

MRI用経口消化管造影剤の開発のための基礎研究： クエン酸第二鉄アンモニウムによる緩和効果

渡部 徳子¹, 中村 順二², 中村 利夫³, 飯塚 利明¹

¹東京水産大学,

²大塚製薬診断事業部,

³大塚製薬製剤研

はじめに

この数年、腹部のMRI用造影剤の必要性が認識され、適切な経口造影剤の出現が期待されている。Gd-DTPA^{1)~4)}、クエン酸鉄アンモニウム^{5)~8)}、緑茶とアルギン酸ナトリウムの混合液⁹⁾などのような陽性造影剤や陰性造影剤であるフェライト粒子^{10)~14)}やカオリナイト¹⁵⁾、硫酸バリウム^{16),17)}、弗素化合物¹⁸⁾などの使用経験が報告され、消化管系からの脾臓や肝臓の識別や境界領域の明確化の点で有効であることが認められた。これらの報告の多くにおいては、ファントム実験や動物実験における信号強度変化に基づいて実用面、臨床面から対象とされた物質の造影効果が評価された。より有効な経口造影剤の開発のためには造影剤として作用している常磁性物質（または反磁性、強磁性物質）の同定と定量、緩和効果の定量的な評価、作用機構など基礎科学的な検討が必要である。

本研究においては、経口投与による陽性の消化管造影剤の開発を目的として種々の鉄化合物の緩和に強く影響しMRIに陽性のコントラスト効果を与える常磁性化合物として、 Gd^{3+} ($S=$

$7/2$)、 Mn^{2+} ($S=5/2$)、 Fe^{3+} ($S=5/2$)、 Cr^{3+} ($S=3/2$)、 Dy^{3+} ($S=7/2$) などの金属イオンやニトロキシドラジカルが可能であるが、経口投与した際の安全性の点から Fe^{3+} イオンを選んだ。一般に Fe^{3+} イオンに比べて Gd^{3+} イオンや Mn^{2+} イオンの方が強い T_1 緩和効果をもつことが知られているが、クエン酸鉄アンモニウム中の Fe^{3+} イオンは消化管造影剤として要求される緩和能力を充分備えていることが明らかにされた。これらの結果に基づいて新しいMRI経口消化管造影剤 (OMR) が開発されつつあり、ファントムおよび動物実験^{19),20)}、第二相臨床試験において良好な結果をみている^{21),22)}。

対象及び方法

(1) 対象鉄化合物の選択

経口毒性のないこと、飲み易いこと、水溶性であること、入手し易いことを選択基準として鉄常磁性化合物の検索を行った。すなわち、食品添加物として許可されている鉄化合物、11種類 (クエン酸第一鉄ナトリウム、クエン酸鉄、クエン酸鉄アンモニウム、3-2酸化鉄、鉄ク

キーワード oral contrast agent, ferric ammonium citrate, relaxation enhancement, abdomen MRI

ロロフィンナトリウム, 硫酸第一鉄, 塩化第二鉄, 乳酸鉄, グルコン酸第一鉄, ピロリン酸第一鉄, ピロリン酸第二鉄), 局外規に収載されている鉄化合物, 5種類(グルコン酸第二鉄, オロチン酸鉄, フマル酸鉄, スレオニン鉄, 含糖酸化物), および局方に収載されている鉄医薬品, 1種類(硫酸鉄)を一次対象とし, その中から選択基準を満たすものとして, クエン酸第一鉄ナトリウム, クエン酸鉄, クエン酸第二鉄アンモニウムを選び, 対象鉄化合物とした. これらの化合物は純粋な化学物質ではなく, 製法により組成が異なるため, 食品添加物として市販されているものと化学薬品として市販されているものを用い比較した. [試料#1クエン酸第一鉄ナトリウム:食品添加物(Lot Y114), #2クエン酸第二鉄:食品添加物(Lot 5265-01-417)および化学薬品(半井薬品 Lot M8H 2245), #3クエン酸鉄アンモニウム:食品添加物(Lot 30828), #4クエン酸第二鉄アンモニウム(緑色):化学薬品(和光純薬 Lot PDM1233), #5クエン酸鉄アンモニウム(茶褐色):化学薬品(和光純薬 Lot PDR 3466)]また, これらの化合物は光分解されやすく, かつ空気酸化されるが, 本実験においては実際に使用されるときに条件を考慮して, 光及び空気に対して特別の配慮をせずに, 室温, 大気中, 蛍光灯ランプ下で試料調製, 保存, 測定を行った. 鉄濃度, および緩和効果の比較のために塩化第二鉄(和光純薬)が用いられた.

(2) 試料調製及び同定

鉄化合物は脱イオン蒸留水(以下, 純水と呼ぶ)および人口胃液に溶かされた. 濃度範囲はFeイオンとして $0.1 \sim 20 \text{ mmol/l}$ ($5.58 \sim 1116 \text{ mgFe/l}$ に相当)である. 使用された鉄化合物は混合物であるため, 鉄イオン緩和度の比較をするためには各化合物の鉄含量の定量が必須である. 鉄イオンの濃度の定量は, ICP法およびオルトフェナンスロリンによる吸光光度法にて

行われた. 純水中の鉄イオンは時間と共に集合体を形成し沈澱するので注意を要する. 緩和効果のpH依存性を検討するために人口胃液(pH 1.2)を純水で希釈したものに一定量のクエン酸鉄アンモニウム(食品添加物)を溶かした(Fe濃度として 3.06 mmol/l , すなわち 171 mgFe/l). 人口胃液は濃塩酸 23.6 ml を 100 ml に希釈し, その 24 ml に食塩 2 g を加え純水にて 1000 ml に希釈し調製された.

鉄化合物の常磁性の強さを検討するために粉末試料, 水溶液およびその凍結状態において電子スピン共鳴(ESR)が測定された(室温または 77 K). また酸化状態の確認のためにメスバウアースペクトルが測定された.

(3) 緩和時間の測定

水プロトンの緩和時間(T_1, T_2)はBruker社製パルスNMR装置(PC-120)を用い, 20 MHz , 40°C で測定された. T_1 は反転回復法, T_2 はCPMG法により, サンプリング数を増やした以外は, 標準のソフトが使われた.

結 果

(1) 種々の鉄化合物の緩和効果

図1および図2に, それぞれ, 水プロトンの T_1 および T_2 緩和速度のFe濃度依存性を示す. 横軸のFe濃度はICP法により定量された値を用いている. ($1 \text{ ppm} = 1 \text{ mg/l}$)緩和速度のFe濃度依存性より求めた緩和度(relaxivity, $[\text{s} \cdot \text{mmol/l}]^{-1}$)を表1に示す. これらの結果から次のことが明らかである.

a) 純水中および人工胃液中共に, 低濃度領域においてクエン酸鉄アンモニウムは食品添加物と化学薬品, 塩基性塩と酸性塩の別なく, 同様の緩和能力を示した. 但し, 高濃度($> 300 \text{ mg/l}$)領域では, 程度は小さいが差異が認められた.

b) 純水中ではクエン酸鉄アンモニウムより,

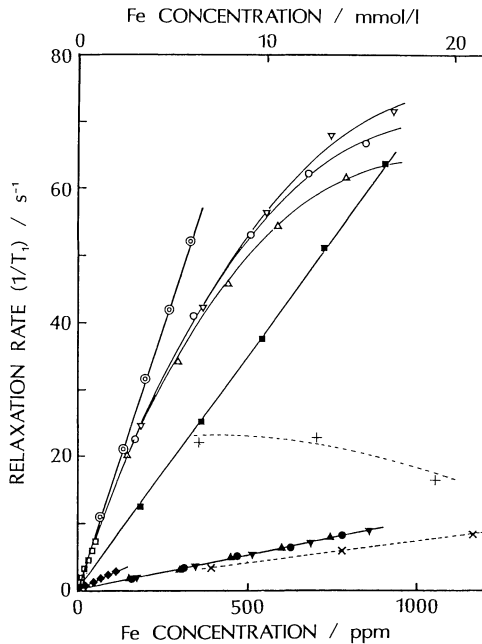


図 1. T_1 緩和速度の鉄濃度依存性

中空の記号は人工胃液, 中黒の記号は純水における緩和速度を示す. 鉄化合物の種類は次の記号により区別される. クエン酸鉄アンモニウム (食品添加物: ○●, 酸性塩: △▲, 塩基性塩: ▽▼), クエン酸第二鉄 (□■), クエン酸第一鉄アンモニウム (+×), 塩化第二鉄 (◎)

クエン酸鉄のほうが, 緩和効果は高い. また, 超音波照射により高濃度を溶解したものは照射しないものと比較して高い緩和効果を示した. 超音波照射による化合物の変性 (二量体から単分子への分解, クエン酸の解離など) が考えられる.

c) クエン酸鉄アンモニウムおよびクエン酸鉄とも, 人工胃液中 (pH=1.2) において水溶液におけるより約 10 倍大きい緩和効果を示した.

d) 塩化第二鉄の場合, 水溶液中と人工胃液中とで緩和効果に大きな差は認められなかった (図 3 参照). 水溶液中ではクエン酸鉄アンモニウムと塩化第二鉄の緩和効果に大きな差異が認められるが, それに比べ人工胃液中, 低濃度

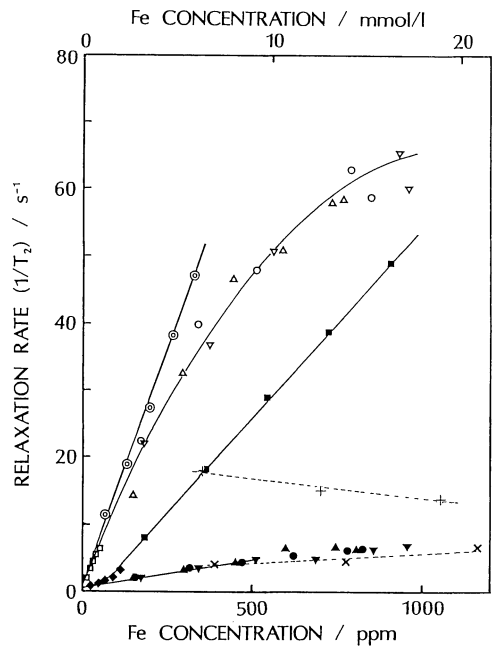


図 2. T_2 緩和速度の鉄濃度依存性

図中の記号は図 1 に準ずる.

域ではその差異は極めて小さい.

e) 緩和速度の Fe 濃度に対する直線性は水溶液試料において優れているが, 人工胃液中では鉄濃度約 500 mg/1 以上で飽和する傾向が見られた.

f) 純粋なクエン酸第一鉄ナトリウムは反磁性の化合物であるが, 空気あるいは光酸化されるために常磁性を示すと考えられる. その緩和効果には時間変動があり明確でない. 図 1 及び 2 おいて点線で示したのはこの為である. 特に人工胃液中の T_2 緩和速度の挙動は他と異なる.

g) クエン酸鉄アンモニウムは, わずかではあるが, T_2 緩和速度に対してより T_1 緩和速度に対してより効果的に作用した.

(2) 緩和効果の pH 依存性

人工胃液の希釈にともなうクエン酸鉄アンモニウム溶液の緩和速度の変化を図 3 に示す. ま

表 1. 各種鉄化合物の緩和度 ($R [s \cdot mmol / l]^{-1}$)

	水溶液		人工胃液	
	R_1	R_2	R_1	R_2
クエン酸鉄アンモニウム	0.52	0.51	6.5	5.5
クエン酸鉄	1.3	1.5	7.4	5.9
クエン酸第一鉄ナトリウム	0.36	-	-	-
Fe ³⁺ chloride	8.7	7.6	8.7	7.2
Fe ³⁺ aquo	5.5			
Mn ²⁺	6.5			

た、比較のために塩化第二鉄の場合も同じ図中に示す。クエン酸鉄アンモニウムの場合には、胃内部の酸性度が極めて高い (pH 1~2) とし T_1 , T_2 ともに強い緩和効果が得られた。pH 3 以上では、緩和速度は酸濃度にほとんど依存しない。塩化第二鉄の場合には緩和速度は大きい、その pH 依存性は小さい。

(3) 鉄濃度の定量および酸化状態の同定

図 4 に ICP 法により決定された鉄濃度と吸光

光度法により決定された鉄濃度の関係を示す。人工胃液 (強塩酸酸性溶液) に溶かされた試料の場合、両方法による定量値に大きな差異は認められなかった。しかし、水溶液試料の場合、吸光光度法による定量値はきわめて低く見積もられた。この事実は水プロトンの緩和に対して有効に作用できる鉄イオンを考慮する上で重要である。

考 察

水プロトンに対する緩和効果の点からはクエン酸鉄がクエン酸鉄アンモニウムより優れている (水溶液中で 2~3 倍, 人工胃液中で 1.1~1.2 倍)。しかし、クエン酸鉄は水に溶けるのが遅く、100 mg / l の濃度でさえ完全に溶けるまでに半日近くかかる。経口造影剤を散剤として頒布することを考えると、クエン酸鉄はふさわしくない。クエン酸第一鉄は緩和効果も弱い化合物としての均一性を欠くため望ましくない。

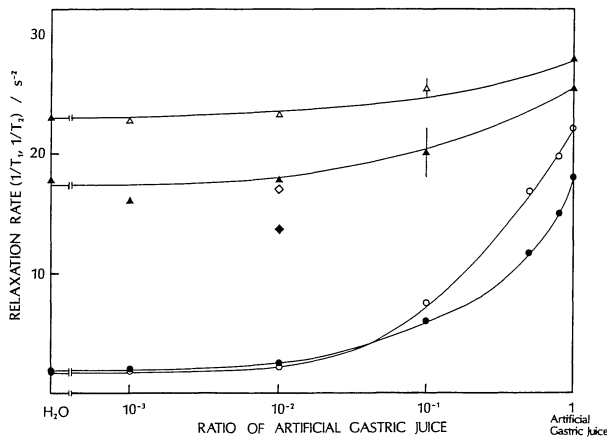


図 3. 緩和速度 (T_1 , T_2) の酸濃度依存性

溶質: クエン酸鉄アンモニウム, 塩化第二鉄 鉄濃度: 171 mgFe / l 溶媒: 人工胃液 (pH=1.2) を脱イオン蒸留水にて希釈

(クエン酸鉄アンモニウム溶液における $1/T_1$: ○, $1/T_2$: ●)

(塩化第二鉄溶液における $1/T_1$: △, $1/T_2$: ▲)

(一昼夜放置後の塩化第二鉄溶液における $1/T_1$: ◇, $1/T_2$: ◆)

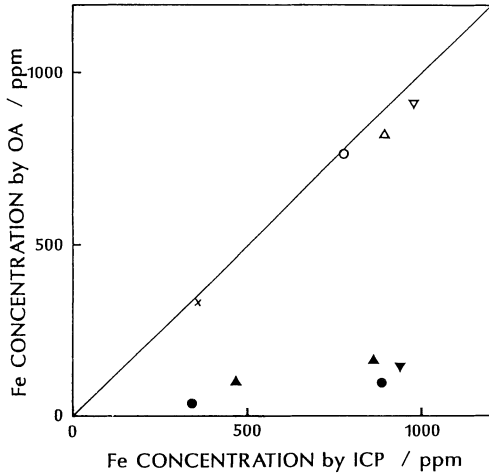


図4. ICP法と吸光光度法とによって定量された鉄濃度の相関

中空の記号は人工胃液、中黒の記号は純水における緩和速度を示す、鉄化合物の種類は次の記号で区別される。クエン酸鉄アンモニウム（食品添加物○●、酸性塩△▲、塩基性塩▽▼）クエン酸第一鉄ナトリウム（×）

したがって、クエン酸鉄アンモニウムが消化管造影剤として最適の鉄化合物と結論される。本実験においては通常MRI造影として用いる金属イオンのキレート化合物を対象外としたが、胃内では酸性、腸内ではアルカリ性の環境下に存在することを考慮すると、広いpH範囲においてキレート化合物の安定性を維持することは難しいと考えたからである。

図1, 2から明らかなように、高濃度側で緩和効果が飽和する傾向が見られる（特に人工胃液中で顕著である）。このことから胃の中の鉄濃度としては約500 mgFe/l以上投与しても無駄であり、鉄濃度に対する直線性が成立する範囲を考慮すれば胃内の実濃度として200 mgFe/l以下が適切濃度であると考えられる。

T₂緩和に対しても同程度に作用できることからこれ以上高濃度ではT₂による信号強度の低下が生じる。これはファントムによる実験で確認

された。

クエン酸第二鉄アンモニウムの酸性塩は二量体（ $(\text{NH}_3)_n\text{H}_{(5-n)}[\text{Fe}_2(\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7)_3]$, $n=0\sim 5$ ）、塩基性塩は九量体（一例として $[\text{Fe}\{\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_7(\text{FeO})_2(\text{NH}_4)_2\}_2(\text{OH}_2)_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ が主成分であると言われている。ICP法による定量は含まれている全Feの原子の数を計測するのに対し、吸光光度法による定量は還元されてオルトフェナンスロリンと錯体を形成し発色したFe原子のみを計測している。従って、純水試料の場合に後者による定量値が極めて低く見積もられたのは、多量体中の全部のFe原子が錯形成したわけではないことを意味している。一方、強酸性溶液中では酸性塩も塩基性塩も低分子へ解離が進み、単量体として存在する割合が大きくなっていると推測される。これは人工胃液中のクエン酸鉄アンモニウムの緩和能力が塩化第二鉄の緩和能力と同程度であったことも矛盾しない。

ESRおよびメスバウアースペクトルの結果はクエン酸鉄アンモニウム中の鉄原子は実験誤差内で全部Fe³⁺であった。

クエン酸鉄アンモニウムは古くから一般大衆薬、処方箋調剤薬として用いられており、また栄養剤および食餌補助剤として安全と認められる食品成分に指定されている。経口造影剤としては安全でかつ飲み易いものでなければならないが、この点においてもクエン酸鉄アンモニウムは造影剤の主成分として適当であると結論できる。

文 献

- 1) M. Laniado, W. Kornmesser, B. Hamm, et al. : MR imaging of the gastrointestinal tract : Value of Gd-DTPA. AJR, 150 : 817-821, 1988.
- 2) S. Kaminsky, M. Gogoll, M. Laniad, et al. : Gd-DTPA as a positive contrast agent in abdominal MR imaging. Abstracts 8th Soc. Med, 355, 1989
- 3) C. Tilcok, E. Unger and T. Fritz : Novel polymer-

- ic contrast agents for improved MR imaging of the GI tract. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 156, 1990
- 4) S. Kaminsky, M. Gogoll, K. Neumann, et al. : Safety and efficacy of the MR bowel contrast agent Gd-DTPA. : Evaluation in 183 patients. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 157, 1990
 - 5) G. E. Wesbey, R. C. Brasch, B. L. Engelstad, et al.: Nuclear magnetic resonance contrast enhancement study of the gastro intestinal tract of rats and a human volunteer using nontoxic oral iron solutions. Radiology, 149 : 175-180, 1983
 - 6) G. E. Wesbey, R. C. Brasch, H. I. Goldberg, et al.: Dilute oral iron solutions as gastrointestinal contrast agents for magnetic resonance imaging; Initial clinical experience. Magn Reson Imag, 3 : 57-64, 1985
 - 7) 八木和夫, 北川清秀, 山端輝男, 他 : MRI における ^{57}Fe -クエン酸塩の造影効果. 第14回日本磁気共鳴医学会大会講演抄録集, 279 1989
 - 8) K. C. P. Li, R. P. Tart, B. Strom, et al. : MRI oral contrast agents : Comparative study of five potential agents in humans. Abstracts 8th Soc Magn Reson Med, 791, 1989
 - 9) 長谷川誠, 久保田隼人, 北野園隆, 他 : 腹部MR検査のための新しい経口造影剤—緑茶とアルギン酸ナトリウム混合溶液. 日医放射学会雑誌, 50 : 79-80, 1990
 - 10) P. F. Hahn, D. D. Strark, S. Saini, et al. : Ferrite particles for bowel contrast in MR imaging : Design tissues and feasibility studies. Radiology, 164 : 37-41, 1987
 - 11) D. Kean, J. Best, L. Turnbull, et al. : Oral magnetic particles (OMP) : A new oral contrast agent for abdominal MR imaging. Abstracts 8th Soc Magn Reson Med, 790, 1989
 - 12) M. Lonnemark, A. Hemmingsson, T. Bach-Gansno : Superparamagnetic particles as an oral MR imaging contrast medium. Abstracts 8th Soc Magn Reson Med, 792, 1989
 - 13) P. A. Rinck, O. Smevik, G. Nilsen, et al. : Oral magnetic particles in abdominal and pelvic MRI. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 154, 1990
 - 14) R. Ballinger, P. Ros, R. L. Magin, et al. : Superparamagnetic iron oxide colloid for oral contrast in MRI : *In vitro* study at 1.5 T. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 155, 1990
 - 15) J. J. Listinsky and R. G. Bryant : Gastrointestinal contrast agents : A diamagnetic approach. Magn Reson Med 8 : 285-292, 1988
 - 16) A. M. Parikh and S. Mezrich : Deuterated barium sulphate as an oral MRI contrast agent. Abstracts 7th Soc Magn Reson Med, 520, 1988.
 - 17) R. Ballinger, P. Ros, R. L. Magin, et al. : Barium sulfate suspension as an oral contrast in MRI : *in vivo* optimization of pulse sequences and concentration at 1.5T. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 738, 1990
 - 18) R. F. Mattrey, P. C. Hajek, V. M. Gylys-Morin, et al. : Perfluorochemicals as gastrointestinal contrast agents for MR imaging : Preliminary studies in rats and humans. AJR 148 : 1259-1263, 1987
 - 19) 古賀けい子, 中村順二, 中村利夫, 他 : クエン酸鉄アンモニウムを主成分とした新しい経口消化管造影剤の MRI 信号強度増強効果について. 日磁日誌 10 : 114-121, 1989
 - 20) T. Watanabe, K. Koga, J. Nakamura, et al. : A new oral contrast medium for gastrointestinal, OMR : Basic research and animal MRI. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 740, 1990
 - 21) Y. Kawamura, H. Kimura, T. Shiga, et al. : Use of ferric ammonium citrate as an oral MRI contrast agent. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 741, 1990
 - 22) K. Yoshikawa, K. Ohtomo, T. Shiono, et al. : Clinical application of the oral gas-generated abdominal contrast agent contained ferric ammonium citrate for MR study-preliminary results of the phase II study in Japan. Abstracts 9th Soc Magn Reson Med, 743, 1990

Basic Research for Development of New Oral Abdominal MR Contrast Agent: Relaxation Effects of Ferric Ammonium Citrate

Tokuko WATANABE¹, Junnji NAKAMURA², Toshio NAKAMURA³,
Toshiaki IIZUKA¹

¹*Laboratory of Chemistry, Tokyo University of Marine Science
4-5-7, Konan, Minato-ku, Tokyo 108*

²*Diagnostics Div., Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd.*

³*Formulation Res. Institue, Otsuka Pharmaceutical Co.,Ltd.*

Recently, magnetic resonance examination of abdomen has been activated and relevant contrast media enhancing magnetic resonance imaging contrast between the gastrointestinal tract and its surroundings are expected. In this paper, as a basic research for developing a new oral contrast agent for gastrointestinal, relaxation rates of various iron compounds were measured in aqueous solution and artificial gastric juice.

Ferric ammonium citrate was the best paramagnetic compound among the investigated as an oral MRI contrast agent which is very safe and has enough relaxation enhancement ability to give contrast between gastrointestinal tract and surroundings.