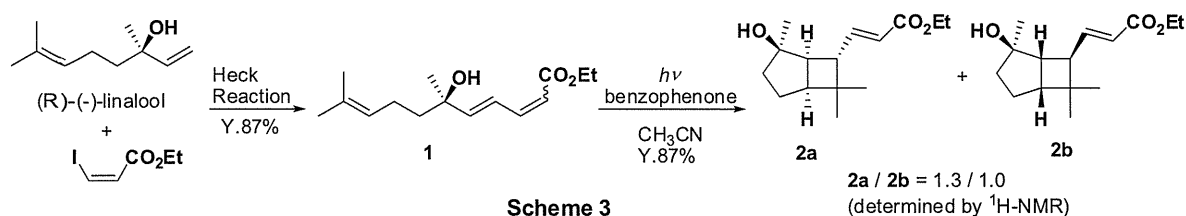


【結果および考察】

光反応前駆体であるトリエンエステル **1** は入手容易な(*R*)-(-)-リナロールを出発物質とする、アルケニルハライドとの Heck 反応により合成した。得られたトリエン化合物に対して光源として高圧水銀灯(366 nm)を用いて光環化反応を行い生成物 **2a** および **2b** をそれぞれ光学活性体として得た(Scheme 3)。



単離したそれぞれの環化物 **2a,2b** にオキシ塩化リンを用いて脱水反応を行い、目的のエンド型二重結合を有する化合物 **3a,3b** とエキソ型二重結合を有する化合物 **4a,4b** を得た(Table 1)。

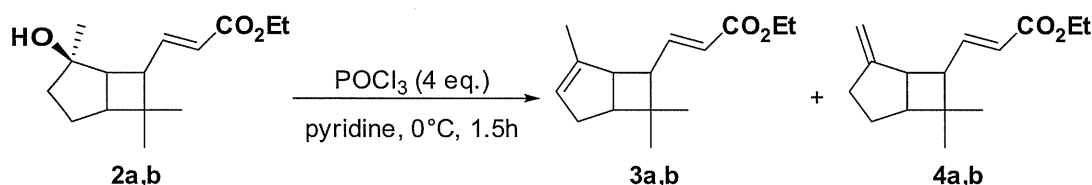


Table 1. Dehydration reaction of 2a,b

entry	S.M.	yield [%] ^{a)}
1	2a	70 (3a / 4a = 2.5 / 1.0)
2	2b	79 (3b / 4b = 2.5 / 1.0)

a) The ratio of **3** / **4** was determined by ¹H-NMR analysis

得られた環化物 **3** と **4** は極性があまり変わらず完全に分離できないため単離せず環拡大反応によるビシクロ[4.2.1]ノン環の合成検討を行った。まず段階的に異性化のみを行ったのちに Cope 転位を進行させる方法では目的物が得られなかった。そこで、化合物 **3** の 7 位を異性化させる際と同時に Cope 転位反応に導く条件検討を行った(Table 2)。140°C以上の高温条件下では分解反応が起こり、共役ジエン化合物 **7** も得られたが、非常に興味あることに塩基存在下 triglyme や DMF の極性溶媒中で 120°C以下で加熱することにより、環拡大した化合物 **6** のみが生成した。塩基性条件のため化合物 **6** は目的化合物 **5** を経由し、二重結合の異性化が起こって生成したと考えられる。

原料に含まれていた化合物 **4** も Cope 転位反応を起こす可能性が考えられるが、興味深いことに現状の反応条件では転位はまったく起こらず、化合物 **4** は未反応のまま回収された。

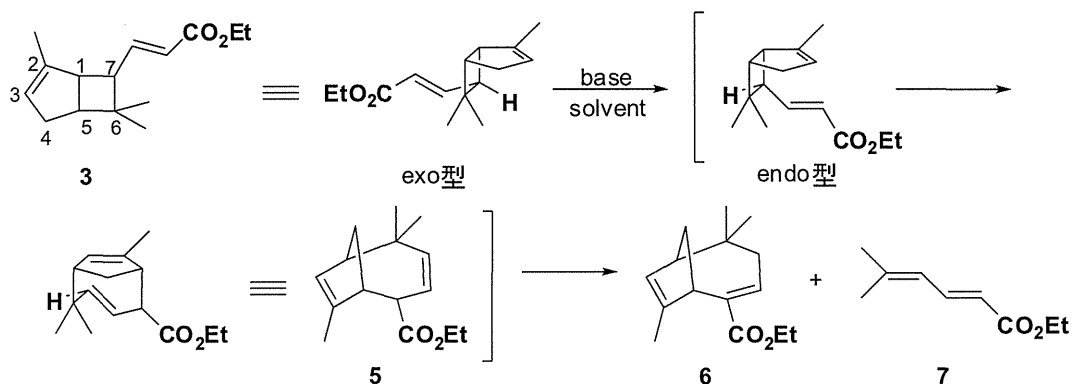


Table 2. Isomerization followed by Cope rearrangement

entry	solvent	base (eq.)	conditions (°C / h)	yield [%] ^{a)}		
				6	7	3 (recovery)
1	triglyme	K ₂ CO ₃ (1.4)	200 / 3	3	29	-
2	triglyme	DABCO (7)	140 / 24	15	32	-
3	triglyme	DBU (7)	140 / 24	52	38	-
4	triglyme	DBU (7)	120 / 24	64	-	7
5	DMF	DBU (7)	120 / 24	88	-	8
6	DMF	DBU (1.4)	120 / 24	85	-	8

a) The ratio of **6** / **3** was determined by ¹H-NMR analysis

反応温度を 120°C、溶媒に DMF を用い、塩基の量を 7 当量での反応は収率 88% を与えた (entry 5)。この反応は塩基の量を 1.4 当量まで減らしても収率は低下せずに 85% の収率で反応は進行した (entry 6)。なお、収率は原料中に含まれる化合物 **3** を基準として算出した。

【参考文献】

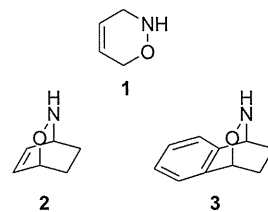
- 1) 本田清、青野庸平、大村一浩、星野雄二郎、井上誠一 第 58 回有機合成化学協会関東支部シンポジウム 講演要旨集 p.76 (2009)

2.3. 星野雄二郎、鈴木健三、真杉恵梨、兪輝、藤本峻也、本田清、第42回複素環化学討論会、京都、2012.10.11-13.

Diels-Alder 反応を利用した多官能性 1,2-オキサジンの合成

1. 緒言

1,2-オキサジンは含窒素多官能性有機化合物の合成中間体として有望なものであり、生理活性化合物の構成単位としてしばしば見られる重要な環構造である。3,6-ジヒドロ-1,2-オキサジン(1)の直接的な合成法の一つとして、ジエンとニトロソカルボニル化合物との Diels-Alder 反応が古くから知られている¹。我々はアトムエコノミーが優れている



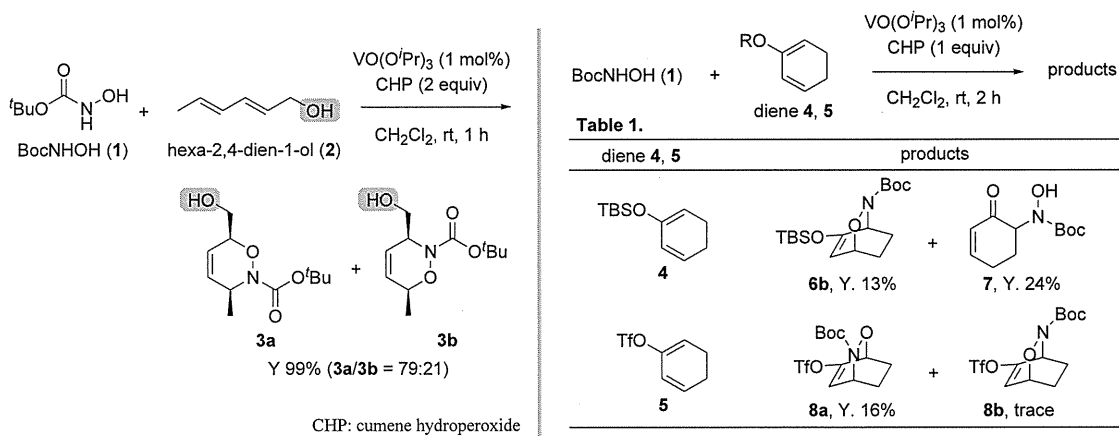
Diels-Alder 反応を利用した複素環合成の研究を展開している中で、穏和な反応条件で選択的な酸化反応を実現できる金属触媒としてバナジウム触媒に着目し、ヒドロペルオキシドを酸化剤とするヒドロキサム酸のニトロソカルボニル化合物への酸化反応とその Diels-Alder 反応を検討した²。その結果、触媒活性が高いだけでなく、官能基共存性も良好であることが明らかとなった。また、Diels-Alder 反応の位置選択性を検討したところ、これまでと同様の proximal 付加体が単一の生成物として得られることを明らかにした。本発表では天然物合成などの重要中間体として期待できる 2-オキサ-3-アザビシクロ[2.2.2]オクテン骨格(2)を与える官能性環状ジエンとの Diels-Alder 反応を検討した。一方、ニトロソ Diels-Alder 反応では合成困難なベンゾ[d][1,2]オキサジン(3)を、イソインドールの Diels-Alder 反応、続く過酸酸化によるアミノオキシドの生成と [1,2]Meisenheimer 転位からなる合成経路について検討を行った。その結果、[1,2]Meisenheimer 転位において良好な位置選択性が見られたので、それらの結果についても合わせて報告する。

2. 結果と考察

2.1. バナジウム触媒を用いたニトロソカルボニル化合物の発生と官能性ジエンとの Diels-Alder 反応

1 mol%のバナジウム触媒存在下、酸化剤としてヒドロペルオキシドを用い、BocNHOH(1)とジエノール(2)を反応させると、反応は速やかに進行し、エポキシドなどの副生成物が生成することなく、対応するジヒドロ-1,2-オキサジン(3a,3b)が高収率で得られてくることを既に報告している²。そこで、この反応を元に、シクロヘキサジエン誘導体とのニトロソ Diels-Alder 反応の反応性と選択性を検討した(表1)。シリルエノールエーテル、ビニルトリフラートいずれの基質に対しても反応は進行したが、6b についてはシリカゲルに対して不安定であり、低収率であった。ジエン 4 では distal 体のみが得られるのに対し、ジエン 5 では逆の proximal 体が優先して得られて

くることが分かった。



2.2. イソインドールの Diels-Alder 反応、続く過酸化と [1,2]Meisenheimer 転位

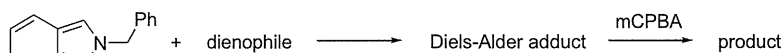


Table 2.

dienophile	Diels-Alder adduct(s) (yield, %)	product (yield, %)
 9	 12 (86)	 15 (89)
 10	 13 (98)	 16 (84)
 11	 14 (78, exo/endo = 44:56)	 17 (31)

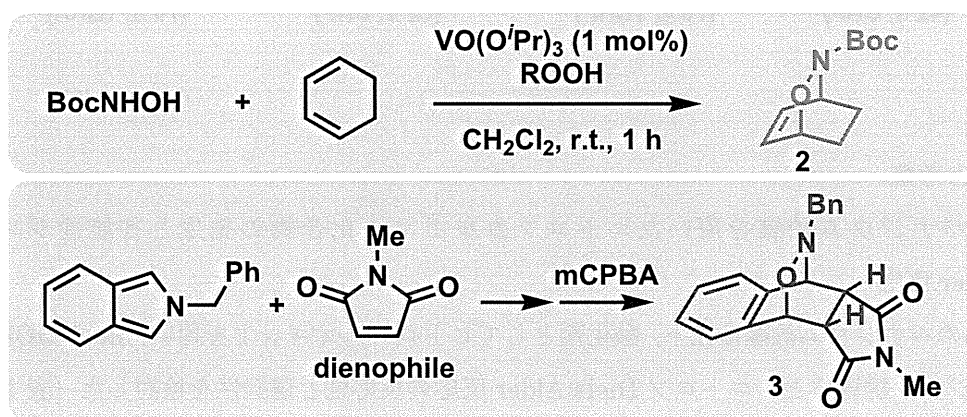
N-アルキルイソインドールと種々のジエノフィルとの Diels-Alder 反応は室温付近で速やかに進行し、対応する付加体を良好な収率で与えた (表 2)。得られた付加体に mCPBA を使って酸化したところ、付加体 12 からは [1,2]Meisenheimer 転位が進行したと考えられる生成物 15 が好収率で得られた。付加体 13 ではオキサジンは得られず、キレトロピー反応が進行したと考えられる生成物ナフタレン 16 が好収率で得られた。一方、非対称置換型付加体 14 では、exo 体においてオキサジン 17 を適度な収率で単離することができた。単一のオキサジン異性体のみが単離されたのは、ベンジル位とアリル位にあるラジカルがより安定であるためと考えられる。

References

- (1) (a) Kirby, G. W. *Chem. Soc. Rev.* 1977, 6, 12; (b) Weinreb, S. M.; Staib, R. R. *Tetrahedron* 1982, 38, 3087; (c) Streith, J.; Defoin, A. *Synthesis* 1994, 1107. (2) Hoshino, Y.; Suzuki, K.; Honda, K. *Synlett* 2012, in press.

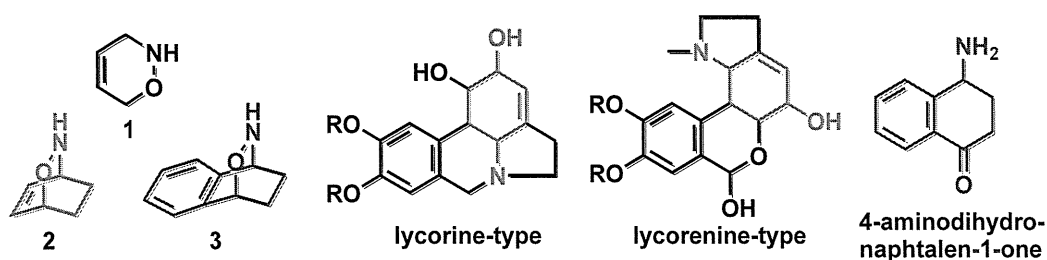
Diels-Alder 反応を利用した多官能性 1,2-オキサジンの合成

<目的> 天然物合成などの合成中間体として有望な 2-オキサ-3-アザビシクロ[2.2.2]オクテン(2)を与える官能性環状ジエンとの Diels-Alder 反応の検討, および, ニトロソ Diels-Alder 反応では合成困難なベンゾ[*d*][1,2]オキサジン(3)を, イソインドールの Diels-Alder 反応, 続く過酸酸化によるアミノオキシドの生成と[1,2]Meisenheimer 転位からなる合成経路の検討を行った.

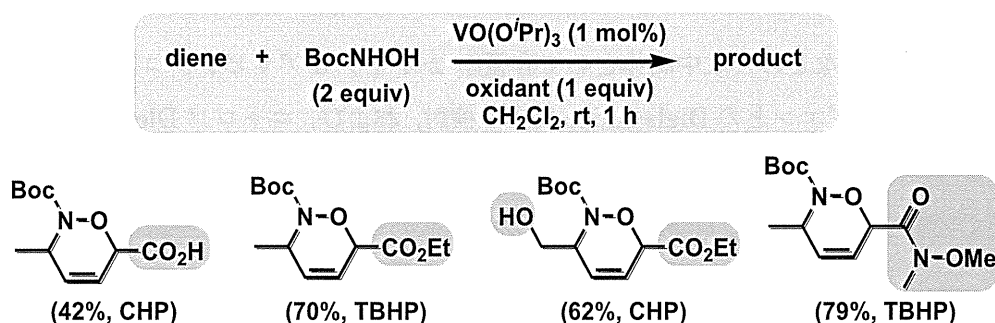


1. 緒言

1,2-オキサジン 1 は含窒素多官能性化合物の合成中間体として有望であり 1, 生理活性化合物の構成単位としても見られる重要な環構造である.



我々は最近、バナジウム触媒を用いるヒドロキサム酸のニトロソカルボニル化合物への酸化反応とその Diels-Alder 反応を検討し、穏和な反応条件下、選択的酸化反応を見出した。触媒活性が高いだけでなく、官能基共存性も良好であり、多官能性有機化合物の簡潔合成法として期待される。



2. 結果と考察

2.1. バナジウム触媒を用いたニトロソカルボニル化合物の発生と官能性ジエンとの Diels-Alder 反応

1 mol% のバナジウム触媒存在下、酸化剤としてヒドロペルオキシドを用い、BocNHOH とシクロヘキサジエン誘導体とのニトロソ Diels-Alder 反応の反応性と選択性を検討した (表 1)。シリルエノールエーテル、ビニルトリフラートいずれの基質に対しても反応は進行した。置換基の違いによってエントリー1 では distal 体のみが得られるのに対し、エントリー3 では逆の proximal 体が優先して得られてきた。

Table 1

Entry	Diene	Yields (%)	
		13 (distal)	24
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			

2.2. イソインドールの Diels-Alder 反応、続く過酸化と [1,2]Meisenheimer 転位

N-アルキルイソインドールと種々のジエノフィルとの Diels-Alder 反応は 0°C から室温付近で速やかに進行し、対応する付加体を良好な収率で与えた (表 2)。得られた付加体に mCPBA を用いて酸化したところ、エントリー 1,2 では [1,2]Meisenheimer 転位が進行したと考えられる生成物が好収率で得られた。エントリー 3 ではアルキンとの Diels-Alder 反応を行い対応する付加体を好収率で得た。それを酸化したところ、目的のオキサジンでは無く、ナフタレン生成物が好収率で得られた。これはキレトロピー反応が進行したためと考えられる。エントリー 4 の非対称置換型付加体では、*exo* 体においてオキサジンの一方を位置選択的に適度な収率で得た。

Table 2

Entry	Dienophile	Yield of Diels-Alder adduct(s) (%)	Yield (%)
1			
2			
3			
4			

References

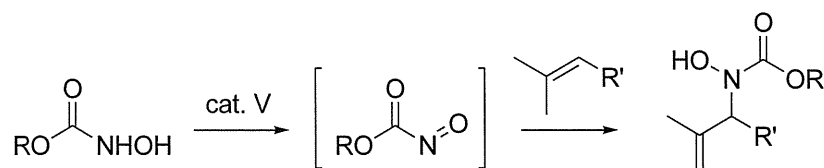
- (1) (a) Kirby, G. W. *Chem. Soc. Rev.* **1977**, *6*, 12; (b) Weinreb, S. M.; Staib, R. R. *Tetrahedron* **1982**, *38*, 3087; (c) Streith, J.; Defoin, A. *Synthesis* **1994**, 1107. (2) Hoshino, Y.; Suzuki, K.; Honda, K. *Synlett* **2012**, *23*, 2375.

2.4. 星野雄二郎、福地智典、本田 清、第 56 回香料・テルペンおよび精油化学に関する討論会、鹿児島、2012.10.27-29.

バナジウム触媒を用いたニトロソギ酸エステルの発生と分子内及び分子間エン反応

1. 緒言

アリルアミンは有用合成中間体として、また生理活性化合物の骨格の一部として知られる重要な化合物である。近年、C-H官能基化を結合形成の鍵反応とするスマートな合成法が注目を集めている。ニトロソエン反応はアリル骨格を有する化合物に直接アミノ基を導入できることで魅力的な反応である¹⁾。ニトロソ化合物の中でも特にニトロソカルボニル化合物は反応性に富み、合成的に興味深い化合物であるが、単離が困難なため系中で発生させる必要がある。我々は穏和な反応条件で、選択的な酸化反応を実現できる金属触媒としてバナジウム触媒に着目し、ヒドロペルオキシドを酸化剤とするヒドロキサム酸のニトロソカルボニル化合物への酸化反応とそのDiels-Alder反応を検討してきた²⁾。その結果、ヒドロキシ基やカルボキシ基を有するジエンにおいても良好な収率でDiels-Alder付加体を与えることを見出した。今回我々は分子内および分子間ニトロソエン反応を検討し、適度な収率で対応するアリルアミンを与えることを見出したので報告する。



2. 結果と考察

ニトロソカルボニル化合物は時間分解IR (TRIR) 研究によって最近直接観測されたように³⁾、寿命が短い化学種であり、ジエンなどが存在しない条件ではO-アシルヒドロキサム酸や酸無水物へと分解していくことが知られている⁴⁾。一般的にエン反応はDiels-Alder反応より反応速度が遅いため、ニトロソカルボニル化合物のような寿命が短い化学種にとってエン反応は困難さが増すことになる。そこで、我々はエン反応を検討する基質として、

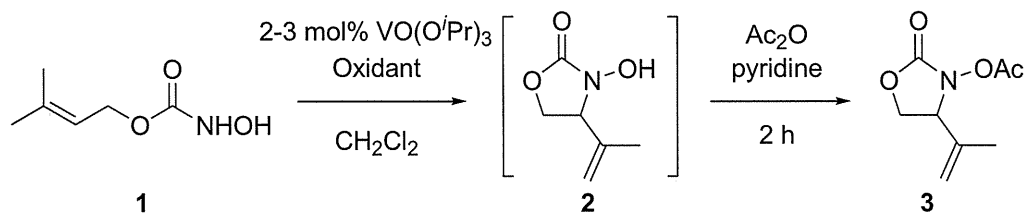


Table 1

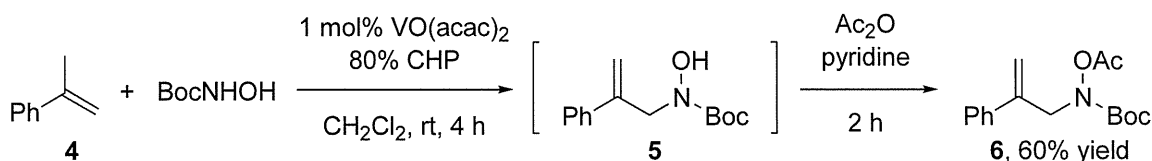
Entry	Oxidant	Temp (°C)	Time (h)	Yield of 3 (%)
1	70% TBHP	0	3	16 ^a
2	70% TBHP	0	2	28
3	30% H ₂ O ₂	0	2	3
4	80% CHP	0	2	37
5	80% CHP	0	1	45
6	80% CHP	-20	1	50

^a The isolated yield of 2.

TBHP: *tert*-butyl hydroperoxide, CHP: cumyl hydroperoxide

N-ヒドロキシカルバミン酸アリル 1 を選択し、分子内でのエン反応をまず検討することとした。市販の 70%TBHP を酸化剤として 3 時間反応を行ったところ、目的とする環化体 2 を若干純度が低いながらも収率 16% で得た。単離操作中に化合物 2 が分解している可能性が考えられたので、無水酢酸によってアセチル保護をしたところ、NMR 測定から十分純度の高い状態で単離できることが分かり、僅かながら収率の向上も見られた。この場合、反応時間を延長しても収率に特に差は見られなかった。そこで、酸化剤を検討したところ、80%CHP を用いたときに 45% まで収率が向上し、さらに -20°C と低温にすることにより 50% まで収率が向上した。その他、酸化剤の当量や反応温度、時間、溶媒など種々検討したが、収率は 50% 程度であった。3 を脱保護して単離精製したオキサゾリジノン 2 を用いて、反応系中での安定性を確認したところ、2 は何も変化せず、そのままであった。このことから、反応条件下において化合物 2 は安定であり、ニトロソエン反応が円滑に進行しないことが中程度の収率となる一つの理由と推測される。

続いて、分子間エン反応を検討した。反応条件はニトロソカルボニルヘテロ Diels-Alder 反応の条件を参考に行った。バナジウム触媒と BocNHOH と α -メチルスチレン 4 を溶解したジクロロメタン溶液に酸化剤をゆっくりと加え、TLC で反応を追跡したところ、原料のメチルスチレンは 3 時間で消失した。分子内の場合と同様にアセチル化して単離したところ、目的の保護されたアリルアミン 6 を適度な収率で得た。グラニオールとの反応では、6 位でアミノ化された生成物が主生成物として 47% で単離された。その他の異性体については現在解析中である。



References

- 1) Johannsen, M.; Jørgensen, K. A. *Chem. Rev.* 1998, *98*, 1689.
- 2) Hoshino, Y.; Suzuki, K.; Honda, K. *Synlett* 2012, in press.
- 3) Cohen, A. D.; Zeng, B.-B.; King, S. B.; Toscano, J. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, *125*, 1444.
- 4) Corrie, J. E. T.; Kirby, G. W.; Mackinnon, J. W. M. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 1985, 883.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2.5. 本田 清、上野恵子、星野雄二郎、ビスクロ[3.2.0]ヘプタン環の環拡大によるビスクロ[4.2.1]ノナン環の構築、第64回有機合成化学協会関東支部シンポジウム、新潟、2012.12.1-2.

ビスクロ[3.2.0]ヘプタン環の環拡大によるビスクロ[4.2.1]ノナン環の構築

【諸言】

天然にはビスクロ[4.2.1]ノナン環骨格を有する化合物が知られている。例えば *Mediterraneols* はマウス白血病細胞に抗白血病作用を示し、*Culmorin* は抗カビ作用を持つことが知られている (**Figure 1**)。これらの化合物に共通するビスクロ[4.2.1]ノナン環骨格の合成は過去にいくつか報告されているが、行程数が多く、収率及び立体選択性に問題もあり、改良の余地が多く残されている。

当研究室では電子供与基を有するトリエン化合物に対して光照射を行った場合、パラレル配向での環化反応が進行し、一挙に位置選択的にビスクロ[3.2.0]ヘプタン環骨格を構築することを見出している (**Scheme 1**)¹⁾。

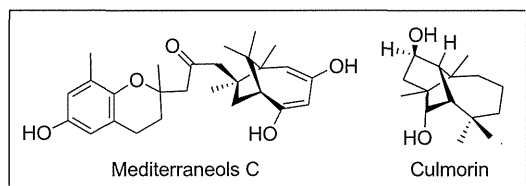
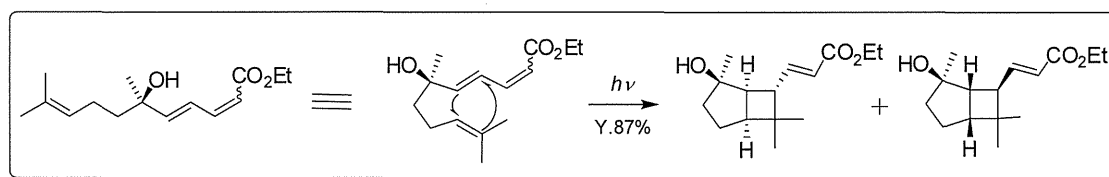


Figure 1



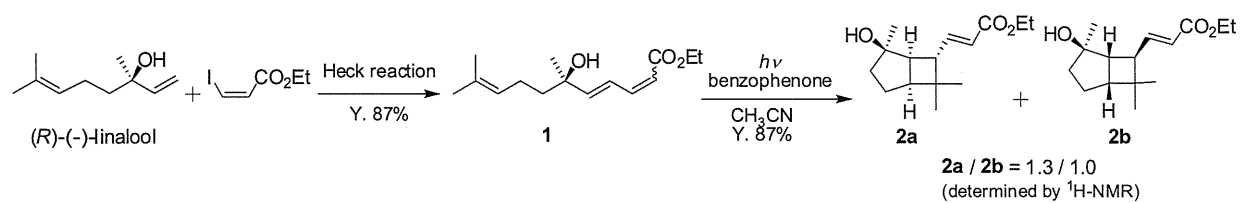
Scheme 1

そこで本研究では、この方法を利用して一挙にビスクロ[3.2.0]ヘプタン環骨格を構築し、ビスクロ[3.2.0]ヘプタン環骨格から異性化及び Cope 転位反応を行うことでより歪みの小さいビスクロ[4.2.1]ノナン環骨格を合成することを目的として検討を行った。

【結果及び考察】

光反応の前駆体であるトリエンエステル **1** は入手容易な(R)-(-)-リナロールを出発物質とし、アルケニルハライドとの Heck 反応による炭素鎖伸長により合成した。得られたトリエン化合物に対して光源として高圧水銀灯(366nm)を用いて光環化反応を行い生成物 **2a** 及び **2b** を合成した

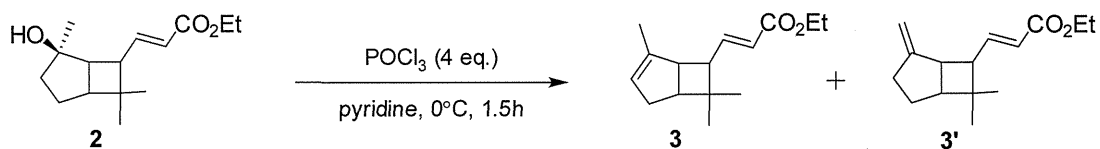
(Scheme 2).



Scheme 2

次に環化物 **2** にオキシ塩化リンを用いて脱水反応を行い、目的のエンド二重結合を有する化合物 **3** を合成した(**Table 1**)。その際にエキソ二重結合を有する化合物 **3'** も得られた。

Table 1. Dehydration reaction of 2

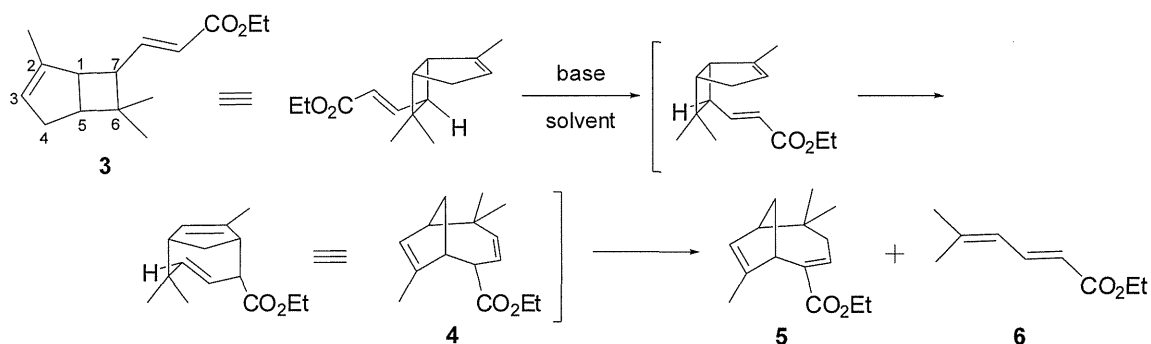


entry	s.m.	yield [%] ^{a)}
1	2a	70 (3a / 3a' = 2.5 / 1.0)
2	2b	79 (3b / 3b' = 2.5 / 1.0)

a) The ratio of **3** / **3'** was determined by ¹H-NMR analysis

次に得られたビシクロ[3.2.0]ヘプタン環から環拡大反応により目的のビシクロ[4.2.1]ノナン環を構築する検討を行った。まず化合物**3**の7位を異性化させるのと同時に Cope 転位反応に導く条件検討を行った(**Table 2**)。高温条件下では分解反応が起こり、共役ジエン化合物**6**が得られた。非常に興味あることに塩基存在下 triglyme や DMF の極性溶媒中で加熱することにより、環拡大した化合物**5**が生成することがわかった。すなわち化合物**5**は一旦目的化合物**4**が生成し、塩基性条件のため二重結合の異性化が起こって生成したものと考えられる。

Table 2. Cope rearrangement of 3



entry	solvent	base	conditions	yield [%] ^{a)}			
				4	5	6	3 (recovery)
1	triglyme	K ₂ CO ₃ (1.4 eq.)	200°C, 3h	-	3	29	-
2	triglyme	DABCO (7 eq.)	140°C, 1d	-	15	32	-
3	triglyme	DBU (7 eq.)	140°C, 1d	-	52	38	-
4	triglyme	DBU (7 eq.)	120°C, 1d	-	64	-	7
5	DMF	DBU (7 eq.)	120°C, 1d	-	88	-	8
6	DMF	DBU (1.4 eq.)	120°C, 1d	-	85	-	8

a) The ratio of **5** / **3** was determined by ¹H-NMR analysis

【参考文献】

- 1) 本田 清、青野庸平、大村一浩、星野雄二郎、井上誠一 第 58 回有機合成化学協会関東支部
シンポジウム 講演要旨集 p.76 (2009)

悪性中皮腫に対する単剤多機能抗がん治療の開発
研究分担者 青木伊知男 放射線医学総合研究所・チームリーダー

研究要旨 高磁場MRIを用いて磁性抗がん剤NEBIをin vivoで定量的にマッピングする手法として、呼吸同期法の最適化によって実用的な水準に高めた。Nudeマウスに211H中皮腫細胞を胸腔内投与し、中皮腫モデルを作成。高磁場MRIにより腫瘍をin vivoで検出した。また、磁性抗がん剤EI236を胸腔内投与し、腫瘍部位の胸郭前面に磁石を2日間設置、EI236のがん部位集積の可視化に成功した。

【初年度】

A. 研究目的磁性を持つ抗がん剤NEBIは、抗がん剤そのものが、MRIにおいて信号低下をもたらす陰性造影剤として作用し、一定の濃度範囲において、その組織内濃度は横緩和時間（ T_2 ）に相関することが予想される。これは、in vivo MRIにおいて、均一性が高く高精度の T_2 定量マッピングを取得する事で、一定の濃度範囲内での抗がん剤の体内動態や濃度分布を推定可能である事を意味する。しかし、中皮腫は呼吸の動きがある肺野に隣接した領域に生じるため、取得中に撮像部位が動くことで、MRI信号が欠損する可能性がある。本研究では、中皮腫におけるNEBI体内動態の追跡および濃度分布を推定したマッピングを行うために、マウス中皮腫同所移植モデルにおいて、空間分解能と信号雑音比の最適化、高周波パルス照射の空間的不均一性と、マルチエコー取得時に生じる誤差の検証、呼吸同期を含む実験動物の固定と撮像手法の改善を含めた撮像条件の最適化を実施し、in vivoで実用的な精度での定量的 T_2 マッピングを得ることを目的とする。

B. 研究方法

BALB/c nudeマウスに中皮腫（211H、 1.0×10^7 cells/50 μ L）を同所移植し、13日後に、高磁場7T MRI（Biospec, AVANCE-III, Bruker BioSpin社製）およびマウス体幹用8chフェイズドアレイ・コイル（Bruker BioSpin）にて、 T_1 強調画像、 T_2 強調画像、および T_2 定量マップを撮像した。定量撮像は、マルチエコー・スピンエコー法（TR/TE = 3000/10-100 ms、

FOV = 3.2×3.2 mm²、matrix = 256 \times 256、スライス厚 = 1 mm）を用いて、脂肪抑制法を併用した呼吸同期法を使用した。マウスは、3%イソフルランで麻酔導入し、気管挿管を行い、人工呼吸器（CWE社製、MRI-1）に接続し、筋弛緩剤を投与、呼吸器から同期信号を出して、MRI撮像を同期させた。

（倫理面への配慮）本研究は、独立行政法人放射線医学総合研究所、動物実験委員会にて承認され、麻酔薬により苦痛を最小化された。

C. 研究結果

マウス撮像用のマルチチャンネル・コイルを用いて、固定装置および呼吸同期法を改良することにより、中皮腫マウスモデルの体幹部肺野においてアーティファクトの少ない T_2 強調画像を150 μ mの空間分解能での撮像に成功した（図1）。高周波パルス照射にポリウム送信コイルを使用することで、空間的不均一性に関して、送受信コイルと比較して改善され、感度との両立を図ることが出来た。

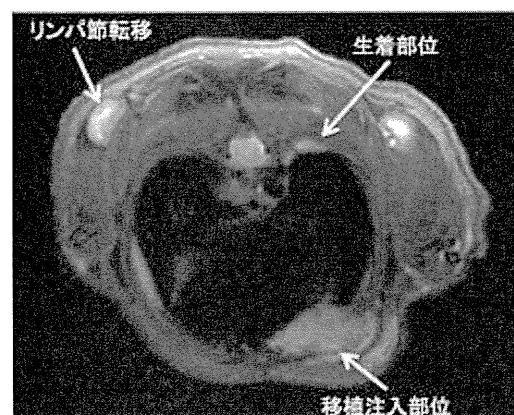


図1 中皮腫モデルマウスの肺野付近のT2強調画像 生着した腫瘍が確認できた。

自発呼吸による撮像では、麻酔感受性によって、同じ麻酔濃度でも呼吸頻度が変化することで、MRIにおけるTRが変動することで、T₂定量値に不安定性が生じた。一方、気管挿管による呼吸同期法では、TRを同一化できた。呼吸で動きがある瞬間にマルチエコーを取得すると、信号にバラツキが生じたため、呼吸同期の信号からの遅延時間を調節することで、呼吸休止期にエコーを取得する事で、マウス中皮腫モデルにおいて、アーティファクトの少ないT₂定量値が得られた(図2)。

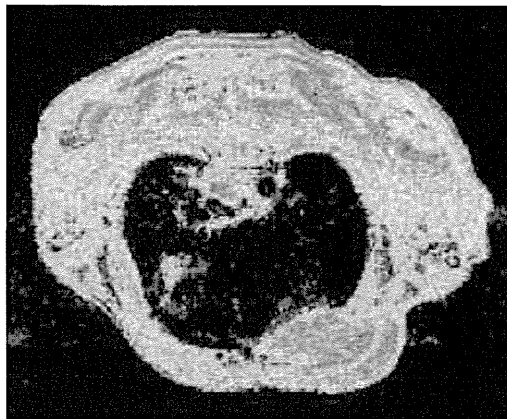


図2 中皮腫モデルマウスにおける肺野付近のT₂定量マップ 暖色系が長い横緩和時間を示す。呼吸同期法の最適化により動きによるアーティファクトが低減できた。

D. 考察

実験動物では、息どめ撮像が出来ないため、肺野付近の撮像とりわけ定量値の精度が低下するが、筋弛緩剤と人工呼吸器を併用し、固定法を改善することで、中皮腫マウスモデルにおいて実用的な精度でT₂定量値の計測が可能となった。今後、磁性を持つ抗がん剤NEBIを投与した際、中皮腫部位での集積を定量的に評価することが可能となった。

E. 結論 マウス中皮腫の同所移植モデルにおいて、in vivoでのT₂定量マッピング法が一定の精度で確立され、磁性を持つ抗がん剤NEBI投与後の、中皮腫部位での集積を定量的に評価する基盤技術が確立された。

【次年度】

A. 研究目的

磁性を持つ抗がん剤EI236は、抗がん剤そのものが、MRIにおいて信号低下をもたらす陰性造影剤として機能する。さらに磁石に対して集積するため、腫瘍近傍に磁石を設置する事で、抗がん剤を物理的に集積させることが可能であり、抗がん剤の集積を可視化しながら、治療を行うことが可能となる。これまで、磁性体を抗がん剤に結合させることで同様の目的を果たした研究が散見されるが、生体内で磁性体と抗がん剤の結合が切れ分離する可能性があるなど、問題点が残っている。一方、磁性抗がん剤EI236は、抗がん剤そのものを磁性化させることで、抗がん剤そのものを生体内において高精度で動態追跡可能と考えられる。昨年度に最適化した肺野周辺の撮像法を用いて、本年度は211H中皮腫細胞を同所移植したモデルを用いて、in vivoでの腫瘍検出、磁石を用いた磁性抗がん剤EI236の局所集積の誘導、ならびに高磁場MRIによるその検出と評価を行うことを目的とした。

B. 研究方法

In vitro MRI実験

アガロースゲル内に磁性抗がん剤EI236を複数注入し、MRIの撮像条件によって、信号がどのように変化するか調べた。高磁場7T MRI (Biospec, AVANCE-I, JASTEC+Bruker BioSpin社製) およびマウス体幹用2chクアドラチャー・コイル (Bruker BioSpin) にて、T₂強調画像、T₂*強調画像を撮像した。撮像の詳細は、下記の通り。

スピンエコー法：RARE法を使用，TR/TE = 2000/20 msec; FOV = 38.4 x 19.2 mm²; Matrix = 256 x 128; スライス厚 = 1.0 mm; RARE factor = 4; 加算回数 = 8, 呼吸同期有, 脂肪抑制有, 撮像時間 = 約8分32秒。

グラディエントエコー法：3D-Flash法を使用, TR/TE = 75/7 msec; Flip angle = 20; FOV = 38.4 x 19.2 x 14.0 mm³; Matrix = 256 x 128 x 20; 加算回数 = 4; 呼吸同期無, し秒抑制無, 撮像時間 = 7分40秒。

In vivo MRI実験

BALB/c nude マウスに中皮腫 (211H, 1.0×10⁷ cells/50 μL) を同所移植し、約2週間後に実験を開始した。投与実験開始2日前に予備的にMRI (T₂強調画像) 撮像を行い、腫瘍の

生着と部位を観察した。EI236を200 μ l 胸腔内投与し、直ちにフェライト磁石付きのジャケットをマウスに着用した。磁石の位置は、事前のMRIの位置情報を用いて腫瘍部位の近くに合わせた。投与2日後にジャケットを外し、3日後に高磁場7T MRI (Biospec, AVANCE-I, JASTEC+Bruker BioSpin社製) およびマウス体幹用2chクアドラチャー・コイル (Bruker BioSpin) にて、T1強調画像、T2強調画像、T2*強調画像を撮像した。撮像法の詳細は、In vitroの方法と同一である。マウスは、3%イソフルランで麻酔導入し、気管挿管を行い、人工呼吸器 (CWE社製、MRI-1) に接続し、弛緩剤を投与した。(倫理面への配慮) 本研究は、独立行政法人放射線医学総合研究所、動物実験委員会にて承認され、麻酔薬により苦痛を最小化された。

C. 研究結果

In vitro MRI実験

アガロースゲル内に封入した磁性抗がん剤EI236は、スピネコー法を用いたT2強調画像法では、注入部位とほぼ同じサイズの信号減少が観察された(図1右)。一方、グラディエントエコー法によるT2*強調画像法では、磁化率効果による「拡大された信号減少 (blooming effect)」が観察された(図1左)。このことから、磁性抗がん剤EI236が一定濃度以上局所に集積すると、T2強調画像法において集積した体積に近い信号減少、T2*強調画像法では、体積を大きく上回る拡大した信号欠損が生じることが示唆された。

グラディエントエコー法 スピネコー法

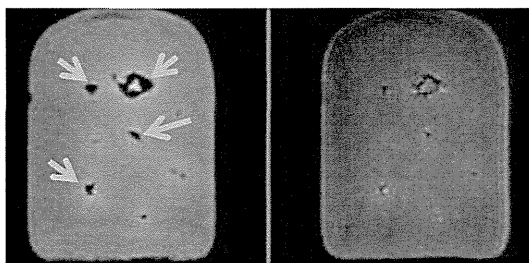


図1 アガロースゲル内に封入した磁性抗がん剤EI236のMRI。(左)グラディエントエコー法を用いたT2*強調画像。(右)スピネコー法を用いたT2強調画像。T2*強調画像では、拡大した信号減少領域(矢印)が観察された。

In vivo MRI実験

211H中皮腫モデルに対し、EI236を胸腔内投与し磁石を2日間設置、投与3日後にMRI撮像を行った。

投与前に、T2強調画像における高信号領域として胸腔内壁に中皮腫の生着が観察された(図2左上)。また、T2*強調画像において、blooming effectによる信号欠損は観察されなかった(図2右上)。磁石による集積誘導後、T2強調画像において、中皮腫内部に顕著な信号低下が観察された(図2左下)。また、T2*強調画像において、拡大した信号欠損 (blooming effect) が顕著に観察された(図2右下)。

T2強調画像は、呼吸同期法により、体動による影響が少ない明瞭な画像が得られた。一方、T2*強調画像は、短い繰り返し時間という撮像条件上の制約から呼吸同期法が利用出来なかったため、体動のアーティファクトの混入が見られたものの、拡大した信号欠損 (blooming effect) の評価には影響が少ないと考えられた。

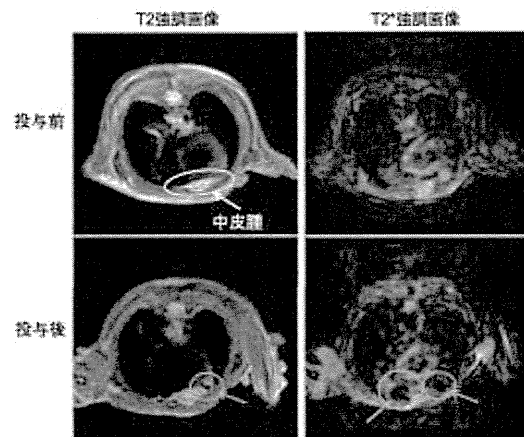


図2 中皮腫モデルマウスにおける磁性抗がん剤EI236投与3日後(磁石つきジャケットによる集積誘導2日間)のMRI。左欄はT2強調画像、右欄はT2*強調画像。上段は投与前、下段は投与・誘導後。T2強調画像において中皮腫内に顕著な信号低下が観察され、それはT2*強調画像における大きな信号欠損と一致した(青丸と矢印)。また、T2強調画像では小さな信号低下でも、T2*強調画像で大きな信号欠損を示す部位も観察された(オレンジ丸と矢印)。

D. 考察

挿管・筋弛緩剤投与による呼吸同期撮像により肺野で明瞭なT2強調画像が得られ、中皮腫モデルにおける腫瘍生着が同定できた。腫瘍近傍の皮膚上に設置した磁石(2日間)によ

り、磁性抗がん剤EI236が中皮腫内に誘導、集積されたことが、T2強調画像およびT2*強調画像法の両方から示唆された。磁石を取り外してから1日経過していることから、これは磁石設置部位に一時的に集まっているのではなく、組織内に保持されていることが推察された。この集積結果は、組織染色の結果ともよく一致した。

E. 結論 マウス中皮腫の同所移植モデルにおいて、磁性抗がん剤 EI236 を胸腔内投与し、腫瘍部位の胸郭前面に磁石を2日間設置し誘導した結果、EI236 のがん部位集積を示唆する信号変化の可視化に成功した。磁性抗がん剤 EI236 は、中皮腫に対する可視化・誘導がん治療における重要な手法になり得ると考えられた。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Tanimoto E, Karasawan S, Ueki S, Nitta N, Aoki I, Koga N. Unexpectedly large water-proton relaxivity of TEMPO incorporated into micelle-Oligonucleotide, RSC Adv. 2013, 3: 3531- 3534.
2. Kershaw J, Leuze C, Aoki I, Obata T, Kanno I, Ito H, Yamaguchi Y, Handa H. Systematic changes to the apparent diffusion tensor of in vivo rat brain measured with an oscillating-gradient spin-echo sequence. Neuroimage. 2012. Accepted
3. Zhelev Z, Aoki I, Gadjeva V, Nikolova B, Bakalova R, Saga T. Tissue redox activity as a sensing platform for imaging of cancer based on nitroxide redox cycle. Eur J Cancer. 2012 Accepted
4. Nishimura Y, Natsume A, Ito M, Hara M, Motomura K, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Aoki I, Saga T, Lee HJ, Wakabayashi T, Kim SU. Interferon- β delivery via human neural stem cell abates glial scar formation in spinal cord injury. Cell Transplant. 2012 Accepted
5. Mi P, Cabral H, Kokuryo D, Rafi M, Terada Y, Aoki I, Saga T, Takehiko I, Nishiyama N, Kataoka K. Gd-DTPA-loaded polymer-metal complex

micelles with high relaxivity for MR cancer imaging. Biomaterials. 2013 Jan;34(2):492-500

6. Hadjidekov G, Hadjidekova S, Tonchev Z, Bakalova R, Aoki I. Assessing renal function in children with hydronephrosis - additional feature of MR urography. Radiol Oncol. 2011 Dec;45(4):248-58
7. Jo JI, Lin X, Nakahara T, Aoki I, Saga T, Tabata Y. Preparation of Polymer-Based Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent to Visualize Therapeutic Angiogenesis. Tissue Eng Part A. 2013 Jan;19(1-2):30-9
8. Zhelev Z, Gadjeva V, Aoki I, Bakalova R, Saga T. Cell-penetrating nitroxides as molecular sensors for imaging of cancer in vivo, based on tissue redox activity. Mol Biosyst. 2012 Aug 28;8(10):2733-40.
9. Toyota T, Ohguri N, Maruyama K, Fujinami M, Saga T, Aoki I*. Giant Vesicles Containing Superparamagnetic Iron Oxide as Biodegradable Cell-Tracking MRI Probes. Anal Chem. 2012 May 1;84(9):3952-7
10. Hattori S, Hagihara H, Ohira K, Aoki I, Saga T, Suhara T, Higuchi M, Miyakawa T. In vivo evaluation of cellular activity in α CaMKII heterozygous knockout mice using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). Front Integr Neurosci. 2013 Nov 11;7:76. PubMed PMID: 24273499; PubMed Central PMCID:PMC3822296.
11. Takanashi JI, Nitta N, Iwasaki N, Saito S, Tanaka R, Barkovich AJ, Aoki I. Neurochemistry in shiverer mouse depicted on MR spectroscopy. J Magn Reson Imaging. 2013 Nov 14. doi: 10.1002/jmri.24306. [Epub ahead of print] PubMed PMID:24243812.
12. Murayama S, Jo JI, Shibata Y, Liang K, Santa T, Saga T, Aoki I, Kato M. The Simple Preparation of Polyethylene Glycol-Based Soft Nanoparticles Containing Dual Imaging Probes. J Mater Chem B Mater Biol Med. 2013 in press. (IF = 6.101, 2012)

13. Takuwa H, Tajima Y, Kokuryo D, Matsuura T, Kawaguchi H, Masamoto K, Taniguchi J, Ikoma Y, Seki C, Aoki I, Tomita Y, Suzuki N, Kanno I, Ito H. Hemodynamic changes during neural deactivation in awake mice: A measurement by laser-Doppler flowmetry in crossed cerebellar diaschisis. *Brain Res.* 2013 Nov 6;1537:350-5. doi:pri:S0006-8993(13)01297-3. 10.1016/j.brainres.2013.09.023. PubMed PMID: 24076448.
 14. Zhelev Z, Bakalova R, Aoki I, Lazarova D, Saga T. Imaging of Superoxide Generation in the Dopaminergic Area of the Brain in Parkinson's Disease, Using Mito-TEMPO. *ACS Chem Neurosci.* 2013 Nov 20;4(11):1439-45. PubMed PMID:24024751. (IF = 3.871, 2012)
 15. Enomoto T, Kawano M, Fukuda H, Sawada W, Inoue T, Haw KC, Kita Y, Sakamoto S, Yamaguchi Y, Imai T, Hatakeyama M, Saito S, Sandhu A, Matsui M, Aoki I, Handa H. Viral protein-coating of magnetic nanoparticles using simian virus 40 VP1. *J Biotechnol.* 2013 Jun 17;167(1):8-15. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.06.005. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 23791947.
 16. Sawada K, Horiuchi-Hirose M, Saito S, Aoki I. MRI-based morphometric characterizations of sexual dimorphism of the cerebrum of ferrets (*Mustela putorius*). *Neuroimage.* 2013 Dec;83:294-306. doi:pri:S1053-8119(13)00661-7. 10.1016/j.neuroimage.2013.06.024. PubMed PMID: 23770407. (IF = 6.252, 2012)
 17. Saito S, Hasegawa S, Sekita A, Bakalova R, Furukawa T, Murase K, Saga T, Aoki I. Manganese-enhanced MRI reveals early-phase radiation-induced cell alterations in vivo. *Cancer Res.* 2013 Jun 1;73(11):3216-24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-12-3837. Epub 2013 May 21. PubMed PMID: 23695553. (IF = 8.650, 2012)
 18. Bakalova R, Zhelev Z, Aoki I, Saga T. Tissue redox activity as a hallmark of carcinogenesis: from early to terminal stages of cancer. *Clin Cancer Res.* 2013 May 1;19(9):2503-17. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3726. Epub 2013 Mar 26. PubMed PMID: 23532887. (IF = 7.837, 2012)
 19. Iida S, Imai K, Matsuda S, Itano O, Hatakeyama M, Sakamoto S, Kokuryo D, Okabayashi K, Endo T, Ishii Y, Hasegawa H, Aoki I, Handa H, Kitagawa Y. In vivo identification of sentinel lymph nodes using MRI and size-controlled and monodispersed magnetite nanoparticles. *J Magn Reson Imaging.* 2013 Dec;38(6):1346-55. doi:10.1002/jmri.24108. PubMed PMID: 23554026. (IF = 2.566, 2012)
2. 学会発表
 1. (招待講演) 青木伊知男, げっ歯類の高磁場 MRI, 包括型脳 MRI 画像チュートリアル, 包括型脳科学研究推進支援ネットワーク, 名古屋大学, Sep 17, 2012
 2. (招待講演) 青木伊知男, 高磁場 MRI と機能性プローブによる分子イメージングへの取り組み, よこはま NMR 構造生物学研究会 第 45 回ワークショップ「イメージングと創薬」, 横浜, 理化学研究所横浜研究所, July 11, 2012
 3. (招待講演) 青木伊知男, ナノ粒子造影剤の可能性～高磁場 MRI による前臨床研究から～, 第 68 回日本放射線技術学会総会学術大会・シンポジウム 2 「Spectral CT imaging の夜明け」, 横浜, April 14, 2012
 4. SPI0-containing unilamellar polyion complex vesicles (PICsome) for in vivo tumor detection using MRI, Daisuke Kokuryo, Yasutaka Anraku, Akirio Kishimura, Mitsunobu R Kano, Sayaka Tanaka, Tsuneo Saga, Kazunori Kataoka, Ichio Aoki, 2012 World Molecular Imaging Congress, Dublin, Ireland, P421, Sep 5-8, 2012.
 5. Noninvasive detection of early pathophysiological changes of irradiated bone marrow in mouse radiation carcinogenesis by diffusion-weighted imaging, Hasegawa S, Morokoshi Y, Furukawa T, Aoki I, Saga T, 2012 World Molecular Imaging