

光線力学的療法・ホウ素中性子捕捉療法薬としての
新規クロリン誘導体の合成と評価に関する研究

県立広島大学大学院
総合学術研究科
生命システム科学専攻

博士論文

平成 27 年 9 月

(2015 年)

浅野 龍二

目次

第1章 序論.....	1
第2章 PDT薬としての新規水溶性クロリン誘導体の合成と評価.....	14
第1節 はじめに.....	14
第2節 実験方法.....	15
第1項 試薬および一般的測定方法.....	15
第2項 水溶性クロリン誘導体の合成.....	16
第3項 動物および腫瘍.....	20
第4項 <i>In vivo</i> でのクロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	21
第5項 <i>In vivo</i> でのクロリン誘導体を用いたPDTによる抗がん効果の評価.....	22
第3節 結果および考察.....	24
第1項 新規水溶性クロリン誘導体の分子設計.....	24
第2項 新規水溶性クロリン誘導体の合成.....	25
第3項 <i>In vivo</i> でのクロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	29
第4項 <i>In vivo</i> でのクロリン誘導体を用いたPDTによる抗がん効果の評価.....	34
第4節 第2章の結論.....	37
第3章 PDTおよびBNCT両用薬としての新規BPA結合型クロリン誘導体の合成と評価.....	38
第1節 はじめに.....	38
第2節 実験方法.....	39
第1項 試薬および一般的測定方法.....	39
第2項 BPA結合型クロリン誘導体の合成.....	40
第3項 動物および腫瘍.....	46
第4項 <i>In vivo</i> でのBPA結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	46
第5項 <i>In vivo</i> でのBPA結合型誘導体を用いたPDTによる抗がん効果の評価.....	48
第6項 <i>In vitro</i> でのBPA結合型誘導体の細胞毒性評価.....	48
第3節 結果および考察.....	50
第1項 新規BPA結合型クロリン誘導体の分子設計.....	50
第2項 新規BPA結合型クロリン誘導体の合成.....	51
第3項 <i>In vivo</i> でのBPA結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	58
第4項 <i>In vivo</i> でのBPA結合型誘導体を用いたPDTによる抗がん効果の評価.....	62
第4節 第3章の結論.....	65
第4章 PDTおよびBNCT両用薬としての新規BSH結合型クロリン誘導体の合成と評価.....	66
第1節 はじめに.....	66
第2節 実験方法.....	66
第1項 試薬および一般的測定方法.....	66

第2項	BSH 結合型クロリン誘導体の合成.....	67
第3項	動物および腫瘍.....	77
第4項	<i>In vivo</i> での BSH 結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	78
第5項	<i>In vivo</i> での BSH 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価.....	79
第6項	<i>In vitro</i> での BSH 結合型誘導体の細胞毒性評価.....	79
第3節	結果および考察.....	81
第1項	新規 BSH 結合型クロリン誘導体の分子設計.....	81
第2項	新規 BSH 結合型クロリン誘導体の合成.....	83
第3項	<i>In vivo</i> での BSH 結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価.....	91
第4項	<i>In vivo</i> での BSH 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価.....	96
第4節	第4章の結論.....	100
第5章	結論.....	101
参考文献	104
論文目録	116
略語一覧	117
謝辞	118

第1章 序論

厚生労働省による2013年における死因順位別の死亡数・死亡率(人口10万対)は、第1位が悪性新生物(がん)で364,721人・290.1、第2位が心疾患で196,547人・156.4、第3位が肺炎で122,880人・97.8であった(Fig. 1.1)¹⁾。1947年以降の年次推移では、がんの死亡率は一貫して上昇を続け、1981年以降において、がんの死因順位は第1位となった(Fig. 1.1)。また、2013年の全死亡者数1,268,432人に占めるがんの死亡者数の割合は28.8%であり、全死亡者数の約3.5人に1人はがんで死亡している¹⁾。このように、現在、がんは国民の生命およびQOLに対する最大の脅威である。

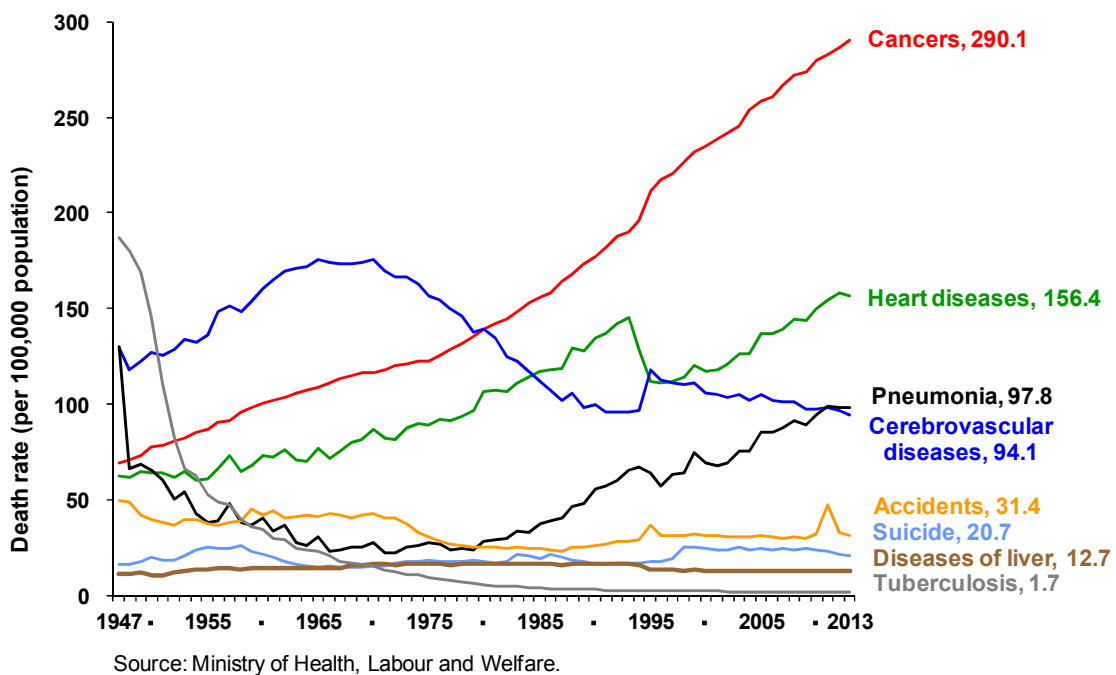


Figure 1.1. Trends in death rates for leading causes of death, 1947-2013.

がんとは、細胞が無制限に増殖して周囲の正常な細胞を破壊し、様々な部位に転移し、生命に危険を及ぼす腫瘍であり、基本的に全ての臓器、組織にがんが発生する。がんは、上皮細胞からなる癌(肺がん、乳がん、胃がん、大腸がん、子宮がん、卵巣がん等)、非上皮性細胞からなる肉腫(骨肉腫、軟骨肉腫、横紋筋肉腫等)および造血器でできるもの(白血病、悪性リンパ腫、骨髄腫等)に大きく分類される。がんの特徴として以下の3点が挙げられる²⁾。(1)ヒトの正常な新陳代謝の都合を無視して自律的に増殖を続ける(自律性増殖)。(2)周囲に広がり、体の至る所に転移し、新しいがん組織を形成する(浸潤および転移)。(3)他の正常組織から栄養を奪取する(悪液質)。

がんの標準的な治療法には、外科療法、化学療法および放射線療法の3種類があり、これらは総称してがんの3大療法と呼ばれている。第1の外科療法とは、手術によりがんの原発巣および転移巣を含めて一塊として切除する治療法である。外科療法では、がんが原発部位のみに留まっており、検査で発見出来ない微小転移がない場合において、病巣を完全に切除することができれば完治の可能性が高い。手術後の創部の治癒および全身の回復に時間を要するため、体への負担が大きく、切除した部位によっては生体機能が損なわれる等により、患者のQOLが低下することが外科療法における欠点である。最近では切除する範囲を最小限に留める縮小手術や内視鏡を用いた腹腔鏡・胸腔鏡下手術によって体への負担を少なくする手術の普及が進んでいる。第2の化学療法とは、抗がん剤を用いてがん細胞の増殖を抑制し、死滅させる治療法である。外科療法や放射線療法が、がんに対する直接的・局所的な治療であるのに対して化学療法ではより広い範囲に治療が及ぶことが期待できるため、転移または転移の可能性がある場合や広範囲に治療が必要な白血病、悪性リンパ腫等に対して行われる。また、化学療法は単独で行われる場合と外科療法や放射線療法等の他の治療法と組み合わせて行われる場合がある。現在用いられている抗がん剤はがん細胞だけに作用し、正常細胞には作用しないという選択毒性を持たないた

め、脱毛、吐き気、倦怠感等の副作用を生じることが化学療法における欠点である。第3の放射線療法とは、がん病巣にX線や γ 線のような放射線を照射することにより、細胞のDNAに直接作用し、がん細胞の増殖能を消失させ、また、そのアポトーシスを増強させることにより死滅させる局所療法である。放射線はがん細胞だけでなく正常細胞にも同様に作用するものの、がん細胞は正常細胞と比較し、損傷から回復する能力が乏しいことから放射線の影響を強く受けて死滅する。ただし、正常細胞への影響を避けることはできないため、放射線照射部位周辺に副作用が生じることが放射線療法における欠点である。近年では治療前の検査技術や照射方法の進歩によって、がん病巣の大きさや位置を正確に測り、その病巣だけに集中的に照射することが可能になり、副作用が軽減されている。

以上のように、がんの3大療法は医療技術の進歩と共に副作用が軽減され、QOLが改善されてきた。しかしながら、未だ患者に負担の大きい治療法であることに変わりはなく、その代替療法として数多くの治療法が研究されてきた。その中でも患者のQOLを重視した低侵襲で副作用の少ない光線力学的療法(PDT)およびホウ素中性子捕捉療法(BNCT)は、3大療法に次ぐ第4のがん治療法として注目されている。PDTは腫瘍集積性を有する光感受性物質と可視光との併用により起こる光化学反応を利用した治療法であり、BNCTは腫瘍集積性を有するホウ素10同位体(^{10}B)を含むホウ素化合物と中性子線との併用により起こる核反応を利用したがん治療法である。両治療法において腫瘍集積性を有する薬剤(光感受性物質およびホウ素化合物)および放射線(可視光および中性子線)は、それぞれ単独では毒性を示さないが、組み合わせられた際に抗腫瘍効果を示すことから、両治療法はバイモーダル治療と呼ばれる。

PDTでは、まず、がん親和性を有する光感受性物質を静脈注射などの方法により投与し、がん組織に選択的に集積させる(Fig. 1.2)。その後、当該がん組織に可視光を照射することにより、がん組織内で光化学反応が起こり、その結果

として発生する一重項酸素およびフリーラジカル種の強い殺細胞効果を利用して、がん組織を選択的に破壊する³⁻⁵⁾。故に、PDTは3大療法と比較して臓器への侵襲が少なく、がん組織に対する選択性が高いため、臓器の温存が可能で副作用の少ないQOLを重視した治療法である。

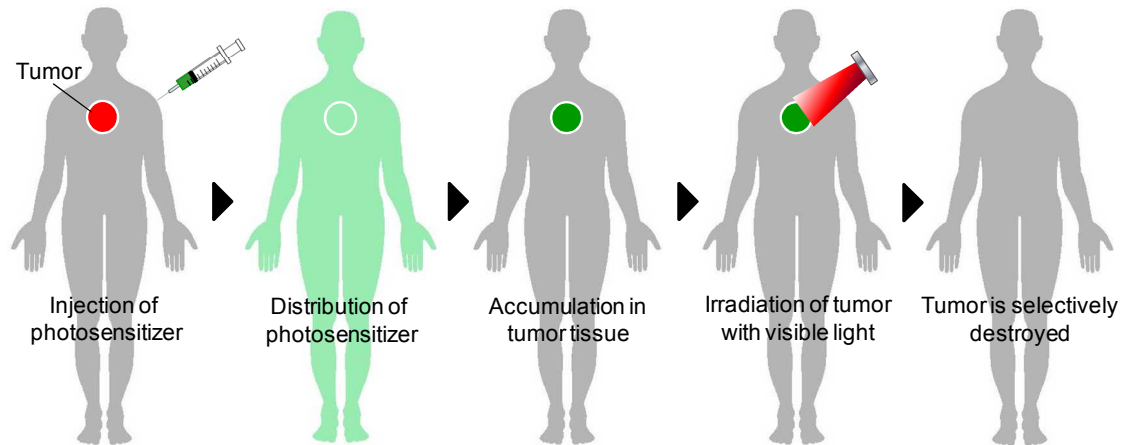


Figure 1.2. The principles of PDT.

PDTにおける光化学反応は、機構の違いから Type 1 および Type 2 に大別される(Fig. 1.3)⁶⁻⁸⁾。Type 1 は、基底状態の光感受性物質 M_0 が光励起された励起一重項状態 $^1M^*$ から項間交差を経て励起三重項状態 $^3M^*$ となり、それが直接的に生体組織と反応してフリーラジカル種を生成し、それと溶存酸素 3O_2 とが反応してがん細胞に傷害を与える機構である。Type 2 は、励起三重項状態の光感受性物質 $^3M^*$ から組織中の溶存酸素 3O_2 へのエネルギー移動により一重項酸素 $^1O_2^*$ を生成し、それががん細胞に傷害を与える機構である。PDTにおける光化学反応の殆どが Type 2 による一重項酸素によるとされている⁸⁻¹²⁾。当該光化学反応は、光感受性物質が集積した細胞のみで効果が発揮されることから、正常細胞への影響を排除するためには、がん細胞への高選択的な集積性を有する光感受性物質を使用することが求められる。

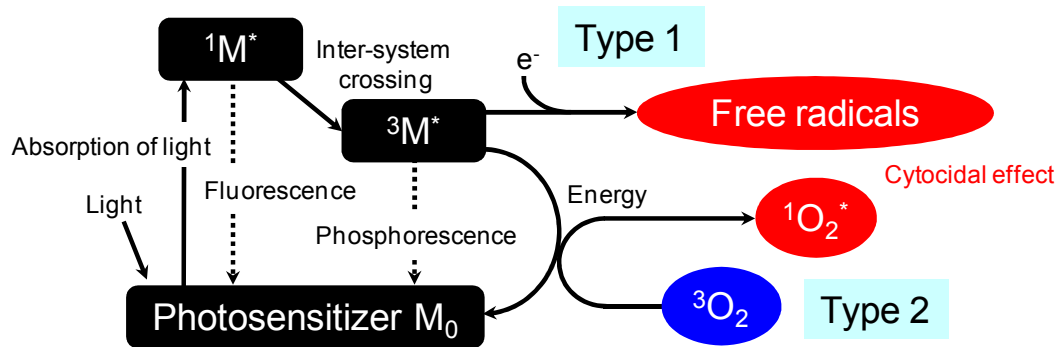


Figure 1.3. An overview of the two types of photosensitization processes.

PDTの歴史は古く、その起源は1900年にRaabが染料のアクリジンと光の併用によりゾウリムシが死滅することを発見したことであり¹³⁾、次いで1903年にTappeinerがエオシン色素と光照射によって腫瘍が壊死したことを報告した¹⁴⁾。1924年にPolicardがポルフィリンと腫瘍との親和性を発見し¹⁵⁾、このポルフィリン誘導体を光感受性物質として使用するPDTの研究は、1960年にLipsonがヘマトポルフィリンを酢酸と硫酸で処理し、より高い腫瘍集積性を有するヘマトポルフィリン誘導体を開発したことから開始された¹⁶⁾。ヘマトポルフィリン誘導体であるPhotofrin^{®17-19)}(Fig. 1.4)は、現在、最も広く使用されている第1世代光感受性物質である。日本では、1994年にPhotofrin[®]とエキシマ・ダイ・レーザーを使用したPDTが早期肺癌、表在性食道がん、表在性早期胃がん、子宮頸部初期がんおよび異形成への使用に対して厚生省(現厚生労働省)の認可を受け、1996年に保険適用となり、良好な治療成績をあげている²⁰⁻²³⁾。

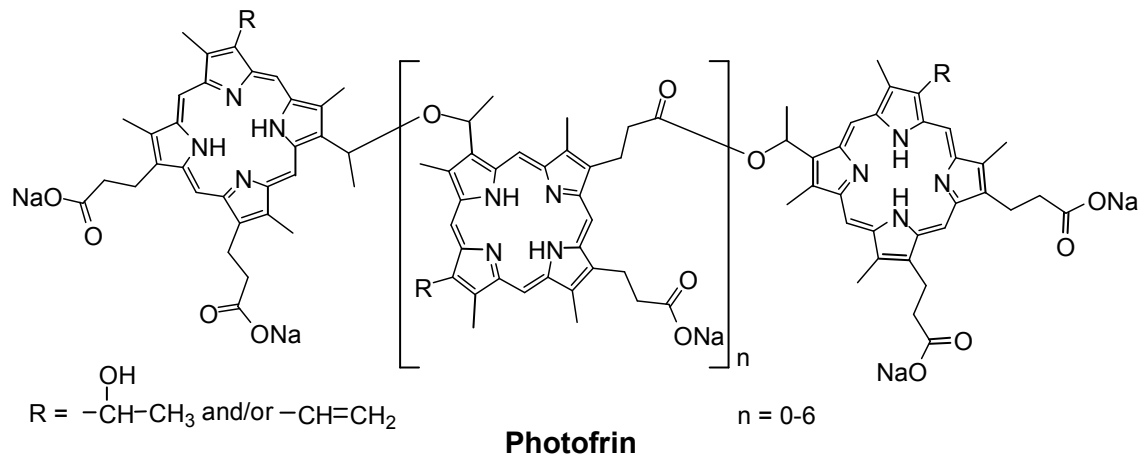


Figure 1.4. Chemical structure of Photofrin.

PDT に使用される光感受性物質に求められる第 1 の性能として、組織透過性の高い波長領域にて効率良く励起されることが挙げられる。PDT の治療手段は主に光が使用されるため、生体組織内に存在する水、酸化ヘモグロビンおよびメラニン等の影響が少ない 650~800 nm の波長領域にて効率良く励起される光感受性物質を使用することが PDT 治療効果の向上に寄与すると考えられる²⁴⁾。次に第 2 の性能として、がん組織に高度に集積し、正常組織から速やかに排泄されることが挙げられる。本性能により正常組織への影響を軽減し、がん組織選択的な治療効果の向上が期待できる。また、PDT では皮膚組織に残存した薬剤により一時的な光線過敏症となり、直射日光などの強い光を受けた場合、副作用として火傷のような症状が生じる危険性があり、優れた正常組織からの排泄性を有することは当該副作用に対する遮光期間の短縮に繋がる。現在最も広く普及している光感受性物質である Photofrin[®]は上記の求められる性能に幾つかの欠点を有する。Photofrin[®]は組織透過性の比較的高い 630 nm の赤色光照射で励起され、光化学反応を惹起するが、当該波長における吸収強度が弱い。そのため、Photofrin[®]を用いた PDT の治療効果は 5~10 mm の表層がんに限定さ

れる。また、Photofrin[®]はがん組織選択性が低く、正常組織への集積性が認められると共に正常組織からの排泄時間が長い。この結果として引き起こされる光線過敏症を防ぐために1ヶ月以上の遮光生活を余儀なくされる。

これらの Photofrin[®]の欠点を解決するために、第2世代光感受性物質の開発が1990年代に開始され、Foscan[®](*meta*-tetrahydroxyphenyl chlorin, *m*-THPC, Temoporfin)²⁵⁻²⁹⁾が頭頸部がんの緩和治療として2001年に欧州連合(EU)で認可され、Laserphyrin[®](mono-L-aspartyl chlorin e6, NPe6, Talaporfin sodium)^{30,31)}が早期肺がんの治療として2003年に認可された(Fig. 1.5)。Photofrin[®]がヘマトポルフィリン誘導体であるのに対して、Foscan[®]および Laserphyrin[®]はポルフィリン骨格内のピロール環の一部が還元されたクロリン誘導体である。これらの薬剤に加えて、Tin ethyl etiopurpurin(SnET2)^{32,33)}および Lutetium texaphyrin³⁴⁻³⁶⁾が臨床試験に使用されてきた(Fig. 1.5)。上記4種類の光感受性物質は Photofrin[®]と比較して長波長領域(Foscan[®] : 652 nm、Laserphyrin[®] : 664 nm、Tin ethyl etiopurpurin : 660 nm、Lutetium texaphyrin : 732 nm)に極大吸収波長を有し、その励起効率も優れているため、前述の光感受性物質に求められる第1の性能に関しては大きな進展があった。しかしながら、これらの薬剤により引き起こされる光線過敏症を防ぐための遮光期間は、Photofrin[®]と比較して改善されたものの、少なくとも2週間必要であり、正常組織からの排泄性に関しては、更なる改善が望まれている。

以上のことから、組織透過性が良い650~800 nmの光照射で効率良く励起され、がん組織への高い選択性および蓄積性、ならびに正常組織からの速やかな排泄性を有する新規光感受性物質の開発は、PDTにおける副作用を軽減し、その治療効果を向上するための大きな課題の一つである。

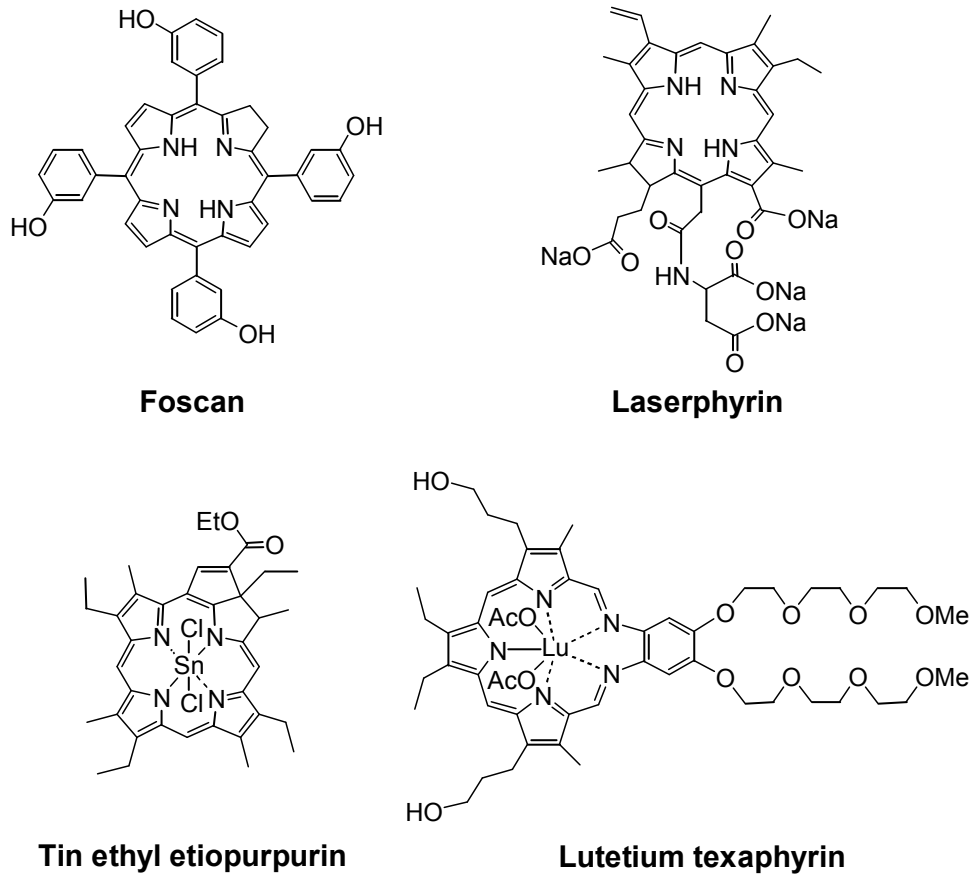


Figure 1.5. Chemical structures of some photosensitizers used in PDT.

一方、BNCTでは、がん細胞に ^{10}B を含むホウ素化合物を予め取り込ませた後、原子炉または加速器から供給される低エネルギーの中性子線(主に熱中性子線)を照射すると、がん細胞内では熱中性子が ^{10}B に衝突することによる核反応が起こり、効率的に α 粒子(^4He)およびリチウム原子核(^7Li)が放出される(Fig. 1.6)。これらは修復不能なDNAの2重鎖を切断するため殺細胞効果が高く、それらの到達距離が4~9 μm であり、この飛距離はおよそ細胞一個の直径に相当するため、正常細胞を損傷することなくホウ素化合物が集積したがん細胞を選択的に破壊する³⁷⁻⁴⁰⁾。また、中性子と ^{10}B 原子核[3,837 barn、中性子捕獲断面積(barn) : 10^{-24} cm^2]の反応確率は、中性子と生体構成元素の中で最も大きい ^{14}N 原子核

(1.81 barn)の反応確率の2,000倍以上であり、本治療法では、PDTにおける光感受性物質と同様に ^{10}B を含むホウ素化合物をがん細胞に選択的に集積させることが治療効果を向上させる上で不可欠である。

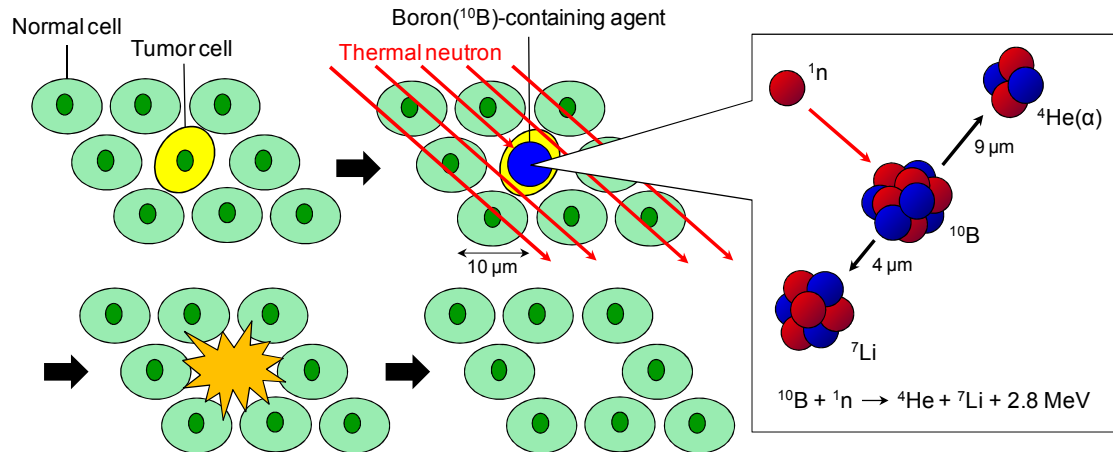


Figure 1.6. Schematic process of BNCT.

現在、BNCTの臨床治療で使用されているホウ素化合物はBPA^{41,42)}およびBSH⁴³⁻⁴⁵⁾である(Fig. 1.7)。なお、天然のホウ素は ^{11}B を80%、 ^{10}B を20%含有しているため、当該BPAおよびBSHは、 ^{10}B を濃縮精製された薬剤である。BPAはアミノ酸のチロシンにホウ素原子が結合した化学構造を有していることから、アミノ酸の取り込みが亢進しているがん細胞に能動的に取り込まれると考えられている。さらに、チロシンがメラニン生合成の前駆物質であるため、メラニン生合成が活発な悪性黒色種では前述のアミノ酸取り込み亢進との相乗効果にて集積性がより高まるため、BPAは主に悪性黒色種の治療に用いられてきた⁴⁶⁾。BSHは12個のホウ素原子がカゴ状に結合した化合物であり、それ自体にがん細胞への選択性はない。しかしながら、脳腫瘍では血液脳関門が破壊されていることから、BSHが腫瘍内に受動的に取り込まれると考えられ、正常脳細胞に集積しないBSHが相対的に脳腫瘍に集積することを利用して、その治療に用いら

れてきた。また、BPAおよびBSHは極めて低毒性な化合物である。具体的には、BSHおよびBPAの投与量は5 g/bodyおよび250 mg/kgであり、一般の薬剤と比較して10~100倍の容量を治療に用いた場合においても安全である。その反面、BPAは腫瘍組織内に高く集積するが、正常組織にも比較的取り込まれること、BSHは正常組織へ集積しないが、腫瘍組織内の集積が不十分であることから、がん細胞に高選択的な集積性を有する効果的な薬剤の開発が求められている。

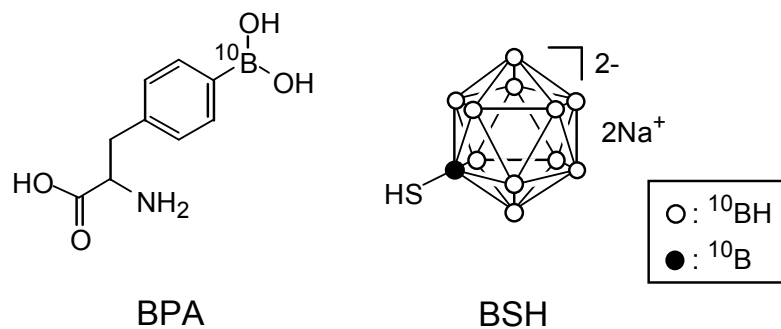


Figure 1.7. Chemical structures of BPA and BSH.

過去数十年に渡って、ホウ素を含有する核酸誘導体⁴⁷⁻⁴⁹⁾、アミノ酸誘導体^{50,51)}、ペプチド誘導体⁵²⁾、糖誘導体^{53,54)}およびリポソーム⁵⁵⁾等のBNCT薬候補化合物が数多く合成され、評価されてきた。それらの化合物に加えて、PDTで実用化されているポルフィリン誘導体の腫瘍集積性に着目し、それをホウ素キャリアーとして利用する試みも行われてきた⁵⁶⁻⁵⁹⁾。ところで、ポルフィリン誘導体の腫瘍集積性のメカニズムは未だ全面的な解明には至っていないが、これまでFig. 1.8のように説明されてきた。ポルフィリンは豊富な π 電子を有するためにタンパク質に非常に高い親和性を有すると共にStacking現象と呼ばれる外部環境に溶け込む性質(ミセル化、親水性環境下では親水性側鎖基を外側に出し、疎水性環境下では疎水性側鎖基外側に出すような)を示す。この特異な両親媒性のために水に溶解する形をとりながら低比重リポタンパク質(LDL)に高い親和性を有

する。がん組織における活発な増殖を維持するためのLDL受容体活性の上昇および組織における毛細血管透過性亢進の相乗効果によりポルフィリンと結合したLDLは能動的に細胞内へ取り込まれる。がん組織ではリンパ系組織が未発達または欠如しており、LDLと結合したポルフィリンを排除することができないため、ポルフィリンは特異的な腫瘍集積性を獲得すると考えられている⁶⁰⁾。一方、Laserphyrin[®]などの親水性ポルフィリン誘導体では、優れた腫瘍集積性を示すものがLDLに親和性を示さず、腫瘍集積性をあまり示さないものがLDLに親和性を示す等の事実が明らかになってきている⁶¹⁾。そのため、LDLに代わるキャリアータンパク質が模索され、最近ではヘモペキシンの関与が有力視されており^{8,62)}、その腫瘍集積性のメカニズムの全面的な解明に向けて、研究が精力的に行われているところである。以上のことから、ポルフィリン誘導体を結合したホウ素化合物は腫瘍集積性の向上が期待でき、それに加えてPDTおよびBNCTの併用療法に使用する両用薬としての利用も可能となる。PDTおよびBNCTの両用薬としてホウ素ポルフィリン誘導体に代わる、より効果的なホウ素クロリン誘導体が開発されており⁶³⁾、今後、更なる進展が望まれている。

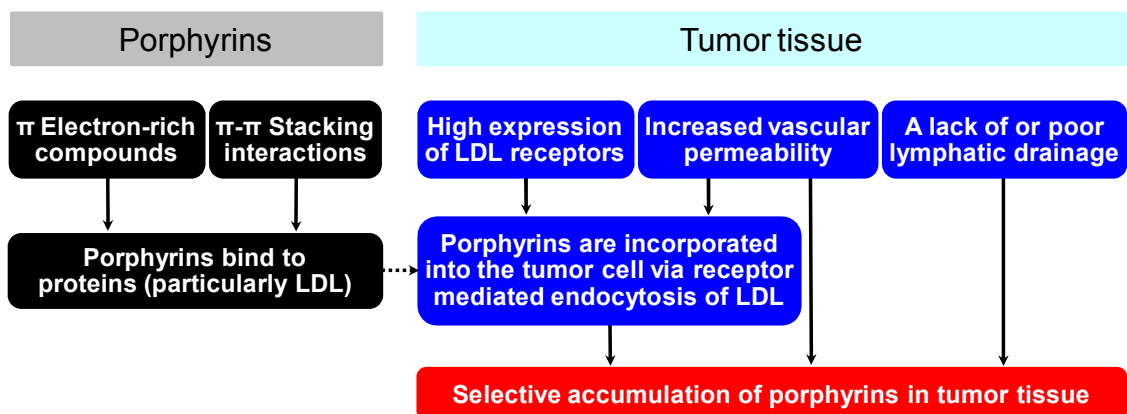


Figure 1.8. The mechanism of tumor selective accumulation of porphyrins.

上記の背景を踏まえて、本研究ではPDTの治療効果の向上と副作用の軽減を志向した新規光感受性物質の開発を第1の目的とした。新規光感受性物質の出発原料として、photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)^{64,65}(Fig. 1.9)を選択した。誘導体**1**はポルフィリン類似化合物のクロリン誘導体であり、比較的組織透過性の高い670 nmに極大吸収を有する。本クロリン誘導体**1**を基に正常組織から排泄性の向上を目指して水溶性クロリン誘導体を合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体についてPDTの治療効果を評価した。次に、既存のBNCT薬の低腫瘍集積性を改善し、PDTおよびBNCTの双方に適用可能な新規ホウ素化合物の開発を第2の目的とした。PDT薬として最も高い評価が得られた新規水溶性クロリン誘導体の化学構造を基に、既存のBNCT薬であるBPAまたはBSHを導入した新規水溶性ホウ素クロリン誘導体を分子設計・合成し、これらの腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性を評価し、PDTおよびBNCT両用薬としての可能性を検討した。

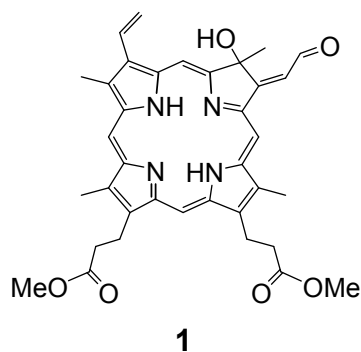


Figure 1.9. Chemical structure of photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**).

本論文は全5章で構成されている。第1章では、序論としてがんの3大療法、PDTおよびBNCTの概要を説明し、これらの問題点から本研究の目的を述べる。第2章では、クロリン誘導体**1**を出発原料として、正常組織からの排泄性の向上を目指したPDT用光感受性物質としての新規水溶性クロリン誘導体を3種類合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優

れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した結果を述べる⁶⁶⁾。第3章および第4章では、既存の BNCT 薬の低腫瘍集積性を改善するために、第2章の結果より得られた PDT 薬として最も優れたクロリン誘導体の化学構造を基に、BPA または BSH を導入した新規ホウ素クロリン誘導体を6種類合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した結果を述べる^{67,68)}。第5章では、結論として本研究の総括を述べる。

第2章 PDT薬としての新規水溶性クロリン誘導体の合成と評価

第1節 はじめに

PDTは、腫瘍集積性を有する光感受性物質と可視光による光化学反応によって発生する一重項酸素およびフリーラジカル種の強い殺細胞効果を利用して、がん組織を選択的に破壊する治療法である。また、がんの3大療法と比較して、臓器の温存が可能で副作用が少ないことから、患者のQOLを向上する新しい治療法として注目されている³⁻⁵⁾。現在、最も広く使用されている第1世代光感受性物質は、ヘマトポルフィリン誘導体のPhotofrin^{®17-19)}であり、臨床薬として最初に認可を受けた薬剤である。しかしながら、Photofrin[®]はがん組織選択性が低く、血清や皮膚からの排泄が遅いため長期の光線過敏症を起し、比較的組織透過性の良い630 nmで励起されるが、この波長の吸収強度が弱く励起効率が悪いという欠点を有する。これらの欠点を解決するためにポルフィリン類似化合物のクロリン誘導体である Foscan^{®25-29)}、Laserphyrin^{®30,31)}、Tin ethyl etiopurpurin^{32,33)}および Lutetium texaphyrin³⁴⁻³⁶⁾等の第2世代光感受性物質が開発され、これらはPhotofrin[®]と比較して長波長領域に極大吸収波長(652、664、660および732 nm)を有し、励起効率に関しては改善された。光線過敏症を防ぐための遮光期間もPhotofrin[®]と比較して短縮されたが、少なくとも2週間は必要であり、更なる副作用の低減には、新しい光感受性物質の開発が手段の一つである。この新しい光感受性物質は組織透過性の高い650~800 nmの光照射で効率良く励起し、既存薬よりも腫瘍組織に対する選択的集積性を有すると共に正常組織からの速い排泄性を有することが求められる。

本章では、正常組織からの排泄性の向上を目指し、3種類の新規水溶性クロ

リン誘導体を合成した。その出発原料には、photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)^{64,65}を選択した。出発原料 **1** は、医薬品原料として容易に入手可能なポルフィリン誘導体である protoporphyrin IX dimethyl ester の光酸化反応で調製され、670 nm に極大吸収波長を有するクロリン誘導体である。3 種類の新規水溶性クロリン誘導体の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性を評価し、その中で最も優れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した。

第2節 実験方法

第1項 試薬および一般的測定方法

Photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)およびイミノジ酢酸ジメチルエステル塩酸塩は文献に従い合成した^{64,65,69}。他の全ての試薬および溶媒は和光純薬工業株式会社またはシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。TLC はメルク株式会社から購入した Silica gel 60 F₂₅₄ または RP-8 F_{254S} で行った。カラムクロマトグラフィーは和光純薬工業株式会社から購入したシリカゲル (Wakogel C-200, 75~150 μm) で行った。¹H NMR の測定にはブルカー社製 ARX-400 (400 MHz) またはバリアン社製 NMR System 600 (600 MHz) を使用し、テトラメチルシランを内部標準物質とした。化学シフトは ppm (δ) で記録し、カップリングコンスタント (*J*) は Hz 単位で表した。MS の測定には株式会社島津製作所製単一四重極質量分析計 LCMS-QP8000 を使用し、ESI (陽イオン) で行った。HRMS の測定にはブルカー製 MicrOTOF II を使用し、ESI (陰イオン) で行った。UV-vis スペクトルの測定には株式会社島津製作所製 UV-2400PC を使用した。HPLC 分析には株式会社日立製作所製 L-7100 (送液ポンプ)、L-7420 (検出器)、L-7300 (カラムオーブン) および D-2500 (クロマトインジケータ) で構成されるシステムを使用し、各化合物の純度決定を行った。HPLC 測定条件は分離カラ

ムを Symmetry Shield RP18 (4.6 i.d. × 150 mm, 3.5 μm, ウォーターズ社製)、移動相をメタノール/水/ギ酸(65 : 34.5 : 0.5, v/v/v)とし、カラム温度 40 °C、流速 0.5 mL/min、検出波長 415 nm、アイソクラティック溶出モードとした。

第2項 水溶性クロリン誘導体の合成

3-Ethenyl-8-(2-hydroxyethylidene)-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13, 17-dipropionic acid dimethyl ester (2)

Photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**, 2 g, 3.2 mmol)を DMF (40 mL)に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム(125 mg, 3.3 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を水(100 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をジクロロメタンで再結晶化し、**2** (1.7 g, 84%)を得た。

ESI-MS m/z : 625 $[M+H]^+$. 1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz) δ : -1.86 (1H, br s); -1.83 (1H, br s); 2.54 (3H, s); 3.34 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 3.36 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 3.39 (3H, s); 3.45 (3H, s); 3.57 (3H, s); 3.58 (3H, s); 3.58 (3H, s); 4.35 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 4.41 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 5.87 (2H, dtd, $J = 6.6, 13.8, 13.8$ Hz); 5.91 (1H, dtd, $J = 6.6, 13.8, 13.8$ Hz); 6.01 (1H, dd, $J = 1.2, 11.4$ Hz); 6.34 (1H, dd, $J = 1.2, 18.0$ Hz); 8.08 (1H, t, $J = 6.6$ Hz); 8.23 (1H, dd, $J = 11.4, 18.0$ Hz); 8.90 (1H, br s); 9.60 (1H, s); 9.87 (1H, s); 10.04 (1H, s); 10.17 (1H, s).

3-Ethenyl-8-(2-hydroxyethylidene)-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13, 17-dipropionic acid disodium salt (3)

2 (1.3 g, 2.1 mmol)を DMF (80 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (40 mL)を加え、室温で2時間攪拌した。反応液をアセトニトリル/酢酸エチル

(200 mL, 3 : 1, v/v)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、アセトニトリル/エタノール(1 : 1, v/v)で洗浄後、乾燥し、**3** (1.1 g, 81%)を得た。

ESI-MS m/z : 597 $[M-2Na+3H]^+$. UV-Vis λ_{max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 388 (109.3), 507 (8.3), 537 (8.0), 565 (6.7), 598 (6.6), 653 (16.2). ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 2.35 (3H s); 3.26-3.34 (4H, m); 3.43 (3H, s); 3.47 (3H, s); 3.49 (3H, s); 4.48 (2H, dd, $J = 7.2, 10.2$ Hz); 4.54 (2H, dd, $J = 7.2, 10.2$ Hz); 5.54-5.64 (2H, m); 6.13 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.30 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 7.78 (1H, t, $J = 6.6$ Hz); 8.09 (1H, dd, $J = 12.0, 18.0$ Hz); 9.35 (1H, s); 9.51 (1H, s); 9.83 (1H, s); 10.26 (1H, s). ESI-HRMS m/z $[M-2Na+H]^-$: calcd for C₃₄H₃₅N₄O₆: 595.2557; found 595.2580. HPLC: R_t 7.6 min, 97.5% purity.

3-Ethenyl-7-hydroxyl-8-ethoxyiminoethylidene-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13, 17-dipropionic acid dimethyl ester (4)

1 (2 g, 3.2 mmol)をピリジン(100 mL)に溶解し、エトキシルアミン塩酸塩(480 mg, 4.9 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を水(200 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥し、**4** (2.1 g, 98%)を得た。

ESI-MS m/z : 666 $[M+H]^+$. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 400 MHz) δ : -1.96 (1H, br s); -1.92 (1H, br s); 1.46 (3H, t, $J = 7.0$ Hz); 2.48 (2.4H, s); 2.52 (0.6H, s); 3.27-3.42 (4H, m); 3.36 (0.6H, s); 3.46 (2.4H, s); 3.47 (3H, s); 3.59 (9H, s); 4.37 (2H, t, $J = 7.5$ Hz); 4.40-4.60 (2H, m); 4.44 (2H, t, $J = 7.7$ Hz); 6.04 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 17.6$ Hz); 8.24 (1H, dd, $J = 11.6, 17.6$ Hz); 8.43 (0.9H, d, $J = 10.4$ Hz); 8.94 (0.2H, d, $J = 10.0$ Hz); 9.15 (0.8H, br s); 9.29 (0.1H, br s); 9.55 (0.2H, d, $J = 10.0$ Hz); 9.71 (0.8H, s); 9.77 (0.2H, s); 9.89 (1H, s); 10.00 (0.8H, d, $J = 10.4$ Hz); 10.07 (1H, s); 10.24 (1H, s).

3-Ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13, 17-dipropionic acid disodium salt (5)

4 (2 g, 3.0 mmol)をピリジン(50 mL)に溶解し、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(10 mL)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を酢酸エチル(200 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、エタノールで洗浄後、乾燥し、**5** (1.5 g, 69%)を得た。

ESI-MS m/z : 638 $[M-2Na+3H]^+$. UV-Vis λ_{max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 341 (25.7), 401 (89.3), 519 (4.6), 562 (7.1), 607 (3.8), 665 (14.9). ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 1.60 (2.4H, t, $J = 7.2$ Hz); 1.67 (0.6H, t, $J = 7.2$ Hz); 1.95 (3H, s); 3.28-3.40 (4H, m); 3.36 (2.4H, s); 3.41 (0.6H, s); 3.48 (3H, s); 3.53 (3H, s); 4.52 (2H, t, $J = 8.4$ Hz); 4.54-4.68 (2H, m); 4.60 (2H, t, $J = 8.4$ Hz); 6.12 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.21 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 7.80 (0.8H, d, $J = 10.8$); 7.91 (1H, dd, $J = 11.4, 18.0$ Hz); 8.18 (0.2H, d, $J = 9.6$ Hz); 8.72 (0.2H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.04 (0.8H, s); 9.08 (0.2H, s); 9.18 (1H, s); 9.27 (0.8H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.72 (1H, s); 10.32 (0.8H, s); 10.34 (0.2H, s). ESI-HRMS m/z $[M-2Na+H]^+$: calcd for C₃₆H₃₈N₅O₆: 636.2822; found 636.2830. HPLC: R_t 43.6 min, 99.5% purity.

3-Ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13, 17-dipropionic acid (6)

1 (5 g, 8.0 mmol)をピリジン(250 mL)に溶解し、エトキシルアミン塩酸塩(1.2 g, 12.3 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。次いで、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (15 mL)を加え、室温でさらに3時間攪拌した。反応液に20%クエン酸水溶液(500 mL)を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥し、**6** [4.5 g, 88%(2工程収率)]を得た。

ESI-MS m/z : 638 $[M+H]^+$. ^1H NMR (pyridine- d_5 , 400 MHz) δ : -1.90 (2H, br s); 1.45 (3H, t, $J = 7.0$ Hz); 2.48 (2.4H, s); 2.52 (0.6H, s); 3.38 (0.6H, s); 3.50, 3.51 (5.4H, s); 3.55-3.62 (4H, m); 3.58 (3H, s); 4.40-4.60 (6H, m); 6.03 (1H, d, $J = 11.6$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 8.24 (1H, dd, $J = 11.6, 17.8$ Hz); 8.41 (0.8H, d, $J = 10.4$ Hz); 8.95 (0.2H, d, $J = 10.0$ Hz); 9.55 (0.2H, d, $J = 10.0$ Hz); 9.69 (0.8H, s); 9.75 (0.2H, s); 9.88 (0.8H, s); 9.91 (0.2H, s); 10.00 (0.8H, d, $J = 10.4$ Hz); 10.05 (1H, s); 10.50 (1H, s).

13,17-Bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (7)

6 (1 g, 1.6 mmol)を DMAc (50 mL)に溶解し、イミノジ酢酸ジメチルエステル塩酸塩(1.5 g, 7.6 mmol)および EDC (4.0 g, 20.9 mmol)を加え、室温で 3.5 時間攪拌した。反応液を水(250 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)で精製し、**7** (920 mg, 62%)を得た。

ESI-MS m/z : 924 $[M+H]^+$. ^1H NMR (pyridine- d_5 , 600 MHz) δ : -1.94 (1H, br s); -1.92 (1H, br s); 1.44 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.46 (2.7H, s); 2.50 (0.2H, s); 3.40 (6H, s); 3.42 (6H, s); 3.48 (3H, s); 3.50 (3H, s); 3.56-3.63 (4H, m); 3.59 (3H, s); 4.42-4.53 (4H, m); 4.55 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 4.63 (2H, s); 4.65 (2H, s); 4.67 (2H, s); 4.78 (2H, s); 6.02 (1H, dd, $J = 1.2, 12.0$ Hz); 6.34 (1H, d, $J = 1.2, 18.0$ Hz); 8.22 (1H, dd, $J = 11.4, 18.0$ Hz); 8.40 (0.9H, d, $J = 10.2$ Hz); 8.91 (0.1H, d, $J = 9.6$ Hz); 9.52 (0.1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.66 (0.9H, s); 9.73 (0.1H, s); 9.86 (0.9H, s); 9.88 (0.1H, s); 9.98 (0.9H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.03 (1H, s); 10.30 (1H, s).

13,17-Bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12, 18-tetramethylporphyrin tetrasodium salt (8)

7 (920 mg, 1.0 mmol) をアセトン(18 mL)およびエタノール(27 mL)の混合溶媒に溶解し、1.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(15 mL)を加え、室温で15分間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(200 mL, 3 : 1, v/v)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、エタノールで洗浄後、乾燥し、**8** (950 mg, 99%)を得た。

ESI-MS m/z : 868 [M-4Na+5H]⁺. UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 417 (95.9), 555 (3.8), 605 (8.3), 663 (21.6). ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 1.59 (2.7H, t, $J = 6.6$ Hz); 1.69 (0.3H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.15 (3H s); 3.42-3.52 (4H, m); 3.53 (3H, s); 3.66 (6H, s); 4.51 (2H, s); 4.53 (2H, s); 4.57-4.62 (8H, m); 4.62-4.72 (2H, m); 6.20 (1H, d, $J = 12.0$ Hz); 6.34 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 8.03 (0.9H, d, $J = 10.8$ Hz); 8.06 (1H, dd, $J = 12.0, 18.0$ Hz); 8.41 (0.1H, d, $J = 9.6$ Hz); 8.93 (0.1H, d, $J = 9.6$ Hz); 9.33 (0.1H, s); 9.37 (0.9H, s); 9.42 (1H, s); 9.47 (0.9H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.95 (1H, s); 10.28 (0.9H, s); 10.28 (0.1H, s). ESI-HRMS m/z [M-4Na+3H]⁻: calcd for C₄₄H₄₈N₇O₁₂: 866.3361; found 866.3349. HPLC: R_t 17.2 min, 99.2% purity.

第3項 動物および腫瘍

マウス大腸がん由来細胞株 colon-26 は理研セルバンクで購入した。Colon-26細胞を10%の非動化したウシ胎児血清(FBS)を含むRPMI 1640培地で、5% CO₂ 雰囲気下、37°Cで培養した。5週齢メスBALB/cマウス(日本クレア株式会社)の背部にcolon-26細胞(3.0×10^7 個/mL)の懸濁液50 μ Lを皮下注射した。移植した腫瘍の大きさが直径約10 mm以上に生育した時、腫瘍を摘出後、およそ2 × 2

mm の小片に切り出し、5 週齢オス BALB/c マウスの左背部皮下に移植針を用いて移植した。移植後(14~21 日)、腫瘍の大きさが直径約 10 mm に達した時、マウスをクロリン誘導体の生体内分布、排泄および PDT 治療効果の検討に使用した。本動物実験は、県立広島大学庄原キャンパスの研究倫理委員会(第 012 号)の承認を得て行った。

第 4 項 *In vivo* でのクロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

クロリン誘導体 **3**, **5** および **8** を超純水に溶解し(2 mg/mL)、colon-26 担がんマウスに 10 mg/kg を尾静脈投与した(マウス 20 g の場合 100 μ L を投与)。担がんマウスから採取された 8 種類の組織および血清について、投与後の下記時間における各クロリン誘導体の生体内分布およびクリアランスを調査するために分析した。8 種類の組織は腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉および皮膚とした。エーテル麻酔下、投与 1、3、6、12 および 24 時間後に 8 種類の組織および心臓採血により全血を採取した(各時点で n = 4)。全血を 37°C で 2 時間静置した後、2,000 g で 15 分間遠心分離し、上清として血清を得た。腎臓は両側を採取し、筋肉は両足大腿部、皮膚は腹部(約 20 \times 20 mm)から採取した。これらの組織および血清を分析まで -80°C で凍結保存した。クロリン誘導体 **3**, **5** および **8** の各組織および血清中の濃度は蛍光測定により決定した。各組織の湿重量を記録し、各組織および血清を超純水と混合した(100 mg 組織または 100 μ L 血清/500 μ L 超純水)。血清を除く各組織をホモジナイザー(S-203、株式会社池田理化製)でホモジナイズ後、4°C、12,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を得た。血清はホモジナイズおよび遠心分離を行わなかった。得られた各上清を 200 μ L ずつ 96 穴マイクロプレートに分注し、マルチスペクトロマイクロプレートリーダー(Varioskan Flash、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)で蛍光を測定した。クロリン誘導体 **3**, **5** および **8** の蛍光測定のための励起波長および検出波

長を Table 2.1 に示した。各組織および血清中のクロリン誘導体 **3**, **5** および **8** の濃度は、幾つかの異なる既知濃度の各クロリン誘導体超純水溶液を調製し、それらの蛍光を測定することにより作成した検量線から算出した。濃度の平均値 \pm 標準誤差を各時点において算出した($n = 4$)。

Table 2.1. Excitation and detection wavelength for fluorescence measurements of chlorin derivatives **3**, **5** and **8**.

Chlorin derivative	Excitation wavelength (nm)	Detection wavelength (nm)
3	390	655
5	400	665
8	415	665

第5項 *In vivo* でのクロリン誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価

イミノジ酢酸誘導体 **8** を PBS に溶解し(2 mg/mL)、colon-26 担がんマウスに 10 mg/kg を尾静脈投与した(マウス 20 g の場合 100 μ L を投与、 $n = 5$)。対照群として担がんマウスに PBS のみ尾静脈投与した($n = 5$)。投与 3 時間後、シーシーエス株式会社製 LED 光源装置(660 nm)を使用し、腫瘍部へ 75.5 J/cm² (照射距離 : 25 mm、0.1429 W \times 528 sec)の光照射を行った。光照射中、腫瘍部を除くマウスの体表面を黒布で覆い遮光した(Fig. 2.1)。誘導体 **8** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群について、7 日間腫瘍の生育を計測することにより治療効果を評価した。デジタルノギスを用いて腫瘍の長径(mm)および短径(mm)について寸法を測定し、(長径) \times (短径)² \times 1/2 の計算式⁷⁰⁾で腫瘍体積(mm³)を算出した。誘導体 **8** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群との腫瘍体積の差を *t* 検定($P < 0.01$)で分析した。

PDT後の組織障害を調査するために、光照射3日後の腫瘍組織および正常組織について組織切片を作成した。皮膚を付けた腫瘍、肝臓および腎臓を誘導体8によるPDT群のマウスから摘出し、光照射のみの対照群のマウスからは皮膚を付けた腫瘍のみ摘出した。摘出した各組織を4%パラホルムアルデヒドで固定し、パラフィンに包埋した。厚さ5 μm にミトクロームで切り出し、当該パラフィン切片をヘマトキシリン・エオシン染色した。顕微鏡下で各組織切片を撮影および観察した。

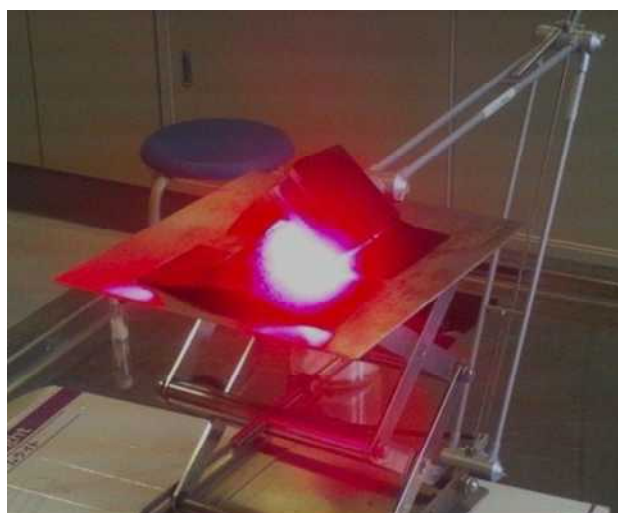
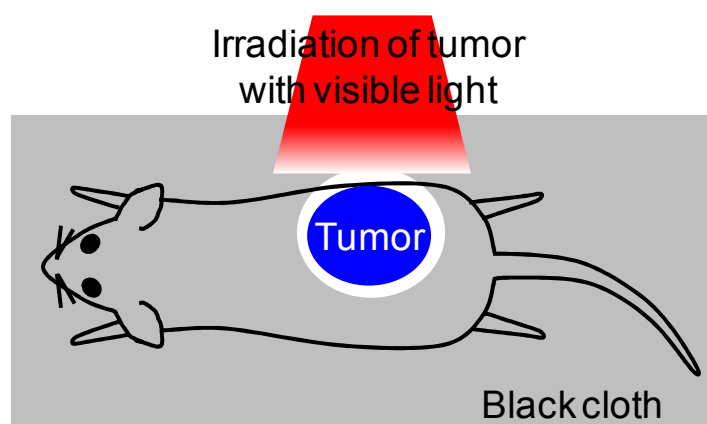


Figure 2.1. PDT in tumor-bearing mice.

第3節 結果および考察

第1項 新規水溶性クロリン誘導体の分子設計

PDT用光感受性物質の正常組織からの排泄性の向上を目指して、クロリン誘導体である photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)を出発原料とした3種類の水溶性クロリン誘導体 **3**、**5** および **8** を分子設計した(Fig. 2.2)。誘導体 **3** および **5** は、**1** の比較的反応性の高いアルデヒド基を水酸基に変換した化合物およびエトキシイミノ基で保護した化合物であり、これらの化合物はジカルボン酸ナトリウム塩とし、水溶性を持たせた。誘導体 **8** は、誘導体 **5** の水溶性を更に高めるためにイミノジ酢酸を2分子結合し、テトラカルボン酸ナトリウム塩とした化合物である。次項では各誘導体の合成について詳細を述べる。

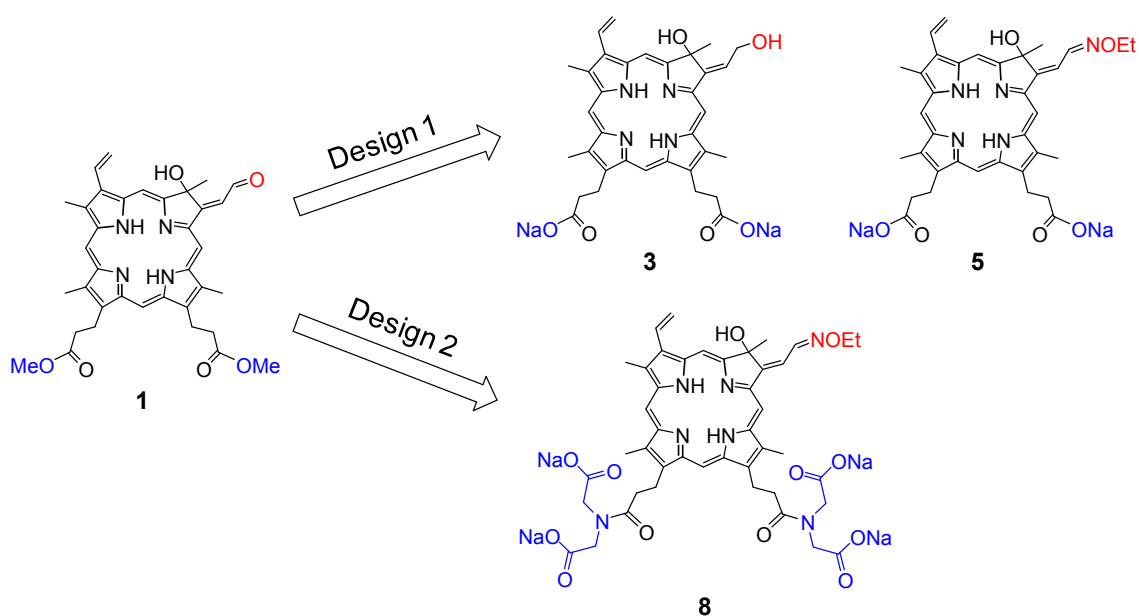
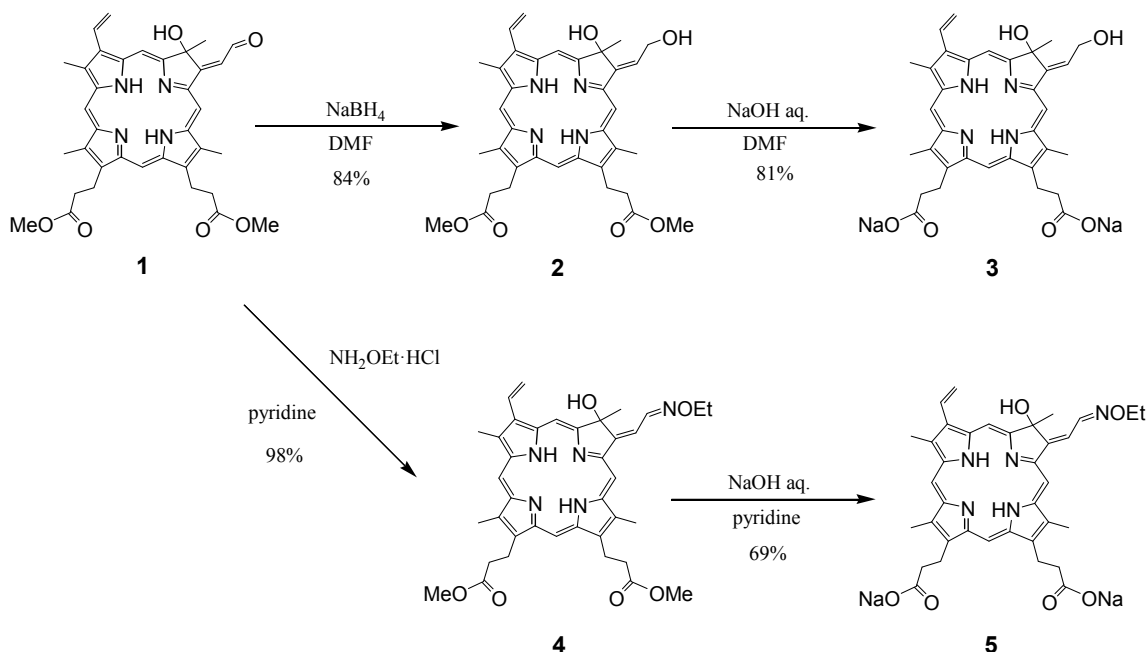


Figure 2.2. Molecular design strategy for efficient PDT agents.

第2項 新規水溶性クロリン誘導体の合成

水溶性クロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の合成経路を Scheme 2.1 および 2.2 に示した。出発原料の photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)は既知の方法により合成した。まず、水酸基誘導体 **3** の合成を行った(Scheme 2.1)。**1** のアルデヒド基の還元は、DMF 中、水素化ホウ素ナトリウム存在下で行った。TLC (酢酸エチル/*n*-ヘキサン, 2 : 1, v/v)で反応を追跡したところ、反応開始後 1 時間で原料 **1** ($R_f = 0.67$)は消失し、 $R_f = 0.22$ に目的とする **2** のスポットと $R_f = 0.33$ および原点部に原料由来の副生成物のスポットを確認した。両副生成物は、ジクロロメタンによる **2** の再結晶化にて容易に除去することができ、収率 84%で誘導体 **2** を得た。本反応をピリジン中で行った場合には、DMF 中と比較して原点部の副生成物が増加することを確認した。**2** のメチルエステル基の加水分解は、DMF 中、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液存在下で行った。反応開始後 2 時間の TLC (ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 12 : 2 : 1, v/v/v)により、原料 **2** の消失($R_f = 0.95$)および目的物のスポット($R_f = 0.45$)を確認し、当該反応溶液をアセトニトリル/酢酸エチル(3 : 1, v/v)中に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取した。当該沈殿物の洗浄は、エタノールのみでは溶解したため、アセトニトリル/エタノール(1 : 1)で行い、乾燥後、水酸基誘導体 **3** を収率 81%で得た。

次に、エトキシイミノ基誘導体 **5** の合成を行った(Scheme 2.1)。**1** のアルデヒド基をピリジン中、エトキシルアミン塩酸塩存在下にてエトキシイミノ基で保護し、誘導体 **4** を収率 98%で得た。**4** のメチルエステルの加水分解を水酸化ナトリウム水溶液存在下のアルカリ条件下で行い、エトキシイミノ基誘導体 **5** を収率 69%で得た。

Scheme 2.1. Synthesis of chlorin derivatives **3** and **5**.

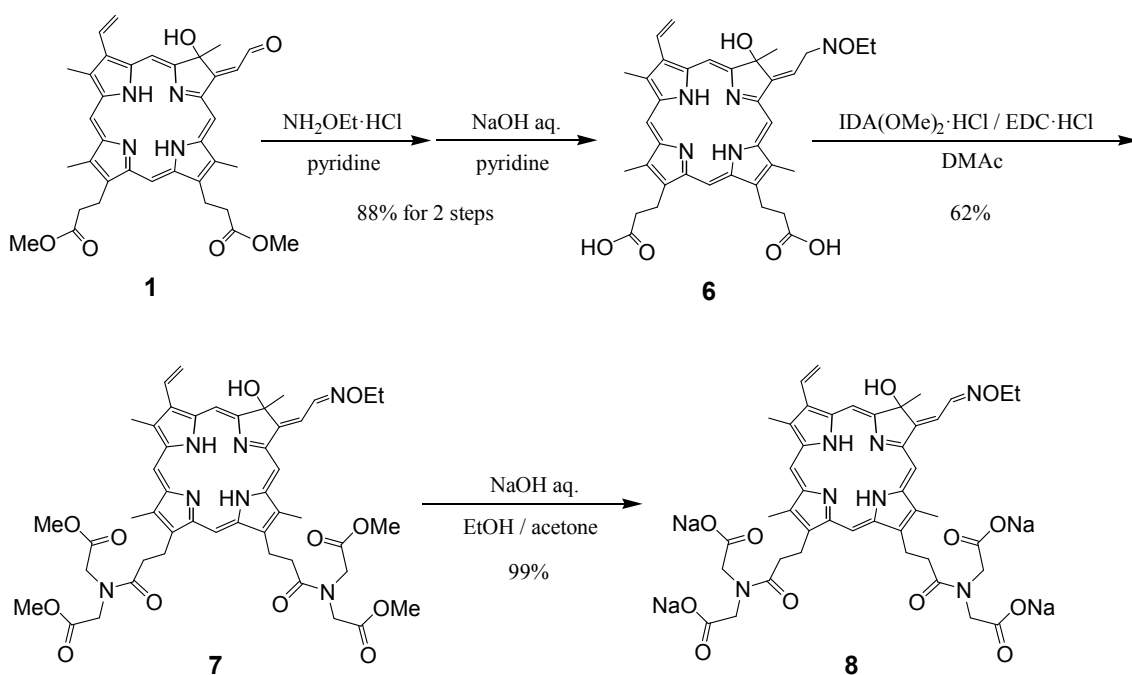
最後にイミノジ酢酸誘導体 **8** の合成を行った(Scheme 2.2)。**1** のアルデヒド基のエトキシイミノ化とメチルエステル基の加水分解の2反応を1反応器で連続して行うことで目的とする **6** を得るワンポット反応を試みた。**1** をピリジンに溶解し、エトキシルアミン塩酸塩を加え、TLC (酢酸エチル/*n*-ヘキサン, 1 : 1, v/v)で反応を追跡した。反応開始後1時間で原料 **1** ($R_f = 0.29$)の消失を確認し、目的物のスポット($R_f = 0.51$)のみを確認した。続いて、メチルエステル基を加水分解するために本反応溶液中に水酸化ナトリウム水溶液を加え、TLC (酢酸エチル/メタノール, 2 : 1, v/v)で反応を追跡した。本反応溶液中に水酸化ナトリウム水溶液を比較的多く添加した場合、**1** のエトキシイミノ化物が析出し、反応が進行しなくなるため、少量で比較的濃度が高い水酸化ナトリウム水溶液を添加することとした。2 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をピリジン 1 mL に対して 0.06 mL 添加した場合には、反応開始後1時間の TLC 分析にて加水分解反応が

進行しないことを確認した。この原因は、反応溶液中の水酸化ナトリウムが低濃度であったためと考えられた。次に、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をピリジン 1 mL に対して 0.06 mL または 0.08 mL 添加した場合には、 $R_f = 0.23$ に目的物 **6** のスポットを確認し、それぞれ 3 時間後または 4 時間後に未加水分解物 ($R_f = 0.89$) の消失を確認した。反応溶液中の水酸化ナトリウム濃度が異なるこれら 2 条件を比較して、高濃度の条件の方が反応の進行が遅かった。この原因は、水酸化ナトリウム水溶液の添加量が多い条件ではピリジンと層分離し易くなり、その結果として反応速度が低下したためと考えられた。また、7 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をピリジン 1 mL に対して 0.06 mL 添加した場合には、加水分解反応は進行し、反応開始後 5 時間で終了した。本条件下では、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液を使用した条件と比較して水酸化ナトリウム濃度が高いにも関わらず反応の進行が遅かった。この原因は、水酸化ナトリウム水溶液の濃度が高い方がピリジンと層分離し易く、両者が混ざり難くなったためと考えられた。以上の結果から、5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液をピリジン 1 mL に対して 0.06 mL 添加する条件が最適条件であることが判明した。当該反応溶液に 20% クエン酸水溶液を加え、酸性条件とし、析出した沈殿物を濾取した。沈殿物の TLC 分析で当該酸性条件下においてエトシキイミノ基は安定であることを確認した。当該沈殿物を水洗後、乾燥し、ジカルボン酸誘導体 **6** を収率 88%(2 工程収率)で得た。

続いて、ジカルボン酸誘導体 **6** とイミノジ酢酸ジメチルエステルの縮合を DMAc 中、EDC 存在下で行った。TLC (ジクロロメタン/メタノール, 18:1, v/v) で反応を追跡したところ、反応開始後 3.5 時間でモノイミノジ酢酸アミド化物 ($R_f = 0.31$) の消失を確認し、目的物 **7** ($R_f = 0.67$) および僅かな原点部のスポットを確認した。原点部の副生成物は **6** と EDC が反応して生じた *N*-アシル尿素と考えられた。当該副生成物は、酢酸エチルを溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に除去することができ、ジアミド誘導体 **7** を収率

62%で得た。最後に、**7** のメチルエステル基の加水分解をアセトンおよびエタノールの混合溶媒中、水酸化ナトリウム水溶液存在下で行い、イミノジ酢酸誘導体 **8** を定量的収率で得た。

今回合成した新規水溶性クロリン誘導体 **3**、**5** および **8** は ^1H NMR、UV-vis スペクトルおよび HRMS により化学構造を同定した。**3**、**5** および **8** は良好な水溶性(**3** および **5** : 10 mg/mL、**8** : 100 mg/mL)を示した。



Scheme 2.2. Synthesis of chlorin derivative **8**.

第3項 *In vivo*でのクロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

合成した新規クロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の *in vivo* での腫瘍集積性および正常組織排泄性を評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

Fig. 2.3~2.5 にクロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の投与(10 mg/kg)後、1 時間から 24 時間に至るまでのマウスの各組織および血清中における各クロリン誘導体の集積量を示し、Fig. 2.6 にクロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の腫瘍組織への集積量の経時的变化を示した。水酸基誘導体 **3** の腫瘍組織への選択的集積性は、投与後 1 時間から 24 時間に至るまでの各時点において確認されなかった(Fig. 2.3)。エトキシイミノ基誘導体 **5** の腫瘍組織集積量は、投与後 1 時間および 3 時間において水酸基誘導体 **3** の腫瘍組織集積量と比較して高い値を示した(Fig. 2.6)が、投与後 1 時間から 24 時間に至るまでの各時点において誘導体 **5** の腫瘍集積量は、肝臓および血清への集積量と比較して低い値を示した(Fig. 2.4)。一方、本研究にて新たに合成した水溶性クロリン誘導体の中で最も高い水溶性を有するイミノジ酢酸誘導体 **8** は、誘導体 **3** および **5** と比較して最も優れた腫瘍選択的集積性を示した(Fig. 2.5)。誘導体 **8** は、投与後 3 時間において腫瘍組織への集積量が最も高くなり(0.69 ng/mg)、血清を除く全ての組織よりも腫瘍組織への集積量が高くなった(Fig. 2.5)。誘導体 **8** の腫瘍組織への集積量は、全ての時点において、誘導体 **3** および **5** の腫瘍組織への集積量より高かった(Fig. 2.6)。また、誘導体 **8** の腫瘍集積量が最大値となった投与後 3 時間において、既存薬である Laserphyrin[®] は腫瘍組織よりも血漿、肝臓、腎臓および脾臓に高く集積しており、誘導体 **8** は既存薬よりも優れた腫瘍選択的集積性を有していることが示唆された⁷¹⁾。一方、誘導体 **8** は誘導体 **3** および **5** と比較して優れた正常組織排泄性を

示した。投与後 24 時間において、誘導体 **8** の正常組織および血清中の残存量は僅かに検出される量にまで低下し、その腫瘍組織中の残存量が最も多かった (Fig. 2.5)。既存薬である Laserphyrin[®]では投与後 24 時間において腫瘍組織よりも肝臓、腎臓に多く残存し、Foscan[®]では同時点で腫瘍組織よりも肝臓、皮膚および尿路組織に多く残存していた^{71,72)}。このことから、誘導体 **8** は、既存薬よりも優れた正常組織排泄性を有していることが示唆された。

3 種類の水溶性クロリン誘導体の中で最も水溶性の高いイミノジ酢酸誘導体 **8** が優れた正常組織排泄性を有しているにも関わらず、腫瘍選択的集積性を示したことは注目に値する。水溶性クロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の化学構造を比較して、誘導体 **8** のイミノジ酢酸残基が前述の優れた性能に関与している可能性が示唆された。誘導体 **8** はイミノジ酢酸残基を有することにより、がん細胞に能動的に取り込まれるキャリアータンパク質に結合されやすくなった結果として腫瘍選択的集積性を獲得した可能性が示唆された。水溶性ポルフィリンの腫瘍集積性に関与するキャリアータンパク質が特定された際には、当該腫瘍集積メカニズムが明らかになると考えられる。このように、*in vivo* でのクロリン誘導体の化学構造と腫瘍選択的集積性の相関を明らかにする研究は、より優れた光感受性物質を開発するために重要である。以上の結果から、本研究にて新たに合成したクロリン誘導体 **3**、**5** および **8** の中で、イミノジ酢酸誘導体 **8** に優れた腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性が見出され、**8** は PDT 用薬として最も優れた性能を有していることが明らかとなった。

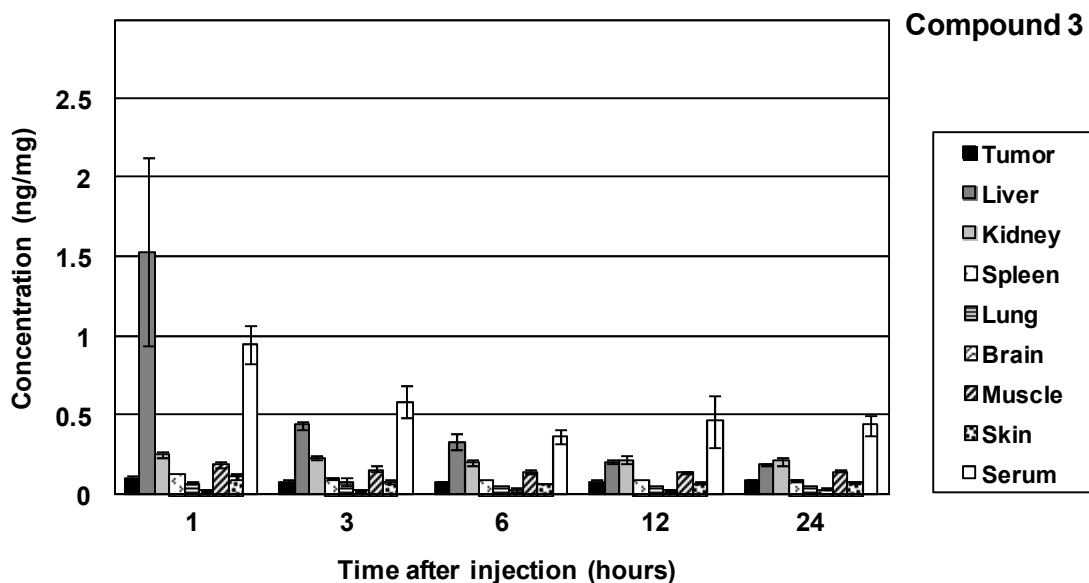


Figure 2.3. *In vivo* biodistribution of chlorin derivative **3** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **3** (10 mg/kg). All data represent means \pm SE (n = 4).

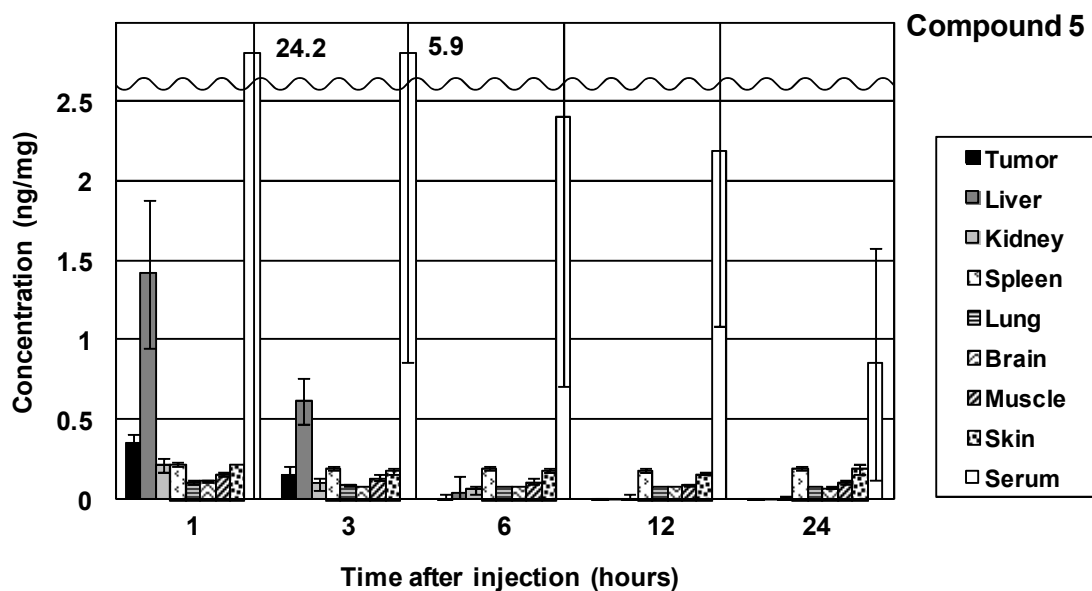


Figure 2.4. *In vivo* biodistribution of chlorin derivative **5** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **5** (10 mg/kg). All data represent means \pm SE (n = 4).

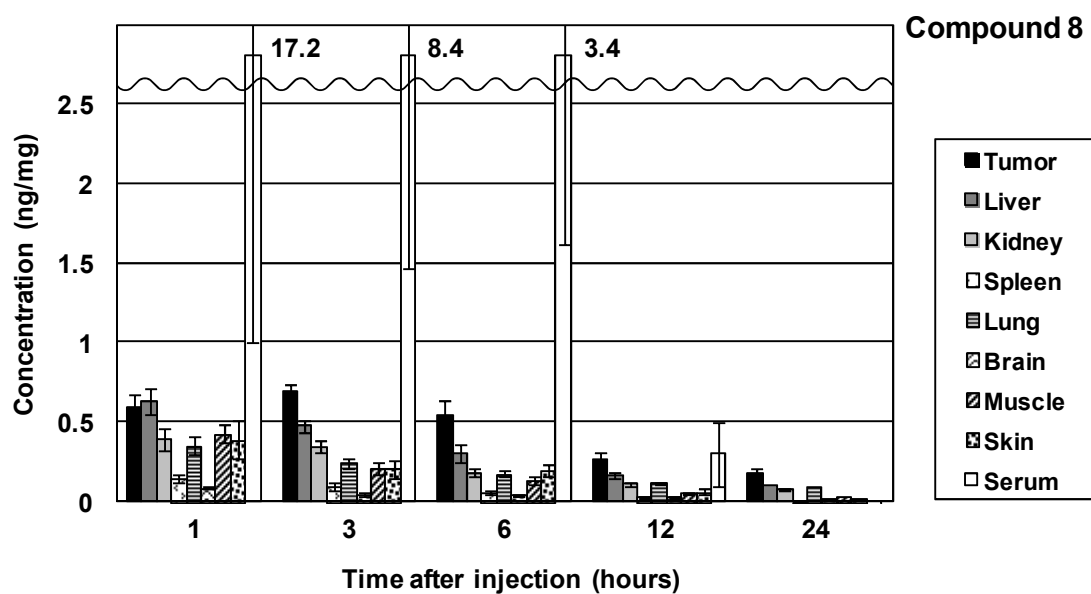


Figure 2.5. *In vivo* biodistribution of chlorin derivative **8** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **8** (10 mg/kg). All data represent means \pm SE (n = 4).

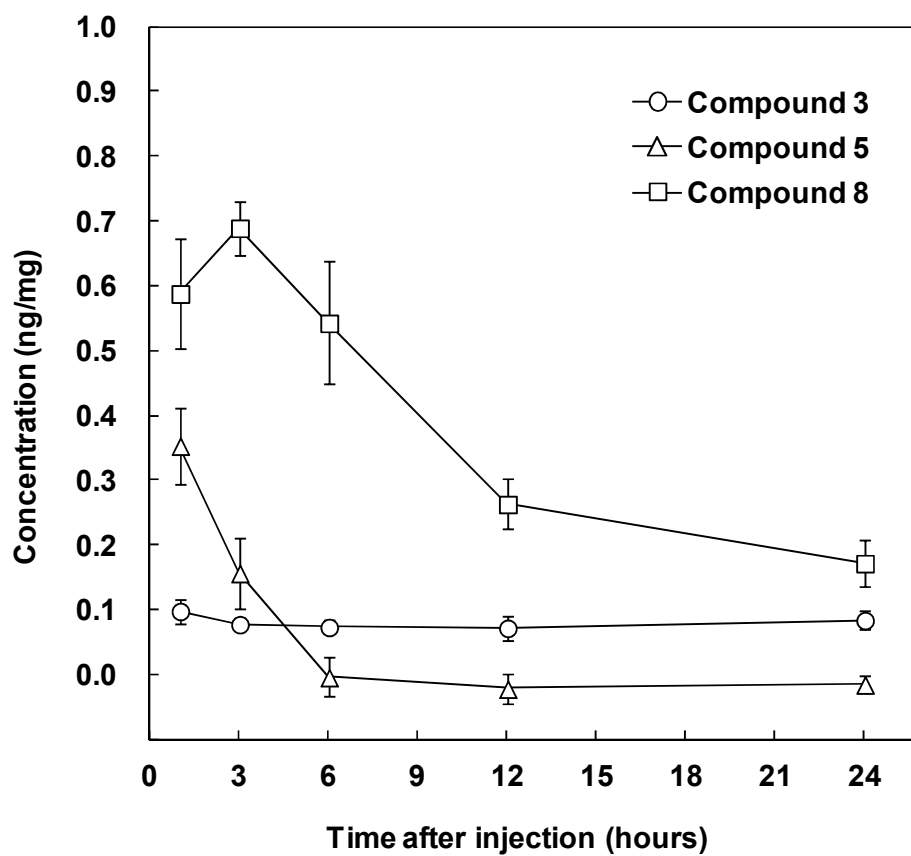


Figure 2.6. The concentrations of chlorin derivatives **3**, **5** and **8** in tumor tissue at the indicated times after intravenous injection into colon-26 tumor-bearing BALB/c mice. All data represent means \pm SE (n = 4).

第4項 *In vivo*でのクロリン誘導体を用いたPDTによる抗がん効果の評価

*In vivo*での新規水溶性クロリン誘導体 **8**を用いたPDTによる抗がん効果をLED照射(660 nm)後の colon-26 担がんマウスのがん生育率を計測することにより評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

誘導体 **8**によるPDT群および照射のみの対照群について、照射後7日間の腫瘍体積を計測した(Fig. 2.7)。照射のみの対照群の腫瘍体積が増加しているのに対して、誘導体 **8**によるPDT群は腫瘍の生育が抑制された。照射後3、5および7日目の腫瘍体積について、対照群と誘導体 **8**によるPDT群を比較したところ、統計的有意差($P < 0.01$)が認められた。また、PDTによる組織障害を評価するために、照射後3日間経過後の誘導体 **8**によるPDT群のマウスから皮膚を付けた腫瘍、肝臓および腎臓を摘出し、組織切片を作成した。照射のみの対照群のマウスからは皮膚を付けた腫瘍のみ摘出し、組織切片を作成した(Fig. 2.8)。照射のみの対照群(Fig. 2.8A)の腫瘍組織および皮膚組織および誘導体 **8**によるPDT群の皮膚組織(Fig. 2.8B)に障害が認められないのに対して、腫瘍組織に細胞核の大きさ、数の減少および染色性の低下、細胞核のまばらな配置等のPDTによる腫瘍組織への障害が認められた(Fig. 2.8B)。誘導体 **8**によるPDT群の肝臓組織(Fig. 2.8C)および腎臓組織(Fig. 2.8D)に障害は認められなかった。即ち、誘導体 **8**を用いたPDTは、腫瘍組織に選択的な障害を与えたことが明らかとなった。一方、がん細胞が正常細胞に比べ熱に弱いという性質を利用したがんの治療法として温熱療法が知られている⁷³⁾。本評価実験において、LED照射は、マウスの照射部位の皮膚表面温度を2~3°C上昇させたが、照射のみの対照群の腫瘍組織(Fig. 2.8A)において照射によって引き起こさ

れた腫瘍組織への障害は認められなかったことから、誘導体 **8** による PDT 群の腫瘍組織への選択的な障害は熱ではなく、PDT により引き起こされたものと考えられた。以上の結果から、イミノジ酢酸誘導体 **8** は優れた腫瘍選択的集積性を有し、誘導体 **8** を用いた PDT は強い抗がん効果を示すことが判明した。

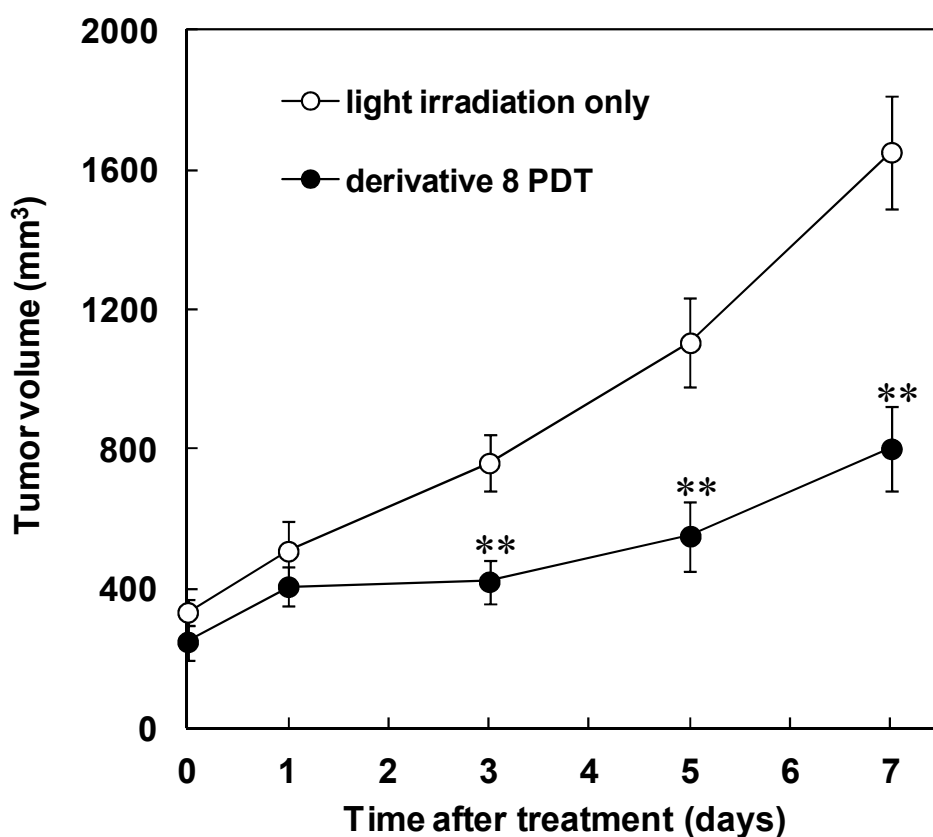


Figure 2.7. Tumor growth of colon-26 tumor-bearing BALB/c mice treated with PBS with irradiation and compound **8** (10 mg/kg) with irradiation. Tumor volumes were measured for 7 days after treatment. All data represent means \pm SE ($n = 5$). **, $P < 0.01$ compared with the control.

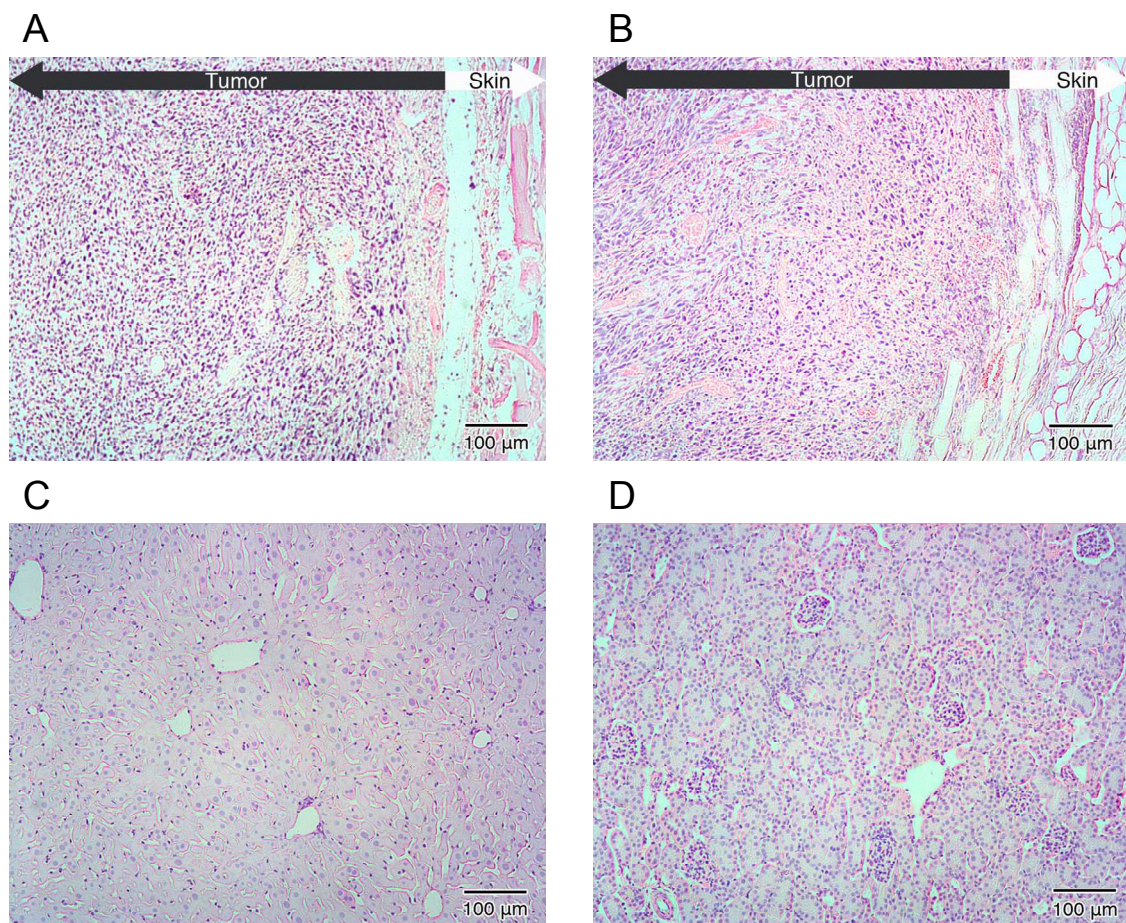


Figure 2.8. Microscopic images obtained at 3 days after PDT (hematoxylin and eosin staining). (A) Tumor (with skin) section from a mouse in the light irradiation group. (B) Tumor (with skin) section from a mouse in the derivative **8** PDT group. (C) Liver section from a mouse in the derivative **8** PDT group. (D) Kidney section from a mouse in the derivative **8** PDT group.

第4節 第2章の結論

本研究では、PDTにおける既存薬の問題点を解決するために、組織透過性が良い650～800 nmの光照射で効率良く励起され、がん組織への高い選択性および蓄積性、ならびに正常組織からの速やかな排泄性を有する候補化合物の創出を目的とし、3種類の新規水溶性クロリン誘導体**3**、**5**および**8**を合成した。これらの中で663 nmに極大吸収波長を有し、最も水溶性の高いイミノジ酢酸誘導体**8**に優れたがん組織選択的集積性および正常組織排泄性を見出した。また、イミノジ酢酸誘導体**8**を用いたPDTにより、がんの生育が統計的に有意に抑制され、PDT後のがん組織および正常組織の組織切片の観察から、がん組織特異的な障害が確認された。以上の結果より、イミノジ酢酸誘導体**8**やこの誘導体の化学構造を基にして改良された光感受性物質を用いるPDTは、既存薬を用いる場合と比較して、治療効果の向上と副作用の軽減が期待できる。

第3章 PDT および BNCT 両用薬としての新規 BPA 結合型クロリン誘導体の合成と評価

第1節 はじめに

PDT で使用される腫瘍集積性を有する光感受性物質と可視光照射は、それぞれ単独では毒性を示さないが、組み合わせられた際に抗腫瘍効果を示す。このような治療法をバイモーダル治療と呼び、別のがん治療法である BNCT もその一種である。BNCT では、 ^{10}B を含むホウ素化合物を予めがん細胞に取り込ませ、低エネルギーの中性子線を照射すると、中性子が ^{10}B に衝突することによる核反応が、がん細胞内で起こり、短飛距離で殺細胞効果の高い α 線(^4He)およびリチウム核(^7Li)が発生し、がん細胞を選択的に破壊する³⁷⁻⁴⁰)。BNCT でも PDT の光感受性物質と同様に ^{10}B を含むホウ素化合物をがん細胞に選択的に集積させることが、その治療効果を向上させ、正常細胞の損傷を防ぐために重要である。BNCT で臨床治療に使用されている薬剤は、BPA^{41,42})および BSH⁴³⁻⁴⁵)のみであり、両化合物は毒性が低く安全性が高いものの、がん細胞への選択性が不十分であるため、より効果的な薬剤の開発が求められている。過去数十年に渡り、数多くのホウ素化合物の合成と評価が行われてきており、近年ではポルフィリンの腫瘍集積性に着目したホウ素ポルフィリン誘導体やホウ素クロリン誘導体が合成され、PDT および BNCT の両用薬としての検討も行われてきた。

第2章において、著者らは既存の PDT 薬の問題点を解決する新規光感受性物質の開発を検討したところ、新規水溶性クロリン誘導体 **8** に優れたがん組織選択的集積性、正常組織排泄性および PDT による抗がん効果を見出し、誘導体 **8** を用いる PDT により、治療効果の向上と副作用の軽減を示唆する結果が得られたことを述べた。この誘導体 **8** の化学構造を基に設計されたクロリン誘導体を

ホウ素キャリアーとした新規ホウ素クロリン誘導体は、既存の BNCT 薬の低腫瘍集積性の改善が期待され、PDT および BNCT の双方においてより効果的な薬剤の候補化合物と考えられる。

本章では、BPA 関連化合物をホウ素源に選択し、誘導体 **8** の化学構造を基にして 2 種類の新規 BPA 結合型クロリン誘導体を合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した。

第 2 節 実験方法

第 1 項 試薬および一般的測定方法

Photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)、イミノジ酢酸ジメチルエステル塩酸塩およびクロリン誘導体 **6** は第 2 章および文献に従い合成した^{64-66,69})。4-Boronocinnamic acid (**13**) (¹⁰B 濃縮)および L-4-boronophenylalanine ethyl ester hydrochloride (**16**) (¹⁰B 濃縮)はステラケミファ株式会社に供与して頂いた。他の全ての試薬および溶媒は和光純薬工業株式会社またはシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。TLC はメルク株式会社から購入した Silica gel 60 F₂₅₄ または RP-8 F_{254S} で行った。カラムクロマトグラフィーは和光純薬工業株式会社から購入したシリカゲル(Wakogel C-200, 75~150 μm)で行った。¹H NMR の測定にはブルカー社製 ARX-400 (400 MHz)、バリアン社製 Mercury-300 (300 MHz)、VXR-500 (500 MHz)または NMR System 600(600 MHz)を使用し、テトラメチルシランを内部標準物質とした。化学シフトは ppm (δ)で記録し、カップリングコンスタント(*J*)は Hz 単位で表した。MS の測定には株式会社島津製作所製単一四重極質量分析計 LCMS-QP8000 を使用し、ESI(陽イオン)で行った。UV-vis スペクトルの測定には株式会社島津製作所製 UV-2400PC を使用した。HPLC 分

析には株式会社日立製作所製 L-7100 (送液ポンプ)、L-7420 (検出器)、L-7300 (カラムオープン)および D-2500 (クロマトインジケータ)で構成されるシステムを使用し、各化合物の純度決定を行った。HPLC 測定条件は分離カラムを Symmetry Shield RP18 (4.6 i.d. × 150 mm, 3.5 μm, ウォーターズ社製)、移動相を誘導体 **15** の分析においてはアセトニトリル/水/酢酸(35 : 55 : 10, v/v/v)、誘導体 **18** の分析においてはアセトニトリル/水/酢酸(40 : 50 : 10, v/v/v)とし、カラム温度 40 °C、流速 1.0 mL/min、検出波長 420 nm、アイソクラティック溶出モードとした。

第2項 BPA 結合型クロリン誘導体の合成

3-Ethenyl-7-hydroxyl-8-hydroxyiminoethylidene-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (**9**).

1 (10 g, 16.1 mmol)をピリジン(100 mL)に溶解し、ヒドロキシルアミン塩酸塩 (2 g, 28.8 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を水(200 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥し、**9** (9.6 g, 94%)を得た。

ESI-MS m/z : 638 [M+H]⁺. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 500 MHz) δ: 2.51 (3H, s); 3.33 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 3.35 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 3.38 (3H, s); 3.44 (3H, s); 3.57 (9H, s); 4.34 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 4.39 (2H, t, $J = 7.6$ Hz); 6.01 (1H, d, $J = 11.6$ Hz); 6.33 (1H, d, $J = 17.7$ Hz); 8.21 (1H, dd, $J = 11.6, 17.7$ Hz); 8.60 (1H, d, $J = 10.4$ Hz); 9.12 (1H, br s); 9.67 (1H, s); 9.88 (1H, s); 10.03 (1H, s); 10.18 (1H, s); 10.23 (1H, d, $J = 10.4$ Hz); 14.10 (1H, s); 18.10 (1H, s).

13,17-Bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-8-hydroxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (**10**).

9 (5.4 g, 8.5 mmol) を THF (108 mL) に溶解し、0.5 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (157 mL) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液に 20% クエン酸水溶液 (168 mL) を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られたジカルボン酸誘導体を未精製のまま次の反応に使用した。ジカルボン酸誘導体を DMAc (270 mL) に溶解し、ジシクロヘキシルアミン (3.3 g, 18.2 mmol)、イミノジ酢酸ジメチルエステル塩酸塩 (8.8 g, 44.5 mmol) および EDC (24 g, 125.2 mmol) を加え、室温で 7 時間攪拌した。反応液を水 (1 L) に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られたイミノジ酢酸誘導体を未精製のまま次の反応に使用した。イミノジ酢酸誘導体をピリジン (36 mL) に溶解し、ヒドロキシルアミン塩酸塩 (0.4 g, 5.8 mmol) を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液を冷却した 10% 酢酸水溶液 (360 mL) に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (アセトン) で精製し、**10** [7.1 g, 93% (3 工程収率)] を得た。

ESI-MS m/z : 896 $[M+H]^+$. $^1\text{H NMR}$ (pyridine- d_5 , 300 MHz) δ : 2.54 (3H, s); 3.38 (3H, s); 3.41 (6H, s); 3.43 (3H, s); 3.49 (3H, s); 3.59 (3H, s); 3.54-3.68 (4H, m); 3.59 (3H, s); 4.52 (4H, dt, $J = 6.9, 15.0$ Hz); 4.64 (2H, s); 4.66 (2H, s); 4.67 (2H, s); 4.69 (2H, s); 6.04 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.36 (1H, d, $J = 17.7$ Hz); 8.25 (1H, dd, $J = 11.4, 18.0$ Hz); 8.62 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); 9.10 (1H, s); 9.68 (1H, s); 9.90 (1H, s); 10.04 (1H, s); 10.25 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); 10.28 (1H, s); 14.10 (1H, s); 16.12 (1H, br s).

13,17-Bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-8-(*tert*-butoxycarbonylamino)propyloxyiminoethylidene-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (11).

10 (5 g, 5.6 mmol) を DMF (100 mL) に溶解し、水素化ナトリウム (鉱油中 60%

分散)(161 mg, 6.7 mmol)および 3-(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルプロミド(2 g, 8.4 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液にメタノール(5 mL)を加えた後、反応液を冷却した 5%酢酸水溶液(420 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(酢酸エチル)で精製し、**11** (4.0 g, 68%)を得た。

ESI-MS m/z : 1053 [M+H]⁺. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -1.95 (1H, br s); -1.92 (1H, br s); 1.57 (9H, s); 2.25-2.34 (2H, m); 2.45 (3H, s); 3.39 (6H, s); 3.42 (3H, s); 3.43 (3H, s); 3.47 (3H, s); 3.49 (3H, s); 3.54-3.62 (4H, m); 3.58 (3H, s); 3.62-3.68 (2H, m); 4.48 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 4.54 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 4.56-4.66 (2H, m); 4.63 (2H, s); 4.65 (2H, s); 4.67 (2H, s); 4.68 (2H, s); 6.02 (1H, d, $J = 12.0$ Hz); 6.34 (1H, d, $J = 17.8$ Hz); 7.82 (1H, br s); 8.22 (1H, dd, $J = 11.4, 17.4$ Hz); 8.36 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.08 (1H, br s); 9.66 (1H, s); 9.86 (1H, s); 9.97 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.03 (1H, s); 10.29 (1H, s).

8-Aminopropoxyiminoethylidene-13,17-bis[(*N,N*-dicarboxymethyl) carbamoyl-ethyl]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (12).

誘導体 **10** からの合成法 : **10** (5 g, 5.6 mmol)を DMF (100 mL)に溶解し、水素化ナトリウム(鉱油中 60%分散)(492 mg, 12.3 mmol)および 3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩(1.2 g, 5.5 mmol)を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を冷却した 5%炭酸水素ナトリウム水溶液(1 L)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[THF、次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)]で精製し、**12** (3.7g, 69%)を得た。

ESI-MS m/z : 953 [M+H]⁺.

誘導体 11 からの合成法 : **11** (1 g, 0.9 mmol)をジクロロメタン(20 mL)に溶解し、TFA (9 mL)を加え、0°C で 20 分間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(16 mL)を加えた後、反応液をエバポレーターで濃縮した。濃縮物に冷却した 5%炭酸水素ナトリウム水溶液(100 mL)を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[THF、次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)]で精製し、**12** (0.5 g, 61%)を得た。

13,17-Bis[(N,N-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-8-{[4-(dihydroxyboranyl)phenyl]prop-2-enylcarbonyl}aminopropoxyiminoethylidene-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (14).

4-Boronocinnamic acid **13** (>99%¹⁰B 濃縮)(1 g, 5.2 mmol)を DMAc (125 mL)に溶解し、DMAP (43 mg, 0.35 mmol)、EDC (4 g, 20.9 mmol)および **12** (3.3 g, 3.5 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を5%炭酸水素ナトリウム水溶液(500 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/メタノール(20 : 1, v/v)]で精製し、**14** (2.4 g, 60%)を得た。

ESI-MS m/z : 1126 [M+H]⁺. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -1.95 (1H, br s); -1.92 (1H, br s); 2.36 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.45 (3H, s); 3.40 (6H, s); 3.42 (3H, s); 3.43 (3H, s); 3.47 (3H, s); 3.49 (3H, s); 3.52-3.62 (2H, m); 3.58 (3H, s); 3.86-3.96 (2H, m); 4.45-4.51 (2H, m); 4.52-4.58 (2H, m); 4.59-4.70 (2H, m); 4.63 (2H, s); 4.65 (2H, s); 4.67 (2H, s); 4.68 (2H, s); 6.03 (1H, d, $J = 12.6$ Hz); 6.34 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 7.06 (1H, d, $J = 16.2$ Hz); 7.52-7.55 (2H, m); 8.16 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 8.15-8.30 (2H, m); 8.30-8.42 (2H, m); 9.08 (1H, br s); 9.66 (1H, s); 9.86 (1H, s); 9.98 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.03 (1H, s); 10.30 (1H, s).

13,17-Bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-8-{[4-(dihydroxyboranyl)phenyl]prop-2-enylcarbonyl}aminopropoxyiminoethylidene-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetrasodium salt (15).

14 (2 g, 1.8 mmol)を DMF (20 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液 (20 mL)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(240 mL, 5 : 1, v/v)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、エタノールで洗浄後、乾燥し、**15** (1.7 g, 83%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 422 (132.5), 538 (6.3), 579 (10.5), 653 (19.6).
ESI-MS m/z : 1034 [M-4Na-2H₂O+3H]⁺. ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 50°C, 400 MHz] δ : 2.36-2.53 (2H, m); 2.44(3H, s); 3.52-3.64 (4H, m); 3.69 (6H, s); 3.72 (3H, s); 3.82-3.90 (2H, m); 4.55-4.80 (14H, m); 6.29 (1H, d, $J = 11.6$ Hz); 6.49 (1H, d, $J = 17.6$ Hz); 6.94 (1H, d, $J = 16.0$ Hz); 7.69 (2H, d, $J = 8.0$ Hz); 7.84 (1H, d, $J = 14.8$ Hz); 8.05 (2H, d, $J = 7.6$ Hz); 8.26 (1H, d, $J = 10.0$ Hz); 8.26 (1H, dd, $J = 11.2, 18.4$ Hz); 9.60 (1H, s); 9.72 (1H, s); 9.78 (1H, d, $J = 10.0$ Hz); 10.09 (1H, s); 10.36 (1H, s).
HPLC: R_t 4.0 min (anti form) and 7.9 min (syn form), 95.2% purity.

13,17-Bis{1-carboxy-2-[4-(dihydroxyboranyl)phenyl]ethyl}carbamoylethyl]-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin diethyl ester (17).

6 (2 g, 3.1 mmol)を DMAc (50 mL)に溶解し、ジシクロヘキシルアミン(290 mg, 1.6 mmol)、EDC (3.6 g, 18.8 mmol)および L-4-boronophenylalanine ethyl ester hydrochloride **16** (>99% ¹⁰B 濃縮)(1.8 g, 6.6 mmol)を加え、室温で 8 時間 30 分間攪拌した。反応液を水(200 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタ

ン/メタノール(50 : 1, v/v)、ジクロロメタン/メタノール(100 : 3, v/v)、次いでジクロロメタン/メタノール(25 : 1, v/v)]で精製し、**17** (1.5 g, 45%)を得た。

ESI-MS m/z : 1075 [M+H]⁺.

13,17-Bis{1-carboxy-2-[4-(dihydroxyboranyl)phenyl]ethyl} carbamoylethyl]-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin disodium salt (18**).**

17 (1.5 g, 1.4 mmol)を DMF (15 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(15 mL)を加え、室温で 10 分間攪拌した。反応液をアセトニトリル/エタノール/酢酸エチル(270 mL, 4 : 4 : 1, v/v/v)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、アセトニトリル/エタノール(1 : 1, v/v)で洗浄後、乾燥し、**18** (1.7 g, 94%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 405 (102.2), 561 (9.2), 610 (5.2), 666 (18.5). ESI-MS m/z : 982 [M-2Na-2H₂O+3H]⁺. ¹H-NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 50°C, 400 MHz] δ : 1.63 (3H, t, $J = 6.9$ Hz); 2.30 (3H, s); 3.05-3.22 (4H, m); 3.29-3.50 (4H, m); 3.58 (3H, s); 3.61 (6H, s); 4.35-4.71 (6H, m); 5.05-5.12 (2H, m); 6.24 (1H, d, $J = 10.4$ Hz); 6.42 (1H, d, $J = 17.6$ Hz); 7.09 (2H, d, $J = 6.4$ Hz); 7.12-7.22 (2H, m); 7.58-7.65 (2H, m); 7.70 (2H, d, $J = 5.6$ Hz); 8.10-8.24 (2H, m); 9.11 (0.2H, d, $J = 10.0$ Hz); 9.53 (1H, s); 9.55 (1H, s); 9.59 (0.8H, d, $J = 10.0$ Hz); 10.00 (1H, s); 10.26 (1H, s). HPLC: R_t 5.0 min (anti form) and 5.8 min (syn form), 96.5% purity.

第3項 動物および腫瘍

マウス大腸がん由来細胞株 colon-26 は理研セルバンクで購入した。Colon-26 細胞を 10% の非動化したウシ胎児血清(FBS)を含む RPMI 1640 培地で、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で培養した。5 週齢メス BALB/c マウス(日本クレア株式会社)の背部に colon-26 細胞(3.0×10^7 個/mL)の懸濁液 50 μ L を皮下注射した。移植した腫瘍の大きさが直径約 10 mm 以上に生育した時、腫瘍を摘出後、およそ 2 × 2 mm の小片に切り出し、5 週齢オス BALB/c マウスの左背部皮下に移植針を用いて移植した。移植後(14~21 日)、腫瘍の大きさが直径約 10 mm に達した時、マウスを BPA 結合型クロリン誘導体の生体内分布、排泄および PDT 治療効果の検討に使用した。本動物実験は、県立広島大学庄原キャンパスの研究倫理委員会(第 012 号)の承認を得て行った。

第4項 *In vivo* での BPA 結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** を PBS に溶解し(2 μ mol/mL)、colon-26 担がんマウスに 10 μ mol/kg を尾静脈投与した(マウス 20 g の場合 100 μ L を投与)。担がんマウスから採取された 8 種類の組織および血清について、投与後の下記時間における各クロリン誘導体の生体内分布およびクリアランスを調査するために分析した。8 種類の組織は腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉および皮膚とした。エーテル麻酔下、投与 1、3、6、12 および 24 時間後に 8 種類の組織および心臓採血により全血を採取した(各時点で n = 4)。全血を 37°C で 2 時間静置した後、2,000 g で 15 分間遠心分離し、上清として血清を得た。腎臓は両側を採取し、筋肉は両足大腿部、皮膚は腹部(約 20 × 20 mm)から採取した。これらの組織および血清を分析まで -80°C で凍結保存した。BPA 結合型クロリン誘

導体 **15** および **18** の各組織および血清中の濃度は蛍光測定により決定した。各組織の湿重量を記録し、各組織および血清を超純水と混合した(100 mg 組織または 100 μ L 血清/500 μ L 超純水)。血清を除く各組織をホモジナイザー(S-203、株式会社池田理化製)でホモジナイズ後、4°C、12,000 g で 10 分間遠心分離し、上清を得た。血清はホモジナイズおよび遠心分離を行わなかった。得られた各上清を 200 μ L ずつ 96 穴マイクロプレートに分注し、マルチスペクトロマイクロプレートリーダー(Varioskan Flash、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)で蛍光を測定した。BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** の蛍光測定のための励起波長および検出波長を Table 3.1 に示した。各組織および血清中の BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** の濃度は、幾つかの異なる既知濃度の各 BPA 結合型クロリン誘導体超純水溶液を調製し、それらの蛍光を測定することにより作成した検量線から算出した。濃度の平均値 \pm 標準誤差を各時点において算出した(n = 4)。

Table 3.1. Excitation and detection wavelength for fluorescence measurements of BPA-conjugated chlorin derivatives **15** and **18**.

Chlorin derivative	Excitation wavelength (nm)	Detection wavelength (nm)
15	420	650
18	405	665

第5項 *In vivo* での BPA 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価

BPA 結合型クロリン誘導体 **18** を PBS に溶解し(2 $\mu\text{mol/mL}$)、colon-26 担がんマウスに 10 $\mu\text{mol/kg}$ を尾静脈投与した(マウス 20 g の場合 100 μL を投与、 $n = 4$)。対照群として担がんマウスに PBS のみ尾静脈投与した($n = 5$)。投与 3 時間後、シーシーエス株式会社製 LED 光源装置(660 nm)を使用し、腫瘍部へ 75.5 J/cm^2 (照射距離 : 25 mm、0.1429 W \times 528 sec)の光照射を行った。光照射中、腫瘍部を除くマウスの体表面を黒布で覆い遮光した(第2章、Fig. 2.1 参照)。誘導体 **18** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群について、7 日間腫瘍の生育を計測することにより治療効果を評価した。デジタルノギスを用いて腫瘍の長径(mm)および短径(mm)について寸法を測定し、(長径) \times (短径) $^2 \times 1/2$ の計算式⁷⁰⁾で腫瘍体積(mm^3)を算出した。誘導体 **18** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群との腫瘍体積の差を *t* 検定($P < 0.05$)で分析した。

第6項 *In vitro* での BPA 結合型誘導体の細胞毒性評価

BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** の細胞毒性評価を WST-8 試験で行った。WST-8 試薬は株式会社同仁化学研究所から購入した。Colon-26 細胞を 100 units/mL のペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシンと 10%の非動化したウシ胎児血清(FBS)を含む RPMI 1640 培地で、5% CO_2 雰囲気下、37°C で培養した。その細胞を 96 穴マイクロプレートの各穴に 5.0×10^3 個/100 μL ずつ播種し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 24 時間培養した。培養後、培地を廃棄し、BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** をそれぞれ 1、3 および 10 μM 含む培地と交換し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 24 時間培養した。WST-8 溶液 10 μL を各穴に添加し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 2 時間培養した。マイクロプレートリーダー(Multiskan FC、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)にて 450 nm

の吸光度を測定した。陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を100%として、 $(\text{評価物質の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}) / (\text{陰性対照の吸光度} - \text{ブランクの吸光度}) \times 100$ の計算式で評価物質の生細胞率(%)を算出した。各試験において生細胞率の平均値 \pm 標準偏差を算出した(n = 3)。

第3節 結果および考察

第1項 新規 BPA 結合型クロリン誘導体の分子設計

第2章にて優れた腫瘍組織選択的集積性および正常組織排泄性を見出した新規クロリン誘導体 **8** と BPA 関連化合物を結合した2種類の新規 BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** を分子設計した(Fig. 3.1)。誘導体 **15** は、クロリン誘導体 **8** における A の位置に BPA 関連化合物を結合させ、第2章の検討でクロリン誘導体 **8** の優れたがん組織選択的集積性および正常組織排泄性に関与している可能性が示唆されたイミノジ酢酸基を残した化合物である。一方、誘導体 **18** は、誘導体 **8** におけるイミノジ酢酸基(B の位置)の片方のカルボシキル基を別の極性基である 4-ボロノフェニル基に置き換えた化合物である。次項では各誘導体の合成について詳細を述べる。

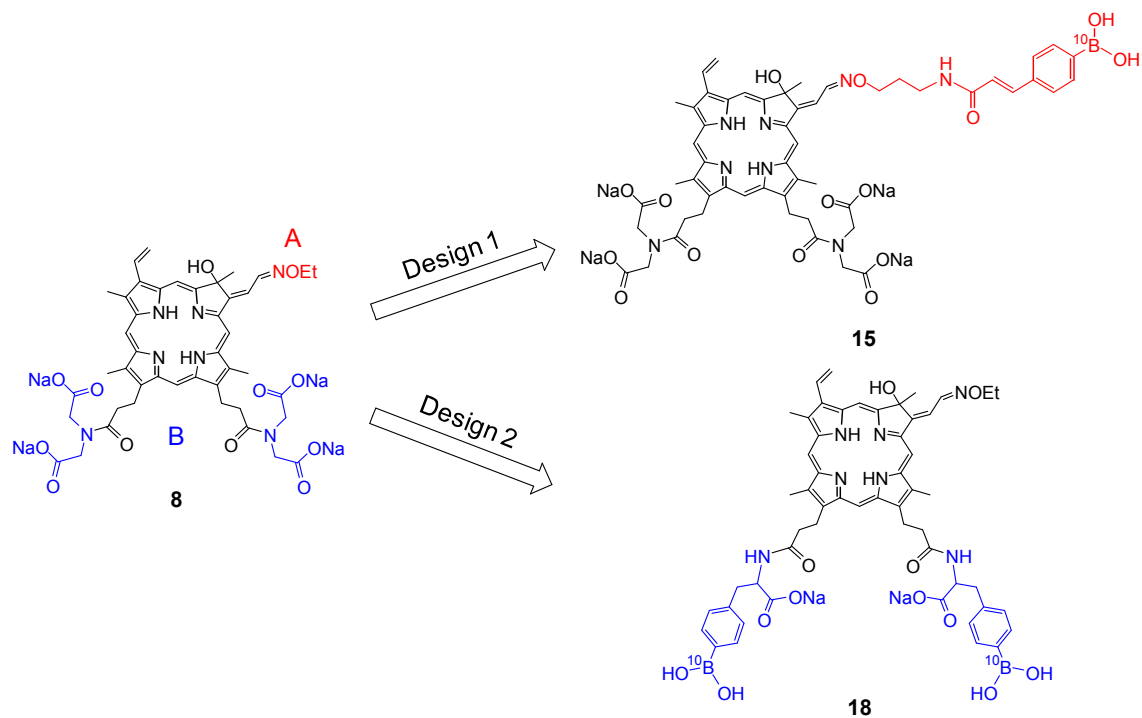
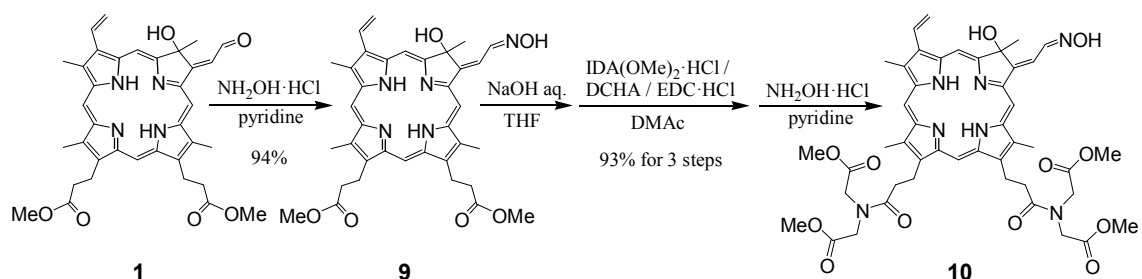


Figure 3.1. Molecular design strategy for efficient PDT/BNCT agents.

第2項 新規 BPA 結合型クロリン誘導体の合成

先ず、BPA 結合型クロリン誘導体 **15** の合成を検討した。出発原料の photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**) のアルデヒド基のヒドロキシイミノ化をピリジン中、ヒドロキシルアミン塩酸塩存在下で行った (Scheme 3.1)。反応開始後 1 時間の TLC (酢酸エチル/*n*-ヘキサン, 1 : 1, v/v) により、原料の消失 ($R_f = 0.29$) および目的物のスポット ($R_f = 0.21$) を確認し、当該反応溶液を水中に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取および水洗後、乾燥し、ヒドロキシルイミノ基誘導体 **9** を収率 94% で得た。**9** のメチルエステルの加水分解を水酸化ナトリウム水溶液によるアルカリ条件下で行った後、得られたジカルボン酸誘導体とイミノジ酢酸ジメチルエステルの縮合を DMAc 中、EDC 存在下で行った。TLC (ジクロロメタン/メタノール, 16 : 1, v/v) で反応を追跡したところ、反応開始後 7 時間でモノイミノジ酢酸アミド化物 ($R_f = 0.12$) の消失を確認し、目的物とするジイミノジ酢酸アミド化物 ($R_f = 0.53$)、僅かな緑色の副生成物 ($R_f = 0.64$) および原点部のスポット (*N*-アシル尿素) を確認した。 $R_f = 0.64$ の緑色のスポットはアミド化の酸性条件によりヒドロキシルアミノ基が脱離した化合物と考えられたため、当該反応溶液の後処理後、未精製のままピリジン中、ヒドロキシルアミン塩酸塩存在下で再ヒドロキシイミノ化を行った。反応開始後 30 分後の TLC (ジクロロメタン/メタノール, 16 : 1, v/v) により、緑色の副生成物 ($R_f = 0.64$) の消失を確認したため、当該反応溶液を冷却した 10% 酢酸水溶液に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取および水洗後、乾燥した。最後に、得られた固体のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、TLC 上の原点部の副生成物 (*N*-アシル尿素) を除去し、ジアミド誘導体 **10** を収率 93% (3 工程収率) で得た。



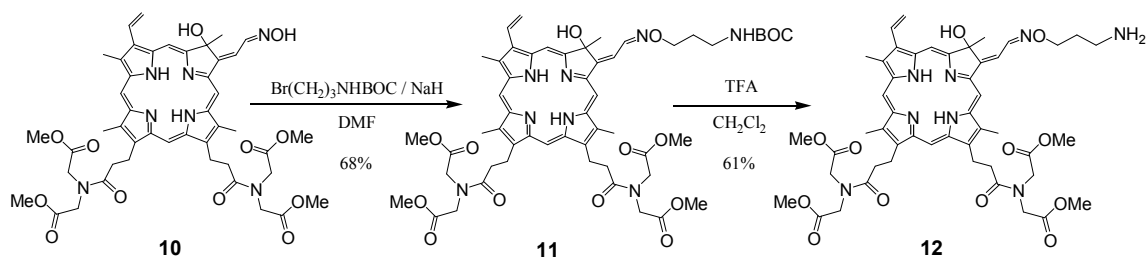
Scheme 3.1. Synthesis of chlorin derivative 10.

BPA 関連化合物の 4-boronocinnamic acid (**13**)とクロリン誘導体とをアミド結合を介して結合させるためにアミノ基を有するクロリン誘導体の合成が必要であった。誘導体 **10** のヒドロキシイミノ基と BOC 基で保護したアミノプロピルハライドを DMF 中、水素化ナトリウム存在下で反応させた(Scheme 3.2)。反応開始後 30 分で反応は終了し、TLC (ジクロロメタン/メタノール, 8 : 1, v/v)により、目的物 **11** ($R_f = 0.60$)および目的物よりも極性の大きい緑色の副生成物のスポットを確認した。当該副生成物は酢酸エチルを溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に除去することができ、誘導体 **11** を収率 68%で得た。誘導体 **11** の脱 BOC 化をジクロロメタン中、TFA (ジクロロメタン 1 mL に対して 0.45 mL、約 30%濃度)存在下で行ったところ、TLC (ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 10 : 2 : 1, v/v/v)により、反応開始後 20 分で原料 **11** の消失を確認し、目的物 **12** ($R_f = 0.41$)および原点部付近に副生成物の生成を確認した。原点部付近の副生成物は THF、次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)を溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に除去することができ、誘導体 **12** を収率 61%で得た。

本脱保護反応は、比較的 low 収率であったため反応条件の最適化を試みた (Table 3.2)。反応条件 1 では、上述のように反応終了時の TLC 分析において、原点部付近に副生成物のスポットを確認した。本副生成物は、当該反応条件で

使用した TFA の添加量が過剰であり、比較的過酷な条件であったことから生成したと考えられた。そのため、先ず TFA の添加量を検討した。条件 1 では溶媒中の TFA 濃度が 30% であるのに対し、10% および 20% に減少した条件 2 および 3 を検討したところ、条件 1 と比較して反応時間が延長されると共に、TLC 分析において原点部付近の副生成物の増加を確認し、目的物 **12** の収率が低下した。これは反応時間の延長に伴い、原料 **11** および目的物 **12** が酸性条件下に曝される時間が延長され、それらの分解が進んだことが原因と考えられた。一方、溶媒の種類を検討したところ、THF または DMF を使用した条件 4 または 5 では、全く反応が進行しなかった。以上の結果から TFA を試薬とした **11** の脱 BOC 化条件として 1 が最適条件であると判断した。

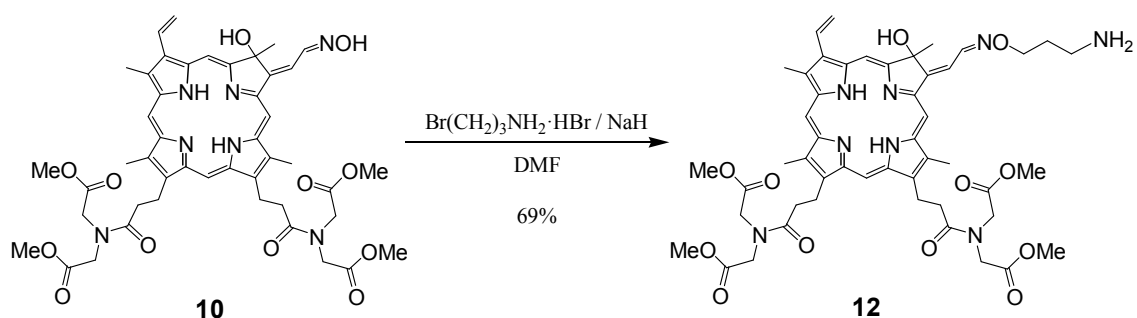
次に、TFA 以外の試薬を用い当該脱 BOC 化の検討を実施した。試薬兼溶媒としてギ酸を用いた場合、0°C の条件 6 では反応開始後 2 時間経過した時点で原料の残留を確認したが、室温の条件 7 では TFA と同等の反応時間で原料が消失した。しかしながら、各反応溶液の TLC 分析において TFA を用いた条件下では生じない副生成物を確認したため、ギ酸を用いた条件は不適と判断した。一方、DFA を試薬に用いた場合、条件 1 と同量の試薬を使用した条件 8 では反応が 2 時間で終了したものの、条件 1 と比較して TLC 分析において原点部付近の副生成物を比較的多く確認した。当該副生成物は反応時間に比例して増加していたため、反応時間を短縮させることにより、その生成を抑制できると考え、試薬の使用量を増加した条件 9 を実施した。反応 20 分後、若干原料の残留を確認したものの、原点部付近の副生成物は条件 1 と同等であった。そのため、反応終了し、目的物 **12** の収率を確認したところ 53% であり、条件 1 と比較して低収率であった。以上の結果から、**11** の脱 BOC 化反応は 30%TFA/ジクロロメタン溶液で実施する当初の条件 1 が最適条件であると判断した。

Scheme 3.2. Synthesis of chlorin derivative **12**.Table 3.2. Deprotection of the BOC group of compound **11**.

Entry	Reagent	Solvent	Ratio (reagent/solvent)	Temp. (°C)	Time (min)	Yield (%)
1	TFA	CH_2Cl_2	0.45/1	0	20	61
2	TFA	CH_2Cl_2	0.1/1	0	>120	-
3	TFA	CH_2Cl_2	0.25/1	0	60	49
4	TFA	THF	0.45/1	0	-	-
5	TFA	DMF	0.45/1	0	-	-
6	Formic acid	-	-	0	>120	-
7	Formic acid	-	-	r.t.	20	-
8	DFA	CH_2Cl_2	0.45/1	0	120	-
9	DFA	CH_2Cl_2	1/1	0	20	53

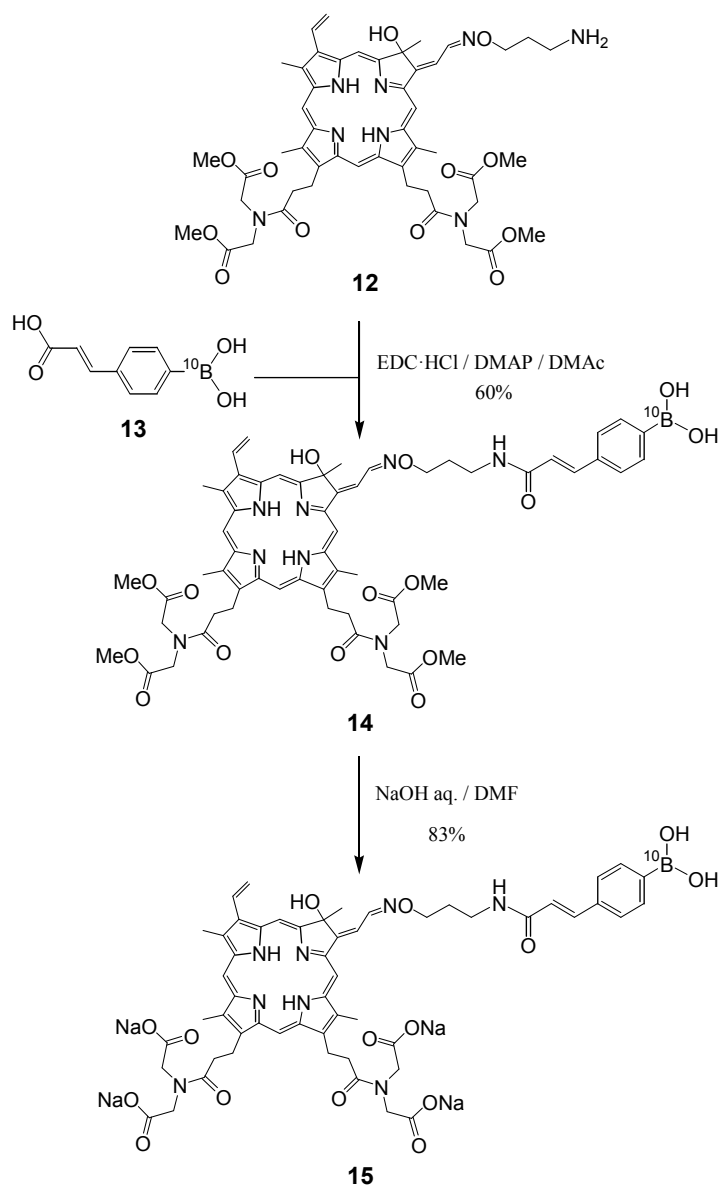
前述の脱 BOC 化反応条件の検討で誘導体 **11** を経て **12** を得る場合、これ以上の収率の向上が見込めないことが判明したため、アミノ基が未保護のアミノプロピルハライドと誘導体 **10** の反応により誘導体 **12** を得る経路を検討した (Scheme 3.3)。誘導体 **10** のアミノプロピル化を DMF 中、3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩および水素化ナトリウム存在下で行ったところ、TLC (ジクロロ

メタン/メタノール/酢酸, 10 : 2 : 1, v/v/v)により、反応開始後 1 時間で原料 **10** ($R_f = 0.93$)の消失を確認し、目的物 **12** ($R_f = 0.41$ 、濃茶色のスポット)および僅かな緑色の副生成物($R_f = 0.15$)のスポットを確認した。当該緑色の副生成物は THF、次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)を溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に除去することができ、誘導体 **12** を収率 69%で得た。誘導体 **11** を経て **12** を合成する経路と比較して、誘導体 **10** から **12** を合成する経路では収率が約 1.7 倍に向上した。一方、上記の誘導体 **10** のアミノプロピル化反応において確認された副生成物(緑色のスポット)は、アミノ基を BOC 基で保護したアルキルハライドを用いた場合でも確認されており、当該副生成物を単離し、MS および UV-vis スペクトル分析により構造推定を行った。MS 分析ではアミノプロピル誘導体 **12** と等しい m/z 953 が得られ、UV-vis スペクトル分析(ピリジン溶媒)では誘導体 **12** と比較して極大吸収波長の高波長側へのシフト(**12** : 676 nm、副生成物 : 686 nm)を確認した。これにより、副生成物の化学構造をポルフィリン環のピロールの窒素がアミノプロピル化された化合物と推定した。

Scheme 3.3. Synthesis of chlorin derivative **12**.

アミノプロピル誘導体 **12** と 4-boronocinnamic acid (**13**) (^{10}B 濃縮)の縮合を DMAc 中、4-ジメチルアミノピリジンおよび EDC 存在下で行った(Scheme 3.4)。TLC(ジクロロメタン/メタノール, 8 : 1, v/v)で反応を追跡したところ、反応開始

後3時間で原料 **12** (原点部)の消失および目的物 **14** ($R_f = 0.55$)の生成を確認したため、当該反応溶液の後処理後、酢酸エチル/メタノール(20 : 1, v/v)を溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、誘導体 **14** を収率60%で得た。最後に、**14** のメチルエステル基の加水分解を DMF 中、水酸化ナトリウム水溶液存在下で行い、BPA 結合型クロリン誘導体 **15** を収率83%で得た。

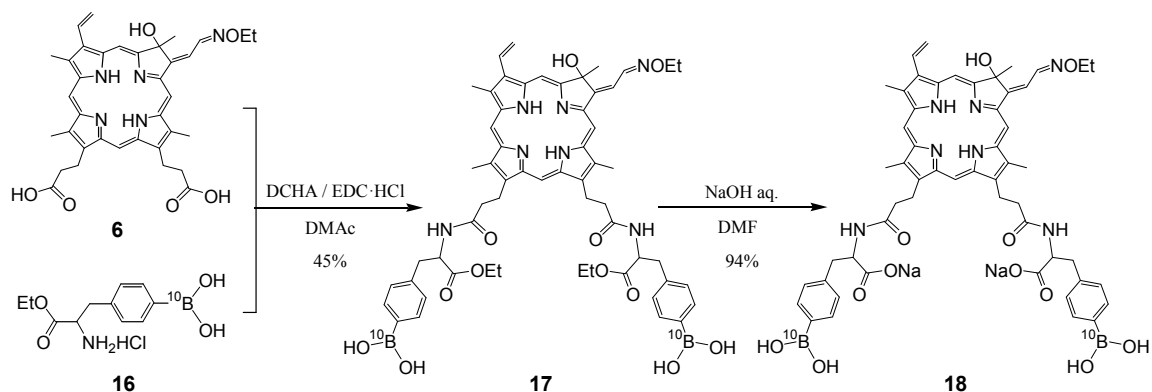


Scheme 3.4. Synthesis of 4-boronocinnamic acid-conjugated chlorin derivative **15**.

一方、BPA 結合型クロリン誘導体 **18** の合成経路を Scheme 3.5 に示した。エ

トキシイミノ基誘導体 **6** と L-4-boronophenylalanine ethyl ester hydrochloride (**16**) (^{10}B 濃縮)の縮合を DMAc 中、ジシクロヘキシルアミンおよび EDC 存在下で行った。TLC(ジクロロメタン/メタノール, 8 : 1, v/v)で反応を追跡したところ、反応開始後 1.5 時間において、 $R_f = 0.02$ に僅かな原料 **6** の残存とモノアミド化物 ($R_f = 0.44$)および目的物であるジアミド化物 **17** ($R_f = 0.62$)の生成を確認した。この時点では、モノアミド化物および目的物 **17** の生成比率は、TLC 上における各スポットの大きさから 1 : 1 であった。さらに 7 時間反応させることにより (トータル 8.5 時間)、モノアミド化物は完全に消失し、目的物 **17** がメインスポットとなったため、反応を終了した。当該反応溶液の後処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行った。精製前の TLC 分析(ジクロロメタン/メタノール, 8 : 1, v/v)にて、目的物 **17** ($R_f = 0.62$)に近接した位置に僅かな副生成物のスポット ($R_f = 0.66$)を確認していたが、ジクロロメタン/メタノール(50 : 1、100 : 3、次いで 25 : 1, v/v)を溶離液に用いたシリカゲルカラムクロマトグラフィーで当該副生成物を除去することができ、誘導体 **17** を収率 45%で得た。最後に、**17** のエチルエステル基の加水分解を DMF 中、水酸化ナトリウム水溶液存在下で行った。反応は定量的に進行し、反応開始後 10 分で原料 **17** の消失を TLC(アセトニトリル/水/酢酸, 5 : 4 : 1, v/v/v)で確認した。当該反応溶液をアセトニトリル/エタノール/酢酸エチル(4 : 4 : 1, v/v/v)中に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取した。当該沈殿物の洗浄は、エタノールのみでは溶解したため、アセトニトリル/エタノール(1 : 1, v/v)で行い、乾燥後、BPA 結合型クロリン誘導体 **18** を収率 94%で得た。

今回合成した新規 BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** は ^1H NMR、UV-vis スペクトルおよび MS により化学構造を同定した。**15** および **18** は良好な水溶性(100 mg/mL)を示した。



Scheme 3.5. Synthesis of BPA-conjugated chlorin derivative 18.

第3項 *In vivo* での BPA 結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

合成した新規 BPA 結合型クロリン誘導体 15 および 18 の *in vivo* での腫瘍集積性および正常組織排泄性を評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

Fig. 3.2 および 3.3 に BPA 結合型クロリン誘導体 15 および 18 の投与(10 $\mu\text{mol/kg}$)後、1 時間から 24 時間に至るまでのマウスの各組織および血清における各クロリン誘導体の集積量を示し、Fig. 3.4 に BPA 結合型クロリン誘導体 15 および 18 の腫瘍組織への集積量の経時的变化を示した。誘導体 15 および 18 は、共に優れた腫瘍組織への選択的集積性および速やかな正常組織からの排泄性を示した。これにより、クロリン誘導体 8 の化学構造を基にした誘導体 15 および 18 の分子設計の成功が示唆された。誘導体 15 の腫瘍組織集積量は、投与後 1 時間から 24 時間に至るまでの各時点において血清を除く全ての組織よりも高く、投与後 12 時間において最大集積値(0.21 pmol/mg)に達した(Fig. 3.2)。

誘導体 **18** の腫瘍組織集積量は、投与後全ての時点において血清および肝臓よりも低い値を示したが、投与後 3 時間において最大集積値(0.27 pmol/mg)に達した(Fig. 3.3)。投与後 24 時間における誘導体 **15** および **18** の血清を除く正常組織中の残存量は、僅かに検出される量にまで低下していた。誘導体 **18** は、誘導体 **15** と比較して 4 分の 1 の時間で腫瘍組織内において最大集積量に達した(Fig. 3.4)。PDT および BNCT 薬としてのポルフィリン誘導体には、副作用である光線過敏症を軽減するために、可能な限り短い時間で腫瘍組織内において最大集積量に達した後、速やかに体内から排泄されることが求められる。また、BNCT の治療効果は、腫瘍特異的集積性を有すると共に化学構造中に多くの ^{10}B 原子を有する薬剤を使用することにより向上されると考えられる。したがって、本評価結果から、化学構造中に ^{10}B 原子数を誘導体 **15** の 2 倍有している誘導体 **18** は、誘導体 **15** と比較して PDT および BNCT 両用薬としてより優れた性能を有していることが示唆された。

一方、臨床において BNCT を有効に行うために必要な ^{10}B 濃度は、腫瘍組織 g あたり 20~30 μg であるとされている³⁹⁾。また、BNCT 薬の T/B 比[血液中(B)に対する腫瘍組織内(T)の ^{10}B 濃度比]は、血管系の壊死の発生を避けるために、少なくとも 1 が必要であり、5 以上が最適とされている^{38,74)}。誘導体 **18** の ^{10}B 濃度は、腫瘍組織内で最大集積量に達した時点においても有効な BNCT に必要な ^{10}B 濃度と比較して低く、誘導体 **18** の T/B 比は、全ての時点において 1 以下であった。本評価では、PDT への使用を想定して、各クロリン誘導体の投与量、投与後の当該腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の調査時点を設定した。今後の研究において、BNCT への使用を想定した誘導体 **18** の評価が必要と考えられる。

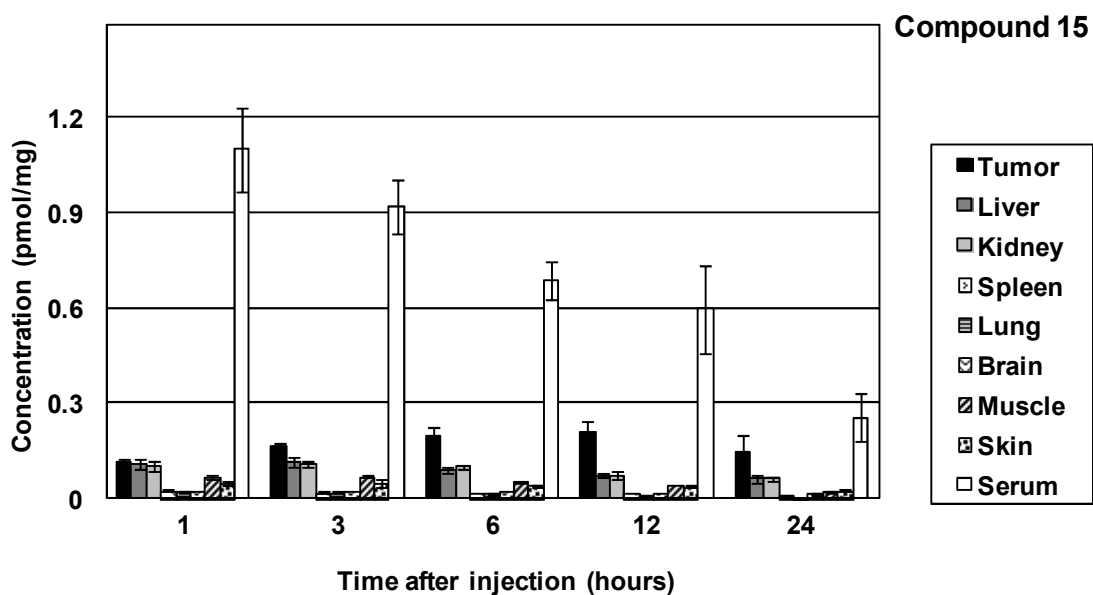


Figure 3.2. *In vivo* biodistribution of 4-boronocinnamic acid-conjugated chlorin derivative **15** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **15** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

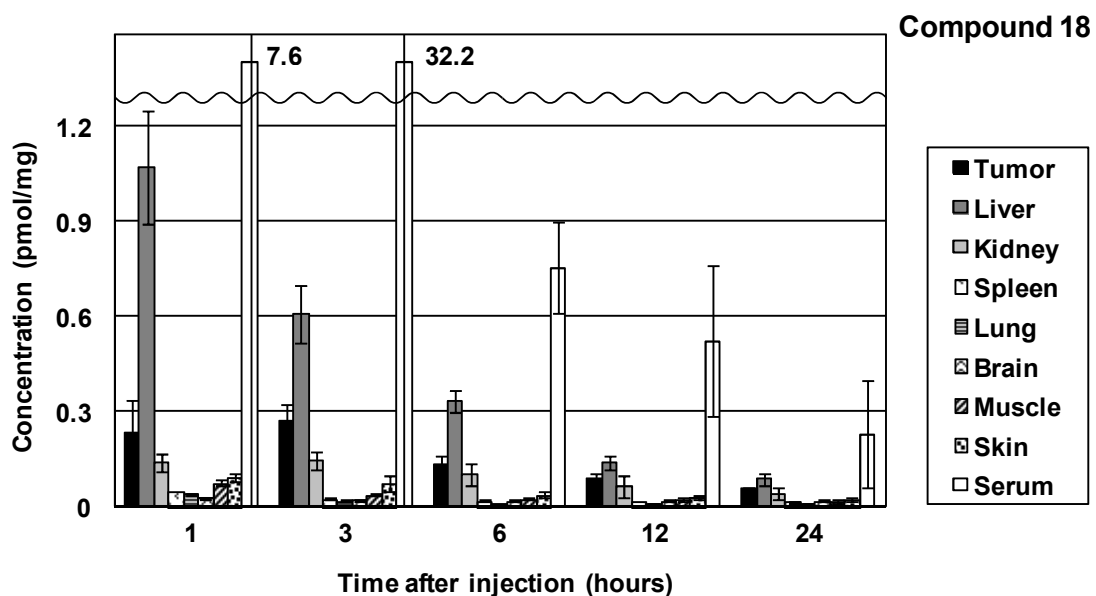


Figure 3.3. *In vivo* biodistribution of BPA-conjugated chlorin derivative **18** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **18** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

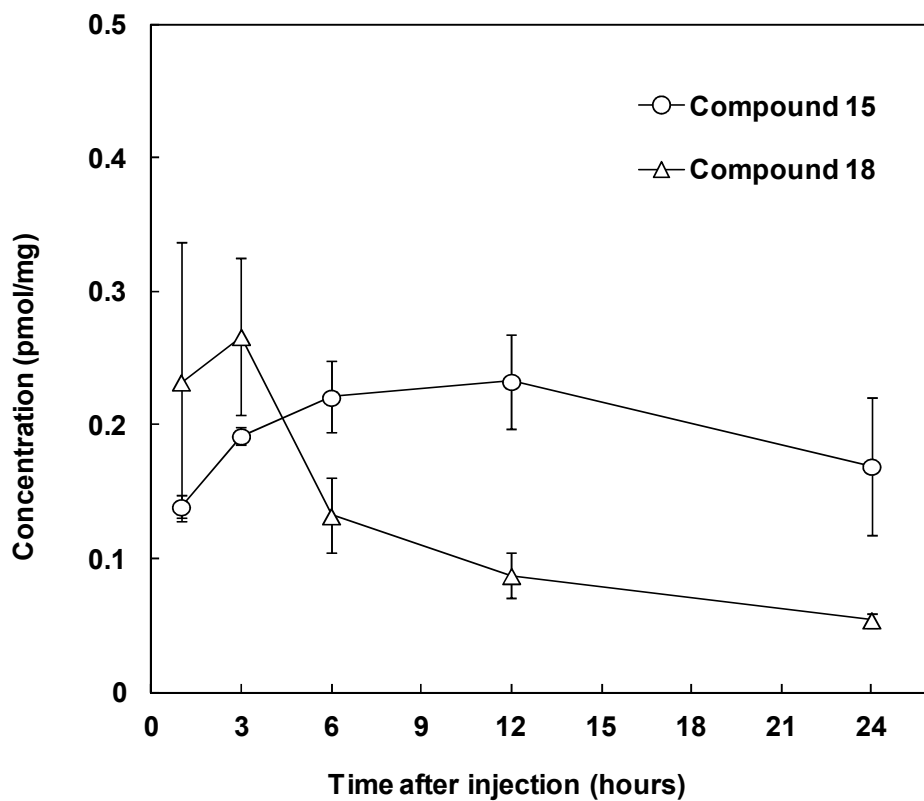


Figure 3.4. The concentrations of BPA related compound-conjugated chlorin derivatives **15** and **18** in tumor tissue at the indicated times after intravenous injection into colon-26 tumor-bearing BALB/c mice. All data represent means \pm SE (n = 4).

第4項 *In vivo* での BPA 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価

In vivo での新規 BPA 結合型クロリン誘導体 **18** を用いた PDT による抗がん効果を LED 光照射(660 nm)後の colon-26 担がんマウスのがん生育率を計測することにより評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏、三浦香織氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

誘導体 **18** による PDT 群および光照射のみの対照群について、光照射後 7 日間の腫瘍体積を計測した(Fig. 3.5)。光照射後 3、5 および 7 日目において、誘導体 **18** による PDT 群は、光照射のみの対照群と比較して腫瘍の生育が統計的有意($P < 0.05$)に抑制された。また、BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** の *In vitro* での細胞毒性試験結果を Fig. 3.6 に示した。誘導体 **15** および **18** は、それらの腫瘍組織集積濃度より高い濃度においても細胞毒性を示さないことが明らかとなった。一方、本評価実験において、第2章の検討時と同様に LED 光照射中にマウスの光照射部位の皮膚表面において 2~3°C の温度上昇が確認された。第2章の PDT 後の腫瘍および正常組織切片の観察による比較検討によって、PDT 群で確認された腫瘍生育抑制効果は、温熱療法⁷³⁾によるものではなく PDT によるものであることが裏付けされている。以上の結果から、誘導体 **18** の抗がん効果は PDT によって引き起こされたものであり、**18** は PDT および BNCT 両用薬の候補化合物となる可能性が示唆された。

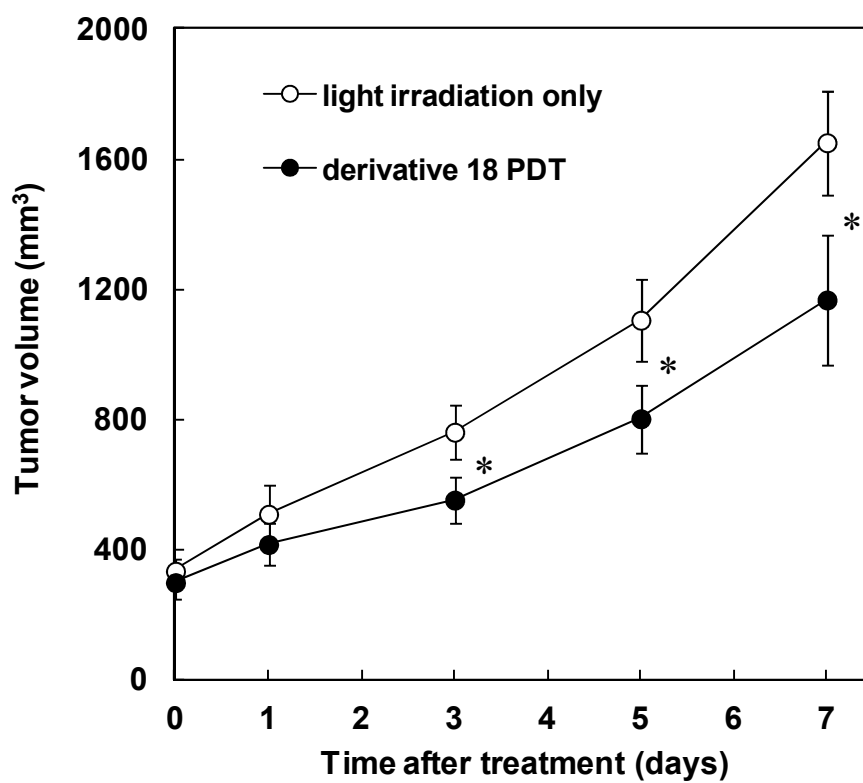


Figure 3.5. Tumor growth of colon-26 tumor-bearing BALB/c mice treated with PBS with irradiation and compound **18** (10 $\mu\text{mol/kg}$) with irradiation. Tumor volumes were measured for 7 days after treatment. All data represent means \pm SE (derivative **18** PDT group: $n = 4$, light irradiation group: $n = 5$). *, $P < 0.05$ compared with the control.

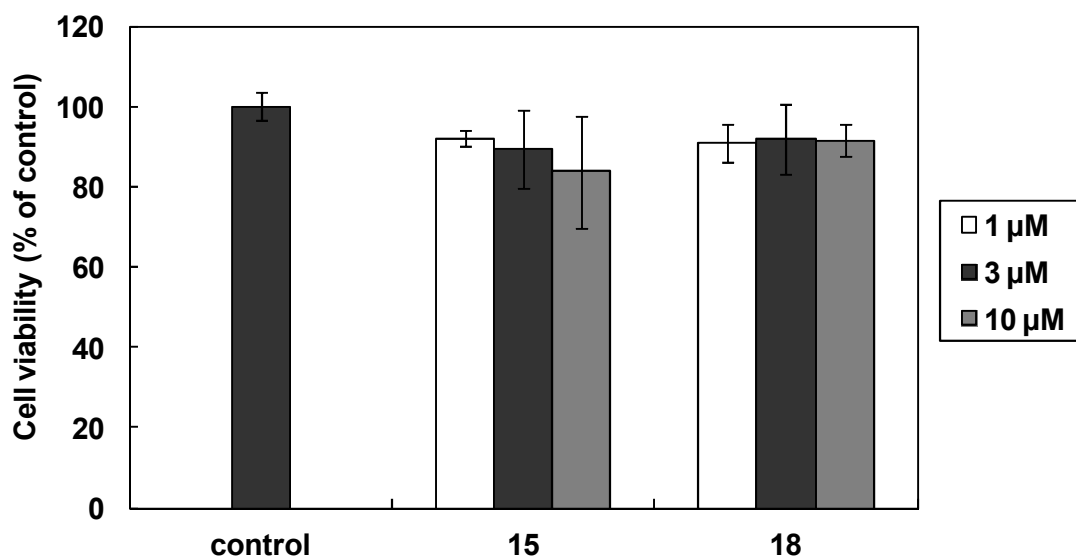


Figure 3.6. Cytotoxicity of BPA related compound-conjugated chlorin derivatives **15** and **18**. Colon-26 cells were incubated in a medium containing BPA related compound-conjugated chlorin derivatives **15** and **18** at each concentration (1, 3 and 10 μM) for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cell viability was determined by using WST-8. Vehicle-treated cells were arbitrarily set as 100% control viability. All data represent means ± SD (n = 3).

第4節 第3章の結論

本章では、既存の BNCT 薬の低腫瘍集積性の改善を目的として、優れたがん組織選択的集積性を有するイミノジ酢酸誘導体 **8** の化学構造を基に設計したクロリン誘導体をホウ素キャリアーに選択し、当該クロリン誘導体と BPA 関連化合物を結合した2種類の新規 BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** を合成した。両化合物の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性を第2章と同様の方法にて評価したところ、誘導体 **18** により優れた腫瘍集積性および正常組織排泄性が認められた。これにより、イミノジ酢酸誘導体 **8** のホウ素キャリアーとしての有用性が示唆された。また、誘導体 **18** を用いた PDT により、がんの生育は統計的に有意に抑制されたため、PDT および BNCT 両用薬の候補化合物となる可能性が示唆された。しかしながら、本章で行った PDT への使用を想定した誘導体 **18** の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の評価では、その腫瘍組織中の ^{10}B 濃度および T/B 比は、効果的な BNCT に求められる値と比較して低かった。今後の研究において、BNCT への使用を想定して、誘導体 **18** の投与量の最適化および投与後の中性子線照射を考慮した時点での腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の評価が必要と考えられた。

第4章 PDT および BNCT 両用薬としての新規 BSH 結合型クロリン誘導体の合成と評価

第1節 はじめに

第3章において、著者らは既存の BNCT 薬の低腫瘍集積性を改善するために、優れたがん組織選択的集積性および正常組織排泄性が見出された新規水溶性クロリン誘導体 **8** をホウ素キャリアーに選択し、当該誘導体とホウ素源である BPA 関連化合物を結合した新規 BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** を合成した。両化合物を比較して誘導体 **18** により優れた腫瘍集積性および正常組織排泄性が認められ、誘導体 **18** の PDT 薬としての効果を評価したところ、がんの生育は有意に抑制された。この結果から、クロリン誘導体 **8** のホウ素キャリアーとしての有用性が示唆された。

本章では、BPA と比較して 12 倍のホウ素原子を有する BSH をホウ素源に選択し、第3章の BPA 結合型クロリン誘導体の合成と同様に、誘導体 **8** の化学構造を基にして 4 種類の新規 BSH 結合型クロリン誘導体を合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した。

第2節 実験方法

第1項 試薬および一般的測定方法

クロリン誘導体 **4**、**9** および **12** は第2章、第3章および文献に従い合成した^{66,67)}。シアノエチル化 BSH 誘導体 **21** は BSH (¹⁰B 濃縮)から文献の方法を一部変

更して合成した⁷⁵⁾。他の全ての試薬および溶媒は和光純薬工業株式会社またはシグマアルドリッチジャパン株式会社から購入した。TLC はメルク株式会社から購入した Silica gel 60 F₂₅₄ または RP-8 F_{254S} で行った。カラムクロマトグラフィーは和光純薬工業株式会社から購入したシリカゲル(Wakogel C-200, 75~150 μm)または富士シリシア化学株式会社から購入したオクタデシルシリル(ODS)シリカゲル(Chromatorex)で行った。¹H NMR の測定にはブルカー社製 ARX-400 (400 MHz)、バリアン社製 NMR System 600(600 MHz)を使用し、テトラメチルシランを内部標準物質とした。化学シフトは ppm (δ)で記録し、カップリングコンスタント(*J*)は Hz 単位で表した。MS の測定には株式会社島津製作所製単一四重極質量分析計 LCMS-QP8000 を使用し、ESI(陽イオンまたは陰イオン)で行った。UV-vis スペクトルの測定には株式会社島津製作所製 UV-2400PC を使用した。

第2項 BSH 結合型クロリン誘導体の合成

8-Aminopropoxyiminoethylidene-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (19)

9 (10 g, 15.7 mmol)を DMF (150 mL)に溶解し、水素化ナトリウム(鉱油中 60% 分散)(1.4 g, 34.5 mmol)および 3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩(3.4 g, 15.7 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液を水(1.5 L)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[THF、次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)]で精製し、**19** (7.3 g, 67%)を得た。

ESI-MS *m/z*: 695 [M+H]⁺.

8-[3-(Bromoacetylamino)propyloxyiminoethylidene]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (20)

19 (5 g, 7.2 mmol)をジクロロメタン(150 mL)に溶解し、0°C でトリエチルアミン(1 mL, 7.2 mmol)およびブロモアセチルブロミド(0.75 mL, 8.6 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液をジクロロメタンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、水洗した。当該ジクロロメタン溶液を硫酸ナトリウムで乾燥後、エバポレーターで濃縮した。濃縮物を酢酸エチルで再結晶化し、**20** (2.5 g, 43%)を得た。

ESI-MS m/z : 815 [M+H]⁺.

8-(3-[(2-Cyanoethyl)(B₁₂H₁₁)sulfonio]acetylamino}propyloxyiminoethylidene)-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester monosodium salt (22)

20 (1.3 g, 1.5 mmol)を DMF (30 mL)に溶解し、**21** (580 mg, 2.2 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液(150 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/メタノール(100 : 3, v/v)]で精製し、**22** (500 mg, 33%)を得た。

ESI-MS m/z : 953 [M-Na]⁻. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -1.93 (2H, br s); 2.00-3.20 (11H, m); 2.28 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.47 (3H, s); 3.37 (2H, dd, $J = 3.6, 7.8$ Hz); 3.38 (2H, dd, $J = 3.6, 7.2$ Hz); 3.46 (3H, s); 3.47 (3H, s); 3.50-3.56 (2H, m); 3.59 (3H, s); 3.60 (6H, s); 3.66-3.80 (2H, m); 3.96 (1H, dt, $J = 7.2, 12.6$ Hz); 4.04 (1H, dt, $J = 7.2, 12.6$ Hz); 4.37 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.44 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.51-4.60 (2H, m); 4.57 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 4.73 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 6.04 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.35

(1H, d, $J = 18.0$ Hz); 8.24 (1H, dd, $J = 12.0, 18.0$ Hz); 8.39 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.72 (1H, s); 9.85 (1H, t, $J = 5.4$ Hz); 9.89 (1H, s); 9.98 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.06 (1H, s); 10.23 (1H, s).

8-({3-[(B₁₂H₁₁)sulfanyl]acetylamino}propyloxyiminoethylidene)-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid tetrasodium salt (23)

22 (400 mg, 0.41 mmol)をエタノール(5 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(3 mL)を加え、室温で5時間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(30 mL, 2 : 1, v/v)で希釈後、エバポレーターで濃縮した。得られた濃縮物を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー[水、次いでエタノール/水(3 : 2, v/v)]で精製し、**23** (202 mg, 51%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 402 (97.4), 576 (7.0), 657 (12.0). ESI-MS m/z : 290 [M-4Na+H]³⁻. ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 1.80-2.60 (11H, m); 2.13 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.24 (3H, s); 3.16-3.24 (4H, m); 3.39 (3H, s); 3.42 (3H, s); 3.45 (3H, s); 3.51 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.30-4.56 (8H, m); 6.09 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.28 (1H, d, $J = 17.4$ Hz); 8.00 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 8.06 (1H, dd, $J = 11.4, 17.4$ Hz); 9.32 (1H, s); 9.55 (1H, s); 9.57 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.82 (1H, s); 10.20 (1H, s).

8-[3-(Bromoacetylamino)propyloxyiminoethylidene]-13,17-bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester (24)

12 (6.6 g, 6.9 mmol)をジクロロメタン(180 mL)に溶解し、0°C でブロモアセチルブロミド(0.72 mL, 8.3 mmol)を加え、室温で20分間攪拌した。反応液をジク

ロロメタンで希釈し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で中和後、水洗した。当該ジクロロメタン溶液を硫酸ナトリウムで乾燥した後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/*n*-ヘキサン(4 : 1, v/v)、次いで酢酸エチル]で精製し、**24** (3.8 g, 51%)を得た。

ESI-MS m/z : 1073 [M+H]⁺.

8-(3-[(2-Cyanoethyl)(B₁₂H₁₁)sulfonio]acetylamino}propyloxyiminoethylidene)-13,17-bis[(*N,N*-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetramethyl ester monosodium salt (25**)**

24 (2.7 g, 2.5 mmol)を DMF (60 mL)に溶解し、**21** (890 mg, 3.4 mmol)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液(300 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/メタノール(25 : 1, v/v)、次いで酢酸エチル/メタノール(20 : 1, v/v)]で精製し、**25** (1.9 g, 61%)を得た。

ESI-MS m/z : 1211 [M-Na]⁻. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -1.93 (1H, br s); -1.91 (1H, br s); 2.00-3.30 (11H, m); 2.28 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.46 (3H, s); 3.41 (3H, s); 3.42 (3H, s); 3.43 (3H, s); 3.44 (3H, s); 3.47 (3H, s); 3.50-3.68 (6H, m); 3.51 (3H, s); 3.58 (3H, s); 3.68-3.80 (2H, m); 3.90-4.00 (1H, m); 4.00-4.07 (1H, m); 4.49 (1H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.56 (1H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.52-4.60 (2H, m); 4.57 (1H, d, $J = 16.8$ Hz); 4.63 (2H, s); 4.66 (2H, s); 4.68 (2H, s); 4.69 (2H, s); 4.73 (1H, d, $J = 16.2$ Hz); 6.03 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 8.24 (1H, dd, $J = 11.4, 18.0$ Hz); 8.38 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.69 (1H, s); 9.86 (1H, t, $J = 6.0$ Hz); 9.88 (1H, s); 9.97 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.04 (1H, s); 10.30 (1H, s).

8-({3-[(B₁₂H₁₁)sulfonyl]acetylamino}propyloxyiminoethylidene)-13,17-bis[(N,N-dicarboxymethyl)carbamoylethyl]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin hexasodium salt (26)

25 (1.7 g, 1.4 mmol)をエタノール(8 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(8 mL)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(150 mL, 2 : 1, v/v)で希釈後、エバポレーターで濃縮した。得られた濃縮物を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー[水、次いでエタノール/水(4 : 1, v/v)]で精製し、**26** (1.4 g, 82%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 333 (21.5), 418 (181.2), 536 (8.9), 577 (14.5), 651 (23.3). ESI-MS m/z : 367 [M-6Na+3H]³⁺. ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 50°C, 400 MHz] δ : 1.76-2.94 (11H, m); 2.34 (2H, t, $J = 5.7$ Hz); 2.50 (3H, s); 3.54-3.66 (4H, m); 3.66-3.76 (2H, m); 3.71 (6H, s); 3.73 (3H, s); 3.87 (2H, s); 4.54-4.84 (6H, m); 4.63 (4H, s); 4.68 (2H, s); 4.69 (2H, s); 6.30 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.51 (1H, d, $J = 7.7$ Hz); 8.26 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); 8.30 (1H, dd, $J = 11.7, 18.0$ Hz); 9.63 (1H, s); 9.79 (1H, d, $J = 10.5$ Hz); 9.80 (1H, s); 10.11 (1H, s); 10.35 (1H, s).

3-Ethenyl-7-hydroxyl-8-[3-(2-nitrobenzenesulfonylamino)propyloxyiminoethylidene]-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (27)

19 (3.8 g, 5.5 mmol)をピリジン(76 mL)に溶解し、NsCl (1.5 g, 6.6 mmol)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液(400 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(THF)で精製し、**27** (2.7 g, 56%)を得た。

ESI-MS m/z : 880 [M+H]⁺.

8-(3-{[3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propyl](2-nitrobenzenesulfonyl)amino}propyloxyiminoethylidene)-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (28)

3-(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルブロミド(33 mg, 0.14 mmol)を DMF (2 mL)に溶解し、炭酸カリウム(79 mg, 0.57 mmol)および **27** (100 mg, 0.11 mmol)を加え、60°C で 1.5 時間攪拌した。反応液を冷却した 10%酢酸水溶液(8 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタン/メタノール(100 : 1, v/v)、次いでジクロロメタン/メタノール(50 : 1, v/v)]で精製し、**28** (87 mg, 74%)を得た。

ESI-MS m/z : 1037 [M+H]⁺.

8-[3-(3-Aminopropylamino)propyloxyiminoethylidene]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (29)

誘導体 **28** からの合成法 : **28** (40 mg, 0.04 mmol)をジクロロメタン(800 μ L)に溶解し、TFA (360 μ L)を加え、0°C で 10 分間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(640 μ L)を加えた後、反応液をエバポレーターで濃縮した。濃縮物に冷却した 5%炭酸水素ナトリウム水溶液(10 mL)を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をカラムクロマトグラフィー[THF 次いで THF/メタノール(4 : 1, v/v)]で精製し、得られた脱 BOC 化物を次の反応に使用した。脱 BOC 化物(30 mg, 0.032 mmol)を DMF(400 μ L)に溶解し、2-メルカプトエタノール(11 μ L, 0.156 mmol)および炭酸カリウム(66 mg, 0.48 mmol)を加え、室温で 19 時間攪拌した。反応液に飽和 NaCl 水溶液(5 mL)を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体を THF (1 mL)に溶解し、*n*-ヘキサン

(1 mL)を加え、析出した沈殿物を濾取し、乾燥後、**29** [10 mg, 33%(2 工程収率)]を得た。

誘導体 30 からの合成法 : **30** (7 g, 8.2 mmol)をジクロロメタン(140 mL)に溶解し、TFA (63 mL)を加え、0°Cで10分間攪拌した。反応液にトリエチルアミン(112 mL)を加えた後、反応液をエバポレーターで濃縮した。濃縮物に5%炭酸水素ナトリウム水溶液(1 L)を加え、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥し、**29** (5 g, 81%, 未精製)を得た。

8-{3-[3-(*tert*-Butoxycarbonylamino)propylamino]propyloxyiminoethylidene}-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (30**)**

3-(*tert*-ブトキシカルボニルアミノ)プロピルブロミド(4.8 g, 20.2 mmol)をDMF (280 mL)に溶解し、炭酸カリウム(5.6 g, 40.3 mmol)および**19** (14 g, 20.5 mmol)を加え、60°Cで3時間攪拌した。反応液を冷却した飽和 NaCl 水溶液(1 L)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[ジクロロメタン/THF(1 : 1, v/v)、次いでTHF]で精製し、**30** (8 g, 47%)を得た。

$^1\text{H NMR}$ (pyridine- d_5 , 600 MHz) δ : -1.92 (2H, br s); 1.57 (9H, s); 1.93 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.22 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.48 (3H, s); 2.85 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.94 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 3.35-3.40 (4H, m); 3.47 (6H, s); 3.50-3.62 (2H, m); 3.60 (9H, s); 4.37 (2H, t, $J = 7.8$ Hz); 4.44 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.58-4.68 (2H, m); 6.04 (1H, d, $J = 12.0$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 17.4$ Hz); 8.23 (1H, dd, $J = 11.4, 17.4$ Hz); 8.42 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.12 (1H, br s); 9.88 (1H, s); 10.01 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 10.06 (1H, s); 10.23 (1H, s).

8-(3-{[3-(Bromoacetyl)amino]propyl}(bromoacetyl)amino}propoxyiminoethylidene)-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester (31)

29 (5 g, 6.6 mmol)を DMAc (270 mL)に溶解し、ブromo酢酸(3.7 g, 26.6 mmol) および EDC (10.2 g, 53.2 mmol)を加え、室温で3時間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液(1 L)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/メタノール(100 : 1, v/v)]で精製し、**31** (1.5 g, 23%)を得た。

8-[3-((3-{[(2-Cyanoethyl)(B₁₂H₁₁)sulfonio]acetyl)amino}propyl){[(2-cyanoethyl)(B₁₂H₁₁)sulfonio]acetyl}amino)propoxyiminoethylidene]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid dimethyl ester disodium salt (32)

30 (1.3 g, 1.3 mmol)を DMF (45 mL)に溶解し、**21** (1.1 g, 4.1 mmol)を加え、室温で24時間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液(200 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー[酢酸エチル/メタノール(50 : 1, v/v)、次いで酢酸エチル/メタノール(100 : 3, v/v)]で精製し、**32** (730 mg, 42%)を得た。

ESI-MS m/z : 634 [M-2Na]²⁻. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -1.94 (1H, br s); -1.93 (1H, br s); 1.94-2.10 (2H, m); 2.10-3.16 (22H, m); 2.27 (2H, t, $J = 6.6$ Hz); 2.48 (3H, s); 3.30-3.42 (4H, m); 3.42-3.82 (10H, m); 3.46 (6H, s); 3.62 (9H, s); 3.82-4.14 (4H, m); 4.36 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.40-4.54 (2H, m); 4.43 (2H, t, $J = 7.2$ Hz); 4.50 (1H, d, $J = 15.6$ Hz); 4.64 (1H, d, $J = 15.0$ Hz); 4.94 (1H, d, $J = 16.2$ Hz); 5.43 (1H, d, $J = 16.2$ Hz); 6.05 (1H, d, $J = 12.0$ Hz); 6.35 (1H, d, $J = 18.6$ Hz); 8.23 (1H, dd, $J =$

12.0, 18.0 Hz); 8.43 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.73 (1H, s); 9.89 (1H, s); 10.00 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 10.05 (1H, s); 10.22 (1H, s).

8-[3-((3-((B₁₂H₁₁)sulfanyl)acetyl)amino)propyl){(B₁₂H₁₁)sulfanyl}acetyl}amino)propyloxyiminoethylidene]-3-ethenyl-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin-13,17-dipropionic acid hexasodium salt (33)

32 (550 mg, 0.4 mmol)をエタノール(2.8 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(2.8 mL)を加え、室温で1時間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(45 mL, 2 : 1, v/v)で希釈後、エバポレーターで濃縮した。得られた濃縮物を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー[水、次いでエタノール/水(4 : 1, v/v)]で精製し、**26** (393 mg, 74%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 418 (155.6), 577 (12.7), 652 (20.0). ESI-MS m/z : 378 [M-6Na+3H]³⁺. ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 1.70-2.80 (22H, m); 1.84 (2H, m); 2.16 (2H, m); 2.38 (3H, s); 3.12-3.24 (4H, m); 3.24-3.40 (2H, m); 3.24 (3H, s); 3.47 (6H, s); 3.54-3.98 (8H, m); 4.36 (2H, m); 4.40-4.80 (2H, m); 4.44 (2H, m); 6.07 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.29 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 8.03 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 8.06 (1H, dd, $J = 12.6, 17.4$ Hz); 9.31 (1H, s); 9.64 (1H, s); 9.68 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.84 (1H, s); 10.18 (1H, s).

13,17-Bis(*N*-{2-[(bromoacetyl)amino]ethyl}carbamoylethyl)-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin (34)

4 (3 g, 4.5 mmol)をエチレンジアミン(50 mL)に溶解し、60°Cで8時間攪拌した。反応液を5%炭酸水素ナトリウム水溶液(300 mL)に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られたジアミノ誘導体を未精製のまま次の反応

に使用した。ジアミノ誘導体を THF (500 mL) に溶解し、0°C でトリエチルアミン (1 mL, 7.2 mmol) およびブロモアセチルブロミド (0.69 mL, 7.9 mmol) を加え、室温で 20 分間攪拌した。反応液を DMF で希釈し、その溶液をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (THF) で精製した。得られた画分溶液を飽和 NaCl 水溶液 (400 mL) に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥し、**34** [1.0 g, 23% (2 工程収率)] を得た。

ESI-MS m/z : 964 [M+H]⁺.

13,17-Bis{N-[2-({[(2-cyanoethyl)(B₁₂H₁₁)sulfonio]acetyl}amino)ethyl]carbamoyl}ethyl}-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin disodium salt (35).

34 (900 mg, 0.9 mmol) を DMF (20 mL) に溶解し、**21** (630 mg, 2.4 mmol) を加え、室温で 1 時間攪拌した。反応液を飽和 NaCl 水溶液 (200 mL) に注ぎ入れ、析出した沈殿物を濾取し、水洗後、乾燥した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー [ジクロロメタン/メタノール (6 : 1, v/v)、次いでジクロロメタン/メタノール (4 : 1, v/v)] で精製し、**35** (592 mg, 52%) を得た。

ESI-MS m/z : 619 [M-2Na]²⁻. ¹H NMR (pyridine-*d*₅, 600 MHz) δ : -2.01 (1H, br s); -1.95 (1H, br s); 1.45 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.00-3.10 (22H, m); 2.45 (3H, s); 3.29 (3H, s); 3.32 (3H, s); 3.36-3.44 (8H, m); 3.50-3.72 (8H, m); 3.60 (3H, s); 3.76-3.90 (4H, m); 4.28-4.54 (8H, m); 4.54-4.64 (2H, m); 6.04 (1H, d, $J = 11.4$ Hz); 6.36 (1H, d, $J = 17.4$ Hz); 8.24 (1H, dd, $J = 11.4, 17.4$ Hz); 8.39 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 9.59 (1H, s); 9.88 (1H, s); 9.98 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.99 (1H, s); 10.28 (1H, s).

13,17-Bis{N-[2-({[(B₁₂H₁₁)sulfanyl]acetyl}amino)ethyl]carbamoyl}ethyl}-3-ethenyl-8-ethoxyiminoethylidene-7-hydroxyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin tetrasodium salt (36).

35 (400 mg, 0.3 mmol)をエタノール(3 mL)に溶解し、1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液(3 mL)を加え、室温で 30 分間攪拌した。反応液をエタノール/酢酸エチル(45 mL, 2 : 1, v/v)で希釈後、エバポレーターで濃縮した。得られた濃縮物を ODS シリカゲルカラムクロマトグラフィー[水、次いでエタノール/水(3 : 1, v/v)]で精製し、**36** (361 mg, 94%)を得た。

UV-Vis λ_{\max} (H₂O) nm ($\epsilon \times 10^{-3}$): 336 (16.2), 422 (118.5), 578 (8.6), 650 (15.8).
ESI-MS m/z : 283 [M-4Na]⁴⁺. ¹H NMR [D₂O/pyridine-*d*₅ (2 : 1, v/v), 600 MHz] δ : 1.44 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); 1.72-2.50 (22H, m); 2.17 (3H, s); 3.28-3.34 (2H, m); 3.32 (3H, s); 3.37 (2H, t, $J = 8.4$ Hz); 3.38-3.50 (12H, m); 3.52 (3H, s); 3.53 (3H, s); 4.32-4.58 (6H, m); 6.11 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 6.25 (1H, d, $J = 18.0$ Hz); 7.86 (1H, d, $J = 10.8$ Hz); 8.05 (1H, dd, $J = 12.0, 18.0$ Hz); 9.28 (1H, s); 9.45 (1H, d, $J = 10.2$ Hz); 9.49 (1H, s); 9.76 (1H, s); 10.23 (1H, s).

第3項 動物および腫瘍

マウス大腸がん由来細胞株 colon-26 は理研セルバンクで購入した。Colon-26 細胞を 10%の非動化したウシ胎児血清(FBS)を含む RPMI 1640 培地で、5% CO₂ 雰囲気下、37°C で培養した。5 週齢メス BALB/c マウス(日本クレア株式会社)の背部に colon-26 細胞(3.0×10^7 個/mL)の懸濁液 50 μ L を皮下注射した。移植した腫瘍の大きさが直径約 10 mm 以上に生育した時、腫瘍を摘出後、およそ 2 \times 2 mm の小片に切り出し、5 週齢オス BALB/c マウスの左背部皮下に移植針を用いて移植した。移植後(14~21 日)、腫瘍の大きさが直径約 10 mm に達した時、マ

ウスをBSH結合型クロリン誘導体の生体内分布、排泄およびPDT治療効果の検討に使用した。本動物実験は、県立広島大学庄原キャンパスの研究倫理委員会(第012号)の承認を得て行った。

第4項 *In vivo*でのBSH結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

BSH結合型クロリン誘導体**23**、**26**、**33**および**36**をPBSに溶解し(2 μmol/mL)、colon-26担がんマウスに10 μmol/kgを尾静脈投与した(マウス20 gの場合100 μLを投与)。担がんマウスから採取された8種類の組織および血清について、投与後の下記時間における各クロリン誘導体の生体内分布およびクリアランスを調査するために分析した。8種類の組織は腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉および皮膚とした。エーテル麻酔下、投与1、3、6、12および24時間後に8種類の組織および心臓採血により全血を採取した(各時点でn=4)。全血を37°Cで2時間静置した後、2,000 gで15分間遠心分離し、上清として血清を得た。腎臓は両側を採取し、筋肉は両足大腿部、皮膚は腹部(約20×20 mm)から採取した。これらの組織および血清を分析まで-80°Cで凍結保存した。BSH結合型クロリン誘導体**23**、**26**、**33**および**36**の各組織および血清中の濃度は蛍光測定により決定した。各組織の湿重量を記録し、各組織および血清を超純水と混合した(100 mg組織または100 μL血清/500 μL超純水)。血清を除く各組織をホモジナイザー(S-203、株式会社池田理化製)でホモジナイズ後、4°C、12,000 gで10分間遠心分離し、上清を得た。血清はホモジナイズおよび遠心分離を行わなかった。得られた各上清を200 μLずつ96穴マイクロプレートに分注し、マルチスペクトロマイクロプレートリーダー(Varioskan Flash、サーモフィッシュャーサイエンティフィック社製)で蛍光を測定した。BSH結合型クロリン誘導体**23**、**26**、**33**および**36**の蛍光測定のための励起波長を420 nm、検出波長を650 nmに設定した。各組織および血清中のBSH結合型クロリン誘導体**23**、**26**、**33**および**36**

の濃度は、幾つかの異なる既知濃度の各 BSH 結合型クロリン誘導体超純水溶液を調製し、それらの蛍光を測定することにより作成した検量線から算出した。濃度の平均値±標準誤差を各時点において算出した(n = 4)。

第5項 *In vivo* での BSH 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価

BSH 結合型クロリン誘導体 **33** を PBS に溶解し(2 $\mu\text{mol/mL}$)、colon-26 担がんマウスに 10 $\mu\text{mol/kg}$ を尾静脈投与した(マウス 20 g の場合 100 μL を投与、n = 4)。対照群として担がんマウスに PBS のみ尾静脈投与した(n = 4)。投与 6 時間後、シーシーエス株式会社製 LED 光源装置(660 nm)を使用し、腫瘍部へ 75.5 J/cm^2 (照射距離 : 25 mm、0.1429 W \times 528 sec)の光照射を行った。光照射中、腫瘍部を除くマウスの体表面を黒布で覆い遮光した(第2章、Fig. 2.1 参照)。誘導体 **33** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群について、7 日間腫瘍の生育を計測することにより治療効果の評価した。デジタルノギスを用いて腫瘍の長径(mm)および短径(mm)について寸法を測定し、(長径) \times (短径)² \times 1/2 の計算式⁷⁰⁾で腫瘍体積(mm^3)を算出した。(光照射後 n 日目の腫瘍体積) / (光照射日の腫瘍体積) \times 100 の計算式で相対腫瘍体積(%)を算出した。光照射後 7 日目のマウスから腫瘍を摘出し、その重量を測定した。誘導体 **33** を用いた PDT 群と光照射のみの対照群との相対腫瘍体積および腫瘍重量の差を *t* 検定($P < 0.01$ 、0.05)で分析した。

第6項 *In vitro* での BSH 結合型誘導体の細胞毒性評価

BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の細胞毒性評価を WST-8 試験で行った。WST-8 試薬は、株式会社同仁化学研究所から購入した。Colon-26 細胞を 100 units/mL のペニシリンおよび 100 $\mu\text{g/mL}$ のストレプトマイシンと 10%の非動化したウシ胎児血清(FBS)を含む RPMI 1640 培地で、5% CO_2 雰囲気下、37°C で培養した。その細胞を 96 穴マイクロプレートの各穴に 5.0×10^3 個

/100 μL ずつ播種し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 24 時間培養した。培養後、培地を廃棄し、BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** をそれぞれ 1、3 および 10 μM 含む培地と交換し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 24 時間培養した。WST-8 溶液 10 μL を各穴に添加し、5% CO_2 雰囲気下、37°C で 2 時間培養した。マイクロプレートリーダー(Multiskan FC、サーモフィッシャーサイエンティフィック社製)にて 450 nm の吸光度を測定した。陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を 100%として、 $(\text{評価物質の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}) / (\text{陰性対照の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}) \times 100$ の計算式で評価物質の生細胞率(%)を算出した。各試験において生細胞率の平均値 \pm 標準偏差を算出した($n = 3$)。

第3節 結果および考察

第1項 新規 BSH 結合型クロリン誘導体の分子設計

第2章にて優れたがん組織選択的集積性および正常組織排泄性を見出した新規クロリン誘導体 **8** と BSH を結合した4種類の新規 BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** を分子設計した(Fig. 4.1)。誘導体 **23** および **33** は、クロリン誘導体 **8** における A の位置にそれぞれ1分子および2分子の BSH を結合させ、当該 BSH が高水溶性を有することからクロリン誘導体 **8** における B の位置のイミノジ酢酸基をカルボシキル基に置き換えた化合物である。誘導体 **26** は、クロリン誘導体 **8** における A の位置に1分子の BSH を結合させ、第2章の検討でクロリン誘導体 **8** の優れたがん組織選択的集積性および正常組織排泄性に関与している可能性が示唆されたイミノジ酢酸基を残した化合物である。誘導体 **23**、**26** および **33** に対して、誘導体 **36** は、クロリン誘導体 **8** における B の位置にイミノジ酢酸基の代わりに2分子の BSH を結合した化合物である。次項では各誘導体の合成について詳細を述べる。

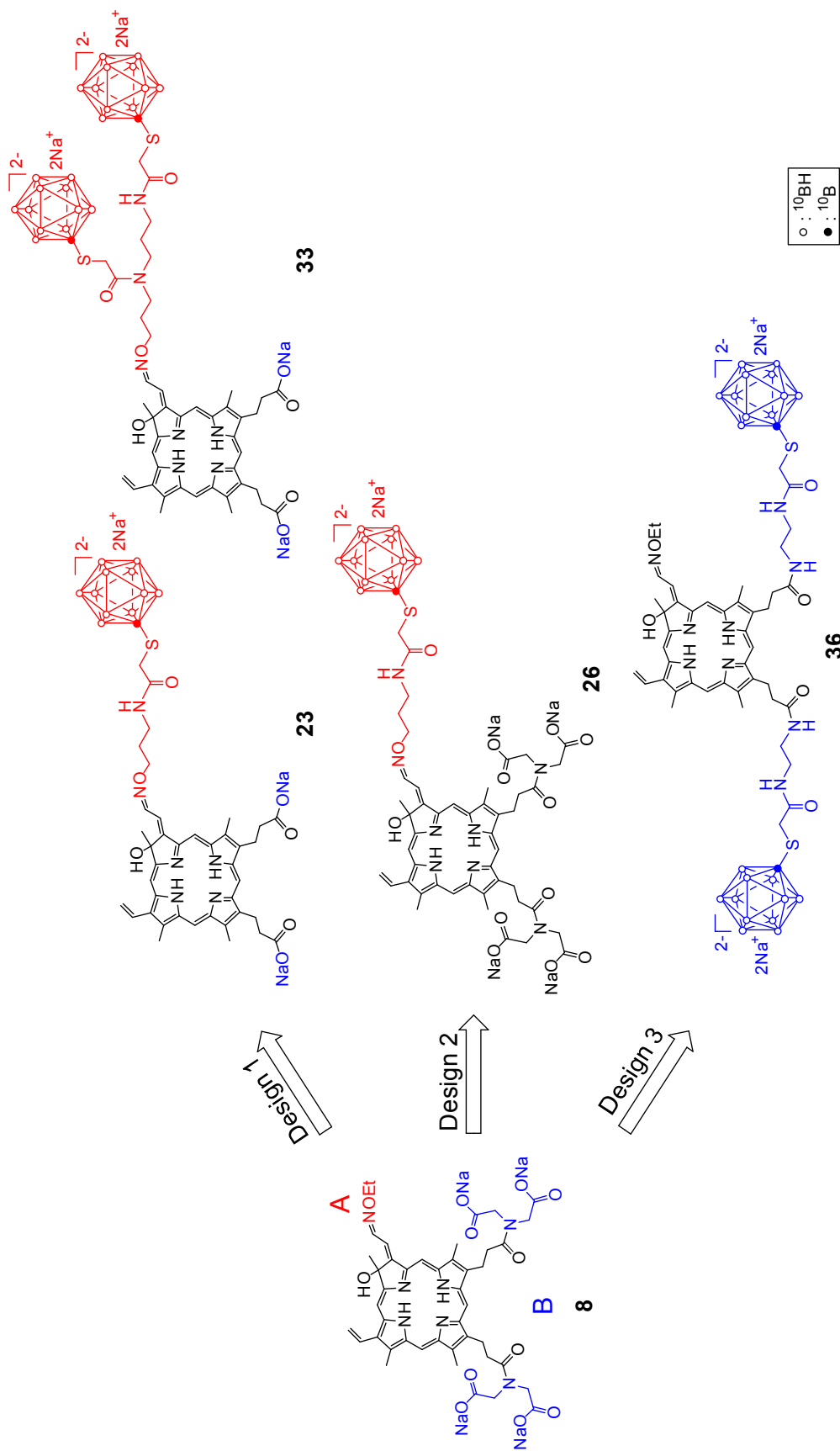
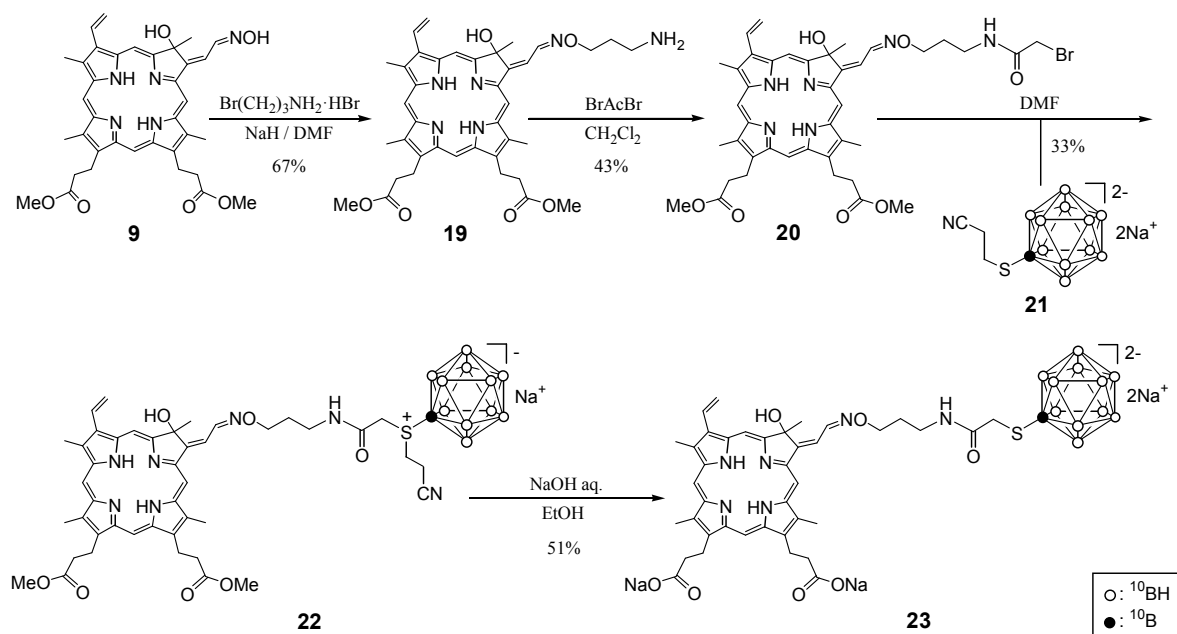


Figure 4.1 Molecular design strategy for efficient PDT/BNCT agents.

第2項 新規 BSH 結合型クロリン誘導体の合成

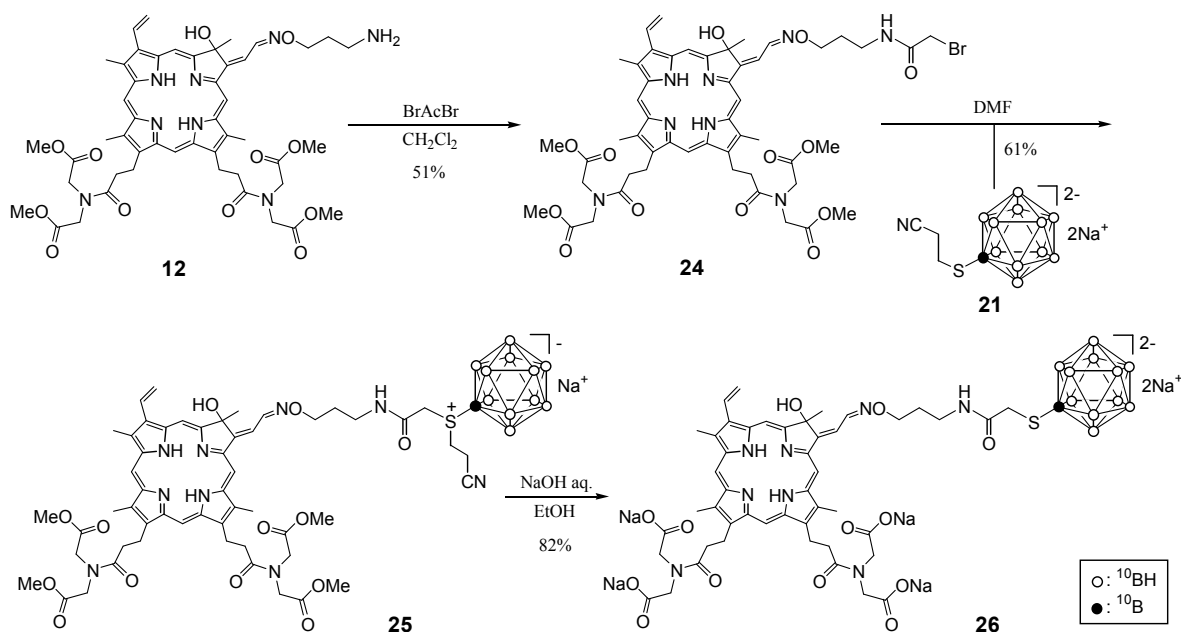
BSH 結合型クロリン誘導体 **23** の合成経路を Scheme 4.1 に示した。ヒドロキシイミノ基誘導体 **9** のアミノプロピル化を DMF 中、3-ブロモプロピルアミン臭化水素酸塩および水素化ナトリウム存在下で行った。TLC (ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 10 : 2 : 1, v/v/v) により、反応開始後 30 分で原料 **9** ($R_f = 0.96$) の消失、目的物 **19** ($R_f = 0.53$) およびポルフィリン環のピロールの窒素がアミノプロピル化された副生成物 ($R_f = 0.16$ 、第3章参照) の僅かなスポットを確認した。当該副生成物はシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより除去し、誘導体 **19** を収率 67% で得た。BSH とクロリン誘導体とをチオエーテルを介して結合させるために、誘導体 **19** のアミノ基のブロモアセチル化をジクロロメタン中、ブロモアセチルブロミド存在下で行った。TLC (ジクロロメタン/メタノール, 20 : 1, v/v) により、反応開始後 30 分で反応終了を確認し、目的物 **20** ($R_f = 0.47$) および 2 種の副生成物のスポット ($R_f = 0.40, 0.58$) を確認した。当該副生成物の内、 $R_f = 0.58$ に確認された化合物のスポットは目的物 **20** の濃茶色と異なり緑色を呈していたため、アルキルイミノ基が脱離した化合物と考えられた。前述 2 種の副生成物の除去をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより試みたが、目的物 **20** と TLC 上のスポットが比較的接近しており、精製が困難であった。そのため、酢酸エチルによる再結晶化により精製し、誘導体 **20** を収率 43% で得た。ブロモアセチル誘導体 **20** とシアノエチル化 BSH 誘導体 **21** (^{10}B 濃縮) の縮合を DMF 中で行った。TLC (酢酸エチル/メタノール, 10 : 1, v/v, 2 回展開) で反応を追跡したところ、反応開始後 30 分で原料 **20** ($R_f = 0.83$) の消失および目的物 **22** ($R_f = 0.36$) の生成を確認したため、当該反応溶液の後処理後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより TLC での目的物 **22** よりも極性の大きい副生成物 (原点部および $R_f = 0.19$) を除去し、スルホニウム誘導体 **22** を収率 33%

で得た。最後に、**22** のシアノエチル基の除去およびメチルエステル基の加水分解をアルカリ条件下で行い、BSH 結合型クロリン誘導体 **23** を収率 51% で得た。



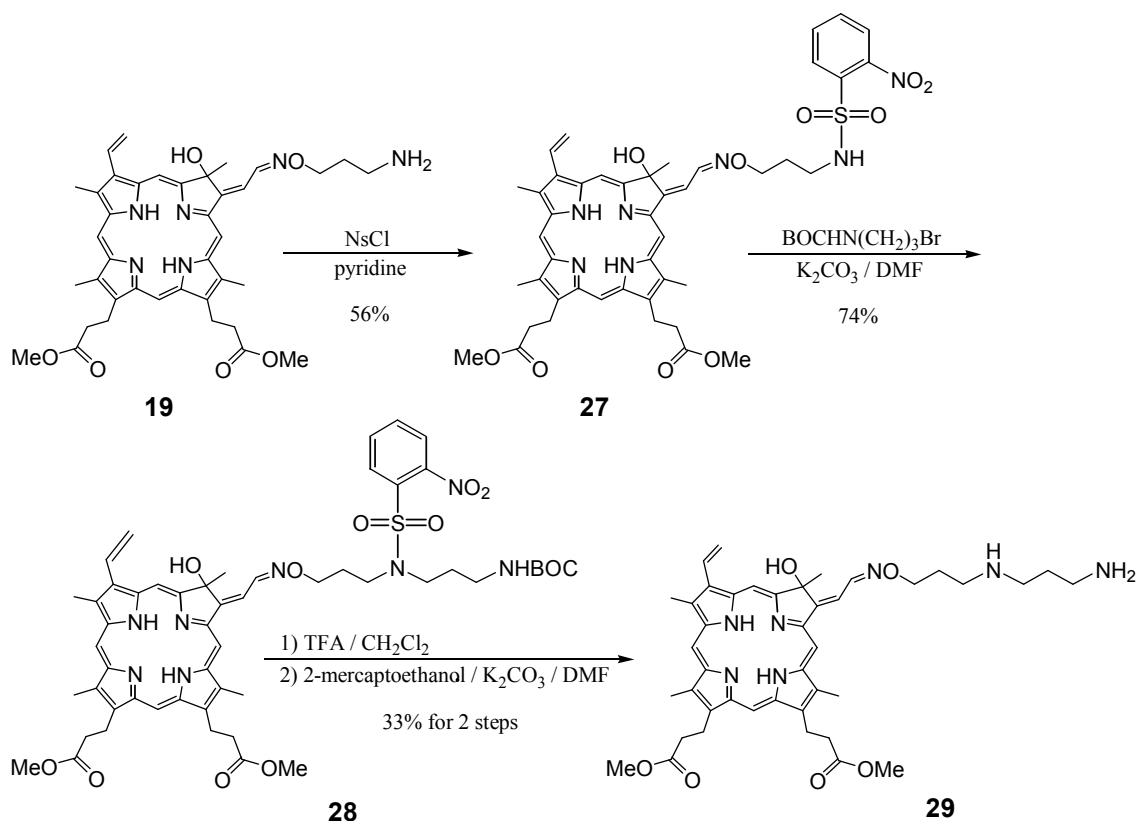
Scheme 4.1. Synthesis of BSH-conjugated chlorin derivative **23**.

一方、BSH 結合型クロリン誘導体 **26** の合成経路を Scheme 4.2 に示した。イミノジ酢酸誘導体 **12** を出発原料として、BSH 結合型クロリン誘導体 **23** と同様に処理した。誘導体 **12** のプロモアセチル化を行い、収率 51% で誘導体 **24** を得た。プロモアセチル誘導体 **24** とシアノエチル化 BSH 誘導体 **21** (^{10}B 濃縮) の縮合により、スルホニウム誘導体 **25** を収率 61% で得た。最後に、誘導体 **25** をアルカリ条件下で処理し、BSH 結合型クロリン誘導体 **26** を収率 82% で得た。

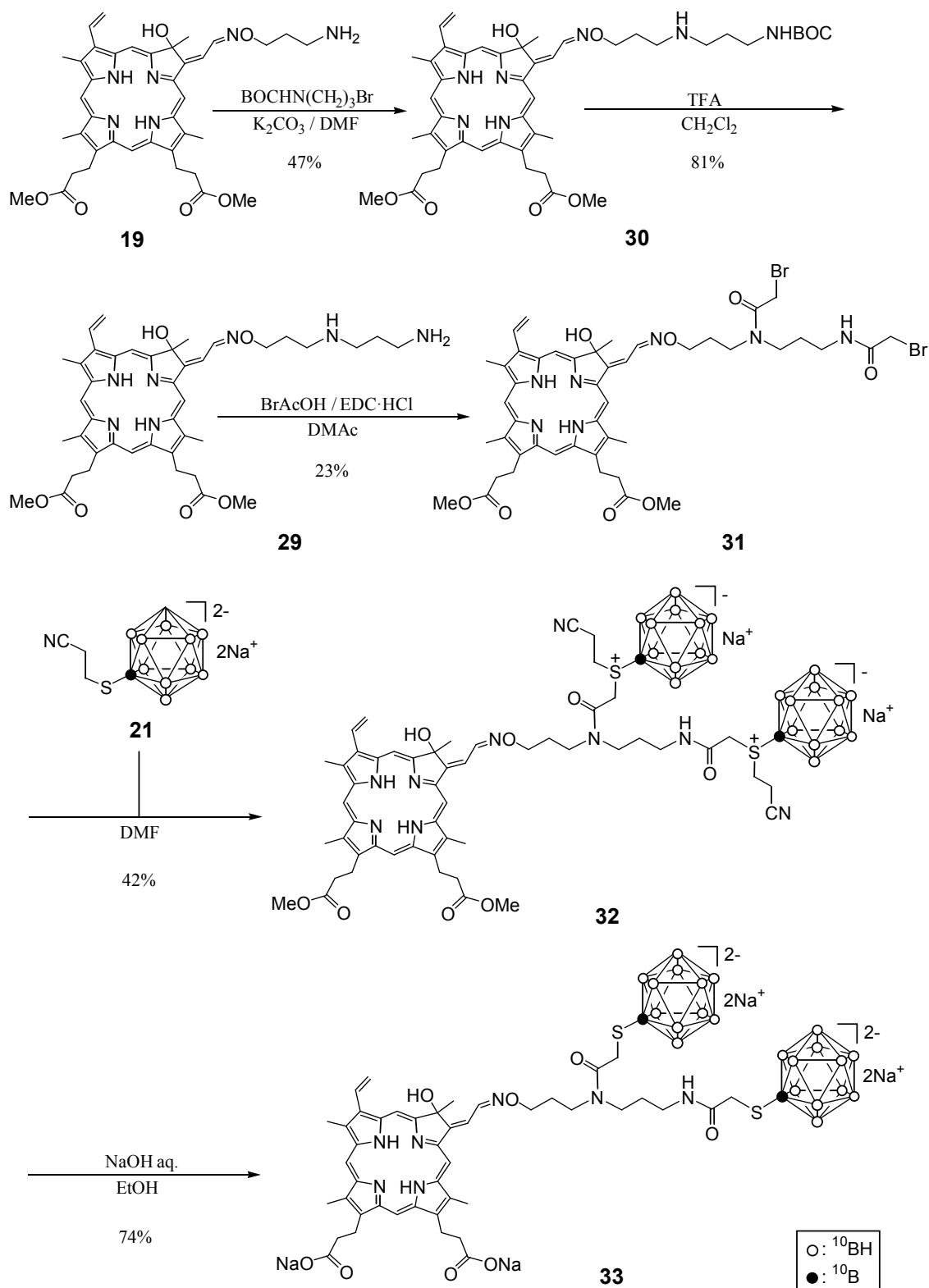
Scheme 4.2. Synthesis of BSH-conjugated chlorin derivative **26**.

次に、BSH 結合型クロリン誘導体 **33** の合成を行った。誘導体 **23** および **26** と同様の方法で 2 分子の BSH を結合させるためには、その反応箇所として 2 個のアミノ基を有するクロリン誘導体の合成が必要であった。この誘導体として、誘導体 **19** のアミノプロピル基を更にアミノプロピル化することで得られ、1 級および 2 級アミンの 2 反応箇所を有する誘導体 **29** の合成を試みた (Scheme 4.3)。まず、誘導体 **19** のアミノプロピル化を行う場合、目的とする 2 級アミンと共に 3 級アミンの生成が懸念されたため、誘導体 **19** のアミノ基を予め Ns 基で保護しておき、アルキル化後、脱保護を行う合成経路を検討した。誘導体 **19** の Ns 化をピリジン中、2-ニトロベンゼンスルホニルクロリド存在下で行い、誘導体 **27** を収率 56% で得た。誘導体 **27** と BOC 基で保護したアミノプロピルハライドとの *N*-アルキル化を炭酸カリウム存在下、60°C で行い、誘導体 **28** を収率 74% で得た。続いて、誘導体 **28** の脱保護を検討した。誘導体 **28** の脱 BOC

化をジクロロメタン中、TFA 存在下で行ったところ、TLC (ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 20 : 2 : 1, v/v/v)により、反応開始後 10 分で反応終了を確認し、脱 BOC 化物($R_f = 0.27$)および原点部に副生成物のスポットを確認した。当該副生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで除去し、得られた精製物の脱 Ns 化を DMF 中、2-メルカプトエタノールおよび炭酸カリウム存在下で行った。TLC(ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 4 : 2 : 1, v/v/v)で反応を追跡したところ、反応開始後 19 時間で僅かに残存した原料($R_f = 0.81$)、目的物 **29** ($R_f = 0.08$)および原点部に副生成物のスポットを確認した。反応の進行に伴い当該副生成物の増加を認めたため、この時点で反応を終了した。原点部の副生成物の除去は困難であったが、残存した原料は THF/*n*-ヘキサン(1 : 1, v/v)による再沈殿化により除去され、誘導体 **29** を収率 33%(2 工程収率)で得た。

Scheme 4.3. Synthesis of chlorin derivative **29**.

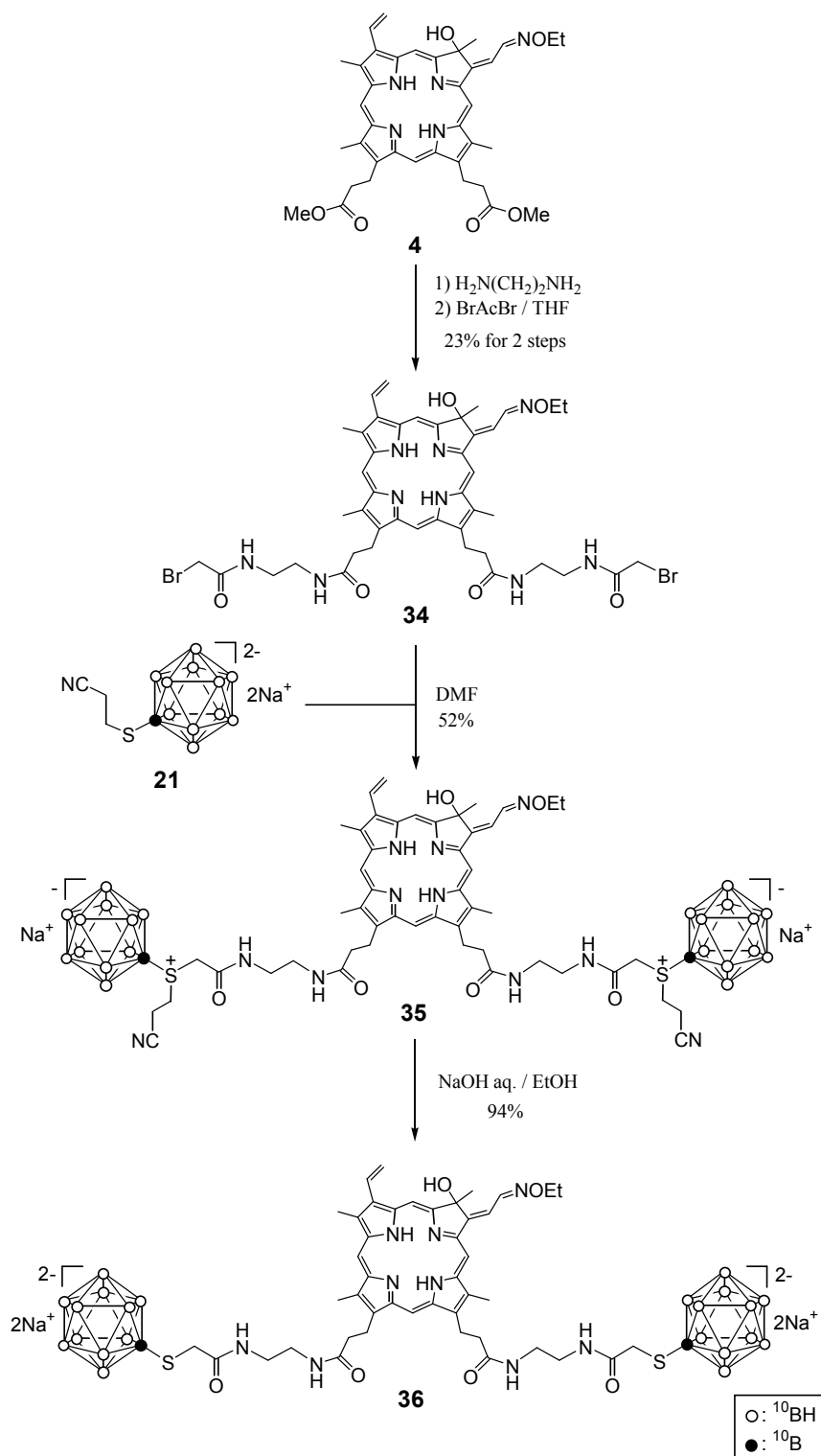
前述の誘導体 **19** のアミノ基を予め Ns 基で保護しておく経路では、誘導体 **28** の脱 BOC 化および脱 Ns 化の両反応時に TLC における原点部の副生成物の生成を確認し、目的物 **29** の収率が低下した。誘導体 **19** から誘導体 **29** を得る経路の収率向上を目指し、Ns 基を使用しない経路で誘導体 **29** の合成を試みた (Scheme 4.4)。誘導体 **19** と BOC 基で保護したアミノプロピルハライドとの選択的 *N*-アルキル化を炭酸カリウム存在下、60°C で行った。3 級アミンの生成を防止するため、アミノプロピルハライドの添加量は誘導体 **19** と等量とした。TLC(ジクロロメタン/メタノール/酢酸, 20 : 2 : 1, v/v/v)で反応を追跡したところ、反応時間の進行に伴い、原料(Rf = 0.10)の減少、目的物 **30** (Rf = 0.35、2 級アミン)および 3 級アミン(Rf = 0.77)の増加を確認し、反応開始後 3 時間で反応の進行が停止したため、反応終了した。3 級アミンおよび未反応原料はシリカゲルカラムクロマトグラフィーで容易に除去可能であり、その結果として誘導体 **30** を収率 47%、3 級アミンおよび未反応原料を収率 4%および 25%で得た。誘導体 **30** の脱 BOC 化をジクロロメタン中、TFA 存在下で行い、誘導体 **29** を収率 81% で得た。前述の Ns 基を使用する経路における誘導体 **19** から **29** を得る 4 段階反応収率が 14%であるのに対して、Ns 基を使用しない本 2 段階収率は 38%であったことから、約 2.7 倍の収率向上を達成した。誘導体 **29** のブロモアセチル化を DMAc 中、ブロモ酢酸および EDC 存在下で行った (Scheme 4.4)。反応開始後 3 時間で反応の進行が停止し、その時点の TLC (ジクロロメタン/メタノール, 15 : 1, v/v)により、目的物 **31** (Rf = 0.50)および副生成物(Rf = 0.42)のスポットを確認した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで当該副生成物を除去し、誘導体 **31** を収率 23%で得た。最後に、定法によりジブロモアセチル誘導体 **31** とシアノエチル化 BSH 誘導体 **21** (¹⁰B 濃縮)の縮合反応を行い、スルホニウム誘導体 **32** を収率 42%で得た後、**32** をアルカリ条件下で処理することにより、BSH 結合型クロリン誘導体 **33** を収率 74%で得た。



Scheme 4.4. Synthesis of BSH-conjugated chlorin derivative **33**.

一方、BSH 結合型クロリン誘導体 **36** の合成を行った(Scheme 4.5)。クロリン誘導体 **4** のジメチルエステル基をエチレンジアミンとのエステル交換反応によりジアミド基とし、その末端の2個のアミノ基をBSHとの反応箇所とする経路を検討した。誘導体 **4** のエチレンジアミンとのエステル交換反応は、60°Cで行ったところ、反応開始後8時間で原料は消失し、後処理後に得られたジアミド誘導体は未精製のまま、次の反応に使用した。ジアミド誘導体のプロモアセチル化をTHF中、プロモアセチルブロミド存在下で行った。TLC(ジクロロメタン/メタノール, 10:1, v/v)により、反応開始後20分で目的物 **34** ($R_f = 0.47$)の生成および本反応の進行が停止したことを確認した。TLC上の原点部の副生成物を除去するために、目的物 **34** が析出していた反応溶液中にDMFを添加することにより一旦溶解させ、当該溶解液のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、得られた溶出液を濃縮した。濃縮物にはカラム精製前に添加したDMFが残存していたため、飽和NaCl水溶液を濃縮物に添加し、析出した沈殿を濾取し、誘導体 **34** を収率23%(2工程収率)で得た。最後に、定法によりジプロモアセチル誘導体 **34** とシアノエチル化BSH誘導体 **21** (^{10}B 濃縮)の縮合反応を行い、スルホニウム誘導体 **35** を収率52%で得た後、**35** をアルカリ条件下で処理することにより、BSH結合型クロリン誘導体 **36** を収率94%で得た。

今回合成した新規BSH結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** は ^1H NMR、UV-vis スペクトルおよびMSにより化学構造を同定した。**23**、**26**、**33** および **36** は良好な水溶性(100 mg/mL)を示した。



Scheme 4.5. Synthesis of BSH-conjugated chlorin derivative **36**.

第3項 *In vivo* での BSH 結合型クロリン誘導体の腫瘍集積性および正常組織排泄性評価

合成した新規 BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の *in vivo* での腫瘍集積性および正常組織排泄性を評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

Fig. 4.2~4.5 に BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の投与(10 $\mu\text{mol/kg}$)後、1 時間から 24 時間に至るまでのマウスの各組織および血清中における各クロリン誘導体の集積量を示し、Fig. 4.6 に BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の腫瘍組織への集積量の経時的変化を示した。誘導体 **23** の腫瘍組織への選択的集積性は、投与後 1 時間から 24 時間に至るまでの各時点において確認されなかった(Fig. 4.2)。これに対して、誘導体 **23** のイミノジ酢酸誘導体である誘導体 **26** は優れた腫瘍選択的集積性を示した(Fig. 4.3)。誘導体 **26** の腫瘍組織集積量は、投与後全ての時点において血清を除く全ての組織よりも高く、投与後 24 時間において最大集積値(0.20 pmol/mg)に達した。2 章の検討において、クロリン誘導体にイミノジ酢酸基を導入することによって当該クロリン誘導体の腫瘍集積性が向上されることを確認した。本評価実験においても、第 2 章の検討結果と同様にイミノジ酢酸基による腫瘍集積性の向上が BSH 結合型クロリン誘導体 **26** において確認されたことは非常に興味深い。一方、誘導体 **23** に 1 分子の BSH を追加した誘導体 **33** の腫瘍組織への選択的集積性は、誘導体 **26** と同様に優れていた(Fig. 4.4)。誘導体 **33** の腫瘍組織集積量は、投与後 1 時間では肝臓、腎臓および血清より低く、投与後 3 時間では肝臓および血清より低かったものの、投与後 6 時間から 24 時間に至るまでの各時点では血清を除く全ての組織より高く、投与後 6 時間において最大集積値(0.21 pmol/mg)

に達した。これに対して、誘導体 **36** は、誘導体 **33** と同様に 2 分子の BSH を有していたが、誘導体 **36** の腫瘍組織への選択的集積性は、全ての時点において確認されなかった (Fig. 4.5)。優れた腫瘍選択的集積性を示した誘導体 **26** および **33** を比較したところ、誘導体 **33** の腫瘍組織において最大集積量に達するまでの時間は誘導体 **26** の 4 分の 1 であり (Fig. 4.6)、誘導体 **33** の正常組織からの排泄性は誘導体 **26** と同等であった。また、誘導体 **33** の化学構造中の BSH 分子、即ち ^{10}B 原子の数は、誘導体 **26** の 2 倍であった。PDT および BNCT 薬としてのポルフィリン誘導体には、副作用である光線過敏症を軽減するために、可能な限り短い時間で腫瘍組織内において最大集積量に達した後、速やかに体内から排泄されることが求められ、BNCT の治療効果は、腫瘍特異的集積性を有すると共に化学構造中に多くの ^{10}B 原子を有する薬剤を使用することにより向上すると考えられる。それ故に、本研究にて新たに合成した BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の中で、誘導体 **33** が PDT および BNCT 両用薬として最も期待される候補化合物であることが示唆された。

一方、腫瘍組織 g あたり 20~30 μg の ^{10}B 濃度が臨床的に有効な BNCT のために必要とされており、BNCT 薬の T/B 比は血管系の壊死の発生を避けるために、少なくとも 1 が必要であり、5 以上が最適とされている^{38,39,74})。誘導体 **33** の腫瘍組織における最大集積量は、第 3 章で最も良い結果を示した BPA 結合型クロリン誘導体 **18** とほぼ同等であった。誘導体 **33** は、誘導体 **18** と比較してその化学構造中に 12 倍の ^{10}B 原子を有するものの、誘導体 **33** の ^{10}B 濃度は、腫瘍組織内で最大集積量に達した時点においても有効な BNCT に必要な ^{10}B 濃度と比較して低く、その T/B 比も全ての時点において 1 以下であった。本評価では、第 3 章同様に PDT への使用を想定して、各クロリン誘導体の投与量、投与後の当該腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の調査時点を設定した。今後の研究において、BNCT への使用を想定した誘導体 **33** の評価が必要と考えられる。

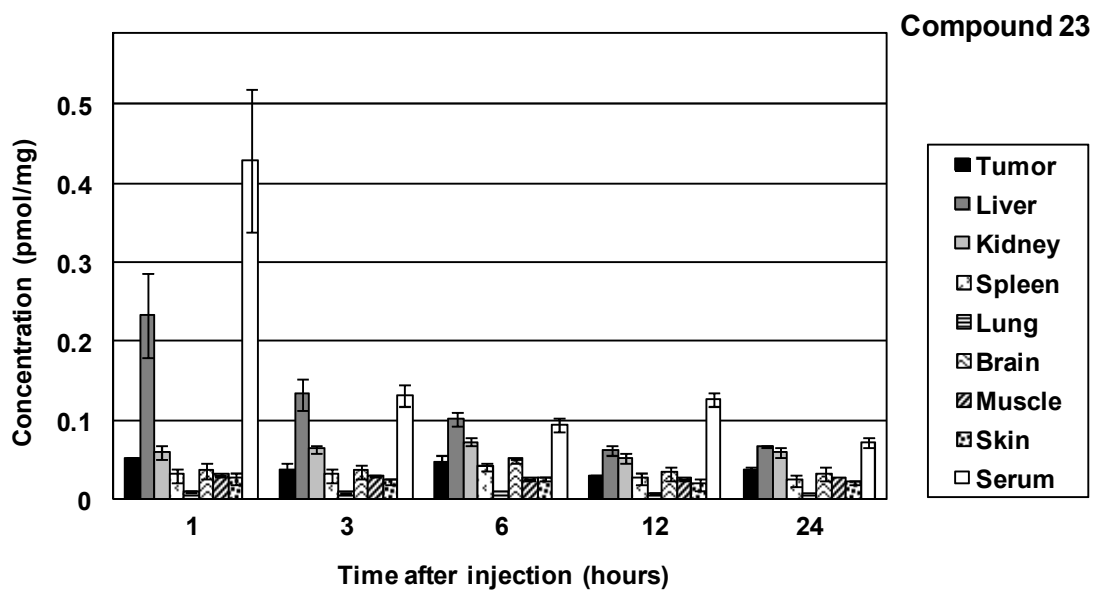


Figure 4.2. *In vivo* biodistribution of BSH-conjugated chlorin derivative **23** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **23** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

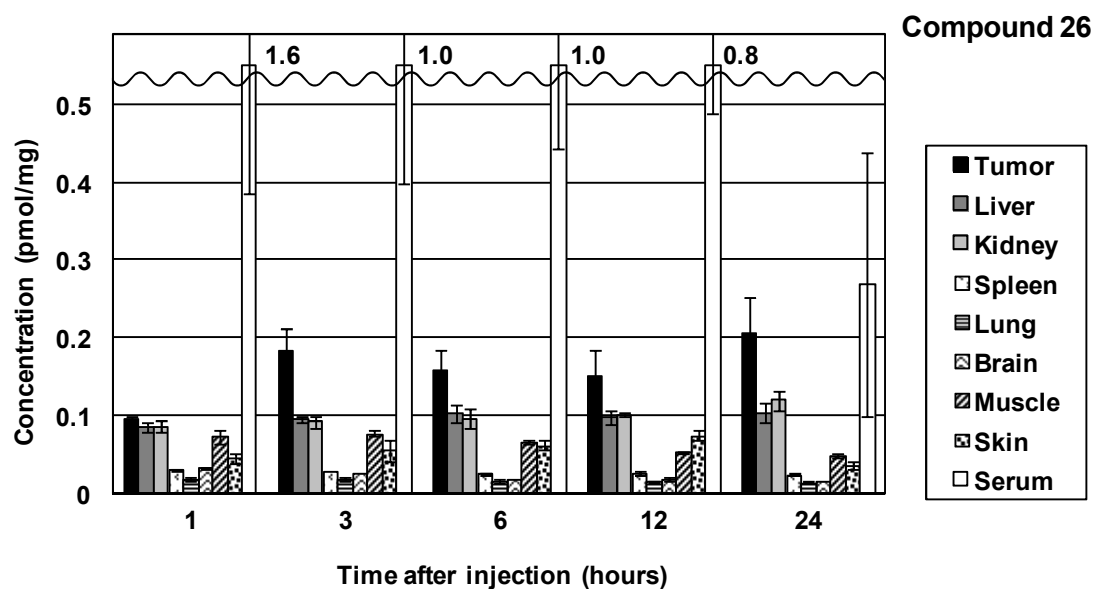


Figure 4.3. *In vivo* biodistribution of BSH-conjugated chlorin derivative **26** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **26** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

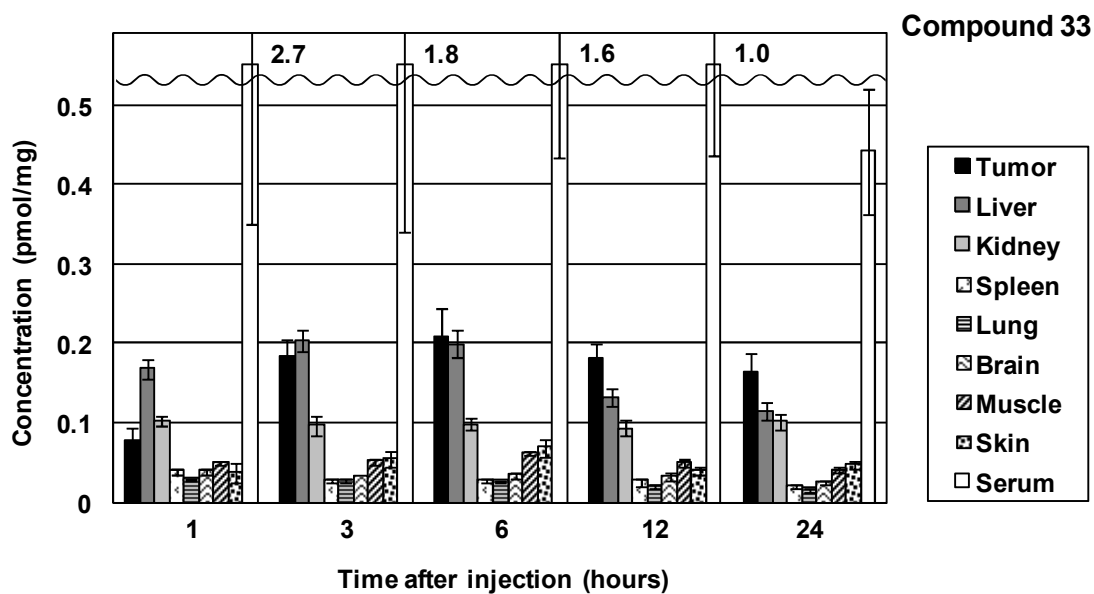


Figure 4.4. *In vivo* biodistribution of BSH-conjugated chlorin derivative **33** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **33** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

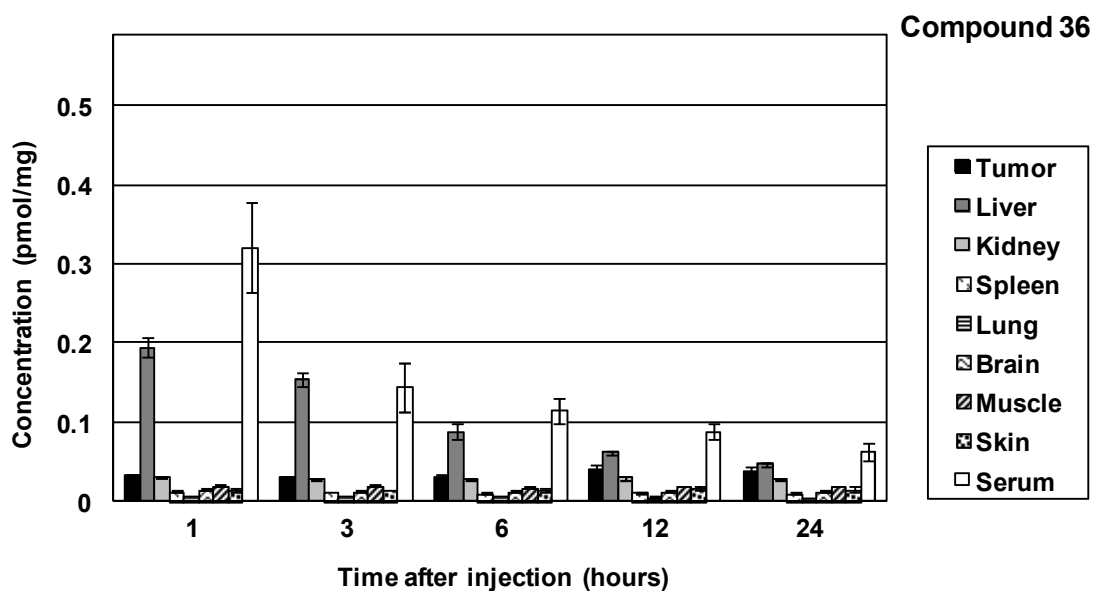


Figure 4.5. *In vivo* biodistribution of BSH-conjugated chlorin derivative **36** in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice at the indicated times after injection of **36** (10 $\mu\text{mol/kg}$). All data represent means \pm SE ($n = 4$).

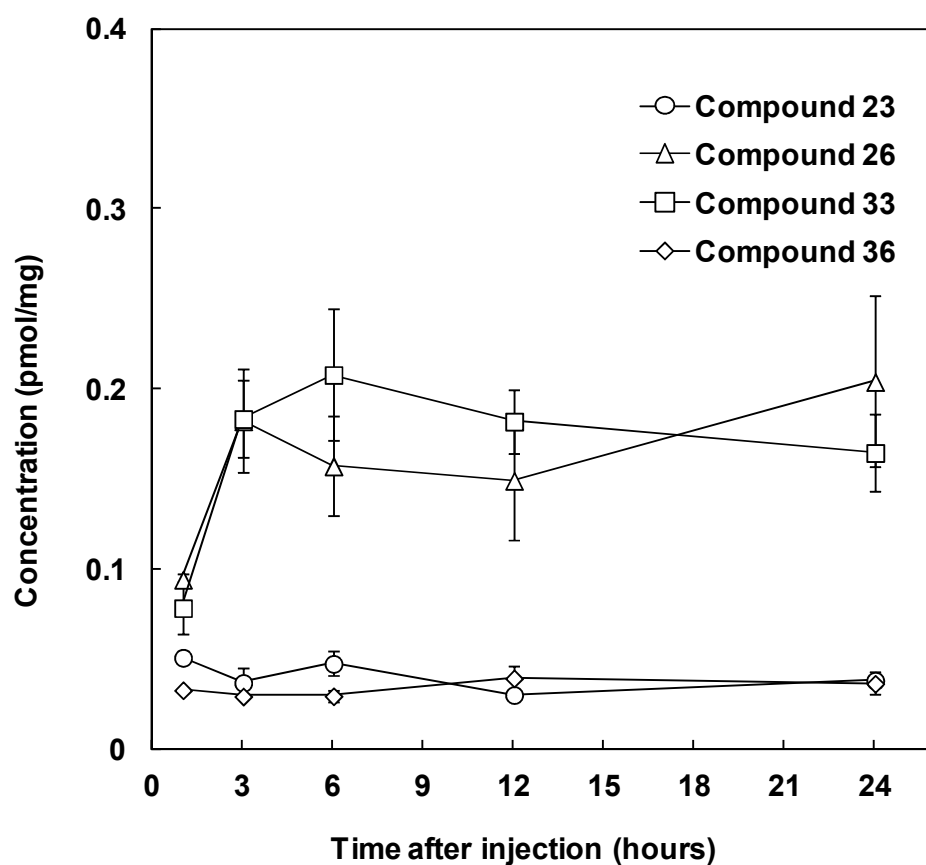


Figure 4.6. The concentrations of BSH-conjugated chlorin derivatives **23**, **26**, **33** and **36** in tumor tissue at the indicated times after intravenous injection into colon-26 tumor-bearing BALB/c mice. All data represent means \pm SE (n = 4).

第4項 *In vivo* での BSH 結合型誘導体を用いた PDT による抗がん効果の評価

In vivo での新規 BSH 結合型クロリン誘導体 **33** を用いた PDT による抗がん効果を LED 光照射(660 nm)後の colon-26 担がんマウスのがん生育率を計測することにより評価した。本評価実験は、共同研究者である県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授、矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏、三浦香織氏および共同研究グループ諸氏に実施して頂いた。以下に評価結果の詳細を記述する。

光照射後 3 および 5 日目において、誘導体 **33** による PDT 群は、光照射のみの対照群と比較して統計的有意($P < 0.05$)な腫瘍生育抑制効果を示したが、光照射後 7 日目における 2 群の相対腫瘍体積間に有意差は認められなかった(Fig. 4.7)。そのため、当該 2 群の光照射後 7 日目のマウスからがん組織を摘出し、重量を計測した。Fig. 4.8 に示すように、当該 2 群の腫瘍重量間に有意差($P < 0.01$)が認められた。従来の方法⁷⁰⁾では、腫瘍体積の計算に腫瘍の深さを考慮していないことが、光照射後 7 日目における当該 2 群の相対腫瘍体積間に有意差が認められなかった原因と考えられた。BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** の *In vitro* での細胞毒性試験結果を Fig. 4.9 に示した。誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** は、それらの腫瘍組織集積濃度より高い濃度においても細胞毒性を示さないことが明らかとなった。一方、本評価実験においても第 2 章および第 3 章の検討時と同様に LED 光照射中にマウスの光照射部位の皮膚表面において 2~3°C の温度上昇が確認されたが、第 2 章の PDT 後の腫瘍および正常組織切片の観察による比較検討で裏付けされていることから、誘導体 **33** の抗がん効果は温熱療法⁷³⁾によるものではなく PDT によって引き起こされたものであり、**33** は PDT および BNCT 両用薬の候補化合物となる可能性が示唆された。

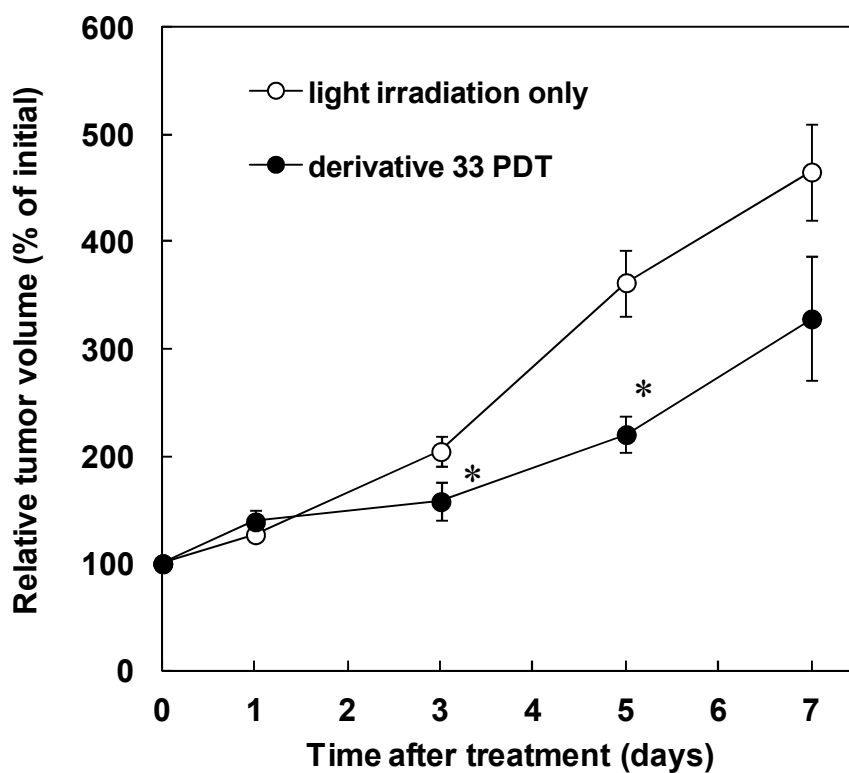


Figure 4.7. Tumor growth in colon-26 tumor-bearing BALB/c mice treated with PBS with irradiation and compound **33** (10 $\mu\text{mol/kg}$) with irradiation. Tumor volumes were measured and relative tumor volumes (% of initial tumor volume) were calculated for 7 days after treatment. All data represent means \pm SE ($n = 4$). *, $P < 0.05$ compared with the control.

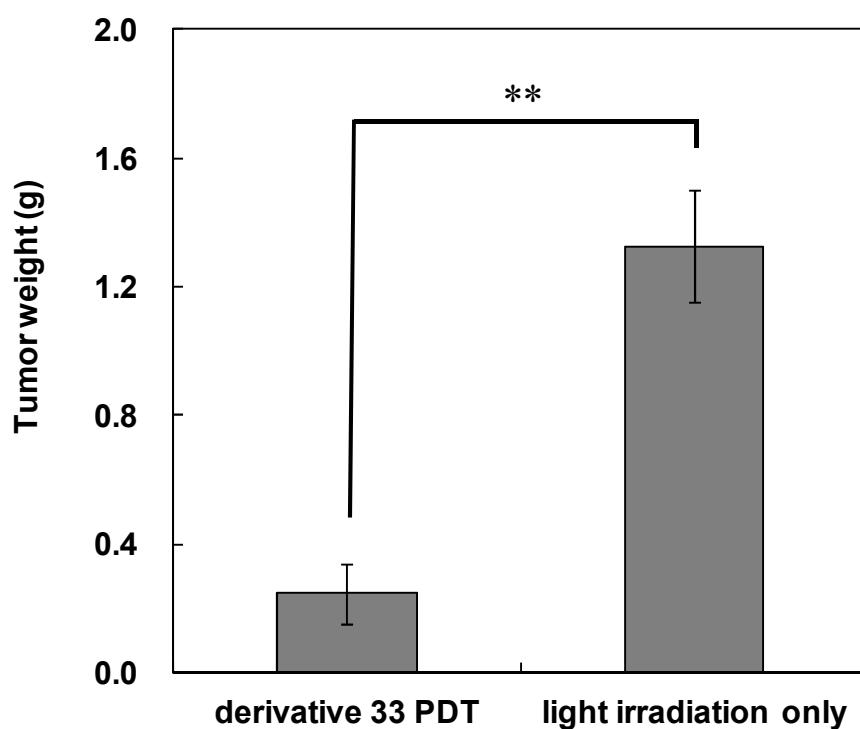


Figure 4.8. Tumor weights of the mice in the derivative **33** PDT group and the light irradiation group at day 7. All data represent means \pm SE (n = 4). **, $P < 0.01$ compared with the control.

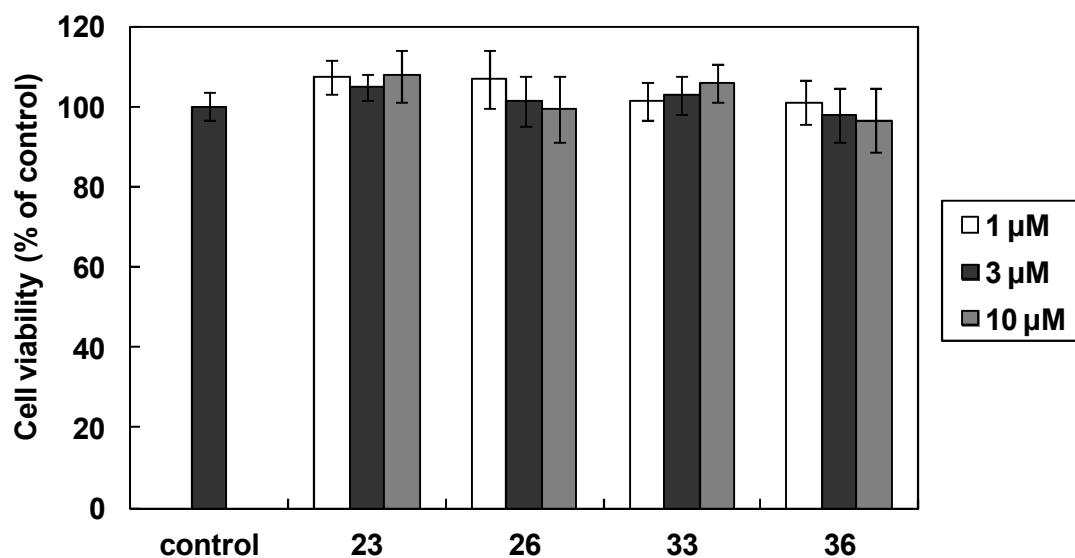


Figure 4.9. Cytotoxicity of BSH-conjugated chlorin derivatives **23**, **26**, **33** and **36**. Colon-26 cells were incubated in a medium containing BSH-conjugated chlorin derivatives **23**, **26**, **33** and **36** at each concentration (1, 3 and 10 μM) for 24 h in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cell viability was determined by using WST-8. Vehicle-treated cells were arbitrarily set as 100% control viability. All data represent means ± SD (n = 3).

第4節 第4章の結論

本章では、より効果的な PDT および BNCT 両用薬の開発を目的として、BPA と比較して 12 倍のホウ素原子を有する BSH をホウ素源に選択した。当該 BSH とホウ素キャリアーとしての有用性を見出したイミノジ酢酸誘導体 **8** の化学構造を基に調製したクロリン誘導体とを結合させた 4 種類の新規 BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** を合成した。これらの誘導体の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性を第 2 章と同様の方法にて評価したところ、誘導体 **33** が腫瘍集積性および正常組織排泄性において比較的優れていた。また、誘導体 **33** を用いた PDT により、がんの生育は統計的に有意に抑制された。当該誘導体 **33** は BPA 結合型クロリン誘導体 **18** と比較して、その化学構造中に 12 倍の ^{10}B 原子を有しており、PDT および BNCT の双方においてより効果的な候補化合物として期待される結果が得られた。しかしながら、本章で行った PDT への使用を想定した誘導体 **33** の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の評価では、誘導体 **18** と同様にその腫瘍組織中の ^{10}B 濃度および T/B 比は、効果的な BNCT に求められる値と比較して低かった。今後の研究において、BNCT への使用を想定して、誘導体 **33** の投与量の最適化および投与後の中性子線照射を考慮した時点での腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の評価が必要と考えられた。更に、*In vivo* での誘導体 **33** を用いた BNCT による抗がん効果を評価し、ホウ素クロリン誘導体の BNCT への有用性を明らかにすることは、既存薬と比較して副作用が少なく、治療効果が高い PDT および BNCT 両用薬の開発の進展において重要な課題である。

第5章 結論

現在、がんは国民の疾病による死因の第1位であり、国民の生命とQOLに対する最大の脅威となっている。近年、患者のQOLを重視した低侵襲で副作用の少ないがん治療法であるPDTおよびBNCTは、3大療法(外科療法、化学療法および放射線療法)に次ぐ第4の治療法として注目されている。両治療法は、がん細胞に低毒性の光感受性物質(PDTの場合)またはホウ素10同位体を含むホウ素化合物(BNCTの場合)を予め集積させた後、低エネルギーの可視光(PDTの場合)または中性子(BNCTの場合)を照射し、その結果としてがん細胞内で発生した一重項酸素およびフリーラジカル種(PDTの場合)または α 粒子およびリチウム原子核(BNCTの場合)の強い殺細胞効果を利用して、がん細胞を選択的に破壊するバイモーダル治療である。PDTの臨床治療では光感受性物質として腫瘍集積性を有するヘマトポルフィリン誘導体の Photofrin[®]やその欠点を改善したポルフィリン類似化合物であるクロリン誘導体の Foscan[®]および Laserphyrin[®]が使用されているが、副作用である光線過敏症の発生原因となる正常組織中の長時間にわたる残存等の問題点があり、より優れた光感受性物質の開発が求められている。一方、BNCTの臨床治療に使用されているホウ素化合物は、BPAおよびBSHであり、両薬剤はがん細胞への選択性が不十分であるため、多量に投与されており、より効果的な薬剤の開発が求められている。著者は、PDTおよびBNCTにおける既存薬の問題点を解決する候補化合物としての新規クロリン誘導体の開発を目的として本研究に着手した。

第2章では、PDT用光感受性物質の正常組織からの排泄性の向上を目指して、クロリン誘導体である photoporphyrin IX dimethyl ester (**1**)を出発原料とした水溶性クロリン誘導体を3種類合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体について PDTによる抗がん効果

を評価した。出発原料 **1** からジカルボン酸ナトリウム塩である水酸基誘導体 **3** およびエトキシイミノ基誘導体 **5** を合成した。後者の誘導体の水溶性を更に高めるためにイミノジ酢酸を2分子結合し、テトラカルボン酸ナトリウム塩であるイミノジ酢酸誘導体 **8** を合成した。各種誘導体を colon-26 担がんマウスに 10 mg/kg 尾静脈投与し、1、3、6、12、24 時間後に血清と腫瘍、肝臓、腎臓、脾臓、肺、筋肉、皮膚、脳の計 8 種の組織を採取し、これら組織中に含まれる誘導体を定量した。3 種類の誘導体の中で最も水溶性が高いイミノジ酢酸誘導体 **8** に優れた腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性が認められた。イミノジ酢酸誘導体 **8** の集積量は、投与 3 時間後に血清を除く他の全ての組織よりも腫瘍において最大に達した。投与 24 時間後には正常組織及び血清に僅かに検出される程度となり、同時点で腫瘍組織より肝臓や腎臓などの正常組織に多く残存している Foscan[®] 及び Laserphyrin[®] と比較して体外への排泄性に優れていると考えられた。イミノジ酢酸誘導体 **8** を用いて腫瘍集積最大時間であった投与 3 時間後に光照射を行い、PDT 薬としての効果を評価したところ、がんの生育は有意に抑制された。イミノジ酢酸誘導体 **8** を用いる PDT は、既存薬を用いる場合と比較して、治療効果の向上と副作用の軽減が期待される結果が得られた。

第3章および第4章では、既存の BNCT 薬の低腫瘍集積性を改善するために、第2章の結果として得られた PDT 薬として最も優れたクロリン誘導体の化学構造を基に、BPA または BSH を導入した新規ホウ素クロリン誘導体を 6 種類合成し、これらの誘導体の中から腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性の最も優れた誘導体について PDT による抗がん効果を評価した。イミノジ酢酸誘導体 **8** の化学構造を基に分子設計を行い、水溶性である 2 種類の BPA 結合型クロリン誘導体 **15** および **18** ならびに 4 種類の BSH 結合型クロリン誘導体 **23**、**26**、**33** および **36** を合成した。各種誘導体の投与量を 10 $\mu\text{mol}/\text{kg}$ とし、第2章と同様の方法にて腫瘍選択的集積性と正常組織排泄性を評価したところ、BPA 結合型では誘導体 **18**、BSH 結合型では誘導体 **33** に最も優れた腫瘍選択的集積性と正常組

織排泄性が認められた。BPA 結合型誘導体 **18** は投与 3 時間後、BSH 結合型誘導体 **33** は投与 6 時間後に腫瘍における集積量が最大に達し、これらの誘導体の血中濃度を比較すると、どちらも投与 24 時間後には投与 1 時間後のおよそ 5 分の 1 に減少しており、体外への排泄性も高いことが示唆された。一方、本研究における PDT への使用を想定した BPA 結合型誘導体 **18** および BSH 結合型誘導体 **33** の腫瘍選択的集積性および正常組織排泄性の評価では、それらの腫瘍組織中の ^{10}B 濃度および T/B 比は、効果的な BNCT に求められる値と比較して低かったことから、BNCT への使用を想定して、各誘導体の投与量の最適化および投与後の中性子線照射を考慮した時点での当該評価が必要と考えられた。最後に、BPA 結合型誘導体 **18** または BSH 結合型誘導体 **33** を用いて、投与後それぞれの集積最大時間に光照射を行い、PDT 薬としての効果を評価したところ、共にがんの生育は有意に抑制された。特に BSH 結合型誘導体 **33** は 12 個の ^{10}B 原子を有する BSH を 2 分子結合しているため、PDT および BNCT の双方においてより効果的なホウ素化合物として期待される結果が得られた。

今後の研究において、新規ホウ素クロリン誘導体の BNCT による抗がん効果を評価し、その BNCT への有用性を明らかにすることは重要な課題であるものの、本研究で合成した各誘導体の化学構造を基にして、既存薬と比較して副作用が少なく治療効果が高い PDT および BNCT 両用薬の創製開発に繋がる知見が得られた。ホウ素クロリン誘導体の適用により、腫瘍組織に集積した当該誘導体が発する蛍光を光学計測機器が組み込まれた手術顕微鏡で検出することで術中に腫瘍部位を確認する光線力学的診断、その蛍光ガイド下による腫瘍摘出手術、術中 PDT および術後 BNCT の施行が可能となる。

本研究で得られた知見が、PDT および BNCT によるがん治療の一層の普及および発展に寄与することを期待する。

参考文献

- (1) 厚生労働省 HP 平成 25 年人口動態統計月報年計(概数)の概況
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai13/index.html>
- (2) 独立行政法人国立がん研究センターがん対策情報センターHP
http://ganjoho.jp/public/dia_tre/knowledge/malignant_tumor.html
- (3) Dougherty, T. J.; Lawrence, G.; Kaufman, J. H.; Boyle, D.; Weishaupt, K. R.; Goldfarb, A. Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **1979**, 62, 231-237.
- (4) Ali, H.; Van Lier, J. E. Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.* **1999**, 99, 2379-2450.
- (5) Nyman, E. S.; Hynninen, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **2004**, 73, 1-28.
- (6) Bonnett, R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19-33.
- (7) Girotti, A. W. Mechanisms of photosensitization. *Photochem. Photobiol.* **1983**, 38, 745-751.

- (8) 加藤治文監修, 奥仲哲弥編集, PDT ハンドブック: 光線力学的治療のアドバンステクニック, 医学書院, **2002**, 3-5.
- (9) Van Steveninck, J.; Tijssen, K.; Boegheim, J. P.; Van Der Zee, J.; Dubbelman, T. M. Photodynamic generation of hydroxyl radicals by hematoporphyrin derivative and light. *Photochem. Photobiol.* **1986**, 44, 711–716.
- (10) Hajdur, C.; Wagnières, G.; Monnier, P.; Van Den Bergh, H. EPR and spectrophotometric studies of free radicals (O_2^- , OH, BPD-MA $^-$) and singlet oxygen (1O_2) generated by irradiation of benzoporphyrin derivative monoacid ring A. *Photochem. Photobiol.* **1997**, 65, 818–827.
- (11) Ochsner, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997**, 39, 1-18.
- (12) DeRosa, M. C.; Crutchley, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, 233-234, 351-371.
- (13) Raab, O. Ueber die wirkung fluorescierenderstoffe auf infusorien. *Z. Biol.* **1900**, 39, 524-546.
- (14) Von Tappeiner, H. *Muench. Med. Wochenschr.* **1903**, 47, 2024.
- (15) Policard, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood. *C. R. Soc. Biol.* **1924**, 91, 1423-1428.

- (16) Lipson R. L.; Baldes E. J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch. Dermatol.* **1960**, 82, 508-516.
- (17) Bonnett, R.; Berenbaum, M. C. HpD - a study of its components and their properties. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1983**, 160, 241-250.
- (18) Moan, J. Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem. Photobiol.* **1986**, 43, 681-690.
- (19) Dougherty, T. J. Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* **1987**, 45, 879-889.
- (20) Hayata, Y.; Kato, H.; Konaka, C.; Ono, J.; Takizawa, N. Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer. *Chest* **1982**, 81, 269-277.
- (21) Kato, H.; Konaka, C.; Kawate, N.; Shinohara, H.; Kinoshita, K.; Noguchi, M.; Ootomo, S.; Hayata, Y. Five-year disease-free survival of a lung cancer patient treated only by photodynamic therapy. *Chest* **1986**, 90, 768-770.
- (22) Kato, H.; Konaka, C.; Ono, J.; Hayata, Y. Preoperative laser photodynamic therapy in combination with operation in lung cancer. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **1985**, 90, 420-429.
- (23) Hayata, Y.; Kato, H.; Furuse, K.; Kusunoki, Y.; Suzuki, S.; Mimura, S. Photodynamic therapy of 169 early stage cancers of the lung and oesophagus: a

- Japanese multi-centre study. *Laser. Med. Sci.* **1996**, 11, 255–259.
- (24) Potter, W. R. “PDT dosimetry and response.” *Proc. SPIE Photodyn. Ther.: Mech.* **1989**, 1065, 88-99.
- (25) Friedberg, J. S.; Mick, R.; Stevenson, J.; Metz, J.; Zhu, T.; Buyske, J.; Sterman, D. H.; Pass, H. I.; Glatstein, E.; Hahn, S. M. A phase I study of Foscan-mediated photodynamic therapy and surgery in patients with mesothelioma. *Ann. Thorac. Surg.* **2003**, 75, 952-959.
- (26) Javaid, B.; Watt, P.; Krasner, N. Photodynamic therapy (PDT) for oesophageal dysplasia and early carcinoma with mTHPC (*m*-tetrahydroxyphenyl chlorin): A preliminary study. *Lasers Med. Sci.* **2002**, 17, 51-56.
- (27) Bonnett, R. New photosensitizers for the photodynamic therapy of tumors. *Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng.* **1994**, 2078, 74–90.
- (28) Suhr, M. A.; Hopper, C.; MacRobert, A. J.; Speight, P. M.; Kubler, A. C.; Kunz, L. Clinical pilot study of interstitial photodynamic therapy for treatment of advanced head and neck tumors. *Mund Kiefer Gesichtschir.* **2001**, 5, 277-282.
- (29) Copper, M. P.; Tan, I. B.; Oppelaar, H.; Ruevekamp, M. C.; Stewart, F. A. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2003**, 129, 709-711.

- (30) Kato, H.; Furukawa, K.; Sato, M.; Okunaka, T.; Kusunoki, Y.; Kawahara, M.; Fukuoka, M.; Miyazawa, T.; Yana, T.; Matsui, K.; Shiraishi, T.; Horinouchi, H. Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung. *Lung Cancer* **2003**, 42, 103-111.
- (31) Taber, S.W.; Fingar, V. H.; Coots, C. T.; Wieman, T. J. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: A phase I clinical study. *Clin. Cancer Res.* **1998**, 4, 2741-2746.
- (32) Lee, L. K.; Whitehurst, C.; Pantelides, M. L.; Moore, J. V. *In situ* comparison of 665 nm and 633 nm wavelength light penetration in the human prostate gland. *Photochem. Photobiol.* **1995**, 62, 882-886.
- (33) Selman, S. H.; Fitkin, D. L.; Keck, R. W.; Morgan, A. R.; Doiron, D. R. Treatment of the transplantable FANFT induced bladder tumors with the Purpurin SnET2 and red light emitted by a pulsed frequency doubled Nd: YAG Laser. *J. Laser Appl.* **1991**, 3, 45-48.
- (34) Young, S. W.; Woodburn, K. W.; Wright, M.; Mody, T. D.; Fan, Q.; Sessler, J. L.; Dow, W. C.; Miller, R. A. Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* **1996**, 63, 892-897.
- (35) Dimofte, A.; Zhu, T. C.; Hahn, S. M.; Lustig, R. A. *In vivo* light dosimetry for motexafin lutetium-mediated PDT of recurrent breast cancer. *Lasers Surg. Med.* **2002**, 31, 305-312.

- (36) Hsi, R. A.; Kapatkin, A.; Strandberg, J.; Zhu, T.; Vulcan, T.; Solonenko, M.; Rodriguez, C.; Chang, J.; Saunders, M.; Mason, N.; Hahn, S. Photodynamic therapy in the canine prostate using motexafin lutetium. *Clin. Cancer Res.* **2001**, *7*, 651-660.
- (37) Locher, G. L. Biological effects and therapeutic possibilities of neutrons. *Am. J. Roentgenol.* **1936**, *36*, 1-13.
- (38) Soloway, A. H.; Tjarks, W.; Barnum, B. A.; Rong, F.-G.; Barth, R. F.; Codogni, I. M.; Wilson, J. G. The chemistry of neutron capture therapy. *Chem. Rev.* **1998**, *98*, 1515-1562.
- (39) Barth, R. F.; Coderre, J. A.; Vicente, M. G.; Blue, T. E. Boron neutron capture therapy of cancer: current status and future prospects. *Clin. Cancer Res.* **2005**, *11*, 3987-4002.
- (40) Hawthorne, M. F. The role of chemistry in the development of boron neutron capture therapy of cancer. *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1993**, *32*, 950-984.
- (41) Chanana, A. D.; Capala, J.; Chadha, M.; Coderre, J. A.; Diaz, A. Z.; Elowitz, E. H.; Iwai, J.; Joel, D. D.; Liu, H. B.; Ma, R.; Pendzick, N.; Peress, N. S.; Shady, M. S.; Slatkin, D. N.; Tyson, G. W.; Wielopolski, L. Boron neutron capture therapy for glioblastoma multiforme: interim results from the phase I/II dose-escalation studies. *Neurosurgery* **1999**, *44*, 1182-1192.

- (42) Pignol, J. -P.; Oudart, H.; Chauvel, P.; Sauerwein, W.; Gabel, D.; Prevot, G. Selective delivery of ^{10}B to soft tissue sarcoma using ^{10}B -L-borophenylalanine for boron neutron capture therapy. *Br. J. Radiol.* **1998**, 71, 320-323.
- (43) Soloway, A. H.; Hatanaka, H.; Davis, M. A. Penetration of brain and brain tumor. VII. Tumor-binding sulfhydryl boron compounds. *J. Med. Chem.* **1967**, 10, 714-717.
- (44) Kageji, T.; Nakagawa, Y.; Kitamura, K.; Matsumoto, K.; Hatanaka, H. Pharmacokinetics and boron uptake of BSH ($\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$) in patients with intracranial tumors. *J. Neurooncol.* **1997**, 33, 117-130.
- (45) Gabel, D.; Preusse, D.; Haritz, D.; Grochulla, F.; Haselberger, K.; Frankhauser, H.; Ceberg, C.; Peters, H. -D.; Klotz, U. Pharmacokinetics of $\text{Na}_2\text{B}_{12}\text{H}_{11}\text{SH}$ (BSH) in patients with malignant brain tumours as prerequisite for a phase I clinical trial of boron neutron capture. *Acta Neurochir.* **1997**, 139, 606-612.
- (46) Ishihashi, M.; Nakanishi, T.; Mishima, Y. Specific killing effect of $^{10}\text{B}_1$ -*para*-boronophenylalanine in thermal neutron capture therapy of malignant melanoma: In vitro radiobiological evaluation. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, 78, 215-218.
- (47) Liao, T. K.; Pondrebarac, E. G.; Cheng, C. C. Boron-substituted pyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, 86, 1869-1870.
- (48) Spielvogel, B. F.; Sood, A.; Shaw, B. R.; Hall, I. H. From boron analogues of

- amino acids to boronated DNA: potential new pharmaceuticals and neutron capture agents. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, 415-418.
- (49) Yamamoto, Y.; Seko, T.; Nakamura, H.; Nemoto, H.; Hojo, H.; Mukai, N.; Hashimoto, Y. Synthesis of carboranes containing nucleoside bases. Unexpectedly high cytostatic and cytotoxicity toward cancer cells. *Chem. Commun.* **1992**, 157-158.
- (50) Nemoto, H.; Cai, J.; Asao, N. Synthesis and biological properties of water-soluble *p*-boronophenylalanine derivatives. Relationship between water solubility, cytotoxicity, and cellular uptake. *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 1673-1678.
- (51) Karnbrock, W.; Musiol, H. -J.; Moroder, L. Enantioselective synthesis of *S*-*o*-carboranylalanine via methylated bislactim ethers of 2,5-diketopiperazines. *Tetrahedron* **1995**, 51, 1187-1196.
- (52) Mier, W.; Gabel, D.; Haberkorn, U.; Eisenhut, M. Conjugation of the *closo*-borane mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) to a tumour selective peptide. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2004**, 630, 1258-1262.
- (53) Jacobsson, M.; Winander, C.; Mani, K.; Ellervik, U. Xylose as a carrier for boron containing compounds. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, 18, 2451-2454.
- (54) Lechtenberg, B.; Gabel, D. Synthesis of a $(B_{12}H_{11}S)^{2-}$ containing glucuronoside as potential prodrug for BNCT. *J. Organomet. Chem.* **2005**, 690, 2780-2782.

- (55) Lee, J. -D.; Ueno, M.; Miyajima, Y.; Nakamura, H. Synthesis of boron cluster lipids: *closo*-dodecaborate as an alternative hydrophilic function of boronated liposomes for neutron capture therapy. *Org. Lett.* **2007**, *9*, 323-326.
- (56) Kahl, S. B.; Koo, M. -S. Synthesis of tetrakis-carborane-carboxylate esters of 2,4-bis-(α,β -dihydroxyethyl)-deuteroporphyrin IX. *Chem. Commun.* **1990**, 1769-1771.
- (57) Wu, H. T; Micca, P. L.; Makar, M. S.; Miura, M. Total syntheses of three copper (II) tetracarboranylphenylporphyrins containing 40 or 80 boron atoms and their biological properties in EMT-6 tumor-bearing mice. *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 5083-5092.
- (58) Koo, M. -S.; Ozawa, T.; Santos, R. A.; Lamborn, K. R.; Bollen, A. W.; Deen, D. F.; Kahl, S. B. Synthesis and comparative toxicology of a series of polyhedral borane anion-substituted tetraphenyl porphyrins. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 820-827.
- (59) El-Zaria, M. E.; Ban, H. S.; Nakamura, H. Boron-containing protoporphyrin IX derivatives and their modification for boron neutron capture therapy: synthesis, characterization, and comparative in vitro toxicity evaluation. *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*, 1543-1552.
- (60) Mazière, J. C.; Morlière, P.; Santus, R. The role of the low density lipoprotein receptor pathway in the delivery of lipophilic photosensitizers in the

- photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B* **1991**, 8, 351-360.
- (61) Kessel, D. Determinants of photosensitization by mono-L-aspartyl chlorin e6. *Photochem. Photobiol.* **1989**, 49, 447-452.
- (62) 中島進, 阪田功, 竹村健, PDT(Photodynamic Therapy)の新展開, *BME* **2000**, 14, 29-34.
- (63) Luguya, R.; Fronczek, F. R.; Smith, K. M.; Vicente, M. G. H. Synthesis of novel carboranylchlorins with dual application in boron neutron capture therapy (BNCT) and photodynamic therapy (PDT). *Appl. Radiat. Isot.* **2004**, 61, 1117-1123.
- (64) Dolphin, D.; Sivasothy, R. The preparation of porphyrin S-411 (dehydrocoproporphyrin) and harderoporphyrin from protoporphyrin IX. *Can. J. Chem.* **1981**, 59, 779-785.
- (65) Nakae, Y.; Fukusaki, E.; Kajiyama, S.; Kobayashi, A.; Nakajima, S.; Sakata, I. Syntheses and screening tests of new chlorin derivatives as photosensitizer. *J. Photochem. Photobiol. A* **2005**, 174, 187-193.
- (66) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new chlorin derivatives as potential photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, 21, 2298-2304.

- (67) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Miura, K.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, 24, 1339-1343.
- (68) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Miura, K.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new BSH-conjugated chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B* **2014**, 140, 140-149.
- (69) Fukuda, T.; Koga, Y.; Iwao, M. Synthesis of 1', 2', 3', 4', 5'-pentamethyl-3, 4-diphenylazaferrocene and its enantioselective C-2 functionalization *via* (-)-sparteine-mediated lithiation. *Heterocycles* **2008**, 76, 1237-1248.
- (70) Nakamura, M.; Fujino, Y.; Mochizuki, M.; Minoda, K.; Masuda, K. *In vivo* effect of prostaglandins on human retinoblastoma cells in nude mice. *Jpn. J. Ophthalmol.* **1987**, 31, 608-620.
- (71) Gomer, C. J.; Ferrario, A. Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res.* **1990**, 50, 3985-3990.
- (72) Peng, Q.; Moan, J.; Ma, L.; Nesland, J. M. Uptake, localization, and photodynamic effect of *meso*-tetra(hydroxyphenyl)porphine and its corresponding chlorin in normal and tumor tissues of mice bearing mammary

carcinoma. *Cancer Res.* **1995**, 55, 2620-2626.

- (73) Van der Zee, J. Heating the patient: A promising approach ? *Ann. Oncol.* **2002**, 13, 1173-1184.
- (74) Valliant, J. F.; Guenther, K. J.; King, A. S.; Morel, P.; Schaffer, P.; Sogbein, O. O.; Stephenson, K. A. The medicinal chemistry of carboranes. *Coordin. Chem. Rev.* **2002**, 232, 173-230.
- (75) Gabel, D.; Moller, D.; Harfst, S.; Roesler, J.; Ketz, H. Synthesis of *S*-alkyl and *S*-acyl derivatives of mercaptoundecahydrododecaborate, a possible boron carrier for neutron capture therapy. *Inorg. Chem.* **1993**, 32, 2276-2278.

論文目録

主参考論文

- (1) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new chlorin derivatives as potential photosensitizers for photodynamic therapy. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **2013**, 21, 2298-2304.
- (2) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Miura, K.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **2014**, 24, 1339-1343.
- (3) Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Miura, K.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new BSH-conjugated chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2014**, 140, 140-149.

副参考論文

- (1) Takebayashi, J.; Asano, R.; Nakae, Y.; Saito, M.; Gohda, E.; Yamamoto, I.; Tai, A. 2-O- α -D-Glucopyranosyl-L-ascorbic acid scavenges 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical via a covalent adduct formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **2007**, 71, 754-760.
- (2) Hachimine, K.; Shibaguchi, H.; Kuroki, M.; Yamada, H.; Kinugasa, T.; Nakae, Y.; Asano, R.; Sakata, I.; Yamashita, Y.; Shirakusa, T.; Kuroki, M. Sonodynamic therapy of cancer using a novel porphyrin derivative, DCPH-P-Na(I), which is devoid of photosensitivity. *Cancer Science* **2007**, 98, 916-920.
- (3) Takahashi, H.; Nakajima, S.; Asano, R.; Nakae, Y.; Sakata, I.; Iizuka, H. Photodynamic therapy using a novel photosensitizer, EC036, is more effective compared with ATX-S10(Na) photodynamic therapy. *Journal of Dermatological Science* **2009**, 55, 130-132.

略語一覽

BNCT : boron neutron capture therapy
BOC : *tert*-butoxycarbonyl
BPA : L-4-boronophenylalanine
BSH : disodium mercaptoundecahydro-*closo*-dodecaborate
DCHA : dicyclohexylamine
DFA : difluoroacetic acid
DMAc : *N,N*-dimethylacetamide
DMAP : 4-dimethylaminopyridine
DMF : *N,N*-dimethylformamide
DNA : deoxyribonucleic acid
EDC : 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide
ESI : electrospray ionization
FBS : fetal bovine serum
HPLC : high performance liquid chromatography
HRMS : high-resolution mass spectra
IDA : iminodiacetate
LED : light-emitting diode
MS : mass spectra
NMR : nuclear magnetic resonance
NsCl : 2-nitrobenzenesulfonyl chloride
PBS : phosphate buffered saline
PDT : photodynamic therapy
QOL : quality of life
TFA : trifluoroacetic acid
THF : tetrahydrofuran
TLC : thin-layer chromatography
UV-vis : ultraviolet-visible absorption spectroscopy

謝辞

本研究を遂行するにあたり、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました県立広島大学生命環境学部生命科学科 田井章博教授に心より感謝いたします。

また、本論文をご精読頂き有用なコメントを頂きました県立広島大学生命環境学部 江頭直義教授、野下俊朗准教授、斉藤靖和准教授に深く感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、様々な面でご支援を賜りましたポルフィリン研究所所長 阪田功博士に心より感謝いたします。

本研究における各誘導体の腫瘍集積性評価実験、PDTによる抗がん効果評価実験および細胞毒性試験は、県立広島大学生命環境学部 矢間太准教授、福本有希氏、永見亜門氏、三浦香織氏、共同研究グループ諸氏のご協力により遂行することができました。また、各誘導体の NMR 測定は、岡山県立大学保健福祉学部 伊東秀之教授に実施して頂き、LED 光源装置の使用にあたっては、シーエス株式会社 市川晶氏にご協力頂きました。ここに深く感謝いたします。また、ホウ素化合物をご供与下さいました筑波大学医学医療系脳神経外科 松村明教授、ステラケミファ株式会社に深く感謝いたします。また、本研究を実施するにあたり、ご支援を賜り温かく見守って下さいました森山メモリアル病院院長 中島進博士、旭川医科大学呼吸器センター 大崎能伸教授に深く感謝いたします。

最後に、終始励まし支えてくれた家族に改めて感謝いたします。