

放射標識を用いた診断用薬の開発と臨床への応用

Simplified Synthesis and Clinical Application of Novel Diagnostic
Radiopharmaceuticals

平成 28 年度

論文博士申請書

加納 大輔 (Kano, Daisuke)

指導教員

加賀谷 肇

目次

序 論	5
1 章の背景	9
2 章の背景	11
第 1 章 ^{99m}Tc およびSPECT撮影を用いた二本鎖siRNA標識法の開発	12
第 1 節 目的	12
第 2 節 方法	12
第 1 項 材料	12
第 2 項 実験動物	14
第 3 項 siRNA配列	14
第 4 項 ^{99m}Tc によるsiRNAの放射性標識	15
第 5 項 siRNAの標識の評価	16
第 6 項 β -ガラクトシダーゼ染色アッセイ	17
第 7 項 マウス肝臓におけるlacZ遺伝子の過剰発現	17
第 8 項 ^{99m}Tc 標識siRNAのSPECT画像撮影	17
第 9 項 RNAアーゼAによる分解に対するsiRNAの安定性の評価	18
第 3 節 結果	19
第 1 項 ^{99m}Tc によるsiRNAの放射性標識	19
第 2 項 siRNA標識の評価	19
第 3 項 RNAアーゼAの分解に対するsiRNAの安定性の評価	21
第 4 項 lacZ遺伝子の過剰発現への ^{99m}Tc 標識siRNA-SPECT画像撮影	21
第 4 節 考察	22
小括	25

第2章 [11C]-Choline - PET製剤の簡易合成法と臨床への応用	31
検討1-1 [11C]-Choline PET製剤利用の検討.....	31
第1節 目的.....	31
第2節 方法.....	31
第1項 原料.....	31
第2項 [11C]標識化を行うproton照射時間の検討.....	31
第3項 [11C]-Choline合成装置の構築	32
第4項 下腹部位の撮像	34
第5項 評価の算出	34
第6項 結腸直腸がん患者に対しての症例検討	35
第3節 結果.....	36
第1項 Proton照射条件	36
第2項 [11C]-Cholineの合成.....	36
第3項 検査条件.....	37
第4項 評価.....	37
第5項 [11C]-Choline PETによる臨床成績	37
第4節 考察.....	39
第1項 Proton照射	39
第2項 [11C]-Choline 合成の検討.....	39
第3項 [11C]-Choline の臨床検査.....	40
小括	42

検討 1－2 子宮がん治療における ^[11C] -Choline PET/CTの役割	48
第 1 節 目的	48
第 2 節 方法	48
第 1 項 患者	48
第 2 項 磁気共鳴撮像	49
第 3 項 画像の判断	49
第 4 項 子宮頸がんの病期診断	50
第 5 項 子宮体がんの病期診断	50
第 6 項 治療	51
第 7 項 治療反応の評価	51
第 8 項 統計解析	52
第 3 節 結果	53
第 1 項 子宮頸がん病期診断	53
第 2 項 子宮体がん病期診断	53
第 3 項 子宮がんの病期診断能力	54
第 4 項 治療効果の評価	55
第 4 節 考察	57
第 5 節 小括	60
謝辞	67
参考文献	68

序 論

がんは我が国の死亡原因第一位であり、全死亡率の約3割を占める。がんの治療には、体内から腫瘍細胞を完全に除去することが求められる。腫瘍病巣が限局的に存在していれば、外科的手法を用いて取り除く方法がとられるが、腫瘍細胞は周囲の重要組織に浸潤することや、遠隔部位に転移を起こすことがあるため、その位置や大きさ、転移の有無を把握し、患者個々の病態に最適な治療を選択する必要がある。がんの克服のためには病態を正確に把握する必要があり、画像診断はそのための最も重要な手段のひとつである。近年は、がん病巣の形態学的な評価だけでなく、治療効果判定、さらには治療感受性予測、予後予測といった機能情報が必要とされている¹⁻⁴⁾。

がん病巣の機能情報を得る代表的なものには、放射性同位元素 (RI) から放出される γ 線をイメージングするSingle Photon Emission Computed Tomography (SPECT) やPositron Emission Tomography (PET) が知られている。SPECTやPETは、放射性同位元素を用いて合成された薬剤を体内に投与し、生体臓器の活動、生化学過程の解明、および治療状況の把握を目的とした機能診断技術である。SPECTやPETは放射線 (γ 線) の高い物質透過性を利用したもので、放射標識された薬剤を体内に投与し、そこから放出される放射線を検出して機能画像として診断を行う。PET検出装置は、生体の周囲を取り巻くように配列された多数の検出器と2個の光子の信号を同時計数する回路からなる。対向する検出器が同時に γ 線を検出した時、その2つを結ぶ直線から β^+ 崩壊が起こった薬剤の位置情報が得られる。これらの累積した位置情報をコンピューターにより画像再構成することで標識化した薬剤の生体内分布を三次元画像で得ることが出来る。SPECT装置は放射線の入射方向を限定する鉛コリメータが必要であるが、PET装置では時計数により薬剤の位置が判明するため検出

器の前にコリメータを置く必要がない。それにより、PETはSPECTよりも標的分子の機能を高感度に、且つ定量的に画像情報を得ることができる。

現在、多臓器がんを対象として 2-[¹⁸F]-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) を用いたPETによるがん診断が、急速に普及している。FDGは解糖系エネルギー代謝が活発な組織に分布するという特徴を有している。腫瘍細胞は糖代謝が正常細胞より活発なことからFDGは正常組織より腫瘍組織により集積する。それ故、FDG-PET診断は腫瘍細胞の糖代謝という情報を提供することができる。病巣を陽性描画し、活動性を評価できるFDGは、がん病巣の検出に関して、現在のところ最も優れたPET薬剤である。しかし、糖代謝が活発に行われる脳や心臓は正常状態でもFDGの集積が高く、細胞密度の乏しい腫瘍組織、糖代謝が低いがん組織では集積は低く、検出が困難である。それらを補うために近年では、新たな放射性標識化合物の開発が進められている^{5,6)}。しかし、それらの標識化合物は厚生労働省の承認を受けてわが国で発売されている放射性医薬品とは異なり、院内製剤として扱われるため、薬剤師の役割は非常に重要である。院内で製造される放射標識薬は、物理学的半減期が数分から数時間と極めて短いために、その多くが施設内で核種の製造から標識化合物の合成を経て製剤化される。標識化合物の合成は、非常に小さいスケールで放射線を遮蔽しながら短時間で行う必要があり、一般的な有機合成の手法とは異なった配慮が必要である。さらに冷却、加熱、試薬や反応液の移送、抽出やクロマトグラフィによる分離精製、溶媒除去、滅菌などの単位操作を、遠隔的に行えるように自動化された装置を使用して実施する必要がある。ここに至るまでの間、試薬の選択や保管、精製、反応条件の検討が不可欠であり、薬学の知識が必須である。さらに調製された注射剤については、放射エネルギーはもとより、放射化学的、一般化学的純度に加えて、無菌試験を必要とする。このことを踏まえて日本核医学会では、施設の放射線障害

予防規程の遵守はもとより、製品標準書、品質管理基準書、製造管理基準書、製造衛生管理基準書の作成を求めている⁷⁾。さらに、薬剤に関する責任の所在を明らかにするために、製造管理者、製造管理責任者、品質管理責任者を配置するよう求めており、特に直接に製造を管理する立場の「製造管理者には薬剤師が望ましい」と明記されている。これは研究・臨床を問わず人体に投与される放射標識薬全般について、製造管理者が 100%の製造責任を負うことを示唆している。研究過程で許される合成失敗や不純物混入による品質低下は、受診者に不利益と負担を強いることになる。

分子イメージングの分野では、新規試験化合物の腫瘍への集積とそのイメージング能の有益性が確認されても、衛生的かつ安定な化合物の獲得が困難であるため、臨床応用まで至らない場合が多い。がんの分野で高感度かつ定量的な機能診断には、標的とした腫瘍との相互作用を正確に反映することが出来る標識薬の開発が必要不可欠である。一般的に理想的な標識薬の条件は、①標的腫瘍細胞への高い移行性、②標的腫瘍細胞への高い親和性、③標的腫瘍細胞への高い選択性、④標的腫瘍細胞からの解離性、⑤速い体内動態(短い血中半減期)、⑥標的腫瘍細胞における低い非特異結合、⑦生体内での高い特異結合、⑧生体内での代謝安定性等が挙げられる。

以上の背景から放射標識を用いた診断用医薬品の開発と臨床応用を目的として、本研究では、がん診療における放射標識薬の適応拡大や新規診断用薬の開発に焦点をあてた。

第 1 章では、核酸医薬品における放射標識化技術の応用を目的として、RI 標識低分子二本鎖 RNA (siRNA) の開発とイメージングの基礎的検討を行なった。合成した標識化合物の特定 mRNA への取り込みと診断用標識薬としての可能性を探索した。

第 2 章では、すでに臨床応用が進んでいる細胞膜代謝を反映する [¹¹C]-Choline の

国立がん研究センターにおける臨床研究体制の確立と標準化を目指し、その合成や検査法を改良するとともに組織分布と診断能に関する臨床研究を行なった。その結果、 ^{11}C -Choline PET/CT (以下、Choline-PET) と Magnetic Resonance Imaging (MRI) の組み合わせは子宮がん患者の病期診断精度を上げることを見出し、 ^{11}C -Choline の画像診断薬としての有用性を認めた。以下にそれぞれについて詳細に記す。

1 章の背景

small interfering RNA (siRNA) は、21–23 塩基対からなる低分子二本鎖RNAである。siRNAはRNA干渉 (RNAi) に関与しており、mRNAの破壊によって配列依存性の遺伝子サイレンシングを誘導する。この現象はウイルス感染などに対する生体防御機構の一環として起こっていると考えられるが、合成siRNAがヒトの細胞においても、RNAi現象を惹起しすることが確認されている。このRNAi技術を用いた遺伝子治療は、様々な疾患の新しい治療戦略になると期待されている⁸⁾。しかし、siRNAの基本骨格であるヌクレオチドの分子量は 310~330 程度であり、2 本鎖であることから分子量は約 13,000 程度となり、化学合成で製造される医薬品（一般的に分子量 1000 未満）と比較して高分子である。さらに、負電荷をもつホスホジエステル構造が連続したポリアニオン構造を有するため、疎水性の細胞膜を通過しにくいという特徴がある。さらに、目的外の遺伝子サイレンシングが起こる可能性などの問題を伴っている。生体内におけるRNAi技術の有効性はsiRNAを効果的に送達することが重要である。従って、非侵襲的に簡便にsiRNAの送達を追跡できる技術の開発が必要不可欠である。生体内でsiRNA分子の正確な薬物動態情報を得るには、前述のPETとSPECTが有用な技術である⁹⁾。PETは、陽電子放射性標識化合物の生体内分布と局所的な蓄積を非侵襲的に画像化でき、SPECTも単一光子放射性標識化合物の局所的蓄積の生体内分布をPETほどではないが画像化できる。これらの技術は、siRNAの前臨床研究に適用できる。

標識に利用した^{99m}Tcは現在、国内において標識核種を利用した全放射性医薬品の使用割合で6割を占め、使用頻度は最も高い。また、市販化された⁹⁹Mo/^{99m}Tcジェネレータから過テクネシウム酸ナトリウム溶液 (Na^{99m}TcO₄) を抽出し、標識反応に用いることができることから、サイクロトロンのような大型設備を必要としない点で

汎用性が高い。

本研究では、 ^{99m}Tc でsiRNAを標識する新技術を開発し、siRNAの生体内分布を調べるために、ジエチレントリアミン-N,N,N',N'',N''-五酢酸 (DTPA) と標識試薬を用いて二本鎖放射性siRNAを合成した。DTPAは短時間で第一級アミノ基と反応させることで安定なアミド結合を形成するために広く使用されており、特定のペプチド¹⁰⁾や抗体¹¹⁾やDNAオリゴヌクレオチド¹²⁾の標識に利便性が高い。 ^{99m}Tc は半減期が極めて短い (6 時間) ことから、二本鎖siRNAを標識することによるアニーリングプロセスを回避できる。このようにして調製した ^{99m}Tc 標識siRNAを、電気泳動後にオートラジオグラフィーにかけて同定した。この単一光子放出体標識siRNAを使用して、実際に、siRNAのDDSキャリアであるTransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solutionの存在下でSPECTカメラを用いてsiRNAの生体内分布を調べた。また細菌のlacZ遺伝子は β -ガラクトシダーゼ酵素に翻訳される。 β -ガラクトシダーゼは、分光光度法や蛍光法、化学発光によるアッセイを用いることで、細胞抽出物で迅速に直接アッセイできる優れたレポーター酵素である。このレポーター酵素も、基質としてX-Galを用いてin situでの組織化学分析に広く使用されている。本研究では、pSV - β -ガラクトシダーゼコントロールベクターを 293T細胞に導入し、TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Starter Kit16 を用いてマウスの肝臓に導入することにより、lacZ遺伝子を過剰発現させた。lacZ mRNAの発現を直接測定するために放射性標識siRNAを用いた。この分子プローブの特性を試験管内で調べ、ヒト疾患での遺伝子発現の生体内イメージングに対する有用性を評価した。

2 章の背景

[^{11}C]-Cholineは、当初アルツハイマー病の画像診断を行うことを目的としてFriedlandらにより合成された¹³⁾。1990年代に、Haraは脳腫瘍や前立腺がんにおいて、PET用腫瘍診断薬として[^{11}C]-Cholineの有用性を報告した¹⁴⁾。

コリンは生体内で重要な役割を果たす生体内成分、ホスファチジルコリンなどのリン脂質、メチル基供与体のベタイン、神経伝達物質のアセチルコリンの合成材料となる。活発な細胞分裂を繰り返すがん細胞では、コリンキナーゼ活性が亢進し、コリンの細胞内濃度が上昇する。[^{11}C]-Cholineはがん細胞の細胞膜に積極的に取り込まれるというFDGと異なる腫瘍の代謝機能情報が提供できる。このような、コリン代謝の亢進は、脳腫瘍、前立腺がん、乳がんなどですでに報告されている^{15, 16)}。また、[^{11}C]-Cholineの膀胱への集積は前立腺腫瘍への集積より遅いと報告されており、前立腺がんの検出に有効であるとの報告が多い¹⁷⁾。しかし、[^{11}C]-Cholineは肝臓・すい臓・十二指腸に生理的集積が高く、上腹部領域を含む多臓器の腫瘍診断には不向きとされることや、[^{11}C]の半減期が20.4分と短く多数の受診者に同日提供することが難しいため、臨床での実用性に乏しく様々な理由から保険適用されていない。また、がん治療の主流となる分子標的薬であるが、治療過程における腫瘍崩壊は内側から起きることがすでに知られており、分子標的薬の普及とともに、[^{11}C]-Choline PETによる固形がんの細胞膜代謝描出に対する有用性は高まっていると推察される。これら、糖代謝をイメージングするFDGと[^{11}C]-Cholineを同日で使用する事で、2つの異なる特性を評価する臨床的有用性を認め様々な結果が期待される。また、同日に2薬剤を用いた場合は、同コンディションで臨床評価が得られる利点を有する。そこで、これまで行われていた[^{11}C]-Cholineをより日常的に用いる安全で簡便な合成法の開発や撮像法や画像判断における指標が望まれていた。

第1章 ^{99m}Tc および SPECT 撮影を用いた二本鎖 siRNA 標識法の開発

第1節 目的

序論で述べたように、生体内におけるRNAi技術の有効性はsiRNAを効果的にmRNAへ送達することが重要である。しかし現在、非侵襲的に簡便にsiRNAの送達を追跡できる技術の報告はない。生体内でsiRNAの正確な薬物分布情報を得るためには、SPECTを用いたsiRNAの放射標識技術の開発が必須であり、放射標識siRNAは開発における前臨床研究に適用できる。それゆえ、本検討では、 ^{99m}Tc を用いてsiRNAを放射標識する技術の開発を試みた。

第2節 方法

第1項 材料

DTPA無水物およびHEPES緩衝液は同仁化学研究所（日本、熊本）から購入した。塩化スズ(II)は和光純薬工業株式会社（日本、大阪）から購入した。ウシ胎児血清はシグマ-アルドリッチ社（米国ミシシッピ州セントルイス）から入手した。293T細胞は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター（日本、茨城県つくば市）から購入した。siRNA、アデノシン三リン酸（ATP）、ポリ(A)ポリメラーゼおよび β -ガラクトシダーゼ染色キットはタカラバイオ株式会社（日本、滋賀）から購入した。Opti-MEM、Poly(A) Tailing Kit、mirVana miRNA Isolation KitおよびRNase AはThermo Fisher Scientific Inc.社（米国マサチューセッツ州ウォルサム）から購入した。pSV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクターはPromega Corporation社（米国ウィスコンシン州マディソン）から購入した。TransIT-293、TransIT-TK0、TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Starter KitとTransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solutionは、Mirus Bio LLC社（米国ウィスコンシン州マディソン）から

購入した。過テクネチウム酸ナトリウム (^{99m}Tc) は日本メジフィジックス株式会社 (日本、東京) から購入した。

他の化学物質および溶媒はすべて、分析用品質のもので、特に明記しない限り、さらに精製せずに用いた。DNA の濃度と純度は分光光度法 (米国 Bio-Rad 社製 Smart Spec 3000) で定量した。SPECT 画像撮影は Siemens mCAM Gamma Camera (ドイツ、ミュンヘン) を用いて行なった。全試料の放射能はガンマカウンター COBRA II 5003 (パーキンエルマー社、米国マサチューセッツ州ウォルサム) を用いて測定した。

第2項 実験動物

特異的病原体をもたない（SPF）5週齢雌 BALB/c マウスを、横浜市立大学と国立がんセンターの動物施設ガイドラインに従って飼育した。動物実験はすべて横浜市立大学および国立がんセンターの動物倫理審査委員会によって承認された。

第3項 siRNA 配列

高品質 siRNA をタカラバイオ社から購入した。この siRNA は鎖の 3' 末端に 2 個のウラシルのオーバーハングを有していた。siRNA のヌクレオチド配列は、lacZ 遺伝子（NCBI Accession No. NC_004431）を標的とするように設計されており、アンチセンス鎖が含まれていた。

lacZ 遺伝子を標的とする siRNA の配列は以下のとおりである：

5'-GCAUAAACCGACUACACAAUU-3'（センス）

5'-UUGUGUAGUCGGUUUAUGCUU-3'（アンチセンス）。

lacZ 遺伝子を標的としない陰性コントロール siRNA の配列は以下のとおりである：

5'-ACAAACCGGCAUACAACUAAU-3'（センス）

5'-UAGUUGUAUGCCGGUUUGUUU-3'（アンチセンス）。

第4項 ^{99m}Tc による siRNA の放射性標識

はじめに ATP と DTPA の結合を試みた。HEPES 緩衝液 (0.1 M、20 μL) を ATP 溶液 (100 mM、20 μL) と混合した。次いで、この溶液に DTPA 無水物 (2 mg) を加え、5 分間室温で攪拌した。上清を慎重に集めて DTPA 結合 ATP 溶液とした。

次に、Poly(A) Tailing Kit を用いて、複数個のアデニンを siRNA の 3' 末端に付加した。表 1 に示す siRNA 溶液 (20 μM = 0.26 mg/ml、20 μL) を Poly(A) Tailing Kit 中の試薬に加え、よく混合後、溶液を 37°C で 3~6 時間インキュベーションした。溶液中のポリ(A)ポリメラーゼ (E-PAP) の濃度を変化させ (0~32 U)、最適濃度を決定した。一連の工程を終えた後、氷冷して反応を止めた。

mirVana miRNA Isolation Kit を用いて、標準的な手順で DTPA-ポリ(A)-siRNA 混合物を精製した。RNA 全体の精製以外に、低分子ドメイン (21~200 bp) と高分子ドメイン (200 bp 以上) を分離精製した。さらに、 $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (100 μL 、74 MBq) と少量の塩化スズ(II)を溶液に加え、よく混合し、37°C で 5 分間インキュベートした。氷冷して反応を止め、その後、 ^{99m}Tc -DTPA-ポリ(A)-siRNA 混合物を採取した。

Poly(A) Tailing Kit の組成

ポリ(A)ポリメラーゼ (2 U/ μL)	16 μL 32 U
反応緩衝液	50 μL
DTPA-結合 ATP 溶液	2 μL
siRNA	20 μL
RNaseA を含有しない水	12 μL
合計	100 μL

第 5 項 siRNA の標識の評価

非標識siRNAと^{99m}Tc標識siRNA (8 μ g) を 20%ポリアクリルアミドゲルに添加し、電気泳動にかけた。その後、ゲルをX線フィルムに感光させ、^{99m}Tcのオートラジオグラムを得た。ゲルをエチジウムブロマイド (EtBr) で 5 分間染色し、UV Transilluminator TM-20 (フナコシ株式会社(日本、東京)) を用いてsiRNAを検出した。また、ガンマカウンターを用いて、ゲルのsiRNAバンドの放射能を測定した。

293T 細胞への lacZ 遺伝子および siRNA の両方の共トランスフェクション

TRANSIT-293 (80 μ L) と pSV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクター (20 μ g) を Opti-MEM (2 mL) に混合した。さらに、この溶液に TRANSIT-TKO (120 μ L) を添加し、混合物をエッペンドルフ管 (350 μ L) に採取した。^{99m}Tc標識siRNAまたは非標識siRNA溶液を Opti-MEM で希釈し、それぞれから溶液 (18 μ L) を取り、上記混合物と混合した。

ヒト胎児腎細胞由来 293T細胞を 24 ウェルプレートに撒き、5% CO₂条件下、37°C で培養した。次いで、コンフルエントになる直前にそれらをインキュベータから取り出した。各ウェルから栄養培地 (250 μ L) を除去し、試薬を加えた。この試薬で各ウェルの総体積を 60 μ Lにした。一定時間、5% CO₂雰囲気下、37°Cで混合物をインキュベーションした。

第6項 β -ガラクトシダーゼ染色アッセイ

β -ガラクトシダーゼ染色アッセイには、 β -ガラクトシダーゼ染色キット（タカラバイオ社）を用いた。簡潔に述べると、293T 細胞をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で穏やかに洗浄した。固定緩衝液を各ウェルに添加した。293T 細胞を、室温で 5～10 分間インキュベーションした。細胞は固定されていたが、適量の X-Gal 染色混合物が調製された。次いで、ウェルを PBS で 2 回洗浄したのち、X-Gal 染色ミックス（1 mL）を各ウェルに添加した。次いで、ウェルを 1 時間から一晩までの範囲で、37 °C でインキュベーションした。青色の発色を光学顕微鏡で測定した。

第7項 マウス肝臓における lacZ 遺伝子の過剰発現

マウス肝臓における lacZ 遺伝子の過剰発現を起こさせるために TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Starter Kit を用いた。マウスを 50mg/kg ペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔した後、動物ホルダーに固定した。マウスの尾静脈に TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution (2.09 mL) を pSV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクター (10 μ L) に加えた注射液を全量、定速で 4～7 秒以内に注入した。

第8項 ^{99m}Tc 標識 siRNA の SPECT 画像撮影

^{99m}Tc 標識siRNAの生体内分布は、Siemens MCAM Gamma Cameraを用いて非侵襲的に撮影した。マウスを 50 mg/kgのペントバルビタールの腹腔内注射で麻酔した後、動物ホルダーに固定した。siRNAの全身の体内分布を測定するため、TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Solution (2.5 MBq/匹) を用いて ^{99m}Tc 標識siRNA (0～200 bp) を尾静脈から静脈内投与した。投与後直ちに走査を開始し、60 分間撮影した。

第9項 RNAアーゼAによる分解に対する siRNA の安定性の評価

非標識siRNA、^{99m}Tc標識siRNAおよびTransIT-TK0 (10 μg/mL)との結合体型の標識siRNAに、分解酵素であるRNase A (20 μg/mL)を加え、37℃で90分間インキュベーションした。分光光度計を用いてsiRNA密度を測定した。

第3節 結果

第1項 ^{99m}Tc による siRNA の放射性標識

ポリ(A)ポリメラーゼを用いて、数個のアデニンをsiRNAの3'末端に付加し、アデニンの $-\text{NH}_2$ 基とDTPAの $-\text{COOH}$ 基を結合させた。さらに、DTPAのキレート形成作用を用いて、 ^{99m}Tc をsiRNAに結合させることに成功した (fig. 1)。

第2項 siRNA 標識の評価

ポリ(A)ポリメラーゼの量が増えるにつれて、EtBrの使用によって21 bpバンドの強度が下がり、200 bpを超えるバンドはより明確になった (fig. 2:a-1)。しかし、21 bpの放射性バンドはオートラジオグラフィーでより強く感光し明確になった (fig. 2:a-2)。一方、200 bpを超えるサイズ領域に明確な放射性バンドは現れなかった。さらに、各レーンのゲルを0~200 bpおよび>200 bpの領域の小片に分断し、ガンマカウンターを用いてそれぞれの放射能計数率を測定した。0~200 bpの試料の放射能計数率は、ポリ(A)ポリメラーゼの増加に伴って増加し、200 bpを超える試料の放射能計数率も増加した (fig. 2:b)。

^{99m}Tc 標識後にsiRNAのノックダウン効率が変化したかどうかを確認する実験を行った。pSV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクターをヒト胎児腎臓由来293T細胞に導入、5% CO_2 条件下、37°Cで細胞を48時間インキュベーションして、 β -ガラクトシダーゼを細胞内で強制的に発現させた。 β -gal染色キットを用いて測定したところ、多くの青色細胞が現れた。このことにより、 β -ガラクトシダーゼの発現が確認された (fig. 3 a)。

また、siRNAトランスフェクション試薬を用いた、前述のベクターとlacZ遺伝子用

非標識siRNAの 293T細胞への共トランスフェクション後は、 β -gal Staining Kit による染色細胞（青色細胞）はほとんど消失し、 β -ガラクトシダーゼがノックダウンされたことが明らかになった。一方、ベクターと陰性コントロールsiRNA (lacZ をノックダウンしないように設計されているsiRNA) の共トランスフェクション後は、無数の青色細胞が出現し、 β -ガラクトシダーゼの発現は全く阻害されなかった。次に、 ^{99m}Tc 標識siRNAを用いて 293T細胞への共トランスフェクションを（標的のlacZと陰性コントロールについて）同様に行い、48 時間インキュベーションした後、細胞の存在を染色によって確認した。 ^{99m}Tc 標識siRNAのうち 21~200 bp画分を用いたときには、青色の細胞はほとんど出現せず、 ^{99m}Tc 標識siRNAのノックダウン効率は、非標識siRNAのそれに比べてほとんど変化していなかった。しかし、200 bpを超える画分を使うと、無数の青色細胞が出現し、ノックダウン効率は著しく減少した (fig. 3)。

第3項 RNAアーゼAの分解に対する siRNA の安定性の評価

トランスフェクション試薬TransIT-TK0を用いて、非標識siRNA、裸の^{99m}Tc-siRNA および^{99m}Tc-siRNAのRNase A耐性を比較した。^{99m}Tc-siRNA とTransIT-TK0の場合、RNase A添加から 60 分後に残っていたRNAは 60%を僅かに下回っていた。一方、裸の非標識siRNAと裸の蛍光色素Cy3 標識siRNAの場合は、RNase Aの添加から 7 分後にはほぼ全てのsiRNAが分解された。TRANSIT-TK0は使用しなかったが、裸の^{99m}Tc-siRNAのみの場合は、RNase A添加 60 分後に残っていたRNAは 30%を少し上回る程度であった (fig. 4)。

第4項 lacZ 遺伝子の過剰発現への ^{99m}Tc 標識 siRNA-SPECT 画像撮影

TransIT-QR Hydrodynamic Delivery Starter KitとpSV -β-ガラクトシダーゼコントロールベクターを用いて、マウスの肝臓にlacZ遺伝子を強制発現させた。^{99m}Tc 標識siRNAの溶液 (0~200 bp) を、2 mLのトランスフェクション試薬TransIT-QRと混合し、尾静脈からマウスに混合溶液を静脈内投与した。投与 30 分後にSPECTカメラを用いて撮影を行なった。^{99m}Tcの顕著な蓄積が肝臓で認められた。一方、トランスフェクションなしのマウス肝臓では^{99m}Tcの蓄積は少なく非特異的であった (fig. 5)。

第4節 考察

RNAiは、siRNAが作用する配列特異的な転写後遺伝子サイレンシング法である。最近、siRNA医薬品の局所適用剤が臨床試験に入り、また、全身注入用siRNA送達システムが次世代siRNA医薬品のために広範に研究されている¹⁸⁾。siRNA薬標識化技術は、siRNA医薬品の開発を加速させるために特に重要である。

siRNAは遺伝子特異的で、標的mRNAの部分塩基配列に対応する塩基配列から構築されている。しかし、標的mRNAの部分配列のすべてに有効なsiRNAを生成できるわけではない。mRNAは数千塩基の長さを持ちうるので、特定のmRNAに対する潜在的なsiRNA候補は多数ある¹⁹⁾。したがって、lacZを標的とする有効なsiRNAを用い、標識合成研究を行なった。本研究では、標識の確認をsiRNAのサイレンシング効果を用いて β -gal染色にて評価した。

siRNAの送達を追跡するための放射性標識法はいくつか報告されており、熱交換を用いるH-3 標識²⁰⁾や5'リン酸化によるP-32 標識²¹⁾などがある。しかし、これらの方法では、siRNAの送達を非侵襲的に可視化することはできない。ほかにsiRNAはDOTAまたはDTPAでキレート化した後、In-111 やCu-64 で標識し可視化できる^{22,23)}。しかし、サイクロトロンによるCu-64 やIn-111 の生成を広範に応用することには限界がある。そこで、十分な放出エネルギー、調製のしやすさ、基礎研究と臨床応用における安全性を考慮して、本研究では^{99m}Tcを選択した。

分子プローブは以下の2段階で合成した。すなわち、siRNAをDTPA結合ATPでキレート化して標識用配位基を作り、その後、siRNAを^{99m}Tcで標識した。siRNAの3'末端に数個のアデニンを付加するためにPoly(A) Tailing Kitを使用した。このキットには、RNA転写物に150塩基以上のポリ(A)テールを追加するように設計された試薬セットが含まれている。ポリ(A)ポリメラーゼ(E-PAP)とATPを用いる。得ら

れるキャップ部と尾部が付加されたRNAはトランスフェクションやマイクロインジェクション実験に使用でき、mRNA安定性と翻訳効率が高くなることから、尾部のないmRNAに比べて翻訳の増強が認められる^{24, 25)}。

本研究では、293T細胞を、pSV- β -ガラクトシダーゼコントロールベクターとlacZ mRNA標的siRNAか陰性コントロールsiRNAのいずれかを用いて共トランスフェクトした。その後、 β -gal染色キットを用いて、それらの β -ガラクトシダーゼタンパク質の発現レベルを可視化した。その結果、lacZ mRNA標的siRNAとトランスフェクトした細胞は、陰性コントロールsiRNAに比べて、著しいダウンレギュレーションを示すことがわかった。^{99m}Tc-DTPA-ポリ(A)-lacZ mRNA標的siRNAでも同様の阻害効果が認められ、DTPAの結合と^{99m}Tcによる放射性標識はsiRNAの生物学的活性に影響を与えないことが示唆された。^{99m}Tc標識siRNAの21~200 bp画分を用いた場合、^{99m}Tc標識siRNAのノックダウン効率は非標識siRNAのそれとほぼ変わらなかった。しかし、200 bpより大きな画分を用いた場合にはノックダウン効率は著しく低下した。

200bpより大きな画分のsiRNAは巨大分子構造を造っていたので、標的mRNAに対するアニール能力が低下した。そのため、この画分はsiRNAとしての機能を失っていたと考えられる。このため、標識率は高いものの、このsiRNA画分は、オートラジオグラフィーの結果とゲルの放射能に基づく遺伝子イメージング用プローブとしての後続研究での使用には適していなかった。

肝臓にlacZを過剰発現させたマウスに^{99m}Tc-DTPA-ポリ(A)-lacZ mRNA標的siRNAを尾静脈投与30分後に、放射性標識プローブを用いたSPECT画像撮影によって、プローブが主要器官からは急速に排泄されるが、肝臓からは排泄されないことが明らかになった。

投与30分後、lacZ遺伝子過剰発現マウスの肝臓に取り込まれたプローブの量は、

正常対照マウスの肝臓に取り込まれたプローブ量よりも多かった。このことは、 ^{99m}Tc -DTPA-ポリ(A)- siRNAプローブがlacZ mRNAに対して特異的にハイブリダイゼーションすることと、lacZ遺伝子過剰発現細胞に放射性標識siRNAが特異的に蓄積することを意味している。

本研究の結果は、 ^{99m}Tc -DTPA-ポリ(A)- lacZ mRNA標的siRNAが生体内で β -ガラクトシダーゼを検出できることを示している。しかし、 β -ガラクトシダーゼは、臨床的には重要なタンパク質ではないので、著者は、新しい腫瘍イメージングを実現させる可能性がある ^{99m}Tc -DTPA-ポリ(A)- 癌遺伝子標的siRNAの研究を行う予定である。

体内の生理条件下でのsiRNA標識の安定性は重要である。siRNAは2'-メトキシ修飾によって生体内でのヌクレアーゼ分解に対して強くなり、siRNAが干渉効果を維持できるようになることが実証されている²⁶⁾。本研究では、トランスフェクション試薬(TransIT-TK0 およびTransIT-QR)を用いて siRNAを安定化して投与した。標識siRNA自体の安定性を評価するために、試験管内で、TransIT-TK0使用・不使用の各条件下で標識siRNAをRNase Aと共にインキュベートし、複数の時点でその濃縮密度を測定した。結果、TransIT-TK0を用いない場合であってもRNase Aに対して作成した標識siRNAが安定であった。

小括

本研究では、siRNAのための新たな単一光子放出体標識法を開発し、SPECTカメラを用いて^{99m}Tc標識siRNAの生体内輸送について評価を行なった。本研究の結果は、作製した標識siRNAが、トランスフェクション試薬との結合体としても、裸の標識siRNAとしても安定であり、標的遺伝子が過剰発現している特定の領域に送達できることを示唆した。したがって、この技術はsiRNA薬の開発に役立つと考えられた。

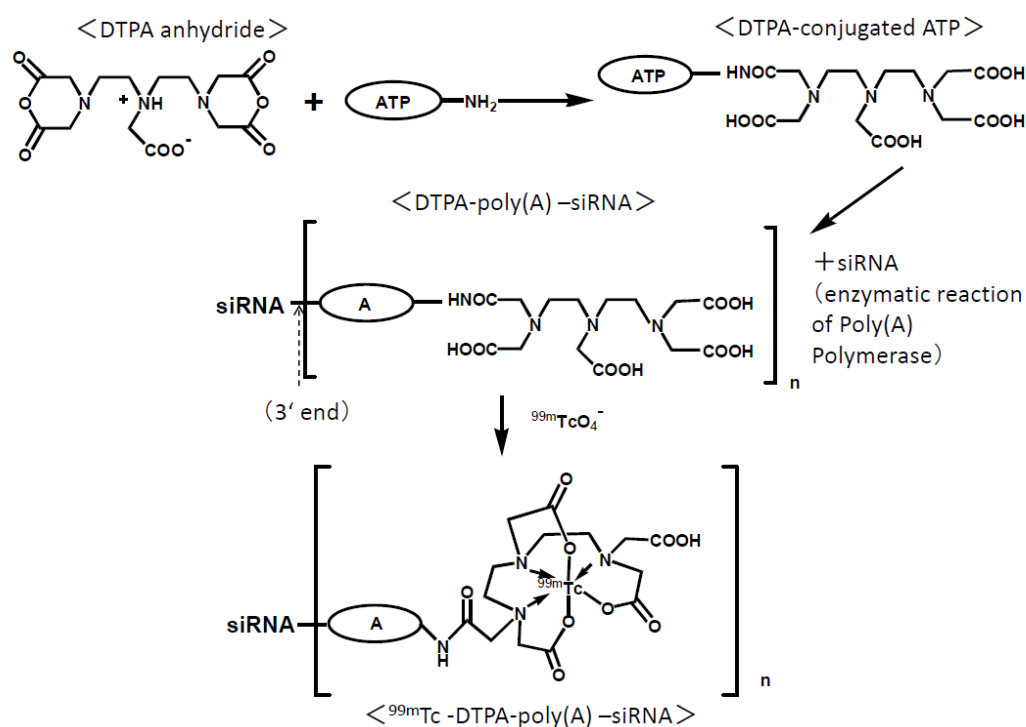


Fig. 1 Synthesis of ^{99m}Tc -DTPA-poly(A) -siRNA:

(1) DTPA anhydride was added to an ATP solution and DTPA-conjugated ATP was produced. (2) Adenines were added to 3' end of siRNA by enzymatic reaction of Poly(A) polymerase (E-PAP) and DTPA-poly(A) -siRNA was generated. (3) $^{99m}\text{TcO}_4^-$ and slight stannous chloride (II) were added to the solution and incubated. (4) ^{99m}Tc -DTPA-poly(A) -siRNA was generated.

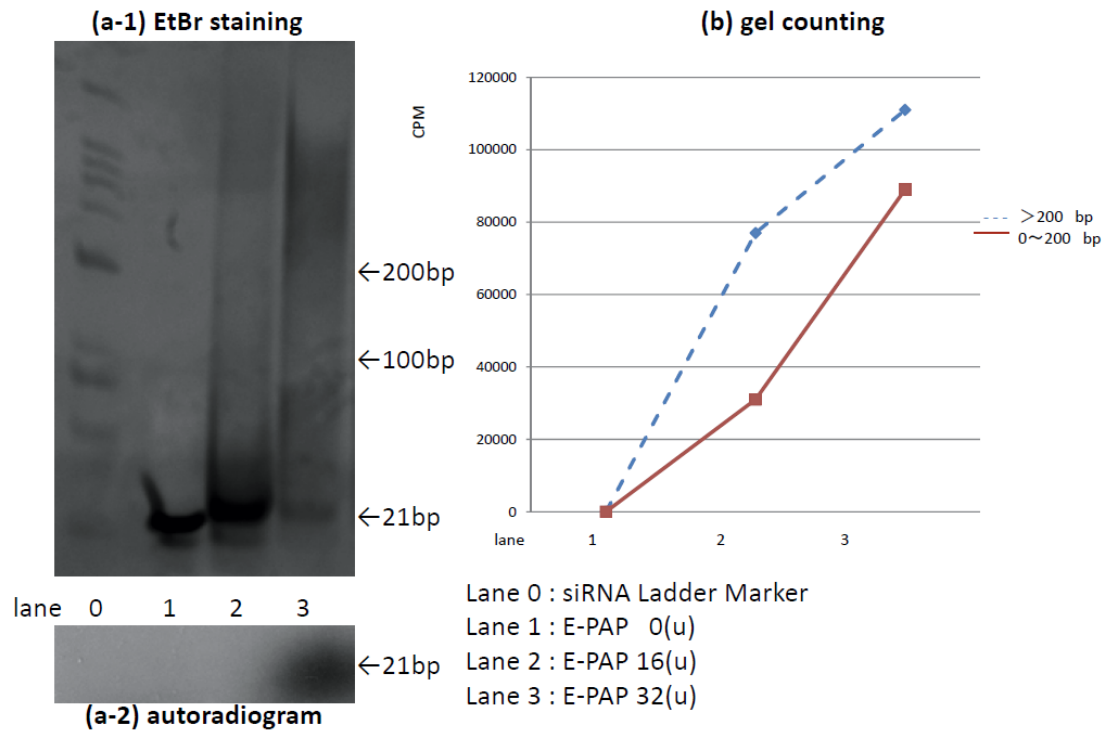


Fig. 2 (a-1) **EtBr dyeing**: As quantity of Poly(A) polymerase rose, 21 bp bands weakened and the bands at the domains more than 200bp became clear. (a-2) **Authoradiography**: 21 bp radioactivity bands became clear as quantity of Poly(A)polymerase rose. (b) **Gel counting**: The radioactivity count of the 0 - 200 bp fraction increased as quantity of Poly(A) polymerase rose (red solid line), and the radioactivity count of more than 200 bp fraction also increased(blue wavy line).

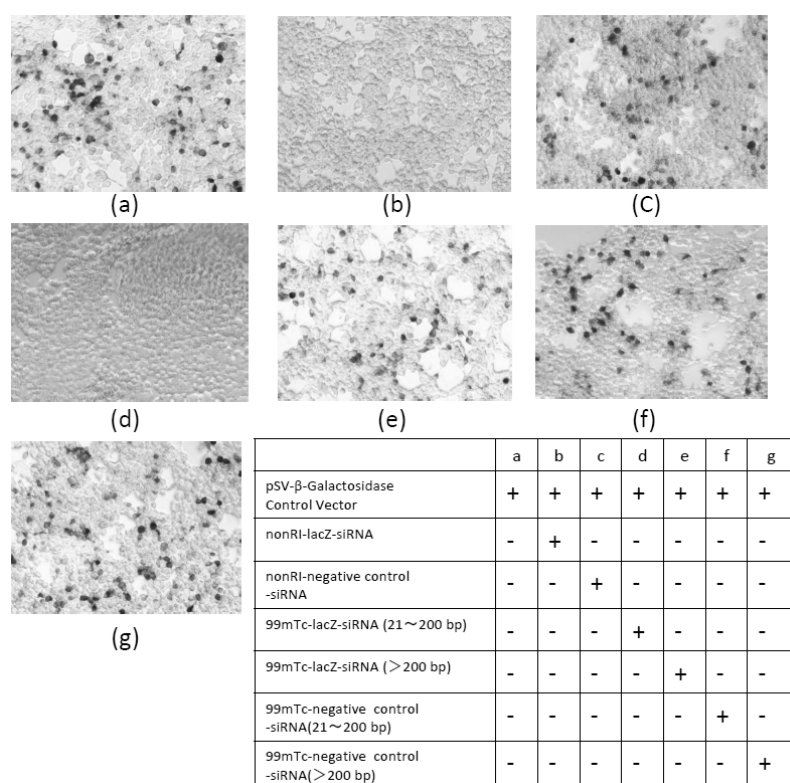


Fig. 3 Beta-Galactosidase Staining Assay: After introducing pSV- β -Galactosidase Control Vector into 293T cell, β -Galactosidase was developed forcibly in the cells. (a) Many blue cells appeared by β -gal dyeing to confirm expression of β -Galactosidase. (b) After co-transfecting the above vector and non-labeled siRNA for the lacZ gene to 293T cells, a cell dyed by β -gal staining kit (a blue cell) almost disappeared. (c, f, g) β -Galactosidase was not restrained at all after co-transfecting the above vector and negative control siRNA. (d) Similar co-transfection for 293T cells about ^{99m}Tc -labeled siRNA was performed. When we used 21 - 200 bp fraction among ^{99m}Tc -labeled siRNA, the knockdown efficiency of the ^{99m}Tc -labeled siRNA hardly changed in comparison with the knockdown efficiency of the non-labeled siRNA. (e) When we used fraction more than 200bp, and the knockdown efficiency decreased remarkably.

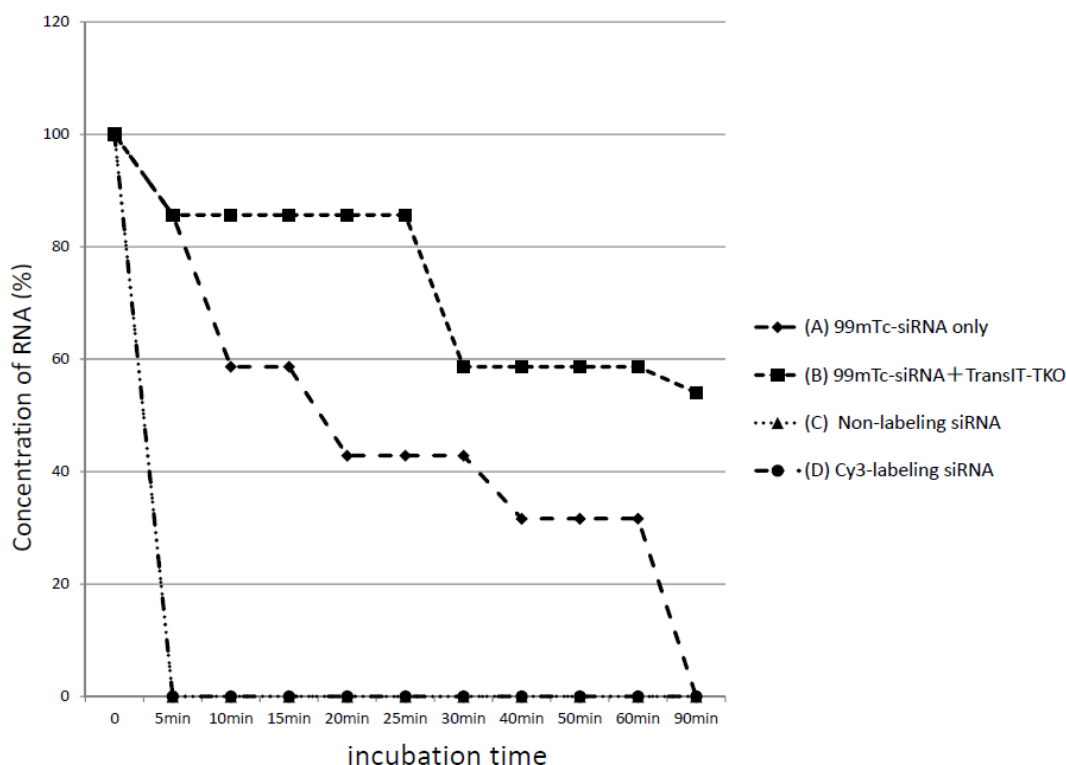


Fig. 4 Evaluation of siRNA Stability against RNaseA Degradation.

In ^{99m}Tc -siRNA with Trans IT TKO, a little less than 60% of RNA remained at 60 minutes after adding RNaseA (B). In naked non-labeled siRNA (C) and naked fluorescent dye Cy3-labeled siRNA (D), almost all siRNA was broken down at seven minutes after adding RNaseA. In naked ^{99m}Tc -siRNA only (A), a little over 30% of RNA remained at 60 minutes after adding RNaseA though we did not use Trans IT TKO.

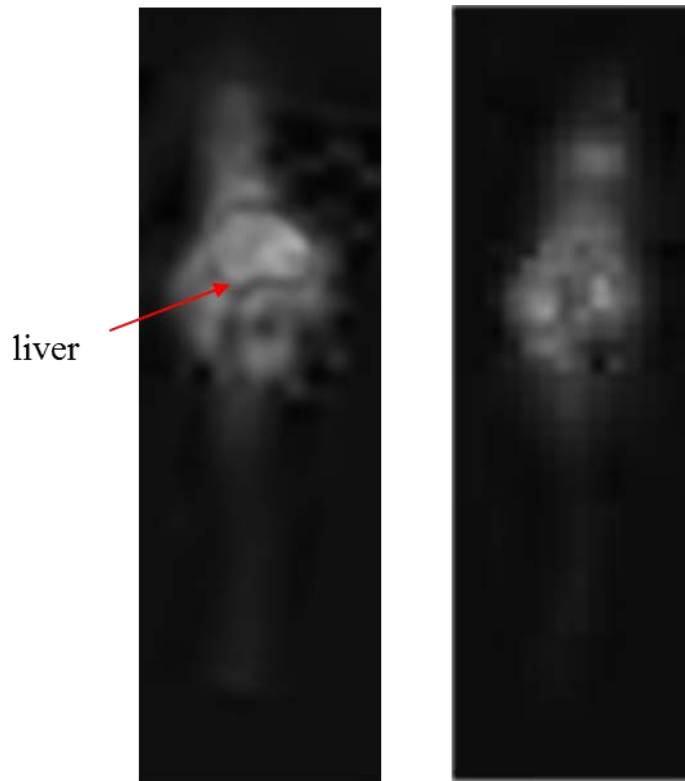


Fig. 5 SPECT Imaging of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Labeled siRNA: (a) We forcibly produced lacZ gene to the liver of a mouse. We administered $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -labeled siRNA solution (0 - 200 bp) to the mouse intravenously from its tail vein. At, 30 minutes after administration, we imaged it by an SPECT camera. The significant $^{99\text{m}}\text{Tc}$ accumulation to the liver was observed. (b) The $^{99\text{m}}\text{Tc}$ accumulation to the liver of the mouse without transfecting the vector in the liver was a little and nonspecific.

第2章 $[^{11}\text{C}]$ -Choline - PET 製剤の簡易合成法と臨床への応用

検討1-1 $[^{11}\text{C}]$ -Choline PET 製剤利用の検討

第1節 目的

序論で述べたように、 $[^{11}\text{C}]$ -Cholineをより日常的に用いるために、より安全で簡便な合成法の開発と撮像法および画像判断における指標が望まれていた。本研究は、以下の3項目を目的として検討した。(1) これまで行われていた $[^{11}\text{C}]$ -Choline合成法を見直し、小型で遮蔽された合成装置およびコンピューターによる制御プログラムを作成する。 $[^{11}\text{C}]$ -Choline合成の収量と作業者の被ばく量を調べ、安全な検査の遂行を目指す。(2) がん患者に投与された $[^{11}\text{C}]$ -Cholineの体内動態を調べ、骨盤部位の検査によって下腹部腫瘍領域の検出最適条件を決める。(3) 正常臓器を対象に $[^{11}\text{C}]$ -Cholineの体内分布を調べ、診断における異常値の検出判断を決める。

第2節 方法

第1項 原料

$\text{N}_2 \cdot 0_2$ 混合ガス (99.2%) はそれぞれ 99.9999%を用い、太陽日酸 (千葉) から購入した。Lithium aluminium hydride ($\text{LiAlH}_4/\text{THF}$) はABX (SA., France)から購入した。Tetrahydrofuran (THF) はSigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO) から購入した。ヨウ化水素酸とdimethylaminoethanol (DMAE) は試薬特級を(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka) から購入した。

第2項 $[^{11}\text{C}]$ 標識化を行う proton 照射時間の検討

$[^{11}\text{C}]$ 標識化には医療用小型サイクロトロン (Cyclone10/5) を用いた。サイクロトロンは、強い磁界と高周波電界を用いて、真空中で陽子を加速する装置である。

陽子は磁界に閉じ込められて同心円上の軌道を描くが、高電圧で加速されることで、しだいに回転半径が大きくなる。このとき粒子が一周するのに要する時間（回転周期）は、回転半径が大きくなっても変わらない。したがって、粒子の回転周期と同期した高周波（数 10 MHz）を与えることによって繰り返し加速することができる。これを利用して加速陽子がサイクロトロンの最大半径に達したとき、陽子をサイクロトロンから取り出してターゲットに照射した。サイクロトロンは、水素の原子核である陽子を光速（秒速 $3 \times 10^5 \text{ km}$ ）の 1/4 程度まで加速することができる。

^{11}C 標識は $\text{N}_2 \cdot \text{O}_2$ 混合ガス (99.2%) に proton ($10 \mu\text{A} \cdot \text{h}$) を照射して得た。Proton の照射時間を変えて得られる最大 ^{11}C - CO_2 の量を測定し、最適な照射時間を検討した。なお $\text{N}_2 \cdot \text{O}_2$ 混合ガスの流速は 50 mL/min に固定した。

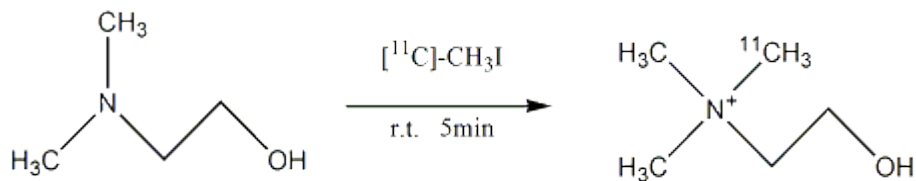
第 3 項 ^{11}C -Choline 合成装置の構築

^{11}C -Choline 合成システム

合成システムは、Choline 合成モジュールと精製モジュールから構成されている。Choline 合成モジュールは JFE 製（川崎）の基盤内部に細い流路を有し、ガスや液体の流量は小型バルブによって調節され、流路や流速の切り替えはコンピューターによって制御される。 ^{11}C - CO_2 をトラップするための冷却にはフロンガスを用いた。加熱には赤外線ヒーターを用いた。ヒーターの近赤外線波長は約 1 - 1.5 μm とした。モジュールの大きさは 22×19×18 cm で、これを遮蔽厚 20 cm の鉛で密閉したホットセル内に入れた。本装置のコンピューター制御は、既存の Lab View を用いて Windows XP に対応させた (fig. 6)。

[¹¹C]-Choline合成手順

[¹¹C]-Choline合成は下記のように行なった。



- 1、 枝付きハート型ガラス容器 (5 mL) に、0.1M LiAlH₄/THF溶液 (1:9、0.3 mL) を入れ、[¹¹C]-CO₂ (約 4 L、流速 50 mL/min) を-15 °Cで通導し、H₂IO₃ (57 %, 0.5 mL) を加えて[¹¹C]-CH₃ I を得た。
- 2、 DMAE (0.25 mL) に[¹¹C]-CH₃ I を溶解したのち、130°Cで5分間加熱した。
DMAEを減圧留去後、残渣を真空下で乾燥し、得られた[¹¹C]-Choline・H₂IO₃を2.5 mLの蒸留水/エタノール混液 (8:2) に溶かし、陽イオン交換カートリッジ (Sep Pak、360 mg/CM cartridge) に通導した。
- 3、 生理食塩水 (5 mL) で[¹¹C]-Cholineを溶出し、メンブレンフィルターで濾過後、滅菌バイアル中に保存した。

第4項 下腹部位の撮像

患者一名を対象にして、経時的に前立腺腫瘍部位、膀胱内の尿、および腸骨動脈に集積した ^{11}C -Cholineを測定し、前立腺イメージングの最適条件を検討した。集積は経時的に得られた画像上にregion of interest (ROI) を取り、吸収線量－時間曲線を作成して最適条件を求めた。データ収集はPET/CT複合機（東芝製Aquiduo、東京）を用い、データ解析はAZE・Workstationで行なった。

第5項 評価の算出

病変における集積の代表値はstandardized uptake value (SUV) から算出した。診断は ^{11}C -Choline－PET画像にCT画像を融合してPET/CT画像を作成し、癌組織と正常組織をそれぞれを視覚的な診断とSUV値で比較した。

$$SUV = \frac{\text{組織放射能濃度}}{\left(\frac{\text{放射能投与量}}{\text{体重}} \right)}$$

組織分布の検討は、平成17年4月から平成18年10月まで国立がんセンターにおいて事前に文書による同意を得た患者20名を対象に行なった。合成 ^{11}C -Choline（444MBq）を上腕静脈内に単回急速投与後、経時的に正常各臓器に集積した ^{11}C -Cholineを測定した。集積の評価は経時的に得られた画像上にROIを取り、吸収線量－時間曲線を作成し最適条件を求めた。データ収集はPET/CT（東芝製Aquiduo、東京）を用い、データ解析はAZE・Workstationで行なった。病変における集積の代表値はSUVから算出した。組織分布の正確性を期すため、 ^{11}C -Choline－PET画像にCT画像を融合してPET/CT画像を作成し、FDGの分布と比較した。FDGは摂食により吸収されず、血液や筋肉内にとどまる性質がある。激しい運動は筋肉への集積を生

じる。そのため患者は検査 5 時間前より絶食とし、前日の激しい運動を禁じた。合成された ^{11}C -Cholineは 444MBqを上腕静脈内に単回急速投与した。FDGは 37MBq/kgを同様に静脈内に投与した。

第 6 項 結腸直腸がん患者に対しての症例検討

50 歳女性の結腸直腸がん患者を対象に、前述の検討で得られた知見をもとに ^{11}C -Choline PET/CT検査を実施し、その診断能を調べた。主訴は下血と腹部の不快感であった。結腸内視鏡検査でS字結腸に隆起性病変が認められた (fig. 12)。内視鏡検査によりこの腫瘍はタイプ 1 の進行癌で漿膜下組織まで侵襲していると診断された。生検試料による病理検査では高分化型腺癌であった。胸部、下腹部、骨盤の断層スキャンでS字結腸壁の肥大と平滑筋腫が疑われる子宮の拡大が判明した。リンパ節の特有の肥大や肝臓を含む明白な転移は認められなかった。患者は書面によるインフォームドコンセントを得たのち、全身 ^{11}C -Choline PET/CT検査を行なった。

第3節 結果

第1項 Proton 照射条件

Proton照射は 10 MeV、照射量 $10 \mu\text{A} \cdot \text{h}$ 、照射時間 30 分で、得られた ^{11}C - CO_2 は最大で $17480 \pm 1523 \text{ MBq}$ であった。(fig. 7)

第2項 ^{11}C -Choline の合成

既報の開放系合成では反応時間 22 分で収量 $1475 \pm 1028 \text{ MBq}$ 、収率 $48.3 \pm 14.2 \%$ (n=5) であった。作業者の被ばく量は、合成一回当たり $46 - 84 \mu\text{Sv}$ であった。一方、今回開発した合成装置で行なった閉鎖系では、反応時間 14 分で収量 $7253 \pm 523 \text{ MBq}$ 、収率 $84.0 \pm 6.0 \%$ (n= 5) であった。作業者の被爆量は $2 - 4 \mu\text{Sv}$ であった。

閉鎖系では、合成モジュールを遮蔽されたセル中に設置し、操作は十分に離れたコンピューター端末で行なった。本法は「温度」「流速」「時間」を簡単に変更することができ、 ^{11}C -Cholineの自動合成装置を開発することができた。全工程で要した時間は開放系が 75 ± 12 分に対して、閉鎖系のそれは 43 ± 12 分であった。最終製剤は当所で規定する品質管理検定に合格し、臨床提供が十分に可能であった。収率は $84.0 \pm 6.0 \%$ (n= 5) で、臨床使用に十分な収量と再現性が得られた。

合成した ^{11}C -Cholineは、注射液 (^{11}C -Choline) 以外は塩化ナトリウムと水で立体異性体は存在しない。合成した ^{11}C -CholineはHPLC法 (RI検出器) の保持時間と ^{11}C の壊変時間から ^{11}C 誘導体であることを確認した (fig. 8)。また塩化Choline標品のUVと一致した (fig. 9)。これにより、合成品は ^{11}C -Cholineであると同定した。

第3項 検査条件

対象患者 20 名のうち、投与薬物による発熱などの有害事象は認められなかった。患者 1 例で減衰補正を行なったtime activity curve (TAC) を作成し、撮像条件を検討した。投与後、 ^{11}C -Cholineは腫瘍細胞内に急速に吸収され、6 分過ぎから膀胱内にも出現した。投与後 80 分後には体内放射線は検出されなかった (fig. 10)。

第4項 評価

FDGと ^{11}C -Cholineの集積比較を同日に行なった結果、下腹部で ^{11}C -Choline集積が少なく、この領域の悪性腫瘍検出に威力を発揮する可能性が示唆された。この領域の悪性腫瘍検出に威力を発揮する可能性が示唆された (fig. 11)。

第5項 ^{11}C -Choline PET による臨床成績

頭部から大腿中央部までの陽電子撮影画像は、合成 ^{11}C -Cholineの静脈投与後、得た。 ^{11}C -CholinePET画像は腹部中央の異常で明瞭な集積を示した (fig. 13-a, c)。この集積の最大値 (SUVmax) は 6.97 であった。この集積はS字結腸癌に対応していることが疑われた。しかし、この集積近傍にもう一つの強い集積があり、小腸への生理的集積が推察された (fig. 13-c)。これらをPET画像のみで識別するのは容易ではなかった。PET/CT融合画像を解析することによって、生理的集積がCT画像のS字結腸壁の肥大と対応していることを明確に示すことができた (fig. 13-d)。低い異常な集積が骨盤腔で観察され、これは子宮筋腫の大きさに対応していた。全身で、他には異常な蓄積は認められなかった。患者はS字結腸切除と単純子宮摘出を受けた。病理検査の結果、高分化型腺癌で漿膜下部組織に侵襲し、N1 グループ (2/30) の 2 つのリンパ節転移があることが分かった。これはTNM分類²⁷⁾ のステージⅢaであった。

これら 2 つのリンパ節転移は直径 10mm以下で、CT画像では正常なリンパ節と診断された。リンパ節転移は ^{11}C -Choline PETでは検出されなかった。子宮の病理検査の結果、多数の平滑筋腫が見つかった。

第4節 考察

第1項 Proton 照射

Proton照射時間を変化させて生成した、 $[^{11}\text{C}]\text{-CO}_2$ の放射能を測定したところ、30分まで徐々に増加し、30分から35分まで5分間で約8%低下したが、その後は約1.5 GBqと一定値を保ち、30分が最も適した照射時間であると思われた。これは効率のよい生成法として医療用に汎用されている小型サイクロトロン（10 MeV）を用い、積算値 $10\ \mu\text{A/h}$ 、ターゲットの流速を $50\ \text{mL/min}$ と固定した。本研究ではエネルギーを一定にし、ガス圧を低く保ったほうが合成系に N_2 の混入が少なくなり、サイクロトロンを保存的に使用できる方法として用いた。

第2項 $[^{11}\text{C}]\text{-Choline}$ 合成の検討

$[^{11}\text{C}]\text{-Choline}$ の合成は、 $[^{11}\text{C}]$ の半減期が短いため、短い反応時間で合成を終了させる必要がある。研究施設の実験合成と異なり、臨床現場では合成の確実性と再現性および繰り返し使用可能な安全性の確保が要求される。開放系の収量が低い原因は活栓からの放射性ガスの漏れや遮蔽板を通しての作業などが煩雑になり、適切な時間や温度での合成が行えないことであった。回数を重ねるごとに作業者の熟練度が増し、その被ばく量は減る可能性はあるが、一年の医療従事者の被ばく量上限（最大 5mSv/年 ）を考えると、大量・複数回の合成は避けなければならない。

一方、今回用いたモジュールは、超小型電磁バルブを用いて流路を作成し、チューブの配管や活栓を用いたことでロスなく合成を進めている点や、小型化させて鉛製のセル内に密閉することで大量照射や大量合成が可能となった。作業者は画面上の数字などを見ることや、装置の不具合などを鉛ガラス越しにチェックするだけでよく、被ばくを少なく、合成を安定的にかつ安全に行うことができた。

第3項 $[^{11}\text{C}]$ -Choline の臨床検査

合成 $[^{11}\text{C}]$ -Cholineを投与した患者は、薬投与による体温の上昇や感染症は認められなかった。提供した製剤は、製剤工程を衛生的に取り扱うことによって安全に供給することができた。

患者1例を対象にした精密ROI検査では、Choline-PETの下腹部撮像は2～5分が描出に適当で、全体の検査を10～15分で行うことができた。Choline-PET終了後、FDGの投与を行っても、FDGの待機時間（FDGの分配に要する時間）である60分で、 $[^{11}\text{C}]$ は三半減期を超えるため残留放射線の影響はないと考えられる。それ故、Choline-PET撮像ののち、連続してFDG-PETを行うことが可能であった。

近年、PET装置の3D modeやList modeのような収集法order subsets expectation maximization (OSEM) の再構成アルゴリズム、PETスキャナーの検出感度の向上やLSOクリスタルの導入など、ソフトとハード両面の進歩により、短い収集時間でも十分良好な像が得られるようになった。また $[^{11}\text{C}]$ -Cholineは血液中からの消失速度が速く、肝代謝型の血流律速の薬剤であり、尿中への即時排泄が少なく尿路近傍の腫瘍検出に有効である。その一方、肝臓・すい臓・十二指腸に生理的集積が高いためにこれら領域の腫瘍診断には不向きである。 $[^{11}\text{C}]$ -Choline PETはPETの特徴である多臓器の異常集積を同時に検出することには向かないと考えられるが、FDG-PETと骨盤部の短時間撮像を組み合わせることによって、さらに広い範囲で同時検出が可能であると思われる。 $[^{11}\text{C}]$ -Cholineの投与量はPET装置の軸方向視野の長さやシステム感度・高計数率特性により、noise equivalent count ratio (NECR) と患者の被ばくリスクを考慮し444MBqと定めた。

以上の検討をふまえて結腸がんの症例を検討した。全身 ^{11}C -Choline PET/CTによって原発部位を検出できた。しかし、結腸直腸がんに対する ^{11}C -Choline PETの有用性を確認するために、病期診断、再発診断および治療効果の評価について更に研究を行わなければならない。なお、 ^{11}C -Choline PETによるCT画像との組み合わせは有効との手ごたえを得ることができた。本症例では、癌組織に近い小腸への生理学的集積が認められたものの、S字結腸病巣への異常な ^{11}C -Choline集積により癌組織が検出された。他の結腸部位への強い集積は認められなかった。本研究では、結腸の ^{11}C -Cholineの生理学的な集積は、小腸での集積よりも低い傾向にあるが、結腸のFDGの生理的な集積は、しばしば小腸の集積よりも高くなるため、癌組織は描写されない。これは結腸直腸がんにおけるCholine-PETの利点である。原因は、小腸でのかなり早い上皮細胞のターンオーバーによると思われるが、確かな理由は不明でさらなる研究が必要である。

腹部のいくつかの集積が、Choline-PET 画像のみならず FDG-PET 画像においても小腸に対応するのか、結腸に対応するのか時として分かりづらい場面が多い。その様な場合、形態画像である CT との融合画像が異常な集積部位の正しい診断の大きな助けとなると考えられる。

小括

FDG-PETでは、トレーサー投与後にFDGが腫瘍組織への集積がピークカウントに達するまで患者は 60 分以上待たなければならない。しかし、本研究で用いた ^{11}C -Cholineの血液クリアランスは非常に早く、腫瘍組織への集積は投与後 3-5 分で最大となる。その後、初期の強い集積はほぼ一定となるので、バックグラウンドと較べて 30 分以上高いアクティビティー比のままでいることができ、短い検査時間での十分な検討が可能である。 ^{11}C -Cholineの更なる利点は受診者の被ばく量が少ないことで、およそ 2.5mSv/370MBqで、FDG-PETの 7mSv/370MBqとは対照的である。

コリンは細胞膜中のリン脂質材料であるホスファティジルコリン成分の一つである。悪性腫瘍の一部は活発な細胞増殖を行なう。それ故、その細胞膜成分の代謝も活発となり、コリンを盛んに取り込む^{28, 29)}。さらに、 ^{11}C -Cholineは癌細胞が低酸素状態であろうと腫瘍における集積量は変わらないが、FDGにおいては低酸素状態における腫瘍集積は低下する³⁰⁾。最近の研究では、細胞培養の実験において阻害剤やRNAiなどによるコリンキナーゼ活性の阻害が腫瘍細胞の増殖を特異的に抑制することなどから、コリンキナーゼをターゲットにした抗がん剤の開発が進められている³¹⁾。本イメージング技術はこのような抗がん剤開発にも応用が可能と考えられる。

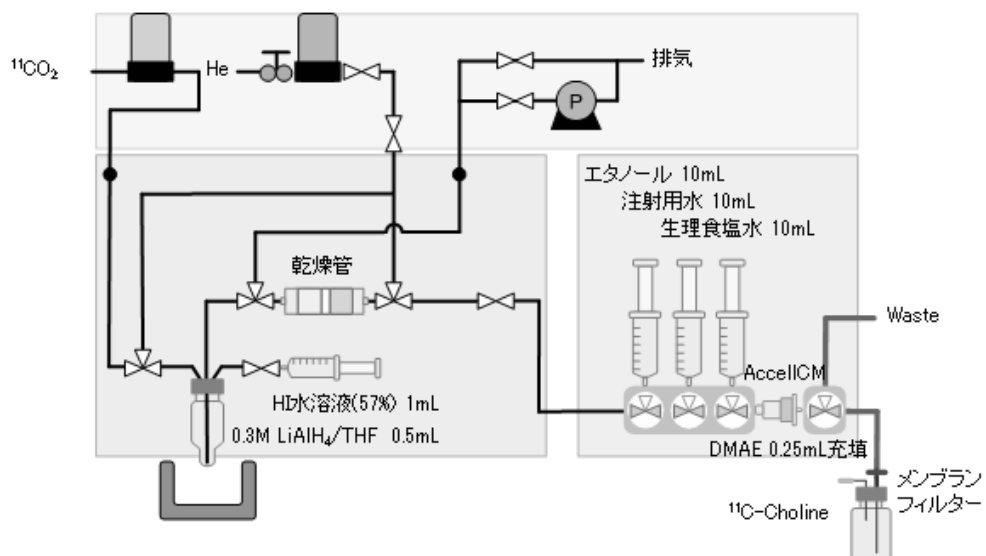


Fig. 6 $[^{11}\text{C}]$ -Choline合成装置概要図

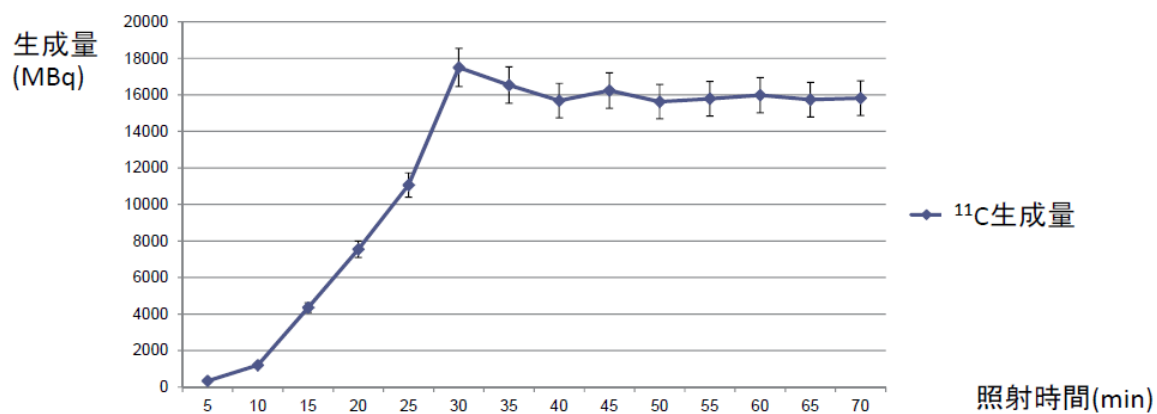


Fig. 7 $[^{11}\text{C}]$ - CO_2 合成量と照射時間の結果

$\text{N}_2 + \text{O}_2 \rightarrow {}^{14}\text{N} (p, \alpha) {}^{11}\text{CO}_2$ Cycron 10/5 (Ion Beam Applications S.A.)

Accelerated particle: proton(-), Acceleration energy 10 MeV Average Beam

current $10 \mu\text{A/h}$ Temp : $25 \pm 2^\circ\text{C}$

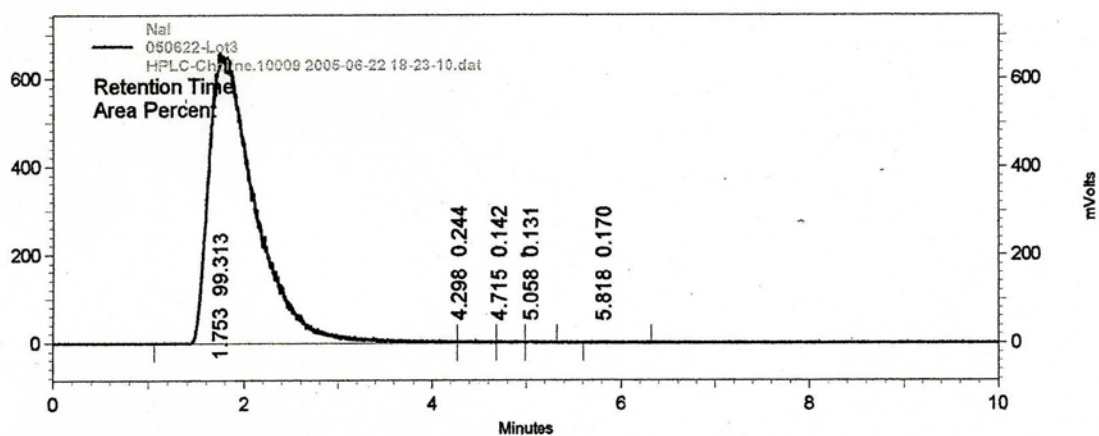


Fig. 8 HPLC クロマトグラムの結果 (NaI 検出器)

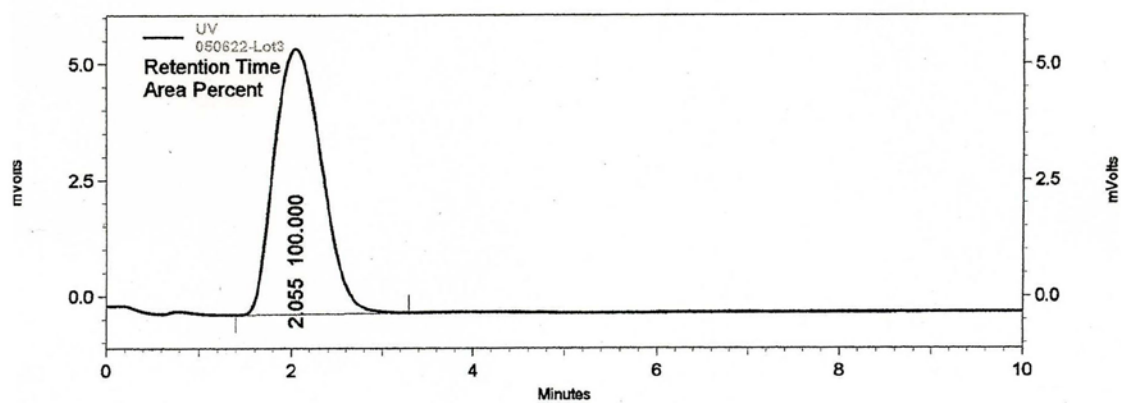


Fig. 9 HPLC クロマトグラムの結果 (UV 検出器)

Column: Crestpak : SIL C18S

Mobile Phase: $\text{CH}_3\text{CN}/0.01\text{M}$

$\text{NaH}_2\text{PO}_4=4/1$

Temp: Room temp ($20^\circ\text{C} \pm$)

Flow: 2mL/min

Detector: NaI (T1), UV205nm

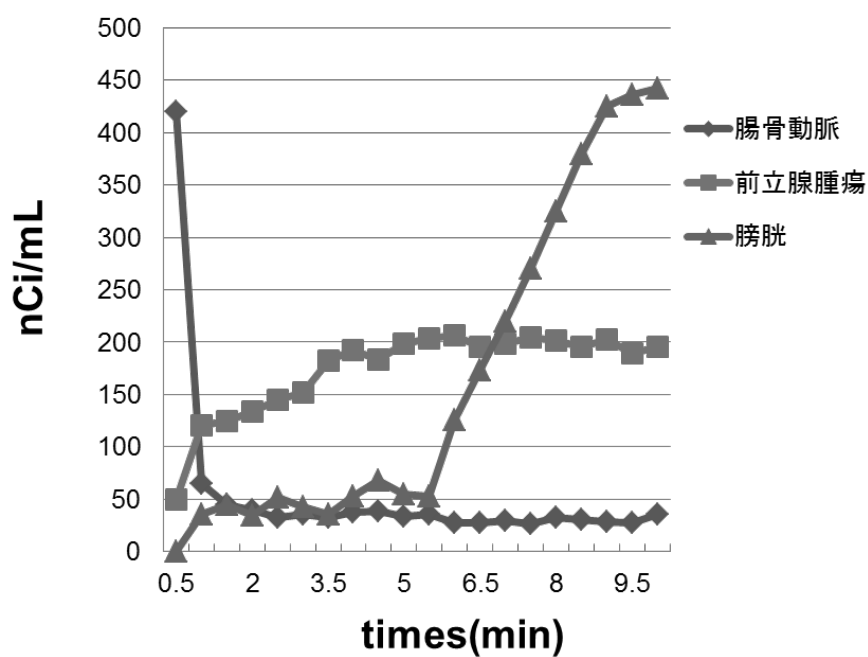


Fig. 10 前立腺がん患者を対象とした $[^{11}\text{C}]$ -Choline集積の経時変化

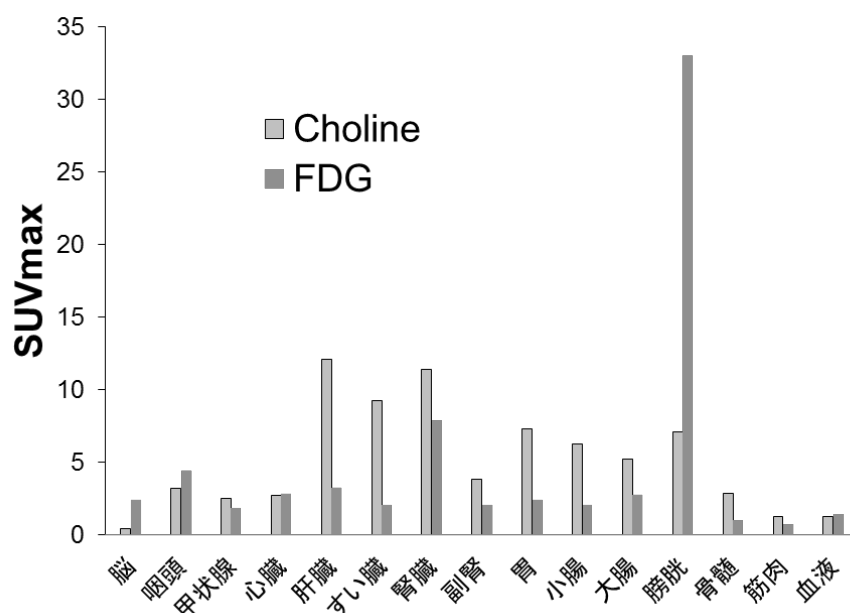


Fig. 11 正常臓器を対象としたCholine-PETとFDG-PET集積の比較

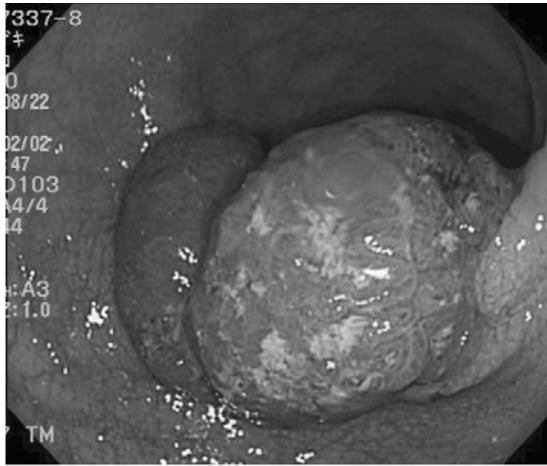


Fig.12 **Endoscopic finding.** Elevated lesion can be seen. Morphologic diagnosis is advanced colon cancer, type 1. Biopsy revealed well-differentiated adenocarcinoma.

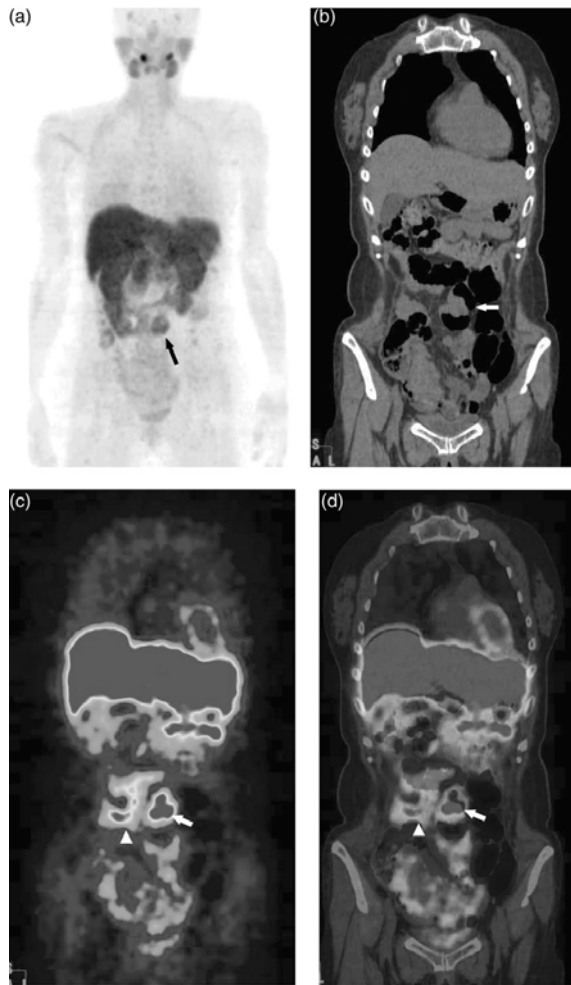


Fig .13 (a) MIP image of $[^{11}\text{C}]$ -Choline positron emission tomography. Abnormal uptake of $[^{11}\text{C}]$ -Choline is observed in the middle of the abdomen (arrow). There is no significant physiological uptake in the colon. (b-d) Coronal computed tomography (b), coronal positron emission tomography (c), coronal co-registered positron emission tomography/computed tomography hybrid image (d). Thickening in the wall of the sigmoid colon is observed in the computed tomography (b, arrow). Abnormal uptake of $[^{11}\text{C}]$ -Choline is observed in the sigmoid colon corresponding to the wall thickening (c, d, arrow). Differentiation between physiological uptake in the small intestine (c, d, arrow head) and tumor uptake can be made by fused PET/CT images. PET, positron emission tomography; CT, computed tomography.

検討 1-2 子宮がん治療における ^{11}C -Choline PET/CT の役割

第 1 節 目的

本研究は、前章の結果から導き出された最適条件下で、子宮がん治療における ^{11}C -Choline PET/CTの役割を明らかにするために実施した。

第 2 節 方法

第 1 項 患者

本研究は、後方視的研究として 2006 年 1 月から 2006 年 12 月の間に、広範囲子宮全摘術または骨盤リンパ節切除術を受けたか、一週間以内に化学療法を始めた子宮がん患者 22 名（子宮頸がん、 $n=11$ ；子宮体がん、 $n=11$ ）を対象に行った。患者すべてにインフォームドコンセントを行い ^{11}C -Choline PET/CTを実施した。子宮頸がんの 5 名の患者については、化学療法後の初回検査とフォローアップ検査の 2 回の ^{11}C -Choline PET/CTが実施された。平均年齢は 51 歳（範囲は 31-73 歳）であった。

PET/CT検査はLSOを用いた全身PET/CTカメラ（Aquiduo；東芝）を用いて行なった。スキャナーのCT構成要素は 16 列検出器を持ち、セプタや回転ロッドソース無しに 68.3cmの体軸横方向視野（transaxial）と 16.2cmの体軸方向視野（axial）を持つ。スキャナーは 3Dモードで用いられ半値全幅（FWHM）が 4.0mmの画像解像度がある。 ^{11}C -Choline PET/CT検査の前に、患者は 6 時間の絶食とした。CTは以下のような設定で頭部から大腿部中央まで標準的なプロトコールに従って実施された；体軸方向 2.0 mm コリメーション×16 モード；120 kVp；自動露出制御（SD10）；および 0.5s チューブ回転、テーブル移動速度 11.0 mm/s。患者は、CT撮像中において通常の浅い呼吸を維持する。ヨード造影剤は投与しない。 ^{11}C -Cholineは前章で検討した方法で院内合成した。頭部から大腿部中央までのエミッションスキャンの取得は、平

均投与量 464 MBq (409-560 MBq) の ^{11}C -Cholineを静脈内投与後 5 分で開始した。
骨盤の 2 回目のエミッションスキャンは続いて 17 分のアップテイク後に開始した。

第 2 項 磁気共鳴撮像

MRI検査は ^{11}C -Choline PET/CT検査の 2 週間以内に、治療の前後で実施した。MRI は 1.5Tシステム (Signa Horizon LX, GE Medical systems, ミルウォーキー) を用いて行なった。パルスシーケンスはT1 強調スピンエコー法 (TR/TE: 500-600 ms/7-10 ms)、T2 強調高速スピンエコー画像 (TE/TR: 3, 750-4, 400 ms/98-105 ms)、および造影剤投与後の脂肪抑制T1 強調 SE画像 (TR/TE: 580-645 ms/6-10 ms) で撮像した。全画像はスライス厚 5.0 mm、インターセクションギャップ 1.0 mmの横断面で得られた。用いた造影剤はガドペンテト酸メグルミン (Magnevist®, Bayer Schering Phama, 大阪、日本) を 0.1 mmol/kg体重の投与量で用いた。

第 3 項 画像の判断

ほかの診断画像を含め、いかなる臨床的情報も知らされていない 2 人の放射線専門医が画像を診断した。Choline-PET、CT、MRIおよびCholine-PET/CT画像を専用ソフトウェア (e-soft; Siemens) により解析した。最大SUV (SUV_{max}) はROIの最大放射能を用いて記録した。分配時間によって集積が変わる可能性を考え、5 分と 17 分の SUV_{max} をそれぞれ SUV1、SUV2 として記録した。時間によるSUVの変化は次式により計算した。
$$\delta \text{SUV} (\%) = (\text{SUV1} - \text{SUV2}) / \text{SUV1} \times 100$$

MRI による単一方向寸法及び容積測定は専門医が行なった。単一方向寸法測定は腫瘍サイズの最大直径を用いた。容積測定はスライス毎の測定により、腫瘍容積を計算した。腫瘍領域の判断は、造影後の脂肪抑制 T1 強調横断画像にて測定した。

第4項 子宮頸がんの病期診断

[¹¹C]-Choline PET/CTによる子宮頸がんの腫瘍サイズはPET/CTのCT画像により判断した。輪郭が不明瞭な腫瘍では、腫瘍サイズは頸部直径を用いた。頸部に [¹¹C]-Choline集積のある腫瘍が局在していればT1 と見做した。子宮頸がんの [¹¹C]-Choline集積があり、腫瘍が子宮傍結合組織に浸潤していればT2 と見做した。 [¹¹C]-Choline集積が、漿膜、子宮付属器官、膣または腹膜播種で認められればT3 と見做した。異常な集積が見られるリンパ節は、たとえ単軸長が10mm以下であっても転移は陽性と記録した。フォローアップ中の造影CTで遠隔転移が確認されればMステージとした。

第5項 子宮体がんの病期診断

[¹¹C]-Choline PET/CTによる腫瘍サイズはPET/CTのCT画像により判断した。輪郭が不明瞭な腫瘍では、腫瘍サイズは子宮体の直径を用いた。子宮体部で [¹¹C]-Choline集積のある腫瘍が局在していればT1 と見做した。腫瘍とみられる [¹¹C]-Choline集積のある頸部を含む場合、T2 と見做した。 [¹¹C]-Choline集積が、漿膜、子宮付属器、膣または腹膜播種で認められればT3 と見做した。リンパ節については子宮頸がんと同様に分類された。該当リンパ節から採取した試料の病理検査でNステージを確認した。フォローアップ中のコントラスト強調CTで遠隔転移が確認されればMステージとした。

第 6 項 治療

5 名の子宮頸がん患者に、シスプラチン投与と放射線治療を行なった。1 名を除く全患者は、シスプラチンによる化学療法を受けた。腎不全の 1 名の患者は化学療法を受けなかった。放射線治療は、外部照射療法 (EBRT) 50Gy と密封小線源治療 (ICRT) 18-24Gy を用いた。骨盤全体に EBRT が行われ、全照射線量 50Gy を 1 回あたり 2Gy を 5 週間かけて照射した。ICRT が実施され全ドーズ 18-24Gy を 1 回あたり 8Gy にて週 1 回照射した。4 名の患者は EBRT 中にシスプラチン投与量を平均 60.3mg (56-63mg) を週 1 回投与する化学療法を受けた。Choline-PET/CT は治療前後に実施した。

第 7 項 治療反応の評価

MRI により治療前後の腫瘍サイズと容積を比較した。

サイズ減少率(%サイズ-RR)は次式により算出した。

$$[\text{サイズ(治療前)} - \text{サイズ(治療後)}] / \text{サイズ(治療前)} \times 100 (\%)$$

容積減少率のパーセンテージは次式により算出した。

$$[\text{容積(治療前)} - \text{容積(治療後)}] / \text{容積(治療前)} \times 100 (\%)$$

Choline-PET による代謝反応の評価は SUV 減少率(%SUV-RR)の算出をした。

治療前後の SUV1 と SUV2 を比較した。SUV1 減少率(%SUV1-RR)は次式により算出した。

$$[\text{SUV1(治療前)} - \text{SUV1(治療後)}] / \text{SUV1(治療前)} \times 100 (\%)$$

SUV2 減少率(%SUV2-RR)は次式により算出した。

$$[\text{SUV1(治療前)} - \text{SUV1(治療後)}] / \text{SUV1(治療前)} \times 100 (\%)$$

第 8 項 統計解析

腫瘍の病期診断は国際対癌協会 (UICC) および産科婦人科国際連盟 (FIGO) の婦人科腫瘍学委員会の TNM 分類を用いた^{31, 32)}。平均フォローアップ期間は 240 日 (53-425 日) であった。SUV の対比較には t 検定を用いた。¹¹C]-Choline PET/CT による病期診断から得られた結果について、比較を Bonferroni 補正済マクニマー検定により行なった。治療反応はピアソン相関検定により比較した。P 値が 0.05 以下となる相関は、統計的に有意な差を示すと見做した。全てのデータ解析は SPSS ver. 16.0 J ソフトウェアパッケージ (SPSS, シカゴ、イリノイ、USA) を用いて行なった。

第3節 結果

第1項 子宮頸がん病期診断

11例の子宮頸がんを対象とした (table. 1)。病理診断により 8 名が扁平上皮癌、2 名が小細胞癌、1 名の腺扁平上皮癌を確認した。子宮頸がんの腫瘍サイズは 35 ± 14 mm であった。T4 疾患患者において、顕微鏡観察で直腸浸潤が認められた。T ステージは 2 名の患者が T1 (18 %)、4 名の患者が T2 (36 %)、3 名の患者が T3 (27 %)、1 名の患者が T4 (6 %) であった。MRI のみで T ステージが正しく分類したのは 6 名の患者で 100 % であった。Choline-PET/CT のみでの分類では、3 名の患者を対象に 50 %、Choline-PET/CT+MRI の分類では 6 名の患者で 100 % であった。11 名の患者中 6 名は N1 疾患であった (table. 2)。N 期診断の精度は MRI のみで 73 %、Choline-PET/CT のみでは 91 %、Choline-PET/CT+MRI で 91 % であった。1 名の患者で大動脈周囲リンパ節まで転移した M1 疾患が発見された。M 期診断の精度は Choline-PET/CT+MRI、Choline-PET/CT のみにおいて 100 % であった。

第2項 子宮体がん病期診断

11例の子宮体がんの病理診断は (fig. 8)、9 名の類内膜腺がん、1 名の癌肉腫、1 名の漿液性腺癌であった。子宮体がんの病理グレードは、グレード 1 ($n=6$)、グレード 2 ($n=3$)、グレード 3 ($n=2$) であった。子宮頸がんと子宮体がん間で、原発病巣の SUV1 ($P=0.236$) にも SUV2 ($P=0.348$) にも有意差はなかった。それぞれの腫瘍タイプの δ SUV はどちらの原発部位でも同様であった ($P=0.347$)。子宮体がんの平均サイズは 36 ± 21 mm であった。T ステージは 5 名の患者が T1 (45 %)、1 名の患者が T2 (6 %)、5 名の患者が T3 (45 %) であった。MRI のみで T ステージが正しく分類したのは 9 名の患者 (82 %)、PET/CT のみが 5 名の患者 (45 %)、PET/CT プラス

MRI が 10 名の患者 (91 %) であった。膣転移を発症した子宮体がんの 1 名の患者は、MRI のみでは病期が過小評価された。Choline-PET/CT においては子宮体と膣の判断が付きやすく、膣転移があると正しく診断した。子宮体がんと腹膜播種を発症した患者において、MRI のみでは過小評価したが、Choline-PET/CT のみ、または Choline-PET/CT+MRI による病期診断では正しく評価できた。11 名の患者中 3 名 (27 %) において N1 の診断がされた。N 期診断精度は MRI のみでは 64 %、Choline-PET/CT のみでは 82 %、Choline-PET/CT+MRI で 100 % であった。全患者に M0 疾患があった。M 期診断精度は Choline-PET/CT+MRI で 91 %、Choline-PET/CT のみで 82 % であった。Choline-PET/CT 単独の診断では 2 名の患者を遠隔転移のある子宮体がんとして過大評価したが、最終診断においてはその集積はそれぞれ、膣転移と正常な大動脈周囲リンパ節であった。

第 3 項 子宮がんの病期診断能力

T ステージ (table. 3) は、MRI のみで 15 患者 (88%)、Choline-PET/CT のみで 8 患者 (47%)、Choline-PET/CT+MRI で 16 患者 (94%) が正しく分類した。T ステージの決定において、MRI のみ、または Choline-PET/CT+MRI が Choline-PET/CT 単独よりも優れていた ($P = 0.039$ 、 $P = 0.008$)。Choline-PET/CT 単独は 4 名の患者で過小評価をし、5 名の患者で過大評価した。N 病期診断精度は (table. 3)、MRI のみで 68 %、PET/CT のみで 86 %、PET/CT+MRI で 96 % であった。PET/CT+MRI は N ステージ判断において MRI 単独での診断よりも優れていた ($P = 0.031$)。MRI 単独での診断は 1 センチ以下のリンパ節のある 4 名の患者の病期を過小評価し、反応性リンパ節のある 3 名の患者を過大評価した。一方、Choline-PET/CT 単独での診断では直径 10mm 以下のリンパ節のある 2 名の患者の病期を過小評価し、反応性リンパ節のある 1 名の患

者を過大評価した。リンパ節転移のある 1 名の患者について Choline-PET/CT+MRI は病期を過小評価した。M 期における診断精度は Choline-PET/CT+MRI で 96 %、Choline-PET/CT のみで 91 %であった。全ステージにおいて (table. 3)、Choline-PET/CT のみで 47 %、Choline-PET/CT+MRI で 88 % ($P = 0.039$) が正しく評価できた。

第 4 項 治療効果の評価

5 名の患者中 4 名 (80 %) が IIb 疾患で 1 名の患者 (20 %) が IVa 疾患であった。IV a 疾患の患者は膀胱への浸潤があり、二次的両側性水腎症を罹患していた。3 名の患者は骨盤リンパ節が肥大していた。彼らの内 2 名は両側性閉鎖肥大リンパ節で検出され、他 1 名は右側閉鎖肥大リンパ節で検出された。どの患者にも遠隔転移は認められなかった。

治療前の MRI において、腫瘍サイズが 36.5 ± 8.7 mm であった。治療後、平均サイズは 21.8 ± 8.2 mm に縮小した。治療前の MRI により、腫瘍容積が 20.6 ± 12.6 mm³ であった。治療後、平均容積は 12.2 ± 8.4 mm³ に縮小した (fig. 14)。%サイズ-RR は 40.7 ± 12.8 %、%容積-RR は 56.5 ± 10.3 % であった (table. 4)。

Choline-PET/CT において、5 名すべての患者において治療前の原発病巣に異常な [¹¹C]-Choline 集積が確認できた。化学放射線療法後の SUV1 と SUV2 は治療前に比べて減少した。治療前の Choline-PET/CT は平均 SUV1 が 5.3 ± 2.4 、平均 SUV2 が 5.2 ± 2.7 を示した。治療後において SUV1 は 2.6 ± 1.2 、SUV2 は 2.0 ± 1.0 に減少した (Fig. 15)。%SUV1-RR は 48.0 ± 20.0 、%SUV2-RR は 60.3 ± 14.4 であった (table. 5)。
%SUV1-RR と %サイズ-RR 間の相関は有意ではなかったが ($r = 0.698$ 、 $P = 0.19$)、%SUV1-RR と %容積-RR には有意な相関があった ($r = 0.892$ 、 $P =$

0.042)。 %SUV2-RR と %サイズ -RR 間に有意差は無かったが ($r=0.660$ 、 $P = 0.226$)、 %SUV2-RR と %容積-RR 間には有意差があった ($r=0.956$ 、 $P = 0.011$)。

第4節 考察

形態画像であるCT画像と組み合わせ、 ^{11}C -Choline PET /CTが子宮がん患者の正確な病期診断に寄与することを示した。特に、 ^{11}C -Choline PET /CTとMRIの組み合わせは、術前診断でTおよびNステージをより正確に診断できるポテンシャルを有する。また、 ^{11}C -Choline PET /CTは子宮頸がん患者の治療前後の反応評価方法として有用である可能性を示した。日常臨床において、子宮がんの術前病期診断法として受け入れられるための要件は、適切な外科手術適用であるか否かの決断を可能とすることである。この基準に則って、MRIが長い間、高感度の最も正確な診断法であると認識されていた^{33, 34)}。しかし、MRIによる子宮がん術前診断についての問題は、転移に関するN期診断についての特異度が低いことである。本研究では、Choline PET/CTとMRIの組み合わせによるN期診断判定が96%の精度であった。本研究結果は、これが子宮がん患者の術前病期診断に適していることを示唆している。Choline PET /CTは、MRIによる子宮がんの術前節状態診断を補完できる。

生体内での ^{11}C -Choline集積指標は、正常組織との集積比により変化する。 ^{11}C -Choline 投与後、血中クリアランスは早く組織内吸収は5分以内に定常状態に達する。 ^{11}C -Cholineの正常集積が、肝臓、脾臓、腎臓、十二指腸、骨髄で観察され、磷脂質が多い腓液への分泌が非絶食状態でも確認された。尿路においては ^{11}C -Choline PETの正常集積はFDGの集積よりも低い。これは ^{11}C -Cholineは尿細管再吸収をされないことと^{35, 36)}、標識化された代謝産物排出が促進されるためである。本研究において、 ^{11}C -Choline PET /CTのN期診断で偽陽性となった1例では、反応性リンパ節に起因するものであり、尿路での ^{11}C -Choline集積によるものではないことが顕微鏡観察で明らかになった。従って、骨盤内での ^{11}C -Choline集積は泌尿器器官の正常集積に殆ど影響されないと思われる。

本研究当時（2006 年）の PET/CT 装置においての限られた空間分解能と分容積効果では小病変部位が検出できないことがあった。本研究において、Choline-PET/CT の CT 像または MRI により判断の難しい 10mm 以下の転移リンパ節が存在したため、2 名の患者を過小評価した。検出器の限界値が高いことや呼吸による位置のずれで、これらは偽陰性の原因となる。また、反応性リンパ節の存在により、Choline-PET/CT で 1 名の患者、MRI で 3 名の患者が偽陽性となった。これら問題点は Choline-PET/CT と MRI の組み合わせにより、形態的所見と代謝的所見を関連させることで、過小評価や過大評価の数を減らすことができる。

化学放射線治療による治療反応評価には、一般的に CT や MRI が用いられる。しかし、治療反応評価には数週間あるいは数カ月を要し、遺残腫瘍を線維性組織や壊死組織と区別するのがこれらの形態画像では困難である。これまで、子宮頸がん患者の治療反応モニタリングで FDG-PET の有効性を示した報告もある³⁷⁻³⁹⁾。FDG-PET 研究と同様に、本研究でも治療前において 5 名すべての子宮頸がん患者で異常な [¹¹C]-Choline 集積があり、化学放射線治療後には治療前と比較して [¹¹C]-Choline 集積が減少した。これらは、FDG-PET による SUV や集積変化と同様に子宮がん患者の治療反応を予測する可能性がある。本研究では、Choline PET/CT による SUV の変化が、MRI 画像から算出する腫瘍容積の反応変化と相関すると結論付けた。

結果を日常臨床の標準診断に移す前に、本研究の手順に関する幾つかの問題を解決する必要がある。本研究における、後方視的研究は子宮頸がんだけではなく子宮体がんも含む子宮がんの小規模集団のみを対象とした。さらに、化学放射線治療に対する反応を研究した患者数も少なかった。本研究は術前の病期診断を評価するように計画されたものであり、子宮がん患者集団における結果は、進行した疾患の病期診断精度において完全に同一の条件での結論であるとしていない。Choline PET

/CT で評価された治療反応が正確に予後を反映するか否かについては、今後の長期のフォローアップを必要とする。

第5節 小括

結論として、Choline PET/CT と MRI の組み合わせは子宮がん患者の病期診断精度を上げる。Choline PET/CT は子宮頸がん患者の化学放射線療法後の治療反応評価法に適している。本結果は Choline PET/CT の利点とポテンシャルを示したが、患者の全数は少なく均質であり、我々の研究は後方視的観察研究である。今後の子宮がん管理の手段として積極的に適用する前に、大規模患者集団の臨床評価が必要であり、今後の検討としたい。

Table 1: Demographic data of patients with cervical and corpus Carcinomas

Parameter	Cervical carcinoma	Corpus carcinoma	Total
No. of patients	11	11	22
Age			
Mean $\pm$ SD	49 $\pm$ 12	53 $\pm$ 12	51 $\pm$ 12
Range	33–68	31–73	31–73
SUV ₁			
Mean $\pm$ SD	4.83 $\pm$ 1.87	5.92 $\pm$ 2.30	5.37 $\pm$ 2.12
Range	2.06–9.42	2.71–9.31	2.06–9.42
SUV ₂			
Mean $\pm$ SD	4.98 $\pm$ 1.97	5.82 $\pm$ 2.10	5.40 $\pm$ 2.04
Range	2.30–10.01	3.00–9.31	2.30–10.01
δ SUV (%)			
Mean $\pm$ SD	−4.05 $\pm$ 14.01	0.40 $\pm$ 6.28	−1.82 $\pm$ 10.84
Range	−39.67–14.25	−10.70–14.00	−39.67–14.25
Final stage	IB ($n = 2$)	IA ($n = 1$)	
	IIB ($n = 4$)	IB ($n = 4$)	
	IIIB ($n = 3$)	IIA ($n = 1$)	
	IVB ($n = 1$)	IIIA ($n = 2$)	
		IIIB ($n = 1$)	
		IIIC ($n = 2$)	

SD standard deviation, *SUV₁* SUV at a mean uptake time of 5 min, *SUV₂* SUV at a mean uptake time of 18 min

Table 2: Location of metastatic lymph nodes in all patients

The numbers in parentheses are percentages

Lymph node	No. of patients
Obturator	8 (36.3)
Common iliac	3 (13.6)
Paraaortic	2 (9.0)
External iliac	2 (9.0)
Internal iliac	2 (9.0)
Suprainguinal	1 (4.5)

Table 3: Comparison of the diagnostic accuracy of staging by MRI, PET/CT, and combining PET/CT and MRI (PET/CT+MRI)

Diagnosis	MRI	PET/CT	PET/CT+MRI
T stage ($n = 17$)			
Correct	15 (88.2)*	8 (47.1)* [†]	16 (94.1) [†]
Overstaged	0	5 (29.4)	0
Understaged	2 (11.8)	4 (23.5)	1 (5.9)
N stage ($n = 22$)			
Correct	15 (68.2) [†]	19 (86.4)	21 (95.5) [†]
Overstaged	3 (13.6)	1 (4.5)	0
Understaged	4 (18.2)	2 (9.1)	1 (4.5)
M stage ($n = 22$)			
Correct	NA	20 (90.9)	21 (95.5)
Overstaged	NA	2 (9.0)	1 (4.5)
Understaged	NA	0	0
Overall stage ($n = 17$)			
Correct	NA	8 (47.1) [†]	15 (88.2) [†]
Overstaged	NA	5 (29.4)	1 (5.9)
Understaged	NA	4 (23.5)	1 (5.9)

The numbers in parentheses are percentages. The diagnostic accuracy of two modalities was compared by the McNemar test. Significant differences were found between two groups: * $P < 0.01$ and [†] $P < 0.05$

NA not applicable

Table 4 : Clinical characteristics in five patients with cervical carcinoma

Pt	Age	Chief complaint	Histology	Chemo		RT		Recurrence time (months)	Treatment after recurrence	Follow-up time (months)
				Dose (mg)	Cycle	EBRT	ICRT			
1	60	Vaginal bleeding	Squamous	56	1	50 Gy/25fr	18 Gy/3fr	3	Chemo	13
2	68	Vaginal bleeding	Squamous	0	0	50 Gy/25fr	18 Gy/3fr	8	None	14
3	55	Vaginal bleeding	Squamous	56	5	50 Gy/25fr	18 Gy/3fr	7	RT	16
4	35	Vaginal bleeding	Squamous	62.2	4	50 Gy/25fr	24 Gy/4fr	None	None	15
5	57	Vaginal bleeding	Squamous	63.4	4	50 Gy/25fr	18 Gy/3fr	None	None	13

Pt patient, *Chemo* chemotherapy, *RT* radiotherapy, *EBRT* extra body radiotherapy, *ICRT* intra cervical radiotherapy, *squamous* squamous cell carcinoma, *fr* fraction

Table 5 : Assessment of MRI and ^{11}C -choline PET results in five patients with cervical carcinoma

Pt	MRI							
	Diameter (mm)				Volume (cm^3)			
	Baseline	After	δ	RR (%)	Baseline	After	δ	RR (%)
1	32.6	16.4	16.2	49.7	12.59	5.63	6.96	55.3
2	40.7	28.4	12.3	30.2	31.64	14.78	16.86	53.3
3	45.5	32.7	12.8	28.1	21.37	8.57	12.81	59.9
4	23.3	14.5	8.8	37.8	2.99	1.71	1.28	42.9
5	40.6	17.1	23.5	57.9	32.27	9.27	23.01	71.3
Pt	^{11}C -choline PET							
	SUV_1				SUV_2			
	Baseline	After	δ	RR (%)	Baseline	After	δ	RR (%)
1	9.42	4.29	5.13	54.5	10.01	3.6	6.41	64
2	3.57	2.6	0.97	27.2	3.57	1.51	2.06	57.7
3	4.61	2.1	2.51	54.4	4.61	1.9	2.71	58.8
4	4.28	3.04	1.24	29	3.67	2.19	1.48	40.3
5	4.4	1.1	3.3	75	4.1	0.8	3.3	80.5

Pt patient, *Baseline* baseline study, *After* study after treatment, δ difference between baseline study and study after treatment, *RR* reduction rate

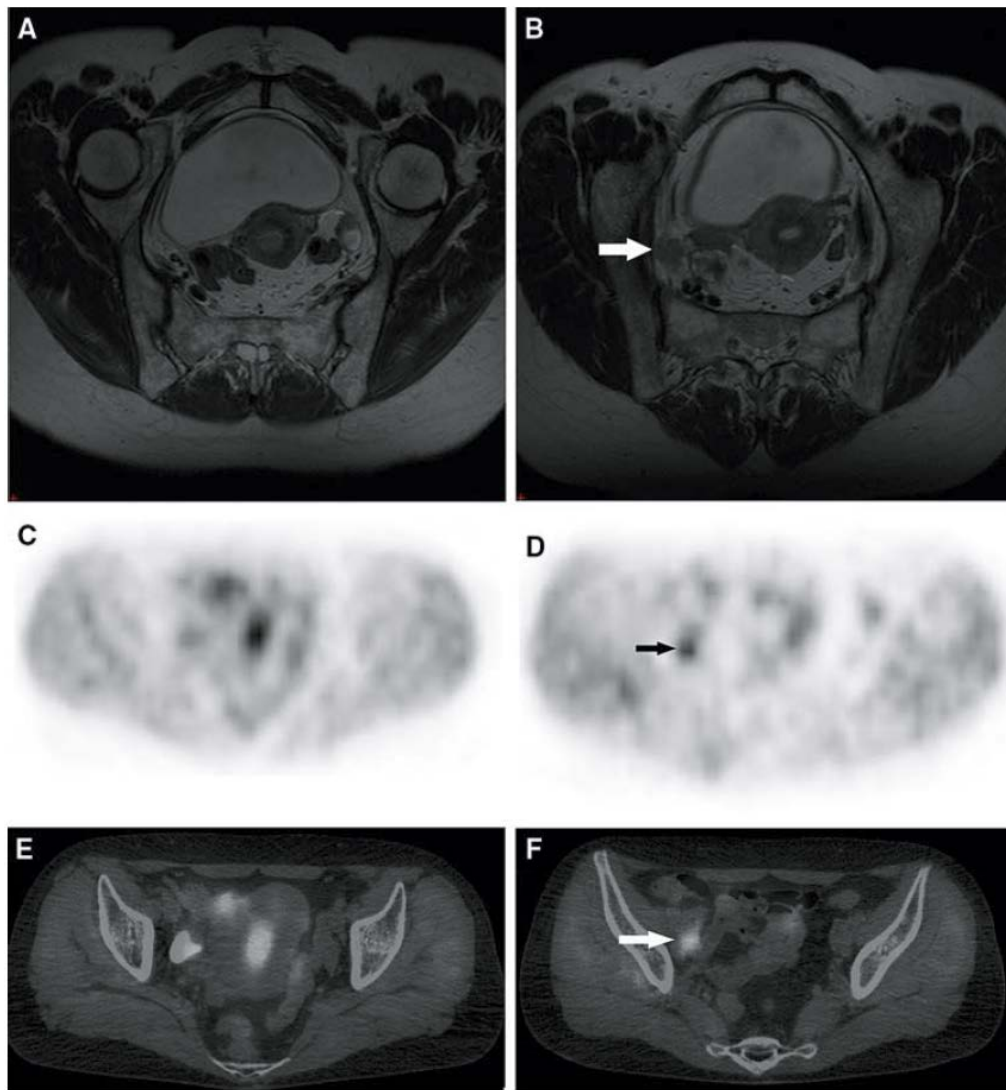


Fig. 14 : A 52-year-old woman with corpus carcinoma. a, b Transverse T2-weighted MR image (TR/TEeff:4,000 ms/100 ms) shows a primary tumor of the isthmus and enlargement of the right obturator lymph node (arrow). c, d Transverse ^{11}C -choline PET image reveals a hypermetabolic focus in the primary tumor and right obturator region (arrow). e, f Transverse ^{11}C -choline PET/CT image reveals a hypermetabolic focus in the primary tumor and right obturator lymph node (arrow). PET/CT findings were verified by histopathologic analysis

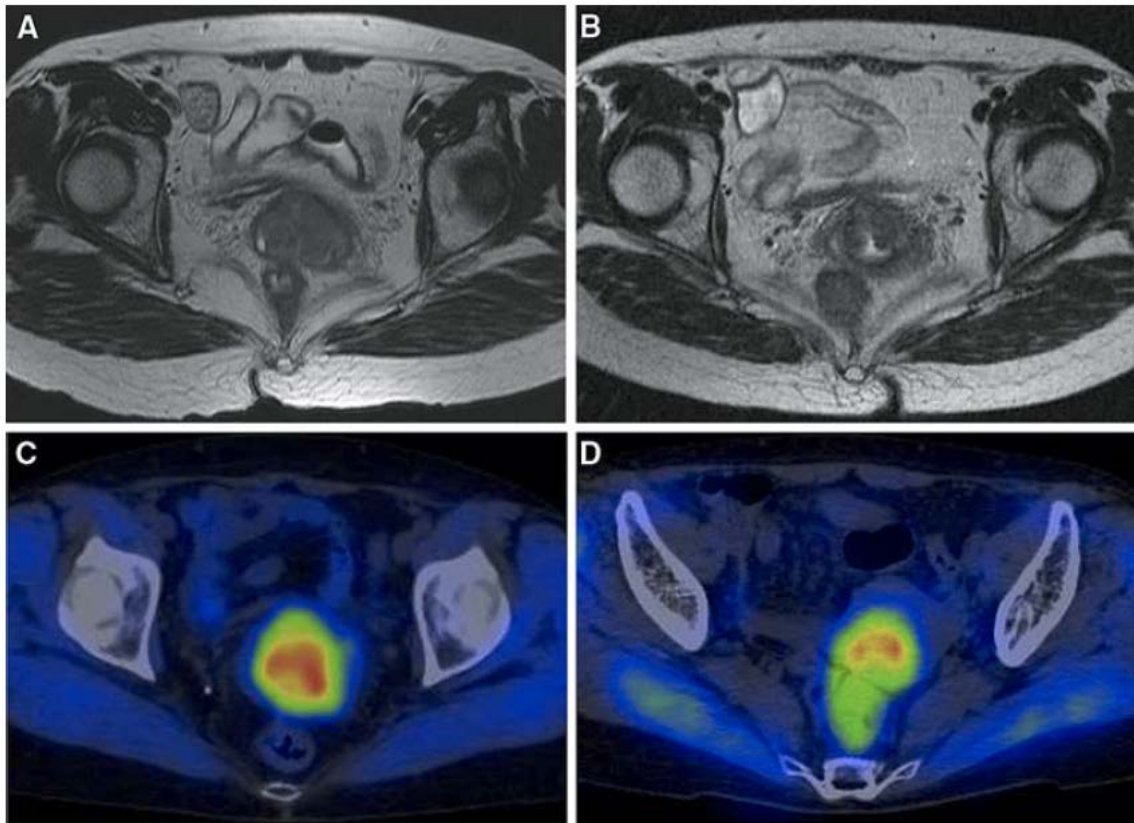


Fig. 15 : A 60-year-old woman with cervical carcinoma: Transverse T2-weighted MR image on the baseline study (a) shows an isointense tumor of uterine cervix. The tumor size and volume are 32.6 mm and 12.59 cm³, respectively. After treatment (b), the tumor is reduced in size. The tumor size and volume are 16.4 mm and 5.63 cm³, respectively. Transverse 11C-choline PET/CT image on the baseline study (c) shows an increased metabolic uptake in primary tumor. After treatment (d), metabolic uptake in the primary tumor decreases. The SUV1 and SUV2 decrease from 4.61 and 4.61 to 2.10 and 1.90, respectively

総 括

本研究において、第1章では、siRNAのための新たな単一光子放出体標識法を開発し、SPECTカメラを用いて^{99m}Tc標識siRNAの生体内輸送について評価を行なった。siRNAに代表される核酸医薬品は次世代医薬品として注目を集めている一方、生体内における易分解性等の問題点が指摘されている。本研究の結果は、作製した標識siRNAが、トランスフェクション試薬との結合体としても、裸の標識siRNAとしても安定であり、標的遺伝子が過剰発現している特定の領域に送達できることを示唆している。siRNAの標識化は、修飾核酸技術やDDS技術の開発における技術の一助となると思われる。また、特定のmRNAに対し放射標識siRNAが特異的に取り込まれることを利用することによって、新たながんの診断指標になる可能性がある。

第2章では、^[11C]-Cholineを安定供給し、臨床研究において成果を得たものである。^[11C]-Cholineの血液クリアランスは急速で、腫瘍集積は静脈内急速投与後3-5分で最大となる。その後、初期の強い集積はほぼ一定となるので、バックグラウンドと較べて30分以上高いアクティビティー比のままでいることができ、短い検査時間での十分な検討が可能である。全身検索での結腸直腸がんにおける^[11C]-Choline PETの利点を診断上に見出した。病期診断においてもFDGの集積がわかりづらい下腹部において^[11C]-Choline PETを用いる有用性を示した。またCTとの組み合わせは診断精度を上げることを示した。このことを踏まえ、続けて行なった子宮がん患者に対する^[11C]-Choline PET/CTの検討では、MRIと組み合わせることによって病期診断精度の治療反応評価法に適していると結論付けた。

これらの成果は、次世代医薬品の開発とがんの詳細情報把握に貢献し、がんを多面的に捉える一助となる。そして、がんの個別化医療に重要な情報を提供し、がんの機能診断や治療評価の進展に基礎的知見を与え得ると考えられる。

謝辞

稿を終えるにあたり本研究に際し、終始多大なるご指導を賜りました明治薬科大学臨床薬剤学研究室 加賀谷肇教授に深甚なる謝意を表します。

そして、多岐にわたるご指導とご助言を頂いた明治薬科大学臨床薬剤学研究室 植沢芳広准教授に深謝いたします。社会人修士課程、研究生時代からご指導を賜りました明治薬科大学名誉教授 毛利公則博士に心より感謝致します。また共同研究に関してご指導・ご協力を頂いた国立がん研究センター東病院放射線診断科 RI 検査室医長 中神佳宏博士、東京医科歯科大学医学部放射線科教授 立石宇貴秀博士、がん研究会有明病院核医学科副部長 寺内隆司博士、国立がん研究センター先端医療開発センター機能診断開発分野長 藤井博史博士に感謝いたします。

本論文の審査にあたり、ご指導を賜りました明治薬科大学薬効学研究室 庄司優教授、明治薬科大学生体機能分析学研究室 兎川忠靖教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) Deroose CM., De A., Loening AM., J Nucl Med., 48:295-303 (2007).
- 2) Blasberg R. G., Tjuvajev, J. G., J Clin Invest., 111:1620-1629 (2003).
- 3) McVeigh, E. R., Circ Res., 98:879-886 (2006).
- 4) Massoud, T. F., Gambhir, S. S., Genes Dev., 17:545-580 (2003).
- 5) Culver, J., Akers, W. & Achilefu, S., J Nucl Med., 49:169-172 (2008).
- 6) Phelps, M. E., Proc Natl Acad Sci USA., 97:9226-9233 (2000).
- 7) 日本核医学会分子イメージング戦略会議編., 院内製造 PET 薬剤基準 (2013).
- 8) Fire A., Xu S., Montgomery MK., Nature., 391: 806-811 (1998).
- 9) Elbashir SM., Harborth J., Lendeckel W., Nature., 411: 494-498 (2001).
- 10) Chen X., Park R., Shahinian AH., Nucl Med Biol., 31: 179-89 (2004).
- 11) Vaidyanathan G., Zalutsky MR., Bioconjug Chem., 5:352-6 (1994).
- 12) Junling Li., John O. Trent., Paula J., Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals., 49: 1213-21 (2006).
- 13) Friedland RP., Mathis CA., Budinger TF., J Nucl Med., 24:812-815 (1983).
- 14) Hara T., Yuasa M., Appl Radiat Isot., 50:531-3 (1999).
- 15) Jager PL., Que TH., Vaalburg W., Pruijm J., Elsinga P., Plukker JT., Eur J Nucl Med., 28:1845-9 (2008).
- 16) Pieterman RM., Que TH., Elsinga PH., Pruijm J., van Putten JW., Willemsen AT., J Nucl Med. 43:167-72 (2002).
- 17) de Jong IJ., Pruijm J., Elsinga PH., Vaalburg W., Mensink HJ., J Nucl Med., 44:331-5 (2003).
- 18) de Fougères AR., Hum Gene Ther., 19:125-32 (2008).

- 19) Yiu SM., Wong PW., Lam TW., *Bioinformatics.*, 21:144-51 (2005).
- 20) Mook OR., Baas F., de Wissel MB., Fluiter K., *Mol Cancer Ther.*, 6:833-43 (2007).
- 21) Wolfrum C., Shi S, Jayaprakash KN., *Nat Biotechnol.*, 25:1149-57 (2007).
- 22) Bartlett DW., Su H., Hildebrandt IJ., Weber WA., Davis ME., *Proc Natl Acad Sci USA.*, 104:15549-54 (2007).
- 23) Merkel OM., Librizzi D., Pfestroff A., Schurrat T., Behe M, Kissel T., *Bioconjug Chem.*, 20:174-82 (2009).
- 24) Bernstein P., Ross J., *Biochem Sci.*, 14:373-7 (1989).
- 25) Harland R., Misher L., *Development.*, 102:837-52 (1998).
- 26) Khaleghpour K., Svitkin YV., Craig AW., DeMaria CT., Deo RC., Burley SK., *Mol Cell.*, 7:205-16 (2001).
- 27) 大腸癌研究会編, 大腸癌取扱い規約., Tokyo: Kanehara, (1997).
- 28) Zeisel SH. *Dietary A Rev Nutr.*, 1:95-121 (1981).
- 29) Podo F., *NMR Biomed.*, 12:413-39 (1999).
- 30) Khan N., Oriuchi N., Ninomiya H., Higuchi T., Kamada H., Endo K., *Ann Nucl Med.*, 18:409-17 (2004).
- 31) Janardhan S., Srivani P., & Sastry G, N., *Curr Med. Chem.*, 13:1169-1186 (2006)
- 32) Sobin LH., Wittekind C., *UICC TNM classification of malignant tumours.* 6th ed. New York: Wiley (2002).
- 33) Benedet JL., Bender H., Jones H III., Ngan HY., Pecorelli S., *Int J Gynaecol Obstet.*, 70:209-62 (2000).
- 34) Togashi K., Nishimura K., Sagoh T., Minami S., Noma S., Fujisawa I.,

- Radiology., 171:245-51 (1989).
- 35) Manfredi R., Mirk P., Maresca G., Margariti PA., Testa A., Zannoni GF.,
Radiology., 231:372-8 (2004).
- 36) Grigsby PW., Siegel BA., Dehdashti F., J Clin Oncol., 19:3745-9 (2001).
- 37) Sironi S., Buda A., Picchio M., Perego P., Moreni R., Pellegrino A.,
Radiology., 238:272-9 (2006).
- 38) Nakamoto Y., Eisbruch A., Achtyes ED., Sugawara Y., Reynolds KR., Johnston CM.,
Gynecol Oncol., 84:289-95 (2002).
- 39) Grigsby PW., Siegel BA., Dehdashti F., Rader J., Zoberi I., J Clin Oncol.,
22:2167-71 (2004).