

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5362987号

(P5362987)

(45) 発行日 平成25年12月11日(2013.12.11)

(24) 登録日 平成25年9月13日(2013.9.13)

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 B 5/055 (2006.01)

A 6 1 B 5/05 3 8 3

請求項の数 9 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-523505 (P2007-523505)	(73) 特許権者	396019387
(86) (22) 出願日	平成17年7月28日(2005.7.28)		ジーイー・ヘルスケア・アクスイエ・セル
(65) 公表番号	特表2008-508023 (P2008-508023A)		スカブ
(43) 公表日	平成20年3月21日(2008.3.21)		ノルウェー国 0401・オスロ ニイダ
(86) 国際出願番号	PCT/N02005/000282		レン ビーオーボックス・4220 ニイ
(87) 国際公開番号	W02006/011810		コベイエン 2
(87) 国際公開日	平成18年2月2日(2006.2.2)	(74) 代理人	100137545
審査請求日	平成20年7月25日(2008.7.25)		弁理士 荒川 聡志
(31) 優先権主張番号	20043226	(74) 代理人	100105588
(32) 優先日	平成16年7月30日(2004.7.30)		弁理士 小倉 博
(33) 優先権主張国	ノルウェー (N0)	(74) 代理人	100129779
			弁理士 黒川 俊久

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 腫瘍イメージングの方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

健常組織と腫瘍組織とを識別することのできる非侵襲的 M R イメージング方法であって、当該方法が、外科的施術を伴わずに、

(a) 過分極¹³C - ピルビン酸塩を含む組成物が予め投与された被験者から、¹³C - ピルビン酸塩の¹³C - M R 画像と、その¹³C - 含有代謝物質であるアラニンの¹³C - M R 画像と¹³C - 含有代謝物質である乳酸塩の¹³C - M R 画像を得る工程と、

(b) 乳酸塩の画像に、反転したピルビン酸塩及び/又はアラニンの画像を乗算することによって、ピルビン酸塩及び/又はアラニンの量に関して乳酸塩の画像を補正する工程とを含んでおり、補正した乳酸塩の画像における高い画像信号が腫瘍組織の指標となる、方法。

10

【請求項 2】

過分極¹³C - ピルビン酸塩が、D N P 法によって¹³C - ピルビン酸及び/又は¹³C - ピルビン酸塩を過分極することによって得られる、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

¹³C - ピルビン酸塩を含む組成物が、リン酸塩緩衝液 (K H₂ P O₄ / N a₂ H P O₄)、A C E S、P I P E S、イミダゾール / H C l、B E S、M O P S、H E P E S、T E S、T R I S、H E P P S 及び T R I C I N からなる群から選択される 1 種以上の緩衝液をさらに含む、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

20

工程 a) における ^{13}C - M R 画像を得るために、多重エコーを用いて周波数情報を符号化するイメージングシーケンスを使用する、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 5】

工程 a) における ^{13}C - M R 画像が、 ^{13}C - ピルビン酸塩を含む組成物の投与後 4 0 0 秒以内で得られる、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 6】

プロトン M R I 造影剤を用いて又は用いずにプロトン画像をさらに取得する、請求項 1 又は請求項 2 記載の方法。

【請求項 7】

工程 (b) における補正が、
(i) 乳酸塩の画像並びにピルビン酸及び / 又はアラニンの画像を各々の画像における最大値で正規化することと、
(i i) 正規化した乳酸塩の画像に、反転したピルビン酸塩及び / 又はアラニンの画像を乗算することと、
(i i i) 工程 (i i) の結果を最初の乳酸塩の画像を乗算することとを含む、請求項 1 乃至請求項 6 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 8】

腫瘍が、脳腫瘍、乳ガン、大腸 / 結腸直腸ガン、肺ガン、腎ガン、頭部及び頸部腫瘍、筋腫、胃ガン、食道ガン、卵巣腫瘍、膵臓ガン又は前立腺ガンである、請求項 1 乃至請求項 7 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 9】

生体内での M R 腫瘍治療のモニタリング及び / 又は腫瘍のステージの判定のための、請求項 1 乃至請求項 8 いずれか 1 項記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【 0 0 0 1 】

本発明は、M R 造影剤として ^{13}C - ピルビン酸塩を使用する腫瘍イメージングの方法であって、腫瘍組織と健常組織とを識別できる方法に関する。

【背景技術】

【 0 0 0 2 】

磁気共鳴 (M R) イメージング (M R I) は、非侵襲的に、かつ患者及び医療従事者を X 線等の有害なおそれのある放射線に暴露することなく患者の身体又はその一部の画像を得ることができるため、医師にとって特に魅力的なイメージング技法である。高画質の画像が得られるため、M R I は、軟組織及び器官に対して好適なイメージング技法であり、正常組織と、腫瘍や病巣等の病的組織との識別が可能になる。

【 0 0 0 3 】

M R 腫瘍イメージングは、M R 造影剤の使用の有無を問わず行うことができる。M R 造影剤を用いずに撮像した M R 画像で、大きさが約 1 ~ 2 c m 以上の腫瘍は、かなり明瞭に現れる。しかし、コントラストが強調される M R I では、はるかに微小な組織病変、例えば、はるかに小さな腫瘍等の発見が可能であり、そのためコントラスト強調 M R イメージングは、初期の腫瘍の発見や転移の発見のための強力なツールである。

【 0 0 0 4 】

数種類の造影剤が M R 腫瘍イメージングに用いられている。水溶性の常磁性金属キレート剤、例えば、O m n i s c a n (商品名) (A m e r s h a m H e a l t h 社) 等のガドリニウムキレート剤は、広く用いられている M R 造影剤である。低分子量であるため、それらの常磁性金属キレート剤は、血管内に投与されると速やかに細胞外空間 (血液及び間質) に到達し、さらに、比較的速やかに体外に排出される。ガドリニウムキレート剤は、転移及び微小な腫瘍の発見率を増大させ、生きた腫瘍組織 (血流が十分に灌流され、かつ / 又は、脳血液関門が障害を受けている) と、中心壊死及び周辺浮腫又は巨視的に浸

10

20

30

40

50

潤のない組織（例えば、C. Claussen et al, Neuroradiology 1985; 27: 164 - 171を参照）との識別を可能にすることにより腫瘍の分類を改善する点で、特に有用であることが見出されている。

【0005】

一方、血液プールMR造影剤、例えば、超常磁性酸化鉄粒子は、血管系内に長時間残留する。これらは、肝臓内でのコントラストの強調だけでなく、腫瘍内の脈管形成等に起因する「漏出性の」毛細血管壁等といった毛細血管の透過性異常の検出にも極めて有用であることが実証されている。

【0006】

上述の造影剤が優れた性質を有することは明白であるが、使用時に全く危険を伴わないわけではない。常磁性金属のキレート錯体は通常高い安定度定数を有するが、投与後に体内で有害な金属イオンが放出されるおそれがある。さらに、これらの造影剤は特異性が低い。

【0007】

国際公開第99/35508号には、過分極した高 T_1 剤の溶液をMR造影剤として用いる、患者のMR検査法が開示されている。「過分極」という用語は、高 T_1 剤中のNMR活性核種、すなわちスピンのゼロでない核種、好ましくは ^{13}C - 又は ^{15}N - 核種の核分極を増大させることを意味する。NMR活性核種の核分極を増大させると、核スピンの励起状態にある核種と基底状態にある核種の分布差が顕著に増大し、MR信号の強度が100倍以上に増強される。 ^{13}C - 及び/又は ^{15}N - が濃縮された高 T_1 剤を用いると、 ^{13}C 及び/又は ^{15}N の天然存在比は無視できるほど低いのでバックグラウンド信号の影響がほぼなくなり、画像のコントラストが好都合に高くなる。過分極に適した様々な有望な高 T_1 剤及びそれらのMR造影剤としての使用について開示されており、それらの例としては、限定的ではないが、酢酸塩、ピルビン酸塩、シュウ酸塩又はグルコン酸塩、グルコース又はフルクトース等の糖、尿素、アミド、グルタミン酸塩、グリシン、システイン又はアルパラギン酸塩等のアミノ酸、ヌクレオチド、アスコルビン酸等のビタミン、ペニシリン誘導体及びスルホンアミド等の非内在性化合物及び内在性化合物が挙げられている。さらに、クエン酸回路のような通常の代謝サイクルの中間体、例えばフマル酸やピルビン酸等が、代謝活性のイメージングに好ましい造影剤であると記載されている。

【0008】

強調しておくべきこととして、過分極造影剤の信号は、緩和によって、さらには患者の身体に投与した後には希釈によっても減衰する。従って、患者の体内の標的部位に高度に過分極した状態で薬剤が分布できるように、体液（血液等）中での造影剤の T_1 値は十分に高くなければならない。

【特許文献1】国際公開第99/35508号パンフレット

【特許文献2】国際公開第98/58272号パンフレット

【特許文献3】国際公開第01/96895号パンフレット

【特許文献4】国際公開第88/10419号パンフレット

【特許文献5】国際公開第90/00904号パンフレット

【特許文献6】国際公開第91/12024号パンフレット

【特許文献7】国際公開第93/02711号パンフレット

【特許文献8】国際公開第96/39367号パンフレット

【非特許文献1】C. Claussen et al, Neuroradiology 1985; 27: 164 - 171

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

発明者らは、過分極 ^{13}C - ピルビン酸を造影剤として用いて腫瘍組織と健常組織とを識別できるMR腫瘍イメージングの方法を見出した。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 0 】

従って、本発明は、健常組織と腫瘍組織とを識別する方法であって、当該方法が、

(a) 過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を含む組成物が予め投与された被験者から、 ^{13}C - ピルビン酸塩と、その ^{13}C - 含有代謝物質であるアラニン、乳酸塩及び任意の炭酸水素塩との ^{13}C - M R 直接画像を得ることと、

(b) ピルビン酸塩及び / 又はアラニンの量に関する乳酸塩の信号を任意に補正して、ピルビン酸塩及び / 又はアラニンに対して存在比率が高い乳酸塩の画像を得ることと、を含み、

^{13}C - M R 直接画像の腫瘍組織が、最も高い強度の乳酸塩の信号及び / 又は、工程 (b) で補正が行なわれる場合には、ピルビン酸塩及び / 又はアラニンに対して存在比率が高い乳酸塩の信号によって示される方法が提供される。

10

【 0 0 1 1 】

N M R 活性化された ^{13}C - 核種の過分極は、様々な方法 (例えば、国際公開第 9 9 / 3 5 5 0 8 号) によって行なうことができ、好ましい方法は、希ガスからの分極の移動、「ブルート・フォース」、スピン冷凍及び D N P である。過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を得るには、 ^{13}C - ピルビン酸塩を直接分極するか、或いは ^{13}C - ピルビン酸を分極してから分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を塩基での中和などによって分極 ^{13}C - ピルビン酸塩へと変換するのが好ましい。

【 0 0 1 2 】

過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を得る好ましい方法は、過分極希ガスからの分極の移動である。核スピンのゼロでない希ガスは、過分極される。つまり、平衡状態の分極で、例えば、円偏波光を使用して分極化を促進させることができる。過分極希ガス、好ましくは He 又は Xe 又はこのようなガスの混合物を用いて、 ^{13}C - 核種を過分極させてもよい。また、過分極は、同位濃縮され、過分極した希ガス、好ましくは ^3He 又は ^{129}Xe を用いて行なってもよい。過分極ガスは、気相に存在していてもよく、液体 / 溶媒で溶解されていてもよく又は、分極ガス自体を溶媒として使用してもよい。或いは、ガスは、冷却した固体面上へ凝結され、この形態で用いられてもよく又は、昇華させることもできる。過分極ガスと分極される化合物との均質混合が好ましい。従って、 ^{13}C - ピルビン酸が分極され、室温で液体である場合、過分極ガスは、液体 / 溶媒に溶解又は、溶媒として用いられるのが好ましい。 ^{13}C ピルビン酸塩が分極される場合、過分極ガスは、ピルビン酸塩もまた溶解する液体 / 溶媒で溶解されるのが好ましい。

20

30

【 0 0 1 3 】

過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を得る別の好ましい方法は、超低温及び超高磁場における熱力学平衡によって N M R 活性核種に分極を与えることである。N M R 分光計の動作磁場及び動作温度と比較して、過分極は、超高磁場及び超低温 (ブルート・フォース) によってもたらされる。使用される磁場強度は、できるだけ高い強度が好ましく、1 T を超える強度が適しており、5 T を超える強度が好ましく、1 5 T 以上の強度がさらに好ましく及び、2 0 T 以上の強度が特に好ましい。温度は、超低温である必要があり、例えば、4 . 2 K 以下、好ましくは 1 . 5 K 以下、さらに好ましくは 1 . 0 K 以下、特に好ましくは 1 0 0 m K 以下である。

40

【 0 0 1 4 】

過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を得る別の好ましい方法は、スピン冷凍方法である。この方法には、スピン冷凍における分極による固体の化合物又は固体系のスピン分極が含まれる。その系は、例えば 3 回以上の回転軸を有する結晶形における、 Ni^{2+} 、ランタニド又はアクチニドイオン等の適切な常磁性体に添加されるか又は、緊密に混合される。共振励磁場が印加されないため、計測は、均質な磁場の必要としない D N P に対する要件より単純なものである。処理は、磁場の方向に対して垂直な軸の周囲で試料を物理的に回転させて行なわれる。この方法の必要条件は、常磁性種が非常に異方性の g 因子を有することである。試料回転の結果、電子常磁性共鳴は核スピンと接触してもたらされ、核スピン温度の低下を導く。核スピン分極が新たな平衡に達するまで、試料回転は行われる。

50

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

さらに好ましい実施形態では、DNP（動的核分極）の方法は、過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩を得るために使用される。分極は、常磁性化合物、いわゆる常磁性試薬又はDNP試薬によってもたらされる。DNP処理で、エネルギーは通常マイクロ波として供給され、まず常磁性試薬を励起する。基底状態に緩和する際に、常磁性試薬の対電子から試料のNMR活性核種への分極の移動が起こる。通常、DNP処理では、中程度の又は高い磁場及び非常に低い温度が用いられており、例えば、液体ヘリウム及び約1 T又はそれ以上の磁場中でDNP処理を実行する。或いは、中程度の磁場及び十分な分極の増大が達成できる任意の温度の下で実行してもよい。DNP技法については、例えば国際公開第98/58272号及び同第01/96895号に記載されており、これらは共に参照として本願明細書に組み込まれる。DNPの方法によって過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩を得るために、 ^{13}C -ピルビン酸塩及び/又は ^{13}C -ピルビン酸が分極される化合物として使用される。

10

【0016】

^{13}C ピルビン酸及び/又は ^{13}C -ピルビン酸塩のいずれを用いるかは、主に、DNP処理で使用する常磁性試薬に依存する。常磁性試薬が ^{13}C -ピルビン酸に可溶性である場合、 ^{13}C -ピルビン酸が好ましく使用され、常磁性試薬と ^{13}C -ピルビン酸によって液体混合物、好ましくは液体溶液が形成される。常磁性試薬が ^{13}C -ピルビン酸に可溶性でない場合、 ^{13}C -ピルビン酸塩及び/又は ^{13}C -ピルビン酸と、少なくとも1種の共溶媒とを使用して液体混合物、好ましくは液体溶液を形成する。DNPがうまくいくか否か及びその際の分極のレベルは、分極される化合物と常磁性化合物が互いに緊密に接触できるかに依存することが明らかである。従って、共溶媒は、好ましくは、常磁性試薬と ^{13}C -ピルビン酸及び/又は ^{13}C -ピルビン酸塩とが溶解する共溶媒又は共溶媒の混合物である。 ^{13}C -ピルビン酸塩に対しては、水が共溶媒として好ましく用いられる。

20

【0017】

さらに、試料混合物を冷却/冷凍する際に結晶化試料ではなくガラス試料を形成する場合に、DNP法でより高い分極レベルが達成されることが判明した。繰り返すと、ガラスが形成されると、常磁性試薬と分極される化合物とをより緊密に接触させることができる。常磁性試薬が ^{13}C -ピルビン酸に対して可溶性であれば、 ^{13}C -ピルビン酸は、好適なガラス形成剤あるため、DNP処理で好ましく使用される。 ^{13}C -ピルビン酸塩は塩であり、 ^{13}C -ピルビン酸塩の水溶液及び常磁性試薬の液体混合物は、凍結する時に結晶化した試料となる。これを防ぐには、グリセロール、プロパンジオール又はグリコール等のガラス形成能の高い共溶媒をさらに追加することが好ましい。

30

【0018】

従って、一実施形態では、 ^{13}C -ピルビン酸塩を水に溶解して水溶液を得て、常磁性試薬、グリセリン及び、任意の共溶媒を添加して液体混合物を形成する。好ましい実施形態では、 ^{13}C -ピルビン酸、常磁性試薬及び共溶媒を混合して液体混合物を形成する。最も好ましい実施形態では、 ^{13}C -ピルビン酸及び常磁性試薬を形成して液体混合物を形成する。化合物の均質混合は、攪拌、ボルテックス又は超音波照射等の数種類の周知の方法で行うことができる。

40

【0019】

次に、DNP処理が行われる前に、液体混合物は凍結される。液体混合物の冷却/凍結は、液体混合物を液体窒素で凍結する等の周知の方法で行うこともできるが、単に液体混合物を分極装置に入れておくだけでも、液体ヘリウムにより試料は凍結する。

【0020】

上記のように、動的核分極（DNP）は、分極される化合物の分極が、常磁性試薬/化合物等のDNP試薬によりもたらされる分極方法である。

【0021】

多くの周知の常磁性化合物が、DNP試薬、例えば、クロム（V）イオン等遷移金属、

50

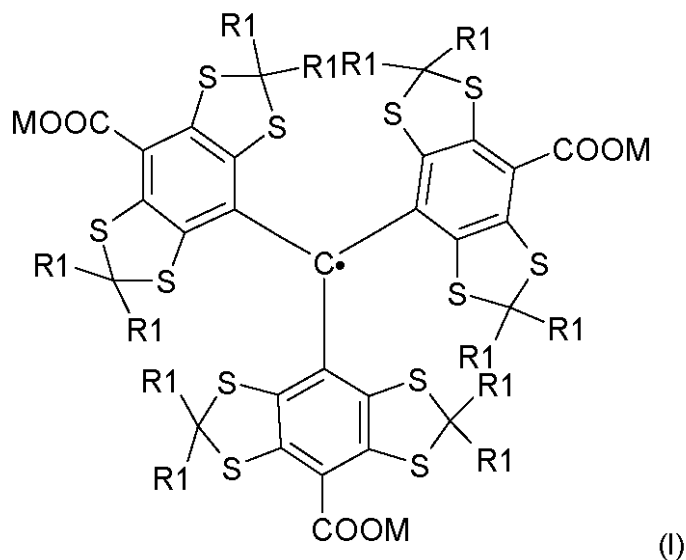
ニトロキシド基、トリチル基又は磁性粒子等の有機フリーラジカル等として使用できる。このようなDNP試薬は、例えば、国際公開第99/35508号、同第88/10419号、同第90/00904号、同第91/12024号、同第93/02711号又は同第96/39367号に記載されている。

【0022】

好ましい実施形態では、式(I)のトリチルラジカルは、常磁性試薬として使用され、DNPの方法によって ^{13}C -ピルビン酸塩を得る。

【0023】

【化1】



式中、Mは、水素又は1当量の陽イオンを表し、R1は同一又は異なる直鎖又は枝分れ任意に水酸化されるC1～C6アルキル基又は $-(\text{CH}_2)_n-\text{X}-\text{R}_2$ 基であって、nは1、2又は3であり、XはO又はSであり、R2は直鎖又は枝分れC1～C4アルキル基である基を表す。

【0024】

好ましい実施形態では、Mは、水素又は生理学的に許容できる1価の陽イオンを表す。「生理学的に許容できる陽イオン」という用語は、ヒト又は非ヒト動物に影響しない陽イオンを表す。好ましくは、Mは、水素又はアルカリ陽イオン、アンモニウムイオン又はメグルミン等の有機アミンイオンを表す。最も好ましくは、Mは、水素又はナトリウムを表す。

【0025】

さらに好ましい実施形態では、R1は同一又は異なるもので好ましくは同一の直鎖又は枝分れ任意に水酸化されるC1～C4アルキル基、最も好ましくは、メチル基、エチル基、イソプロピル基、ヒドロキシメチル基又はヒドロキシエチル基を表す。

【0026】

さらに好ましい実施形態では、R1は同一又は異なるもので好ましくは同一の $\text{CH}_2-\text{O}-(\text{C}_1\sim\text{C}_3\text{アルキル})$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}_1\sim\text{C}_3\text{アルキル})-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-(\text{C}_1\sim\text{C}_3\text{アルキル})$ 、 $-(\text{CH}_2)_2-\text{S}-\text{CH}_3$ 、 $-(\text{C}_1\sim\text{C}_3\text{アルキル})-\text{S}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_2\text{H}_5$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{C}_2\text{H}_4\text{OH}$ 又は $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_3$ 、最も好ましくは、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ を表す。

【0027】

さらに好ましい実施形態では、Mは、水素又はナトリウムを表し、R1は同一の $-\text{CH}$

10

20

30

40

50

$2 - \text{CH}_2 - \text{OCH}_3$ を表す。

【0028】

式(I)のトリチル基は、特許文献6、特許文献8、国際公開第97/09633号パンフレット及び国際公開第98/39277号パンフレットで詳細に記載されるように合成される。要約すると、ラジカルは、3当量のメタル化された単量体アリール化合物と、1当量の適当な保護基を有するカルボン酸誘導体とを反応させ、3量化した中間体を生成させることにより合成できる。この中間体をメタル化し、次いで、例えば、二酸化炭素と反応させると、トリチルカルビノールトリカルボン酸が得られ、さらに強酸で処理すると、トリアリールメチル陽イオンが生成する。その後、この陽イオンを還元すると、安定なトリチルラジカルが生成する。

10

【0029】

^{13}C -ピルビン酸塩及び/又は ^{13}C -ピルビン酸と、任意の溶媒を含む液体混合物は、好ましくは5~100mM、さらに好ましくは10~20mM、特に好ましくは12~18mM、最も好ましくは13~17mMを含む。本発明の方法のDNP処理で、より高濃度のラジカルを用いると分極の立ち上げに要する時間は短くなるが、達成される分極レベルは低くなることが見出された。従って、これらの2つの効果を互いにバランスさせなければならない。

【0030】

DNP技法については、例えば国際公開第98/58272号及び同第01/96895号に記載されており、これらは共に参照として本願明細書に組み込まれる。通常、DNP処理では、中程度の又は高い磁場及び非常に低い温度が用いられており、例えば、液体ヘリウム及び約1T又はそれ以上の磁場中でDNP処理を実行する。或いは、中程度の磁場及び十分な分極の増大が達成できる任意の温度の下で実行してもよい。本発明の方法の好ましい実施形態では、DNP過程は液体ヘリウム及び約1T又はそれ以上の磁場中で行われる。好適な分極装置は、例えば国際公開第02/37132号パンフレットに記載されている。好ましい実施形態では、分極装置は、低温保持装置(クライオスタット)及び、超電導磁石等の磁場発生手段に取り囲まれた中央のボア内に設置され、導波路によって、マイクロ波源に接続されたマイクロ波チャンパー等の分極手段を備えている。ボアは、垂直方向に、少なくとも、磁場強度が ^{13}C 核種への分極を引き起こすのに十分な高さ(例えば1~2.5T)を有する超電導磁石付近の領域Pの高さまで延在している。試料用のボアは、好ましくは密封可能であり、例えば1ミリバールオーダー以下の低圧まで減圧可能である。取り外し可能な試料導入管等の試料(常磁性試料と、 ^{13}C -ピルビン酸塩及び/又は ^{13}C -ピルビン酸塩を含む混合物)導入手段をボアの内側に有していてもよく、この試料導入管はボアの頂部から領域Pに位置するマイクロ波チャンパーの内側の位置まで挿入されていてもよい。領域Pは、液体ヘリウムにより分極が起こるのに十分な低温、好ましくは0.1~100K程度の温度、好ましくは0.5~10K、最も好ましくは1~5Kに冷却されている。試料導入手段は、好ましくは、その上端が、ボア内部の部分的減圧状態を保持するのに好適な任意の手段により密封可能である。試料保持カップ等の試料保持容器が、試料導入手段の下端の内側に取り外し可能なように取り付けられていてもよい。試料保持容器は、好ましくは、比熱容量が低く低温特性に優れた、KelF(登録商標:ポリクロロトリフルオロエチレン)又はPEEK(ポリエーテルエーテルケトン)等の軽量材料により作られている。試料容器は、分極される1種以上の試料を保持することができる。

20

30

40

【0031】

試料は、試料保持容器中に挿入され、液体ヘリウム中に浸漬され、好ましくは、周波数約94GHz、出力200mWのマイクロ波の照射を受ける。分極のレベルは、マイクロ波の照射を行いながら固体 ^{13}C -NMR信号の取り込みを行うことによりモニターすることができるので、工程b)で、固体 ^{13}C -NMRスペクトルの取り込みを行う手段を備えた分極装置を用いることが好ましい。通常、 ^{13}C -NMR信号と時間との関係を示すグラフで飽和曲線が得られる。従って、最適な分極レベルに到達した時点を決める

50

。

【0032】

過分極が、試料を固体状態であることを必要とする方法、例えばDNP方法によって行われる場合、本発明の方法で使用するためには、固体の試料を液体状態に遷移させる必要がある。固体の分極混合物は、例えば国際公開第02/37132号パンフレットに記載されているように溶解又は、国際公開第02/36005号パンフレットに記載されているように融解される。固体の過分極試料を、さらに好ましくは緩衝液（好ましくは生理的に許容できる緩衝液）に溶解して液組成物を得ることが好ましい。「緩衝液」という用語は、本願明細書中で用いられる場合に、1種以上の緩衝液、すなわち、緩衝液の混合物を表す。

10

【0033】

好ましい緩衝液は、生理学的に許容できる緩衝液であり、さらに好ましくは、例えば、リン酸緩衝液（ $\text{KH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ ）、ACES、PIPES、イミダゾール／塩酸、BES、MOPS、HEPES、TES、TRIS、HEPPS又はTRICIN等のpHが約7～8の範囲内である緩衝液である。さらに好ましい緩衝液は、リン酸緩衝液及びTRISであり、最も好ましくはTRISである。他の実施形態では、2種類以上の上述の好ましい緩衝液、すなわち緩衝液の混合物が用いられる。

【0034】

分極される化合物として $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸が用いられる場合には、 $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸の $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸塩への変換もまた溶解に含まれる。このことを達成するために、 $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸を塩基と反応させる。一実施形態では、 $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸を塩基と反応させ、 $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸塩に変換した後に、緩衝液を加える。

20

【0035】

他の好ましい実施形態では、緩衝液と塩基を混合して1つの溶液とし、この溶液を $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸に加え、溶解し、同時に $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸に変換する。好ましい実施形態では、塩基は、 NaOH 、 Na_2CO_3 又は NaHCO_3 の水溶液であり、最も好ましい塩基は NaOH である。特に好ましい実施形態では、 NaOH を含むTRISバッファの溶液で $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸を溶解し、 $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸のナトリウム塩に変換する。他の好ましい実施形態では、緩衝液又は適用可能である場合には緩衝液／塩基の混合溶液は、錯形成していない常磁性イオンと結合することができる1種以上の化合物、例えば、DTPAやEDTA等のキレート剤をさらに含んでいる。遊離の常磁性イオンは、過分極化合物の T_1 の短縮を引き起こすおそれがあることが見出されているが、これは避けることが好ましい。

30

【0036】

溶解は、好ましくは、国際公開第02/37132号パンフレットに開示された方法及び／又は装置を用いて行うことができる。過分極がDNPの方法によって行なわれる場合、分極装置とは物理的に別個の又は分極装置及び溶解装置を備える装置の一部である溶解装置のいずれかが用いられる。好ましい実施形態では、溶解は、緩和を改善し、過分極の最大値を維持するために高磁場中で実施される。磁場の節点は避けるべきであり、磁場強度が低いと上記のような対策を講じても緩和が増大するおそれがある。

40

【0037】

過分極がDNPの方法によって行われる場合、常磁性試薬及び／又はその反応生成物は溶液を含む $^1\text{ }^3\text{C}$ -ピルビン酸塩から除去されるのが好ましい。常磁性試薬及び／又は反応生成物は、部分的に、或いはほぼ完全に、理想的には完全に除去されていればよく、完全に除去されることが好ましい。例えば、式(I)のトリチル基の反応生成物は、ピルビン酸と、ヒドロキシル基を含む式(I)のラジカルとの反応で形成されるエステルである可能性がある。常磁性試薬及び／又はラジカルの反応生成物の除去に使用される方法は周知である。通常、その方法の適用可能性は、常磁性試薬及び／又はその反応生成物の性質に依存する。固体の過分極試料が溶解されると、ラジカルが沈殿する場合は、濾過して液体組成物から容易に除去することができる。常磁性試薬として磁性粒子を使用する場合、

50

これらの粒子もまた濾過により容易に除去される。沈殿が生成しない場合には、常磁性試薬は、逆相、順相又はイオン交換クロマトグラフィー等の液相クロマトグラフィーのようなクロマトグラフィー分離法又は抽出により分離できる。

【0038】

式(I)のトリチル基は、紫外/可視部に特徴的な吸収スペクトルを有するため、ラジカルの除去後に、液体組成物中にラジカルが存在するか否か確認する方法として紫外/可視吸光測定を用いることができる。定量的な結果(溶解した過分極試料中に存在するラジカルの濃度)を得るために、試料における特定の波長の吸光度から、試料中の対応するラジカルの濃度が得られる様に分光光度計を校正してもよい。

【0039】

本発明の方法で使用する ^{13}C -ピルビン酸塩及び/又はDNPの方法で分極した ^{13}C -ピルビン酸塩を得るために好ましく使用される ^{13}C -ピルビン酸の同位体濃縮率は、好ましくは、少なくとも75%、さらに好ましくは、少なくとも80%及び特に好ましくは、少なくとも90%であり、同位体濃縮率が90%を上回っていることが最も好ましい。理想的には、濃縮率は100%である。 ^{13}C -ピルビン酸及び/又は ^{13}C -ピルビン酸塩は、 C_1 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_1$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_1$ -ピルビン酸塩という)、 C_2 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_2$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_2$ -ピルビン酸塩という)、 C_3 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_3$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_3$ -ピルビン酸塩という)、 C_1 -位及び C_2 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_{1,2}$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_{1,2}$ -ピルビン酸塩という)、 C_1 -位及び C_3 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_{1,3}$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_{1,3}$ -ピルビン酸塩という)、 C_2 -位及び C_3 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_{2,3}$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_{2,3}$ -ピルビン酸塩という)又は C_1 -位、 C_2 -位及び C_3 -位で同位体濃縮がなされているもの(以下、 $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ -ピルビン酸塩という)のいずれであってもよいが、 C_1 -位で同位体濃縮がなされているものが好ましい。

【0040】

$^{13}\text{C}_1$ -ピルビン酸及び $^{13}\text{C}_1$ -ピルビン酸塩の合成法としては数種類のものが周知である。要約すると、Seebach他、Journal of Organic Chemistry 40(2), 1975, 231-237では、例えば、1,3-ジチアン又は2-メチル-1,3-ジチアン等のS,S-アセタール(ジチオアセタール)に変換することにより、カルボニル基を含む出発物質の保護及び活性化を行う合成経路が述べられている。ジチアンはメタル化され、メチル基を含む化合物及び/又は $^{13}\text{CO}_2$ と反応する。本文献中で概説されているような適当な同位体濃縮された ^{13}C -成分を用いることにより、 $^{13}\text{C}_1$ -ピルビン酸塩、 $^{13}\text{C}_2$ -ピルビン酸塩又は $^{13}\text{C}_{1,2}$ -ピルビン酸塩を得ることができる。その後、文献記載の常法を用いて、カルボニル基を遊離させる。別の合成経路では、酢酸を出発物質とし、まず臭化アセチルに変換し、次いで Cu^{13}CN と反応させる。得られたニトリルを、アミドを経てピルビン酸に変換する(例えば、S.H.Anker他、J.Biol.Chem. 176(1948), 1333又はJ.E.Thirkettle, Chem Commun. (1997), 1025を参照)。さらに、市販の ^{13}C -ピルビン酸ナトリウムを、例えば、米国特許第6232497号に記載の方法でプロトン化することによって、 ^{13}C -ピルビン酸を得ることもできる。

【0041】

本発明の方法で使用するため、過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩は、ヒト又はヒト以外の動物身体への投与に適した組成物として提供される。組成物は、好ましくは、上記の緩衝液又は緩衝液の混合物を含む。組成物は、薬学的に許容できる慣用の担体、賦形剤及び製剤補助剤をさらに含んでもよい。従って、組成物は、例えば、安定化剤、オスモル濃度を調整する薬剤、溶解補助剤を含んでもよい。

【0042】

ピルビン酸塩は、高濃度であっても人体に対して高い耐性を有する内在性の化合物である。クエン酸回路の前駆体として、ピルビン酸塩は人体内で代謝上重要な役割を果たしている。ピルビン酸塩は数種の化合物に変換され、アミノ基転移によってアラニンを生成し、酸化脱炭酸によりピルビン酸塩はアセチル - C o A と炭酸水素塩とに変換され、ピルビン酸塩の還元によって乳酸が生成し、カルボキシル化によりオキサロ酢酸塩が生成する。

【 0 0 4 3 】

今回、過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩から過分極 ^{13}C - 乳酸塩、過分極 ^{13}C - 炭酸水素塩 ($^{13}\text{C}_1$ - ピルビン酸塩、 $^{13}\text{C}_{1,2}$ - ピルビン酸塩及び $^{13}\text{C}_{1,2,3}$ - ピルビン酸塩の場合のみ) 及び過分極 ^{13}C - アラニンへの変換を、生体内でのMRイメージングを用いた腫瘍組織と健常組織との識別に利用できることが判明した。このことは、過分極化合物の信号が緩和及び希釈のため減衰することに鑑みると、驚くべきことである。ヒトの全血中37で、 $^{13}\text{C}_1$ - ピルビン酸塩の T_1 緩和時間は約42秒である。しかし、過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩から過分極 ^{13}C - 乳酸塩、過分極 ^{13}C - 炭酸水素塩及び過分極 ^{13}C - アラニンへの変換は十分に速く、 ^{13}C - ピルビン酸塩及びその代謝産物に由来する信号を検出することができる。アラニン、炭酸水素塩及び乳酸塩の量は、研究対象である組織の代謝状態に依存する。 ^{13}C - 乳酸塩、過分極 ^{13}C - 炭酸水素塩及び過分極 ^{13}C - アラニンのMR信号強度は、これらの化合物の量及び検出時における分極の残存率に関連しているため、過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩の ^{13}C - 乳酸塩、過分極 ^{13}C - 炭酸水素塩及び過分極 ^{13}C - アラニンへの変換を観測することにより、非侵襲的なMRイメージングを用いた、ヒト又はヒト以外の動物体内における生体内での代謝プロセスの検討を行うことができる。

【 0 0 4 4 】

異なるピルビン酸代謝物に由来するMR信号強度は、組織の型によって異なることが見出された。アラニン、乳酸塩、炭酸水素塩及びピルビン酸塩による特有のピークパターンは、検討対象である組織の代謝状態に対する明確な特徴として用いることができ、従って、健常組織と腫瘍組織との識別が可能になる。これにより、過分極 ^{13}C - ピルビン酸塩を含む組成物は、生体内でのMRイメージングにとって優れた薬剤となる。

【 0 0 4 5 】

通常、検査対象である、患者又は動物等の被験者をMRマグネットに入れる。 ^{13}C - MR専用のラジオ波コイルが、観測対象となる部位をカバーするように配置される。

【 0 0 4 6 】

^{13}C - ピルビン酸塩を含む組成物は、非経口投与、好ましくは、血管内投与、関節内投与又は目的の部位或いは器官に直接投与される。本発明の組成物の用量及び濃度は、毒性、臓器への標的能及び投与経路等の因子の程度に依存する。通常、組成物は、ピルビン酸塩濃度が体重1kgあたり1mmol以下、好ましくは0.01~0.5mmol/kg、さらに好ましくは0.1~0.3mmol/kgの濃度で投与される。投与速度は、好ましくは10ml/秒未満、さらに好ましくは6ml/秒未満、最も好ましくは5ml/秒~0.1ml/秒である。投与後400秒以内、好ましくは120秒以内、さらに好ましくは60秒以内、特に好ましくは投与後20~50秒後、最も好ましくは投与後30~40秒後に、関心体積を周波数及び空間選択的にエンコーディングするMRイメージングシーケンスが適用される。これにより、 ^{13}C - 乳酸塩、 ^{13}C - アラニン及び ^{13}C - ピルビン酸塩の代謝イメージ、好ましくは、 ^{13}C - 乳酸塩、 ^{13}C - アラニン、 ^{13}C - 炭酸水素塩及び ^{13}C - ピルビン酸塩の代謝イメージが得られる。同時に、プロトンMRI造影剤を用いて、或いは用いずにプロトン画像の取り込みを行い、解剖学的画像及び/又は組織灌流画像を得る。

【 0 0 4 7 】

関心体積のエンコーディングは、例えば、T. R. Brown他, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 3523 - 3526 (1982); A. A. Maud

sley 他, J. Magn. Reson. 51, 147-152 (1983) に記載の、いわゆる分光イメージングシーケンスによって達成することができる。

【0048】

スペクトルイメージデータは、多数の体積要素からなり、個々の体積要素は完全な ^1H - MR スペクトルを含んでいる。 ^1H - ビルビン酸塩及びその ^1H - 代謝産物は、全て ^1H - MR スペクトルで固有の位置にピークを有しており、それらの同定に用いることができる。その共鳴周波数におけるピークの積分強度は、それぞれ、 ^1H - ビルビン酸塩及びその ^1H - 代謝産物の量に直接関係している。 ^1H - ビルビン酸塩及び個々の ^1H - 代謝産物の量を、例えば、L. Vanhamme 他, J. Magn. Reson. 129, 35-43 (1997) に記載の時間領域フィッティング法を用いて評価する場合には、 ^1H - ビルビン酸塩及び個々の ^1H - 代謝産物について、カラー表示又はグレイ表示により、測定された ^1H - ビルビン酸塩及び個々の ^1H - 代謝産物の量を表す画像を生成することができる。

10

【0049】

分光イメージング法は、 ^1H 、 ^{31}P 、 ^{23}Na 等の全種類の MR 核種を用いて代謝画像を生成することができる点で有用であることが実証されたが、スペクトルイメージを完全にエンコードするために多数回の繰返しが必要であるため、この方法は過分極 ^1H にはあまり適していない。MR 信号の取り込みの間中、過分極 ^1H の信号が確実に受信されるよう注意を払う必要がある。これは、信号対雑音比は低下するが、位相エンコーディングの全ステップで照射される RF パルス角を小さくすることにより達成される。マトリックスのサイズを大きくすると、必要な位相エンコーディングのステップ数及びスキャン回数は増大する。

20

【0050】

P. C. Lauterbur (Nature, 242, 190-191, (1973) 及び P. Mansfield (J. Phys. C, 6, L422-L426 (1973)) の先駆的な研究に基づくイメージング法は、データ取り込みの際に読み出し用の勾配磁場 (グラジエント) を印加することを含み、信号対雑音比の高い画像又は同等物、空間分解能の高い画像が得られる。しかし、これらのイメージング方法の基本形を用いても、 ^1H - ビルビン酸塩及びその ^1H - 代謝産物を分離して画像化することはできず、 ^1H - ビルビン酸塩及び全ての ^1H - 代謝産物の信号を含む画像しか得られないため、個々の代謝産物を同定することはできない。

30

【0051】

好ましい実施形態では、周波数をコードするために多重エコーを用いたイメージングシーケンスが用いられる。水と脂質が分離した ^1H 画像を生成することができるシーケンスは、例えば、G. Glover, J. Magn. Reson. Imaging 1991; 1: 521-530 及び S. B. Reeder 他, MRM 51: 35-45 (2004) に記載されている。測定する代謝産物及びその MR 周波数は既知であるため、上記参考文献に記載の方法を、 ^1H - ビルビン酸塩、 ^1H - アラニン及び ^1H - 乳酸塩、好ましくは ^1H - ビルビン酸塩、 ^1H - アラニン、 ^1H - 乳酸塩及び ^1H - 炭酸水素塩の画像化に直接適用すると、古典的なスペクトル画像化技法よりも高品質な信号、空間分解能がより高い信号及び短い取り込み時間が与えられ、過分極 ^1H - MR 信号をより有効に使用することができる。

40

【0052】

腫瘍組織は、灌流が増大し代謝活性が向上するという特徴を示すことが多い。代謝の要求が高く、かつ/又は毛細血管からより離れた細胞によって誘導される血管床の増加、血管新生という過程によっても、エネルギーの恒常性を維持するために必要とされるエネルギーを供給するに足るだけの物質の確保は不可能である。このような領域内では、細胞が十分なエネルギーを産生する点で問題が生じており、代謝パターンに顕著な変化が生じていることが期待される。問題が生じているがエネルギーの恒常性を維持している組織は、特に乳酸の産生量が増加しているという点でエネルギー代謝が変化する。驚くべきことに

50

、過分極¹³C - ピルビン酸塩を用いると、MRイメージングで用いることのできる短い時間窓内で、この代謝の変化を可視化でき、すなわち、腫瘍領域内で強度が高い¹³C - 乳酸塩の信号を用いて腫瘍を健常組織と識別することが可能である。灌流は、腫瘍組織内では不均一であるため、¹³C - 乳酸塩の信号を、同一領域内に存在するピルビン酸塩の量(¹³C - ピルビン酸塩の信号)で補正することが好ましい。この補正によって、ピルビン酸塩に対して存在比率が高い乳酸塩の画像が得られる。この補正により、ピルビン酸塩の信号に対して乳酸塩の信号強度が高い組織の領域を強調することができ、腫瘍組織と正常組織の識別が改善される。

【0053】

ピルビン酸塩の信号による補正を行うためには、乳酸塩及びピルビン酸塩の画像を個々の画像における最大値で正規化する。次に、正規化した乳酸塩の画像に、反転したピルビン酸塩の画像(例えば、画像内のピルビン酸塩の信号の最大強度からすべてのピクセルについてピルビン酸塩の信号強度を減じた差)を乗算する。最終段階として、上記の操作により得られた中間結果に元の乳酸塩の画像を乗算する。

10

【0054】

代謝が変化している領域を強調するために、¹³C - アラニンの信号強度の減少と関連のある強度の高い¹³C - 乳酸塩の信号を、上の段落で述べたような操作に用いることができ、これによりアラニンに対して存在比率の高い乳酸塩の画像が得られる。驚くべきことに、腫瘍領域の同定、すなわち、腫瘍組織と正常組織の識別は、この補正によっても改善される。アラニンの信号による補正を行うためには、乳酸塩及びアラニンの画像を個々の画像における最大値で正規化する。次に、正規化した乳酸塩の画像に、反転したアラニンの画像(例えば、画像内のアラニンの信号の最大強度からすべてのピクセルについてアラニンの信号強度を減じた差)差を乗算する。最終段階として、上記の操作により得られた中間結果に元の乳酸塩の画像を乗算する。同様に、¹³C - 炭酸水素塩の信号も、解析に用いることができる。さらに、プロトンMRI造影剤を用いて、或いは用いずに取り込みを行ったプロトン画像を解析に用いて、解剖学的画像及び/又は組織灌流画像を得ることもできる。

20

【0054】

代謝が変化している領域を強調するために、¹³C - アラニンの信号強度の減少と関連のある強度の高い¹³C - 乳酸塩の信号を、上の段落で述べたような操作に用いることができ、これによりアラニンに対して存在比率の高い乳酸塩の画像が得られる。驚くべきことに、腫瘍領域の同定、すなわち、腫瘍組織と正常組織の識別は、この補正によっても改善される。アラニンの信号による補正を行うためには、個々の画像で乳酸塩及びアラニンの画像にける最大値へと正規化する。次に、正規化した乳酸塩の画像に反転したアラニンの画像、例えば、画像内のアラニンの信号の最大強度とピクセル毎のアラニンの信号強度との差をかけ合わせる。最終段階として、上記の操作により得られた中間結果に元の乳酸塩の画像をかけ合わせる。同様に、¹³C - 炭酸水素塩の信号も、解析に用いることができる。さらに、プロトンMRI造影剤を用いて、或いは用いずに取り込みを行ったプロトン画像を解析に用いて、解剖学的画像及び/又は組織灌流画像を得ることもできる。

30

【0055】

他の好ましい実施形態では、過分極¹³C - ピルビン酸塩を含む組成物を繰り返し投与することにより、動的検査を行うことができる。この点は、患者の体内を比較的長時間循環するために動的検査を行うことができない他のMR造影剤と比較した場合の本発明の方法のさらなる利点である。

40

【0056】

本発明の方法は、生体内でのMRによる腫瘍のステージ判定のためにさらに用いられてもよい。上の段落で述べたような代謝画像及び/又は代謝比の高い存在率の画像は、腫瘍のサイズや代謝活性によって定義された、適切に区分された分類を用いれば、この目的に用いることができる。

【0057】

50

さらに、本発明の方法は、生体内における腫瘍の治療効果のMRによるモニタリング、例えば、治療用抗ガン剤及び／又は放射線治療による治療又は任意の除去法、すなわち、ラジオ波、マイクロ波若しくは超音波と組み合わせた化学的除去法を用いた、或いは用いない任意の治療を行った場合における代謝パターンの直接的な変化のモニタリングに用いられてもよい。

【0058】

患者又は動物に対する前処理によってタンパク質代謝、脂質代謝又はエネルギー代謝全般を乱すことにより、本発明の方法による腫瘍のMRイメージングに影響を与え、改善することができる。これらを達成する手段は周知であり、絶食（例えば一晩）、グルコース投与等が例として挙げられる。

10

【0059】

好ましい実施形態では、本発明の方法は、脳腫瘍、乳ガン、大腸／結腸直腸ガン、肺ガン、腎ガン、頭部及び頸部腫瘍、筋腫、胃ガン、食道ガン、卵巣腫瘍、膵臓ガン及び前立腺ガンに対する、生体内におけるMR腫瘍イメージング、腫瘍の治療効果のモニタリング及び腫瘍のステージの判定に使用できる。さらに、本発明の方法は、特に生体内における前立腺ガンのMRイメージング、すなわち、生体内での前立腺ガンの診断及び／又は前立腺ガンのステージの判定及び／又は前立腺ガンの治療効果のモニタリングのためのMR造影剤として特に有用であることが見出された。

【0060】

男性が、医師に排尿時の苦痛及び不快感を訴える場合、前立腺ガンが疑われる。その男性が50歳以上の場合には、前立腺特異抗原（PSA）検査が行われる。PSA値の上昇及び／又は直腸内触診での異常に基づいて、前立腺ガンの疑いが持たれる。PSA検査の結果が陽性の場合、患者は、超音波による生体検査のために専門家（泌尿器科医）の下に送られる。米国及びヨーロッパでは、1年間に200万件以上の生体検査が行われており、それぞれ、6例中5例及び3例中2例は陰性である。初期の段階で発見されれば、これらの患者の5年後生存率は100%である。前立腺ガンは最も患者数の多いガンであり、男性のガンによる死亡原因の第2位であるため、前立腺ガンを早期の段階で発見することができ、生体検査の件数を低減させるのに有用な前立腺ガンの診断方法に対する医学上の強い要請が存在する。

20

【0061】

前立腺の ^{13}C -イメージングには、送受信用の ^{13}C -RF体積コイルが必要であり、好ましくは送信用の ^{13}C -RF体積コイルとMR受信専用の直腸内RFコイルとを組み合わせ用いられ、さらに好ましくは、送受信用のフェイズドアレイ ^{13}C -RF体積コイルとMR受信専用の直腸内RFコイルとを組み合わせ用いられる。特に好ましくは、 ^{13}C -イメージングの後で ^1H -前立腺画像の取り込みが可能なコイルである。

30

【実施例】

【0062】

実施例1：トリス（8-カルボキシ-2,2,6,6-テトラ（メトキシエチル）ベンゾ-[1,2,-4,5']-ビス-(1,3)ジチオール-4-イル）メチルナトリウム塩の合成

40

国際公開第98/39277号パンフレットの実施例7に従って合成したトリス（8-カルボキシ-2,2,6,6-テトラ（ヒドロキシエチル）ベンゾ-[1,2,-4,5']-ビス-(1,3)ジチオール-4-イル）メチルナトリウム塩10g（70mmol）を、アルゴン雰囲気下でジメチルアセタミド280mlに懸濁した。水素化ナトリウム（2.75g）、次いでヨウ化メチル（5.2ml）を加え、わずかに発熱反応である反応を、34の水浴中で60分間行わせた。水素化ナトリウム及びヨウ化メチルを、それぞれ同量ずつ2回繰り返して加え、最後の添加後に、混合物を室温で68時間攪拌し、500mlの水中に注いだ。1MNaOH（水溶液）40mlを用いてpHをpH>13に調整し、混合物を室温で15時間攪拌して生成したメチルエステルを加水分解した。その後、2MHC1（水溶液）50mlを用いて、混合物をpHが約2となるように酸性化

50

し、酢酸エチル（500 ml 及び 2×200 ml）で抽出した。有機相をまとめて Na_2SO_4 上で乾燥後、蒸発乾固させた。粗生成物（24 g）を、アセトニトリル／水を溶離剤として分種 HPLC により精製した。集めたフラクションを蒸発させ、アセトニトリルを除去した。残った水相を酢酸エチルで抽出し、有機相を Na_2SO_4 上で乾燥後蒸発乾固した。水（200 ml）を残渣に加え、1 M NaOH （水溶液）を用いて pH を注意深く 7 に調整すると、この過程の間に残渣はゆっくり溶解した。中和後、水溶液を凍結乾燥した。

【0063】

実施例 2： ^{13}C -ピルビン酸及び実施例 1 のトリチル基を用いた DNP の方法による過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩を含む組成物の製造

10

実施例 1 のラジカル 5.0 mg を ^{13}C 1 - ピルビン酸（164 μl ）に溶解して、20 mM 溶液を調製した。試料を均一になるまで混合し、溶液の一部（41 mg）を試料カップに入れ、DNP 分極装置内に挿入した。

【0064】

DNP 条件下で、1.2 K で、3.35 T の磁場中でマイクロ波（93.950 GHz）を試料に照射した。2 時間後、分極を終了し、国際公開第 02/37132 号パンフレットに記載の溶解装置を用いて、試料を水酸化ナトリウム及びトリス（ヒドロキシメチル）- アミノメタン（TRIS）の水溶液に溶解し、過分極 ^{13}C -ピルビン酸ナトリウムの中性の溶液を得た。溶解した試料について、速やかに ^{13}C -NMR による分析を行い、分極の評価を行ったところ、 ^{13}C の分極率が 19.0% という値が得られた。

20

【0065】

実施例 3： ^{13}C -ピルビン酸及び実施例 1 のトリチル基を用いた DNP の方法による過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩の製造

実施例 1 のラジカル（209.1 mg）を ^{13}C 1 - ピルビン酸（553 mg）及び未標識のピルビン酸（10.505 g）に溶解して、15 mM 溶液を調製した。試料を均一になるまで混合し、溶液の一部（2.015 g）を試料カップに入れ、DNP 分極装置内に挿入した。

【0066】

DNP 条件下で、1.2 K で、3.35 T の磁場中でマイクロ波（93.950 GHz）を試料に照射した。4 時間後、分極を終了し、国際公開第 02/37132 号パンフレットに記載の溶解装置を用いて、試料を水酸化ナトリウム及びトリス（ヒドロキシメチル）- アミノメタン（TRIS）の水溶液に溶解し、100 mM TRIS 緩衝液中のピルビン酸塩の全濃度が 0.5 M である、過分極 ^{13}C -ピルビン酸ナトリウムの中性の溶液を得た。溶解装置と直列にクロマトグラフィー用カラムを接続した。カラムは、バリアン社（Varian Inc.）製で、疎水性充填材（Bondesil-C18、40 μm 、注文番号 12213012）を充填したカートリッジ（直径 38 mm、高さ 10 mm）よりなる。溶解した試料をカラムに通すと、ラジカルが選択的に吸着された。ろ液について、速やかに ^{13}C -NMR による分析を行い、分極の評価を行ったところ、 ^{13}C の分極率が 16.5% という値が得られた。その後、ラジカルの残留濃度を、紫外分光計により測定波長 469 nm で分析したところ、検出限界の 0.1 μM 未満であった。

30

40

【0067】

実施例 4： ^{13}C -ピルビン酸及び、トリス（8-カルボキシ-2,2,6,6-テトラ（ヒドロキシ-エトキシ）メチル-ベンゾ[1,2-d:4,5-d']ピス（1,3）ジチオール-4-イル）メチルナトリウム塩を用いた、DNP の方法による過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩の製造

トリス（8-カルボキシ-2,2,6,6-テトラ（ヒドロキシエトキシ）ベンゾ-[1,2,-4,5-d']-ピス-（1,3）ジチオール-4-イル）メチルナトリウム塩を国際公開第 97/09633 号パンフレットの実施例 29 に記載されるように合成した。

【0068】

50

トリス(8-カルボキシ-2,2,6,6-テトラ(ヒドロキシエトキシ)ベンゾ-[1,2,-4,5-d']-ピス-(1,3)ジチオール-4-イル)メチルナトリウム塩を ^{13}C -ピルビン酸(83.1mg)に溶解して、20mM溶液を調製した。試料を均一になるまで混合し、溶液の一部(41mg)を試料カップに入れ、DNP分極装置内に挿入した。DNP条件下で、1.2Kで、3.35Tの磁場中でマイクロ波(93.950GHz)を試料に照射した。試料からの ^{13}C -NMR信号の取り込みを、バリアン社製Inova-200NMR分光計を用いて行った。DNPを介した分極の増大を、熱平衡下での ^{13}C -NMR信号及び増大したNMR信号の測定結果より計算した。 ^{13}C の分極率として16%という値が得られた。

【0069】

実施例5：造影剤として過分極 ^{13}C -ピルビン酸塩を含む組成物を用いた腫瘍イメージング

5.1. 腫瘍動物モデル及び腫瘍調製

R3230ACは、雌フィッシャー344ラットで維持されるラット乳腺癌である。動物の腫瘍モデルを確立するために、RPMI1640培地、10%ウシ胎児血清(FBS)及び10%DMSOを含むR32030細胞の凍結したバイアルを37℃で速やかに解凍した。その後、細胞の溶液をFBSに移し、RPMI1640培地を追加した。最後に、細胞の懸濁液を25cm²の培養フラスコに移し、37℃、5%CO₂のインキュベータ中に入れた。培地は毎日交換した。ラットに投与する日に、機械的に又はトリプシンを用いて細胞を剥離した。カルシウム及びマグネシウムを含まないリン酸緩衝液で細胞を洗浄した。トリプシン(0.05%トリプシンを0.02%EDTA水溶液に溶解したもの)を2~5分かけて加えた。その後、FBS5mlを加え、細胞を、FCS及び抗生物質(ペニシリン100IU/ml、ストレプトマイシン100IU/ml及びアンフォテリシンB2.5µg/ml)を含むRPMI1640培地を入れたビーカーに移した。細胞溶液を遠心分離して、細胞ペレットを、FBS及び抗生物質を含むEPMI培地20mlに再懸濁し、遠心分離及び再懸濁を繰り返した。その後、細胞を、4×10⁶個/ml RPMI1640培地となるようにバイアルに分注した。ドナー腫瘍を得るために、雌性フィッシャー344系ラット(チャールズ・リバー社、180~200g)を麻酔し、0.3mlの細胞懸濁液を、鼠径部両側に皮下注射した。15日後及び22日後に、F.A.Burgener他、Invest Radiol 22/6(1987)、472-478;

S.Saini他、J.Magn.Reson. 129/1(1997)、35-43に記載の方法で、腫瘍の切片を調製した。

【0070】

レシピエントである雌性フィッシャーラットの腹側縁上を2箇所切開した。腫瘍の切片を開口内に挿入し、縫合した。腫瘍の移植から12~14日後に、ラットのイメージングを行った。

【0071】

5.2. ラットの調製及びプロトンMRイメージング

計量したラットをイソフルラン(2~3%)で麻酔し、体温を37℃以上に保つために加熱テーブル上に保持した。カテーテルを、尾静脈及び左総頸動脈に挿入した。ラットをMR装置に移し、FC-104フルオリナートを循環させることにより約37℃に加熱した自家製のパッド上に配置した。この液体は、 ^1H -及び ^{13}C -MRイメージングの際にバックグラウンド信号を生じない。開放型呼吸器に接続された長いチューブから0.4L/分の速度で供給される1~2%イソフルランにより麻酔を継続した。動脈カテーテルを、T字管を介して圧力計及び生理食塩水供給ポンプ(流速0.15mL/分)に接続して、カテーテルが血栓で詰まるのを防止した。ラットを、ラット用MRコイル(Rapid Biomedical社(ドイツ)製)に入れ、標準的なプロトンMRイメージングシーケンスによりイメージングを行い、解剖学的情報を得て腫瘍の位置を決定した。

【0072】

10

20

30

40

50

5.3. ^{13}C -MRイメージング

MR装置により測定したプロトンの周波数に基づき、 ^{13}C -アラニンの共鳴周波数を下式により求めた。

【0073】

^{13}C 1 - アラニンの周波数 = $0.25144 \times [(\text{装置のプロトン共鳴周波数} \times 1.00021) - 0.000397708]$

計算により求められた周波数より、 ^{13}C 1 - アラニンに由来するMR信号の位置は、 ^{13}C 1 - 乳酸塩の共鳴信号がその左側に、 ^{13}C 1 - ピルビン酸塩の共鳴信号が ^{13}C 1 - アラニンの右側の位置になる。非局所的なMR分光シーケンスを用いて測定を行い、 ^{13}C -MRコイル及び装置のMR周波数が正しく設定されていることを確認した。腫瘍をカバーするよう ^{13}C -画像の位置(スライス厚10mm、平面ピクセルサイズ $5 \times 5 \text{ mm}^2$)を定めた。再構成段階で画像データにゼロフィリングを行い、 $2.5 \times 2.5 \times 10 \text{ mm}^3$ の分解能を得た。TRIS緩衝液(90mM)に溶解した ^{13}C 1 - ピルビン酸塩を、10ml/kgの用量で、12秒間で、最小体積2mlを尾静脈から注入し、注入開始から30秒後(注入完了から18秒後)に、化学シフト ^{13}C -MRシーケンスを開始した。

【0074】

5.4. MRイメージングデータの解析

MRイメージングにより 16×16 要素のマトリックスが得られ、個々の要素又はピクセル/ボクセルは ^{13}C -MRスペクトルを含んでいる。再構成段階で、マトリックスに対し、空間分解能を増大するのに有用な数学的操作であるゼロフィリングを行い、 32×32 に拡大された。データセットは1024のスペクトルを含んでおり、さらに解析を行うために、Dicomフォーマットでエクスポートされた(DICOMは、医療情報のデジタル通信に関する標準規格書を指定商品とする北米電子機器工業会の登録商標である)。これらのスペクトルのうち約半分は、ボクセルが動物の体外に位置していたので、MR信号を含んでいなかった。動物の体内では、ピルビン酸塩の信号強度が高く、乳酸塩及びアラニンがほとんど存在しないボクセル(血流プール)がある一方、他のボクセルはピルビン酸塩、アラニン及び乳酸塩がほぼ同量ずつ存在していた。

【0075】

ピルビン酸塩、アラニン及び乳酸塩の強度は、以下の条件を含む時間領域フィッティング法を用いて求めた。ゼロ次の位相は、全データセットにわたって一定。

【0076】

1次の位相は1.4ミリ秒。

【0077】

時間領域の線幅又は減衰は、個々の代謝産物についてそれぞれ別個に、全データセットの平均線幅の0.5~3倍の変動を許容。

【0078】

周波数は、最も高いピーク(ユーザが定義する必要あり)について、全データセットにわたって観測された平均周波数に対して両方向に20Hzの変動を許容。

【0079】

乳酸塩、アラニン及びピルビン酸塩の強度をマトリックス中で再配列し、再サンプリングを行い、プロトン解剖学的MR画像の分解能とのマッチングをとる。 ^{13}C -MR画像の解剖学的画像上への投影を自動的に行い、オペレータに依存しない結果を得る。結果は、ラットの腫瘍の解剖学的プロトン画像、解剖学的画像上に投影されたピルビン酸塩、乳酸塩及びアラニンに関する代謝 ^{13}C -画像を含む画像セットとして表示され、画像には、各ピクセルについて以下が表示される。

【0080】

a) $([\text{乳酸塩}]_{\text{norm}} \times ([\text{ピルビン酸塩}]_{\text{max}} - [\text{ピルビン酸塩}]))_{\text{norm}} \times [\text{乳酸塩}]$

b) $([\text{乳酸塩}]_{\text{norm}} \times ([\text{アラニン}]_{\text{max}} - [\text{アラニン}]))_{\text{norm}} \times [\text{乳$

10

20

30

40

50

酸塩]が表示されている。

【0081】

ここで、「[...]norm」という用語は、正規化、すなわち、代謝画像における最大値へと調整された強度を表し、「[乳酸塩]」は、計算された強度を表す。

【0082】

腫瘍領域に最も高い乳酸塩の信号がある状態又は腫瘍領域で乳酸塩のピルビン酸塩に対する比率が高く、かつ同じピクセル領域内で乳酸塩のアラニンに対する存在比率が高い状態が、 ^{13}C -MR画像における腫瘍組織と正常組織の識別が成功したと定義される。

【0083】

5.5. 生物学的分析

10

腫瘍部位には、目視による検査で出血の兆候が認められた。腫瘍をラットの身体から切り離し、秤量後半分に切断した。腫瘍の内部を目視により検査したところ、均質性、壊死及び出血が認められた。腫瘍組織を4%ホルマリン中に保存した。

【0084】

腫瘍に罹ったラットのうち、以下の条件を満たすものが評価に適していると考えられる。

【0085】

腫瘍の重量は100mgより多い。

【0086】

腫瘍の内部に目視できる壊死や嚢胞が存在しない。

20

【0087】

体温が35以上である MR検査の際に、動脈圧が60mmHgより高い。

【0088】

5.6. 結果

18頭のラットについて、合計で30の異なる腫瘍のイメージングを行った。1頭のラットについては失敗し、3つの腫瘍については、上の段落5.5に記載の生物学的条件を満たさなかった。残りの17頭における26の腫瘍は、均質であり、その内部は重量感があり壊死を起こしていない。注入時の ^{13}C 1-ピルビン酸塩の平均分極は $21.2 \pm 2.9\%$ (平均±標準偏差)であり、pHは 8.08 ± 0.14 (平均±標準偏差)であった。

30

【0089】

図1は、1頭のラットについて撮像した、(1)プロトンの参照画像で、図中の矢印は腫瘍の位置を示す、(2) ^{13}C -ピルビン酸塩の画像、(3) ^{13}C -乳酸塩の画像、(4) ^{13}C -アラニンの画像、(5) ^{13}C -ピルビン酸塩で補正した ^{13}C -乳酸塩の画像及び(6) ^{13}C -アラニンで補正した ^{13}C -乳酸塩の画像よりなる典型的な画像の組を示す。画像(2)~(6)は、プロトンの参照画像と融合している。

【0090】

図2は、同じ画像の組を示すが、解剖学的プロトン画像と融合していない画像(2)~(6)よりなる。

【0091】

40

結果として、腫瘍の位置は、高い代謝活性に起因するピルビン酸塩の高信号(2)により示される。しかし、乳酸塩の信号(3)により、最終的に腫瘍の正確な位置が特定される。アラニンは、骨格筋内では観測されるが、腫瘍組織には存在しない(4)。ピルビン酸塩及びアラニンで補正した乳酸塩の信号(5)及び(6)は、いずれも腫瘍に対して優れたコントラストを有する。

【0092】

このように、代謝画像で腫瘍の位置は乳酸塩の高信号、ピルビン酸塩で補正した乳酸塩の高信号及びアラニンで補正した乳酸塩の高信号によって示されることが実証された。

【0093】

代謝 ^{13}C -MR画像の解析より、以下の症例数で腫瘍領域で代謝のコントラストを示

50

した。

【 0 0 9 4 】

乳酸塩の信号については 2 6 の腫瘍中 2 4 例。

【 0 0 9 5 】

ピルビン酸塩で補正 (5 . 5 , , a) した乳酸塩の信号については 2 6 の腫瘍中 2 6 例

。

【 0 0 9 6 】

アラニンで補正 (5 . 5 , b) した乳酸塩の信号については 2 6 の腫瘍中 2 6 例。

【 0 0 9 7 】

本研究における全成功率は、 2 6 例中 2 6 例、 1 0 0 % であった。

10

【 0 0 9 8 】

本研究により、腫瘍は、過分極 ^{13}C 1 - ピルビン酸塩を用いて同定され、対象となる領域 (腫瘍) に、化合物の撮像が可能な時間内に到達し、化合物及びその代謝産物の撮像が可能であることが示された。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 9 9 】

【図 1】 1 頭のラットについて撮像した、 (1) プロトンの参照画像で、図中の矢印は腫瘍の位置を示す、 (2) ^{13}C - ピルビン酸塩の画像、 (3) ^{13}C - 乳酸塩の画像、 (4) ^{13}C - アラニンの画像、 (5) ^{13}C - ピルビン酸塩で補正した ^{13}C - 乳酸塩の画像及び (6) ^{13}C - アラニンで補正した ^{13}C - 乳酸塩の画像からなる典型的な画像の組を示す図。画像 (2) ~ (6) は、プロトンの参照画像と融合している。

20

【図 2】 同じ画像の組であるが、解剖学的プロトン画像と融合していない画像 (2) ~ (6) からなる画像の組を示す図。

【図 1】

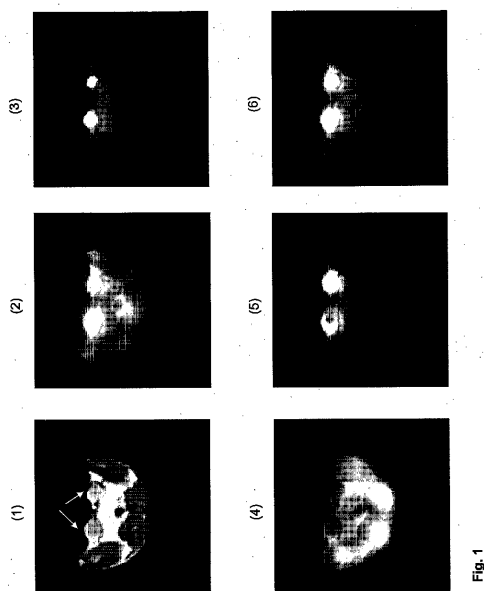


Fig. 1

【図 2】

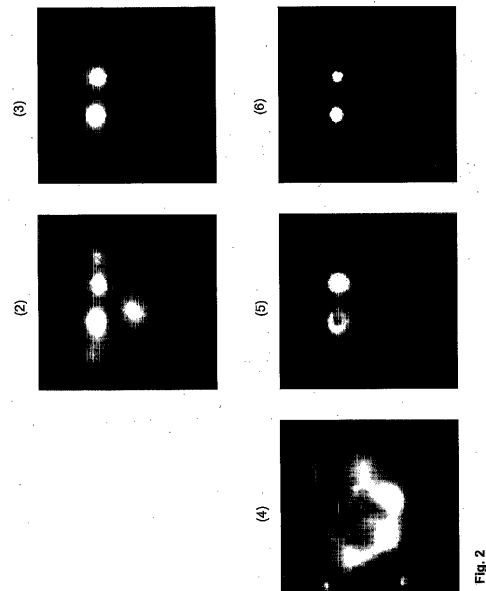


Fig. 2

フロントページの続き

- (72)発明者 タニング, ミッケル
スウェーデン、エス - 2 0 5 ・ 1 2 ・ マルモ、ペーアー・ハンソンズ・ヴェー・4 1、アメルシャム・ヘルス・エル・アンド・デー・アーベー (番地なし)
- (72)発明者 アーデンチャール・ラーソン, ヤン・ヘンリク
スウェーデン、エス - 2 0 5 ・ 1 2 ・ マルモ、ペーアー・ハンソンズ・ヴェー・4 1、アメルシャム・ヘルス・エル・アンド・デー・アーベー (番地なし)
- (72)発明者 ヴォルパー, ヤン
スウェーデン、エス - 2 0 5 ・ 1 2 ・ マルモ、ペーアー・ハンソンズ・ヴェー・4 1、アメルシャム・ヘルス・エル・アンド・デー・アーベー (番地なし)
- (72)発明者 ラルシェ, マティルデ
スウェーデン、エス - 2 0 5 ・ 1 2 ・ マルモ、ペーアー・ハンソンズ・ヴェー・4 1、アメルシャム・ヘルス・エル・アンド・デー・アーベー (番地なし)
- (72)発明者 ザント, ルネイ・イント
スウェーデン、エス - 2 0 5 ・ 1 2 ・ マルモ、ペーアー・ハンソンズ・ヴェー・4 1、アメルシャム・ヘルス・エル・アンド・デー・アーベー (番地なし)

審査官 右▲高▼ 孝幸

- (56)参考文献 特開平0 1 - 2 6 5 9 5 0 (J P , A)
特開平0 3 - 0 3 7 0 4 3 (J P , A)
Paula Gould, C-13 MR tracers show potential for functional diagnostics , DIAGNOSTIC IMAGING , 2 0 0 4 年 6 月 , インターネット<URL: <http://www.diagnosticimaging.com/dimag/legacy/molecularimagingoutlook/2004jun/04.html>>

- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
A 6 1 B 5 / 0 5 5