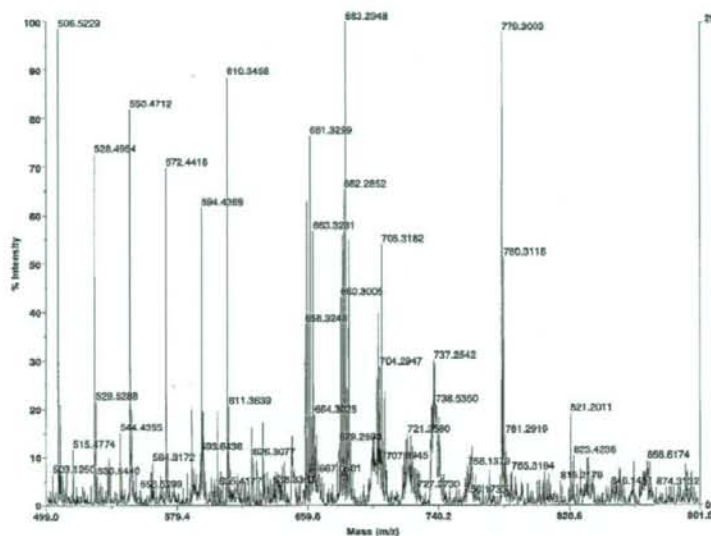


Voyager Spec #1=>BC=>AdvBC(32,0,6,0,1)>NF0.7[BP = 683.3, 2937]

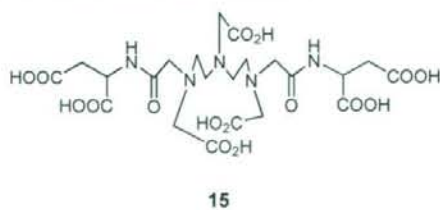


Mode of operation:	Reflector
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Negative
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	20000 V
Orbit voltage:	79%
Mirror voltage ratio:	1.12
Guide wire Q:	0.002%
Extraction delay time:	125 msec
Acquisition mass range:	500 - 800 Da
Number of laser shots:	50/spectrum
Laser intensity:	1412
Laser Rep Rate:	3.0 Hz
Calibration type:	Default
Calibration matrix:	α-Cyano-L-hydroxyisovaleric acid
Low mass gate:	500 Da
Timed ion selector:	Off
Digitizer start time:	22-4255
Bin size:	0.5 mDa
Number of data points:	15248
Vertical scale Q:	900 mV
Vertical offset:	0.50%
Input bandwidth Q:	800 kHz
Sample well:	75
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	6384
Instrument name:	Voyager-DE PRO
Phase type Namevar:	CIVVYAGER100-walk-plam.ph
Lab name:	PE Biosystems
Absolute x-position:	46601.1
Absolute y-position:	16732.4
Relative x-position:	-706.37
Relative y-position:	-95.399
Check in operation:	60
Source pressure:	1.034e-017
Mirror pressure:	4.65e-008
TIC pressure:	0.901
TIS gas width:	7
TIS light length:	688

Fig. 2-1-45 化合物 22 の MS スペクトル

Fig. 2-1-45 の MS スペクトルより 661.92 [M-H]⁻のピークを確認した。以上から化合物 22 の構造を同定した。

Gd-DTPA-Aspartic acid 23



特許出願の関係で
ここでは開示できない

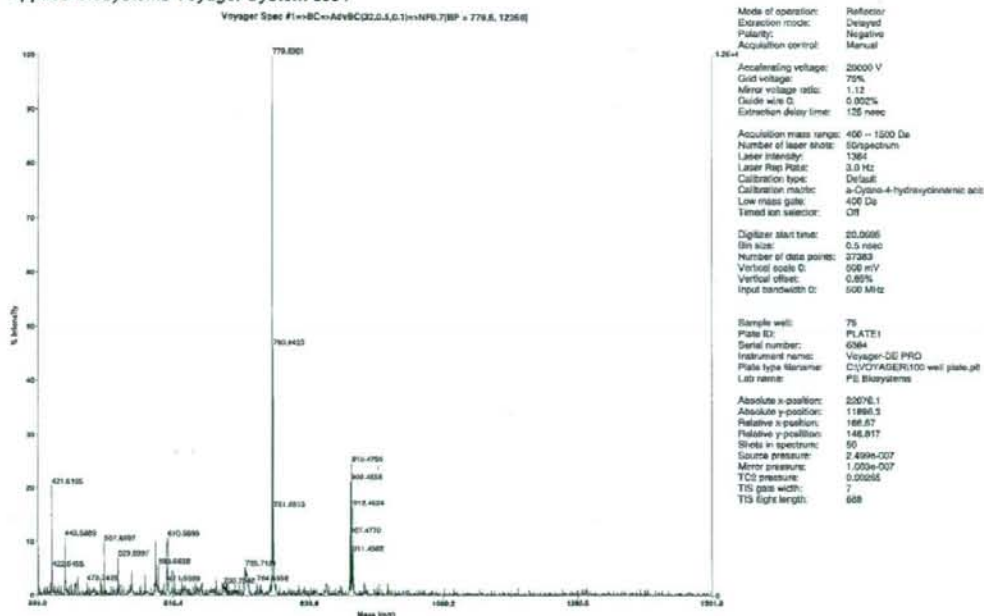
15

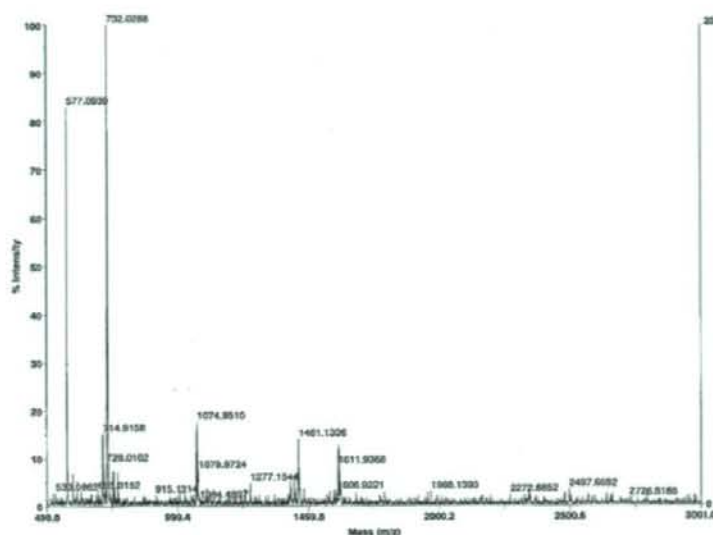
23

Scheme 2-1-24 Gd-DTPA-Aspartic acid 23

塩化ガドリニウム (III) 六水和物をガドリニウム源とし、水中、ピリジン触媒下、50°C で DTPA- Aspartic acid 15 に対してガドリニウムを 1.2 当量反応させることで Gd-DTPA-Aspartic acid 23 を収率 95%で合成した。錯体を形成していないガドリニウムは Chelex[®]100 Resin を用いて除去した。

以下に化合物 23 の MS スペクトル (Fig. 2-1-46) のデータを示す。





Mode of operation:	Reflector
Extraction mode:	Delayed
Polarity:	Positive
Acquisition control:	Manual
Accelerating voltage:	20000 V
Grid voltage:	75%
Mirror voltage ratio:	1.12
Guide wire ID:	0.0075
Extraction delay time:	120 msec
Acquisition mass range:	500 - 3000 Da
Number of laser shots:	50/spectrum
Laser intensity:	26C7
Laser flap pulse:	3.5 Hz
Calibration type:	Default
Calibration matrix:	α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid
Low mass gate:	500 Da
Timed ion selector:	Off
Digitizer start time:	22.42
Bin size:	0.5 msec
Number of data points:	64871
Vertical scale II:	300 mV
Vertical offset:	0.0%
Input bandwidth II:	500 MHz
Sample well:	37
Plate ID:	PLATE1
Serial number:	4994
Instrument name:	Voyager DE PRO
Plate type:	Esanica
Lab name:	CIV/VYAGER/100 well plate.plt FE Biosystems
Absolute x-position:	59124.6
Absolute y-position:	37184
Relative x-position:	1054.12
Relative y-position:	116.528
Shots in spectrum:	50
Source pressure:	3.810e-007
Mirror pressure:	1.522e-007
TOF pressure:	0.005132
TOF gate width:	7
TOF light length:	488

Fig. 2-1-47 化合物 24 の MS スペクトル

Fig. 2-1-47 の MS スペクトルより 732.03 $[M+H]^+$ のピークを確認した。以上から化合物 24 の構造を同定した。

2-1-2-5 合成した Gd 錯体の *in vitro* 評価

緒言でも述べたように MRI は体内に存在する水のプロトンの緩和速度を測定しコンピュータ処理することで画像化を行っている。そのため、造影剤により増強された水のプロトンの緩和時間を測定し緩和特性を調べることは、造影剤としての性能を知る重要なパラメータとなる。また、緩和時間に関して言えば MRI 造影剤は T_1 強調型造影剤および T_2 強調型造影剤の 2 種類が知られている。それぞれの造影剤は水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) あるいは横緩和時間 (T_2) を短縮させる効果を持っている⁷⁻⁹⁾。ランタノイド系金属である Gd は、従来プロトンの縦緩和時間 (T_1) の強い短縮効果を持つ造影剤であるため、合成した Gd 錯体は T_1 強調型造影剤と言える。そこで、*in vitro* における水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) を測定することにより合成した Gd 錯体の造影剤としての性能評価を試みた。

2-1-2-5-1 錯体を形成していないガドリニウムの除去

錯体を形成していないガドリニウムが緩和時間の測定に影響を及ぼさないよう合成した全ての Gd 錯体はその水溶液の pH を 7.0 に調整後、Chelex[®]100 Resin を加え 6 時間攪拌した。その後、呈色試験により錯体を形成していないガドリニウムの有無を確認した。

呈色試験の手順としてはまずサンプルチューブに微量の Gd 錯体を入れ、続けて pH

を 5.0 に調整した酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液を加えピリジンを一滴滴下した。溶液を均一にした後、キシレノールオレンジを加えた。溶液の色が赤褐色のまま変化していない場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していないことを示している。溶液の色が青紫色に変化した場合、錯体を形成していないガドリニウムが存在していることを示しているので呈色試験で色が変わらなくなるまで Chelex[®]100 Resin による除去を繰り返し行なった。

2-1-2-5-2 縦緩和時間 (T_1) の測定

合成した Gd 錯体を超純水に溶解させ卓上核磁気共鳴装置 Minispec (TD-NMR) と呼ばれる緩和時間測定器を用いて水のプロトンの縦緩和時間 (T_1) を測定した。緩和時間は温度依存性が大きく温度が上昇するほど緩和時間は長くなることが知られている。また、造影剤は体内に投与されることを考慮に入れ水溶液の温度を 37°C に固定して測定を行なった。測定誤差が極小になるよう一つの Gd 錯体につき 5 回の測定を行ない得られた値の平均を縦緩和時間 (T_1) とした。

2-1-2-5-3 Gd 濃度の測定

緩和時間は造影剤の Gd 濃度に依存しているため、ICP 発光分光分析装置を用いて緩和時間の測定に使用した水溶液の Gd 濃度を測定した。また、各水溶液の Gd 濃度を測定する際に基準となる検量線は 3 つの濃度に調整した Gd 水溶液を用いて作成した。

2-1-2-5-4 縦緩和率 (r_1) の測定

前述したように造影剤により増強された水のプロトンの緩和時間を測定し緩和特性を調べることは、造影剤としての性能を知る重要なパラメータとなる。しかし、緩和時間は造影剤の Gd 濃度に依存するため緩和時間を Gd 濃度で割った緩和率が指標として用いられている。縦緩和率 (r_1) は以下の式から求めることができる。

$$r_1 = \frac{\frac{1}{T_1} \times 1000 - r_1^{H_2O}}{[Gd^{3+}]} \quad (1)$$

r_1 ; 縦緩和率 [$s^{-1}mM^{-1}$]

T_1 ; 縦緩和時間 [ms]

$r_1^{H_2O}$; 水の縦緩和率 [$s^{-1}mM^{-1}$]

$[Gd^{3+}]$; Gd 濃度 [mM]

以下に T_1 および $[Gd^{3+}]$ の測定結果から式(1)を用いて求めた各 Gd 錯体の r_1 を表にして示す。

Table 2-1-01 水中における各 Gd 錯体の縦緩和率 (r_1)

Entry	Compound No. & Abbreviation	r_1 [$s^{-1}mM^{-1}$] (37°C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	17a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.4
3	17b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	5.8
4	18 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(4OAc)(1OH)	5.9
5	19a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.3
6	19b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	5.8
7	20 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	8.1
8	21 Gd-DTPA-Phenylalanine	5.8
9	22 Gd-DTPA-Glycine	5.5
10	23 Gd-DTPA-Aspartic acid	5.4
11	24 Gd-DTPA-2-Aminophenol	4.8

Table 2-1-01 から Entry 1 の Gd-DTPA (Magnevist) は臨床の現場において最も一般的に用いられている。そこで、各 Gd 錯体の造影剤としての性能を評価するために Gd-DTPA をスタンダードとした。

本研究で合成した全ての Gd 錯体は Gd-DTPA と比較して高い r_1 を示した。中でも Entry 7 の Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (**20**) は r_1 が $8.1 [s^{-1}mM^{-1}]$ と Gd-DTPA と比較して 2 倍以上であった。これは臨床において Gd-DTPA よりも低濃度での使用が可能であることを示唆している。欧米ではより鮮明な画像を得るために Gd-DTPA を高濃度で使用した結果、解離した Gd により NSF (Nephrogenic systemic fibrosis ; 腎性全身性線維症) という病に犯されてしまうという問題が起こっている⁴⁹⁻⁵⁵。低濃度で使用可能ということが臨床の現場で求められている条件の一つであり Entry 7 の Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (**20**) はその条件を満たした新規 MRI 造影剤となるポテンシャルを有している。

また、Entry 2, 3 および 5, 6 をそれぞれ比較したところ若干異なる r_1 を示したが、ガドリニウム源の違いではなく測定誤差によるものだと考えられる。この結果から水中における r_1 においてもガドリニウム源の違いが及ぼす影響は見られなかった。

2-1-2-5-5 血清アルブミン溶液中における縦緩和率 (r_1) の測定

現在注目されている造影剤の中に Blood Pool Agents と呼ばれるものがある。この種の造影剤は投与後に血中に存在している巨大分子であるタンパク質と結合することで緩和率を高めている。大きな分子 (ポリエチレングリコール、 dendrimer、デキストリン等) と結合した造影剤はその緩和率が向上するということが報告がなされている^{41,42,56-62}。Blood Pool Agents の一つである MS-325 (Vasovist) は血液中に最も多く存

在するタンパク質である血清アルブミンをターゲットとしている⁶³⁾。そこで、本研究で合成した各 Gd 錯体についても血清アルブミンによる緩和率の増強効果を得られるか否かを検討した。血清アルブミンは牛のものを用いて血中濃度である 37.3 g/l となるように血清アルブミン溶液を調整し、 r_1 測定は前項と同様の条件および方法で行なった。

以下に T_1 および $[Gd^{3+}]$ の測定結果から式(1)を用いて求めた各 Gd 錯体の結成アルブミン溶液中における r_1 を表にして示す。

Table 2-1-02 血清アルブミン溶液中における各 Gd 錯体の縦緩和率 (r_1)

Entry	Compound No. & Abbreviation	r_1 [$s^{-1}mM^{-1}$] (37°C)
1	Gd-DTPA (Magnevist)	3.5
2	17a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	6.9
3	17b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)	5.7
4	18 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(4OAc)(1OH)	5.6
5	19a Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.8
6	19b Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)	6.9
7	20 Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH)	7.7
8	21 Gd-DTPA-Phenylalanine	11.0
9	22 Gd-DTPA-Glycine	6.2
10	23 Gd-DTPA-Aspartic acid	10.4
11	24 Gd-DTPA-2-Aminophenol	6.2

Table 2-1-02 においても Table 1 と同様に Entry 1 の Gd-DTPA (Magnevist) をスタンダードとした。

Table 2-1-02 より本研究で合成した全ての Gd 錯体は Gd-DTPA と比較して高い r_1 を示したが、Entry 2-7 の各 Gd-DTPA 糖錯体では血清アルブミンによる緩和率の増強効果を得ることは出来なかった。ところが、Entry 8, 10 の Gd-DTPA-Phenylalanine (**21**) および Gd-DTPA-Aspartic acid (**23**) は r_1 がそれぞれ 11.0, 10.4 [$s^{-1}mM^{-1}$] と水中における r_1 と比較して 2 倍以上であった。血清アルブミンとの結合により緩和率の増強効果が得られることから、Entry 8 および 10 の Gd 錯体 **21** および **23** が Blood Pool Agents となるポテンシャルを有していると考えられる。

Blood Pool Agents である MS-325 はその末端部にフェニル基を 2 つ有した構造をしており、Entry 8 の Gd-DTPA-Phenylalanine も同じく末端部にフェニル基を有した構造をしていることからフェニル基が血清アルブミンとの結合に用いられていると考えられる。また、Entry 8, 9 の Gd 錯体 **21** および **23** は共にその末端部にカルボキシル基を有した構造をしていることからカルボシル基も血清アルブミンとの結合に用い

られていると考えられる。

また、MS-325 は 37°C の水中において r_1 が $6.6 [s^{-1}mM^{-1}]$ を示すことが報告されている⁶³⁾。Table 2-1-01 より Entry 8, 9 の Gd 錯体 **21** および **23** は 37°C の水中において r_1 がそれぞれ $5.8, 5.4 [s^{-1}mM^{-1}]$ を示し MS-325 と比較して小さい。MS-325 の血清アルブミン中における r_1 は確認できていないが、血清アルブミンにより得られる緩和率の増強効果が Gd 錯体 **21, 23** と MS-325 で違いがなければ水中と同様な結果になることも考えられる。ところが、水中においては Gd 錯体 **20** の Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) (**20**) は MS-325 と比較して高い緩和率を示す。Gd 錯体 **20** に対して **21** および **22** の有するフェニル基およびカルボキシル基を化学修飾すれば生体内においてより高い緩和率を示す可能性がある。一般的に分子量の大きい造影剤は回転相関時間 (τ_R) を減少させるために高い緩和率を示すことが知られている⁶³⁾。しかし Gd 錯体 **20** は Gd 錯体 **17, 18** よりも低分子量でありながらも高い緩和率を示している。また、Gd 錯体 **17** と **19** は糖末端の官能基がそれぞれアセチル基とヒドロキシル基となる構造であるが、Table 2-1-01, 02 より緩和率に大きな違いがないため、糖と DTPA を結ぶスペーサーの長さが Gd 錯体 **20** の高い緩和率に影響を及ぼしているのではないかと推察した。これを確認するために今後はさらにスペーサーを長くした Gd-DTPA 糖錯体を合成する必要がある。

また、Gd 錯体 **17a, 17b** および **19a, 19b** をそれぞれ比較したところ水中と同じく若干異なる r_1 を示したが、ガドリニウム源の違いではなく測定誤差によるものだと考えられる。以上の結果からガドリニウム源の違いが Gd 錯体の分子構造や r_1 に及ぼす影響はないと考えられる。

2-1-2-6 合成した Gd 錯体の *in vivo* 評価

2-5 から *in vitro* において合成した Gd 錯体は現在臨床に用いられている Gd-DTPA (Magnevist) よりも造影剤として高機能であることが示唆された。現段階において合成した Gd 錯体の実用性を評価するためにラットを用いた *in vivo* 評価を行なった。

3.0T 超伝導磁気共鳴画像撮影装置 Signa 3.0T を用いて MR 画像を撮像した。*in vivo* 評価においても *in vitro* 評価と同様に Gd-DTPA (Magnevist) をスタンダードとした (Table 2-1-01, 02)。*in vivo* 評価には Gd 錯体は *in vitro* 評価において高い緩和率を示した Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) **20** と基本骨格が同じであるために比較が容易な Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) **19** を用いた (Table 2-1-01, 02)。Gd-DTPA, Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) **19**, Gd-DTPA-HMTA-D2-4Glc(OH) **20** はそれぞれ 0.1 mmol/kg, 0.05 mmol/kg, 0.05 mmol/kg となるように生理食塩水を用いて造影剤の濃度を調整した。

in vivo 評価から Gd 錯体 **19** および **20** は共に Gd-DTPA の濃度の半分でありながらもより強いコントラストを示し、中でも Gd 錯体 **20** は非常に強いコントラストを示した。この結果は 2-1-2-5-4 で述べた Gd-DTPA と比較して低濃度での使用が可能という仮説を支持するものであり、臨床の現場で求められている条件を満たす新規 MRI 造影剤としてのポテンシャルを有していると言える。

また、この結果は糖と DTPA を結ぶスペーサーの長さが Gd 錯体 **20** の高い緩和率に

影響を及ぼしているのではないかという仮説も指示すものであり、これを確認するためにさらにスペーサーを長くした Gd-DTPA 糖錯体の合成は必要不可欠だと考えられる。

以上の結果から、本研究で合成した Gd 錯体は新規 MRI 造影剤としてのポテンシャルを有しており、これらの分子構造は更なる性能向上のための指標になると考えられる。

2-1-3 参考文献

1. 稲本一夫, 別府慎太郎, 医用放射線科学講座 放射線画像技術学 **1992**, 8, 225-226.
2. 岩井喜典, 斉藤雄督, 今里悠一, 医用画像診断装置~CT, MRI を中心として~ **1988**, 105-206.
3. 荒木力, MRI のパワーテキスト **1988**, 18-66.
4. 伊藤直樹, 柿崎大, 河西昌幸, 腎腫瘍性疾患における MRI 用造影剤ガドテル酸メグルミン (Gd-DOTA) の有用性 **1996**, 33, 145-156.
5. N. Bloembergen, E.M. Purcell and RV Pond, "Relaxation effects in nuclear magnetic resonance absorption", *Phys. Rev.*, **1948**, 73, 679-712.
6. I. Solomon, "Relaxation process in a system of two spins", *Phys. Rev.*, **1955**, 99, 559-565.
7. R. A. Wallace, J. P. Harr, Jr., D. B. Miller, S. R. Woulfe, J. A. Polta, K. P. Galen, M. R. Hynes and K. Adyanli, *Magnetic Resonance Medicine*, **1998**, 40 (5), 733-739.
8. R. B. Lauffer, A. C. Vincent, and T. J. Meade, *J. Phys. Chem.B*, **1989**, 7, 109.
9. 谷本伸弘, *Innervision*, **1997**, 62-67.
10. R. N. Muller, D. M. Grand and R. K. Harris (Ed.), Chichester, *Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance*, **1995**, 1438-1444.
11. 片山仁, 山口昂一, 造影剤マニュアル **1991**, 85-100.
12. G. Elizongo, C. Fretz, and D. Stark, "Preclinical evaluation of MnDPDP ; New paramagnetic hepatobiliary contrast agent for MR imaging.", *Radiology*, **1991**, 178, 73-.
13. G. Bongartz, "Imaging in the time of NFD/NSF: do we have to change our routines concerning renal insufficiency?", *Magn. Reson.Mater. Phy.*, **2007**, 20, 57-62.
14. J. Varadarajan, S. Crofts, and J. Carvalho, *Invest. Radiol.*, **1994**, 29 (2), 18.
15. Z. Ren, W. Jie, and W. Lu, *Chem. Res. Chin. Univ.* **1997**, 13 (2), 150-.
16. T. J. Caulfield, P. Guo, C. R. Illing, K. E. Kellar, E. Lirersidge, J. Shen, J. Wellons, D. Ladd, N. Peltien and J. L. Toner, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. **1995**, 5 (15), 1657-1662.
17. E. C. Wiener, F. P. Auteri, J. W. Chen, M. W. Brechbiel, O. A. Gansow, D. S. Schneider, R. L. Belford, R. B. Clarkson and P. C. Lanterbur, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 7774-7782.
18. H. Lammers and D. Pubanz, *Inorg. Chem.* **1997**, 36, 2527-.
19. M. Saeed, M. F. Wendland, M. Engelbrecht, and H. Sakuma, *Eur. Radiol.* **1998**, 8, 1047-
20. L. Lattuada, and G. Lux, *Tetrahedron Letters*. **2003**, 11, 3359-3366.
21. S. Rast, E. Belorizky, P. H. Fries, and J. P. Travers, *J. Phys. Chem. B* **2001**, 1978-1983.
22. J. Feng, G. Sun, F. Pei, and M. Liu, *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2003**, 11, 3359-3366.
23. H. Nemoto, J. Cai, H. Nakamura, M. Fujiwara, and Y. Yamamoto, *J. Organometallic Chemistry*, **1999**, 581, 170-175.

24. M. Tamura, Y. Urano, K. Kikuchi, T. Higuchi, M. Hirobe, and T. Nagano, *J. Organometallic Chemistry* **2000**, 611, 586-592.
25. S. W. Annie Bligh, Anwar H. M. S. Chowdhury, D. Kennedy, C. Luchinat, and G Parigi, *Magnetic Resonance in Medicine* **1999**, 41, 767-773.
26. 山岸登, アクティブ・ターゲッティング DDS ナノ粒子の開発, 化学と工業, **2005**, 58-3, 262-264.
27. C. P. Stowell and Y. C. Lee, *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **1980**, 37, 225-.
28. H. Sato, 89th Annual Meeting of American Association for Cancer Research 講演集要旨 **1998**, 6.
29. R. X. Zhuo, Y. J. Fu, and J. Liao, *Chinese Chemical Letters* **1997**, 8 (2), 157-160.
30. 金尾義治, 中野貴透, 田中哲郎, 玉木玲子, 岩瀬宏樹, 山口泰典, 薬剤学 **2000**, 60 (3), 183-195.
31. F. Yan-jun and Z. Ren-xi, *Chemical Research in Chinese Universities* **1997**, 13 (4), 336-343.
32. G. Banerjee, G. Nandi, S. B. Mahato, A. Pakrashi, and M. K. Basu, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **1996**, 38, 145-150.
33. J. Shinha, N. Das, and M. K. Basu, *J. Surface Sci. Technol* **2000**, 16 (1), 200-209.
34. 真柴田篤, 戸辺成, 小林明, 人口臓器 **1989**, 1261-1264.
35. B. Raduchel, H. Schmitt-Willich, and J. Platzek, *Polm. Mater. Sci. Eng.* **1998**, 79, 516-.
36. M. Nishikawa, H. Hirabayashi, Y. Takakura, and M. Hashida, *Pharmaceutical Research*. **1995**, 12 (2), 209-.
37. M. Takahashi, Y. Hara, K. Aoshima, H. Kurihara, T. Oshikawa and M. Yamashita, *Tetrahydron Letters* **2000**, 41, 8485-8488.
38. 小川圭介, 平成 19 年度静岡大学理工学研究科修士論文, **2007**.
39. 水野紗耶香, 平成 19 年度静岡大学工学部卒業論文, **2008**.
40. 小川悠子, 平成 17 年度静岡大学工学部卒業論文, **2006**.
41. C. F. Joseph, H. Regeling, B. Zwanenburg and G. J. F. Chittenden, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6910.
42. H. Kobayashi, S. Kawamoto, T. Saga, N. Sato, T. Ishimori, J. Konishi, K. Ono, K. Togashi, *M. W. Bioconjug. Chem.* **2001**, 12, 587-593.
43. H. Kobayashi, S. Kawamoto, S. K. Jo, H. L. Bryant Jr., M. W. Brechbiel R.A. Star, *Bioconjug. Chem.* **2003**, 14, 388-394.
44. 青木峻, 平成 18 年度静岡大学工学部卒業論文, **2007**.
45. N. Ardoin, D. Astaruc, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1995**, 135, 875.
46. N. Jayaraman and J. F. Stoddart, *Tetrahedron. Lett.* **1997**, 38, 6767-.
47. 泉屋信夫, 加藤哲夫, 青柳東彦, 脇道典, ペプチド合成の基礎と実験 **1985**, 119-120.
48. C. C. Joseph, H. Regeling, B. Zwanenburg and G. J. F. Chittenden, *Tetrahedron* **2002**, 58, 6910.
49. T. Grobner, "a specific trigger for the development of nephrogenic fibrosing dermopathy and nephrogenic systemic fibrosis?", *Nephrol. Dial. Transplant.*, **2006**, 21, 1104-1108.

50. A. Khurana, et al., "a review of 6 cases temporally related to Gadodiamide injection (Omniscan)", *Invest. Radiol.*, **2007**, *42*, 139-145.
51. P. Marckmann, "suspected causative role of Gadodiamide used for contrast-enhanced magnetic resonance imaging", *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2006**, *17*, 2359-2362.
52. JG. Pryor, et al., "a clinicopathologic study of six cases", *J. Am. Acad. Dermatol.*, **2007**, Apr 3 [published online].
53. A. Deo, M. Fogel and E. Cowper, "a population study examining the relationship of disease development to Gadolinium exposure", *Clin. J. Am. Nephrol.*, **2007**, *2*, 264-267.
54. AS. Boyd, JA. Zic and JL. Abraham, "Gadolinium deposition in nephrogenic fibrosing dermopathy", *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 27-30.
55. WA. High, et al., "Gadolinium is detectable within the tissue of patients with nephrogenic systemic fibrosis", *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 21-26.
56. T. S. Desser, D. L. Rubin, H. H. Muller, F. Qing, S. Khodor, G. Zanazzi, S. W. Young, D. L. Ladd, J. A. Welloms, K. E. Kellar, J. L. Toner, *J. Magn. Reson. Imaging* **1994**, *4*, 467-472.
57. D. M. J. Doble, M. Botta, J. Wang, S. Aime, A. Barge, K. N., *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 10758-10759.
58. S. Langereis, Q. G. Lussanet, M. H. P. Genderen, W. H. Backes, E. W. Meijer, *Macromolecules* **2004**, *37*, 3084-3091.
59. V. J. Venditto, C. Aida, M. W. Brechbiel, *Mol. Pharmacol.* **2005**, *2*, 302-311.
60. R. Arebizak, M. Schaffer, E. Dellacherie, *Bioconjug. Chem.* **1997**, *8*, 605-610.
61. C. Corot, M. Schaffer, S. Beaute, P. Bourrinet, S. Zehaf, V. Benize, M. Sabatou, D. Meyer, *Physical. Acta Radiol.* **1997**, *38* (Supplement 412), 605-610.
62. M. V. Knopp, S. O. Shoenberg, C. Rehm, and F. Floemer, *Investigative Radiology.* **2002**, *37* (12), 706-715.
63. Peter Caravan, Jeffrey J. Ellison, Thomas J. McMurry, and Randall B. Lauffer, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2293-2352.

2-2 糖デンドリマー・各種 Gd-DTPA デンドリマー合成

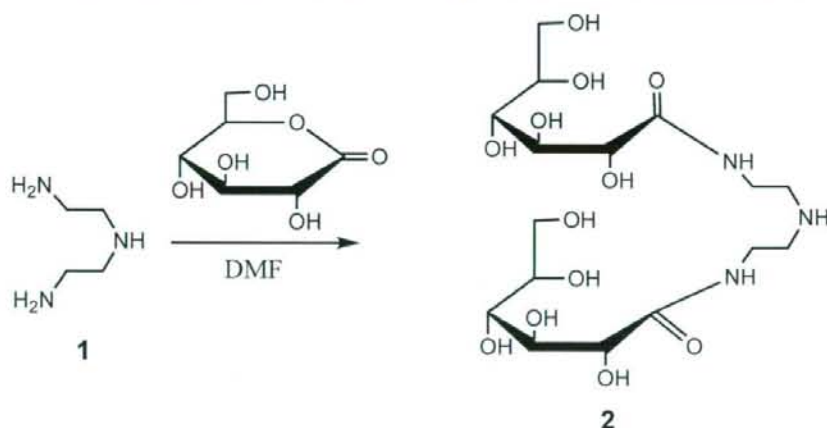
2-2-1 糖デンドリマー

2-2-1-1 末端 (Terminal) 部の合成

本研究では末端部の合成は、まずジエチレントリアミンとグルコノラクトンを出発物質として行った。また、デンドリマー合成の段階において糖のヒドロキシル基による反応の複雑化を抑制するため、遊離のヒドロキシル基をパーアセチル保護した。末端部の合成に必要とした全4ステップすべてが高収率で進み、全収率は71%であった。また、同様の方法にて、出発物質をガラクトース、マンノース、ラクトース由来のラクトン体として、異なる糖にデンドリマー末端部を合成した。それぞれの糖に対する末端部の全収率は62%、62%、50%であった。

(1) ジグリコシルアミン 2 の合成

DMF 中室温でジエチレントリアミン(1)1当量に対してD-(+)-グルコノ-1,5-ラクトンを2当量反応させることによって、化合物 2 を収率 96%で得た。この場合には反応が進行すると、化合物 2 は DMF 中から結晶として析出するので精製が容易であった。



Scheme 2-2-01

化合物 2 の構造は¹H-NMR スペクトルでアミドプロトンの存在を確認し、さらに¹³C-NMR スペクトルで糖の4種類のメチン炭素、1種類のメチレン炭素の存在を確認することにより同定した (Fig. 2-2-01)。

通常のデンドリマー合成において、分子の中間に位置するブランチを合成する途中の段階では基質の片方の反応部位を保護することによって反応箇所を制御していく方法が主流である。今後続くデンドリマー合成においては糖のヒドロキシル基のパーアセチル化が必要であるが、Scheme 2-2-01 に示したジエチレントリアミンの第一級アミンに対する選択的アミド化反応は不必要な反応点における保護・脱保護の過程を省略することができるため、一般的なデンドリマー合成において非常に利用価値の高い反応である。

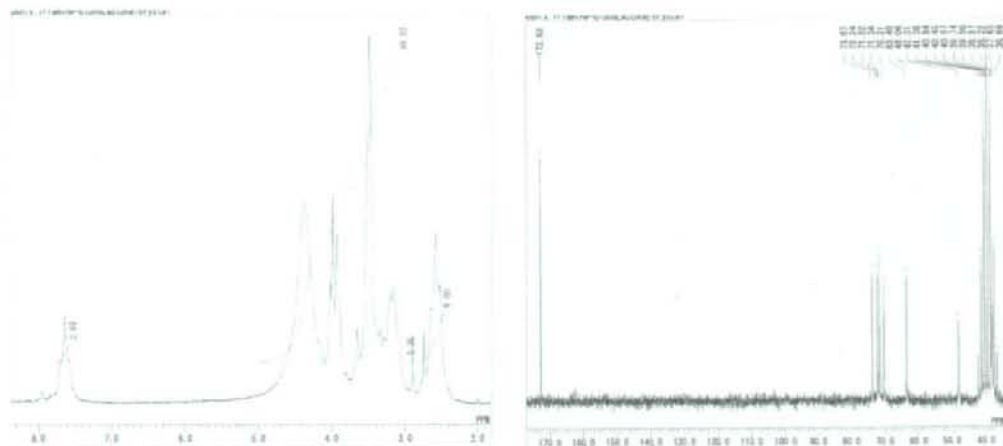
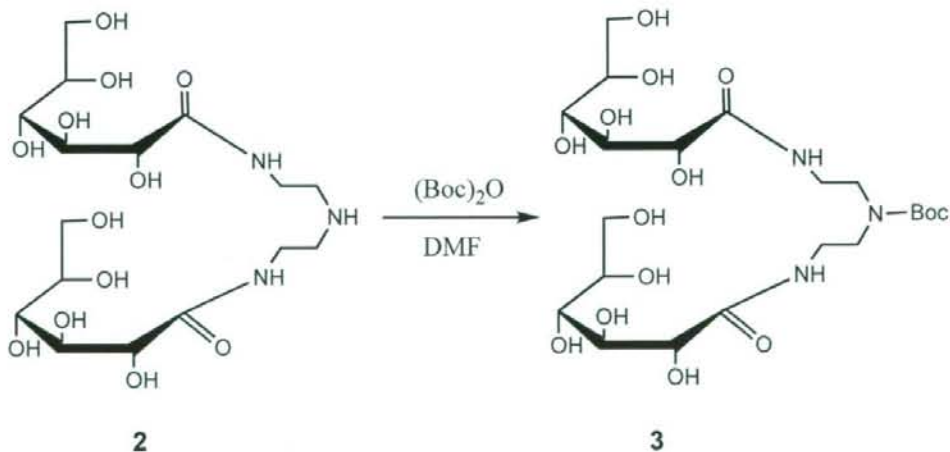


Fig. 2-2-01 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ for compound 2

(2) ジグリコシルアミン 2 の Boc 化およびヒドロキシル基のアセチル化 (化合物 3 の合成)

ジグリコシルアミン 2 を DMF 中で二炭酸ジ-*t*-ブチルと室温で反応させ、終了後、トリエチルアミンを加え、さらに無水酢酸を当量加えることで化合物 3 を収率 85% で合成した。以前の研究では化合物 2 を精製した後、ヒドロキシル基をアセチル化して化合物 3 を得ていたが、化合物 2 の反応系に無水酢酸、トリエチルアミンを加え精製した後でも化合物 3 が高収率で得られたため、化合物 2 を取り出さずに反応を行うことにした。



Scheme 2-2-02

化合物 3 の $^1\text{H-NMR}$ スペクトルで出現したアセチルのプロトン数と他のメチン、及びメチレンのプロトン数を比較することで構造の同定を行った (Fig. 2-2-02)。

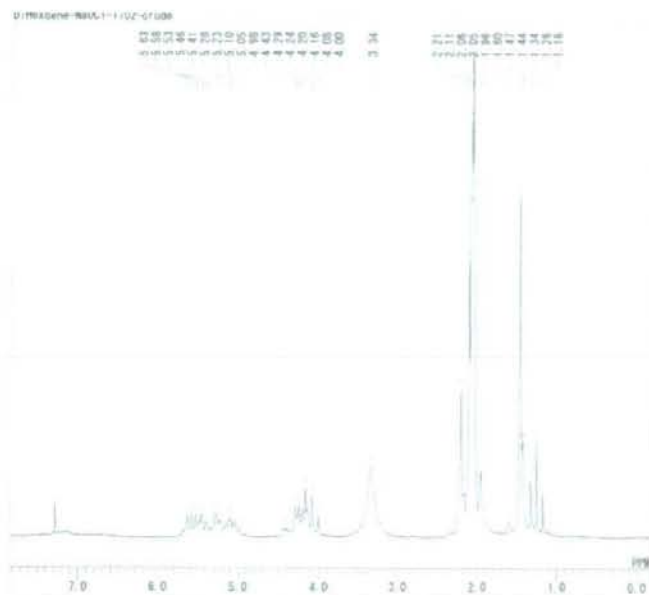
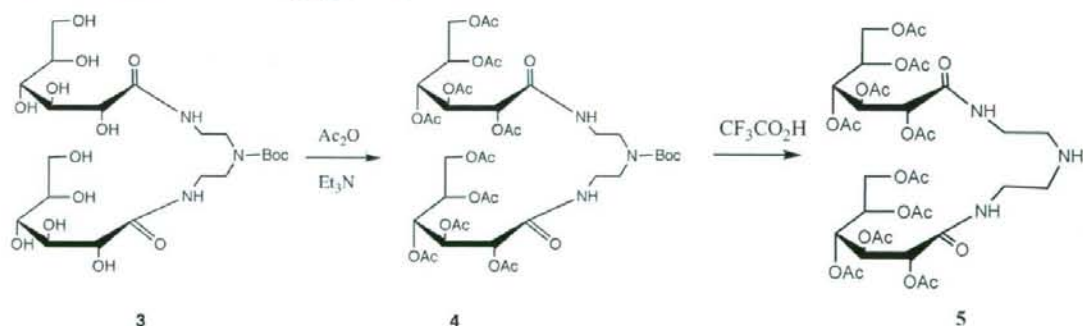


Fig. 2-2-02 $^1\text{H-NMR}$ for compound 3

(3) 化合物 3 のアセチル化 (化合物 4 の合成) および 4 の脱 Boc 化 (化合物 5 の合成)

Boc 化した化合物 3 を無水酢酸中、トリエチルアミンの共存させながら全ての OH 基のアセチル保護を行い、化合物 4 を合成した。一般に Boc 基の脱保護は酸性条件下で行われることが知られている。ここでは反応させる化合物 4 のアセチル基が外れない程度の強さの有機酸であるトリフルオロ酢酸を用いることで Boc 基の選択的脱保護を行った。化合物 5 の収率は 87%であった。

化合物 5 の構造の同定は $^1\text{H-NMR}$ スペクトルにおいて Boc 基のメチルプロトンのピークが消滅したことから確認した。



Scheme 2-2-03

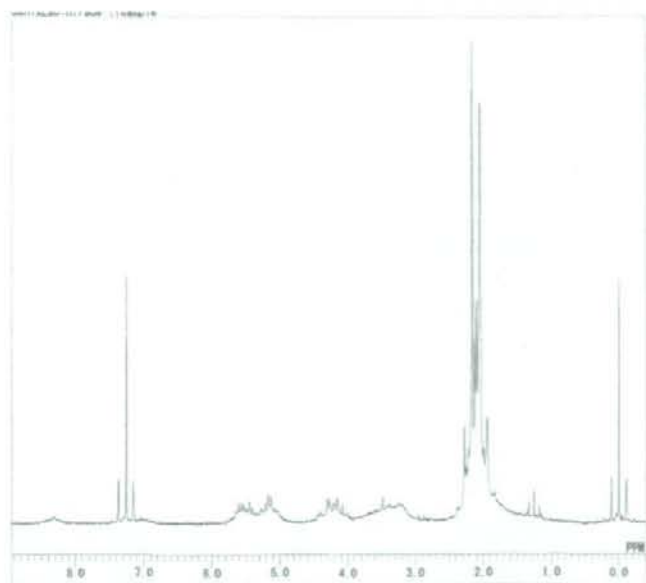
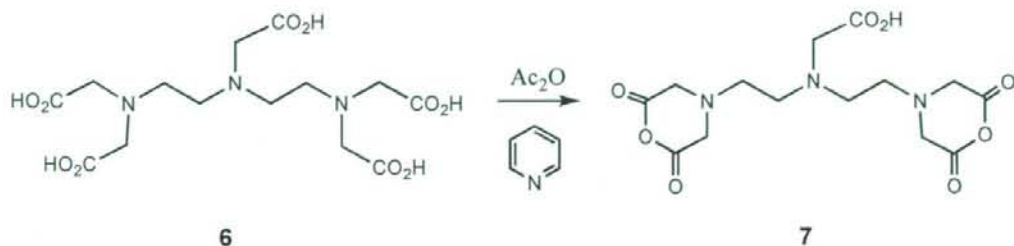


Fig. 2-2-03 $^1\text{H-NMR}$ for compound 4

(4) DTPA 誘導体及びデンドリマーの合成

DTPA をデンドリマー化する際に、まず DTPA を脱水させることにより反応点の 4 個のカルボキシル基を活性化させて二無水物とし、反応点でないカルボキシル基を相対的に不活性化するために DTPA-二無水物を合成する方法をとった。DTPA-二無水物は DTPA (6) をピリジン中、 65°C で無水酢酸と反応させることで得ることができると報告されている。本研究でも、この合成方法と同様の方法で DTPA-二無水物 (7) を収率 90% で合成した。

DTPA-二無水物の $^{13}\text{C-NMR}$ スペクトルを Fig. 2-2-04 に掲げる。 $^{13}\text{C-NMR}$ において、55.3ppm に現れていた DTPA のカルボン酸の α 位のメチレン炭素ピークが減少し、そのピークより少し高磁場の 52.5ppm に対応する無水物由来のメチレン炭素のピークが現れた。また IR より、DTPA が環を形成し、ラクトン体となっていることを支持する 1820cm^{-1} にピークが出ていたことから、DTPA-二無水物の構造の同定を行った。



Scheme 2-2-04

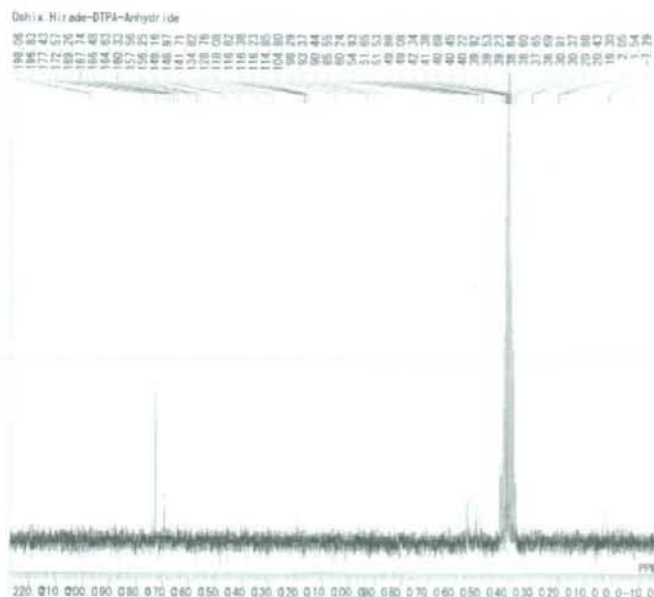
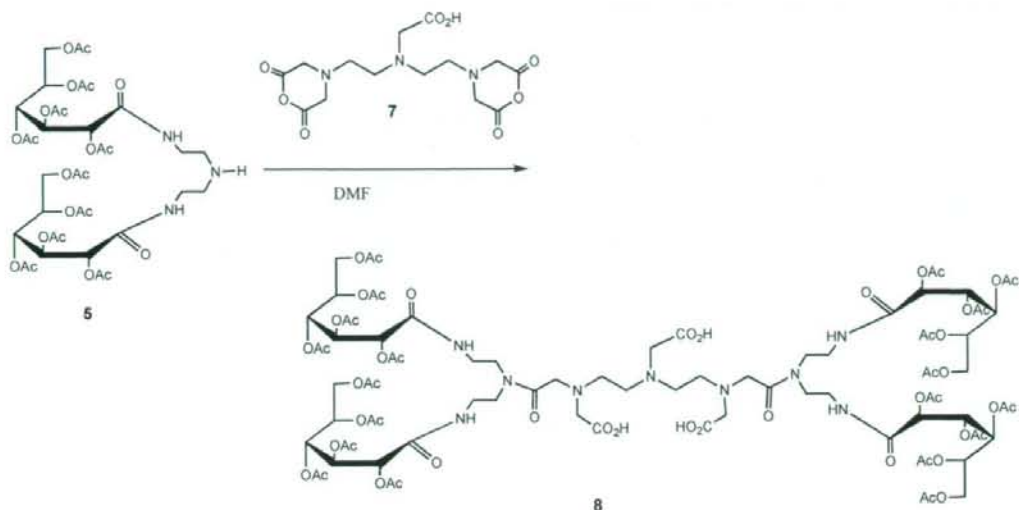


Fig. 2-2-04 ^{13}C -NMR for compound 7

(5) DTPA-D1-Glc(OAc)の合成

合成した DTPA-二無水物 **7** と 2 当量の化合物 **5** を DMF 中、室温で反応させることで、DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) **8** を収率 73% で合成した。この DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) はイソプロパノール中から再結晶して得られることができるため精製が容易であった。

DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) **8** の ^1H -NMR スペクトルを Fig. 2-2-05 に掲げる。Fig. 2-2-05 においてコア部の DTPA 由来のプロトンは 3.2-3.6ppm に現れる。この同じケミカルシフト領域には末端の糖由来のメチレンプロトンが現れるが、スペクトル全体におけるプロトン比を考慮することでデンドリマーコア部の存在を確認することができ、DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) **8** の生成が示唆された。



Scheme 2-2-05

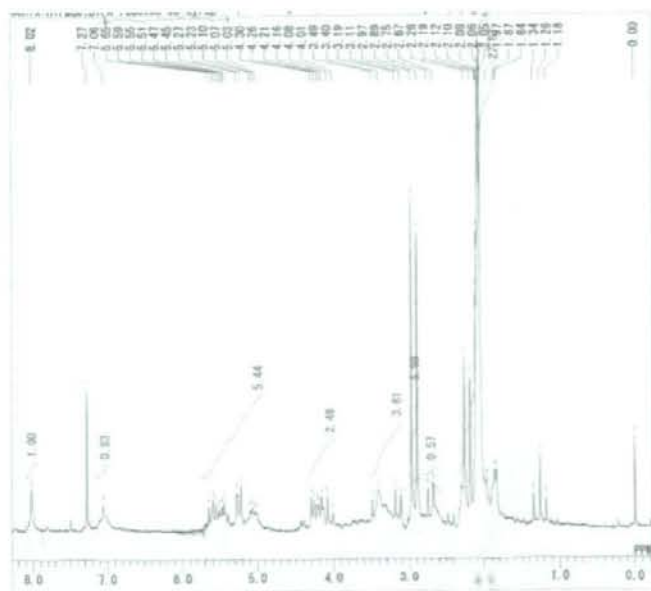
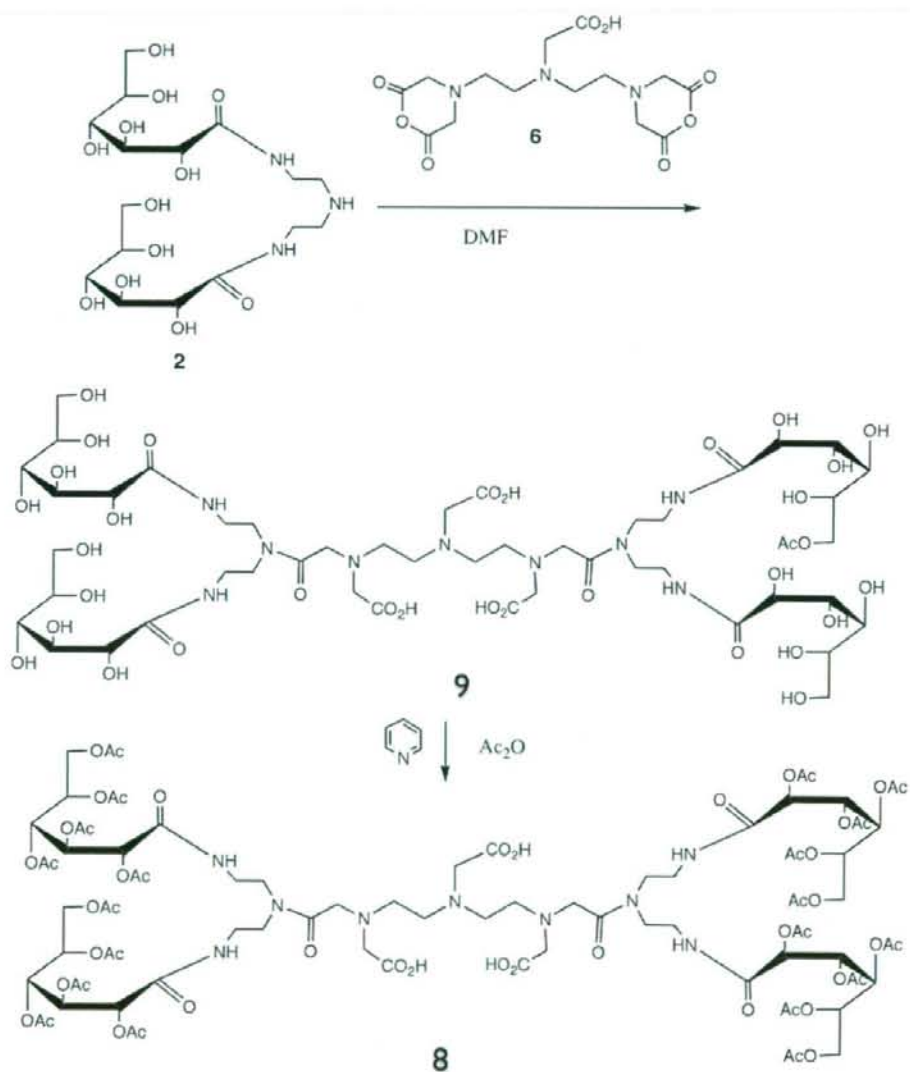


Fig. 2-2-05 $^1\text{H-NMR}$ for compound **8**

さらにコアの存在を明確にする為に DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) の 3 つのカルボキシル基についてメチルエステル化を試みた。合成方法としては、糖のヒドロキシル基を保護しているアセチル基が外れたり、糖自体が壊れたりしないように、酸触媒を用いないメチルエステル化反応を検討した。中性条件化でメチルエステル化を行う際にしばしばトリメチルシリルジアンゾメタン (TMSCHN₂) が用いられる。本研究でもこの合成方法を適用した。メタノール中で DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) とト

リメチルシリルジアゾメタンを反応させ、DTPA デンドリマー (DTPA-D1-Glc(OAc)) の 3 つのカルボキシル基がメチルエステル化された DTPA デンドリマーを収率 69%で合成した。

一方、前述の化合物 **8** を標的分子とする合成法の欠点として、反応経路が多段階に渡ることである。この改良として Scheme 2-2-06 に示すように、二段階で標的分子を合成する試みを実施した。化合物 **9** は結晶性物質として定量的に生成した。さらに、NMR 測定するために化合物 **9** をアセチル化することによって化合物 **8** の合成を試みた。しかしながら、全ての OH 基がアセチル保護することが困難であった。



Scheme 2-2-06

2-2-2 各種 Gd-DTPA デンドリマーの合成

Gd-DTPA のガドリニウム源として塩化ガドリニウム(Ⅲ)を利用した合成方法が報告されている。ここでもその方法を適用した。水中で DTPA デンドリマー(Gd-DTPA-Glc, Gal, Man, Lac(OAc))をと塩化ガドリニウム(Ⅲ)を 95℃で反応させ、GD-DTPA デンドリマー(Gd-DTPA-Glc, Gal, Man, Lac(OAc))をそれぞれ収率 96%, 90%, 93%, 及び 88%で得た。

2-2-2-1 末端(Terminal)部の合成

(1) ジグリコシルアミン 2 の合成

ジエチレントリアミン(2.04g, 19.8mmol)を DMF(50ml)に溶かし、室温で攪拌しながら D-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン(7.05g, 39.6mmol)を少しずつ加えた。6 時間室温で攪拌した後冷保存し、析出した結晶をろ過し、乾燥させて無色結晶のジグリコシルアミン 1(8.77g, 19.0mmol)を収率 96%で得た。

(2) ジグリコシルアミン 2 の Boc 化およびヒドロキシル基のアセチル化(化合物 4 の合成)

ジグリコシルアミン 2(4.23g, 9.21mmol)を DMF(20ml)中に溶解させ、その溶液に二炭酸ジ-t-ブチル(2.01g, 9.21mmol)DMF 溶液(10ml)を氷水浴中で滴下した。その後、室温で 1 日間攪拌した。反応終了後、トリエチルアミン(10ml)を加え、さらに無水酢酸(9.40g, 92.1mmol)を氷水浴中で加え室温で 2 日間攪拌した。反応終了後、水(20ml)を入れ攪拌し、さらに酢酸エチル(50ml)と飽和炭酸ナトリウム(1g)を加え抽出した。水相を酢酸エチル(30ml)で再度抽出し、飽和炭酸塩水(50ml)で 3 回洗浄した。最後に無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過してから減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(展開液クロロホルム:メタノール=20:1)で単離精製することによりアセチル化された無色結晶の化合物 4(7.67g, 7.83mmol)を収率 85%で得た。

(3) 化合物 4 の脱 Boc 化(化合物 5 の合成)

化合物 4(8.42g, 8.59mmol)をジクロロメタン(5ml)に溶かし、溶液を攪拌しながらトリフルオロ酢酸(7ml, 94.2mmol)を室温で少しずつ加え、その後、室温で 1 時間 30 分攪拌した。反応終了後、減圧下で溶媒を除去してから残渣を酢酸エチル(100ml)に溶かし、その溶液を飽和炭酸水素ナトリウム(50ml)で洗浄し、次に水(50ml)で洗浄した。最後に無水硫酸ナトリウムで乾燥させ、ろ過した後、減圧下で溶媒を除去し、残渣をシリカゲルクロマトグラフィー(展開溶媒クロロホルム:メタノール=15:1)で単離精製することで無色結晶の化合物 5(6.58g, 7.47mmol)を収率 87%で得た。

2-3 Synthesis of Gd-DTPA-HMTA-A-2Glc(OH) and Gd-DTPA-E

Introduction: Magnetic Resonance Imaging (MRI), at present, is a well established safe and effective imaging technique in clinical diagnosis [1]. Use of some contrast agents (CA) effectively increases the contrast efficiency. Therefore sheer investigation of these contrast agents is more essential. Among these contrast agents stable, water soluble gadolinium (III) complexes have the ideal properties such as higher water relaxivity, chemical stability and low toxicity [2]. Presently Gd-Dota, Gd-Dtpa-BMA, Gd-HP-DO3A, Gd-DTPA-BMEA and Gd-DO3A-Butriol are using as standard contrast agents for clinical practice [3]. Though these candidates are using widely for the clinical practice yet they didn't fulfill their role. So it is very necessary to design new candidates of this family in order to overcome the drawbacks of the existing agents. To be a good candidate of this class, CA should have considerably high molecular weight [4], rigid structure, which can restrict the fast rotation of the molecule and consequently offer slow tumbling motion [5-10]. More over the presence of hydrophilic groups in these molecules increase their water solubility and the presence of hydroxyl and amino groups can easily recognize the protein molecules *in vivo* and can adhere to them strongly.

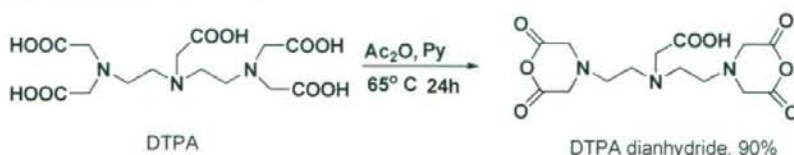
In response to the above conclusion we have rationally designed two novel contrast agents exhibiting high relaxivity values when compared to the existing standards

Result and Discussion

In my experiment, the new asymmetric Gd-DTPA-HMTA-A-2Glc(OH) was synthesized by the reaction of DTPA di-anhydride and C₆ ligand which was prepared from D-Glucono-1,5-Lactone and hexamethylene triamine followed by Boc protection of secondary amine and protection of all glycoside hydroxyl groups and deprotection of Boc.

2-3-1 Synthesis of DTPA dianhydride

DTPA dianhydride was prepared according to the previously established procedure [11]. DTPA was added to a mixture of acetic anhydride and pyridine and stirred thoroughly over a period of 24hrs at 65°C under inert conditions. After the completion of reaction mixture was filtered and washed thoroughly with acetic anhydride and acetonitrile. This was dried over sufficient period of time under vacuum and the yield of the product was 90%. Scheme 2-3-1 depicted the preparation route of DTPA dianhydride.



Scheme 2-3-01 Synthesis of DTPA di-anhydride