持されているが(24)、細胞死によって非活性化されると、細胞膜の非対称性は破綻し、PS（細胞1個あたり100万個）が細胞外表面に露出する(6)。したがって、PSはアポトーシス検出の魅力的な標的となる(7)。長年、PSの細胞外露出はアポトーシスの特徴であると推測されていたが(26)、壊死、分裂期細胞死、オートファジーなど他の非アポトーシス性の細胞死もPSの外面化と関連している(27, 28)。したがって、PS細胞外面化の検出は、細胞死の特定の様式に限らず細胞死を検出可能である。

内因性タンパク質 Annexin A5（分子量36 kDa）は、カルシウムの存在下、PSに対して高い親和性（ $K_d = 0.5-7 \text{ nM}$ ）を示し(29)、*in vitro* および *in vivo* の両方で細胞死検出に利用されている(30, 31)。臨床研究が進められた SPECT 薬剤として、hydrazinonicotinamide（HYNIC）を配位子とし、 ^{99m}Tc で標識した $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Annexin A5}$ がある(32, 33)。 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Annexin A5}$ の臨床試験では、化学療法後に病巣へ放射能集積が見られた例において、2ヵ月後のX線CT検査にて腫瘍の著明な縮小、又は消失が確認されたと報告され(34)、細胞死の検出によって治療効果判定が行える可能性が示唆された。しかし、放射性代謝物由来と思われる非標的組織、特に腎臓への放射能集積が高く、長時間滞留するため腹部の正確な細胞死イメージングを妨げる可能性がある(27, 35)。

そこで著者らは、放射性代謝物が代謝臓器から迅速にクリアランスされる配位子 N,N' -trimethylenedibenzohydroxamamide [$\text{C}_3(\text{BHam})_2$] を用いた細胞死イメージング剤、 $^{99m}\text{Tc-C}_3(\text{BHam})_2\text{-Annexin A5}$ を作製し、その評価を行った(35)。 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Annexin A5}$ と比較して $^{99m}\text{Tc-C}_3(\text{BHam})_2\text{-Annexin A5}$ の腎臓への放射能集積はいずれの時間においても大きく低減された。また、 $^{99m}\text{Tc-HYNIC-Annexin A5}$ は肝臓と腎臓において滞留したが、 $^{99m}\text{Tc-C}_3(\text{BHam})_2\text{-Annexin A5}$ は、時間と共に放射能集積が低減した(35)。

このように Annexin A5 は細胞死のプロープとして利用可能であるが、下記に記載する弱点もある(28)。

- (1) Annexin A5 と PS の結合がカルシウム依存性であること；細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動（または組織差）によってプロープの結合に影響を与える可能性があり、複数回

のスキャンにおける再現性が損なわれる可能性がある。

- (2) 薬物動態が最適とは言えないこと；タンパク質など高分子は腫瘍組織への浸透が悪く、非標的領域および血液からのクリアランスが遅いため、標的病変における Annexin A5 の取り込みの大きさ、及びシグナルノイズ比が通常低くなる。
- (3) 放射性標識手順が煩雑で複雑になること；タンパク質であるため酸、塩基、高温、有機溶媒に弱く、生理活性を維持したまま放射性標識できる条件が限定される。

そこで、Annexin A5 の代用として Zinc-dipicolylamine (Zn-DPA) に着目した。蛍光標識 Zn-DPA を用いた PS との解離定数は 133 ± 35 nM であり(36)、Zn-DPA は PS に中程度の親和性を示すと報告されている(8-10)。Annexin A5 は 2 つの Ca^{2+} を介して PS に結合するが、Zn-DPA はその構造中の 2 つの Zn^{2+} を介し Ca^{2+} 非依存的に PS に結合する(25)。また、低分子であるため非標的組織からの速やかなクリアランス、標的組織への高い浸透が期待でき、ある程度過酷な標識条件の利用が可能になるなど、タンパク質のプローブと比べて利点がある(4, 37)。本研究では、この Zn-DPA を臨床で広く用いられている SPECT 核種である $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{123}I で標識した化合物、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3-ZnDPA および ^{123}I -ZnDPA を設計し、評価を行った。なお、 ^{123}I (半減期：13.3 時間) の代替核種として半減期が長く基礎研究に適している ^{125}I (半減期：59.4 日) で代用し、検討を行った。

1.1 実験方法

1.1.1 試薬・機器

シリカゲルはシリカゲル 60 (Merck, Darmstadt, ドイツ) を用いた。 ^{125}I NaI (644 GBq/mg) は PerkinElmer (Waltham, MA) から購入した。 $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$ は株式会社日本メジフィジックスより入手した $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ ジェネレーターより生理食塩水で溶出して用いた。その他の試薬はすべて特級試薬を使用した。

^1H -NMR は溶媒に重クロロホルムもしくは重水を用い、tetramethylsilane を内標準物質として JEOL JNM-ECS400 (JEOL、東京、日本) を使用し測定した。Direct Analysis in Real

Time-MS (DART-MS)、エレクトロスプレーイオン化質量分析 (ESI-MS)、には JEOL JMS-T100TD (JEOL) を用いた。逆相 (RP) -HPLC は、送液ユニットには LC-10AD、吸光度検出器には SPD-10A、カラムオーブンには CTO-10A (いずれも島津製作所、京都、日本) を用いた。カラムには Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6×150 mm、ナカライテスク、京都、日本)、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6×150 mm、ナカライテスク) を用いた。オートウェルガンマカウンターは ARC-380 (日立アロカメディカル株式会社 (現、株式会社日立製作所)、東京、日本) を用いた。

Colon-26 (マウス直腸癌由来細胞株、BALB/c 系統) は東北大学医用細胞資源センターから、U-87 ヒトグリオーマ細胞は American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手し、前者は 10%ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン (100 units/mL) およびストレプトマイシン (100 µg/mL) を含む RPMI 1640 培地 (ナカライテスク) を用い、後者は 10%ウシ胎児血清 (FBS)、1 mM ピルビン酸ナトリウム、ペニシリン (100 units/mL) およびストレプトマイシン (100 µg/mL) を含む Eagle's Minimum Essential Medium 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を用い、5%CO₂ を含む加湿空气中、37°C で培養した。

1.1.2 標識前駆体 (DPA-NH₂、Tr-MAG3-DPA) の合成

[¹²³I]IB-DPA の標識前駆体となる 1,1'-(5-{2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethoxy}-1,3-phenylene)bis[*N,N*-bis(pyridin-2-ylmethyl)methanamine] (DPA-NH₂) は、以前に報告された方法により合成した(37)。次に、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA の標識前駆体となる *N*-[17-(3,5-bis {[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]methyl}phenoxy)-2,5,8-trioxo-12,15-dioxo-3,6,9-triazaheptadecyl]-2-(tritylthio)acetamide (Tr-MAG3-DPA) は **Figure 1-1** に示すスキームに従い合成した。まず、*N*-[(tritylmercapto)acetyl]glycylglycylglycine (Tr-MAG3) を以前に報告された方法により生成した(38)。次に、Tr-MAG3 (4.2 mg、8.30 µmol)、DPA-NH₂ (5.0 mg、7.72 µmol)、および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (DCC、1.9 mg、9.26 µmol) を 400 µL のクロロホルムに溶解し、混合物を 22.5 時間振とうした。窒素ガスで溶媒を除去し

た後、残留物をアセトニトリルに懸濁させた。次に、その濾過液を Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10×250 mm) を用いた RP-HPLC で分析し、目的物を含む画分を質量分析で同定し、0.05%triethylamine (TEA) を含む水 : アセトニトリル 60 : 40 から 20 分間で 40 : 60 へ変換するグラジエント法にて 4 mL / min の流速の条件で Tr-MAG3-DPA の精製を行った。凍結乾燥により溶媒を除去し、黄色のオイル状物質として Tr-MAG3-DPA を得た (6.6 mg、75%)。

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.12 (2H, s), 3.27 (2H, m), 3.53-3.55 (4H, m), 3.61 (6H, m), 3.65 (2H, m), 3.74 (2H, s), 3.79 (4H, t), 3.90 (2H, s), 4.21 (8H, s), 6.57 (2H, s) 6.75 (1H, s), 7.28-7.39 (15H, m), 7.71-7.76 (4H, t), 7.92-7.93 (4H, d), 8.25-8.27 (4H, t), 8.81-8.82 (4H, d)

MS (ESI, *m/z*, [M+H]⁺) Calcd for C₆₅H₇₁N₁₀O₇S: 1135.5, Found: 1135.5

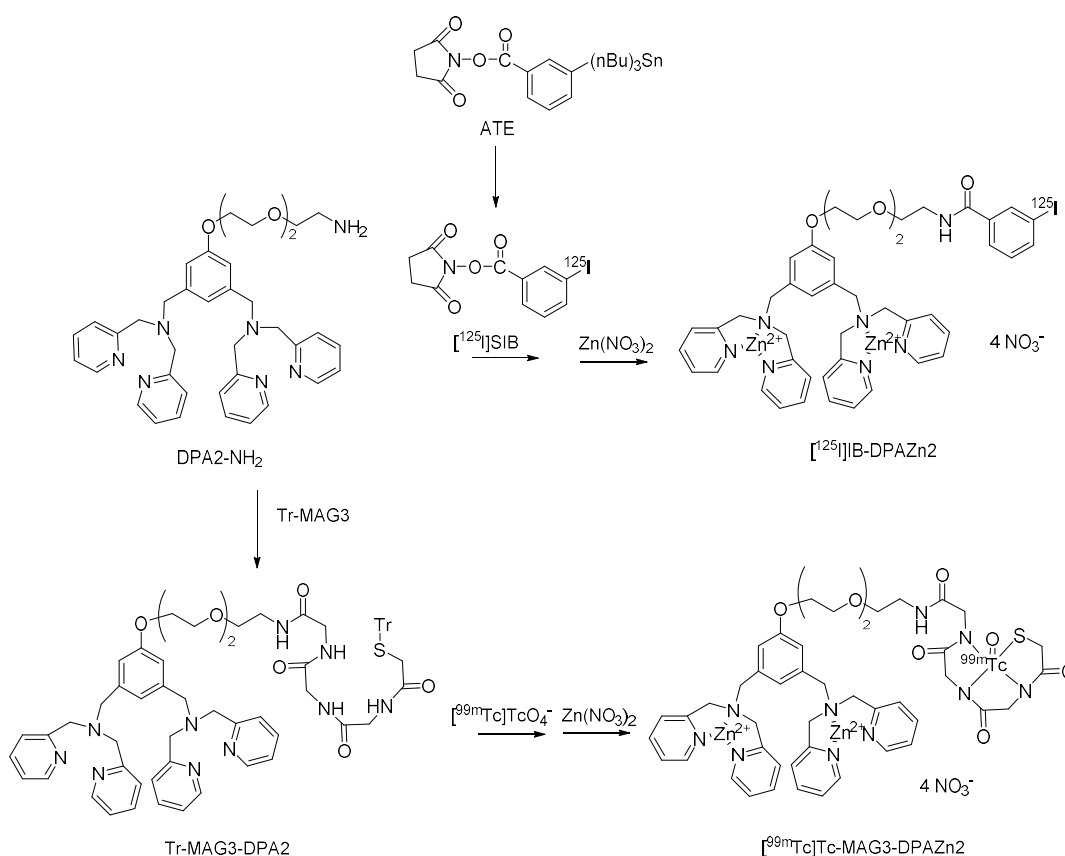


Figure 1-1: Syntheses of [¹²⁵I]IB-ZnDPA and [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA

1.1.3 非放射性 IB-DPA の合成

非放射性 IB-DPA は、**Figure 1-2** に示すスキームに従い合成した。非放射性 *N*-succinimidyl 3-iodobenzoate (SIB、4.6 mg、13.3 μmol) と DPA-NH₂ (5.0 mg、6.67 μmol) を 400 μL のジクロロメタンに溶解し、混合物を 30 分間振とうした。混合物を Cosmosil 5C₁₈-MS-II (4.6 \times 150 mm) を接続した RP-HPLC で分析し、MS で目的物のピークを同定した。その後、Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10 \times 250 mm) を接続した RP-HPLC を用い、13 分間で 0.05%TEA を含む水 : アセトニトリル 50 : 50 から 37 : 63 へ変換するグラジエント法にて 4 mL/min の流速の条件で IB-DPA の精製を行った。凍結乾燥により溶媒を除去し、黄色のオイル状物質として IB-DPA を得た (0.84 mg、14.3%)。

¹H NMR (CDCl₃): δ 3.63 (2H, m), 3.66 (4H, m), 3.70-3.72 (6H, m), 3.79 (2H, m), δ 3.93 (2H, m), 4.19 (8H, s), 6.57 (2H, s) 6.82 (1H, s), 7.00-7.07 (1H, m), 7.56-7.68 (6H, m), 7.91-7.93 (4H, d), 8.02 (1H, s), 8.01-8.22 (4H, t), 8.81-8.82 (4H, d)

MS (ESI, *m/z*, [M+H]⁺) Calcd for C₄₅H₄₈IN₇O₄: 878.3, Found: 878.3

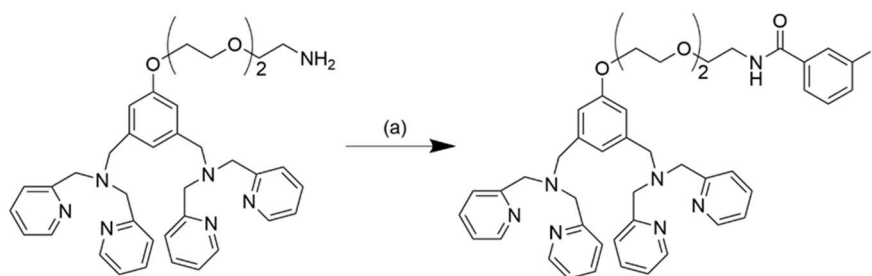


Figure 1-2: Synthesis of nonradioactive IB-DPA. (a) SIB, dry CH₂Cl₂, rt

1.1.4 非放射性 Re-MAG3-DPA の合成

非放射性 Re-MAG3-DPA は、**Figure 1-3** に示すスキームに従い合成した。Re-MAG3 は、以前に報告された方法により生成した(38)。次に、2,3,5,6-tetrafluorophenol (1.8 mg、11.0 μmol)、1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC、2.1 mg、11.0 μmol) と 15.9 μL の TEA を 100 μL のアセトニトリルに溶解し、その溶解液を Re-

MAG3 (4.6 mg, 9.97 μmol) を溶解させた 0.1 M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 1 mL に滴下した。反応混合物を 10%塩酸で pH 6 に調整し、室温で 30 分間振とうした。反応混合物を水で希釈し 8mL とし、2 連につなげた Sep-Pak C₁₈ カートリッジ (Waters, Milford, MA) に注入した。注射用水 20 mL、20%エタノール / 0.01 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 30 mL、水 10 mL、ジエチルエーテル 0.5 mL により洗浄後、2.5mL のアセトニトリルで溶出することにより活性エステルを精製した。DPA-NH₂ (2.1 mg, 3.24 μmol) を活性エステル溶液に加え、TEA で pH を 9 に調整した後、室温で 1 時間攪拌した。Cosmosil 5C₁₈-MS-II (10×250 mm) を用いた RP-HPLC で分析し、目的物を含む画分を質量分析で同定した。0.05%TEA を含む水 : アセトニトリル 70 : 30 から 10 分間で 64 : 36 へ変換するグラジエント法にて 4 mL / min の流速の条件で精製を行った。凍結乾燥により溶媒を除去し、黄色のオイル状物質として Re-MAG3-DPA を得た (2.3 mg, 21.1%)。

MS (ESI, m/z , $[\text{M}+\text{H}]^+$) Calcd for C₄₆H₅₂N₁₀O₈ReS: 1092.3, Found: 1093.5

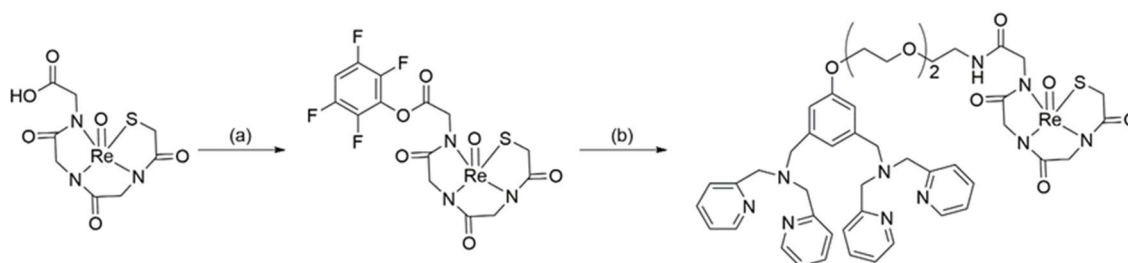


Figure 1-3: Syntheses of Re-MAG3-DPA. (a) 2,3,5,6-Tetrafluorophenol, EDC, TEA, CH₃CN, rt
(b) DPA-NH₂, rt

1.1.5 [¹²⁵I]IB-ZnDPA の調製

N-Succinimidyl 3-[¹²⁵I]iodobenzoate ([¹²⁵I]SIB) は、過去に報告された方法を使用し調製した(39)。得られた [¹²⁵I]SIB を 20 μL の水に溶解し、50 μg の DPA.NH₂ を含む 50 μL のアセトニトリルに添加した後、50 μL の 1%TEA/ アセトニトリル溶液を使用して pH を

7~8 に調整した。混合溶液を室温で 30 分間放置した後、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6×150 mm) を用いた RP-HPLC で精製した。20 分間で 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) 含む水 : メタノール 40 : 60 から 60 : 40 へ変換するグラジエント法にて 1 mL/min の流速の条件で行った。非放射性 IB-DPA と保持時間が一致する画分を収集し、その画分に含まれるメタノールを窒素ガスにより除去した。等容量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を [¹²⁵I]IB-DPA 溶液に加えて中和後、さらに終濃度が 0.75 mM になるよう硝酸亜鉛水溶液を加えて室温で 10 分間混合することで、追加の精製なしに [¹²⁵I]IB-ZnDPA を調製した。

1.1.6 [^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA の調製

[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA は、過去に報告された標識法にわずかな変更を加えて調製した (40)。45 μL の TFA と 5 μL のトリエチルシランを 50 μg の Tr-MAG3-DPA に加えることでトリチル基を脱保護した。溶媒を窒素ガスで除去し、80 μL の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 9.5) を加えて pH を 8~9 に調整した後、0.1 M クエン酸緩衝液 (pH 5.0) で 1 mg/mL の濃度に調整した 3 μL の塩化スズ二水和物溶液、及びジェネレーターから生理食塩水で溶出した 200 μL の [^{99m}Tc]TcO₄⁻ (37 MBq) を加えた。反応混合物を 60°C で 10 分間加熱し、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6×150 mm) を接続した RP-HPLC で精製した。RP-HPLC は 20 分間で 0.1%TFA を含む水 : エタノール 90 : 10 から 70 : 30 へ変換するグラジエント法にて 1 mL/min の流速の条件で行った。非放射性 Re-MAG3-DPA と保持時間が一致する [^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA を含む画分 (保持時間 : 約 11.8 分) を収集し、等量の 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) を添加することで pH を 7~8 に調整し、さらに終濃度が 0.75 mM になるよう硝酸亜鉛水溶液を加えて室温で 10 分間混合した。得られた [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA は追加の精製をせずに使用した。

1.1.7 分配係数測定

[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA および[¹²⁵I]IB-ZnDPA の分配係数の測定は、過去に報告された方法にわずかな変更を加えて行った(41)。すなわち、放射性プローブを 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で適度な放射能濃度に希釈し、3 mL をチューブに分注し、3 mL の 1-オクタノールを加え、5 分間のボルテックスを行った。1,000 g で 5 分間遠心分離を行った後、有機相から 2.5 mL をとり、新たに 2.5 mL の緩衝液を加えた。同様にボルテックスと遠心分離を行った後、有機相から 2 mL とり、新たに緩衝液を 2 mL 加え、再度ボルテックスと遠心分離を行った。有機相と水相を 1 mL ずつとり、それぞれの放射能を測定した。分配係数 $\log P$ は以下の式より算出した ($n = 3$)。

$$\log P = \log \left(\text{有機相の放射能} / \text{水相の放射能} \right)$$

1.1.8 In vitro における安定性実験

[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA および[¹²⁵I]IB-ZnDPA の緩衝液中での安定性を評価するため、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で希釈し、溶液を 37°C でインキュベートした。その 1 時間後、及び 6 時間後に RP-HPLC で分析した ($n = 3$)。分析は 1.1.5 および 1.1.6 で示した[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA および[¹²⁵I]IB-ZnDPA の精製と同条件で行った。さらに、マウス血漿と放射性プローブ溶液を 10 : 1 の比率で混合し、37°C でインキュベートした。6 時間後、等量の氷冷アセトニトリルを加え混合後、10,000g で 5 分間遠心分離し、上澄みを 0.45 μm フィルターでろ過することで徐タンパク操作を行った。ろ液を RP-HPLC で分析し放射化学的純度を測定した ($n = 3$)。

1.1.9 細胞結合実験

細胞結合実験は、マウス大腸がん細胞 Colon-26 およびヒトグリオーマ細胞 U-87 MG を使用して行った(42)。細胞を 6 ウェルプレートに蒔き (Colon-26 : 1.2×10^5 cells/well、U-87 MG : 1.5×10^5 cells/well)、5-フルオロウラシル (5-FU) 処理の前に 5% CO₂、37°C

条件下で 24 時間培養した。通常の培地または 10 μ M の 5-FU を含む培地で Colon-26 は 24 時間、U-87 MG は 48 時間培養した。細胞を PBS で 2 回洗浄し、FBS を含まない培地で希釈した [^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA、[^{125}I]IB-DPA、[^{125}I]IB-ZnDPA を 3.7 kBq / well になるように加えた。5% CO_2 、37°C 下で 2 時間処理後、ウェルプレートごとを氷上に移した。培地を回収し、細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した。回収した培地と洗浄に用いた PBS はウェル毎にまとめてチューブに入れ、その放射能をガンマカウンターで測定した。洗浄後の細胞は 500 μ L の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて溶解させ、細胞溶解液を回収した。この操作を二度繰り返し得た細胞溶解液の放射能をガンマカウンターで測定した。さらに、放射能測定終了後細胞に含まれるタンパク質量はプロテインアッセイビシニコニン酸キット（ナカライテスク）を用いて測定した。細胞に結合した放射性プローブの量は以下の式より算出し、対照群と 5-FU 処置群の細胞への放射能集積の有意差検定は、対応のない Student's t test により行い、 $p=0.05$ 未満を有意差ありとした。

細胞に結合した放射性プローブ (%Dose / protein mg)

$$= (\text{Cell}) / [\text{Cell} + (\text{Medium} + \text{PBS})] / (\text{Protein})$$

Cell: 細胞溶解液の放射能 (cpm)

Medium + PBS : 培地と洗浄 PBS の放射能 (cpm)

Protein: タンパク量 (mg)

1.1.10 担がんマウスにおける体内放射能分布実験

動物の飼育および実験手順は金沢大学動物実験規程に従い、動物実験委員会に承認後、実施した。マウスは自動照明システムによる 12 時間ごとの明暗の管理で、23°C で餌と水に自由に摂取できる状態で飼育された。

Colon-26 細胞を 1%メチルセルロースが添加された HEPES-BSS (KCl : 0.22 g / L、NaCl : 7.7 g / L、 Na_2HPO_4 : 0.14 g / L、D-glucose : 1.8 g / L、HEPES : 7.15 g / L) に懸濁

し、 1.0×10^6 cell / 100 μ L に調整した。6 週齢の BALB/c 雌ノーマルマウス（日本 SLC、浜松、日本）の背中に調製した細胞溶液を皮下注射し担がんマウスを作製した。腫瘍接種後 6 日目に未治療群、及び 5-FU 投与群の 2 群（各 $n=4$ ）にランダムに分け、未治療群には生理食塩水 200 μ L を、5-FU 投与群には 5-FU / 生理食塩水（12.5 mg / mL）を 5-FU として 150 mg / kg 体重の投与量で腹腔内に投与した。投与 24 時間後に、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ （90 kBq / 100 μ L）を尾静脈投与した。放射性プローブ投与 2 時間後に屠殺し、臓器を摘出し、それぞれの重量と放射能を測定した。体内放射能分布や腫瘍取り込みは、組織の重さ当たりの投与した放射能に対する割合（%dose/g）で表した。未治療群と 5-FU 投与群の臓器への放射能集積の有意差検定は、対応のない Student's t test により行い $p = 0.05$ 未満を有意差ありとした。

1.1.11 TUNEL 染色

放射能測定後の腫瘍組織を OTC コンパウンド（Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA）で包埋し、ドライアイス / ヘキサン中で凍結させ、クリオスタット HM525（Thermo Fisher Scientific Inc, MA, Waltham）を用いて -25°C 下、10 μm にスライスし、腫瘍組織切片を作製した。ホルマリンで固定し、*In situ Apoptosis Detection Kit*（タカラバイオ、大津、日本）を用い、取扱説明書に従って TUNEL 染色を行った。PBS で 3 回洗浄後、エタノールで脱水し、キシレンで透徹を行った後、オイキット液で封入し、蛍光顕微鏡 BZ-9000（KEYENCE、大阪、日本）により観察した。1 腫瘍切片当たりランダムに倍率 200 倍でランダムに 10 視野を取り、1 視野に観察できる TUNEL 染色陽性細胞数を計測し、平均値を求めた。腫瘍の放射能集積と TUNEL 染色陽性細胞数の平均値の相関係数を単純回帰分析によって求め、 $p = 0.05$ 未満を有意差ありとした。

1.2 結果

1.2.1 標識実験

DPA-NH₂ と別途作成した¹²⁵I]SIB を反応させ、RP-HPLC で精製を行うことで、¹²⁵I]IB-DPA を放射化学的収率 42%、放射化学的純度 95%以上で得た。非放射性の IB-DPA と ¹²⁵I]IB-DPA をそれぞれ RP-HPLC で分析したところ、両者はほぼ同じ保持時間に溶出された (Figure 1-4 (b))。

[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA の前駆体である Tr-MAG3-DPA は、DPA-NH₂ と Tr-MAG3 のコンジュゲーションにより得た。Tr-MAG3-DPA のトリチル基を脱保護後、塩化スズ存在下、[^{99m}Tc]Tc(VII)O₄ から [^{99m}Tc]Tc(V)O³⁺ に還元し、MAG3 と配位させた。その後、RP-HPLC で精製することにより、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA を放射化学的収率 71%、放射化学的純度 95%以上で得た。また、テクネチウムには安定同位体が存在しないため、テクネチウムと同族の元素である非放射性レニウムを用いた錯体、Re-MAG3-DPA を合成した。[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA には DPA 構造が含まれているため、^{99m}Tc が MAG3 ではなく、DPA と配位する可能性がある。^{99m}Tc が MAG3 のみで配位されていることを確認するために、Re-MAG3-DPA は、事前に形成した非放射性 Re-MAG3 と DPA-NH₂ のカップリングによって調製した。[^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA は Re-MAG3-DPA と類似の保持時間を示しており、これらの構造的類似性が確認された (Figure 1-4 (a))。

[¹²⁵I]IB-ZnDPA と [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA は、¹²⁵I]IB-DPA と [^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA をそれぞれ硝酸亜鉛水溶液と混合することで追加の精製なしに調製した。

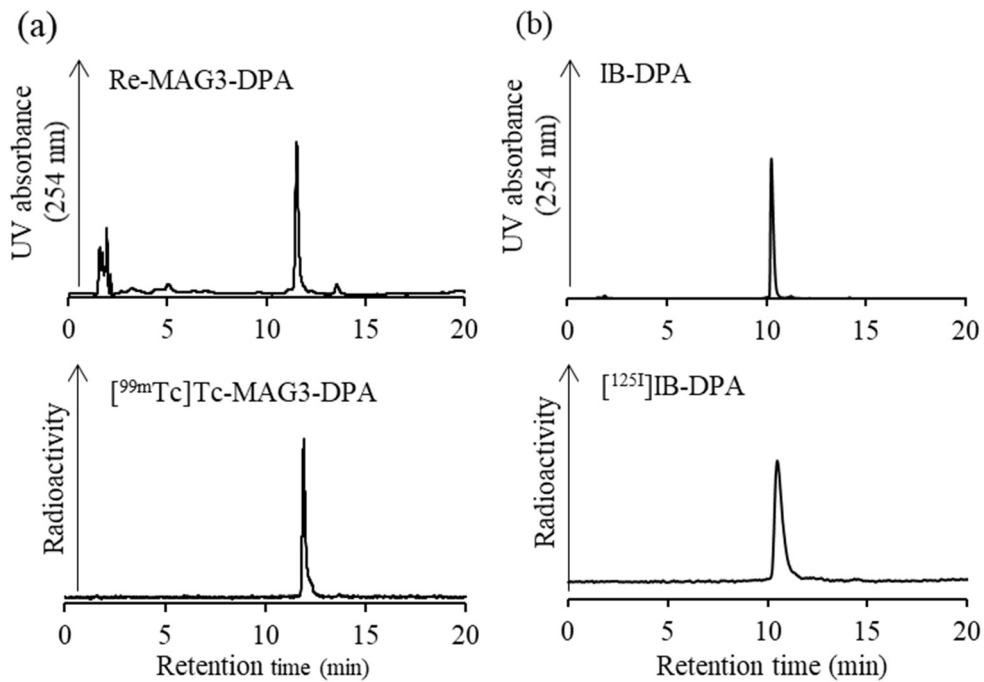


Figure 1-4. RP-HPLC chromatograms of (a) nonradioactive Re-MAG3-DPA and radioactive $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$. Conditions: A flow rate of 1 mL/min with a gradient mobile phase of 10% ethanol in water containing 0.1% TFA to 30% ethanol in water containing 0.1% TFA for 20 min. RP-HPLC chromatograms of (b) nonradioactive IB-DPA and radioactive $[^{125}\text{I}]\text{IB-DPA}$. Conditions: A flow rate of 1 mL/min with a gradient mobile phase of 40% methanol in water containing 0.1% TFA to 60% methanol in water containing 0.1% TFA for 20 min.

1.2.2 分配係数測定

$[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ および $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の分配係数 $\log P$ は、それぞれ 1.19 ± 0.03 および -0.23 ± 0.07 であり、 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ は $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ よりも脂溶性が高かった。

1.2.3 *In vitro* における安定性実験

37°C に加温したリン酸緩衝液中での放射性プローブの安定性実験の結果を **Figure 1-5** に示す。 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ は時間の経過とともに徐々に分解し、6 時間後は $78.2 \pm 4.0\%$ ($n = 3$) が未変化体で存在していた。一方、 $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ は比較的高い安定性を示し、6 時間後も 95%以上が未変化体で存在していた ($96.5 \pm 0.5\%$, $n = 3$)。

37°C に加温したマウスの血漿で 6 時間インキュベートしたところ、 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ および $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ はそれぞれ $89.7 \pm 7.2\%$ ($n = 3$) および $81.7 \pm 1.0\%$ ($n = 3$) が未変化体で存在していた。

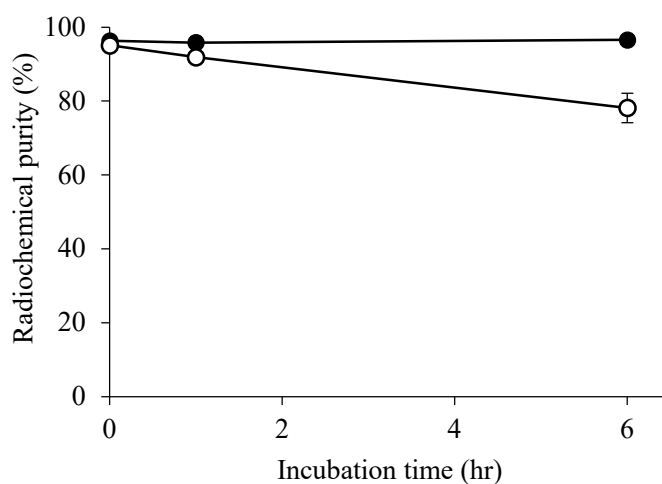


Figure 1-5. Stability of $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ (closed circle) and $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ (open circle) in phosphate buffer. All results are shown as mean \pm SD ($n = 3$).

1.2.4 細胞結合実験

5-FU を添加した培地で前処理した細胞（5-FU 処置群）と前処理しなかった細胞（対照群）に、放射性プローブを 2 時間曝露させ、放射性プローブの細胞への結合量を比較した。その結果を **Figure 1-6** に示す。 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の集積は対照群よりも 5-FU 処置群で有意に高かった。亜鉛未配位の $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-DPA}$ の集積も 5-FU 処置群で有意に高かったが、各群の集積量の差は亜鉛配位の $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の方が大きかった。一方 ^{125}I 標識体においては、U-87 MG 細胞における $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ のみ対照群よりも 5-FU 処置群で有意に集積したが、その差は小さい。その他の場合では、5-FU 処置群と対照群との間に有意な差は観察されなかった。

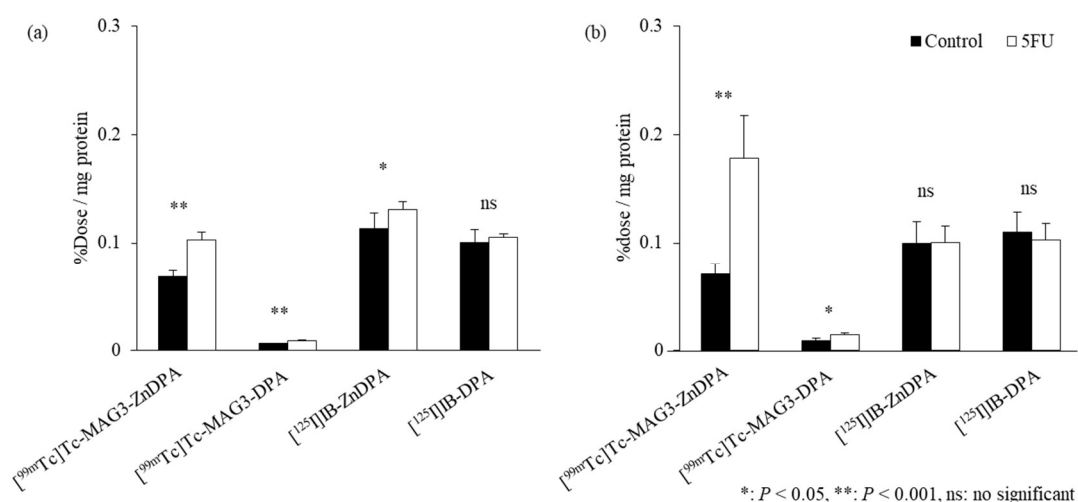


Figure 1-6. Cell binding studies using of (a) human neuronal glioblastoma cell line, U-87MG and (b) murine colon carcinoma cell line, Colon-26. All results are shown as mean \pm SD (n = 5-6).

1.2.5 担がんマウスにおける体内放射能分布実験

担がんマウスにおける ^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA 投与2時間後の体内放射能分布を **Table 1-1** に示す。放射性プローブ投与前日の 5-FU 投与の有無で比較したところ、5-FU 投与群では腫瘍への放射能集積が有意に増加した。他の組織への取り込みは、5-FU 投与群と未治療群の間で有意差はなかった。 ^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA は主に小腸に分布し、その集積は肝臓、大腸、腎臓でも高かった。

Table 1-1. Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of ^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA in Colon26 tumor-bearing mice.

Tissue	Non-treatment group		5-FU treatment group	
	%ID/g	SD	%ID/g	SD
Blood	0.33	0.04	0.29	0.06
Liver	11.21	5.49	9.02	3.33
Kidney	2.83	0.71	3.76	0.66
Small-Intestine	104.73	11.44	104.59	17.15
Large-Intestine	2.56	2.70	2.63	1.35
Spleen	0.38	0.17	0.29	0.11
Pancreas	0.41	0.20	0.96	1.07
Lung	0.56	0.26	0.64	0.20
Heart	0.26	0.09	0.27	0.02
Stomach [†]	0.42	0.09	0.56	0.23
Bone	0.37	0.05	0.41	0.04
Muscle	0.23	0.04	0.25	0.10
Brain	0.02	0.01	0.02	0.00
Tumor	0.19	0.02	0.34*	0.03

Data are expressed as % injected dose per gram tissue (%ID/g). Each value represents the mean (SD) for three or four animals. Significance was determined using student-t test (* $p < 0.05$, vs. control)

[†] Data are expressed as % injected dose.

1.2.6 腫瘍への放射性プローブの集積と TUNEL 染色陽性細胞数の比較

腫瘍における放射性プローブの蓄積が細胞死に関連しているか確認するため、放射能測定後の腫瘍組織から凍結切片を作製し、細胞死の検出に用いられる TUNEL 染色を行った。Figure 1-7 (a) および (b) は、それぞれ未治療群および 5-FU 治療群のマウスから得られた代表的な染色画像を示す。5-FU 投与群のマウスでは、より多くの TUNEL 陽性細胞が観察され、この群における細胞死が多いことを示唆している。腫瘍への放射能集積を横軸に、TUNEL 染色陽性細胞数を縦軸にとり、グラフを作成したところ、Figure 1-7 (c) に示すように有意な正の相関を示した ($r = 0.658$, $p < 0.05$)。

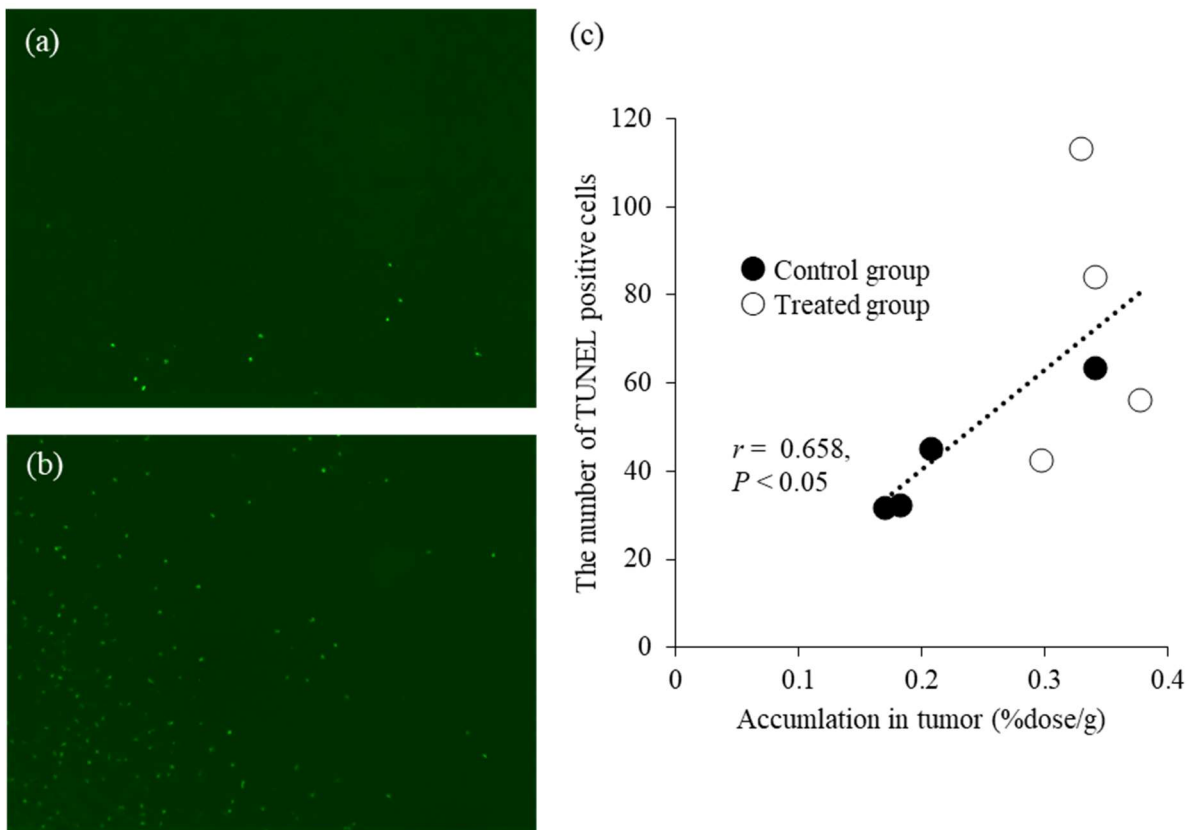


Figure 1-7: Representative TUNEL-stained images of tumor splices ($\times 200$) in (a) a control mouse and (b) a 150 mg/kg of 5-FU-treated mouse. (c) Correlation between TUNEL-positive cells and tumor uptake.

1.3 考察

アポトーシス、ネクローシス、オートファジーなど、さまざまなタイプの細胞死に関連して細胞膜の非対称性の喪失が起きる。このとき、通常は脂質二重層の内側に存在している PS が外側に転移する現象がみられることから、PS を標的とし、PS に親和性のある Zn-DPA を細胞死検出のプロープとして使用した細胞死イメージング剤を設計・合成・評価した。

標識操作により $[^{125}\text{I}]\text{IB-DPA}$ および $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-DPA}$ を生成後、硝酸亜鉛と混合することで、 $[^{125}\text{I}]\text{IB-ZnDPA}$ および $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の調製を行った。Ojida らによって、DPA に存在する 2 つの Zn(II) 結合の錯形成定数は、それぞれ $>1 \times 10^6$ および約 $3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ であると推定されている(43)。そこで、硝酸亜鉛と $[^{125}\text{I}]\text{IB-DPA}$ および $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-DPA}$ の混合の際には、DPA と亜鉛を配位させるのに計算上十分であると考えられる 0.75 mM の濃度の硝酸亜鉛を用いた。DPA と Zn の実際の配位は確認していないものの、 $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-DPA}$ と $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の *in vitro* 特性の違いにより、配位していると判断した。

In vitro 細胞結合実験において、細胞の 5-FU 曝露の有無で放射性プロープの集積を比較したところ、5-FU 処置群において $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ の集積が有意に高かった。Zn-DPA 誘導体は死細胞上の PS に結合するためこの結果は妥当である。一方、 $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ より低い集積ではあるが、亜鉛を配位していない $[^{99\text{m}}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-DPA}$ も 5-FU 処理により有意に細胞集積が増加した。この理由について次のように考察した。Wang らは蛍光標識 DPA 誘導体が亜鉛の配位の有無にかかわらず FITC-Annexin A5 と同じ染色プロファイルを示すことを報告している(44)。この理由として Wang らは、DPA は死細胞内の不安定な亜鉛と配位することで細胞死を検出する能力を獲得し、亜鉛配位のない DPA も Zn-DPA よりも弱い PS 親和性であるが細胞死を検出できたと推測している(44)。さらに、Hu らは亜鉛を配位していない DPA 誘導体は脂肪滴 (LD) を効果的に染色したと報告している(45)。LD は膜合成のために中性脂質を保存する細胞小器官で

あり、アポトーシスによって細胞質に LD の蓄積が起きる可能性があることが報告されている。Hu らは抗生物質スタウロスポリンで処理した HeLa 細胞において、蛍光標識 DPA と LD イメージングに用いられる Nile Red で染色した画像はよく重なることを報告し、DPA が LD を検出することを実証した。したがって、5-FU 処理細胞における亜鉛未配位の ^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA の蓄積は、(1) 細胞表面の PS への結合と (2) 細胞内 LD への結合の 2 種類のメカニズムによって引き起こされる可能性が考えられる。しかしながら、水溶性が高い ^{99m}Tc]Tc-MAG3-DPA の細胞膜への透過性は低く、(2) の寄与による集積は少ないはずであり、おそらく (1) の機序により集積したと考えられる。

In vitro 実験における ^{125}I]IB-ZnDPA の比較的高い細胞集積は、それらの脂溶性が原因であると推定される。細胞死を検出するために Zn-DPA 誘導体は細胞膜表面に露出した PS に結合する必要があるが、脂溶性の高い ^{125}I]IB-ZnDPA は細胞膜の表面に結合するだけでなく、細胞膜を透過し、細胞内にも集積したと考えられる。そのため、 ^{125}I]IB-ZnDPA は細胞死の検出には適さないと判断し、 ^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA のみを *in vivo* で評価することとした。

治療の効果を判断するために細胞死イメージング剤を投与し、PET や SPECT などのイメージングモダリティを使用する場合、同じ個人での治療前後の病変部位における放射能の集積を比較する。本研究では、同一マウスによる集積の比較ではなく、担がんマウスを 5-FU 投与群と未投与群に分け、その翌日の ^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA の体内分布を 5-FU 治療の有無で比較することによって評価した。5-FU の投与量は以前の研究に基づき 150mg/kg に設定しており、この投与量の治療により腫瘍の成長を有意に抑制することが確認されている(35)。5-FU の投与により腫瘍の細胞死が誘発されたと考えられ、所期の通り、未投与群よりも 5-FU 投与群のマウス腫瘍への放射能取り込みは有意に高かった (Table 1-1)。未投与群のうち 1 匹のマウスは、高い放射能の蓄積を示したがこの腫瘍の TUNEL 陽性細胞の数も同様に高いことが確認された (Figure 1-7 (c))。このことから、Zn-DPA 誘導体が抗がん剤への曝露以外の理由で死んだ細胞に結合する可能

性が示唆された。実験に用いたすべてマウスの結果を総合すると、腫瘍への放射能の蓄積は TUNEL 陽性細胞の数と正の相関があった (Figure 1-7 (c)、 $R = 0.658$)。これらの結果は、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ が細胞死に依存した集積を示し、化学療法の効果を判断する治療効果判定に役立つことを示唆している。

一方で、特に小腸での蓄積が非常に高く、腹部の細胞死の検出には適さない体内分布を示した。 ^{18}F 標識 Zn-DPA(44)、 $^{99m}\text{Tc}-(\text{CO})_3$ 標識 Zn-DPA(46)、 $^{99m}\text{Tc-HYNIC}$ 標識 Zn-DPA(46)などの他の Zn-DPA 誘導体も、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ と同様に小腸や肝臓で高い蓄積を示していることから、Zn-DPA 誘導体は基本的に肝臓に取り込まれ、胆汁排泄により腸に排泄されると推定した。一方、 $^{111}\text{In-DTPA}$ または $^{111}\text{In-DOTA}$ 標識 Zn-DPA の親水性は高く、 $^{111}\text{In-DTPA}$ 標識 Zn-DPA および $^{111}\text{In-DOTA}$ 標識 Zn-DPA は肝臓への取り込みが少ないことが報告されている(47)。より高い親水性は、Zn-DPA を含む放射性プローブの生体内分布を改善することが期待される。

排泄経路以外の問題点として、5-FU を投与した場合でも未治療の場合と比較して放射性プローブの集積の増加は 1.8 倍程度であり、シグナル強度は低い。前述の通り、小腸や肝臓といった非標的組織では高集積であるため、画像のコントラストが低くなることが予想される。問題を解決するためには非標的臓器からの迅速な排除を促進し(ノイズの低減)、PS への親和性を高めること(シグナルの増強)により、シグナル / ノイズ比を改善する必要がある。PS の親和性を向上させるためには、Zn-DPA ユニットの数を増やすことと、Zn-DPA の構造を変更することが候補となる。前者の例として、細胞死の検出ではないものの、感染症の画像化に関する研究で ^{111}In 標識 Zn-DPA が報告されている(47)。後者の例として、DPA 構造に修飾を加えたり、DPA の数を増やしたりすることで作成した複数の Zn-DPA 誘導体から、PS 親和性が増強した Zn-DPA が見出されている(36)。現在のところ小腸や肝臓といった腹部への放射能集積の問題は解決されていないが、PS の親和性が高まればコントラストが高い画像を提供する放射性核種標識 Zn-DPA 得られる可能性がある。

以上、抗がん剤を投与した担がんマウスを用いた検討において、 $[^{99m}\text{Tc}]\text{Tc-MAG3-ZnDPA}$ が細胞死に特異的に集積し、細胞死検出が可能性であること示唆された。一方で、シグナル強度の低さや肝臓や腸管における高集積などイメージング剤として使用する際の弱点が明らかになった。これらの結果から、本研究は抗がん剤の治療効果判定を目的とした放射性プローブを開発する際の足掛かりになると考えられる。

第 2 章

前立腺癌の標的 α 線治療を目的とした Bombesin 誘導体の基礎的検討

前立腺癌は全世界で年間 110 万人が罹患し男性がんの第 2 位である(48)。元来欧米に多く、日本での罹患率は高くないとされていたが、近年増加しており、2017 年の推計では男性がんの 1 位となっている。前立腺癌は他のがんと比較すると進行が遅く死亡率は低いものの、リンパ節や骨に転移することが多いという特徴がある(49)。転移した場合はホルモン療法が有効な治療法であるが、応答は一過性であり、ほとんどの患者はアンドロゲンレベルが低くとも前立腺特異抗原 (PSA) レベルが上昇する去勢抵抗性前立腺癌 (CRPC) と呼ばれる進行性疾患となる。そのため、ホルモン療法のみで完治することは困難であり(50)、別のアプローチによる治療法の開発が望まれている。

標的アイソトープ治療 (別名 : 内用療法、核医学治療、内照射療法、アイソトープ治療) とは体内に放射性同位元素 (RI) そのものや RI で標識された薬剤を投与して行う放射線治療である。一般的な外部照射による放射線治療はがんが原発巣にとどまっている場合は効果的であるが、転移した場合には有効とは言えない。一方、標的アイソトープ治療においては、薬剤がその特性に従って分布し、体内から放射線を照射するため作用は全身性で、転移がんの治療に有効である。現在日本で保険収載されている薬剤は β 線を放出する RI を利用したものが主であるが、 $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ (ゾーフィゴ[®]注射液) が 2016 年に α 線を放出する薬剤として初めて承認されるなど、 α 線を利用する治療に注目が集まっている。この理由として第一に、 α 線の線エネルギー付与は β 線よりも約 400-500 倍も高く、DNA をより強力に切断する (DNA 二本鎖切断) ことが可能であり、また、酸素濃度や細胞周期の影響を受けにくいことが挙げられる。このため β 線よりも治療に有利であり、高い治療効果が期待できる。第二に、飛程が 100 μm 以下と細胞数個分程度しかないため、周辺の正常組織への照射が最小限で、副作用の軽減が期待できる。実際に、 β を放出する $[^{89}\text{Sr}]\text{SrCl}_2$ (メタストロン[®]注射液) ではがん骨転移に対して疼痛

緩和効果のみ得られたのに対し、 α 線を放出する $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ （ゾーフィゴ®注射液）は骨転移を有するCRPC患者の生存期間の延長を示した(51)。また、別の α 線放出核種である ^{225}Ac を利用した ^{225}Ac 標識前立腺特異的膜抗原（PSMA）リガンド、 ^{225}Ac -PSMA-617は、薬事承認されていないものの、転移性CRPCに対して完全寛解した例を認め、非常に高い有効性を示した(52)。したがって、 α 線放出核種を用いた標的アイソトープ治療はCRPCにとって魅力的な治療戦略といえる。

アスタチン-211（以下、 ^{211}At ）は臨床使用が期待されている α 線放出核種の一つである。ハロゲンでありヨウ素と類似した化学的性質を有すること、標識操作や薬剤が標的組織に到達する時間を確保できる程よい半減期（7.2時間）を有することが魅力である。また、前述の ^{223}Ra や ^{225}Ac は海外での原子炉製造となるが、 ^{211}At は核原料物質の規制を受けることなく、安価な ^{209}Bi を原料としてサイクロトロン等の加速器で日本国内でも製造可能である。既に国内6か所以上のサイクロトロン所有施設で ^{211}At の製造実績があり、 ^{211}At 標識化合物の医療応用に向けた取り組みが進められている(11-14)。 ^{211}At を標的組織まで到達させるキャリア分子と結合させ、未反応の ^{211}At や標識反応の副生成物を取り除き、製剤化すれば、標的アイソトープ治療の薬剤として応用可能である。

ガストリン放出ペプチド受容体（以下、GRPR）は、前立腺癌や乳癌を含むさまざまな腫瘍で過剰発現していることが報告されている(17-19)。GRPRは前立腺癌細胞の膜には高密度に分布する一方で、通常の前立腺や前立腺肥大症の組織においてはほとんど発現していない(18)。また、前立腺癌患者のリンパ節や骨標本でも発現が確認されている(20)。したがって、GRPRリガンドは前立腺癌細胞に放射性核種を運搬するキャリア分子として適切である(21)。Bombesin（以下、BBN）はヨーロッパスズガエル（*Bombina orientalis*）の皮膚から単離された14残基のペプチドで、哺乳類のGRPRに対して高い親和性を有する。現在までに、前立腺癌を対象とした放射性標識BBN誘導体の報告が多数あり(19, 21, 22)、標的アイソトープ治療の薬剤としては ^{90}Y や ^{177}Lu など β 線放出核種を使用したものの報告がある。例えば、 ^{177}Lu -AMBAは、腫瘍増殖を抑制し、マウス

の生存率を高めたと報告され(53)、BBN をキャリアとして使用する標的アイソトープ治療が実証された。しかし、 ^{211}At を含む α 線放出核種で標識された GRPR 誘導体はまだ報告されていない。

本研究では、前立腺癌治療を目的とした標的アイソトープ治療薬の基礎的検討を行った。前立腺癌細胞へのキャリアとして BBN を選択し、 ^{211}At 導入部位との間に異なるリンカーを持ついくつかの ^{211}At 標識 BBN 誘導体 ($[^{211}\text{At}]\text{AB-1}$ ~ $[^{211}\text{At}]\text{AB-6}$) を設計した。アスタチンには安定同位体が存在しないことから、その代用として化学的性質が類似しているヨウ素を導入した BBN 誘導体、IB-BBN (IB-1~IB-6) を作成し、IB-BBN の GRPR への親和性を評価することで、作製する ^{211}At 標識 BBN 誘導体を決定した。なお、グルタミン酸残基を含む IB-5 は負電荷を有する BBN 誘導体は電荷をもたない BBN 誘導体よりも腫瘍組織への蓄積が有意に高いこと、ヒドロキシル基を含む IB-6 は非標的組織からのクリアランスが良好であることが報告されていたため(54)、作製した。

2.1 実験方法

2.1.1 試薬・機器

^{211}At は、福島県立医科大学設置の CYPRIS MP-30 サイクロトロン（住友重機械工業株式会社、東京、日本）を用い、 $^{209}\text{Bi}(\alpha, 2n)^{211}\text{At}$ 反応によって製造した。ビスマスからの ^{211}At の単離は、 850°C に加熱した炉心管での乾留によって行った。気化した ^{211}At は炉心管の下流に取り付けられた PTFE 製のチューブ（内径 2 mm、長さ 1 m）で捕捉され、クロロホルム溶液として回収した(55)。 $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin}$ は PerkinElmer (Waltham, MA) から購入した。Fmoc-Met-Rink-Amide MBHA Resin および bombesin は、株式会社ペプチド研究所（大阪、日本）から購入した。1-(9H-Fluoren-9-yl)-3-oxo-2,7,10-trioxa-4-azadodecan-12-oic acid (Fmoc-AEEA) は、Ark Pharm, Inc. (Arlington Heights, IL) から購入した。*N*-Succinimidyl 3-trimethylstannyl-benzoate (*m*-MeATE) は Toronto Research Chemicals (North York, カナダ) から購入した。その他の試薬は特級試薬を用いた。

HPLC 分析は、SPD-M20A フォトダイオードアレイ検出器、LC/MS-8040 質量分析計（島津製作所）または Gabi ガンマ線検出器（Elysia-Raytest、Straubenhardt、ドイツ）と組み合わせた Shimadzu Prominence シリーズを用いて行った。HPLC システムの制御とデータ処理には、島津製作所製 LabSolutions ソフトウェアを使用した。Cosmosil 5C₁₈-AR-II カラム（ナカライテスク）は、本文中の条件で使用した。放射能測定には、オートウェルガンマカウンター2480 WIZARD²（PerkinElmer）を使用した。

2.1.2 BBN 誘導体の合成

Table 2-1 に示す BBN 誘導体は Fmoc-Met-Rink-Amide MBHA Resin と保護アミノ酸誘導体を用いて Fmoc 固相合成法により保護ペプチド鎖を延長した。すなわち、N^α-Fmoc 基の脱保護反応と、側鎖保護 N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体の縮合反応を繰り返すことで実施した。N^α-Fmoc 基の脱保護には、20%ピペリジン / ジメチルホルムアミド (DMF) を用い、10 分間処理することで行った。縮合反応は、DMF 中での 3 等量の N^α-Fmoc-アミノ酸誘導体を 3 等量の 1-[bis(dimethylamino)methylene]-1H-benzotriazolium 3-oxide hexafluorophosphate (HBTU) と 1-hydroxybenzotriazole hydrate (HOBt)、及び 6 当量の *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) と *N*-methylpyrrolidone (NMP) を用い、15 分間反応させた。なお、DMF で洗浄後、樹脂の一部を採取して Kaiser test を行い、陰性を示すまで縮合反応を繰り返した。最後のアミノ酸残基の延長後、20%ピペリジン / DMF を使用して Fmoc 保護基を除去し、樹脂を乾燥させた。さらに、樹脂からのペプチド切断及び脱保護のため、25 μL の triisopropylsilane、62.5 μL の水、62.5 μL の ethanedithiol、2350 μL の TFA を 0°C で樹脂に添加し、室温で 1.5 時間攪拌した。樹脂のろ過で除去後、ろ液に氷冷したジエチルエーテルを添加して、粗ペプチドを析出させた。その後、遠心し、上澄みを除去する作業を 2 回繰り返した。得られた粗ペプチドは LC/MS によって同定し、Cosmosil 5C₁₈-AR-II (10×150 mm) を用いた RP-HPLC で精製した。BBN-1 の場合は、移動相が 20 分で 0.1%の TFA を含有する水:メタノール 80 : 20 から 70 : 30 へ変換

するグラジエント法にて；BBN-2、4、5、および6の場合は、0.1%のTFAを含有する水:アセトニトリル75：25のイソクラティック法で；BBN-3の場合は、0.1%のTFAを含有する水:アセトニトリル73：27のイソクラティック法で；それぞれ流速4.0 mL/minの条件で行った。凍結乾燥により溶媒を除去して、BBN誘導体（BBN-1～BBN-6）の粉末を得た。

2.1.3 非放射性 IB-BBN の合成

非放射性 IB-BBN は、0.05%トリエチルアミンを含む75%アセトニトリル水溶液中で100分間、BBN誘導体（BBN-1～BBN-6）と1.75等量の*N*-succinimidyl 3-iodobenzoate (SIB)を振とうし、反応させた（**Figure 2-1**）。LC/MSによって同定し、RP-HPLCにより精製した。Cosmosil 5C₁₈-AR-II（10×150 mm）を用いて、IB-4、IB-5およびIB-6の場合、0.1%のTFAを含有する水:アセトニトリル65：35のイソクラティック法で；IB-1およびIB-3の場合、0.1%のTFAを含有する水:アセトニトリル63：37のイソクラティック法で；IB-2の場合、0.1%のTFAを含有する水：アセトニトリル60：40のイソクラティック法で；それぞれ流速4.0 mL / minの条件で行った。溶媒をエバポレーターで除去し、IB-BBN（IB-1～IB-6）を得た。

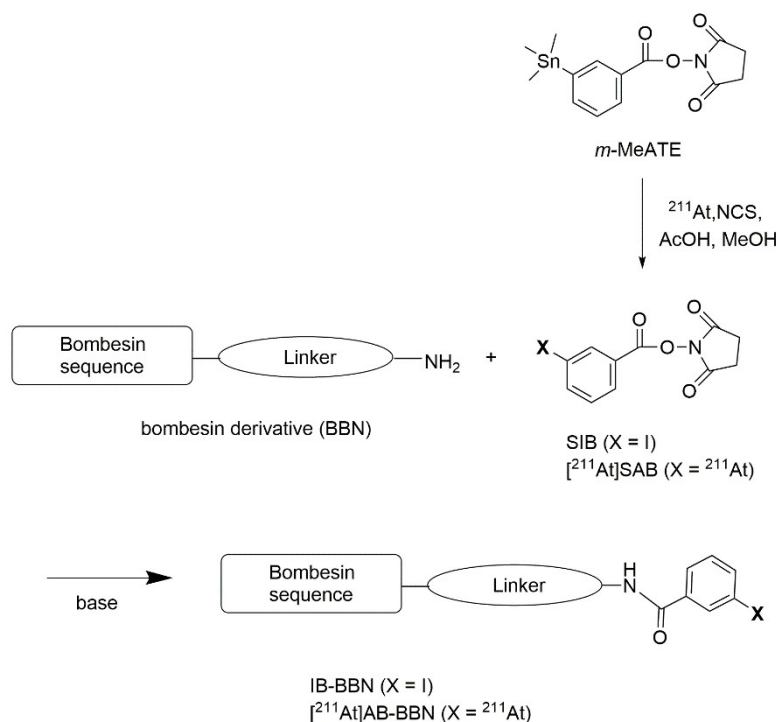


Figure 2-1: Scheme of IB-BBN and [^{211}At]AB-BBN

2.1.4 細胞培養条件

PC-3 細胞 (JCRB9110) は国立研究開発法人 医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク (日本、大阪) から入手し、7%FBS、1%非必須アミノ酸、ペニシリン (100 units / mL)、およびストレプトマイシン (100 μg / mL) を含む Ham's F-12K (Kaighn's) 培地 (和光純薬工業 (現 富士フイルム和光純薬)、大阪、日本) を用い、5%CO₂ を含む加湿空気中、37°C で培養した。

2.1.5 GRPR との親和性評価

GRPR に対する天然 BBN および合成 IB-BBN の結合親和性は、GRPR を発現することが知られているヒト前立腺癌細胞 PC-3(56)を用い、GRPR 特異的に結合する放射性リガンド [^{125}I]Tyr⁴-bombesin との競合結合実験によって求めた。実験は、以前に報告された

方法(57)をわずかに変更して行った。50%阻害濃度 (IC₅₀) は、GraphPad Prism 7 ソフトウェア (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA) を使用した非線形回帰分析によって計算した。天然 BBN、IB-2、IB-3、および IB-4 の IC₅₀ 値は、3 回の独立した実験を行い、他の IB-BBN の IC₅₀ 値は天然 BBN の値よりも高い値を示したため、1 回のみ行った。

2.1.6 [²¹¹At]AB-3 の調製

Figure 2-1 に示すように、²¹¹At 導入試薬 *N*-succinimidyl 3-[²¹¹At]astatobenzoate ([²¹¹At]SAB) を調製し、続いて BBN-3 と縮合させることで目的物 [²¹¹At]AB-3 を得た。

[²¹¹At]SAB は、次の手順で調製した。まずクロロホルムで溶出した ²¹¹At を反応容器に入れ、クロロホルムを窒素ガスで穏やかに蒸発させた。その後、反応容器に 0.1 μmol の *m*-MeATE、11 μL の *N*-chlorosuccinimide / MeOH (1 mg / mL)、および 41 μL の 1%酢酸 / MeOH を加えた。反応溶液を室温で 15 分間静置した後、RP-HPLC を使用して [²¹¹At]SAB を精製した。Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6×150 mm) を用いて、移動相が 20 分で 0.1%の TFA を含有する水 : メタノール 60: 40 から 40 : 60 へ変換するグラジエント法にて流速 1.0 mL/min の条件で行った。 [²¹¹At]SAB を含む画分を収集し、水で 2 倍希釈した後、活性化した Sep-Pak C18 Plus Light カートリッジ (Waters, Milford, MA) に通過させることでカートリッジに保持させた。水 5 mL でカートリッジを洗浄後、0.3-0.4 mL のアセトニトリルで溶出することで [²¹¹At]SAB のアセトニトリル溶液を得た。

50 μL の 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) に溶解した 25-50 μg の BBN-3 に、100 μL の [²¹¹At]SAB / アセトニトリルを加え、室温で 20 分間静置した。反応を停止するために、25 μL の 0.2 M メチオニン / 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.5) を反応混合物に加え、ボルテックス後 5 分間静置した。その後、 [²¹¹At]AB-3 は、RP-HPLC により精製した。Cosmosil 5C₁₈-AR-II (4.6×150 mm) を用い、0.1%の TFA を含有する水 : アセトニトリル 65 : 35 のイソクラティック法にて流速 1 mL / min の条件で行った。フラクションを回収するチュ

ープには、酸化分解を防ぐために 12.5 μL の 20%アスコルビン酸ナトリウム水溶液を事
前に入れ、0.25 mL ずつフラクションを回収した。 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を含むフラクションに 10
 μL の 1%ポリソルベート水溶液を添加した後、エバポレーターを使用してアセトニトリ
ルを除去した。

2.1.7 *In vitro* での $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の安定性試験

$[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の 37°C での安定性を評価するため、PBS で 10 倍希釈し、溶液を 37°C で
インキュベートした。その後、1、3、6、および 12 時間後に RP-HPLC で分析した。分
析条件は 2.1.6 で示した $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の精製と同条件で行った。さらに、37°C のマウス血
漿中での $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の経時的な安定性 (2、15、30、60 分間) を、1.1.8 と同様の手順を
用いて調べた。代謝物の同定のため、非放射性 IB-3 もマウス血漿中で 37°C で 60 分間
インキュベートし、徐タンパク操作を行った後、LC/MS で分析した。

2.1.8 *in vivo* での $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の安定性試験

マウス血中の $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の放射化学的純度を測定するために、雄の BALB/c nu/nu マ
ウス (日本 SLC、浜松、日本) に 100 μL の $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ (750 kBq) を尾静脈注射した。
注射後 2 分 (n=3) または 5 分 (n=1) で、マウスをと殺し、血液サンプルを得た。10,000g
で 3 分間遠心して血漿を分離した後、血漿に等量の氷冷アセトニトリルを加え、混合物
を 10,000g で 3 分間遠心分離した。上清を 0.45 μm フィルターで濾過し、RP-HPLC で分
析し、放射化学的純度を求めた。

2.1.9 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の細胞内在化の確認

ヒト前立腺癌細胞 PC-3 を使用した $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の内在化の確認は、過去に報告された
方法(58)をわずかに変更して行った。12 ウェルプレートに 2.4×10^5 cells/well の PC-3 細
胞を事前に蒔き、24 時間後、1%FBS を添加した氷冷培地で細胞を 2 回洗浄した。ウェ

ルに 0.8 mL の培地を入れ、さらに実験群には 0.1 mL の 0.5%BSA/PBS を、非特異的な結合を測定する群には 10 μ M BBN を含む 0.5%BSA / PBS を加えた。次に、0.5%BSA / PBS で溶解した 0.1 mL の [^{211}At]AB-3 (10.1 kBq/well) を各ウェルに加えた。37°C で 5、15、30、60、および 120 分間インキュベーション後、1%FBS を添加した氷冷培地で細胞を 2 回洗浄した。細胞を酸洗浄バッファー (0.1 M NaCl を含む 50 mM グリシン緩衝液 (pH2.8)) で 5 分間浸漬し、酸洗浄バッファーを測定用チューブに回収した。ここで得られた画分を膜結合放射性リガンド画分 (MRF) と呼ぶ。最後に、細胞を PBS で洗浄後、0.5 mL \times 2 の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて細胞を溶解し、その溶液を測定用チューブに回収した。ここで得られた画分を内在化放射性リガンド画分 (IRF) と呼ぶ。MRF および IRF の放射能をガンマカウンターで測定し、添加した放射能に対する各画分の放射能の割合から、膜に結合した割合及び内在化した割合を求めた。

2.1.10 [^{211}At]AB-3 の細胞外流出の確認

[^{211}At]AB-3 の細胞外流出の確認は、過去に報告された方法(54, 59)をわずかに変更して行った。細胞への [^{211}At]AB-3 の添加までは 2.1.9 と同様の手順で行ったが、60 分間インキュベーション後に細胞を 1%FBS 添加の氷冷培地で洗浄した。その後、1 mL の無血清培地を加え、37°C で 15、30、60、120 分間インキュベートし、各時点で上清を回収した。これは細胞外に放出された放射能に相当する。さらに、細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄後、0.5 mL \times 2 の 1 M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて細胞を溶解し、その溶液を回収した。これは細胞に残留した放射能に相当する。回収した上清と細胞溶解液の放射能はガンマカウンターで測定した。細胞から放出された放射能と残留した放射能の合計を細胞に取り込み放射能とみなし、流出率 (%) は、取り込み放射能に対する放出された放射能の割合として計算した。

2.1.11 前立腺癌モデルマウスにおける体内放射能分布実験

動物の飼育および実験手順は、福島県立医科大学動物実験委員会に承認され、実施された。マウスは、自動照明システムによる12時間ごとの明暗の管理で、23°Cで餌と水に自由に摂取できる状態で飼育された。PBSを用いて 5×10^6 cells/100 μ Lになるように調整をしたPC-3細胞をヌードマウス（BALB/c nu/ nuマウス、雄性、4週齢、体重21-25 g、日本SLC）の右肩皮下へ移植した。移植12日後に $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ （85 kBq/100 μ L）を尾静脈投与した。この際の投与溶媒は2%のアスコルビン酸ナトリウムおよび0.05%のポリソルベートを含有する生理食塩水であり、BBN添加群にはさらに100 μ Lあたり100 μ gの天然BBNを添加した投与溶媒を使用した。投与後1時間で屠殺し、臓器を摘出し、それぞれの重量と放射能を測定した。

放射能の生体内分布は、組織1gあたりの投与放射能に対する組織内放射能の割合（%ID/g）と投与放射能に対する組織内放射能の割合（%ID）として表した。血液、血漿、筋肉、骨はそれぞれ、体重の8%、4.3%、48%、5%と推定し、計算した(60)。対照群とBBN添加群の臓器への放射能集積の有意差検定は、対応のないStudent's t testにより行い、 $P = 0.05$ 未満を有意差ありとした。

2.2 結果

2.2.1 非放射性IB-BBNの合成および*in vitro*でのGRPRへの親和性の評価

BBN誘導体（BBN-1～BBN-6）のアミノ酸配列、収率、質量分析の結果をTable 2-1に示す。BBN-1～BBN-6に非放射性SIBを結合させることにより、IB-BBN（IB-1～IB-6）を合成し、澄明なオイル状態で得た。さらに、 $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin}$ を使用した競合結合実験により、IB-BBNのGRPRへの親和性の評価を行った。IB-BBNの収率、質量分析の結果、及び $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin}$ に対する IC_{50} をTable 2-2に示す。IB-5およびIB-6は、天然BBNよりも低いGRPR親和性を示した一方で、IB-2、IB-3、およびIB-4は、天然BBNと同程度の親和性を示した。

Table 2-1: The sequence and analytical data of BBN derivatives.

	Additional sequence	BBN sequence														[M+H] ⁺		Yield (%)
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	calc.	found ^a	
Native BBN	—	Pyr	Q	R	L	G	N	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	—	—	—
BBN-1	—	Pyr	Q	K	L	G	N	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	796.4 ^b	796.6	16.2
BBN-2	—	—	—	—	—	—	—	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	940.5	940.5	52.7
BBN-3	(CH ₂ -CH ₂ -O) ₂	—	—	—	—	—	—	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	1085.5	1085.6	74.5
BBN-4	βA βA βA	—	—	—	—	—	—	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	1153.6	1153.6	78.7
BBN-5	βA βA S	—	—	—	—	—	—	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	1169.6	1169.6	12.9
BBN-6	βA βA E	—	—	—	—	—	—	Q	W	A	V	G	H	L	MENH ₂	1211.6	1211.6	26.1

Pyr: Pyroglutamic acid, βA: β-Alanine, M-NH₂: amidated methionine

^a Mass values were obtained by ESI-MS. ^b This calculated value was based on [M+2H]²⁺.

Table 2-2: Analytical data of nonradioactive IB-BBN derivatives.

Compound	[M+H] ⁺		yield (%)	IC ₅₀ (nM) ^c
	calc	found ^a		
Bombesin	-	-	-	0.53 ± 0.01
IB-1	911.4 ^c	911.7	49.5	0.85 ^d
IB-2	1170.4	1170.5	62.3	0.34 ± 0.29
IB-3	1315.5	1315.6	75.0	0.52 ± 0.29
IB-4	1383.5	1383.7	52.6	0.33 ± 0.01
IB-5	700.3 ^b	700.5	21.0	3.91 ^d
IB-6	1441.5	1141.6	64.8	1.67 ^d

^a Mass values were obtained by ESI-MS. ^b This calculated value was based on [M+2H]²⁺. ^c Affinities for GRPR were determined with [¹²⁵I]Tyr⁴-bombesin in PC-3 prostatic cancer cell line. ^d Result of one experiment

2.2.2 [²¹¹At]AB-3 の合成

[²¹¹At]SAB の HPLC 精製後の放射化学的収率は、79.5 ± 4.4% (減衰補正あり、n = 3) であった。 [²¹¹At]SAB と BBN-3 の縮合率は、28.2 ± 2.4% (減衰補正あり、n = 3) であった。放射化学的純度は、*in vivo* での安定性試験に使用したバッチ (90.2%) を除いて、95%以上だった。 **Figure 2-2** に精製後の HPLC のクロマトグラムを示す。 [²¹¹At]AB-3 の保持時間は 8.1 分で、非放射性 IB-3 の保持時間 7.6 分と類似していた。なお、UV 検出器とガンマ検出器間の遅延時間は約 0.5 分であり、この保持時間の差は妥当である。以前の報告では、保持時間に対応する非放射性ヨウ素導入化合物と比較することにより、²¹¹At 標識化合物の構造を検証しており (61, 62)、この研究における保持時間の類似性は以前の報告と一致している。

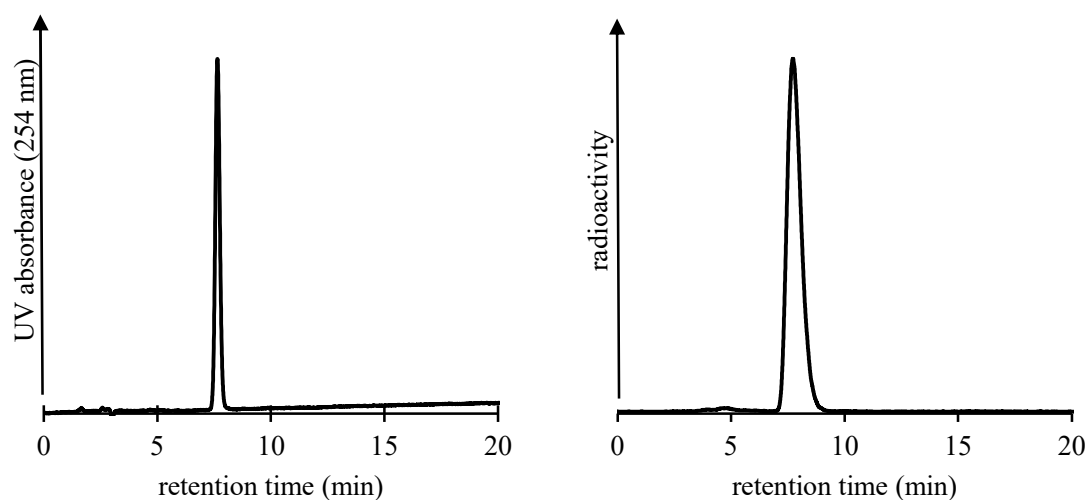


Figure 2-2 RP-HPLC chromatograms of (a) nonradioactive IB-3 ($t_R = 7.6$ min) and (b) [^{211}At]AB-3 ($t_R = 8.1$ min). Solvents: A:0.1%TFA / H_2O and B: 0.1% TFA / acetonitrile. The column temperature was maintained at 40°C . The time program: 35% solvent B for 10 min; 35-100% solvent B in 0.5 min; 100% solvent B for 5 min; 100-35% solvent B in 0.5 min; 35% solvent B for column re-equilibration, flow rate:1 mL/min.

2.2.3 *In vitro* および *in vivo* での安定性試験

[²¹¹At]AB-3 は PBS 中では 12 時間後でも 92.1 ± 0.2% が未変化体で存在し、安定であったが、マウスの血漿では、**Figure 2-3** に示すように 1 時間以内に徐々に分解した。

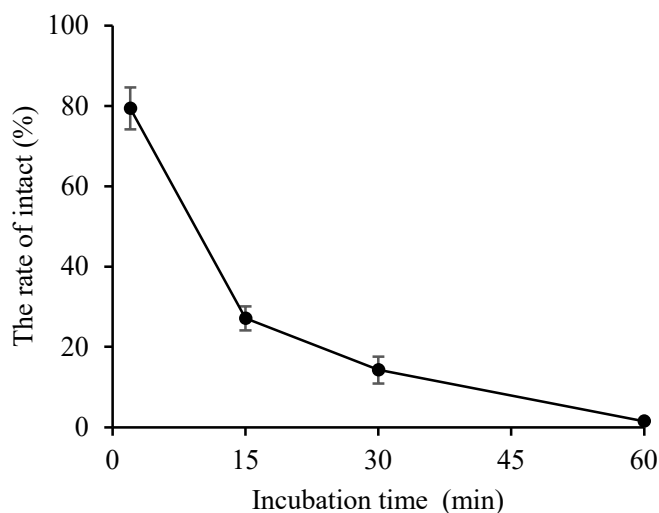


Figure 2-3: Stability of [²¹¹At]AB-3 in murine plasma at 37°C. All results are shown as mean ± SD (n = 3).

Figure 2-4 (a) 及び (b) は、非放射性 IB-3 および [²¹¹At]AB-3 のマウス血漿での 1 時間のインキュベーション後のクロマトグラムを示す。(a) において保持時間 6.0 分のピークは、m/z: 708.2 であった。ペプチド結合が切断させて生成する代謝物のうち、一つの構造式 (**Figure 2-4** (c)) m/z [M+H]⁺: 708.2 と一致したことから、[²¹¹At]AB-3 は血漿中で Trp⁸ と Ala⁹ の間のアミド結合が切断されることが示唆された。

In vitro では経時的に分解することが示されたものの、*in vivo* で [²¹¹At]AB-3 はマウスへの投与 2 分後において血中で 82.9 ± 4.7% が未変化体で存在していた。したがって、投与早期であれば [²¹¹At]AB-3 は腫瘍に到達可能であり、集積する可能性がある。なお、投与後 5 分後以降の長期的な安定性は血中の放射能が低く調査できなかった。

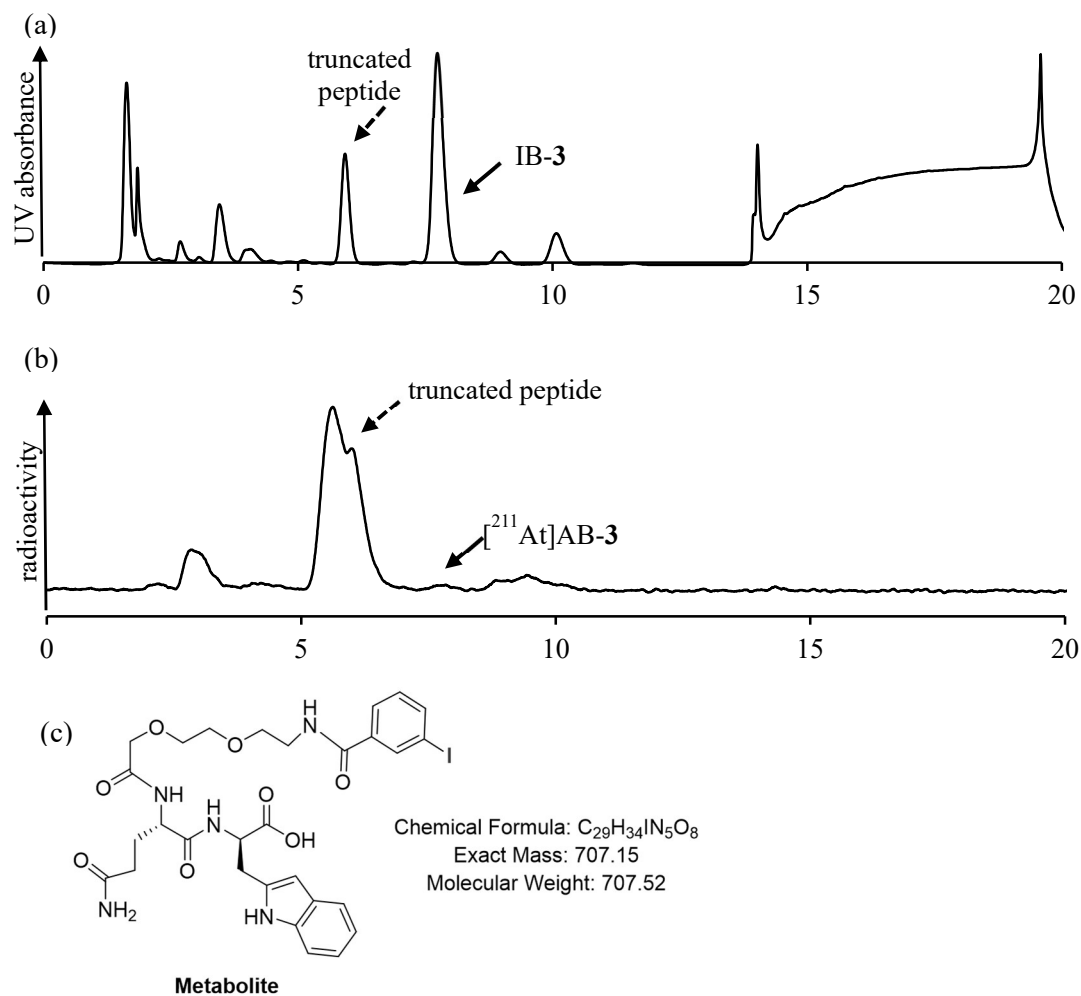


Figure 2-4 Chromatograms of (a) nonradioactive IB-3 and (b) $[^{211}\text{At}]$ AB-3 after incubation in murine plasma at 37°C for 1 h. (c) The structure of expected metabolite.

2.2.4 [²¹¹At]AB-3 の細胞内在化及び外在化の確認

PC-3 細胞への[²¹¹At]AB-3 の結合量の時間変化を **Figure 2-4** に示す。[²¹¹At]AB-3 は細胞に時間経過に従って結合し、結合は 60 分で飽和した。添加した薬剤のうち細胞内部に約 20%、細胞膜表面に約 5%が結合した。即ち、[²¹¹At]AB-3 は細胞に約 25%が結合し、そのうち約 80%が内在化した。この内在化パターンは、他の BBN 誘導体について以前に報告されたパターンと類似していた(58, 63)。また、非特異的な結合を測定するため、[²¹¹At]AB-3 と共に 1 μM の BBN を添加した群 (**Figure 2-4** における nonspecific に相当) では、[²¹¹At]AB-3 の細胞への結合が有意に低下した。

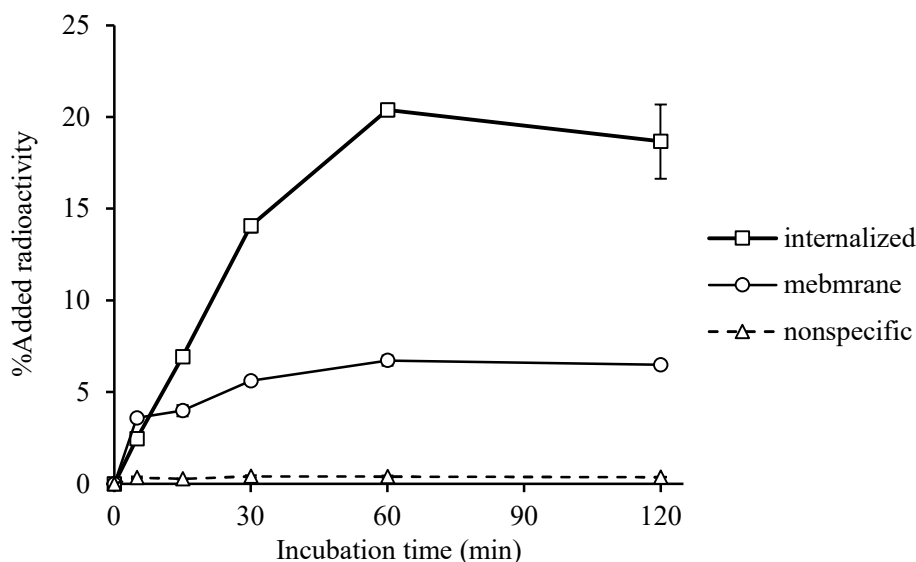


Figure 2-4: Internalization of [²¹¹At]AB-3 in PC-3 cells with or without the addition of native BBN (1 μM). The internalized or membrane-bound values were expressed as the percentage of added radioactivity (n = 3).

一方、60 分間の曝露後、培地から未結合の $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を取り除いたところ、**Figure 2-5** に示すように、時間の経過とともに放射能が放出された。

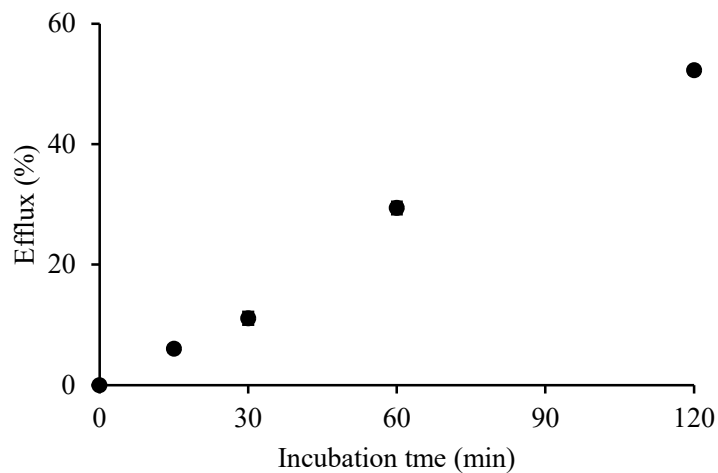


Figure 2-5: Externalization experiments of $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ in PC-3 cells were performed after 60 min of internalization. The efflux values were expressed as the ratio of the released radioactivity to the sum of released and remaining radioactivity ($n = 4$).

2.2.5 前立腺癌担がんマウスにおける体内放射能分布実験

PC-3 細胞担がんマウスにおける $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の体内放射能分布を **Table 2-3** に示す。腫瘍に到達する前に、血漿中での $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の分解し、集積しないことが懸念されたが、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は投与後 1 時間で腫瘍に集積した ($4.05 \pm 0.73 \% \text{ID/g}$)。天然 BBN を同時投与した BBN 添加群では、GRPR 発現が高い腫瘍および膵臓での放射能集積が、対照群と比較して大幅に減少した。

Table 2-3: Biodistribution of radioactivity after intravenous injection of [²¹¹At]AB-3 in PC-3 tumor-bearing mice.

Tissue	1 h		1 h-blocking	
	%ID/g	%ID	%ID/g	%ID
Blood	1.78 ± 0.24	2.46 ± 0.34	2.01 ± 0.16	2.78 ± 0.19
Plasma	1.73 ± 0.22	1.27 ± 0.18	1.80 ± 0.12	1.32 ± 0.08
Muscle	0.56 ± 0.10	5.14 ± 0.90	0.65 ± 0.04	6.02 ± 0.61
Heart	2.19 ± 0.40	0.23 ± 0.03	2.48 ± 0.23	0.25 ± 0.03
Lungs	7.28 ± 0.98	0.89 ± 0.14	138 ± 12.1*	20.0 ± 1.44*
Spleen	7.66 ± 1.22	0.63 ± 0.12	11.6 ± 1.66*	1.05 ± 0.21*
Pancreas	4.03 ± 0.38	0.64 ± 0.08	2.53 ± 0.45*	0.39 ± 0.05*
Testicle	2.28 ± 0.38	0.19 ± 0.03	2.06 ± 0.26	0.18 ± 0.02
Stomach [†]	12.0 ± 1.47	1.77 ± 0.26	10.4 ± 1.60	1.44 ± 0.23
Small-Intestine	27.0 ± 6.18	27.1 ± 5.54	22.8 ± 2.43	22.1 ± 2.25
Large-Intestine	2.27 ± 0.23	0.57 ± 0.10	1.75 ± 0.49	0.49 ± 0.04
Kidney	3.67 ± 0.77	1.58 ± 0.33	3.82 ± 0.18	1.61 ± 0.12
Adrenal gland	2.52 ± 0.51	0.03 ± 0.01	6.67 ± 1.63*	0.05 ± 0.01*
Liver	5.27 ± 0.79	6.12 ± 0.99	11.2 ± 1.56*	11.7 ± 1.63*
Brown fat	1.55 ± 0.23	0.11 ± 0.02	2.28 ± 0.30*	0.12 ± 0.02
Salivary glands	18.9 ± 4.20	2.45 ± 0.46	14.6 ± 1.29	1.87 ± 0.32*
Thyroid	25.1 ± 3.75	0.65 ± 0.09	15.47 ± 2.32*	0.30 ± 0.06*
Bone	1.39 ± 0.22	3.21 ± 0.48	1.55 ± 0.20	3.59 ± 0.48
Brain	0.27 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.08 ± 0.01
Tumor	4.05 ± 0.73	0.36 ± 0.12	2.56 ± 0.24*	0.23 ± 0.07

Data are expressed as %injected dose per gram tissue (%ID/g) and %injected dose per tissue (%ID). Each value represents the mean ± SD for five animals. [†]Data tissues do not contain gastrointestinal contents. Significance was determined using student-t test (* *P* < 0.05, vs. control group).

2.3 考察

BBN 配列のメチオニン残基が酸化した BBN スルホキシドは、受容体結合と生物活性が低減することが報告されており(64)、標識においてメチオニン残基の酸化回避もしくは再還元は必須である。実際に、 $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin}$ を調製する際には酸化剤である Iodogen を使用するため、 $[^{125}\text{I}]\text{Tyr}^4\text{-bombesin sulfoxide}$ が主生成物となり、スルホキシドの再還元および追加の HPLC 精製が必要となる(64)。トリメチルスズ基を有する *m*-MeATE と ^{211}At の反応は求電子置換反応であり、標識の際には複数の価数で混在している ^{211}At を+1 価にするために酸化剤を用いる。そこで本研究では、 ^{211}At 標識におけるメチオニン残基の酸化を回避するため、 $[^{211}\text{At}]\text{SAB}$ を合成後 HPLC 精製により酸化剤と未反応の *m*-MeATE を取り除いた後に BBN-3 と縮合させるという 2 つのステップを経て $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を合成した。

In vitro での血漿中安定性試験により、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は BBN 配列の途中で切断されることが明らかとなった。IB-2 および IB-4 も天然 BBN と同程度の GRPR 親和性を有するが、IB-3 および $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ と同じ BBN 配列を有しており、マウスの血漿中での分解されることが容易に推測できる。したがって、それらの対応する ^{211}At 標識 BBN、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-2}$ および $[^{211}\text{At}]\text{AB-4}$ は評価していない。

$[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ はマウスの血漿で経時的に分解されることが明らかとなったが、曝露後 2 分の時点ではほとんど分解していない ($79.4\% \pm 5.2\%$)。また、*in vivo* のマウス血漿中においても、投与後 2 分で $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ はほとんど分解しておらず ($82.9\% \pm 4.7\%$)、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は分解される前に生体内の腫瘍に集積する可能性がある。そこで、前立腺癌モデルマウスにおける体内放射能分布実験を行ったところ、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は腫瘍と膵臓で GRPR 特異的な集積をすることが確認された。

細胞を用いた *in vitro* 実験により、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は時間経過で細胞に取り込まれ、また内在化することが確認された。 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の細胞結合は、過剰の BBN の同時曝露により阻害されており、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の細胞への結合は GRPR 特異的であることが示唆され

た (Figure 2-4)。一方で、時間の経過とともに一度内在化した放射能は細胞から放出された (Figure 2-5)。一般的に、放射性ヨウ素標識化合物は内在化後に細胞内に保持されず細胞外に流出するため(65)、 ^{211}At 標識化合物においても同様に細胞外に流出したと考えられるが、標的アイソトープ治療には不都合な特性である。腫瘍の滞留を改善するには、*N*-succinimidyl 3- ^{211}At astato-4-guanidinomethylbenzoate (^{211}At]SAGMB) (66, 67)を使用するなど、代替の ^{211}At 標識方法を選択することを検討すべきである。 ^{211}At]SAGMB によって ^{211}At 標識された化合物は、リソソーム内で正電荷を持つ放射性代謝物に分解されるため、細胞膜を通過せず細胞内に留まる。既に抗体やペプチドの標識では使用されており、 ^{211}At 標識 BBN 誘導体作成においても、 ^{211}At]SAB の代わりに ^{211}At]SAGMB のような試薬を使用すると、腫瘍の ^{211}At 保持が改善される可能性がある。

^{211}At]AB-3 投与後の腫瘍の放射能集積は比較的高かったが、腫瘍の他にも高い放射能集積を示した組織も観察された。以前から、 ^{211}At 標識化合物を生体に投与した際に標識化合物から ^{211}At が脱離する「脱アスタチン (deastatination)」がしばしば問題視されており(68)、腫瘍以外の組織に高い放射能集積をもたらした一因として、脱アスタチンにより生成した遊離の ^{211}At の分布が考えられる。この理由として、 ^{211}At]AB-3 は構造上の理由で脱アスタチンを起こしやすいと予想されること、 ^{211}At]AB-3 投与後、高い放射能分布を示した組織がアスタチンの高集積組織であったことが挙げられる。以下に詳述する。

- ^{211}At]SAB を使用して ^{211}At 標識する場合、母体化合物が抗体のような高分子の場合は脱アスタチンが比較的起こりにくいが、対照的に、低分子化合物では脱アスタチンが起こりやすいことが報告されている(15)。 ^{211}At]Astatobenzoic acid や ^{211}At 標識ビオチン誘導体の生体内放射能分布は、 ^{211}At 単独の分布に類似しており(15, 69)、低分子化合物における脱アスタチンの具体例である。 ^{211}At]AB-3 も抗体と比較して低分子量の化合物であり、全身で観察された放射能分布は脱アスタチンによって引き起こされた可能性がある。

- 遊離のアスタチンは甲状腺、胃、肺及び脾臓に高集積することが知られており(15, 16, 69, 70)、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ はこれらの組織に集積している。また、甲状腺の放射能集積が主に脱アスタチンの指標として用いられるが、遊離の ^{211}At のみ単独でマウスに投与した場合の甲状腺への集積は注射後 1 時間で約 2%ID ほどであると報告がある(15, 70)。薬物動態が異なるため一概には比較できないが、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の甲状腺蓄積は $0.65 \pm 0.09\% \text{ID}$ と低くはなく、脱アスタチンが起きている可能性を支持する。
- 体内放射能分布実験の結果から、脱アスタチン以外で考察した点について以下に記述する。体内分布実験で天然 BBN を同時投与した BBN 添加群において、GRPR 発現組織ではない甲状腺の取り込みも BBN 添加群で有意に減少した。この原因について、BBN 添加群の投与液に含まる天然 BBN が $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の脱アスタチンを間接的に減少させ、遊離 ^{211}At が蓄積する甲状腺およびその他の組織の放射能集積が減少したと考えている。その機序に関して以下に述べる。SIB を介した放射性ヨウ素標識化合物の場合、細胞内在化後に発生する放射性代謝物が脱ヨウ素化せずに血行に戻ることが知られているが(65)、 ^{211}At 標識化合物の場合は異なると考えられる。Teze らの推定によると、 37°C のリソソーム内においてヨウ素標識化合物の酸化的脱ヨウ素化速度に対して、アスタチン標識化合物の酸化的脱アスタチン化速度は約 6×10^6 倍速い(71)。また、BBN 誘導体は、受容体へ結合し細胞に内在化した後、リソソーム内で分解されると推測されている(57, 72)。したがって、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は細胞内在化後にリソソームに到達し、分解され、さらに（ヨウ素の場合は脱ヨウ素されないが）脱アスタチンし、遊離の ^{211}At を生成する。その後、遊離の ^{211}At が血液に流出し、甲状腺などに集積していると推測される。したがって、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の GRPR 陽性細胞への取り込みが天然 BBN によって阻害されると、その後に起きる遊離の ^{211}At の流出が抑制される可能性がある。

甲状腺とは対照的に、BBN 添加群の肺では高い放射能の蓄積が観察されたが、以前の研究で報告されているように解明されておらず(73, 74)、 ^{211}At 以外の他の RI 標識 BBN 誘導体でも起こることから ^{211}At に起因した集積ではないと考えられる。

この研究には次に示す limitation がある。第一に、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は脱アスタチン化を起こしている可能性が高いと思われるものの、防止できていないことである。脱アスタチンにより ^{211}At 標識化合物の標的選択性を低下させ、非標的組織への毒性が懸念されるため、その低減・防止は治療的応用に向けて不可欠であるが、この問題は解決されていない。甲状腺については、アスタチンはヨウ素と同様に、ナトリウム・ヨウ素共輸送体 (Sodium-iodide symporter、NIS) を介して集積すると考えられており(70)、NIS の基質となるチオシアン酸塩、過塩素酸塩、ヨウ化物等を事前または同時に投与することで甲状腺の集積を 70~80%程度低減可能である(70)。現時点では、安定ヨウ素剤やその他のアスタチン取り込み防止剤の事前及び事後投与により、標的組織以外への集積を減らす処置が必要と考えられる。

第二に、マウス血漿中でペプチド分解および内在化後の細胞からの放射能流出は、腫瘍への放射能の蓄積を減らし、治療効果を低下させうることから、BBN 配列を修飾し、血漿中安定性を改善することができれば、腫瘍の放射能集積が増加する可能性がある。また、 $[^{211}\text{At}]\text{SAGMB}$ 等の利用により腫瘍滞留性が増強される可能性がある。しかしながら、いずれも本研究では実証されていない。

最後に、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ の抗腫瘍効果はこの研究では調査されていない。体内分布実験では $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は腫瘍に特異的に蓄積され、抗腫瘍効果を示す可能性が示唆されているが、一方でその他多くの組織、特に小腸で腫瘍よりも高い蓄積が観察されている。 ^{211}At の毒性に関する研究によると、遊離 ^{211}At 投与後の主な死因は、消化管上皮の脱落と限局性経壁壊死であることが示されている(75)。一方、 $[^{223}\text{Ra}]\text{RaCl}_2$ のように、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ 由来の放射能集積が主に腸管内容物にある場合、 α 線の腸管壁への毒性は最小限である可能性がある(51)。この研究では腸管組織と内容物を区別して測定しておらず、腸管組織と内容物のどちらに ^{211}At が存在しているか明確ではないが、遊離 ^{211}At の腸管集積による深刻な副作用の可能性は捨てきれない。そのため、治療効果を確認する実験は実施していない。

以上、前立腺癌移植マウスを用いた検討において、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ が前立腺癌に特異的に集積し、腫瘍増殖抑制効果を示す可能性が示唆された。一方で、薬剤の血漿中の不安定性や脱アスタチンの可能性など薬剤設計における課題が明らかになった。これらの結果から、本研究は前立腺の標的アイソトープ治療を目的とした放射性薬剤を開発する際の足掛かりになると考えられる。

結語

第1章では、抗がん剤の治療効果判定のための細胞死イメージング薬剤の開発を目的として DPA 誘導体の放射性標識を行い、放射性プローブの安定性および細胞結合実験、担がんマウスにおける治療の有無による体内動態の検討を行い、以下の知見を得た。

1. [^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA、[^{125}I]IB-ZnDPA を設計、合成し、いずれも放射化学的純度 95%以上で得た。細胞死の誘導目的に行った 5-FU 曝露の有無によって、[^{125}I]IB-ZnDPA の細胞取り込みに有意な差は認められなかった。[^{125}I]IB-ZnDPA は高い脂溶性により非特異的に細胞に取り込まれ、細胞死を検出できないと考えられた。一方、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA は対照群と比較して 5-FU 曝露群において有意に高い集積を示し、細胞死を検出可能であることが示唆された。
2. 担がんマウスにおける[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA の体内放射能分布を、放射性プローブの投与前日の 5-FU 投与の有無により比較すると、5-FU 投与群の腫瘍の放射能集積が有意に増加した。さらに腫瘍の放射能集積と TUNEL 染色陽性細胞数を比較すると、有意な高い正の相関が確認された。したがって、[^{99m}Tc]Tc-MAG3-ZnDPA は *in vivo* においても細胞死を検出し、また、細胞死に依存した集積をすることが示唆された。
3. 一方で、腫瘍への集積は未治療の場合と比較して 1.8 倍程度であり、シグナル強度は低く、また、小腸での非常に高い蓄積が観察された。このため、特に腹部の腫瘍における細胞死の *in vivo* 検出は困難になると予想され、イメージング剤としての弱点が明らかになった。

これらの結果から、本研究は抗がん剤の治療効果判定を目的とした放射性プローブを開発する際の足掛かりになると考えられる。

第2章では、前立腺癌の標的アイソトープ治療を目的とした ^{211}At 標識化合物の開発を目的として、非放射性ヨウ素導入 BBN 誘導体 (IB-BBN) を用いたスクリーニング、 ^{211}At 標識 BBN 誘導体の合成、薬剤の安定性の確認、細胞結合実験、および担がんマウスでの体内分布の評価を行い、以下の知見を得た。

1. 安定同位体が存在しないアスタチンの代替としてヨウ素を用いて置換した IB-BBN を合成し、GRPR 親和性を評価したところ、3 種類の IB-BBN が天然 BBN と同程度の親和性を有すことを見出した。そのうち IB-3 の ^{211}At 置換化合物、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を放射化学的純度 90%以上で得た。
2. 細胞取り込み実験により、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ が前立腺癌細胞に結合し、内在化することが確認された。また、過剰の天然 BBN の添加により、細胞表面・内部への取り込みが大幅に抑制され、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は GRPR を介し細胞に取り込まれることが示唆された。
3. $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ はマウス血漿中で経時的に分解されることが確認されたが、*in vitro*、*in vivo* ともに血漿に曝露後 2 分以内ではほとんどが未分解体として存在していた。
4. 前立腺癌細胞 PC-3 担がんマウスに $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を投与したところ腫瘍に高集積し、その集積は過剰の天然 BBN 同時投与により有意に減少したことから、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は GRPR 特異的に腫瘍に取り込まれることが示唆された。
5. $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ は腫瘍以外の他の組織にも高い取り込みを示したが、この理由として、標識化合物から脱離した ^{211}At が分布したためと推測された。

以上、初めて α 線放出核種で標識された BBN 誘導体、 $[^{211}\text{At}]\text{AB-3}$ を合成・評価し、これらの研究成果から ^{211}At 標識 BBN 誘導体の基礎的な特性が明らかとなり、今後の研究に有益な情報を提供するものと考えられる。

引用文献

1. Eisenhauer EA, Therasse P, Bogaerts J, Schwartz LH, Sargent D, Ford R, et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer*. 2009;45(2):228-247.
2. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. 2005;5(3):231-237.
3. Ogawa K, Aoki M. Radiolabeled apoptosis imaging agents for early detection of response to therapy. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:732603.
4. Reshef A, Shirvan A, Akselrod-Ballin A, Wall A, Ziv I. Small-molecule biomarkers for clinical PET imaging of apoptosis. *J Nucl Med*. 2010;51(6):837-840.
5. Blankenberg FG. In vivo detection of apoptosis. *J Nucl Med*. 2008;49 Suppl 2:81S-95S.
6. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*. 1995;182(5):1545-1556.
7. Tait JF. Imaging of apoptosis. *J Nucl Med*. 2008;49(10):1573-1576.
8. Koulov AV, Stucker KA, Lakshmi C, Robinson JP, Smith BD. Detection of apoptotic cells using a synthetic fluorescent sensor for membrane surfaces that contain phosphatidylserine. *Cell Death Differ*. 2003;10(12):1357-1359.
9. Hanshaw RG, Lakshmi C, Lambert TN, Johnson JR, Smith BD. Fluorescent detection of apoptotic cells by using zinc coordination complexes with a selective affinity for membrane surfaces enriched with phosphatidylserine. *Chembiochem*. 2005;6(12):2214-2220.
10. Kwong JM, Hoang C, Dukes RT, Yee RW, Gray BD, Pak KY, et al. Bis(zinc-dipicolylamine), Zn-DPA, a new marker for apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*.

- 2014;55(8):4913-4921.
11. Ohshima Y, Sudo H, Watanabe S, Nagatsu K, Tsuji AB, Sakashita T, et al. Antitumor effects of radionuclide treatment using alpha-emitting meta-²¹¹At-astato-benzylguanidine in a PC12 pheochromocytoma model. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2018;45(6):999-1010.
 12. Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Nagatsu K, Minegishi K, Ishioka NS, et al. Preclinical Evaluation of the Acute Radiotoxicity of the alpha-Emitting Molecular-Targeted Therapeutic Agent ²¹¹At-MABG for the Treatment of Malignant Pheochromocytoma in Normal Mice. *Transl Oncol*. 2019;12(7):879-888.
 13. Liu Y, Watabe T, Kaneda-Nakashima K, Ooe K, Shirakami Y, Toyoshima A, et al. Preclinical Evaluation of Radiation-Induced Toxicity in Targeted Alpha Therapy Using [²¹¹At] NaAt in Mice: A Revisit. *Transl Oncol*. 2020;13(4):100757.
 14. Watabe T, Kaneda-Nakashima K, Liu Y, Shirakami Y, Ooe K, Toyoshima A, et al. Enhancement of ²¹¹At Uptake via the Sodium Iodide Symporter by the Addition of Ascorbic Acid in Targeted alpha-Therapy of Thyroid Cancer. *J Nucl Med*. 2019;60(9):1301-1307.
 15. Garg PK, Harrison CL, Zalutsky MR. Comparative tissue distribution in mice of the alpha-emitter ²¹¹At and ¹³¹I as labels of a monoclonal antibody and F(ab')₂ fragment. *Cancer Res*. 1990;50(12):3514-3520.
 16. Lundh C, Lindencrona U, Schmitt A, Nilsson M, Forssell-Aronsson E. Biodistribution of free ²¹¹At and ¹²⁵I- in nude mice bearing tumors derived from anaplastic thyroid carcinoma cell lines. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006;21(6):591-600.
 17. Parry JJ, Andrews R, Rogers BE. MicroPET imaging of breast cancer using radiolabeled bombesin analogs targeting the gastrin-releasing peptide receptor. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;101(2):175-183.
 18. Markwalder R, Reubi JC. Gastrin-releasing peptide receptors in the human prostate:

- relation to neoplastic transformation. *Cancer Res.* 1999;59(5):1152-1159.
19. Sancho V, Di Florio A, Moody TW, Jensen RT. Bombesin receptor-mediated imaging and cytotoxicity: review and current status. *Curr Drug Deliv.* 2011;8(1):79-134.
 20. Ananias HJ, van den Heuvel MC, Helfrich W, de Jong IJ. Expression of the gastrin-releasing peptide receptor, the prostate stem cell antigen and the prostate-specific membrane antigen in lymph node and bone metastases of prostate cancer. *Prostate.* 2009;69(10):1101-1108.
 21. Baratto L, Jadvar H, Iagaru A. Prostate Cancer Theranostics Targeting Gastrin-Releasing Peptide Receptors. *Mol Imaging Biol.* 2018;20(4):501-509.
 22. Ferreira CA, Fuscaldi LL, Townsend DM, Rubello D, Barros ALB. Radiolabeled bombesin derivatives for preclinical oncological imaging. *Biomed Pharmacother.* 2017;87:58-72.
 23. Smith BA, Smith BD. Biomarkers and molecular probes for cell death imaging and targeted therapeutics. *Bioconjug Chem.* 2012;23(10):1989-2006.
 24. Blankenberg FG, Strauss HW. Recent advances in the molecular imaging of programmed cell death: part I--pathophysiology and radiotracers. *J Nucl Med.* 2012;53(11):1659-1662.
 25. Hanshaw RG, Smith BD. New reagents for phosphatidylserine recognition and detection of apoptosis. *Bioorg Med Chem.* 2005;13(17):5035-5042.
 26. Schlegel RA, Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell. *Cell Death And Differentiation.* 2001;8:551.
 27. Corsten MF, Hofstra L, Narula J, Reutelingsperger CP. Counting heads in the war against cancer: defining the role of annexin A5 imaging in cancer treatment and surveillance. *Cancer Res.* 2006;66(3):1255-1260.
 28. Rybczynska AA, Boersma HH, de Jong S, Gietema JA, Noordzij W, Dierckx R, et al. Avenues to molecular imaging of dying cells: Focus on cancer. *Med Res Rev.* 2018;38(6):1713-1768.

29. Lahorte CM, Vanderheyden JL, Steinmetz N, Van de Wiele C, Dierckx RA, Slegers G. Apoptosis-detecting radioligands: current state of the art and future perspectives. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2004;31(6):887-919.
30. Laufer EM, Reutelingsperger CP, Narula J, Hofstra L. Annexin A5: an imaging biomarker of cardiovascular risk. *Basic Res Cardiol*. 2008;103(2):95-104.
31. Jiang X, Li H. MiR-1180-5p regulates apoptosis of Wilms' tumor by targeting p73. *Oncotargets Ther*. 2018;11:823-831.
32. Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kopiwoda S, Tait JF, et al. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. *Eur J Nucl Med*. 1999;26(10):1251-1258.
33. Doue T, Ohtsuki K, Ogawa K, Ueda M, Azuma A, Saji H, et al. Cardioprotective effects of erythropoietin in rats subjected to ischemia-reperfusion injury: assessment of infarct size with ^{99m}Tc-annexin V. *J Nucl Med*. 2008;49(10):1694-1700.
34. Rottey S, Slegers G, Van Belle S, Goethals I, Van de Wiele C. Sequential ^{99m}Tc-hydrazinonicotinamide-annexin V imaging for predicting response to chemotherapy. *J Nucl Med*. 2006;47(11):1813-1818.
35. Ogawa K, Ohtsuki K, Shibata T, Aoki M, Nakayama M, Kitamura Y, et al. Development and evaluation of a novel ^{99m}Tc-labeled annexin A5 for early detection of response to chemotherapy. *PLoS One*. 2013;8(12):e81191.
36. Plaunt AJ, Harmatys KM, Wolter WR, Suckow MA, Smith BD. Library synthesis, screening, and discovery of modified Zinc(II)-Bis(dipicolylamine) probe for enhanced molecular imaging of cell death. *Bioconjug Chem*. 2014;25(4):724-737.
37. Niu G, Chen X. Apoptosis imaging: beyond annexin V. *J Nucl Med*. 2010;51(11):1659-1662.
38. Ogawa K, Mukai T, Arano Y, Ono M, Hanaoka H, Ishino S, et al. Development of a rhenium-186-labeled MAG3-conjugated bisphosphonate for the palliation of metastatic

- bone pain based on the concept of bifunctional radiopharmaceuticals. *Bioconjug Chem.* 2005;16(4):751-757.
39. Ogawa K, Takeda T, Yokokawa M, Yu J, Makino A, Kiyono Y, et al. Comparison of Radioiodine- or Radiobromine-Labeled RGD Peptides between Direct and Indirect Labeling Methods. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 2018;66(6):651-659.
 40. Ogawa K, Mukai T, Inoue Y, Ono M, Saji H. Development of a novel ^{99m}Tc-chelate-conjugated bisphosphonate with high affinity for bone as a bone scintigraphic agent. *J Nucl Med.* 2006;47(12):2042-2047.
 41. Ogawa K, Shiba K, Akhter N, Yoshimoto M, Washiyama K, Kinuya S, et al. Evaluation of radioiodinated vesamicol analogs for sigma receptor imaging in tumor and radionuclide receptor therapy. *Cancer Sci.* 2009;100(11):2188-2192.
 42. Rapic S, Vangestel C, Elvas F, Verhaeghe J, den Wyngaert TV, Wyffels L, et al. Evaluation of [¹⁸F]CP18 as a Substrate-Based Apoptosis Imaging Agent for the Assessment of Early Treatment Response in Oncology. *Mol Imaging Biol.* 2017;19(4):560-569.
 43. Ojida A, Mito-oka Y, Sada K, Hamachi I. Molecular recognition and fluorescence sensing of monophosphorylated peptides in aqueous solution by bis(zinc(II)-dipicolylamine)-based artificial receptors. *J Am Chem Soc.* 2004;126(8):2454-2463.
 44. Wang H, Tang X, Tang G, Huang T, Liang X, Hu K, et al. Noninvasive positron emission tomography imaging of cell death using a novel small-molecule probe, ¹⁸F labeled bis(zinc(II)-dipicolylamine) complex. *Apoptosis.* 2013;18(8):1017-1027.
 45. Hu Q, Gao M, Feng G, Chen X, Liu B. A cell apoptosis probe based on fluorogen with aggregation induced emission characteristics. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2015;7(8):4875-4882.
 46. Wyffels L, Gray BD, Barber C, Moore SK, Woolfenden JM, Pak KY, et al. Synthesis and preliminary evaluation of radiolabeled bis(zinc(II)-dipicolylamine) coordination complexes as cell death imaging agents. *Bioorg Med Chem.* 2011;19(11):3425-3433.

47. Rice DR, Plaunt AJ, Turkyilmaz S, Smith M, Wang Y, Rusckowski M, et al. Evaluation of [¹¹¹In]-labeled zinc-dipicolylamine tracers for SPECT imaging of bacterial infection. *Mol Imaging Biol.* 2015;17(2):204-213.
48. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65(2):87-108.
49. Kelly SP, Anderson WF, Rosenberg PS, Cook MB. Past, Current, and Future Incidence Rates and Burden of Metastatic Prostate Cancer in the United States. *Eur Urol Focus.* 2018;4(1):121-127.
50. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schroder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet.* 2016;387(10013):70-82.
51. Parker C, Nilsson S, Heinrich D, Helle SI, O'Sullivan JM, Fossa SD, et al. Alpha emitter radium-223 and survival in metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2013;369(3):213-223.
52. Kratochwil C, Bruchertseifer F, Giesel FL, Weis M, Verburg FA, Mottaghy F, et al. ²²⁵Ac-PSMA-617 for PSMA-Targeted alpha-Radiation Therapy of Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer. *J Nucl Med.* 2016;57(12):1941-1944.
53. Lantry LE, Cappelletti E, Maddalena ME, Fox JS, Feng W, Chen J, et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA: Synthesis and characterization of a selective ¹⁷⁷Lu-labeled GRP-R agonist for systemic radiotherapy of prostate cancer. *J Nucl Med.* 2006;47(7):1144-1152.
54. Garcia Garayoa E, Schweinsberg C, Maes V, Brans L, Blauenstein P, Tourwe DA, et al. Influence of the molecular charge on the biodistribution of bombesin analogues labeled with the [^{99m}Tc(CO)₃]-core. *Bioconjug Chem.* 2008;19(12):2409-2416.
55. Oriuchi N, Aoki M, Ukon N, Washiyama K, Tan C, Shimoyama S, et al. Possibility of cancer-stem-cell-targeted radioimmunotherapy for acute myelogenous leukemia using ²¹¹At-CXCR4 monoclonal antibody. *Sci Rep.* 2020;10(1):6810.
56. Maddalena ME, Fox J, Chen J, Feng W, Cagnolini A, Linder KE, et al. ¹⁷⁷Lu-AMBA

- biodistribution, radiotherapeutic efficacy, imaging, and autoradiography in prostate cancer models with low GRP-R expression. *J Nucl Med.* 2009;50(12):2017-2024.
57. Chen X, Park R, Hou Y, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, et al. microPET and autoradiographic imaging of GRP receptor expression with ^{64}Cu -DOTA-[Lys³]bombesin in human prostate adenocarcinoma xenografts. *J Nucl Med.* 2004;45(8):1390-1397.
 58. Maina T, Nock B, Nikolopoulou A, Sotiriou P, Loudos G, Maintas D, et al. [$^{99\text{m}}\text{Tc}$]Demotate, a new $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -based [Tyr³]octreotate analogue for the detection of somatostatin receptor-positive tumours: synthesis and preclinical results. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2002;29(6):742-753.
 59. Yan Y, Chen K, Yang M, Sun X, Liu S, Chen X. A new ^{18}F -labeled BBN-RGD peptide heterodimer with a symmetric linker for prostate cancer imaging. *Amino Acids.* 2011;41(2):439-447.
 60. Ogawa K, Aoki M, Kadono S, Odani A. Complexes of myo-inositol-hexakisphosphate (InsP6) with zinc or lanthanum to enhance excretion of radioactive strontium from the body. *PLoS One.* 2018;13(4):e0195067.
 61. Ogawa K, Mizuno Y, Washiyama K, Shiba K, Takahashi N, Kozaka T, et al. Preparation and evaluation of an astatine-211-labeled sigma receptor ligand for alpha radionuclide therapy. *Nucl Med Biol.* 2015;42(11):875-879.
 62. Ogawa K, Takeda T, Mishiro K, Toyoshima A, Shiba K, Yoshimura T, et al. Radiotheranostics Coupled between an At-211-Labeled RGD Peptide and the Corresponding Radioiodine-Labeled RGD Peptide. *ACS Omega.* 2019;4(3):4584-4591.
 63. La Bella R, Garcia-Garayoa E, Bahler M, Blauenstein P, Schibli R, Conrath P, et al. A $^{99\text{m}}\text{Tc}$ (I)-postlabeled high affinity bombesin analogue as a potential tumor imaging agent. *Bioconjug Chem.* 2002;13(3):599-604.
 64. Vigna SR, Giraud AS, Reeve JR, Jr., Walsh JH. Biological activity of oxidized and reduced iodinated bombesins. *Peptides.* 1988;9(4):923-926.

65. Chitneni SK, Koumarianou E, Vaidyanathan G, Zalutsky MR. Observations on the Effects of Residualization and Dehalogenation on the Utility of N-Succinimidyl Ester Acylation Agents for Radioiodination of the Internalizing Antibody Trastuzumab. *Molecules*. 2019;24(21).
66. Vaidyanathan G, Affleck DJ, Bigner DD, Zalutsky MR. *N*-succinimidyl 3-[²¹¹At]astato-4-guanidinomethylbenzoate: an acylation agent for labeling internalizing antibodies with alpha-particle emitting ²¹¹At. *Nucl Med Biol*. 2003;30(4):351-359.
67. Choi J, Vaidyanathan G, Koumarianou E, Kang CM, Zalutsky MR. Astatine-211 labeled anti-HER2 5F7 single domain antibody fragment conjugates: radiolabeling and preliminary evaluation. *Nucl Med Biol*. 2018;56:10-20.
68. Guerard F, Gestin JF, Brechbiel MW. Production of [²¹¹At]-astatinated radiopharmaceuticals and applications in targeted alpha-particle therapy. *Cancer Biother Radiopharm*. 2013;28(1):1-20.
69. Wilbur DS, Hamlin DK, Chyan MK, Kegley BB, Quinn J, Vessella RL. Biotin reagents in antibody pretargeting. 6. Synthesis and in vivo evaluation of astatinated and radioiodinated aryl- and nido-carboranyl-biotin derivatives. *Bioconjug Chem*. 2004;15(3):601-616.
70. Larsen RH, Slade S, Zalutsky MR. Blocking [²¹¹At]astatide accumulation in normal tissues: preliminary evaluation of seven potential compounds. *Nucl Med Biol*. 1998;25(4):351-357.
71. Teze D, Sergentu DC, Kalichuk V, Barbet J, Deniaud D, Galland N, et al. Targeted radionuclide therapy with astatine-211: Oxidative dehalogenation of astatobenzoate conjugates. *Sci Rep*. 2017;7(1):2579.
72. Gandy A, Therneau TM, Aalen OO. Global tests in the additive hazards regression model. *Stat Med*. 2008;27(6):831-844.
73. Garcia Garayoa E, Ruegg D, Blauenstein P, Zwimpfer M, Khan IU, Maes V, et al.

- Chemical and biological characterization of new $\text{Re}(\text{CO})_3/[^{99\text{m}}\text{Tc}](\text{CO})_3$ bombesin analogues. *Nucl Med Biol.* 2007;34(1):17-28.
74. Zhang X, Cai W, Cao F, Schreibmann E, Wu Y, Wu JC, et al. ^{18}F -labeled bombesin analogs for targeting GRP receptor-expressing prostate cancer. *J Nucl Med.* 2006;47(3):492-501.
75. McLendon RE, Archer GE, Garg PK, Bigner DD, Zalutsky MR. Radiotoxicity of systematically administered ^{211}At astatide in B6C3F1 and BALB/c (nu/nu) mice: a long-term survival study with histologic analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996;35(1):69-80.

謝辞

本研究にあたり直接の御指導を戴き、終始ご指導、御鞭撻を賜りました金沢大学薬学系 臨床分析科学研究室 小川 数馬 教授に深謝いたします。また、本研究にあたりご指導、御鞭撻を賜りました小谷 明 金沢大学名誉教授に深く感謝いたします。

更に、実験を進めるに当たり、多くの御助言と御協力を戴きました福島県立医科大学 趙 松吉 教授、高橋 和弘 教授、鷲山 幸信 准教授、西嶋 剣一 講師、右近 直之 助教、譚 成博 先生、下山 彩希 様にそれぞれ謹んで御礼申し上げます。

同時に、本研究をまとめるにあたり懇切なる御指導と御教示を戴きました金沢大学 大宮 寛久 教授、後藤 享子 准教授、深見 達基 准教授、吉村 智之 准教授に深く感謝いたします。

また、 ^{211}At 製造のためのサイクロトロン運転にあたりご協力いただきました住重加速器サービス株式会社 佐々木 茂範 様、望月 一優 様に心より御礼申し上げます。

最後に、本研究において多くの御協力を戴きました金沢大学学際科学実験センター、柴 和弘 教授、北村 陽二 准教授、小阪 孝史 助教に御礼申し上げます。また、金沢大学 臨床分析科学研究室 黄檗 達人 助教に感謝の意を表します。