

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 2-6-02 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 2-6-02 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 2-6-02 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 $6.6 [\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}]$ を示すことが報告されている⁶³⁾。Table 2-6-01 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 $[\text{s}^{-1}\text{mM}^{-1}]$ 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 2-6-01, 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。

2-6-2-6 合成した Gd 錯体の *in vivo* 評価

2-6-2-5 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 2-6-01, 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 2-6-01, 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 2-6-2-5-4 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。

2-6-3 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, 山口昴一, 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. 山崎登, アクティブ・ターゲティング 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, *薬剂学* **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. 真栄田篤, 戸辺成, 小林明, *人口臓器* **1989**, 1261-1264.
35. B. Raduchel, H. Schmitt-Willich, and J. Platzek, *Polym. 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, *Tetrahedron 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創業論文, **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.

2-7 糖デンドリマー・各種 Gd-DTPA デンドリマー合成

押川 達夫

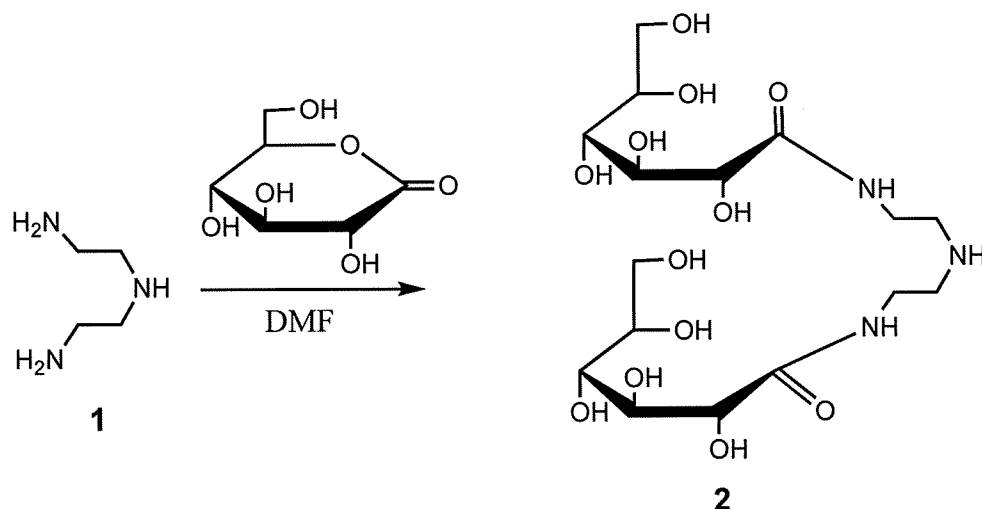
2-7-1 糖デンドリマー

2-7-1-1 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톤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톤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톤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 2-7-01

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. 2-7-01)。

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 2-7-01 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。

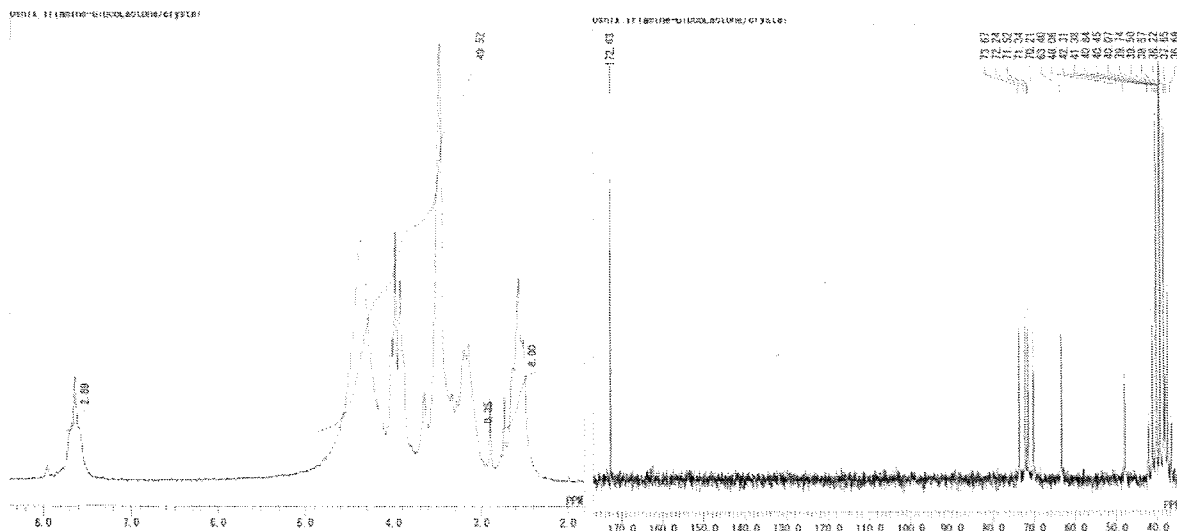
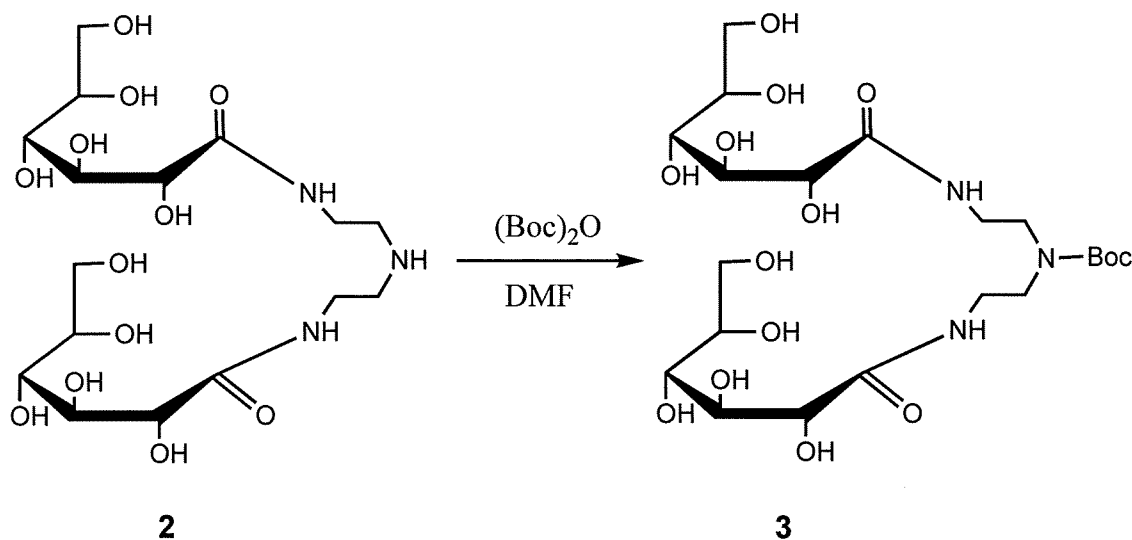


Fig. 2-7-01 $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ for compound **2**

(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 2-7-02

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. 2-7-02)。

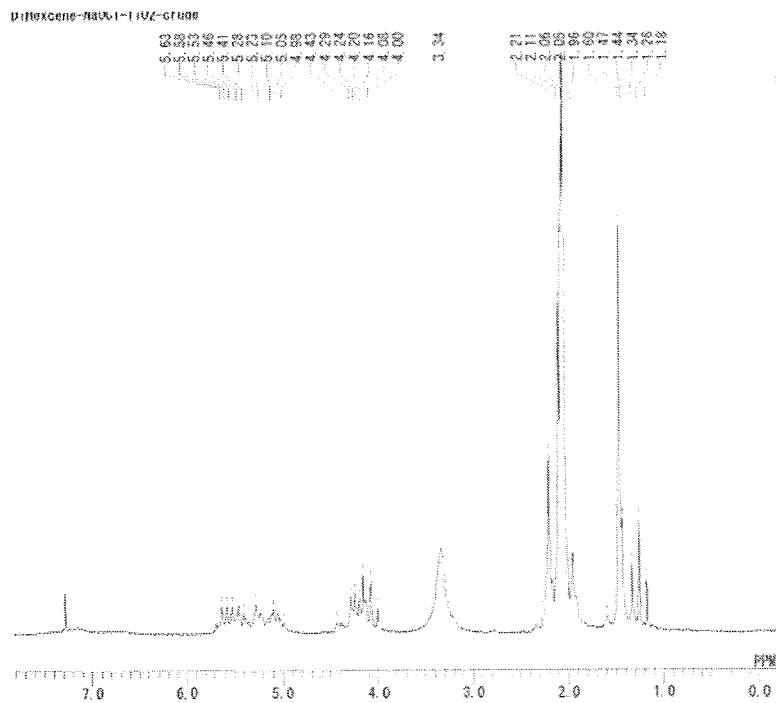
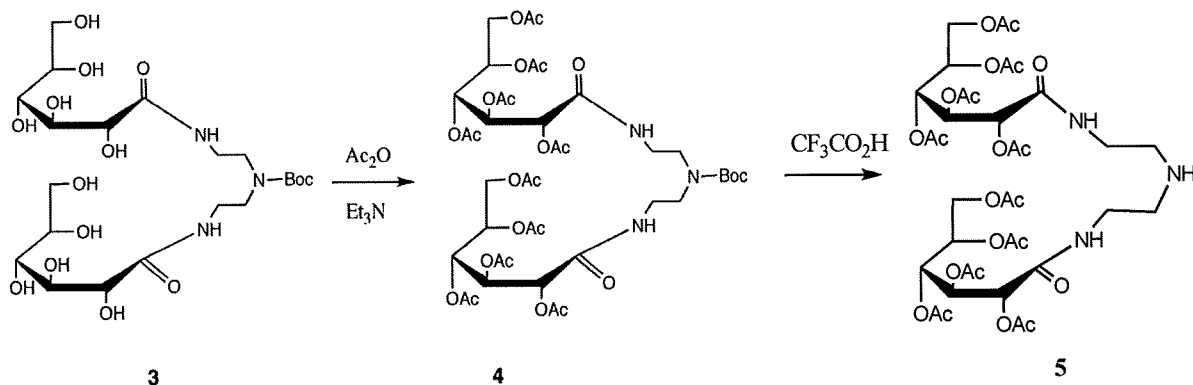


Fig. 2-7-02 $^1\text{H-NMR}$ for compound 3

(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、トリエチルアミンを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 2-7-03

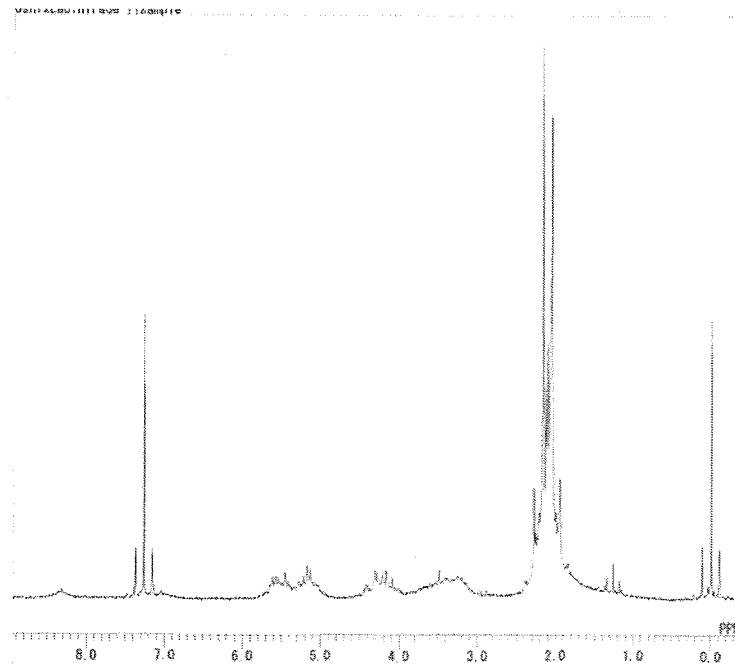
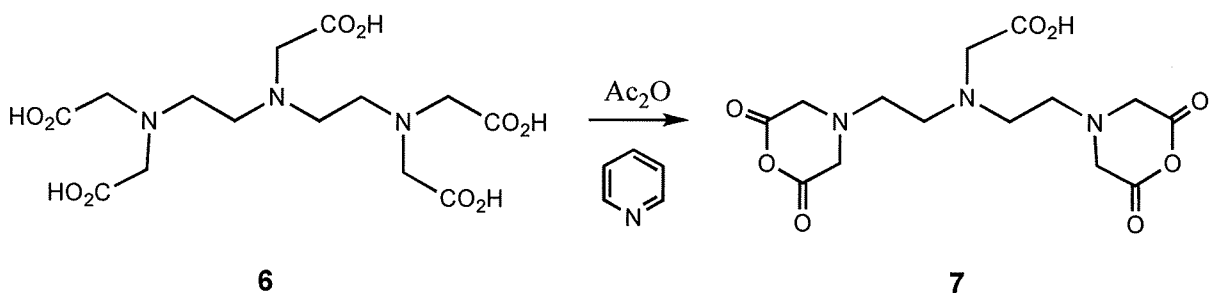


Fig. 2-7-03 $^1\text{H-NMR}$ for compound 4

(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. 2-7-04 に掲げる。 $^{13}\text{C-NMR}$ において、55.3 ppm 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 52.5 ppm 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 1820 cm^{-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 2-7-04

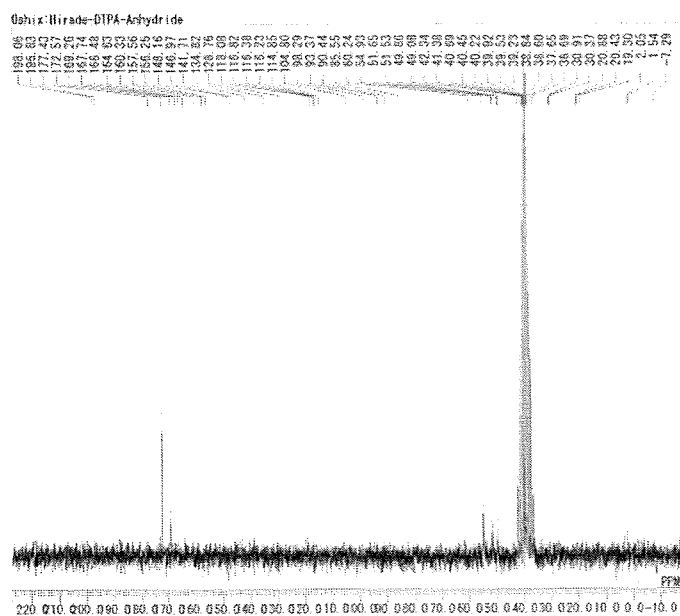


Fig. 2-7-04 ^{13}C -NMR for compound 7

(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. 2-7-05 に掲げる。Fig. 2-7-05 においてコア部の DTPA 由来のプロトンは 3.2-3.6 ppm 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。

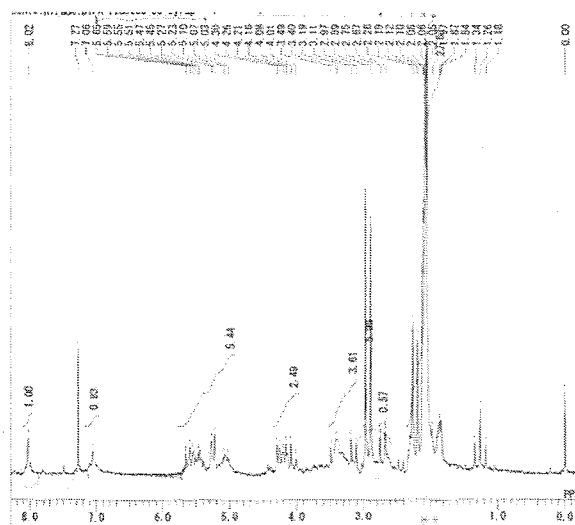
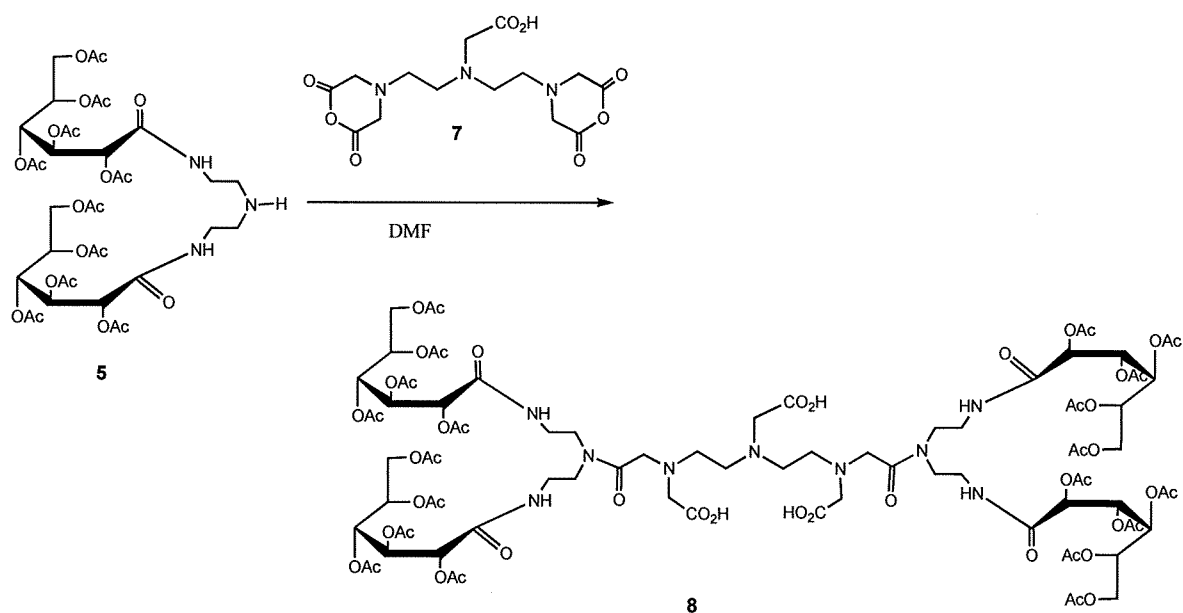
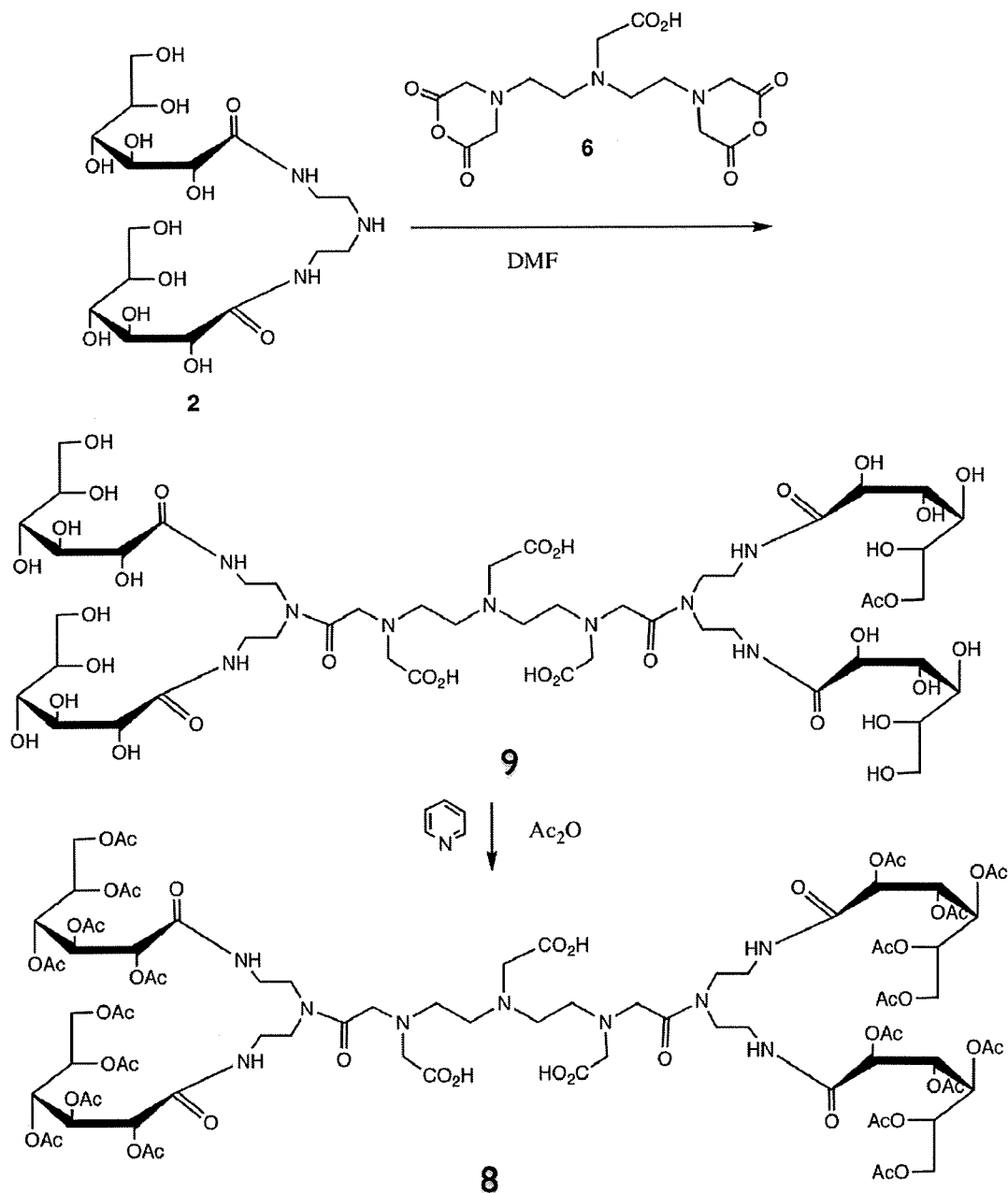


Fig. 2-7-05 $^1\text{H-NMR}$ for compound **8**

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-G1c(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ゾメタン (TMSCHN_2) 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-G1c(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-G1c(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。

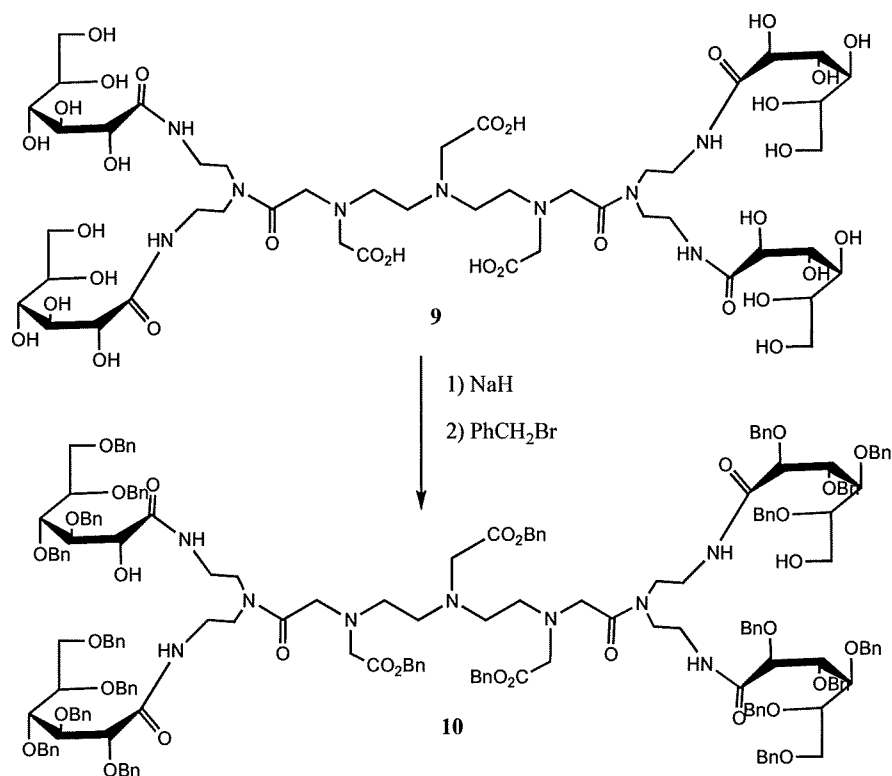
一方、前述の化合物 **8** を標的分子とする合成法の欠点として、反応経路が多段階に渡ることである。この改良として Scheme 2-7-06 に示すように、二段階で標的分子を

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 **8** をアセチル化することによって化合物 **7** の合成を試みた。しかしながら、全ての OH 基をアセチル保護することが困難であった。



Scheme 2-7-06

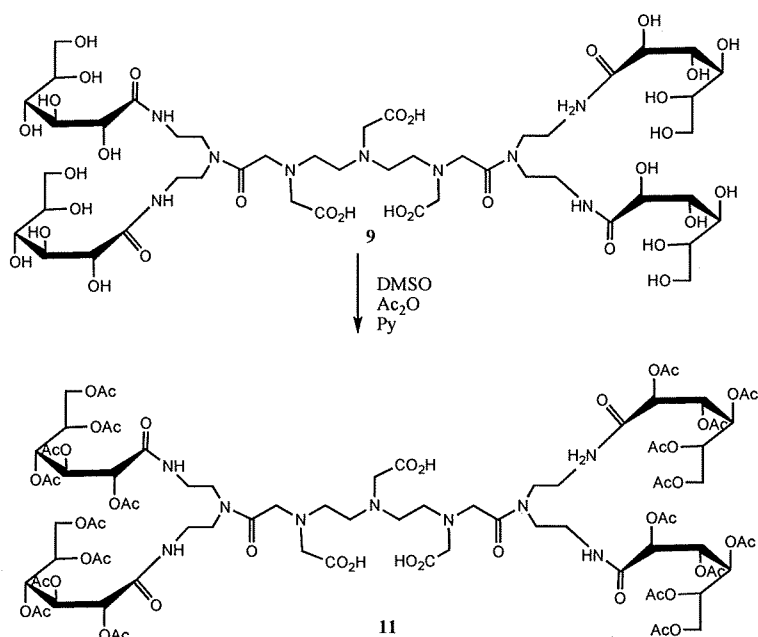
そこで結晶性物質であり水溶性物質の化合物 **9** の構造決定のために、水素化ナトリウムによってアルコキシドに変換し、さらに臭化ベンジルを化学量論量添加してベンジルエーテル化 **10** を試みた (Scheme 2-7-07)。



Scheme 2-7-07

しかしながら、NaHの強塩基性のために糖骨格が分解したと思われる成分が多数観測された。今後は穏和な条件下でエーテル化を検討する必要があると推測された。

一方、化合物8の短経路合成のために化合物9をDMSOを溶媒として、アセチル化を検討した(Scheme 2-7-08)。その結果、25%の収率で目的化合物である化合物8の合成に成功した。



Scheme 2-7-08

2-7-2 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))と塩化ガドリニウム(III)を 95°C 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。

2-7-2-1 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(2.04 g, 19.8 mmol)を DMF(50 ml)に溶かし、室温で攪拌しながら D-(+)-グルコノ-1,5-ラクトン(7.05 g, 39.6 mmol)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 2(8.77 g, 19.0 mmol)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(4.23 g, 9.21 mmol)を DMF(20 ml)中に溶解させ、その溶液に二炭酸ジ-t-ブチル(2.01 g, 9.21 mmol)DMF 溶液(10 ml)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(10 ml)を加え、さらに無水酢酸(9.40 g, 92.1 mmol)を氷水浴中で加え室温で 2 日間攪拌した。反応終了後、水(20 ml)を入れ攪拌し、さらに酢酸エチル(50 ml)と飽和炭酸ナトリウム(1 g)を加え抽出した。水相を酢酸エチル(30 ml)で再度抽出し、飽和炭酸塩水(50 ml)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(7.67 g, 7.83 mmol)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(8.42 g, 8.59 mmol)をジクロロメタン(5 ml)に溶かし、溶液を攪拌しながらトリフルオロ酢酸(7 ml, 94.2 mmol)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(100 ml)に溶かし、その溶液を飽和炭酸水素ナトリウム(50 ml)で洗浄し、次に水(50 ml)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、残渣をシリカゲルカラム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(6.58 g, 7.47 mmol)を収率 87% で得た。

2-8 ガドリニウム錯体の合成上の問題点と配位子の構造 ～XRDによる解析～

戸田 三津夫

2-8-1 ガドリニウム錯体の製造

2-8-1-1 合成上の問題点

MRI 造影剤としてのガドリニウム錯体の合成研究では、「配位子を有機合成したのちにガドリニウム錯体とするという手法」と「ガドリニウムが常磁性金属ゆえに NMR 分析ができない」という相反する要素が障害となり、錯体となってしまっただけでは構造の確認が困難である。すなわち、ガドリニウムイオンを配位子に取り込ませ、錯体とする過程をどの段階に持ってくるかは、最終生成物の合成をすすめる上で極めて重要である。しかし、一方で、一端ガドリニウムイオンを取り込ませ錯体を合成すると、MRI 造影剤として有効であるということ、これは裏を返せば、造影剤自体の NMR 分析が事実上不可能であることを意味する。しかも、ガドリニウム錯体は一般に非常に安定度定数が大きいため、ガドリニウムイオンを気軽に出し入れすることはできない。これは、ガドリニウムの毒性を封じ込める意味では重要なのだが、合成上はありがたくない。

有機物の構造決定は、現在の洗練された有機合成においてもますます極めて重要で、個々の段階で構造と純度を確認して用心深くステップを重ねていく。しかも、有機物の構造決定には NMR 分析によるところが非常に大きな比重を占めている。したがって、ある段階から NMR が使用できないということは、合成に携わる者にとって、飛行機のレーダーが機能を停止するようなものである。ガドリニウムを入れた途端、妨害電波やチャフによりレーダーが攪乱されたようになる。実際に合成に携わっている者にとって、これはパニックに等しく、自らの進むべき進路を見失う。したがって、錯体形成の段階以降は、大昔に有機合成で分析手段の主流であった元素分析、赤外吸収スペクトル吸光分析、あるいは、質量分析、発光分析などに頼らざるを得ない。この考え方に立てば、ガドリニウムイオンの導入が後の段階になるほど合成上は確信を持ってやりやすいことになる。

本プロジェクトでは、青島、青木により Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)が合成されているが、その造影剤としての性能はなぜか異なる。また、小川によりアセチル化と脱アセチル化を経ない別途合成がなされており、こちらの方が構造はより確実性が高いが、造影剤としての性能はさらに劣るという結果が出ている。すべての段階で NMR 分析可能な一般的合成であれば、どういったことが起こっていてどう対処すれば良いか、容易に判明するが、すでに述べたように本研究の合成ではガドリニウムイオンを導入した段階以降では NMR が使用できないためサンプルの同定と構造解析が困難なために、最適の構造が明らかにされていない状況にある。ここでは、その解決法について考察する。

2-8-1-2 実際の合成

青島、青木による Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)合成は、周辺部をアセチル化してコア部と反応させ、塩化ガドリニウムを反応させることにより錯体 Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)とし、アセチル基を水酸化ナトリウム水溶液にて加水分解により脱離させて生成物を得ている。青島のサンプル（本プロジェクトの初期のサンプルで、最も高性能を示した）は、錯体合成の際に酸化ガドリニウムを使用しているが、青木（再現実験）の場合には、塩化物を用い塩化水素が発生したためか、加水分解ステップ以前に生成物の一部が Gd-DTPA-DETA-D2-

4Glc(OH)となってしまう。加水分解の条件検討とともに、使用するガドリニウム試薬の検討も必要であると思われる。また、青木サンプルが MALDI-TOF-MS において positive モードで 1462 ($[M+H]^+$) を示したのに対して、青島サンプル (オリジナル) は、青木サンプルにパターンがよく似ているものの、1462 ($[M+H]^+$) のピークはなく、1747、1255 にピークを示した。1255 のピークは、加水分解されてすべての AcO が HO になり、しかも糖の部ユニットが一つ外れた質量に相当する。

一方、小川は、青島、青木がアセチル保護した段階を省き、コア部と未保護の周辺部を反応させて DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)を直接合成している。こちらは、MALDI-TOF-MS にて negative モードで 1274 ($[M-H]^-$) が検出されている。

このように、本研究では、精密な構造決定の困難によって支障をきたしている面がある。

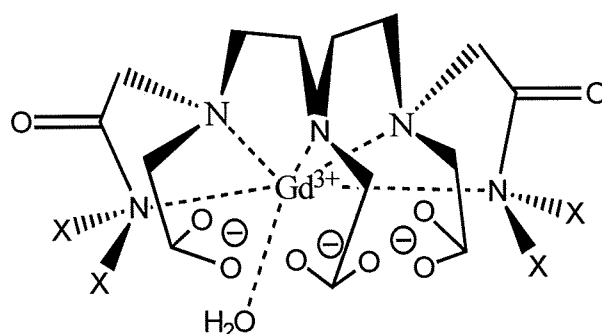


Fig. 2-8-01 Gd 錯体の構造 (X = sugar)
 I : X = Glc(OH) mw = 1448 (ligand = 1275)
 II: X = Glc(OAc) mw = 2288 (ligand = 2115)

2-8-1-3 打開策

今後、ぜひ検討しなければならない要件は以下の通りである。

1. 合成途中段階での構造決定を可能にする。
 - (1) Gd をできるだけあとの段階で導入する合成ルートを計画する。
 NMR 分析に際して、Gd の存在が障害となるため、合成ルートの最終段階に近いところまで、配位子のみの合成とすることにより、構造の確認が可能となり合成の精度と再現性が確保できる。
 - (2) Gd 以外の、NMR 測定不能とならない希土類元素の利用を検討する。
 (保護基として活用することも考慮しながら、最終的には Gd 錯体とする)
 たとえば Eu などの比較的 NMR 分析に障害とならない希土類元素を用いて合成を行い、錯体構造を保持しつつ NMR 分析も可能な合成ルートを確保する。
 錯体の安定度定数が適当なものを選択すればあとの段階で Gd への置換も考えられる。
2. 反応条件の強弱と加水分解の進み具合に不可解な点があるので検討する。
 青島サンプルと青木サンプルでは、同様のルートにより合成を行っているが、造影剤としての性能が異なるというのは、脱アセチル化を行う加水分解段階に鍵があると思われる。

る。したがって、加水分解条件を詳細に検討することが必要になる。また、別途合成し構造がより確かな小川サンプルとも性質が異なるため、当初の目的の構造とは違うもの、おそらく部分的にアセチル基が残っている化合物などであると想定すべきであろう。

3. 錯体合成段階についても、酸化物がよいのか塩化物でよいのか、再検討する。
青島サンプルのいくつかは、試薬に酸化ガドリニウムを用い錯体を得ている。一方、青木サンプルは基本的には塩化ガドリニウムを用いている。塩化ガドリニウムを用いると系内に塩化水素が発生して、これが通常の、あるいは錯体構造に特異的な加水分解をしているかもしれない。このことを考慮して、錯体化試薬の検討とその際の条件を行う必要がある。
4. 光学異性体の存在も含めて、構造未確定の成分の構造決定を試みる。
合成の些細な条件変化などにより、微量成分の構造や構成が変化している可能性がある。有効な成分が微量成分であれば、それは卓越した性能を有していることが期待されるため、混合物から、HPLC、電気泳動、その他の方法により分画を行い、性能と構造の評価を行う必要がある。
5. Mass、IR 以外に、蛍光分析、XRD（粉末 X 線回折分析）を取り入れる。
元素としてのガドリニウムの特徴を生かすために蛍光分析が有効であると思われる。
6. 青島サンプルがペースト状で、再現物が結晶だったという点の解明。
これは、現象を再現しないと如何ともしがたいが、性状の違いは極めて重要である場合があるので、細心の注意を払う必要がある。

いずれにしても、現在までの状況では、当初描いていた構造のものが最良の性能をもたらしたわけではないようだ。しかし、マイナー成分であるにも関わらず、サンプル全体として高い性能を発揮したのであれば、その純度を上げた場合には、いままでの造影剤の中でのチャンピオンデータを、10 倍を超えて上回るかもしれない。

ほかの方法として、当初の再現を試みて、とにかくある程度の性能が出た複数の成分が存在するサンプルから有効なものを取り出す努力も必要かもしれない。

2-8-2 XRD パターンによる、造影剤配位子：DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) および DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) 加水分解物の構造に関する考察

造影剤配位子 DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) は、当初、まず DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc) を合成し、塩化ガドリニウムもしくは酸化ガドリニウムにより錯体を形成させたのちに加水分解を行い、アセチル基を脱離させヒドロキシ基とすることにより合成していた。（これをルート A とする）しかし、水酸化ナトリウム水溶液を用いた加水分解は、条件により生成物の性状が異なり、多種の生成物の混合物となっていると思われた。そこで、小川は後別合成ルートとしてアセチル化と脱アセチル化を経ない方法で DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) を直接合成し、ガドリウム錯体とする方法を確立し、ほぼ単一の生成物として Gd-DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) を得ることができるようになった。（これをルート B とする）

ところが、ルート A で合成した生成物が達成した緩和率において高い性能を示した反面、ルート B から合成した生成物は同等の性能を示さず、加水分解途上の生成物が高い性能を有す

る可能性がでてきた。そこで、条件を、[1.0 N - NaOHaq, 4h, rt]と[0.5 N - NaOHaq, 1 h, rt]に設定し、加水分解を行い、生成物を分析することにした。得られた生成物が結晶様の固体であったため、従来検討していなかった XRD 測定を行うことにした。XRD 測定は、分子の構造ではなく結晶構造の情報を得る手段であるため、個々の化合物の構造を解明することはできないが、固体生成物（生成物のうち結晶化した部分）が結晶であるかそうでないか。結晶（組成の違う結晶あるいは、結晶多系）が何種類あるか、それにより、生成物の種類や比率に関する情報が得られると期待された。

一方、高性能を示したガドリウム錯体は液状であったのに対して、ルート B で合成した生成物は結晶状であった。造影剤の性能を発揮する機構には水分子との親和性が重要であると言われており、液状生成物が水を含んだ状態であると考えれば、このことが大きな意味を持つ可能性がある。直接ルート B で合成した配位子 DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)、ルート A ののち加水分解することにより合成した配位子 DTPA-DETA-D2-4Glc(OAc)_m(OH)_n は、ともに水に易溶で、アセトンなど水と任意の割合で混ざる有機溶媒を加えることにより結晶化させることができた。結晶は、程度の差はあるが空気中では潮解性を示した。これは、XRD 測定を困難にした。そこで、アルゴン雰囲気下でポリプロピレンフィルム (PP) をドーム状に張ったサンプルホルダにサンプル結晶をマウントすることで測定した。結晶は、測定のあいだ潮解性を示すことがなく、結晶状態を保った。下図 A-C に、A:[ルート B で合成した配位子 DTPA-DETA-D2-4Glc(OH)]、B: [1.0 N - NaOHaq, 4h, rt]、C: [0.5 N - NaOHaq, 1 h, rt] のそれぞれの結晶の XRD パターンを示す。

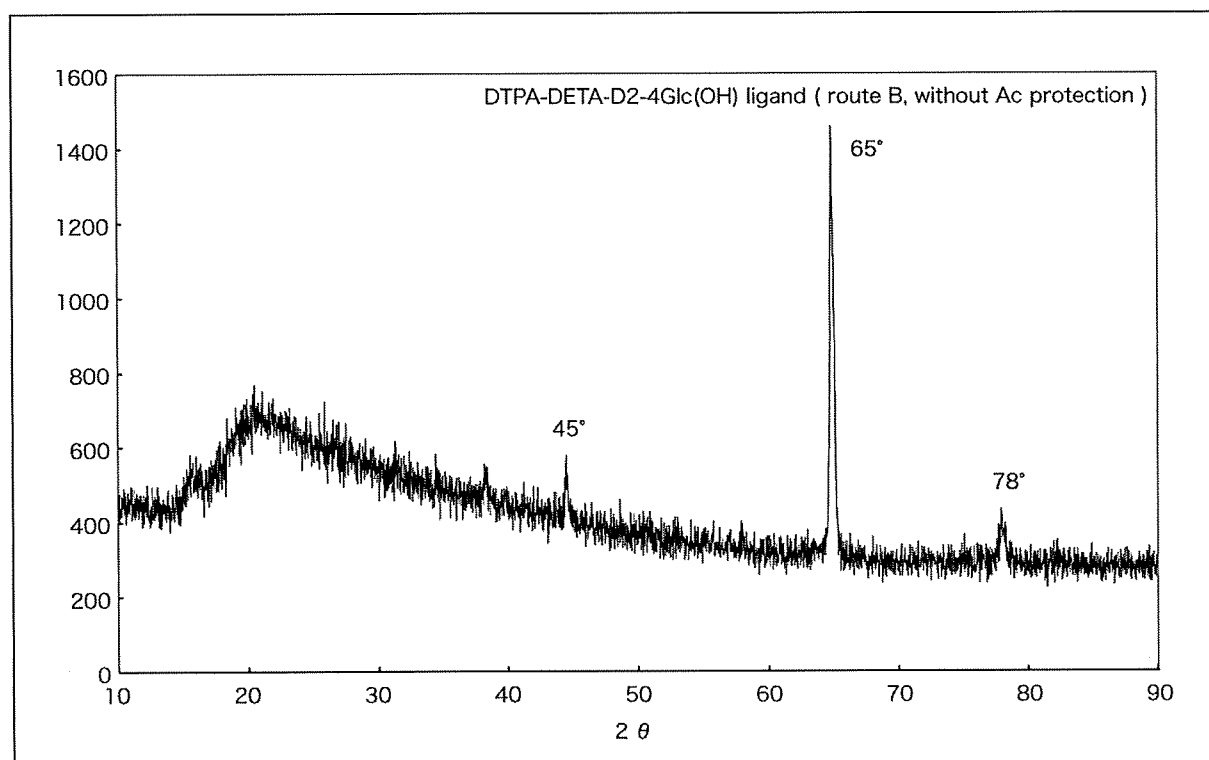


Fig. 2-8-02 DTPA-DETA-D2-4Glc(OH) の XRD パターン [ルート B で合成]

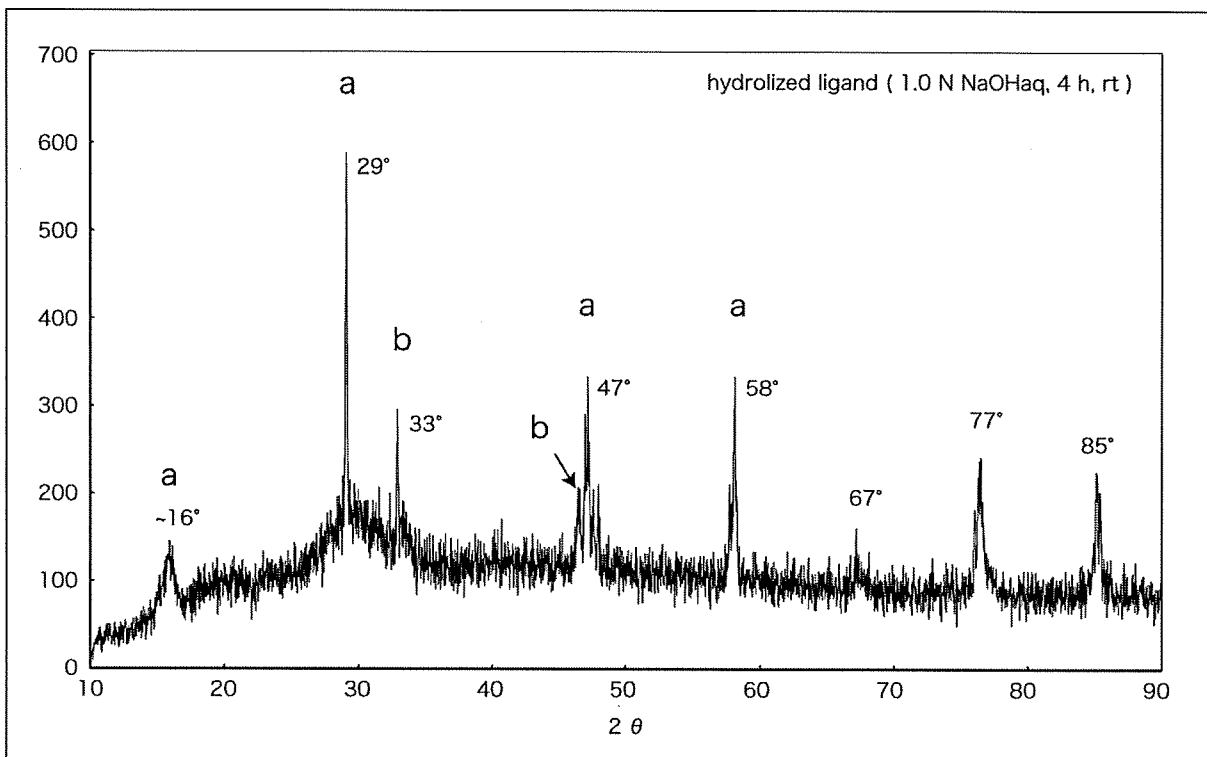


Fig. 2-8-03 加水分解生成物の XRD パターン [1.0 N - NaOH aq, 4h, rt]

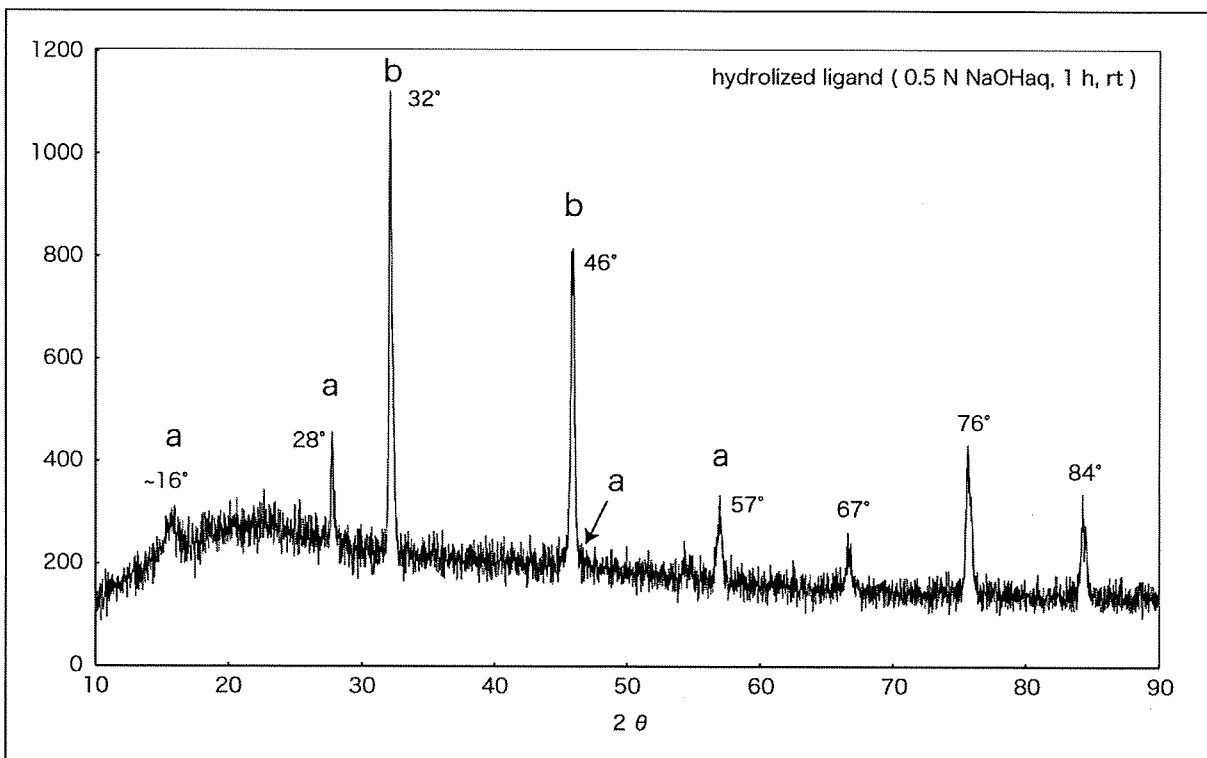


Fig. 2-8-04 加水分解生成物の XRD パターン [0.5 N - NaOH aq, 1 h, rt]