

氏 名	園 田 明 永
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	博 士 第 5 9 3 号
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
学 位 授 与 年 月 日	平 成 2 1 年 3 月 2 5 日
学 位 論 文 題 目	Development of a conjugated Gadolinium and Cisplatin-gelatin possessing properties as an intravascular contrast agent for MR imaging  (MRI にて血管内造影剤としての性質を持つ抗癌剤の開発—ガドリニウム、シスプラチン、ゼラチンの結合体)
審 査 委 員	主 査 教 授 山 路 昭  副 査 教 授 岡 部 英 俊  副 査 教 授 木 村 隆 英

## 論文内容要旨

※整理番号	598	(ふりがな) 氏名	(そのだあきなが) 園田明永
学位論文題目	Development of a conjugated Gadolinium and Cisplatin-gelatin possessing properties as a intravascular contrast agent for MR imaging		
目 的	<p>この実験の目的は、ガドリニウム (Gd) と Diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) とシスプラチン (Cis) および Gelatin (Gel) を用いて、MRI 下にて描出可能なシスプラチン製剤 (Gd-DTPA-Gel-Cis) を開発することにある。</p>		
方 法	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. DTPA は、カルボキシル基を持ち、これは、Gel のアミノ基と結合することが予想された。DTPA と Gel を様々な割合 (DTPA : Gel = 0.2 : 1, 0.5 : 1, 0.8 : 1, 1 : 1) で結合させて、DTPA の Gel への結合割合を測定した。反応は DMSO 溶液中 (37℃、90 分) で行い、純水で透析することで、結合した DTPA-Gel を取り出した。Gel への DTPA への結合割合は、Gel の残存アミノ基を TNBS 法にて測定することで算出した。</li> <li>2. 1. で作成した DTPA-Gel に Cis を様々な割合 (Cis : DTPA-Gel = 0.002 : 1, 0.004 : 1, 0.02 : 1, 0.2 : 1, 2 : 1) で反応させた。Gelatin のカルボキシル基には、Cis が結合する可能性が、田畑らの実験で示唆されており、これを応用した。Gel-DTPA を純水に溶かし、これに Cis を滴下して、37℃、72 時間反応させた。これを純粋で透析することにより、DTPA-Gel-Cis を取り出した。DTPA-Gel-Cis に含まれる Pt 量を原始吸光にて測定し、Cis の結合量を算出した。</li> <li>3. 1. で作成した DTPA-Gel に Gd を様々な割合 (Gd : DTPA-Gel = 0.1 : 1, 1 : 1, 10 : 1) で反応させた。Gel-DTPA を MESbuffer (PH5.0) に溶かし、これに酢酸 Gd を滴下して、37℃、90 分間反応させた。PD10 カラムで透析することにより、Gd-DTPA-Gel を取り出した。Gd-DTPA-Gel に含まれる Gd 量を原始吸光にて測定し、Gd の結合量を算出した。</li> <li>4. 1, 2, 3 の結果をもとに、Gd-DTPA-Gel-Cis を作成した。これを透析膜に封入し、牛血清中で攪拌 (37℃、72 Stroke/min)。30 分、6 時間、24 時間ごとの、血清中へ放出された Pt、Gd 濃度を原始吸光にて測定した。</li> <li>5. 1, 2, 3 の結果をもとに、Gd-DTPA-Gel-Cis を作成した。</li> <li>6. これを 2ml のポリウレタンチューブに入れ、MRI (T1WI) での信号強度を、希釈 Gd 溶液と比較した。</li> <li>7. 統計ソフトは Dr. SPSS を使い、<math>p &lt; 0.05</math> を有意差として Student T にて計算した。</li> </ol>		

## 結 果

1. DTPA:Gel (0.2:1, 0.5:1, 0.8:1, 1:1) における、DTPA の結合量は、8.42、54.35、93.05、96.09%であった。1:1 の反応では、Gel 上のアミノ基の90%以上が結合した。Cis : DTPA-Gel (0.002:1, 0.004:1, 0.02:1, 0.2:1, 2:1) における、Cis の結合量は、予想された最大結合量の0.17%、0.34%、0.60%、1.04%、1.18%であった。
2. Gd:DTPA-Gel (0.1:1, 1:1, 10:1) における、Gd の結合量は、予想された最大結合量の1.84、6.14、70.26%であった。
3. 作成した Gd-DTPA-Gel-Cis は、10mg/ml 中に 42.84ug/ml の Gd と 1.53ug/ml の Pt を含んでいた。
4. 血清中では、Pt は 24 時間で徐々に放出された。一方、Gd は 24 時間では放出を認めなかった。
6. Gd-DTPA-Gel-Cis の溶液は市販の Gd 溶液に近い濃度で、高信号を示した。

## 考 察

我々はまず、Gelatin に含まれるアミノ基の何%に DTPA が結合できるかを調べた。DTPA1 分子とアミノ基 1 分子を 1 : 1 と考えたとき、DTPA を 1 以上の割合で反応させれば、90%以上のアミノ基と結合することがわかった。よって、DTPA-Gel 作成時の反応割合は、1:1 とした。次に DTPA-Gel に含まれるカルボキシル基の何%に Cisplatin が結合するかを調べた。Cisplatin1 分子がカルボキシル基 2 分子に結合すると仮定してこれを 1 : 1 と考えたとき、Cisplatin 量が 0.2 までは、急峻な結合率上昇を示すのに対し、0.2 を超えると結合グラフは、平坦となるため、DTPA-Gel-Cis の作成には、Cisplatin は、0.2 程度の反応が経済的と考えられた。次に Gadolinium の DTPA-Gel との結合割合を調べた。DTPA-Gel に含まれる DTPA1 分子と Gadolinium1 分子を 1 : 1 と考えたとき、Gadolinium を 10 反応させれば DTPA-Gel 上の DTPA の 70%近くに結合することが判明した。よって、Gadolinium は 10 程度の反応が経済的と考えた。上記、結果から Gd-DTPA-Gel-Cis を作成した。作成した Gd-DTPA-Gel-Cis (10mg/ml) に含まれる Gadolinium は 42.84ug/ml、プラチナ濃度は 1.53ug/ml であった。

次に、作製した Gd-DTPA-Gel-Cis が MRI にて薬剤分布が同定可能な抗がん剤として働くためには、ある程度の期間は、Cisplatin と Gd が結合していなければ、その分布を見たことにならない。よって、牛血清中で、Cisplatin や Gd が Gd-DTPA-Gel-Cis から 24 時間以内にどの程度放出されるかを調べたわけであるが、Cisplatin は、最初の 6 時間で 15%以上が放出されたもののその後の放出は穏やかで、24 時間で 20%程度の放出であった。一方、Gd は 24 時間でまったく検出されず、Gd-DTPA-Gel-Cis に安定して結合していることが示された。最後に in vitro にて Gd-DTPA-Gel-Cis 溶液が同 Gd 濃度の市販 MRI 造影剤とどの程度信号が異なるかを MRI にて評価した。結果として、Gd-DTPA-Gel-Cis は、市販の造影剤に比べてやや薄い濃度でも高信号となった。生体内での薬剤分布を MRI 信号で見ることができると考えられた。

## 結 論

MRI 下で分布評価可能なシスプラチン製剤の開発に成功した。今後は腫瘍モデルを用いて、その生体内での信号強度、抗腫瘍効果などについて、評価していきたい。

## 学位論文審査の結果の要旨

整理番号	598	氏名	園田 明永
論文審査委員			
<p>(学位論文審査の結果の要旨)</p> <p>本研究は、ガドリニウム (Gd) と Diethylenetriaminepentaacetic acid(DTPA) とシスプラチン (Cis) および Gelatin(Gel) を用いて、MR I 下にて描出可能なシスプラチン製剤 (Gd-DTPA-Gel-Cis) の開発を目的としたものである。</p> <p>Gd-DTPA-Gel-Cis の作成については、段階的に各種反応条件下での結合割合を検討しながら、最終的に同物質の作成に成功した。作成された Gd-DTPA-Gel-Cis は、10mg/ml 中に 42.84 <math>\mu</math>g/ml の Gd と 1.53 <math>\mu</math>g/ml の Pt を含んでいた。また血清中では Pt は 24 時間で徐々に放出されたが、Gd は放出を認めず安定であった。Gd-DTPA-Gel-Cis の溶液は市販の Gd 溶液に近い濃度で高信号を示し、生体内での薬剤分布を MR I 信号で見ることができると考えられた。</p> <p>本研究は抗がん剤の腫瘍ターゲティングを目的とした DDS 製剤の Cis と Gel の結合体にさらに Gd を付加して MR I にて薬剤の生体内での分布を可視化しようとする目的で、Gd-DTPA-Gel-Cis を初めて作成したものである。将来の臨床応用への可能性を示した研究でもあり、博士 (医学) の学位を授与するに値すると認める。</p>			
(平成21年2月5日)			