

一酸化窒素感受性蛍光色素の開発と応用

小島 宏建

博士論文

一酸化窒素感受性蛍光色素の開発と応用

東京大学大学院 薬学系研究科

小島 宏 建

目次

略語	1
第1章 序	
第1節 研究目的	3
第2節 NOの性質	
(1) NOおよびその酸化体の反応性	5
(2) 生体内でのNO	6
第3節 現在までに報告されているNO測定法	
(1) 間接的測定法	13
(2) 直接的測定法	14
第4節 蛍光法によるバイオイメーjing法	22
第2章 NO感受性蛍光色素DAF-2の開発	
第1節 2,3-ジアミノナフタレン(DAN)を用いたNO測定	
(1) ジアミンでNOを捉える	24
(2) ラット大動脈平滑筋細胞より生成するNOの測定 および反応機構の考察	25
(3) ウシ大動脈由来血管内皮細胞より生成するNOの測定	26
(4) 培養細胞より生成するNOのバイオイメーjing	26
(5) まとめ	27
第2節 DAN-1 EEを用いたバイオイメーjing	
(1) DAN-1 EEの開発	32
(2) ラット大動脈由来血管平滑筋細胞のイメーjing	32
(3) 問題点	33
(4) まとめ	34
第3節 DANより優れたジアミンを有する蛍光色素の創製	
(1) NO蛍光プローブの要件	41
(2) ナフタレン骨格を有する化合物の検討	42
(3) ベンゾフラン骨格を有する化合物の検討	42

第4節	ジアミノフルオレセイン (DAF-1 - DAF-6) の開発	
(1)	DAF のデザインと合成	45
(2)	DAF の性質	46
(3)	まとめ	48
第5節	DAF を用いた細胞外 NO 測定	
(1)	HPLC によるトリアゾール体生成の確認	59
(2)	マイクロプレートリーダーによる迅速な NO 測定	59
第6節	DAF 誘導体を用いたバイオイメージング法の開発	
(1)	NO イメージングプローブ (DAF-2 誘導体) の デザインと合成	64
(2)	DAF-2 DA を用いた血管平滑筋細胞の生成する NO のイメージング	65
(3)	共焦点レーザー顕微鏡による DAF-2 C18, DAF-2 C15 を負荷した血管平滑筋細胞の観察	66
第7節	DAF-2 DA を用いたラット脳における NO イメージング	
(1)	生きているラットの脳表における NO イメージング	76
(2)	ラット脳スライスを用いた海馬における NO イメージング	76
第3章	改良型プローブ DAF-FM の開発と応用	
第1節	pH 特性の改良	84
第2節	DAF-FM DA を用いた血管内皮細胞のイメージング	99
第3節	血管内皮細胞における NO と Ca^{2+} 同時イメージング	102
第4節	海馬スライスを用いた虚血時のイメージング	
(1)	実験の目的	112
(2)	虚血条件による NO 生成パターンとの相違	112
(3)	細胞内 pH 低下の測定への影響	114
第4章	ジアミノローダミン (DAR) の創製	
(1)	ローダミンの特性	121
(2)	DAR-1 と DAR-2 の開発	121

(3) DAR-1 のエチルエステル (EE) 体への誘導化と イメージングへの応用	121
(4) ラット脳ホジネートを用いたエステル加水分解の 検討と DAR のアセトキシメチル (AM) 体の開発	122
(5) pH 特性の改善	122
(6) DAR-4M 誘導体の開発とイメージングへの応用	123
第 5 章 総括	136
実験の部	137
合成法および機器データ	
第 2 章第 2 節	143
第 2 章第 3 節	145
第 2 章第 4 節	152
第 2 章第 6 節	160
第 2 章第 7 節	162
第 3 章第 1 節	163
第 4 章	169
References	177
謝辞	181

略語

Ac, acetyl
 Arg, arginine
 AM, acetoxymethyl
 ATP, adenosine triphosphate
 BF, benzofuran
 BK, bradykinin
 CCD, charge-coupled device
 cNOS, constitutive nitric oxide synthase
 DA, diacetate
 DAF, diaminofluorescein
 DAN, 2,3-diaminonaphthalene
 DAR, diaminorhodamine
 DETC, *N,N*-diethyldithiocarbamate
 2-DeoxyGlc, 2-deoxyglucose
 DM, dichroic mirror
 DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium
 DMF, *N,N*-dimethylformamide
 DMSO, dimethyl sulfoxide
 DTCS, *N*-(dithiocarboxy)sarcosine
 E, energy
 EA, elemental analysis
 EDRF, endothelium-derived relaxing factor
 EE, ethyl ether
 EI, electron ionization
 Em., emission
 eNOS, endothelial nitric oxide synthase (type III NOS)
 ESR, electron spin resonance
 Et, ethyl
 Ex., excitation
 FAB, fast atom bombardment
 FAD, flavin adenine dinucleotide
 FBS, fetal bovine serum
 FMN, flavin mononucleotide
 Hb, hemoglobin
 HOMO, highest occupied molecular orbital

HPLC, high performance liquid chromatography
 HRP, horse radish peroxidase
 I, intensity
 iNOS, inducible nitric oxide synthase (type II NOS)
 IFN- γ , interferon- γ
 IL-1 β , interleukin-1 β
 KA, kainic acid
 KRP, Krebs-Ringer phosphate buffer
 LPS, lipopolysaccharide
 LTD, long-term depression
 LTP, long-term potentiation
 LUMO, lowest occupied molecular orbital
 MGD, *N*-methyl-D-glucamine dithiocarbamate
 m.p., melting point
 MRI, magnetic resonance imaging
 MS, mass spectrometry
 Me, methyl
 NADH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide
 NADPH, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
 L-NAME, *N*^G-nitro-L-arginine methyl ester
 NaPi, sodium phosphate buffer
 NMDA, *N*-methyl-D-aspartic acid
 L-NMMA, *N*^G-monomethyl-L-arginine
 NMR, nuclear magnetic resonance
 nNOS, neuronal nitric oxide synthase (type I NOS)
 NO, nitric oxide
 NO₂, nitrogen dioxide
 NO₂⁻, nitrite
 NO₃⁻, nitrate
 N₂O, nitrous oxide
 NO⁺, nitrosonium cation

NO⁺, nitrosyl ion
NOC, NO releasing compound
¹O₂, singlet oxygen
O₂⁻, super oxide anion
ONOO⁻, peroxynitrite
PBS(+), phosphate-buffered saline
PET, photo-induced electron transfer
PTIO, 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-
3-oxide-1-oxyl
RI, radioisotope
sGC, soluble guanylate cyclase
t_{1/2}, half-life time
TFA, trifluoroacetic acid
THF, tetrahydrofuran
TMIO, 1,1,3,3-tetramethylisindoline-2-oxyl
TNF- α , tumor necrosis factor- α
UV, ultraviolet
y., yield

第1章 序

第1節 研究目的

1987年に一酸化窒素(NO)が血管内皮由来血管弛緩因子(EDRF)であると報じられて¹⁾以来, 生理活性物質としてのNOに関する研究は活発に行われてきており, L-ArgからNO合成酵素(NOS)により生成したNOは循環系で機能するばかりではなく, 免疫系や神経系においても多様かつ重要な作用を有していることが報告され(Fig. 1-1), 1992年Science誌のthe Molecule of the Yearにも選ばれている。さらに, NOがEDRFであることの発見に功績があったFurchgott, Murad, Ignarroの三博士に1998年度ノーベル医学生理学賞が与えられた。しかし, EDRFとしてのNOの役割は明らかになったものの, その他の真の生体機能に関しては未だに議論のあるところで, 特に中枢神経系においては, 記憶・学習のメカニズムの一つと考えられているシナプス可塑性や種々の虚血疾患に関わることが示唆されているが, 全く混沌とした状態にある。その原因の一つは, NOが生理的条件下で O_2 や $O_2^{\cdot -}$ によって酸化を受け易く不安定であり, さらに低濃度での放出のために既存の方法では測定が困難であることから, 生理的に機能しているNOの挙動をリアルタイムで直接測定することができず, 確かな根拠に基づいた議論が難しいことである。NOおよびその酸化体の作用解析は, 学問的に有意義であるだけでなく, 臨床的にも種々の疾患における未知の病因を明らかにした上で, その治療法を確立できる可能性を秘めている。すなわち, 循環系においては, 動脈硬化や高血圧症, 免疫系では感染疾患, 中枢系では脳梗塞, 痴呆症やアルツハイマー病などにNOが関わっている可能性があるため, NOの作用解明は非常に重要な研究課題である。

本研究は, NOの新規検出・測定法の開発を目的としており, その目標は細胞内, 組織中, さらにin vivoでのNOの動的挙動を明らかにすることである。具体的には, NOの生体内画像化(バイオイメーjing)に用いる蛍光色素を創製し, それをNOの時空間的な量変化の観察に応用することにより, NOの作用解析を行うことである。

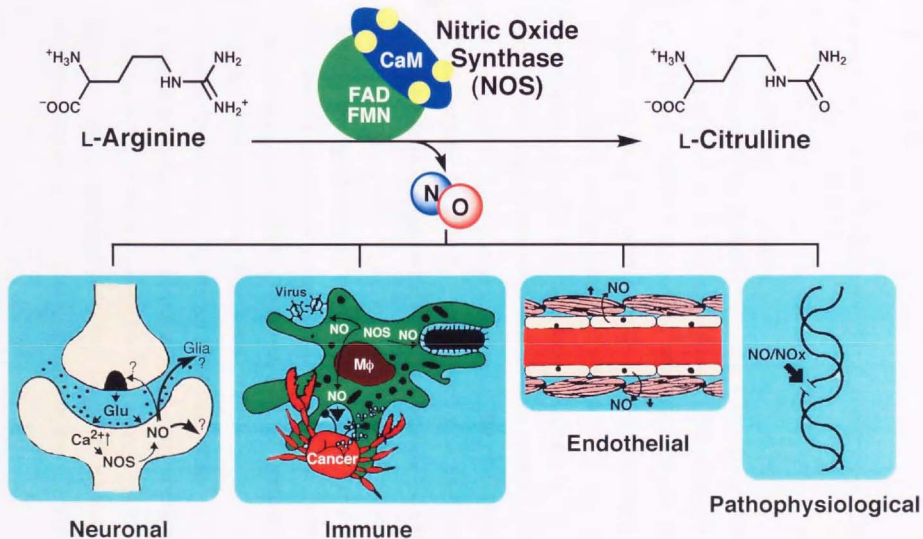


Fig. 1-1 NOの多様な生体作用

第2節 NOの性質

NOを検出するには、NOの性質を精査しなくてはならない。そこでNOに関連する知見を簡単にまとめた。

(1) NOおよびその酸化体²⁾の反応性

NO 常温で無色の気体。反結合性軌道に1電子を含むラジカル種。この不対電子はNとOの間に非局在化している。N-O結合の回転による共鳴吸収帯がマイクロ波領域にあり、常温では溶液中のESRシグナルは観測しがたい。ラジカル種の中ではNO自身はかなり安定な分子種であり、反応性に乏しい。その安定性を象徴するかのよう、嫌気下ではNOは水溶液として保存可能である。なお、水には1.9 mMまで溶解するとされている³⁾。NO自身の反応としては、 O_3 、 O_3^+ 、 NO_2 、PTIO、ヘム鉄への配位などラジカル的な反応以外知られておらず、ユニークな反応としては、脂肪族アミンとの adduct (Drago complex) 形成である (Scheme 1-2-1)^{4), 5)}。これらは封管中、圧力をかけ、アミンにNOを付加させたものであるが、この反応は可逆的で Keefer らによりこれらの化合物が NO donor として非常に有用であることが示されてきた⁶⁾。さらに Keefer らはこれらの分子内 complex 誘導体を開発し、NO 放出速度の異なる化合物群 (NONOate, Table 1-2-2) を合成しており⁷⁾、現在これらの NONOate は NO donor として市販されるにまで至っている (NO releasing Compounds: NOC 類)。実際に私も合成したが、非常に簡単に作れ、かつそれ自身非常に安定で、その有用性を実感している。

$ONOO^-$ $NO+O_2^{+9}$ あるいは $NO^++H_2O_2^{9)}$ で生成する非常に酸化力の強いイオンである。

その酸化活性の本体はそのものなのか、あるいはその分解物なのか未だはっきりしていないが、 CO_2 が $ONOO^-$ の分解を促進し、 NO_2^+ と CO_3^{2-} を生成することが報告された¹⁰⁾。生成した NO_2^+ はチロシンなどのニトロ化を行うとも報じられているが、どこまで生体内で起こっているかは、まだまだ明確でないことが多い。

NO⁺ (N₂O₃ も無水亜硝酸と呼ばれ、NO⁺の反応性を有する。) 強力なニトロソ化能を有する。NO₂+H⁺でも生成し、アニリン類のジアゾ化など有機化学の分野でもお馴染みである。当研究室滝澤らは酸素存在下 NO はアニリンと反応し、ジフェニルトリアゼンを生成することを見出したが (Scheme 1-2-2) ¹¹⁾、これは NO の酸化体の N₂O₃ によりジアゾ化を受けてもう 1 分子のアニリンが付加したものと考えている。

NO⁺とチオール反応によりニトロソチオールが生成することが知られている。現在、このニトロソチオールに NO 研究者の関心が高まっている。というのもニトロソチオールが生体内で NO (あるいは NO⁺) と同様の働きをもつことが Stamler を初めとする研究者により ¹²⁾ 報告されており、そのニトロソチオールが NO donor として貯蔵、あるいは伝達物質の作用を有する可能性を秘めているからである。

NO₂ NO とは違って反応性に富む褐色の気体 (融点 -9.3℃, 沸点 21.3℃)。テフロンをも腐食し、水中での保存は不能。気相中で容易に dimer 化して N₂O₄ となり、無色となる。

(2) 生体内での NO

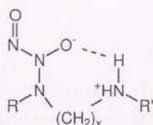
生体内で NO は L-Arg から生合成される ¹³⁾ のだが (Scheme 1-2-3), その生合成に関わっている酵素 (NOS) は大きく分けて Table 1-2-3 に挙げた 3 種類存在する。Type III 由来の NO は血管平滑筋細胞の sGC を活性化し、血管を弛緩させることが知られている。Type II の iNOS が誘導されたマクロファージなどの細胞は μM order の NO を生成することが知られ、3 種類の中では最も大量の NO を産生する。その NO は呼吸鎖阻害や DNA 合成阻害を引き起こすため、腫瘍細胞や微生物を殺す等の作用を有する。現在、その働きが最も分かっていないのが Type I NOS 由来の NO で、グルタミン酸レセプターの活性化により細胞内カルシウム濃度が上昇し、神経細胞より産生される。その NO が記憶・

学習形成等の神経伝達，つまり神経の可塑性に関わっているとされてはいるものの本当のところは未だに明らかになっていない。

生成された NO は生理的条件下では不安定で，反応性に富む酸化体に変化し，生体にとって毒として働くこともある。例えば核酸塩基やヌクレオシドの脱アミノ化を引き起こすことも報告されている (Table 1-2-4)¹¹⁾。

酸化数	酸化物	酸/塩基	イオン
+5	N ₂ O ₅	HNO ₃	NO ₃ ⁻ , NO ₂ ⁺
+4	NO ₂ (N ₂ O ₄)		
+3	N ₂ O ₃	HNO ₂	NO ₂ ⁻ , NO ⁺ , ONOO ⁻
+2	NO		
+1	N ₂ O	H ₂ N ₂ O ₂	N ₂ O ₂ ²⁻
0	N ₂		
-1		NH ₂ OH	
-2		N ₂ H ₄	N ₂ H ₅ ⁺
-3		NH ₃	NH ₄ ⁺

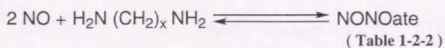
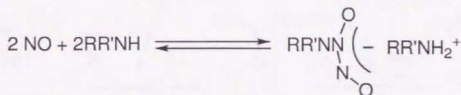
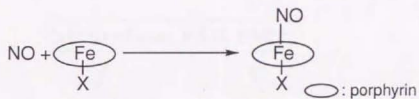
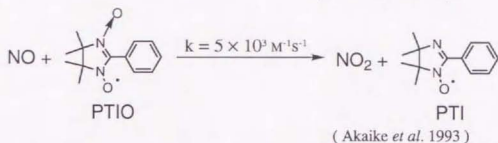
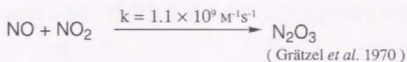
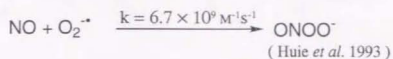
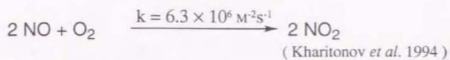
Table 1-2-1 酸化数と窒素酸化物²⁾



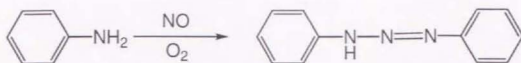
NOC	x	R	R'	t _{1/2} (min)*
6	2	Me	Me	36.1
7	3	Me	Me	10.1
8	4	Me	Me	1.3
9	6	Me	Me	2.7
10	2	Me	H	40
11	2	Et	H	333
12	2	Et	Et	327
13	3	Me	H	13.7
14	3	Et	Et	71.8
15	3	Pr	H	76.6
5	3	i-Pr	H	93.0
16	3	i-Pr	i-Pr	88.5
17	3	cyclohexyl	H	115
18	2	(CH ₂) ₂ NH ₂	H	3400
19	3	(CH ₂) ₃ NH ₂	H	284
20	3	(CH ₂) ₄ NH ₂	H	165

* Determined at 22 °C and pH 7.4 in 0.1 M phosphate buffer.

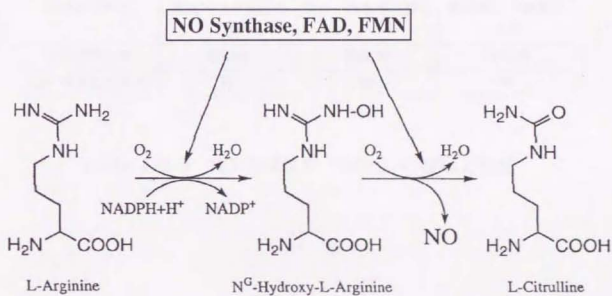
Table 1-2-2 NONOateの種類⁷⁾



Scheme 1-2-1 NOラジカル自身の反応



Scheme 1-2-2 酸素存在下でのアニリンとNOとの反応¹¹⁾



Scheme 1-2-3 アルギニンからのNOの生成

性質	Type I 神経型 : nNOS	Type II 誘導型 : iNOS	Type III 血管内皮型 : eNOS
発現する主な細胞	神経細胞	マクロファージ細胞 グリア細胞 肝実質細胞 血管平滑筋細胞 メサングウム細胞	血管内皮細胞
分子量 (kDa)	160	130	133
酵素の発現	構成型	誘導型	構成型
酵素の活性化	細胞内Ca ²⁺ 濃度の 上昇	遺伝子の転写活性化	細胞内Ca ²⁺ 濃度の 上昇
細胞内局在性	細胞質	細胞質	細胞膜
Ca ²⁺ 依存性の有無	有	無	有

Table 1-2-3 NO 合成酵素 (NOS) の種類と性質







Substrate	Product	Yield (%)	
		NO + O ₂	NO
 Adenine	 Hypoxanthine	> 99	2
 Guanine	 Xanthine	85	0
 Cytosine	 Uracil	28	0
Adenosine	Inosine	> 99	
Guanosine	Xanthosine	81	
Cytidine	Uridine	47	

Table 1-2-4 NO + O₂系による核酸塩基とヌクレオシドの反応¹¹⁾

第3節 現在までに報告されている NO 測定法

測定法は大きく分けて間接的・直接的の2つのタイプに分類される。(Table 1-3-1)

(1) 間接的測定法

NO を直接捉えるのではなく、NO が生成した後に関連物質を測定することで、NO の生成量を推測する方法である。

1 Griess 法

間接的測定法の代表例として、NO の安定酸化生成物である NO_2^- を測定する Griess 法がある。この方法は *N*-1-ナフチルエチレンジアミンとスルファニルアミドを酸性下 NO_2^- と反応させ、ジアゾカップリングさせることで、543 nm の吸光度を測定するものである。また、さらに高次の酸化体である NO_3^- もカドミウムなどで NO_2^- に還元することにより測定できる。この方法の利点は安価な試薬で、手軽に測定できるということである。逆に、吸光法に基づくため、検出限界は $1\mu\text{M}$ 程度と感度が低い。ただし、HPLC と組み合わせることで高感度化することも可能である¹⁴⁾。

2 DAN による NO_2^- 測定法

上記と同様の原理を用い、蛍光法に発展させたのが 2,3-ジアミノナフタレン (DAN) を用いる NO_2^- 測定法である。これは NO_2^- の溶液を酸性にし、ジアゾ化を経てナフトリアゾールが生成することに基づいている。この方法の検出限界は 10 nM である。ナフトリアゾールは 375 nm 励起と短波長であるため (Fig. 1-3-1), 生体由来の夾雑物質の蛍光が影響することと、その蛍光強度は pH 感受性 (Fig. 1-3-2) で、トリアゾールのプロトンの付加・脱離によって変化することには留意しなければならない。

3 Radioisotope (RI) 法

これは、1分子の NO が1分子の L-アルギニンから NO 合成酵素によって生成される際、1分子の L-シトルリンを副生することを利用したものである。 ^3H や ^{14}C ラベルした L-アルギニンを用い、NO 生成後、L-アルギニンと L-シトルリンをイオン交換カラムに

よって分離して、L-シトルリン生成量を放射活性をもとに測定し、それを NO 生成量に換算するものである。NO 合成酵素から生成する NO のアッセイには高感度である点から、必須の方法である。実際、NO 合成酵素のクローニングが成功したのも本方法を開発できたことによる。問題点としては RI を用いる煩雑さとリアルタイム測定への応用を行いにくいことである。そのため消費 L-アルギニンと L-シトルリン生成量を α -フタルアルデヒドで誘導化後に HPLC で検出する方法¹⁵⁾や¹⁵N ラベルした L-アルギニンをを用い、¹⁵N-L-シトルリンを HPLC-MS で検出する方法¹⁶⁾なども開発された。

(2) 直接的測定法

前述したが、生理的な NO の寿命が短いために直接測定が困難であることから、間接的な測定法が広く用いられているのが現状である。しかし、NO を測定する方法として望ましいのは、やはり NO を直接で測定する方法である。そのため、工夫を凝らしたさまざまな測定法が報告されており、これらを実験の目的によってうまく使い分けることが肝要である。

1 化学発光法

a オゾン法

化学発光法が極めて高感度であることから、NO が EDRF であることの証明に用いられたのも本方法である。NO はオゾンと反応すると励起状態の NO_2 を生成し、基底状態に戻る際に発光する。この反応は気相中でのみ起こり、当時は大気中の公害ガスである NO_x 測定に用いられていた。したがって、生体サンプル中の NO を測定するには、気相中に NO を追い出す必要がある。その際、生成した NO の 100% が移行するとは考えにくく、また、生成する NO をリアルタイムで測定することは困難であるため、安定な酸化体 NO_2^- 、 NO_3^- やニトロソチオールにヨウ素などを添加し、NO に還元することで間接的に測定する方法もある。しかし、そのために NO に対する特異性が下がってしまうことが考えられる。もちろん気相中の NO 測定には向いており、臨床において呼気中の

NO をモニターするような用い方には最適である。

b ルミノール法

本方法は当研究室菊地らにより開発され、既存の方法の中では最高感度の検出限界 1 pM である。NO は過酸化水素存在下、ルミノールと反応して、化学発光を起こす。ルミノールとの反応種はパーオキシナイトライト (ONOO⁻) であると考えられる。NO が酸素と反応して N_2O_3 を生成し、 N_2O_3 が過酸化水素と反応することで ONOO⁻ が生成することが報告されている⁹⁾。菊地らはこの方法を摘出腎臓に応用し、血圧と NO 量との相関を調べている。私は *in vivo* 系への応用として、マイクロダイアリシス法と組み合わせた測定系に改良し、小脳から生成する NO をリアルタイム検出することを行った。

ex vivo 系や *in vivo* 系で高感度リアルタイム測定できることは長所であるが、NO 検出の信頼性が高くはなく、脳内 NO の作用解析に応用可能な、本当の意味での実用的な方法にするためには、さらなる特異性の向上等、根本的な改良が必要である。しかしながら、現時点では化学発光法に基づく測定法の特異性の向上は困難であると判断した。

Moncada らのグループは本方法の検出液をマクロファージのメディウムに混ぜておき、NO 合成酵素を誘導したマクロファージから生成する NO を顕微鏡下で、可視化できることを報告している¹⁷⁾。しかし、本系は過酸化水素が検出液に含まれるので、直接生体サンプルに応用することは避けるべきであり、灌流系で用いる場合において有効な方法である。また、高感度である反面、NO に対する特異性が高くはない。したがって、必ず NO 合成酵素阻害剤などを用いた対照実験を行って確かめる必要がある。

さらに、この原理を応用したセンサーが報告されているが、高感度が本系の特長であるにも拘わらず、検出限界が 1.3 μ M と良くないので改善が必要であろう¹⁸⁾。

2 蛍光法

化学発光法と比較した場合、検出の特異性は蛍光色素のデザイン次第で高めることができる。というのも、蛍光性と化学構造の相関が化学発光と比較して明確になっており、プローブ分子のデザインがある程度可能であるからである。感度は化学発光法より劣る

とはいえ、かなりの高感度測定の可能性を秘めている。

a Dichlorofluorescein (Scheme 1-3-3)¹⁹⁾, Dihydrorhodamine 123 (Scheme 1-3-4)²⁰⁾ 法

NO が酸素あるいは活性酸素種によって酸化を受けた酸化体とフルオレセインやローダミンの還元体が反応し、フルオレセインやローダミンを生成することを利用した方法である。活性酸素種でも蛍光性になるので、特異性が低く、検出限界も $16 \mu\text{M}$ と良くない。

b ジエン法

NO 自身を捉える分子として期待されるのは、ジエンを用いた測定法である。もともと TMIO のようなジエンは後述する ESR 法に用いられていたが、蛍光法にも応用できる分子が開発された²¹⁾。その分子が NO と反応後、ESR 検出可能なラジカルとなり、それが生体成分のアスコルビン酸等により還元され、蛍光を発するというものである。励起波長が短波長であることと、還元を受ける反応が律速なので、生体サンプルにどこまで応用できるかを今後注目したい。

3 電極法

NO を電気化学的に酸化したときに流れる電流をモニターして、NO の検出を行ったものである。細い電極が作製できるため、特定の一部分の NO 測定においては有効である。電極の種類もクラーク型隔膜電極、Ni ポルフィリンコート型、3 層膜被覆型 Pt/Ir 型²²⁾ などがあり、市販もされている。他にも α -フェニレンジアミン被覆型²³⁾ など、さらに新しいタイプの物も開発されている。感度に関してもかなり高感度であり、リアルタイムで測定できるという強みがある。特異性に関しても工夫がいろいろとなされ、ナフィオン膜や「NO 選択的透過膜」で電極を覆ったりして、イオン等の酸化を受けやすい物質を排除している。この膜が NO 選択性の要となるので、使用の際には吟味が必要であろう。高感度な反面、ノイズやアーチファクトの影響を受けやすいので再現性に留意すべきであるが、その電極の性質を良く知った上で、慎重に用いる限り、非常に強力なツールであることは間違いない。応用例としては、血管内皮細胞由来の NO 測定²⁴⁾ やブラジ

キニンやアセチルコリンで刺激して生成した人の腕由来の NO 測定²⁵⁾、あるいは神経系における NO の役割の解明へ向けた神経組織における測定^{26,27)} 等が挙げられる。

4 ESR 法

NO は本来フリーラジカルであるので、ESR シグナルを観測することは可能であるが、NO 自身不安定な上、そのシグナルを得るには低温等特殊な条件が必要である。したがって、ESR を用いて NO 自身のシグナルを捉える方法を生体における機能解明に応用することができないので、スピントラップ剤と反応させて安定なラジカル種に変換してから ESR で測定されてきた。スピントラップ剤は様々なものが報告されている。

a PTIO 法

赤池・前田により開発された方法で、カルボン酸を付けて、水溶性の増した carboxy PTIO も市販されている。最近はその NO 捕捉能を利用した NO 消去剤としての価値が高くなっている。ただし、反応性の高い NO_2 が副生するので注意が必要である。

b ヘモグロビン法

ヘモグロビン (Hb) と NO が反応し、特有の ESR シグナルを示すニトロシル Hb が生成することを利用した方法である。デオキシ Hb は扱いづらく、 NO_2^- とも反応してしまうのでカルボニル Hb を用いた方法が報告²⁸⁾ されているが、低温測定が必要であるので用途に限られる。

c ジエン法

NO と反応してラジカル種を生成するジエンを用いる方法である。感度、物質の安定性の面から生体サンプルへの応用例はまだ少ないが、NO 自身と反応する有機化合物という点で興味深く、さらに発展する可能性がある。

d ジチオカルバメート鉄錯体法²⁹⁾

水溶性の高い N-メチル-D-グルカミンジチオカルバメート (MGD)^{30,31)}、N-ジチオカルボキシサルコシン (DTCS)^{32,33)} 鉄錯体や脂溶性の高い N,N-ジエチルジチオカルバメート (DETC) 鉄錯体がよく用いられている。小動物にスピントラップ剤を投与して、そ

のまま ESR 装置に挿入する *in vivo* 検出における報告が興味深い。特に、吉村らにより DTCS を用い、ラットの *in vivo* イメージングがなされている³³⁾ことは特筆すべきである。生物を生かしたまま、非侵襲的に NO 測定できるという点で素晴らしい。L バンドの周波数を用いざるを得ないので感度が悪いが、組織への局在や空間分解能などの問題と同時に解決できれば、幅広く用いられるようになる期待できる方法である。

5 MRI 法

ごく最近、MRI による *in vivo* イメージングも報告された³⁴⁾。LPS 投与後の肝臓におけるシグナル強度増加を ESR 法でもスピントラップ剤として使われた MGD で緩和時間 (T_1) の変化として検出している。感度やプローブの組織局在の問題があるが、非侵襲測定法として期待される。

6 吸光法

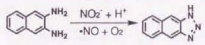
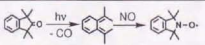
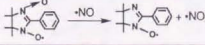
やはり感度が低いことが最大の欠点であるが、夾雑物質が少なく、比較的高濃度の NO 測定 (例えば、標準 NO 溶液の定量など) には、コスト、信頼性、操作の容易さの点から有用である。

a オキシヘモグロビン法

オキシヘモグロビンと、NO との反応後のメトヘモグロビンとのソーレー帯の吸収変化を追う方法。マイクロダイアリシス法と組み合わせた応用法も報告されているが³⁵⁾、生体での NO 検出への応用の際には特異性に疑問がある³⁶⁾。

b Horseradish peroxidase (HRP) 法

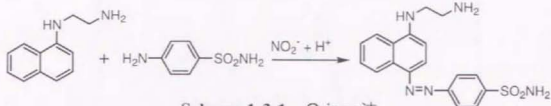
HRP の NO 配位による吸光度変化を利用した測定法³⁷⁾。感度を上げるためには 10 cm セルを用いる。生物サンプルへの応用には用いられないが、夾雑物質がない標準 NO 溶液の定量には有効である。

	Method	Detecting Limit	Mechanism & Characteristics	Theory	References
(1)	Griess Reaction	100 nM	•UV absorbance of diazo coupling reaction	Colorimetric Assay	Green, L. C. et al. <i>Anal. Biochem.</i> (1982) 126, 131-8
(2)	DAN Fluorescence	10 nM		Fluorometric Assay	Misko, T. P. et al. <i>Anal. Biochem.</i> (1993) 214, 11-16 Miles, A. M. et al. <i>Methods</i> (1995) 7, 40-47
(3)	Radio Isotope	1 nM	$[^3\text{H}]\text{Arg} \longrightarrow [^3\text{H}]\text{Citrulline}$ •Useful only in NO synthase assay	Radioisotope Assay	Bredt, D. S. & Snyder, S. H. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> (1989) 86, 9030-3
(4)	Ozone Chemiluminescence	10 pM	$\text{NO} + \text{O}_3 \longrightarrow \text{NO}_2 + {}^1\text{O}_2$ •Reduction necessary in AcOH, I ₂ chamber •Detect NO, NO ₂ ⁻ & NO ₃ ⁻ altogether •Detectable only in gas phase	Chemiluminescence Assay	Palmer, R. M. J. et al. <i>Nature</i> (1987) 327, 524-6
(5)	Luminol Chemiluminescence	1 pM	$\text{luminol}/\text{H}_2\text{O}_2 + \text{NO} \longrightarrow \text{chemiluminescence}$ •Make simultaneous detection with pressure possible •The highest sensitivity of any method so far developed	Chemiluminescence Assay	Kikuchi, K. et al. <i>Anal. Chem.</i> (1993) 65, 1794-9 Kikuchi, K. et al. <i>J. Biol. Chem.</i> (1993) 268, 23106-23110
(6)	Electrode	Clark Type 1 μM	•Detect by piercing into the slice of rat brain •Severe limitation in application organ	Voltammetric Assay	Shibuki, K. <i>Neurosci. Res.</i> (1950) 9, 69-76
		Ni Porphyrin 10 nM	•Detect by piercing into a single cell •Detect H ₂ O ₂ together		Malinski, T. & Taha, Z. <i>Nature</i> (1992) 358, 676-8
(7)	ESR	HbFe ^{II} 1 μM	$\text{HbFe}^{\text{II}} + \text{NO} \longrightarrow \text{HbFe}^{\text{II}}\text{NO}$ •Detect NO, NO ₂ ⁻ & NO ₃ ⁻ altogether	ESR Signal	Wannmalm, A. et al. <i>Anal. Biochem.</i> (1990) 187, 359-63
		TMIO 10 nM			Kroth, H. G. et al. <i>Angew. Chem.</i> (1992) 31, 891-3
		PTIO 1 μM			Akaike, T. et al. <i>Biochemistry</i> (1993) 32, 827-832
		DETC 0.5 μM	$\text{R-S-S-R} + \text{NO} \longrightarrow \text{R-S(S-NO)-S-R}$		Mordvintcev, P. et al. <i>Anal. Biochem.</i> (1991) 199, 142-6
(8)	O ₂ Hb	20 nM	$\text{O}_2\text{Hb} + \text{NO} \longrightarrow \text{Fe}^{\text{III}}\text{Hb} + \text{NO}_3^-$ •Detect Fe ^{III} Hb Production •Hb decomposes in perfusion buffer	Colorimetric Assay	Keim, M. & Shurader, J. <i>Circ. Res.</i> (1990) 66, 1561-75

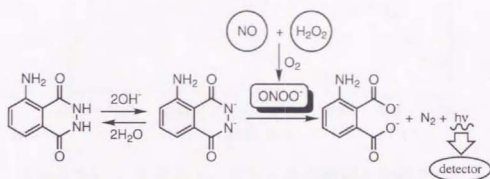
Scheme 1-3-1

Scheme 1-3-2

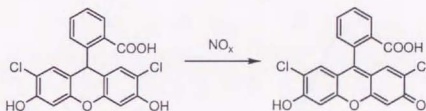
Table 1-3-1 主な既存のNO測定法



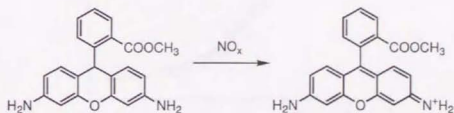
Scheme 1-3-1 Griess法



Scheme 1-3-2 ルミノール+過酸化水素法



Scheme 1-3-3 Dichlorofluorescein法



Scheme 1-3-4 Dihydrorhodamine 123法

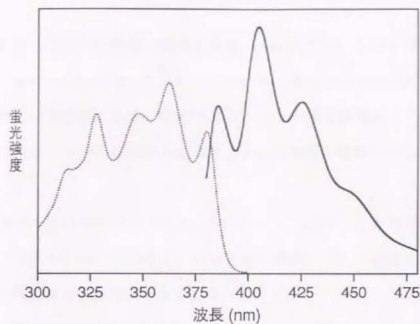


Fig. 1-3-1 ナフトトリアゾールの励起・蛍光スペクトル
リン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) 中にて測定。

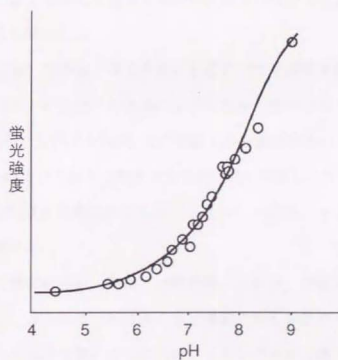


Fig. 1-3-2 ナフトトリアゾールのpH特性
0.1 mMナフトトリアゾールをリン酸ナトリウム溶液 (0.1 M) に
溶解して測定。

第4節 蛍光法によるパイオイメージング法

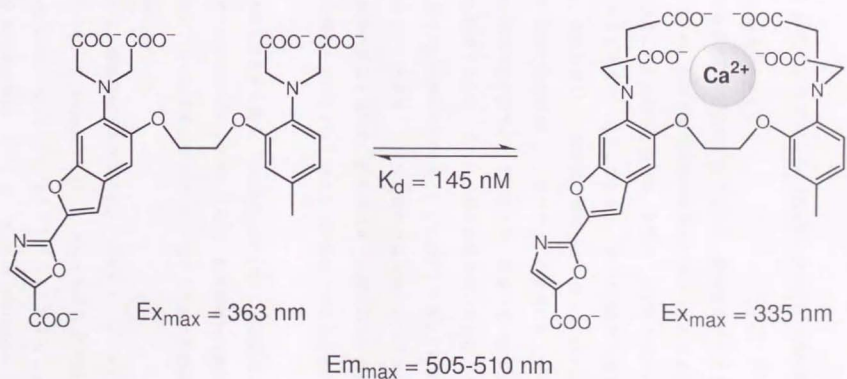
「ものをみる」ということは科学の基本である。人は見えないものを自分の目に見える形にするため、様々な工夫を行ってきた。すなわち、遠くのものを見るには望遠鏡、小さなものを見るには顕微鏡、ものの状態を見るにはその測定装置などである。生命現象を捉えるためにはその生きている状態をみることが直接的で信頼できる。百聞は一見に如かずである。

しかし、顕微鏡で小さいものが何でも見えるかという点必ずしもそうではないため、一つの方法としてわれわれは、その小さいものを蛍光標識してその蛍光を観察することでその小さいものの動きを観察できるようになってきた。

たとえば、生きた細胞内の Ca^{2+} 自体を人は見ることができないが、 Ca^{2+} を fura-2³⁸⁾ (Scheme 1-4-1) や fluo-3³⁹⁾ といった蛍光色素で捕らえることにより、その動態を追うことができるようになった。そのことにより従来知られていなかった Ca^{2+} にかかわる生命現象が数多く知られるに至った。

先ほどなつてきたと書いたのは、まだ小さいものすべてを標識することができないからである。第1節で NO という分子の生体における役割の解明が待たれていることを述べた。NO の動態を追うことができれば、 Ca^{2+} 同様その役割がわかってくるに違いない。ところが、これまで NO という分子の動きを蛍光顕微鏡下で捉えることはできていない。というのも、NO 感受性蛍光色素が存在しなかったからである。そこでわれわれはその色素を発見しようと試みた。

最近では多種多様な色素の開発、あるいは顕微鏡、カメラ、画像処理装置などといったハード面が改良され、さらには光軸方向にも分解能のある共焦点レーザー顕微鏡も用いられている。また、それらの使い方の工夫といったソフト面も進んでおり、木下らにより1分子イメージングなどの試みもなされるなど⁴⁰⁾、今後のこの蛍光を用いたイメージング法のさらなる発展は間違いないと考えている。



Scheme 1-4-1 Ca^{2+} 荧光色素 fura-2

第2章 NO感受性蛍光色素 DAF-2の開発

第1節 2,3-ジアミノナフタレン (DAN)を用いたNO測定

(1) ジアミンでNOを捉える

NOの作用解明を目標にする分析手法としては、開発者だけで行える実験は限られ、追試も必要となるため、さまざまな分野の専門家が用いることのできる汎用的な方法を開発することが望ましい。となると吸光法、蛍光法、化学発光法のいずれかの原理に基づくのが適切であると考えた。前述したとおり、NOは低濃度であるため、高感度検出が不可欠である。吸光法に基づく測定法は簡便性という点において特に優れるが、NO測定には感度という点で限界がある。そこでまず、感度的に申し分のない化学発光法に基づくルミノール法でNOを捉えようと試みたが、前章で述べたように、特異性を持たせることは非常に困難であった。さらに過酸化水素を用いるため、その応用範囲に制限があり、私の目指すNOの真の作用解明にとって必ずしも満足の測定法ではなかった。

そこで感度は劣るが、特異性、応用性に優れた蛍光法に基づくNO測定法を開発することを考えた。感度が劣るとはいえ、吸光法に比べればはるかに高感度であることが期待され、生体内で機能しているNOを捉える可能性は十分にあると判断し、実際に着手した。

蛍光法によりNOを測定する場合、その原理となるNOに特異的な反応が必要である。しかし、NO自身の反応性はそれほど高くはなく、金属錯体への配位など限られた反応しか知られていないことは前章第2節で述べた。そのうちわれわれはアミン類との反応性に着目し、詳細に検討した。

当研究室において、酸素存在下NOはアニリンと反応し、ジフェニルトリアゼンを生成することを明らかにした (Scheme 1-2-2)¹¹⁾。MiskoらはDANが酸性条件下NO₂⁻と反応し、DANとは蛍光特性の異なるナフトリアゾールを生成することを明らかにし、蛍光法に基づくNO₂⁻測定法を開発した⁴¹⁾。そこで、われわれはDANをはじめとする芳香

族隣接ジアミンが酸素存在下、中性条件でNOと反応し、トリアゾール体を生成することと明らかにし、DANを用いたNO測定法を開発した。Milesらも同様な測定法を報告している⁴²⁾。私は次項で示すように酸素の代わりにPTIOを酸素ドナーとして用いることが可能であることも明らかにし、この測定法をラット大動脈平滑筋細胞、ウシ大動脈内皮細胞に応用し、生細胞が生成するNOを実際に捉えることができるかどうかを確かめた。

(2) ラット大動脈平滑筋細胞より生成するNOの測定および反応機構の考察

Fig. 2-1-1はLPSとサイトカインで刺激し、iNOSを誘導した平滑筋細胞より生成するNOを測定したものである。DANを含む培養液の蛍光強度が培養時間と共に増加していく様子が分かる。細胞がNOを産生しない条件でNOドナーであるNONOateを培養液に加え、同様に培養して蛍光強度変化を測定し、calibrationを行ったところ、2時間で約6 μM (約2 fmol/cell/h)のNOが生成したことになる。PTIOはNOを酸素よりも速く酸化し、感度をさらに向上させるため用いたのだが、濃いほどよいというわけではなく、最適濃度（ここでは10 μM ）が存在することがわかった。NOの生成量を減らすため、細胞数を減らしてみたところ、見かけ上PTIOを入れない時の方が感度が良くなった（Fig. 2-1-2）。恐らくは0-10 μM の間に最適濃度が存在すると考えている。

そこで過剰のPTIOを加えた時に感度が悪くなる原因を検討したところ、

- 1 PTIOがラジカル種であることから蛍光をquenchするため。
- 2 PTIOがUV吸収をもち、励起光を吸収するため。
- 3 DANとの主な反応種 (N_2O_3) の生成量が減少するため。

が考えられた。1と2は確かに影響しているかもしれないが、ナフトトリアゾールの溶液にPTIOを加えていっても、この実験結果が説明できるほどには蛍光量が減少しなかった。しかし、3の反応種の生成が減少するということで説明できると考えた。つまり、DANと反応するNOの酸化体はNOとNOが酸素またはPTIOによって酸化を受けて生

成した N_2O_3 であると考えられ、PTIO を過剰に加えると NO よりも NO_2 の方が多くなりバランスが崩れて、結果として N_2O_3 の収量が減少するために感度が悪くなったと考えられる (Scheme 2-1-1)。

(3) ウシ大動脈由来血管内皮細胞より生成する NO の測定

cNOS を有する血管内皮細胞より生成する NO の測定は、その生成量の少なさのために非常に困難であり、オゾンを用いる化学発光法⁴³⁾などでは行われているが、簡便に行える方法は存在していない。DAN を用いる蛍光法が内皮細胞にも適用できれば、NOS 阻害剤の開発の際のアッセイ法に使えるなど、その有用性は大きいものとなる。Fig. 2-1-3 の A はバッファーとして PBS(+) を用いた結果で、bradykinin を加えなかったものや NOS 阻害剤を添加したものに比較して蛍光の増加量が大きく、NO の検出はできている。ただ、コントロール群も増えている理由としては、励起波長が短いため、細胞から NADH などの蛍光性物質が漏出したことなどが考えられる。このコントロールの増加量を差し引いて計算すると培養液に $0.15 \mu M$ の NO が 2 時間で細胞から産生されたことになる ($0.04 \text{ nmol}/100 \mu g \text{ protein/hr}$)。オゾン法による報告 (Fig. 2-1-3 の C) と比較してやや少なめであるが、バッファー中の Ca^{2+} 濃度の違いや細胞培養等の条件の違い、測定法の違いによるものと思われる。

Fig. 2-1-3 の B はバッファーとして KRP を用いた結果で、カルシウム濃度が PBS(+) よりも低いためか、NO の産生量は少なかった。

血管内皮細胞より細胞外に生成する NO を DAN で捉えることはできたが、より長波長励起かつ高感度な試薬の開発が望まれた。

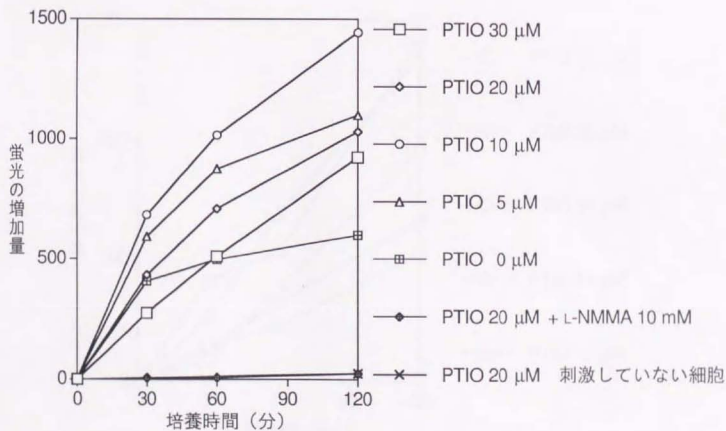
(4) 培養細胞より生成する NO のバイオイメーjing

血管平滑筋細胞、血管内皮細胞について DAN を用いたイメージングを試みた。DAN を含む培養液に細胞を浸し、その培養液を除いた後、DAN を含まない培養液に取り替えるのであるが、DAN は脂溶性が高いために細胞膜に分配し、wash out 後それが徐々に溶

出するようであった。また、UV 励起による細胞自身の自家蛍光が強く、本当に染まっていたのかも実際にはよく分からなかった。したがって、DAN が細胞に局在化しないため、蛍光顕微鏡を用いたイメージングは不可能であると結論づけた。

(5) まとめ

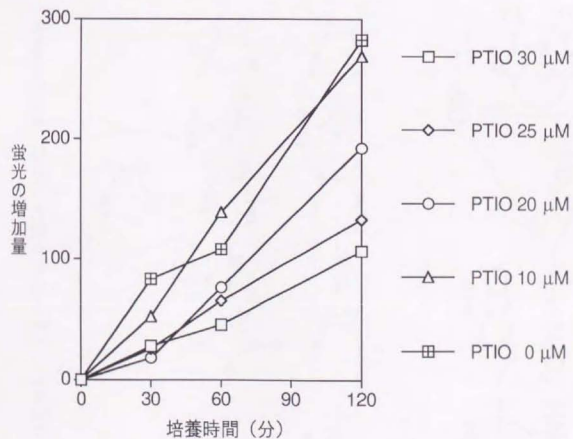
細胞が産生する NO をジアミン (DAN) を用いて捉えることが可能であることが分かった。ただし、より長波長励起かつ高感度な試薬の開発が望まれ、DAN 自身を用いたイメージングはできなかった。



検出条件

培養液 DAN 100 μM , L-Arg 1 mM, 300 $\mu\text{l/well}$ 刺激後 13 時間 細胞数 $6 \times 10^5/\text{well}$

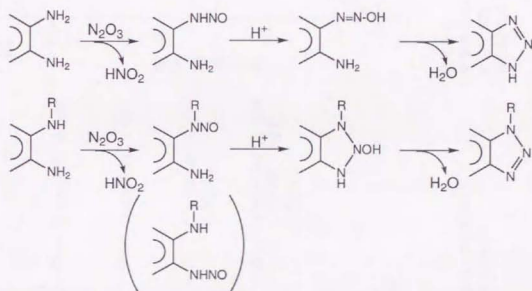
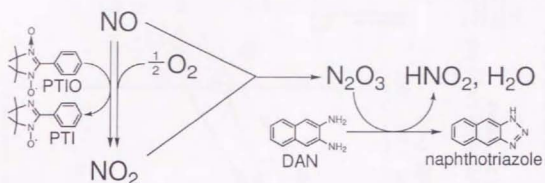
Fig. 2-1-1 ラット大動脈平滑筋細胞が産生するNOによる蛍光強度変化 (1)



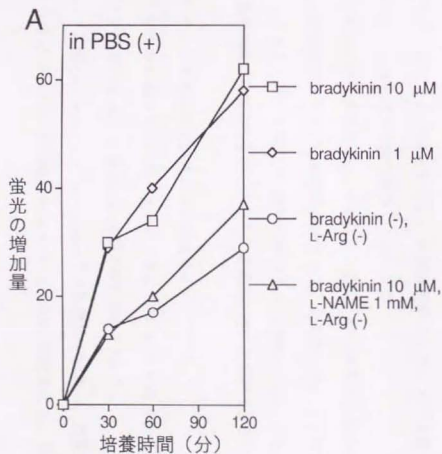
検出条件

培養液 DAN 100 μM , L-Arg 1 mM, 500 $\mu\text{l/well}$ 細胞数 9×10^4 /well

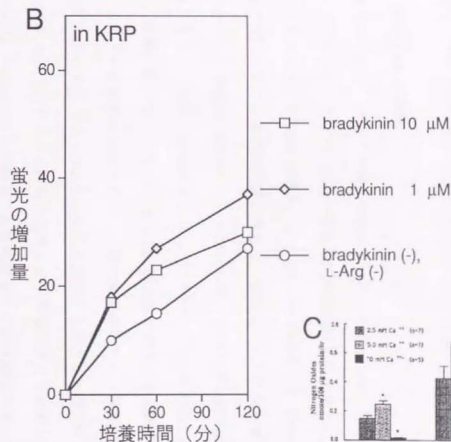
Fig. 2-1-2 ラット大動脈平滑筋細胞が産生するNOによる蛍光量変化 (2)



Scheme 2-1-1 DANに代表されるジアミンとNOの推定反応機構



検出条件
培養液 DAN 100 μM , PTIO 0 μM , L-Arg 1 mM
in PBS(+) (Ca^{2+} 0.90 mM), 300 $\mu\text{l/well}$
蛋白量 124.8 $\mu\text{g/well}$



検出条件
培養液 DAN 100 μM , PTIO 0 μM , L-Arg 1 mM
in KRP (Ca^{2+} 0.54 mM), 300 $\mu\text{l/well}$
蛋白量 124.8 $\mu\text{g/well}$

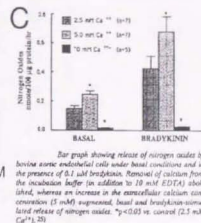


Fig. 2-1-3 ウシ大動脈内皮細胞が産生するNOによる蛍光強度変化

第2節 DAN-1 EEを用いたバイオイメーjing

(1) DAN-1 EEの開発

DANを用いたイメーjingの際に問題になったことの一つは、細胞内に色素が局在化しないことであった。そこで、波長と蛍光強度の問題はそのままとし、局在化するための官能基(エステル)をDANに導入したDAN-1 EEを合成した(Scheme 2-2-1)。これは脂溶性の高いエステル体が細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けることにより細胞外に漏れにくい水溶性の増したカルボン酸DAN-1になるようにデザインしたものである(Scheme 2-2-2)。ナフタレン環に官能基を導入することも検討したが、収率が良くないので、もともと反応性の高いアミンを修飾することを考えた。ナフトトリアゾールを見るとトリアゾール環に水素原子が1つ存在する。この水素原子1つ分だけDANになくとも、NOとの反応は進行するだろうと考えたわけである。したがって、DANの片方のアミンに修飾を施すことが可能であると判断した。ベンジルを挟んでいるのは、fluorophoreの共鳴系に蛍光強度を下げる可能性の高いカルボン酸を導入したくなかったことと(Table 2-2-1)、立体障害を作ってエステル基がアミンに近づけないようにして分子内での環化を防ぐことによる。

さて、肝心の蛍光変化はFig. 2-2-1のようにほとんど無蛍光のDAN-1にNOを作用させると、蛍光性のトリアゾール体を生成することを観測した。トリアゾール体の蛍光強度はナフトトリアゾールに比べ2割ほど弱かった(Table 2-2-2)。Fig. 2-2-2はNONOateによる蛍光強度の経時変化を示しており、定量的にNOを測定できることが確認できた。

(2) ラット大動脈由来血管平滑筋細胞のイメーjing

次に生細胞が生成するNOのイメーjingにDAN-1 EEを応用した。細胞は比較的大量のNOを生成するiNOSを誘導した血管平滑筋細胞を用いた。

底がガラス製のシャーレにラット大動脈平滑筋細胞を培養し、実験の約10-12時間前にLPSとサイトカインで細胞に刺激を行い、NOSを誘導する。培養液を10 μ Mの

DAN-1 EE を含む KRP に取り替え、37℃で1時間培養し、色素を負荷する。その後 wash out し、L-Arg や L-NMMA を含む KRP に取り替え、Ex. 330-385 nm - Em. 420 nm 以上の細胞内の蛍光強度変化を蛍光顕微鏡下で観察した。

Fig. 2-2-3 は測定開始時と測定 30 分後の蛍光強度を擬似カラーで示した図である。細胞の中央付近の蛍光が強いが、これはその部分の細胞の厚みが大きいため光路長が長いことに起因する。Fig. 2-2-4 はその経時変化を示したものである。培養液中に L-Arg が存在すると、NO が産生されて蛍光強度が増加している。NOS の競合的な阻害剤の L-NMMA が存在すると蛍光強度の増加は抑えられた。若干、減少しているのは色素の細胞外への漏出、または色素あるいは自家蛍光の退色に由来するバックグラウンドの蛍光強度の減少（後述）によると考えている。

次に、測定の途中で薬物を加えた。Fig. 2-3-5 の A は L-Arg 0.5 mM 存在下で測定し始め、途中で L-NMMA 10 mM を加えたところ、蛍光強度の増加が止まった。B は L-NMMA 1 mM 存在下で測定し始め、途中で L-Arg 10 mM を加えたところ、蛍光が増加し始めた。

(3) 問題点

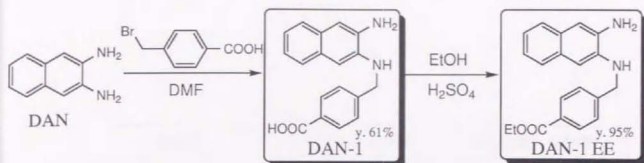
NO を蛍光画像として捉えることに初めて成功したが、より感度の高いプローブの開発が望まれた。すなわち、血管平滑筋細胞のような NO を比較的大量に生成する細胞で感度がぎりぎりであると、今後、作用解析を行いたい cNOS を有する細胞に適用することは困難である。

また、励起波長が短波長であることが問題であることも再認識され、細胞に対する傷害の可能性がある上、細胞自身のもつ NADH 等に由来する自家蛍光の影響が非常に大きかった。この自家蛍光は励起光により退色を起こすため、励起光を当て続けると全体の蛍光量は減少していくことも分かった。したがって、自家蛍光の影響が小さいとされる長波長励起のプローブの創製が望まれた。

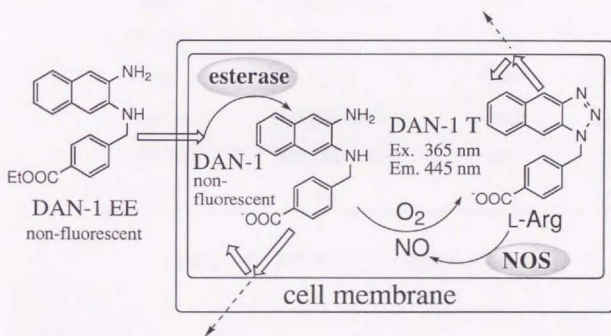
最後に、細胞に DAN-1 EE が局在化したため詳細に検討を行ってはいないが、本当に細胞内でエステルが切れて DAN-1 を生成し、それが NO と反応しているのかは不明である。エステル体のままでも、NO と反応すればトリアゾール体を生成し、蛍光を発することは観察している。しかし、DAN の場合は細胞に局在化しなかったことを考えると、誘導化の目的は達成している。

(4) まとめ

DAN-1 EE を開発することにより、血管平滑筋細胞より生成する NO のイメージングに成功した。しかし、さらに高感度で可視光励起のプロープの開発が望まれた。



Scheme 2-2-1 DAN-1, DAN-1 EEの合成経路



Scheme 2-2-2 DAN-1 EEを用いたバイオイメーキングの原理

置換基	蛍光波長への影響	蛍光強度への影響
alkyl	なし	ほとんどない
-OH, -OMe, -OEt	長波長側へ移る	増加
-COOH	長波長側へ移る	著しく減少
-NR ₂	長波長側へ移る	増加
-NO, -NO ₂	——	消失
-CN	なし	増加
-SH	長波長側へ移る	減少
-F, -Cl, -Br, -I	長波長側へ移る	減少
-SO ₃ H	なし	なし

Table 2-2-1 蛍光性に対する置換基の効果⁵⁵⁾

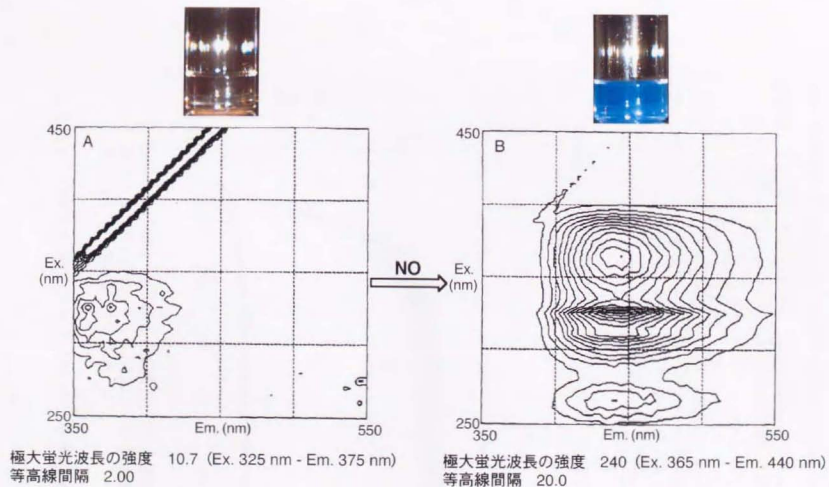


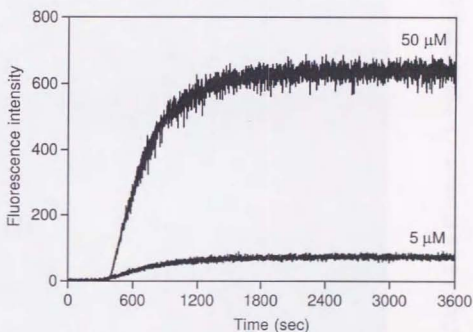
Fig. 2-2-1 NO添加によるDAN-1の蛍光スペクトル変化

リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) 中, 100 μ M DAN-1 にNOガスを数秒間通気した。

化合物	Extinction coefficients and absorption maxima		Fluorescence maxima		Relative quantum efficiencies	
	Diamine	Triazole	Diamine	Triazole	Diamine	Triazole
	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	nm	nm		
DAN	0.5 (336)	0.6 (357)	385	433	0.51	0.83
DAN-1	0.6 (340)	0.6 (360)	385	447	0.002	0.63

ナトリウムリン酸緩衝液 (20 °C, 0.1 M, pH 7.4) 中でのデータ。
量子収率はp-terphenyl/cyclohexaneを0.87として算出。

Table 2-2-2 モル吸光係数, 波長と蛍光量子収率



DAN-1 100 μM に NOC13 を上記濃度添加した際の 37 °C,
pH 7.4, 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液中での変化。
測定波長: Ex. 365 nm, Em. 440 nm

Fig. 2-2-2 NOC13添加によるDAN-1の蛍光強度の経時変化

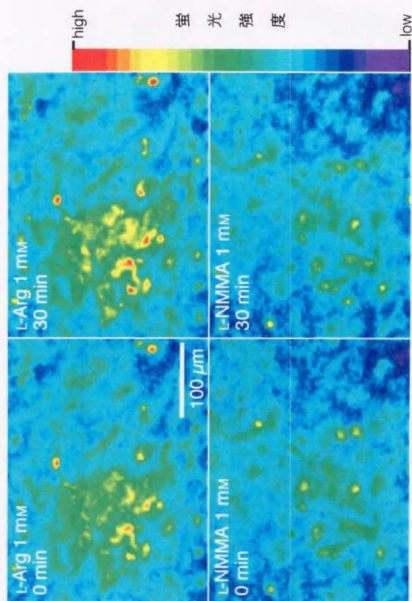


Fig. 2-2-3 DAN-1 EEを用いたラット大動脈平滑筋細胞が生成するNOのイメージング

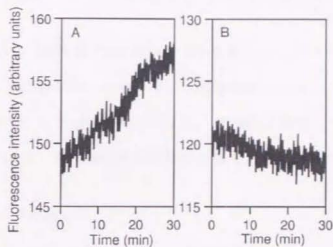


Fig. 2-2-4 DAN-1 EEを負荷したラット大動脈平滑筋細胞の蛍光強度変化

A: 1 mM L-Arg存在下, B: 1 mM L-NMMA存在下での経時変化
L-Arg, L-NMMAは測定開始10 min前に添加した。
データはFig. 2-2-3 に対応しており、
細胞を含む任意の領域の蛍光強度を平均して示している。

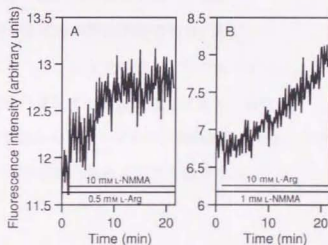


Fig. 2-2-5 培地の組成を替えることによるDAN-1 EEを負荷したラット大動脈平滑筋細胞の応答

測定開始時の培養液は測定開始10 min前に添加した。
データは細胞を含む任意の領域の蛍光強度を平均して示している。

第3節 DANより優れたジアミンを有する蛍光色素の創製

第1節で述べたように、DANはiNOS由来のNOを捉えることができたのだが、cNOS由来のNOを捉えることは感度的に余裕がないため実用的ではない。われわれが知りたいのは神経細胞由来のNOなどcNOS由来であり、生理的に機能しているNOを測定するバイオイメージングには、より高感度な試薬が必要であると考えた。

(1) NO 蛍光プローブの要件

市販されているジアミンのうち、Fig. 2-3-1 に代表される有用である可能性があるものについて検討したが、NOとは反応するものの、いずれも感度、酸化に対する安定性の点でDANの方が優れていたため、新規に合成しなければならなかった。

NOのイメージングに用いる蛍光プローブに求められる条件としては、

- 1 加熱、加圧なしに中性の水中で単に混ぜるだけで反応すること。
- 2 その反応がNO特異的に高収率で進行すること。
- 3 プローブ自身や生成物が共に安定であること。
- 4 反応後にダイナミックな蛍光特性の変化を起こすこと。
すなわち、波長が変化するか蛍光強度が増加すること。
- 5 細胞自身の自家蛍光やフォトダメージを軽減するため、可視光励起であること。
- 6 細胞にプローブを局在させることが可能なこと。

が挙げられる。

まず、私は蛍光性のナフタレン骨格やベンゾフラン骨格を有するジアミノ化合物をデザインし、合成した。合成に成功したものをFig. 2-3-2に示した。なお、デザインの際に参考にした経験的に知られている蛍光性に対する置換基の影響をTable 2-2-1に示した。

(2) ナフタレン骨格を有する化合物の検討

1,2-Diaminonaphthalene Bamberger らの報告している方法 (1-Phenylazo-2-naphthylamine の亜鉛による還元。) ⁴⁴⁾ により合成。酸化されやすく不安定で、測定には使えない。ナフタレン環の α 位にアミノ基が付くと一般に β 位のものよりも酸化されやすいように思えた。

化合物 3 DAN にスルホンアミドを導入した。ジアミン Ex. 350 nm - Em. 450 nm, トリアゾール Ex. 370 nm - Em. 445 nm。ほとんど変化しなかった。励起波長が短波長で、蛍光強度も DAN を著しく越える程には強くなかった。

(3) ベンゾフラン骨格を有する化合物の検討

化合物 11 NO との反応前後とも無蛍光。Br から誘導化しようと合成したが、後述の 15, 24 の結果より断念。

化合物 15 (6OMeBF) ジアミン Ex. 330 nm - Em. 434 nm (モル吸光係数: 2.5×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$, 相対量子収率: 0.091), トリアゾール Ex. 330 nm - Em. 442 nm。蛍光強度は弱く、ほとんど変化しない。

化合物 20 (7OMeBF) ジアミン Ex. 335 nm - Em. 440 nm (モル吸光係数: 2.4×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$, 相対量子収率: 0.22), NO bubble 後 Ex. 320 nm - Em. 390 nm。NO と反応することで蛍光強度が減少。NO と反応することで蛍光が減少しても、その減少量をモニタすることで NO 測定できるが、蛍光の増加を利用することよりも特異性が低くなるため望ましくなかった。つまり、イメージングを行う際、蛍光が減少することは化合物の分解、漏出、その他の要因によって起こりうるが、それに比べれば蛍光強度が増加することは普通はありえない。

化合物 24 (NMe₂BF) ジアミン Ex. 335 nm - Em. 438 nm (モル吸光係数: 3.1×10^4 $M^{-1}cm^{-1}$, 相対量子収率: 0.66), NO bubble 後 Ex. 330 nm - Em. 464 nm。

NO と反応することで蛍光強度が極度に減少。

化合物 28 ベンゾフラン環にジアミンを導入した。ジアミン 無蛍光, NO bubble 後
Ex. 365 nm - Em. 445 nm。蛍光強度が DAN の場合に匹敵しない。シアノ基
は加水分解し、カルボン酸に誘導化するために導入しているが、カルボン
酸は一般に蛍光強度を下げる方向に作用する。したがって、シアノ基の時
点で DAN よりも弱い蛍光強度であることを考慮するとこの化合物の誘導体
は期待薄であり、これ以上は進めないことにした。

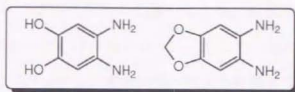


Fig. 2-3-1 検討を行った市販のジアミノ化合物の例

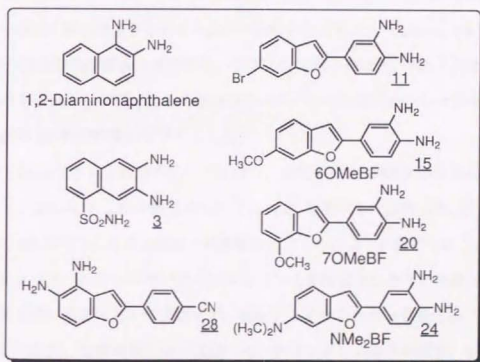


Fig. 2-3-2 合成し検討を行ったジアミノ化合物

第4節 ジアミノフルオレセイン (DAF) 類の開発

DAN-1 EE を NO イメージングプローブとして開発したが、感度や励起波長などの問題点のため満足のいく蛍光プローブとはならなかった。そこで、得られた情報を新しい蛍光プローブの設計にフィードバックし、前節で述べたように様々な化合物を合成しつつ、検討した結果、フルオレセイン骨格にジアミンを導入するに至った。

(1) DAF のデザインと合成

可視光励起、高い量子収率で知られているフルオレセインは、それ自身及びその誘導体がさまざまな用途の試薬に応用されている。Ca²⁺プローブ fluo-3 の蛍光 on/off ³⁹⁾ や弱い蛍光強度のアミノフルオレセインのアミノ基がアセチル化されることにより強い蛍光が発せられること ⁴⁵⁾ から、私はベンゼン環の置換基からキサンテン環への電子供与があるフルオレセイン類は一般に低量子収率であるのではないかと考えた (Scheme 2-4-1)。DAN や前節で述べた化合物の詳細な検討から、ジアミンは電子供与的、NO と反応後のトリアゾール環は電子供与性が弱くなることが分かった。その仕組みをフルオレセイン骨格に応用し、新規 NO 測定試薬をデザインした。

Scheme 2-4-2, Scheme 2-4-3 は上記デザインに従い、合成された DAF-1 から DAF-6 を示したものである。DAF-4, 5, 6 は水酸基のオルト位に Cl を導入し、水酸基の pK_a を下げ、中性付近での pH 変化による蛍光強度への影響が小さくなるように設計した。

ニトロ基の還元はラネーニッケルやパラジウムを用いる接触還元法あるいは酸と鉄やスズといった金属を用いる還元法では成功せず、硫化ナトリウムを用いる還元法 ⁴⁶⁾ で高収率を得ることができた。前者の還元法では恐らく、キサンテンの還元が起き、Scheme 1-3-3 のような還元型フルオレセインが生成するものと考えている。アルカリ状態にすることでフェノール性 OH 基のデプロトンネーションが起き、キサンテンの電子密度が上がって還元されにくい状態になるものと思われる。

(2) DAF の性質

Fig. 2-4-1 は DAF-2 の NO 添加による励起スペクトルと蛍光スペクトル変化を示したものである。DAF 溶液に NO ガスを通気させると瞬時に写真のような蛍光物質を生成した。スペクトルより NO 添加により励起・蛍光波長が変化するのはなく、ほぼ同じ波長で蛍光が増加していることが分かる。この蛍光の増加がトリアゾール体由来であることは $^1\text{H-NMR}$, MS により確認した。

DAF がトリアゾール体に変化することで蛍光を発する原理に関しては、Photo-induced electron transfer⁴⁷⁾ によると考えている (Fig. 2-4-2)。フルオレセインを反応部位であるベンゼン環側とフルオロフォアであるキサンテン側とに分けて考えると説明できる。光によって励起された電子が基底状態に戻るときに発せられるのが蛍光であるが、反応前のジアミノ体の場合、ジアミンの付いたベンゼン環の HOMO レベルがキサンテン側の HOMO レベルより高いため、光エネルギーにより電子が励起されたときに、空いた電子の軌道に矢印のように電子が流れ込んでしまい、蛍光を発することができない。一方、トリアゾール体になると HOMO レベルが下がり、この現象が起きないため、蛍光を発すると考えられる。

Fig. 2-4-3 は NONOate より生成した NO による DAF-2 の蛍光強度の経時変化である。NONOate の添加量や半減期に相関を示し、NO の量に依存して蛍光強度が変化することが分かる。

次に、DAF-1~DAF-6 の相互比較を行った。

Fig. 2-4-4 はそれぞれの DAF 10 μM を用いて NO に対する検量線を引き、比較している。どの DAF も NO と反応し蛍光強度を増加させるが、DAF-2 と DAF-4 がその中でもやや高感度であるようだ。(検出限界: 5 nM)

Fig. 2-4-5 は Cl の有無の違いがある DAF-2 と DAF-5 のトリアゾール体 (DAF-2 T, DAF-5 T) の pH 変化による蛍光強度への影響を示している。DAF-2 T は pH 7 より小さくなると極端に蛍光強度が減少するのに対し、DAF-5 T は pH 6 より小さくならないと極

端に減少することはない。デザイン通り、DAF-5 T の水酸基の pK_a が DAF-2 T のものよりも小さくなっていることでこのような違いが生じたものと考えている。

Table 2-4-1 は DAF のスペクトル特性を表にまとめたものである。トリアゾール体になることで、蛍光量子収率が劇的に上昇することが分かる。また、Cl の導入されている DAF-4, 5, 6 の励起・蛍光波長が DAF-1, 2, 3 のものよりも約 10 nm ずつ長波長側にシフトしている。

Table 2-2-2 を改めて見ると、DAN のトリアゾール体の量子収率もかなり高い。今回開発した DAF はそのモル吸光係数の大きい分だけ強い蛍光強度になっているものと思われる。

Fig. 2-4-6 はトリアゾール体の検量線による DAN と DAF の比較である。蛍光強度は DAF のトリアゾール体の方が約 24 倍大きいことが分かる。したがって、夾雑物質の存在しない系においては、DAF を用いた NO 測定法が最大 24 倍 DAN よりも高感度になるはずである。しかし実際には、DAF の励起波長と蛍光波長が近いため、5 μ M 以上の濃度の DAF を用いると蛍光のクエンチングの影響がある。そのため、DAN と同じ 100 μ M で用いることはできず、約 5 倍の高感度化であった。HPLC を用いる検出の場合にはより高感度な測定が可能であると思われる。Fig. 2-4-7 は NOC13 1 μ M に対する最適濃度を調べたものであるが、10 μ M 程度の DAF を用いるのが適当であることが分かる。私の目的は生細胞に直接 DAF を適用することであるので、細胞毒性等の観点から、その際にはできるだけ低濃度で用いる方が望ましい。したがって、そういった意味からは好ましい結果である。

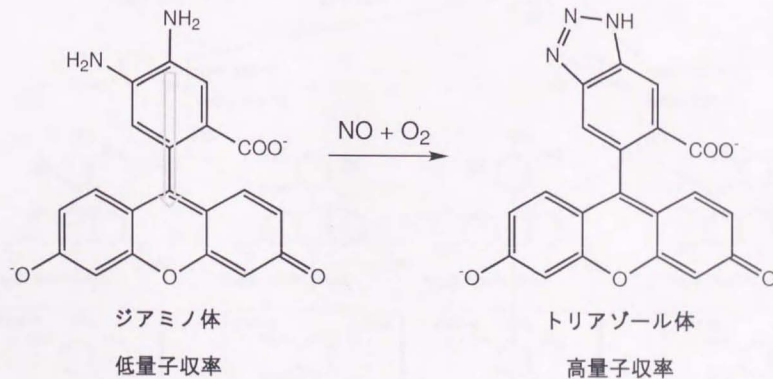
DAF-2 10 μ M を用いる際の NO を捕らえる効率、つまり NO に対するトリアゾール体の収率であるが、Fig. 2-4-4 の DAF-2 の傾きは Fig. 2-4-6 の DAF-2 T の傾きから約 18% であると判断できる。反応機構 (Scheme 2-1-1) から NO 2 分子で 1 分子のトリアゾール体を生成すると考えられるので、残りの約 64% の NO は気相中へ逃げたり、酸化後、水と反応して NO_2^- に変化しているものと考えられる。NO 捕捉効率が 100% に近いこと

は DAF が NO ラジカル自身とは反応せず、 NO^+ (N_2O_3) と反応することによる。Scheme 1-2-1 で示したように NO が O_2 と反応して NO_2 を生成し、それが NO と反応することで N_2O_3 を生成する。 N_2O_3 とアミンの反応はモルホリンのニトロソ化の速度定数 $6.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (48) から考えて、律速にはなっていないと思われる。おそらくは NO と O_2 との反応が律速反応であろう。この NO 自身を捉えない測定法は二つの意味をもつ。一つは NO の酸化がやや遅いため、感度が高くないという悪い面。もう一つは情報伝達分子である NO を捕捉しないため、情報伝達の阻害は起こさない良い面である。実際、 Ca^{2+} プローブが buffering 作用を示し、問題となるケースも知られている。

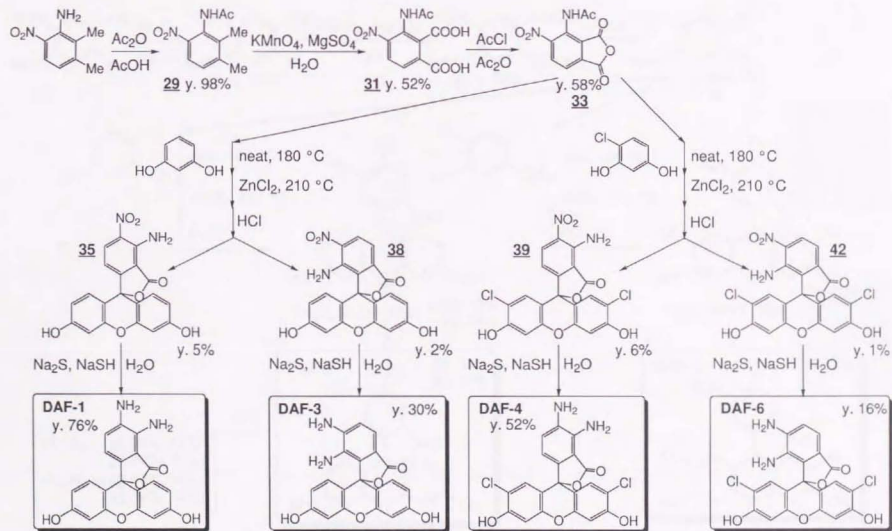
DAF の NO に対する特異性に関しては高く、生理的条件下においては NO の安定酸化体である NO_2^- や NO_3^- とは反応せず、他の活性酸素種の $\text{O}_2^{\cdot -}$ や過酸化水素による蛍光性物質の生成は見られなかった。

(3) まとめ

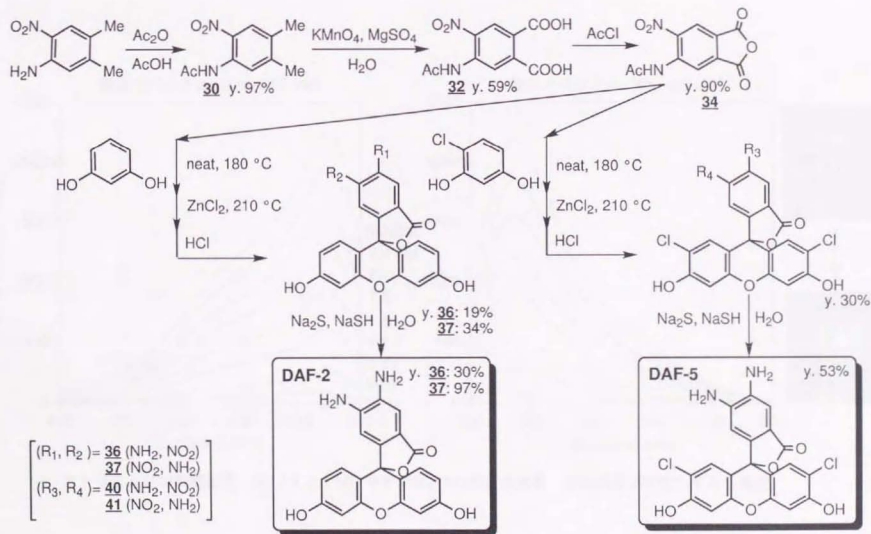
NO を可視光励起で高感度・特異的に測定できる蛍光プローブ DAF 類の開発に成功した。



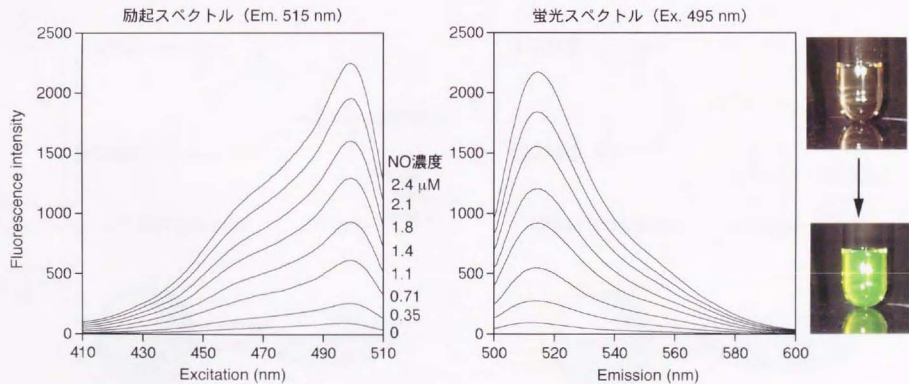
Scheme. 2-4-1 フルオレセイン誘導体の蛍光性を決定すると考えた因子



Scheme 2-4-2 DAFの合成経路 (1)



Scheme 2-4-3 DAFの合成経路 (2)



ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) 中で測定。NO溶液添加後、蛍光強度が安定してから測定。

Fig. 2-4-1 DAF-2にNOを添加したときの励起・蛍光スペクトル変化

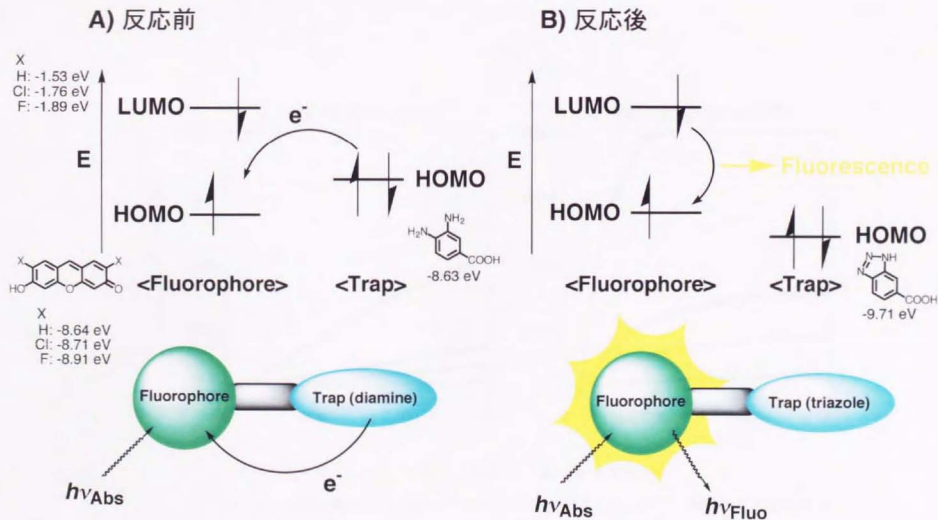
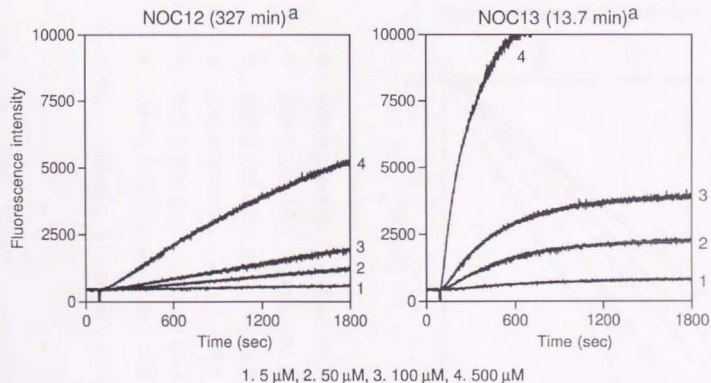
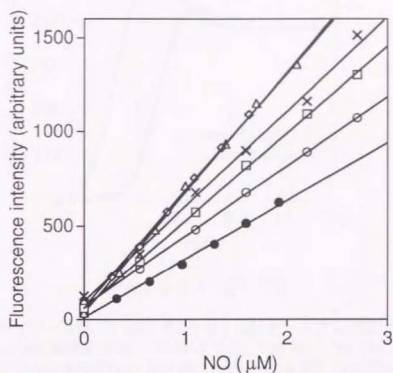


Fig. 2-4-2 Photo-induced Electron Transfer (PET)による蛍光の消光
 エネルギー計算はPM3による



DAF-2 10 μ MにNONOateを添加した際の37 $^{\circ}$ C, pH 7.4, 0.1 Mリン酸緩衝液中での変化。
測定波長: Ex. 495nm, Em. 515nm ^a 22 $^{\circ}$ C, pH 7.4, 0.1 Mリン酸緩衝液中での半減期。 ⁷⁾

Fig. 2-4-3 NONOateから生成するNO量に依存したDAF-2の蛍光強度変化



Ex. Em.

□ DAF-1 (495-515) $y = 465x + 60.7$

◇ DAF-2 (495-515) $y = 624x + 66.9$

○ DAF-3 (495-520) $y = 371x + 74.6$

△ DAF-4 (515-530) $y = 641x + 38.5$

× DAF-5 (505-520) $y = 506x + 99.3$

● DAF-6 (510-530) $y = 310x + 12.0$

ナトリウムリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) 中で測定。

Fig. 2-4-4 DAF (10 μM) によるNOの検量線

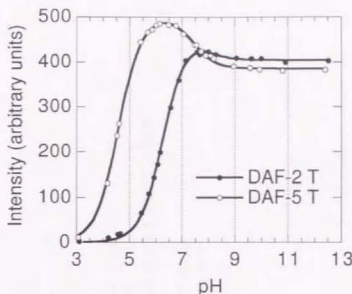


Fig. 2-4-5 pH 特性

トリアゾール体 (1 μ M) を 0.1 M リン酸ナトリウム溶液に溶かし、pH と蛍光強度を測定。(DAF-2 T: Ex. 495 nm - Em. 515 nm, DAF-5 T: Ex. 505 nm - Em. 520 nm) 次式でそれぞれ fitting。

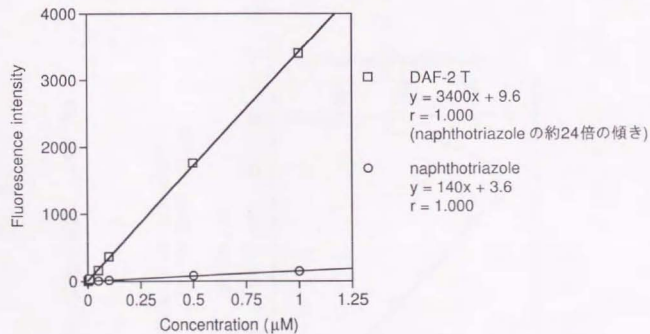
DAF-2 T, Intensity = $460 / (1 + 10^{6.27 - \text{pH}}) - 55.6 / (1 + 10^{7.94 - \text{pH}})$, $R = 0.9997$;

DAF-5 T, Intensity = $505 / (1 + 10^{4.59 - \text{pH}}) - 119 / (1 + 10^{7.41 - \text{pH}})$, $R = 0.9996$.

DAF	Extinction coefficients and absorption maxima		Fluorescence maximum of triazole form	Relative quantum efficiencies	
	Diamine	Triazole		Diamine	Triazole
	$\times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	$\times 10^4$ $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	nm		
1	8.1 (489)	5.6 (493)	521	0.004	0.78
2	7.9 (486)	7.3 (491)	513	0.005	0.92
3	8.1 (493)	6.6 (493)	521	0.005	0.85
4	9.7 (501)	9.2 (505)	530	0.002	0.75
5	9.8 (499)	7.9 (503)	523	0.007	0.70
6	11 (505)	4.3 (506)	528	0.003	0.53

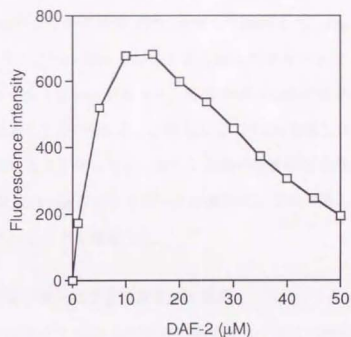
ナトリウムリン酸緩衝液 (20 $^{\circ}\text{C}$, 0.1 M, pH 7.4) 中でのデータ。
量子収率は 0.1 M NaOH 水溶液中での fluorescein を 0.85 として算出。

Table 2-4-1 モル吸光係数、波長と蛍光量子収率



合成したそれぞれの標品をpH 7.4, 0.1 Mリン酸緩衝液に溶解して測定。
 測定波長：Ex. 495 nm, Em. 515 nm (DAF-2 T)
 Ex. 375 nm, Em. 425 nm (naphthotriazole)

Fig. 2-4-6 DAF-2とDANのトリアゾール体の蛍光強度の比較



NOC13 1 μM添加し, 37 °C, 1 時間
incubation 後のDAF-2の蛍光強度

Fig. 2-4-7 濃度の蛍光への影響

第5節 DAFを用いた細胞外NO測定

DAFがNO測定に優れていることが明らかになったため、生物由来のNO測定系を開発することにした。

(1) HPLCによるトリアゾール体生成の確認

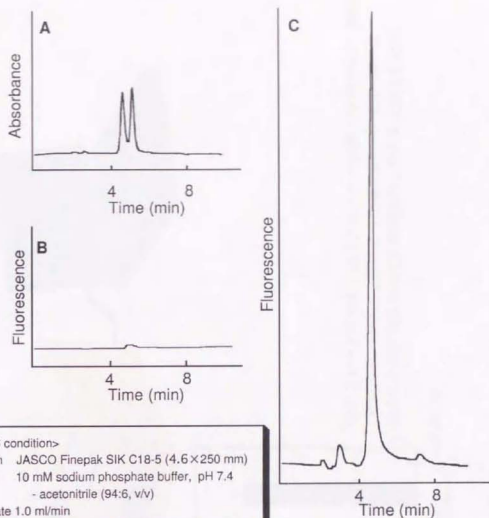
まず、NO産生細胞の培養液にDAFを加えることで、キュベット内での反応と同様にトリアゾール体が生成するかどうかを逆相HPLCを用いて確認した。Fig. 2-5-1のAはHPLCによりDAF-2とトリアゾール体のDAF-2 Tを分離したチャートで、保持時間はDAF-2は4.81 min, DAF-2 Tは4.23 minであった。BはDAF-2のみの蛍光検出チャートであり、ほとんど無蛍光であることが分かる。CはDAF-2をNOS誘導したマクロファージ様細胞(RAW264.7細胞)とインキュベーションした後の培養液をHPLC分離・蛍光検出したもので、保持時間4.23 minに大きなピークが現れた。この結果よりトリアゾール体が間違いなく生成していることを確認した。

(2) マイクロプレートリーダーによる迅速なNO測定

前項のトリアゾール体の確認からDAFを培養液に混ぜておくだけで細胞外に生成したNOを捉えることができることが明らかになった。したがって、シャーレに培養した細胞の培養液をキュベットに移して、蛍光光度計でNO測定することはもちろん可能である。しかし、細胞外NO測定の実際の利用法としては、濃度を変化させたり、複数の試薬を試験するような大量アッセイが考えられる。そこで私は蛍光マイクロプレートリーダーを用いる迅速なNO測定法の開発を行った。

LPSとIFN- γ でRAW264.7細胞にNOSを誘導した後、培養液にDAFを10 μ M加えて、2時間さらに培養し、その培養液の蛍光強度を測定した(Fig. 2-5-2)。NOS阻害剤の濃度を変化させることで、その阻害剤の阻害曲線が描けることから、この方法はNOS阻害剤及び賦活化剤候補化合物のアッセイに有効な方法である。

また、第1節(3)で述べたように血管内皮細胞から生成するNO測定にはDANでは感度・波長の点から不満があった。そこで新規に開発したDAFを適用することにした。Fig. 2-5-3はFig. 2-5-2と同様、マイクロプレートリーダーを用い、ウシ大動脈内皮細胞から生成するNOを測定した結果である。用量依存的にトリアゾール生成が抑制されている。データは示していないが、D-NAME 1000 μ Mでは抑制しなかった。生成したトリアゾール体から換算して、96穴プレートの1穴当たりのconfluentに生えた細胞(1.17 mg total protein/well)から2時間で60 pmol(濃度: 300 nM)のNOがブラジキニン刺激により生成していた。



<HPLC conditions>
 Column JASCO Finepak SIK C18-5 (4.6×250 mm)
 Eluent 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4
 - acetonitrile (94:6, v/v)
 Flow rate 1.0 ml/min
 A: Absorbance 495 nm / B,C: Ex.-Em. 495 nm-515 nm
 Injection volume 10 μ l

Fig. 2-5-1 HPLCによるトリアゾール体生成の確認

A: DAF-2 (1 μ M) + DAF-2 T (1 μ M)

B: DAF-2 (1 μ M)

C: DAF-2 を刺激したRAW 264.7細胞と2 hインキュベーション後の上清



96穴プレートに培養したマクロファージ様 (RAW264.7) 細胞に LPS と IFN- γ で iNOS を誘導させた後、DAF-2 (10 μ M) を溶かした KRP 液を加えて 2 時間後の上清の蛍光強度を測定。

Fig. 2-5-2 マイクロプレートリーダーを用いた NO 測定への応用

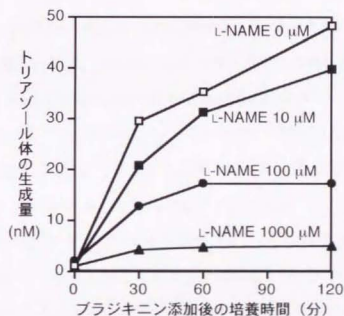
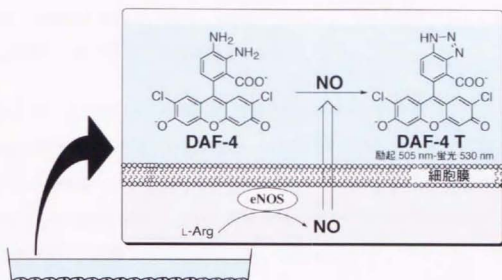


Fig. 2-5-3 ウシ大動脈内皮細胞から生成するNO測定

第6節 DAF誘導体を用いたバイオイメーキング法の開発

DAFを培養細胞や組織切片等に応用し、本来の目的であるNOのバイオイメーキングを試みた。そこで細胞に局在化のため、6種類のDAFのうち最も感度がよく、pH7以上で安定なpH特性を有するDAF-2を誘導化することにした。

(1) NOイメーキングプローブ (DAF-2誘導体) のデザインと合成

1 Rotmanらがフルオレセインのジアセチル体が細胞の中のエステラーゼにより加水分解を受けることを報告していることを参考にした⁴⁹⁾。細胞膜を透過し、細胞内のエステラーゼにより加水分解を受けて、もとの水溶性の高いプローブに戻るものとしてDAF-2 DAをデザイン、合成した (Scheme 2-6-1, Scheme 2-6-2)。アミンがアセチル化を受けないよう、フェノール性OH基がデプロトネートした状態で無水酢酸を作用させて合成した。ラット脳のホモジネートを用いてその加水分解速度を検討したところ、約10-15分でほとんどのDA体が加水分解されることが分かった (Fig. 2-6-1)。

2 細胞膜に脂肪鎖が挿入されて、フルオレセイン部分は細胞の外にあり、細胞外に出てきたNOを捕らえるものとして、DAF-2 C18, DAF-2 C15をデザイン、合成した (Scheme 2-6-1, Scheme 2-6-2)。というのも、ジアミンはNOの酸化体と反応するため、酸素濃度の高いであろう細胞外で反応させた方が効率よく、また夾雑物も細胞内より少ないため望ましいと推測し、デザインしたものである。DAF-2 C18はアミン部分にアルキル鎖を導入したものである。アミンにアルキル鎖が付くとそのアルキルが付いたN原子の方がもう一方の一級アミンのN原子よりも電子密度が高くなり、NO⁺を捕らえる反応であるN-ニトロソ化がアルキルの付いたアミンに優先的に起こり、二級アミンであるためにそこで反応が止まってしまうことを懸念した。そこでこれまでのプローブと同じく一級アミンが先に反応するように、DAN-1がNO測定に成功していることを踏まえ、ベンジルを導入したDAF-2 C15をデザインした。

(2) DAF-2 DA を用いた血管平滑筋細胞の生成する NO のイメージング

DAF-2 DA は非蛍光性であるため、エステルが加水分解されない限り蛍光を発しない (Scheme 2-6-2)。これを用いてラット大動脈平滑筋細胞より生成する NO のイメージングをした。方法は DAN-1 EE と同様であるが、観測する励起・蛍光波長を替えた (Ex. 490 nm, Em. 515 nm 以上)。DAF-2 DA を負荷後細胞を蛍光顕微鏡下で観察すると明らかに蛍光強度が負荷していない細胞よりも強く、エステルが加水分解されていることが確認できた。

細胞の蛍光強度の経時変化を測定したところ、Fig. 2-6-2 のように刻々と生成する NO の様子を画像化することができた。DAN-1 EE の Fig. 2-2-3 のデータと比べ、その蛍光強度の増加がはっきりと観察できている。Fig. 2-6-3 の a は刺激により NOS を誘導した細胞の培養液に 1 mM の L-Arg を含むときの蛍光強度の経時変化、b は 1 mM の L-Arg に 10 mM の L-NMMA を添加したときのもの、c は無刺激の細胞の培養液に 1 mM の L-Arg を加えたときのものである。a では蛍光が増加、b では最初は阻害剤が効いていない細胞もあるが徐々に増加が止まる、c では全く蛍光が増加しないという結果になり、NO をイメージングできることが明らかとなった。また、データは示していないが、培養液に NONOate を加えると急激に蛍光強度が増加することも観察している。

この色素をイメージングに用いた際の生成する NO の正確な定量に関しては困難である。もちろん、細胞外から既知濃度の NO または NO ドナーを与えたときの蛍光強度変化から推定したり、細胞外に放出された NO を第 5 節で述べた方法を含む他の方法で定量することにより検量線を作成することも可能ではある。しかし、光学系や測定条件を一定にする制約が発生する上、細胞には長波長励起であることから測定への影響が少ないとはいえ、自家蛍光が存在しないわけではなく、細胞の厚みや反応場である細胞内環境などサンプルの個体差も無視できない。したがって、安易に定量を試みることは誤った数値を算出する危険性があり、数字だけが一人歩きして結果的にでたための考察をする可能性が大きい。そこで私は敢えて正確な定量は困難で、order の見積もり程度の半定

量に留めることが賢明であるとの判断を下した。実際、 Ca^{2+} 感受性蛍光色素の場合でも、細胞外における解離定数のデータを細胞内でも同じと仮定して細胞内濃度を算出しているため、正確な定量は行えないと認識した上で多くの専門家が利用している。バイオイメージングは時空間的な物質の拡がりや物質量の相対的な変化を調べる有効な手段であると言える。

次のような考察もできる。DAF-2 が捕らえるのは NO 自身ではなく、酸化した NO^+ 等価体であり、トリアゾール体が生成しているということは、生成した NO が細胞内で酸化を受けていることになる。 NO^+ は反応性が高いため、細胞はそれに対する防御機構を必要とすると思われる。正常な *in vivo* においては、恐らく glutathione や dithiothreitol などのチオール分子や水分子が NO^+ を消去しているのであろう。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡による DAF-2 C18, DAF-2 C15 を負荷した血管平滑筋細胞の観察

DAF-2 C18 は緩衝液中 NO と反応して蛍光を発するのに対し、DAF-2 C15 は脂溶性が高いためか、ほとんど水に溶解しなかった。実際に細胞にこれらを負荷して、光軸方向にも分解能がある共焦点レーザー顕微鏡でデザイン通り細胞膜に脂肪鎖が挿入された状態になっているかどうかを観察した。比較のため、DAF-2 DA も観察した。

DAF-2 DA 核内にも染まっていて、細胞全体が非常によく染まっていることが分かった

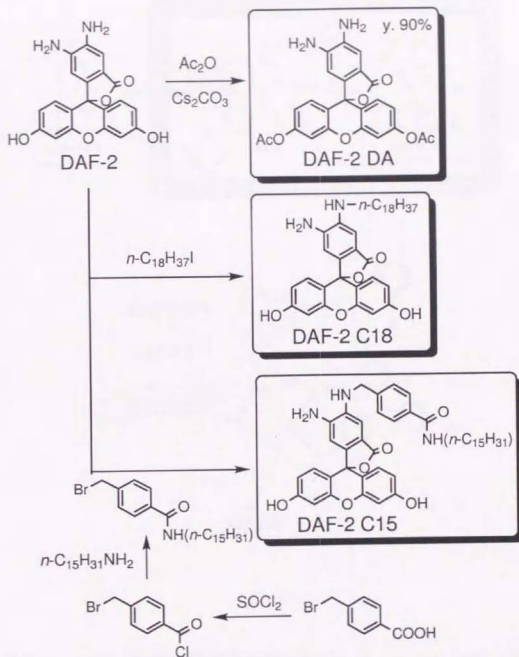
(Fig. 2-6-4, Fig. 2-6-5)。NONOate を培養液に加えると細胞全体が光った。

この際、問題点として分かったことは、レーザー光のような強い励起光を当てすぎると退色の影響が出ることである。フルオレセインは退色しやすいことで知られており、不必要に励起光を当てることは避けなければならない。

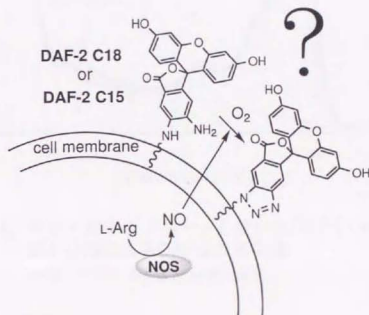
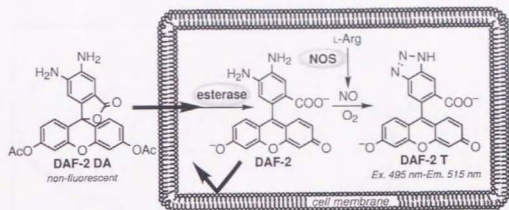
DAF-2 C18 核内に蛍光がない画像が得られたが、期待したように細胞膜部分だけが染まっているわけではなく、細胞質も染まっていることが分かった (Fig.

2-6-6)。このプローブは細胞膜を透過し、細胞内にたくさんある膜組織に分配されているのであろう。NONOate を外から加えると核以外の細胞質が光った。DAF-2 C18 は DAF-2 DA と比較すると負荷のされ方が良くはないため、実用的ではなかった。しかし、修飾方法の違いで色素の負荷のされ方が変わることは興味深く、改良によっては DAF-2 DA とは異なったタイプのプローブが完成する可能性がある。

DAF-2 C15 溶解性が悪いためか、負荷できていなかった。NONOate を外から加えても光らなかった。



Scheme 2-6-1 DAF-2誘導体の合成経路



Scheme 2-6-2 DAF-2誘導体を用いたバイオイメーキングの原理

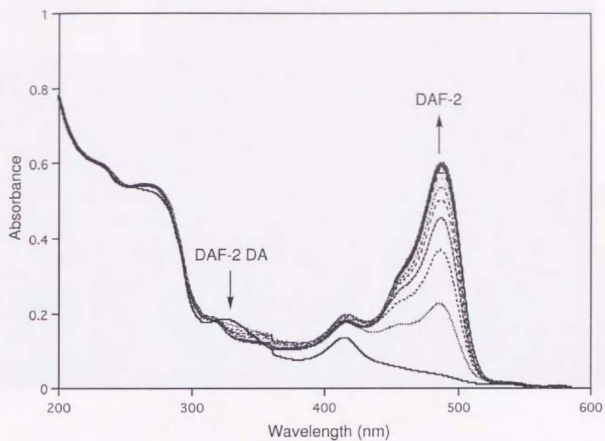


Fig. 2-6-1 ラット脳ホモジネートを用いたDAF-2 DAの加水分解によるDAF-2の再生成
吸収スペクトルを3分おきに測定。

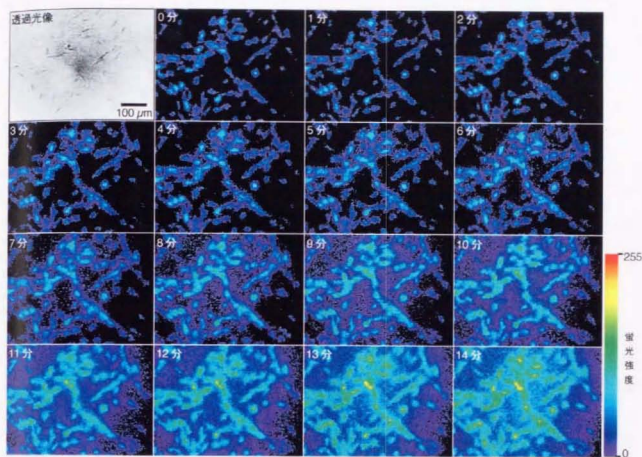
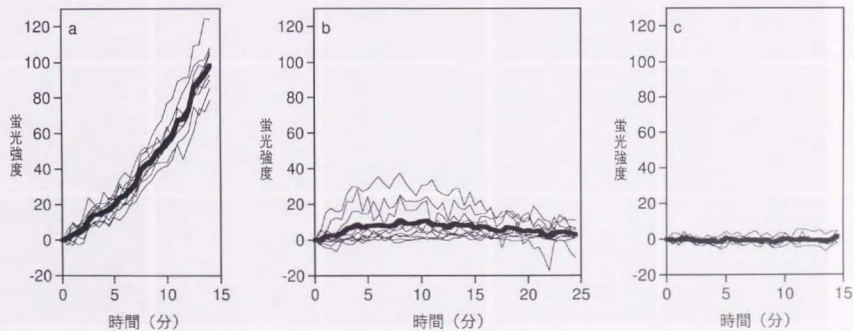


Fig. 2-6-2 ラット大動脈平滑筋細胞が刻々と生成するNOの
DAF-2 DAによるイメージング
蛍光強度を擬似カラーで示している。



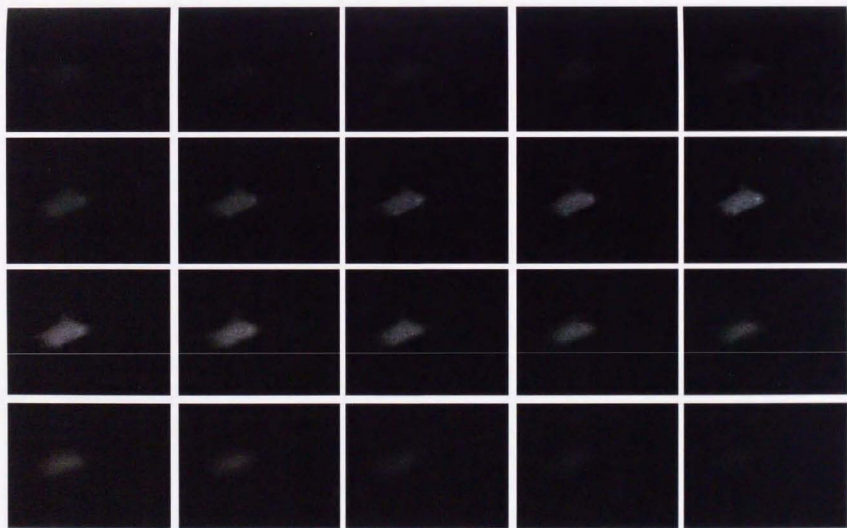
a: 刺激した細胞の1 mM L-Argを含む培養液中での変化 (Fig. 2-6-2 に対応するデータ)

b: 刺激した細胞の10 mM L-NMMAと1 mM L-Argを含む培養液中での変化

c: 無刺激の細胞の1 mM L-Argを含む培養液中での変化

細線は個々の細胞の蛍光強度を示し、
太線はその平均値を示す。

Fig. 2-6-3 各条件下における個々の血管平滑筋細胞の蛍光強度変化



左上図より順番に光軸方向 $2\mu\text{m}$ 毎にスキャンした細胞の画像を配置している。(対物レンズ倍率 40 倍)

Fig. 2-6-4 DAF-2 DAを負荷したラット大動脈由来血管平滑筋細胞の共焦点レーザー顕微鏡像

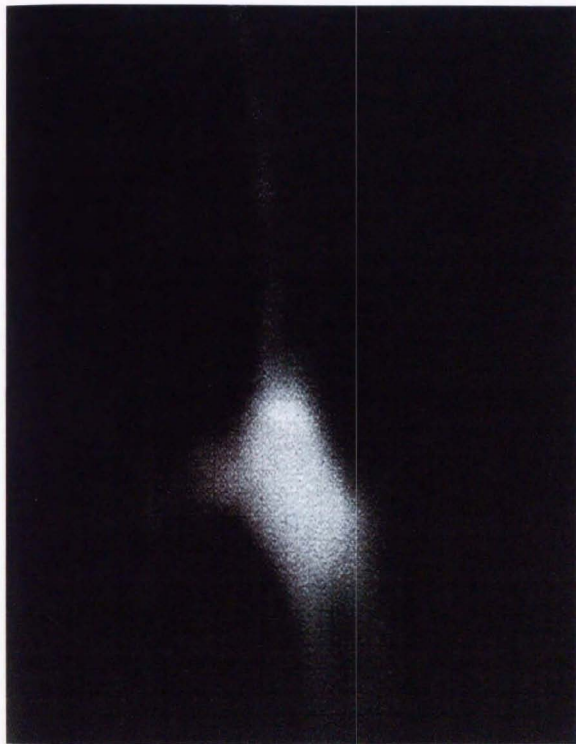


Fig. 2-6-5 DAF-2 DAを負荷したラット大動脈血管平滑筋細胞の共焦点レーザー顕微鏡像

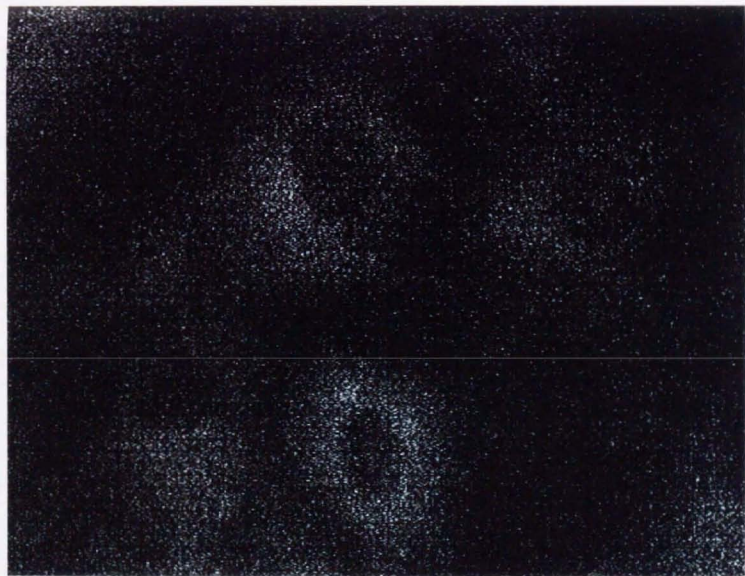


Fig. 2-6-6 DAF-2 C18を負荷したラット大動脈由来血管平滑筋細胞の共焦点レーザー顕微鏡像

第7節 DAF-2 DA を用いたラット脳における NO イメージング

脳内における NO の作用に関しては全く混沌としている。LTP や LTD 現象に関与すると提唱はされているが、確かな証拠もなく、否定するデータさえ存在する。神経細胞内に存在する eNOS は細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇する刺激に対応して NO を生成することは知られているが、それがどのような機能をするのかは分かっていない。Fig. 2-7-1 のようにシナプスの Pre 側からの情報伝達物質により Post 側の Ca^{2+} 濃度が上昇して生成した NO が Pre 側にフィードバックする逆行性伝達物質として機能することも提唱されて話題となったが、現在は下火である。

そこで私は脳試料を用いたイメージングを行うことにより、新しい知見を得ることを期待し、ラット脳に DAF-2 DA を適用した。

(1) 生きているラットの脳表における NO イメージング

Fig. 2-7-2 は頭蓋骨を一部除去し、硬膜、くも膜を除いた後、脳表に $10\ \mu\text{M}$ の DAF-2 DA を含む人工髄液 30 分間灌流した後、蛍光顕微鏡下で観察した。ラットは脳固定器で固定し、筋弛緩させ、人工呼吸を施している。観察開始後、15 分くらいで、斑点状の蛍光をもつ細胞が現れた。しかし、この細胞に関しては神経細胞なのかグリア細胞なのか不明である。また数時間経つと、血管平滑筋と思われる細胞が蛍光を発した。これは時間スケールから考えて、iNOS 由来の NO であろうと考えている。

このように DAF-2 DA を用いることにより、*in vivo* においても脳内の NO を可視化できることが分かった。

さらに、詳細な検討するため、脳スライスをを用いた実験を行うことにした。

(2) ラット脳スライスをを用いた海馬における NO イメージング

雄性 SD ラット (8 週齢) を断頭後、全脳を素早く摘出し、氷冷した人工髄液液に入る。氷冷後、約 $500\ \mu\text{m}$ ずつの冠状断スライスに切断し、 $34\ ^\circ\text{C}$ の人工髄液に入れ、約

1 時間かけてスライスによるダメージの回復を待つ。DAF-2 DA (10 μ M) を含む人工髄液に大脳スライスを入れ、細胞の上清を取り替え、30 分かけて色素を負荷した。負荷後、灌流によって残った色素を洗い流した。DAF 負荷後のスライスは白金・イリジウム合金の針金を環状にしたものにナイロン製のネットを張ったものを載せて固定し、励起フィルター450-490 nm、ダイクロイックミラー505 nm、バリアフィルター520-560 nm の付いた正立蛍光顕微鏡で観察し、ビデオカメラから取り込んだ画像を解析した。

負荷後の蛍光の局在について観察したところ、海馬では歯状回の蛍光強度が特に強かった。これは恒常的な NO の生成が歯状回で多いことによると考えられる。

ところが NMDA 刺激を行うと、Fig. 2-7-3 に示すように CA1 領域の錐体細胞近辺の蛍光強度が有意に増加した。Fig. 2-7-4 は Fig. 2-7-3 に対応する経時変化を示したグラフである。この蛍光強度の増加は NOS 阻害剤 L-NAME の添加により抑制されたが、その異性体で阻害効果のない D-NAME の添加では影響がなかった (Fig. 2-7-5)。また、NO によって蛍光を発しないアミノ基が 1 つしかないモノアミノフルオレセインのエステル誘導体 (4AFDA) を負荷した場合は蛍光強度が増加しない。したがって、この蛍光強度の上昇は NMDA 刺激により生成した NO によるものであることを示している。

NMDA 刺激により海馬 CA1 領域において NO が生成することは、acute スライスだけではなく、培養スライスにおいても確認している (Fig. 2-7-6)。

歯状回の蛍光強度は NMDA 刺激前から強かったのだが、NMDA 刺激による変化はほとんどなかった。海馬の歯状回は NADPH ジアホラーゼ活性 (NOS 活性の指標とされる) が高いと報告されている^{50,51)} が、それが NO 生成量に必ずしも一致しないということを視覚的に示すことができた。

私は NMDA 刺激に対する海馬 CA1 領域での NO 生成を示したが、その他の薬物や電気刺激による変化を調べることや他の部位におけるイメージングにも DAF-2 DA は応用可能である。例えば細胞の種類は未同定であるが、Fig. 2-7-7 に示すような NO 産生細胞を発見しており、このような NO に関する新発見がさらに得られるものと期待できる。

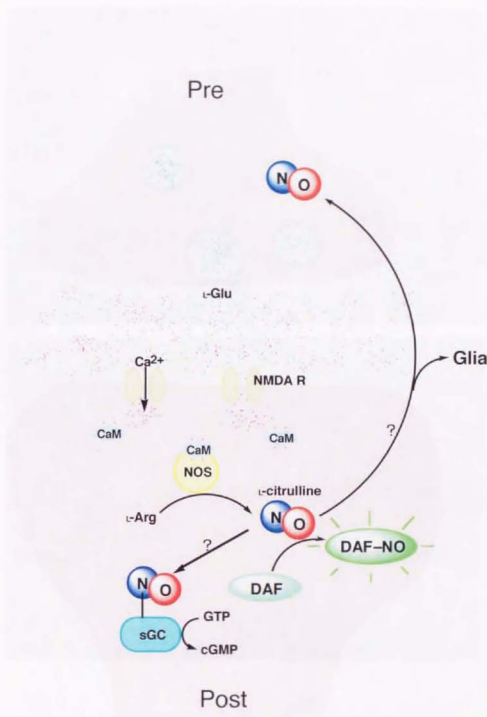


Fig. 2-7-1 シナプスにおけるNOの生成と挙動

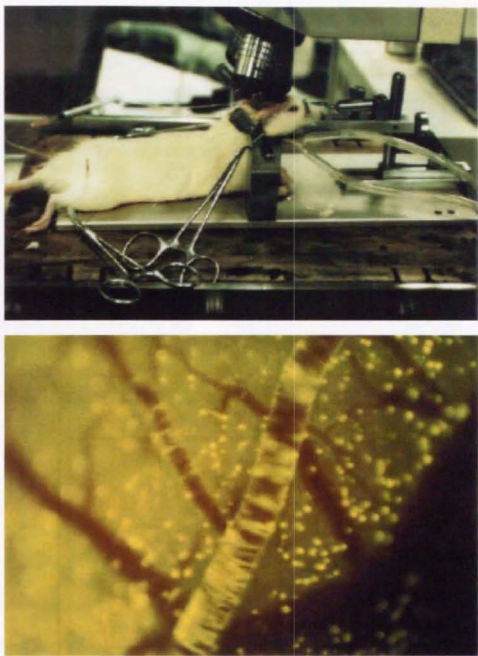


Fig. 2-7-2 DAF-2 DAによるラット脳表のイメージング
上図：顕微鏡下のラット
下図：観察開始6時間後の脳表の蛍光像

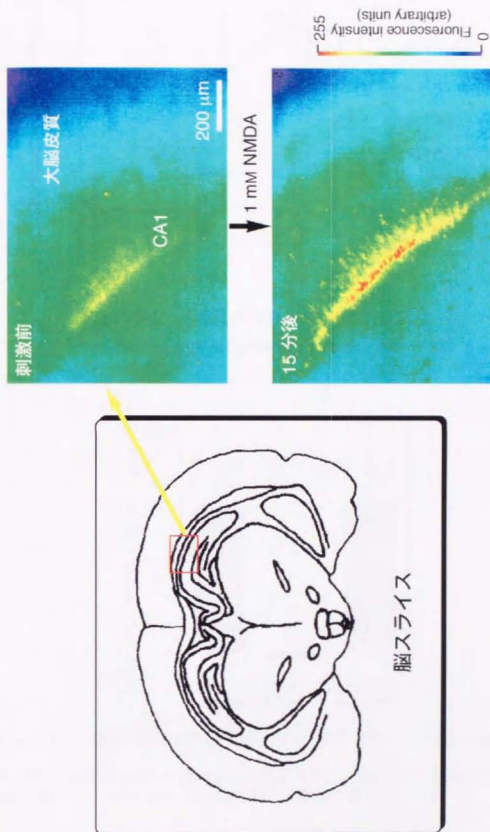


Fig. 2-7-3 ラット海馬スライスより生成するNOのイメージング

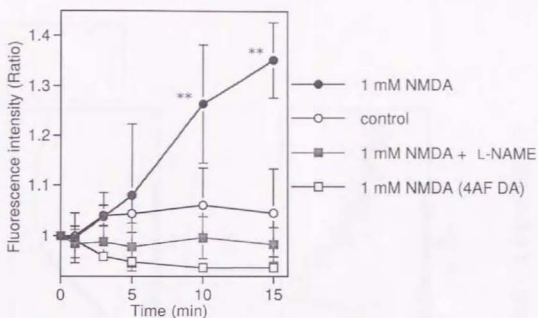


Fig. 2-7-4 海馬CA1領域の蛍光強度変化

**p<0.01 vs control by Student's *t* test. Mean \pm S.D. n = 7.

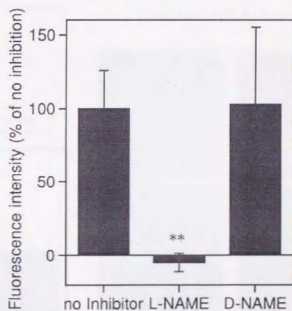


Fig. 2-7-5 海馬CA1領域のNMDA (1 mM) 刺激15 分後の蛍光強度

海馬スライスに100 μ MのL- またはD-NAME存在下, DAF-2 DAを30 分かけて負荷。

**p<0.01 vs no inhibition by Dunnett's test. Mean \pm S.D. n = 7.

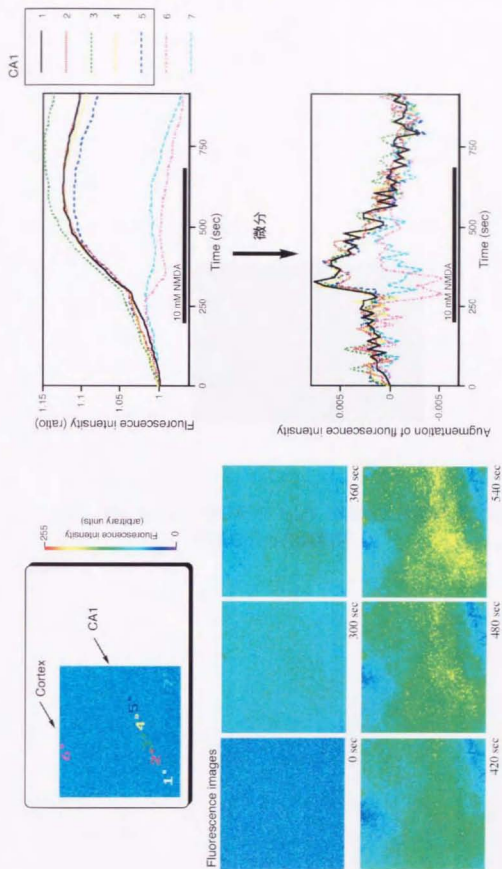


Fig. 2-7-6 培養海馬スライスのCA1領域におけるNMDA刺激による蛍光強度変化

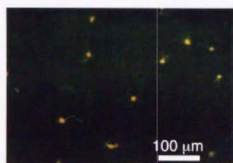


Fig. 2-7-7 NMDA (1 mM) 刺激後に大脳皮質において
蛍光を発した細胞体

第3章 改良型プローブ DAF-FM の開発と応用

第1節 pH 特性の改良

前章で述べたように DAF-2 は有用であり、細胞や組織から生成する NO のイメージングを可能にしたが、応用を重ねるうちに、改良すべき点も見つかってきた。DAF は pH 感受性のフルオレセインを骨格としている。Fig. 2-4-5 をみると、DAF-2 T の蛍光強度は pH 7 を下回ると急激に減弱することがわかる。血管内皮細胞など cNOS を有する細胞は、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると NO を生成することが知られているが、同時に細胞内のイオン組成が変化するため、細胞内 pH が変化することがある。したがって、細胞内で生成した DAF-2 T はこの影響により蛍光強度が変化してしまうことになる。これはキサンテン骨格のフェノール性 OH 基がプロトン化するためであり (Scheme 3-1-1)、そのことを予測して OH 基の pK_a を下げるべく、前章で記載した OH 基の隣接位に Cl が導入されている DAF-4、DAF-5、DAF-6 を合成した。ところが、OH 基の pK_a を下げることができたものの、Fig. 2-4-5 の DAF-5 T の pH 特性曲線にコブがみられるように pH 6-7 付近で蛍光強度が不安定であることが明らかとなった。この中性領域での pH による蛍光強度の変化はバイオイメージング用のプローブとしては致命的欠陥になる。この原因は生成するトリアゾール環の酸性度の高い水素の影響であると推定した (Scheme 3-1-1)。そこで、Fig. 3-1-1 にまとめたような改良を試みることにした。まず、既に合成していた DAF-4 と DAF-5 に N-メチル化を施すことにした。DAF-6 に関しては収率・感度が良くなかったため検討の対象から外した。N-メチル化を行っても、トリアゾール体が生成することは DAN-1 や DAF-2 C18 の例から問題ないと判断した。しかし、DAF に MeI にてメチル化を施すとメチル基は電子密度の高い N 原子に入り、メチルが付いている N 原子の電子密度がさらに上昇するため、 N_2O_3 がそちらを優先的にニトロソ化し、二級アミンなのでそこで反応が止まって環化しないことで、反応効率すなわち感度が減少することを懸念した。

そこで、両方のアミノ基にそれぞれメチルが入ったものを合成し、感度を検討した (Scheme 3-1-2, Scheme 3-1-4, Scheme 3-1-5, Scheme 3-1-6)。合成経路で特筆すべき点はこれまで無溶媒でフルオレセインの縮合反応を行っていたが、メタンスルホン酸を溶媒兼触媒として用いると均一な系になるためか、収率が上昇する場合があることが分かった。感度の検討方法は同量の NO ドナーを添加したときの蛍光強度の増加量を比較することで行い、モル吸光係数、量子収率、NO との反応効率のファクターを総合して判断することとした。

その結果、懸念されたニトロソ体は生成するものの、主生成物はトリアゾール体であり、予想 (Fig. 3-1-1) に反して電子密度の高い方の N 原子にメチル基を導入したものである DAF-4 M2 が最も高感度で DAF-4 に匹敵するか若干良かった (Fig. 3-1-2)。

pH 特性を DAF-4 M2 T に関して調べたところ、期待通り pH 6 以上で安定になった (Fig. 3-1-3)。

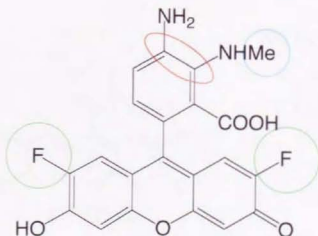
この検討を行っている際に、F を導入したフルオレセインが光に対する退色が小さく、量子収率が高く、励起波長が無置換のフルオレセインと変わらないため、共焦点顕微鏡で用いる Ar レーザーの 488 nm で効率よく励起できるとの報告³²⁾を入手したので、Cl 原子を F 原子に置き換えたものもデザインした。予想としては DAF-4 M2 と同じ位置のアミン基が置換された DAF-7 M2 (DAF-FM) が最も高感度であろうと考えたが、念のため DAF-8 M2 も合成して比較することとした (Fig. 3-1-1, Scheme 3-1-3, Scheme 3-1-4, Scheme 3-1-6)。

結果は予想通り DAF-FM が最も感度が良く、従来の DAF-2 よりも高感度であった (Fig. 3-1-4, Fig. 4-8)。pH 特性も pH 5.8 以上で安定になった (Fig. 3-1-5)。波長に関しては論文通り、Cl 原子を導入したフルオレセインほどは長波長にはシフトしなかった (Fig. 3-1-6)。トリアゾール体の蛍光量子収率も Cl 原子を導入している DAF-4 よりも良かった (Table 3-1-1)。退色に関しては、Fig. 3-1-7 のように無置換のフルオレセインに比べ、2 倍程度光に対する寿命が長くなっている。実は Cl 原子を導入したのもも退

色に対しては無置換のフルオレセインよりも抵抗性があることも分かった。

さらに、水酸基の pK_a を小さくするために、テトラフッ素化した DAF を合成しようと試みたがフルオレセインに縮合する過程の収率が極度に悪く断念した。

感度や pH 特性等、イメージングに必要な条件を総合評価すると DAF-FM が現在のところ最良の NO 感受性蛍光色素であるとの結論に達した。



ジアミンの位置

- | | | |
|------|---|-------------------|
| 3,4- | → |) 実際に合成し、感度等を要検討。 |
| 4,5- | → | |
| 5,6- | → | |

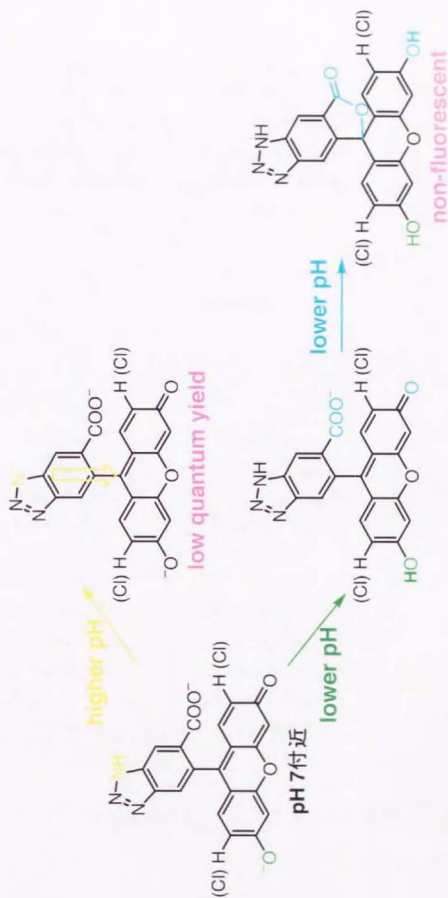
アミノ基へのモノメチルの導入

- ・ 中性付近でのpHの変化に対して蛍光強度が安定になる。
- ・ 電子密度の小さいアミンに導入する方が N_2O_3 との反応速度が高いため高感度であると思われる。——→ 実際に合成して要確認。

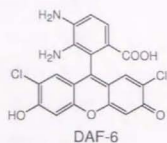
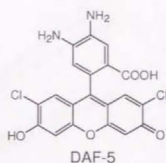
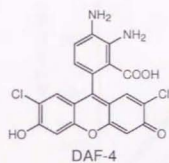
フッ素原子の導入

- ・ 高い電気陰性度のため、オルト位の水酸基のpKaを6.5位から4.5位に下げ、中性付近でのpHの変化に対して蛍光強度が安定になる。
- ・ 退色しにくいとの報告がある。
- ・ 励起波長が塩素原子を導入した時のように長波長に移行しない。(Arレーザーを用いる共焦点顕微鏡に有利。)

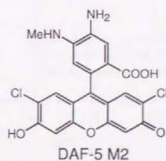
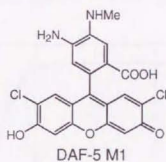
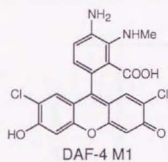
Fig. 3-1-1 改良型DAFのデザイン



Scheme. 3-1-1 pH変化とトリアゾール体のプロトン化



H → Me



Scheme 3-1-2 アミンのモノメチル化

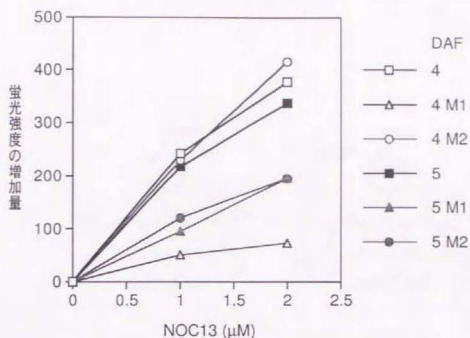


Fig. 3-1-2 メチル化DAF類のNOとの反応性

それぞれの色素 (10 μM) をリン酸ナトリウム溶液 (0.1 M, pH 7.4) に溶かし, NOC13と1時間, 37 °Cでインキュベート後, 蛍光強度 (DAF-4類: Ex. 506 nm - Em. 530 nm, DAF-5類: Ex. 504 nm - Em. 526 nm) を測定。

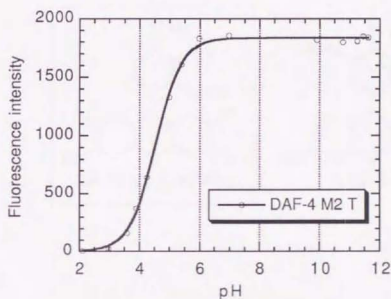
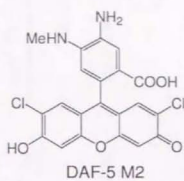


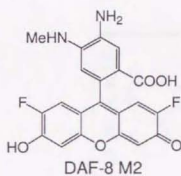
Fig. 3-1-3 DAF-4 M2 TのpH特性

トリアゾール体 (1 μM) を0.1 Mリン酸ナトリウム溶液に溶かし, pHと蛍光強度 (Ex. 515 nm - Em. 525 nm) を測定。次式でfitting。

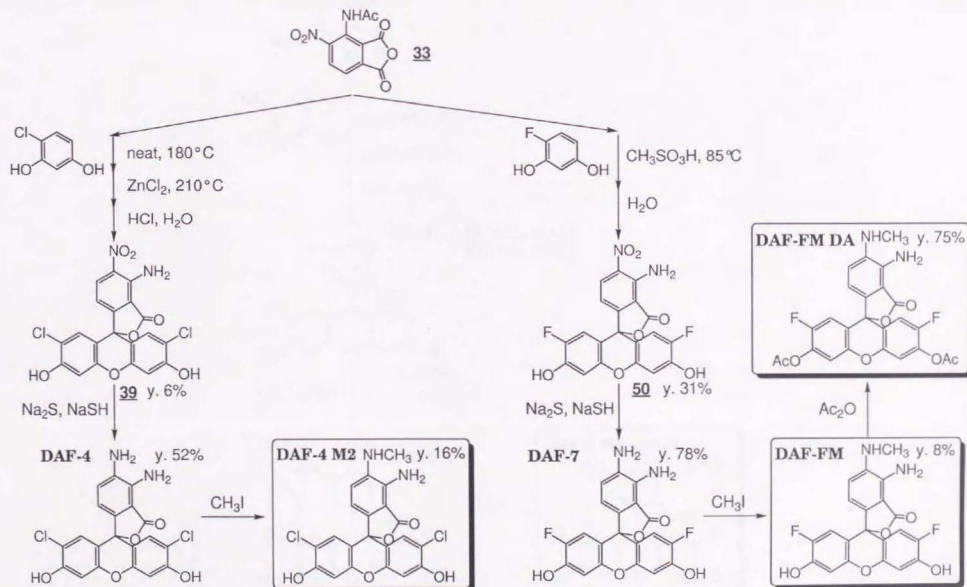
$$\text{Intensity} = 1835 / (1 + 10^{4.53 - \text{pH}}), R = 0.9993.$$



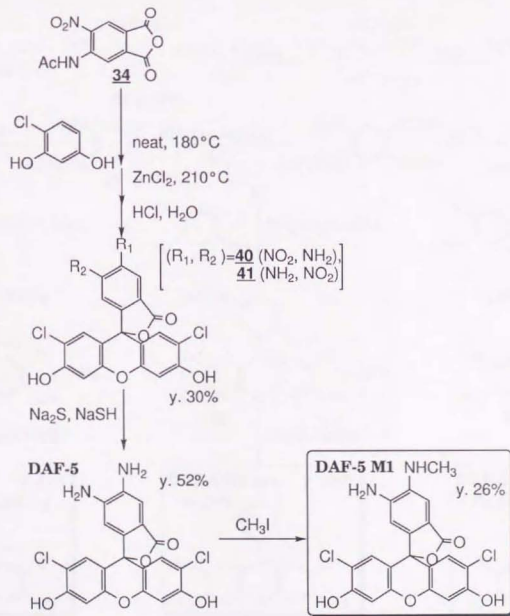
Cl → F



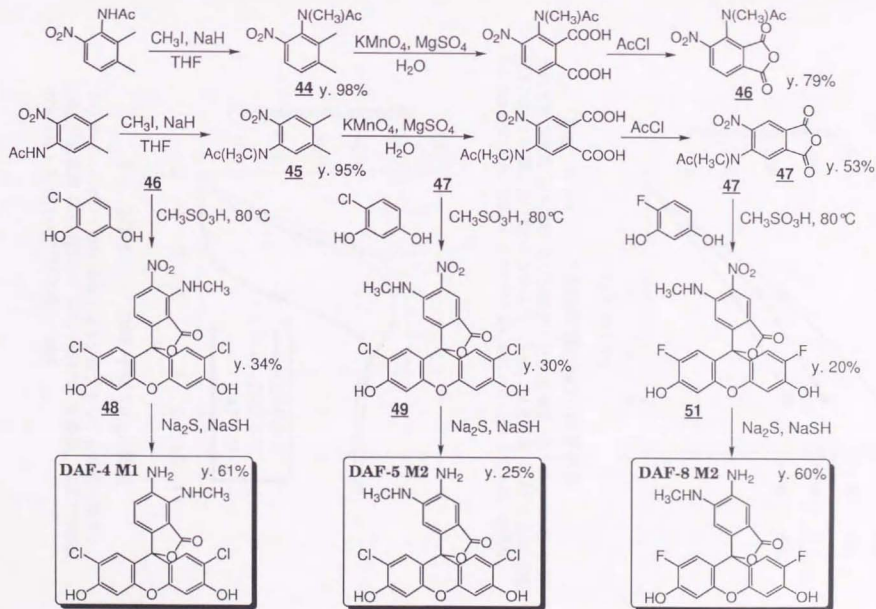
Scheme 3-1-3 ハロゲンとしてF原子を導入



Scheme 3-1-4 DAF-4 M2とDAF-FMの合成経路



Scheme 3-1-5 DAF-5 M1の合成経路



Scheme 3-1-6 DAF-4 M1, DAF-5 M2, DAF-8 M2の合成経路

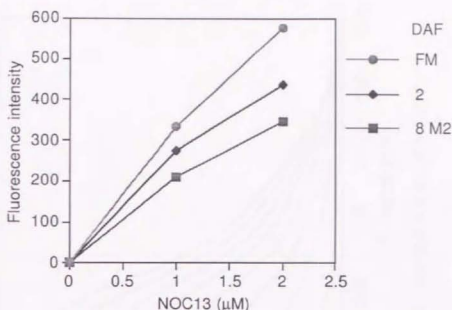


Fig. 3-1-4 F化DAF類のNOとの反応性

それぞれの色素 (10 μM) をリン酸ナトリウム溶液 (0.1 M, pH 7.4) に溶かし, NOC13と1時間, 37 °Cでインキュベート後, 蛍光強度 (DAF-2, DAF-8M2: Ex. 495 nm - Em. 515 nm, DAF-FM: Ex. 500 nm - Em. 515 nm) を測定。

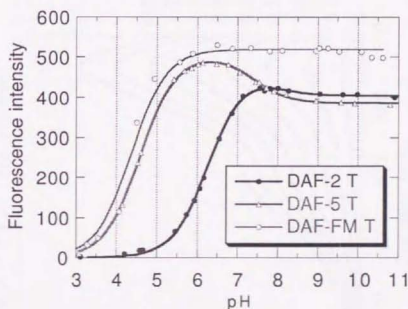
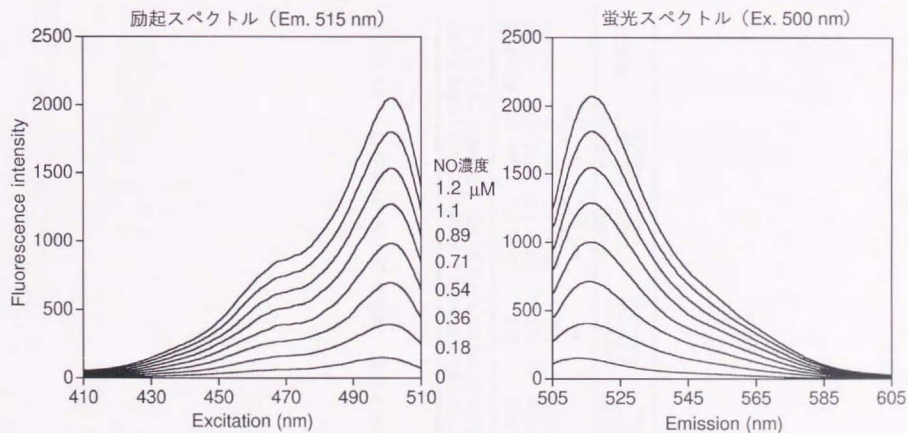


Fig. 3-1-5 DAF-FM TのpH特性

トリアゾール体 (1 μM) を0.1 Mリン酸ナトリウム溶液に溶かし, pHと蛍光強度 (Ex. 495 nm - Em. 515 nm) を測定。次式でfitting。
Intensity = $518 / (1 + 10^{4.38 - \text{pH}})$, $R = 0.994$ 。



ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) 中で測定。NO溶液添加後、蛍光強度が安定してから測定。

Fig. 3-1-6 DAF-FMにNOを添加したときの励起・蛍光スペクトル変化

化合物	Extinction coefficients and absorption maxima		Fluorescence maximum of triazole form	Relative quantum efficiencies	
	Diamine	Triazole		Diamine	Triazole
	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	nm	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	nm	
DAF-2	7.9 (486)	7.3 (491)	513	0.005	0.92
DAF-4	9.7 (501)	9.2 (505)	530	0.002	0.75
DAF-FM	8.4 (487)	7.3 (495)	515	0.005	0.81

ナトリウムリン酸緩衝液 (20 °C, 0.1 M, pH 7.4) 中でのデータ。
量子収率は0.1 M NaOH水溶液中でのfluoresceinを0.85として算出。

Table 3-1-1 DAF-FMのモル吸光係数, 波長と蛍光量子収率

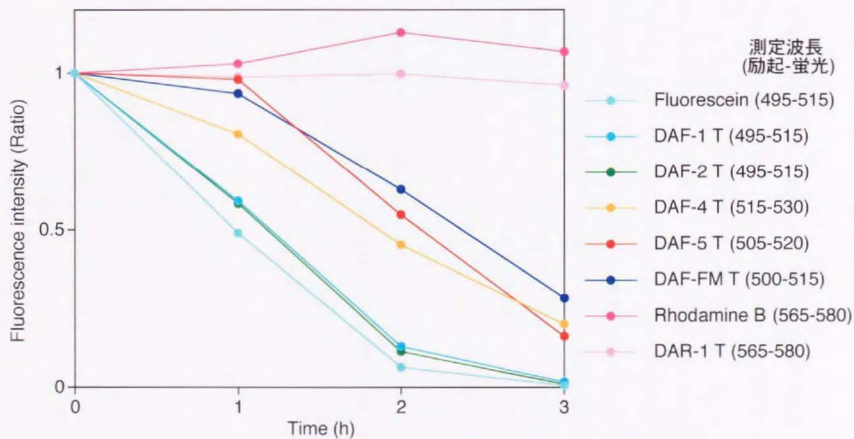


Fig. 3-1-7 光に対する色素の安定性

それぞれの色素 (10 μ M) のリン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) をガラス製のバイアルに入れ、11月の快晴の東京にて直射日光を当て、1時間毎にサンプリングし、蛍光強度を測定。

第2節 DAF-FM DA を用いた血管内皮細胞のイメージング

次に DAF-FM の DA 体を合成し (Scheme 3-1-4) , NO 生成量が微量であるために測定が困難で, 細胞内 pH の変化が起こることが知られる ウシ大動脈内皮細胞の NO イメージングに適用した。その結果, 血管内皮細胞が bradykinin (Fig. 3-2-1, Fig. 3-2-2) や Ca^{2+} ionophore である A23187 (Fig. 3-2-3) 刺激により生成する NO を画像として捉え, イメージングすることに初めて成功した。Fig. 3-2-1 は刻々の蛍光強度を測定開始時の蛍光強度で割った蛍光比を画像化して示したものであり, 核のある部位の蛍光強度の増加が細胞質における増加よりも遅く, 核の部分が黒く抜けた画像が得られた。血管内皮型の NO 合成酵素は細胞膜近辺に存在するとされているので, そこで生成した NO が何らかの機構で核内へは拡散しにくくなっているか, あるいは DAF が NO を捉えるには酸素が必要であることから, 核内に NO が拡散していても, NO は核内では酸化を受けにくいことを示している。

このように bradykinin などの刺激によって生成する極微量の NO をイメージングすることに成功し, 細胞質から蛍光強度の上昇が始まることを視覚的に捉えることができた。

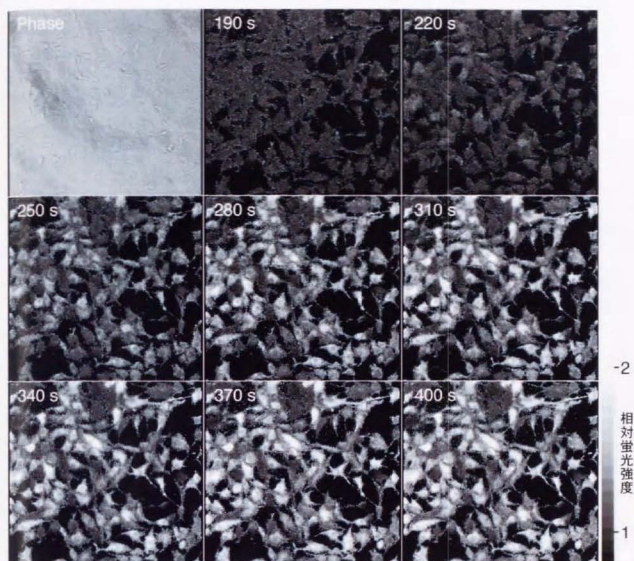


Fig. 3-2-1 DAF-FM DAによるウシ大動脈内皮細胞のイメージング

10 μ M DAF-FM DAを含むPBS(+)に細胞の上清を置換し、37 $^{\circ}$ Cで1時間かけて細胞内に色素を負荷する。その後、蛍光顕微鏡下にシャーレを移して測定を開始した。測定開始時を0 sとしており、200 sにbradykinin (0.1 μ M)を加えた。左上図は測定開始前の透過光像を示し、それ以外は測定開始時からの蛍光強度の変化率を色の濃淡で示している。

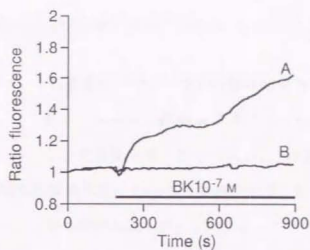


Fig. 3-2-2 DAF-FM DAを負荷したウシ大動脈内皮細胞の
蛍光強度変化

10 秒毎に撮像し、1 個の細胞を含む任意の7つの
エリアの測定開始時に対する相対蛍光強度を平均
した値をプロットした。

A: Fig. 3-2-1 に対応するデータ

B: L-NAME 1 mM 存在下の対照データ

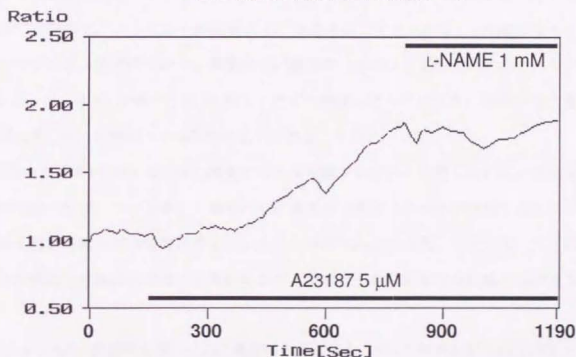


Fig. 3-2-3 DAF-FM DAを負荷したウシ大動脈内皮細胞の
蛍光強度変化 (2)

10 秒毎に撮像し、1 個の細胞を含む任意の7つの
エリアの測定開始時に対する相対蛍光強度を平均
した値をプロットした。

第3節 血管内皮細胞における NO と Ca^{2+} 同時イメージング

細胞内で起こっているイベントを複数のパラメータの同時計測をもとに観察することは生体機能解明に重要なことである。私は蛍光顕微鏡のカメラの前に W-views system (浜松ホトニクス (株)) という分光装置を置くことにより、NO 感受性蛍光色素の DAF-FM 由来の蛍光と Ca^{2+} 感受性蛍光色素の Fura-Red 由来の蛍光とを分離して測定可能な NO と Ca^{2+} の同時イメージング法を開発した (Fig. 3-3-1)。

この方法をウシ大動脈内皮細胞に適用し、DAF-FM DA と Fura-Red AM とを同時負荷することにより single cell での NO と Ca^{2+} の同時測定を行った。Fura-Red は細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇すると蛍光強度が減少する色素であり、その蛍光強度の減少に対応して NO が生成していることが Fig. 3-3-2 から分かる。Fig. 3-3-2 上部には透過光像と擬似カラーで強度を示した蛍光像を示している。Bradykinin や ATP は G 蛋白系を活性化し、 IP_3 が生成されて細胞内 Ca^{2+} ストアから細胞質に Ca^{2+} 放出を起こすとされる。eNOS はカルシウムカルモデュリン依存性であり、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により活性化されることが知られている。Fig. 3-3-2 のデータは 10 秒に 1 枚ずつ撮像したものであり、細胞内 Ca^{2+} 濃度がほぼ上昇しきった時刻から NO が生成し始めることが分かった。

NO 自身を捉えない DAF は NO の酸化を待たない限りシグナルを発しないことを第 2 章第 4 節で述べたが、この結果より細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇により NO が生成するという生物応答を測定可能な反応速度は有していることが明らかとなった。すなわち、ミリ秒スケールの時間分解能は有さないとと思われるが、秒スケールの応答であれば十分測定できる。

Fig. 3-3-3 は NOS 阻害剤を用い、 Ca^{2+} 濃度が上昇しても、NO の生成が見られないことを確認したものである。

Fig. 3-3-4, Fig. 3-3-5 は bradykinin 刺激により細胞に Ca^{2+} オシレーションが起きたときの蛍光強度変化を示している。初めの Ca^{2+} 濃度上昇にのみ大きく NO 生成の応答をした細胞のデータが得られた。2 回目以降の Ca^{2+} 濃度上昇には NO 生成の応答がほとんどな

ように見える。この原因としては NO 生成のための Ca^{2+} 濃度の閾値が存在するか、NOS の周囲に存在する基質である L-Arg が枯渇する、あるいは一度 NO を生成するとしばらくの間、フィードバック阻害がかかり NOS の Ca^{2+} 濃度上昇に対する sensitivity が下がるため（生成した NO が NOS のヘムと相互作用することが報告されている。⁵³⁾）などが考えられる。

Fig. 3-3-6 は ATP 刺激により細胞に Ca^{2+} オシレーションが起きたときの蛍光強度変化を示している。初めの Ca^{2+} 濃度上昇に大きく NO 生成の応答をし、2 回目以降の Ca^{2+} 濃度上昇にも弱いながらも応答している細胞のデータが得られた。また、NOS 阻害剤添加を行っても、オシレーション現象には影響せず、NO 生成が阻害される。

Fig. 3-3-7 も ATP 刺激により細胞に Ca^{2+} オシレーションが起きたときの蛍光強度変化を示している。ところが 2 回目の Ca^{2+} 濃度上昇にも対応して NO がはっきりと生成しているデータが得られた。よく見ると 1 回目の Ca^{2+} 濃度上昇がシャープである。Fig. 3-3-6 の上のデータでは 1 回目の Ca^{2+} 濃度上昇が大きく、Fura-Red で捉え切れていないため、実は 1 回目に比べ、2 回目以降の Ca^{2+} 濃度上昇が NOS を活性化するには小さ過ぎるのかもしれない。すなわち、NOS を活性化するための Ca^{2+} 濃度の閾値があることになる。前述の最初の Ca^{2+} 濃度上昇にのみ、見かけ上大きく NO 生成の応答をした原因であるが、「NOS の周囲に存在する基質である L-Arg が枯渇する」ことは 2 回目までのオシレーションの lag time が約 300 s とかなり大きく、一般に細胞内の物質移動は早いとされているので、確かな根拠は示せないが枯渇ということは考えにくい。さらに「一定時間 NOS の Ca^{2+} 濃度上昇に対する sensitivity 低下」の可能性であるが、2 回目までのオシレーションの lag time がここに示したどのデータも約 300 s であり、Fig. 3-3-7 のように NO を生成することが可能であることから、全く否定することはできないが、やはり「NOS を活性化するための Ca^{2+} 濃度の閾値」が最も可能性があるのではないであろうか。

今後、刺激剤の濃度を変化させたり、さまざまなタイミングで試薬を併用することを行い、その応答の違いを詳細に比較調査する必要がある。ただ、現時点の問題点として

はこのウシ大動脈内皮細胞において、必ずオシレーションが起きる条件を見出していないことがある。培養条件（細胞密度、継代数や移植後の日数）や刺激薬物の濃度等にオシレーションは左右されるようである。したがって、細胞を変えて必ずオシレーションが起きる細胞を用いることも今後の一つの方針である。

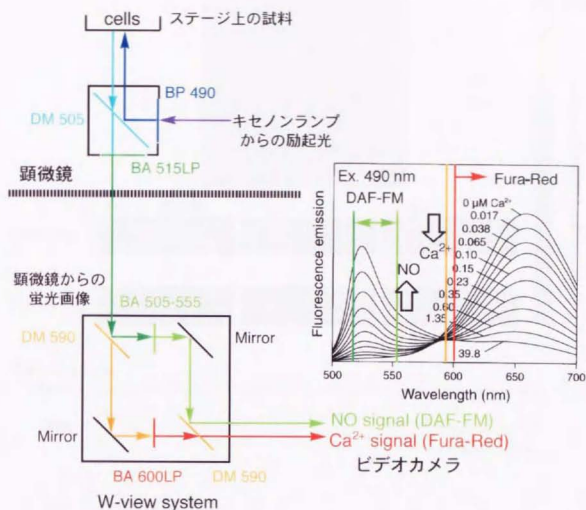


Fig. 3-3-1 NOとCa²⁺の同時イメージングに用いた分光系

BP, BAは光学フィルターで特定の波長の光のみを透過させ、LPと付したものはそれよりも長波長の光を透過させる。DMはdichroic mirrorで、表示した波長以下の光は反射し、それよりも長波長の光を透過させる。DAF-FM DAとFura-Redとを同時負荷した細胞に490 nmの励起光を与え、発せられた蛍光は上記装置により、DAF-FM由来の蛍光とFura-Red由来の蛍光とに分光して測定する。

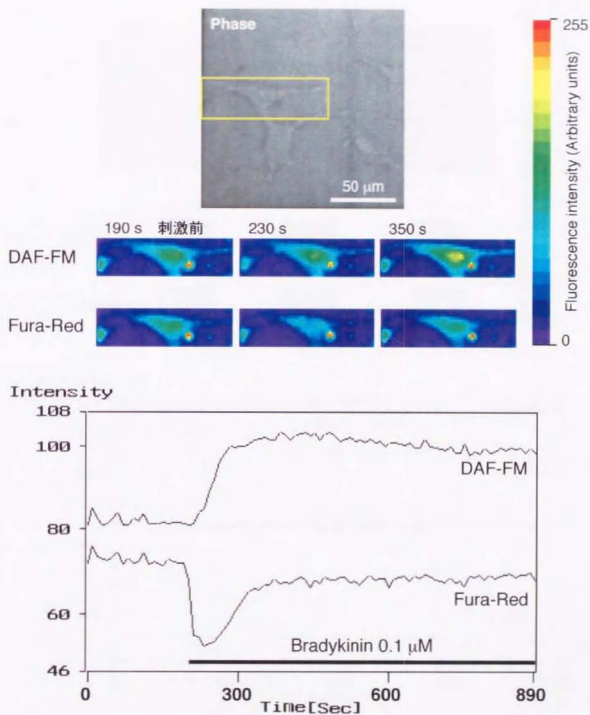


Fig. 3-3-2 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定

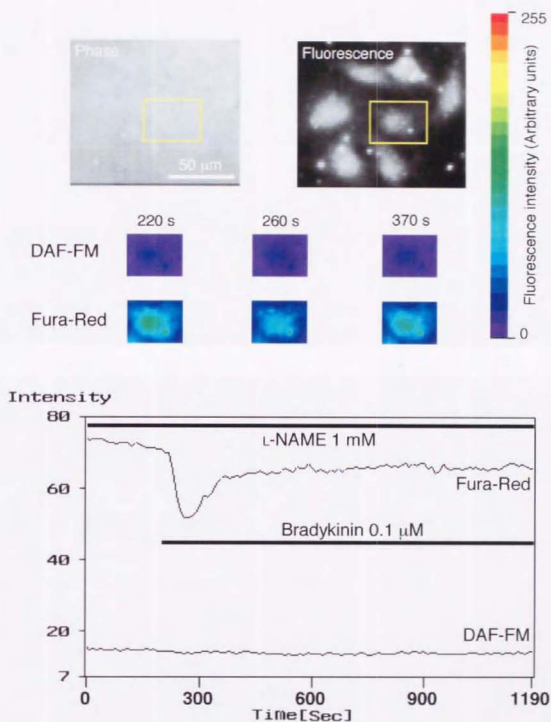


Fig. 3-3-3 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定
(NOS阻害剤の効果)

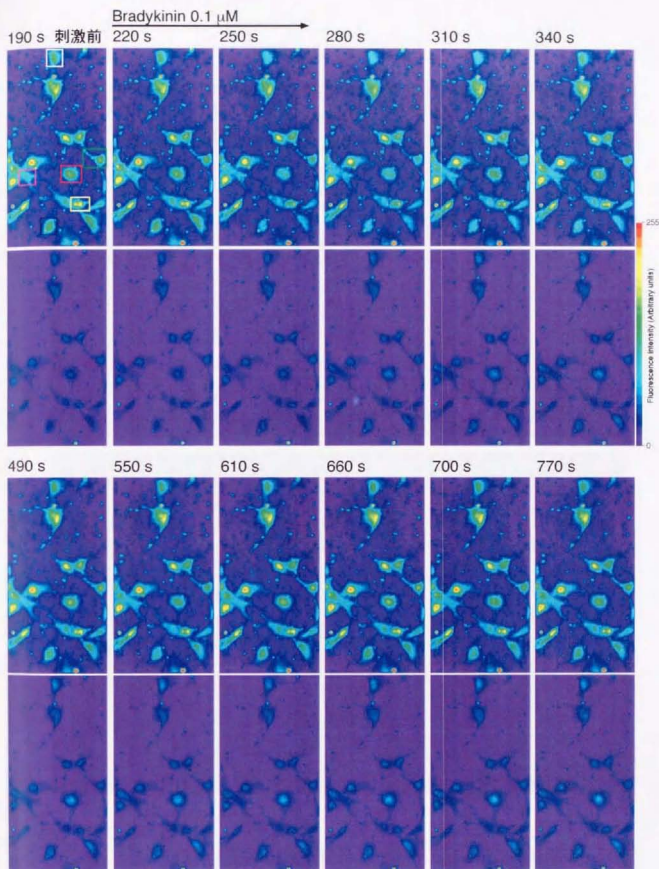


Fig. 3-3-4 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定
(bradykininによる Ca^{2+} オシレーション)
上段 : Fura-Red, 下段 : DAF-FM

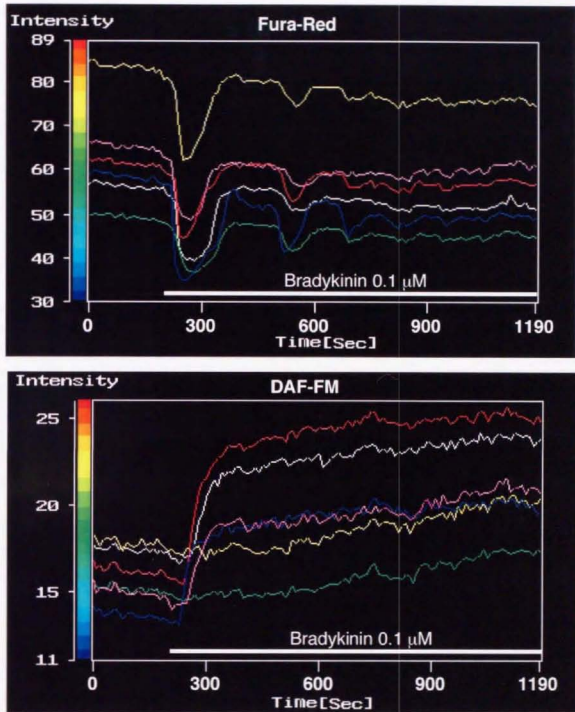


Fig. 3-3-5 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定
(Bradykininによる Ca^{2+} オシレーション)

各色のラインはFig. 3-3-4の左上図で囲んでいる細胞の蛍光強度を示している。

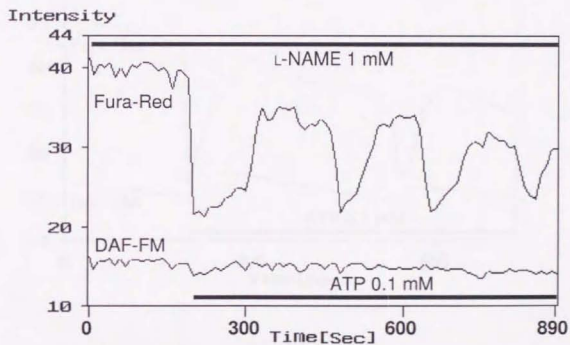
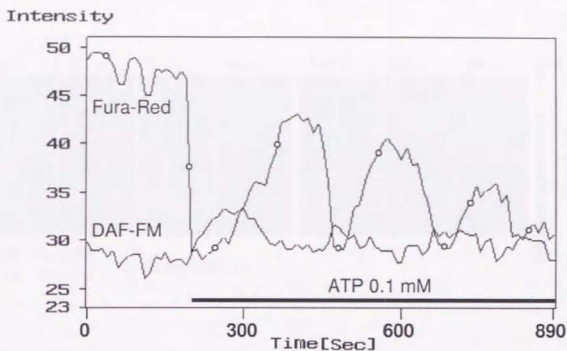


Fig. 3-3-6 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定
(ATPによる Ca^{2+} オシレーション)

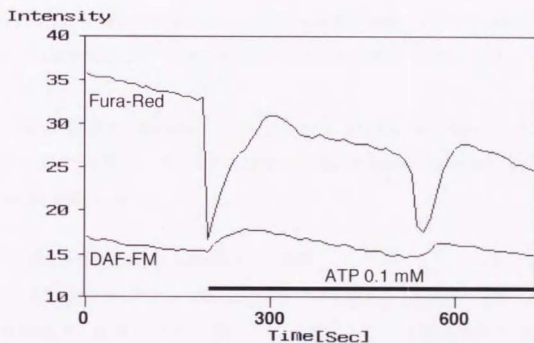
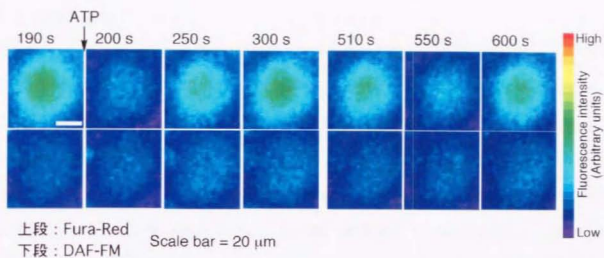


Fig. 3-3-7 ウシ大動脈内皮細胞におけるNOと Ca^{2+} の同時測定
(ATPによる Ca^{2+} オシレーション)

第4節 海馬スライスをを用いた脳虚血時のNOイメージング

(1) 実験の目的

脳内でのNOの作用は全く明確になっていないことを第2章第7節で述べたが、その真の生理作用と並んで病態生理学的作用も解明が待たれており、特に高齢化社会を迎えつつある今日、脳梗塞や痴呆等の脳虚血性疾患の病態機序解明は急務である。脳虚血後には病巣内のすべてのニューロンが一様に障害されるのではなく、特定のニューロンのみが脆弱性を示すことがあり、記憶形成を司る海馬においてはCA1領域のニューロンが傷害を受けやすいことが報告されている。その際、興奮性アミノ酸が放出され、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇してNOが生成するとされ、NOや活性酸素がその傷害の原因だとする仮説がある。しかし、真の分子メカニズムは未だ解明されておらず、NOが関与すると主張するグループもNOS阻害剤を用いると傷害の程度が軽減するという根拠で論じており、逆にNOS阻害剤により傷害の程度が大きくなると報告するグループもあるため混沌としている。

そこで私はNOが急性虚血時にどこからどのように生成するのかを調べるために、ラット海馬スライスをを用い、虚血モデル状態でのNO生成の様子を可視化することをDAF-FM DAを用いて試みた。

(2) 虚血条件によるNO生成パターンの相違

DAF-FM DAを負荷したラット海馬スライス標本をカメラ・画像解析装置と接続した蛍光顕微鏡下、虚血モデル状態にした。虚血モデルは灌流液中のglucoseを2-deoxyglucose (2-DeoxyGlc) に置換し、窒素ガス通気を行って酸素濃度を下げたRinger液を10分間灌流してエネルギー産生を抑えることにより行った。

その結果、Fig. 3-4-1のように虚血時にはほとんどNOは生成せず、再灌流に相当する虚血条件解除直後に急激に生成した。2番と3番すなわち赤と緑のラインが示している海馬CA1領域が特に顕著であったが、海馬全体でも蛍光強度が増加した。ここで生成し

ている NO は細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇によりカルモデュリンによって制御を受けている NOS が活性化され生成したものであるもので、fura-2 を用いた Ca^{2+} イメージングも行って比較したところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇は虚血中にも起きており (CA1 領域が特に応答が早く、顕著)、NO の挙動と必ずしもパラレルではないことが分かった。なお、Fig. 3-4-2 には対照実験としての NOS 阻害剤 L-NAME 存在下のデータを示した。しかし、DAF が NO を捉えるためには酸素が必要であることから、窒素ガス通気を行って酸素濃度が下がった条件下では NO を捉えることができていないだけで、虚血時にも実際には NO を生成していることが考えられる。

そこで、今度は窒素ガス通気を行わないで、2-DeoxyGlc 置換のみによる虚血条件を試みた。ただし、灌流液の温度はエネルギー要求性を大きくするため、高めの 36-37 °C に設定した (通常は 33-34 °C で行う。)。その結果、虚血時から蛍光強度が増加し始め、CA1 領域の蛍光強度が著しく増加した (Fig. 3-4-3)。また、 Ca^{2+} 濃度の上昇 (CA1 領域が特に顕著) に対応して NO が生成することを確認することができた。なお、対照実験として Fig. 3-4-4 に NOS 阻害剤 L-NAME 存在下のデータ (上図) とその NOS 阻害剤の光学異性体で NOS 阻害効果のない D-NAME を併用したときのデータ (下図) を示している。

すると、やはり窒素ガス通気の虚血条件時には NO を DAF が捉えていないだけで、NO は生成していたのであろうか？

ところが、Fig. 3-4-5 のように窒素ガス通気の虚血条件時に灌流液に NO ドナーを添加すると蛍光強度は増えるため、DAF と NO との反応に必要な酸素量は存在していることが明らかとなった。すなわち、細胞による NO 生成にはより多くの酸素濃度が必要であることを示しており、NOS が行う L-Arg の酸化には、Glucose を代謝することにより得られるエネルギーと分子状酸素が用いられることから、本条件下においては NO を生成していなかったと考えられる。

結論として、窒素ガス通気条件下の虚血時には細胞内 Ca^{2+} 濃度上昇があるにも拘わら

ず NO はほとんど生成せず、虚血解除直後に CA1 領域が特に顕著であるが、海馬全体において急激な NO 生成がみられた。一方、酸素ガス通気の場合は虚血時から主に CA1 領域において NO が生成することが分かった。酸素濃度により NO の生成パターンがこのように異なることは NO の虚血性疾患への関わりを考える上で重要な知見である。

(3) 細胞内 pH 低下の測定への影響

前項では触れなかったが、これまで示してきた DAF-FM を用いたイメージングの蛍光強度変化をよく見ると、虚血条件開始後、蛍光強度が低下していることが分かる。これは DAF-FM あるいは DAF-FM T の蛍光強度が虚血条件により引き起こされた acidosis により減弱しているものと考えた。それを確かめるべく、fluorescein diacetate を海馬スライスに負荷して虚血条件にした (Fig. 3-4-6)。その結果、色素の漏出あるいは退色が激しく、蛍光強度が経時的に減少しているが、よく見ると測定開始 5 分辺りで CA1 領域の pH が急激に減少し、さらに 5 分程かけて他の部位を示す曲線のレベルまで戻っていることが分かる。フルオレセインに F 原子を導入しても、pH 非感受性になるわけではなく、pH 5.8 以下になれば影響を受けることは Fig. 3-1-5 より分かる。実際、虚血時に pH 6 以下になるという報告がある⁵⁴⁾。

すなわち、DAF-FM を用いて NO を観察しているときは、DAF-2 の場合より改善されたとはいえ、常に細胞内 pH 変化に十分注意する必要がある。すなわち、Fig. 3-4-3 の上図のように虚血時に測定開始時の蛍光強度を超えて増えている場合は、この pH 低下の影響に打ち勝つだけの NO による DAF-FM T 生成があるということを示し、400 s から 500 s 辺りにかけての蛍光強度上昇の傾きには細胞内 pH 回復による蛍光強度上昇のファクターが加わっていることを認識しておく必要がある。

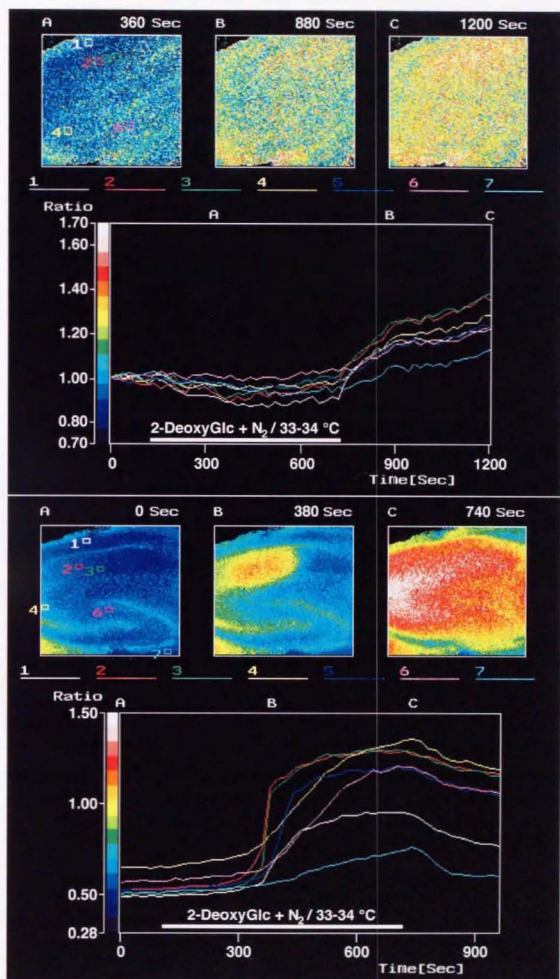


Fig. 3-4-1 虚血状態のラット海馬スライスにおけるNO (上図) と Ca²⁺ (下図) イメージング (窒素ガス通気)

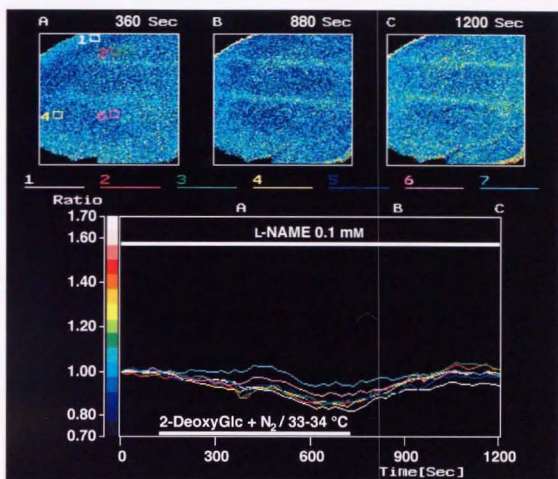


Fig. 3-4-2 虚血状態のラット海馬スライスにおけるNOイメージング
(窒素ガス通気・L-NAME存在下)

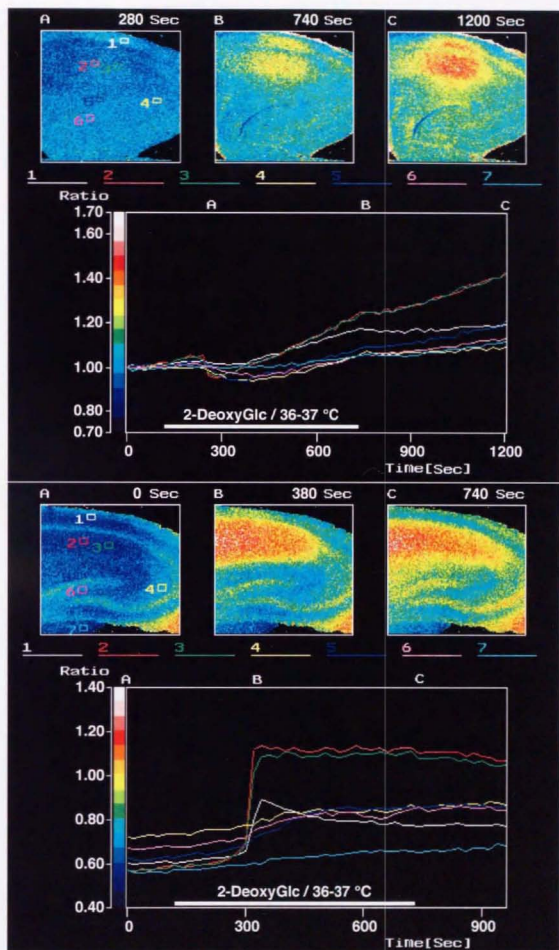


Fig. 3-4-3 虚血状態のラット海馬スライスにおけるNO（上図）と Ca^{2+} （下図）イメージング（酸素ガス通気）

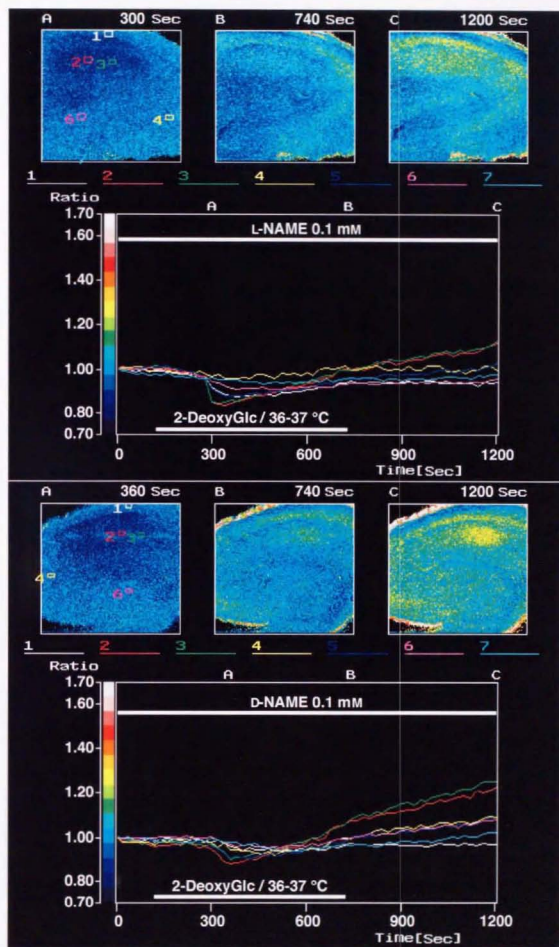


Fig. 3-4-4 虚血状態のラット海馬スライスにおけるNOイメージング
(酸素ガス通気・上図：L-NAME存在下 下図：D-NAME存在下)

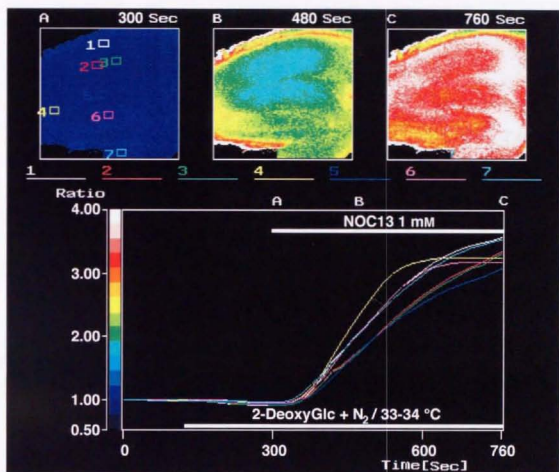


Fig. 3-4-5 虚血状態のラット海馬スライスにおけるNOイメージング (NOドナー添加)

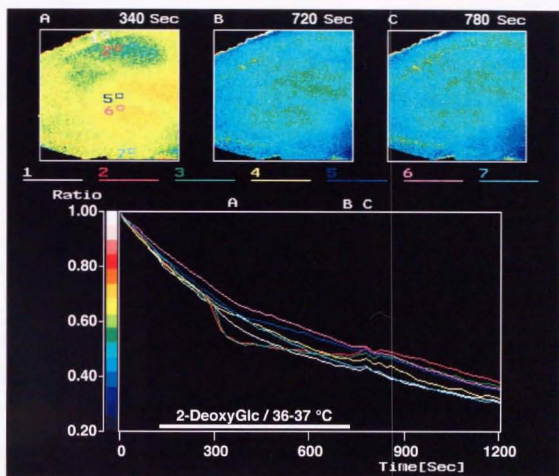


Fig. 3-4-6 虚血状態のラット海馬スライスにおけるpHイメージング

第4章 ジアミノローダミン (DAR) の創製

(1) ローダミンの特性

ローダミンはフルオレセインに比べ、長波長励起が可能であるため細胞の自家蛍光の影響が小さく、退色しにくく、フェノール性 OH 基がないために生理的な範囲での pH 変化の影響を受けない蛍光色素骨格である。蛍光 on/off の機構は第2章第4節で述べた PET であると推定できるため、ジアミンをローダミン骨格にフルオレセインと同様に導入することにより、S/N 良く NO 測定できると予想し、DAR のデザイン・合成を行った。

(2) DAR-1 と DAR-2 の開発

Scheme 4-1 に示したように DAR-1 と DAR-2 をまず合成し、NO と反応後、蛍光性のトリアゾール体ができることを確認した (Fig. 4-1)。極大励起波長はフルオレセインより約 70 nm も長波長であることが分かった。DAR-2 は DAR-1 と比べ、合成的な収率が悪いにも拘わらず、感度や波長等の特性は大して変わらなかった (Table 4-1, Fig. 4-8)。

光による退色の程度を直射日光によって調べたところ、Fig. 3-1-7 に示すように 3 時間経過後も全く退色が起きなかった。

(3) DAR-1 のエチルエステル (EE) 体への誘導化とイメージングへの応用

そこで私は DAR-1 に細胞局在化のためのエステル基を導入した DAR-1 EE に誘導化した (Scheme 4-1)。DAR-1 EE をラット大動脈平滑筋細胞から生成する NO のイメージングに適用し、刻々と生成する NO の画像化に成功した (Fig. 4-2, Fig. 4-3)。予想通り細胞の自家蛍光の影響はほとんどなかったが、色素の均一な負荷が難しく、バックグラウンドの蛍光強度がなかなか安定しなかった。また培養細胞が剥がれやすくなるため、細胞毒性を有する可能性があった。

(4) ラット脳ホモジネートを用いたエステル加水分解の検討と DAR のアセトキシメチル (AM) 体の開発

色素の負荷が難しい原因の一つは DAR-1 EE の加水分解速度が遅いためではないかと推定した。というのも、エステルが立体的に混んだ部位（キサンテンとベンゼン環は直交していると思われる）に付いており、さらにエチルエステルであることから比較的安定であるからである。ラット脳のホモジネートを用い DAR-1 EE の加水分解の程度を HPLC にて調べたところ、30 分間インキュベートしても、全く加水分解されなかった (Fig. 4-4)。そこで私は細胞内のエステラーゼによって加水分解を受けやすいとされるアセトキシメチル (AM) を DAR-1 に導入し (Scheme 4-2)、加水分解の程度を検討したところ、DAR-1 AM は 30 分間で約 30% の AM 体が加水分解を受けていた (Fig. 4-5)。したがって、イメージングに用いる DAR のエステル体としては AM 体の方が望ましいと考えられる。

(5) pH 特性の改善

DAR はフェノール性 OH 基がないとはいえ、DAF の場合と同様にトリアゾール体になったときに酸性水素が存在すると pH 感受性になる (Fig. 4-7)。Fig. 4-2 のように細胞内 pH 変化のない場合の測定には問題がないが、前章で述べたような細胞内 pH がダイナミックに変化する場合には用いることができない。そこで、フルオレセインで置換位置を検討した結果から、感度的に優れていると考えられる DAR-M をデザインし、DAR-1 に N-モノメチル化を施した (Scheme 4-2)。

予想通り、DAR-M は pH 4 以上で蛍光強度が安定になり (Fig. 4-7)、かつ NO に対する感度も上昇した (Fig. 4-8)。

バイオイメージングのため、DAR-M に AM を導入した DAR-M AM を合成し (Scheme 4-2)、ウシ大動脈内皮細胞に適用した。

ところが、相変わらず細胞が剥がれやすくなり、細胞毒性を有しているような印象を

受け、細胞への負荷も困難であった。

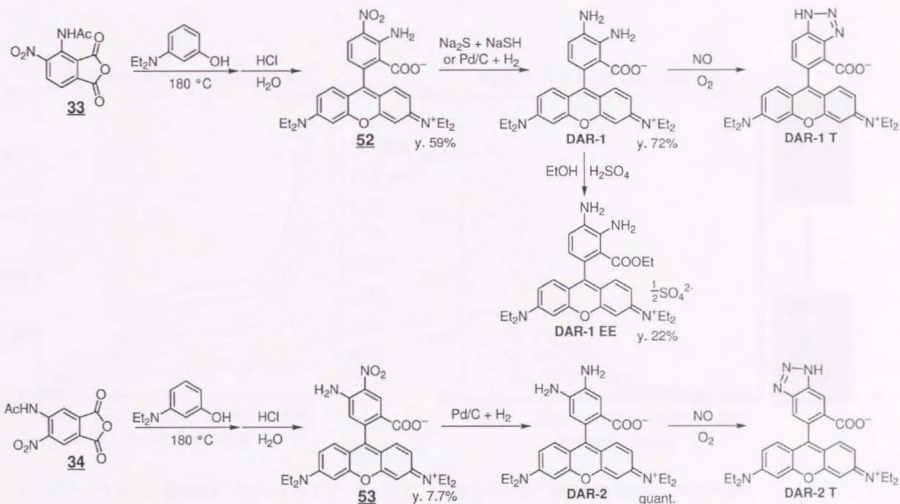
(6) DAR-4M 誘導体の開発とイメージングへの応用

私は前述の問題点の原因がテトラメチルローダミン骨格の脂溶性の高さにあるかもしれないと考え、テトラメチルローダミン骨格に変えることを考えた。Ca²⁺感受性蛍光色素 Rhod-2³⁹⁾ はテトラメチルローダミン骨格であることを参考にした。

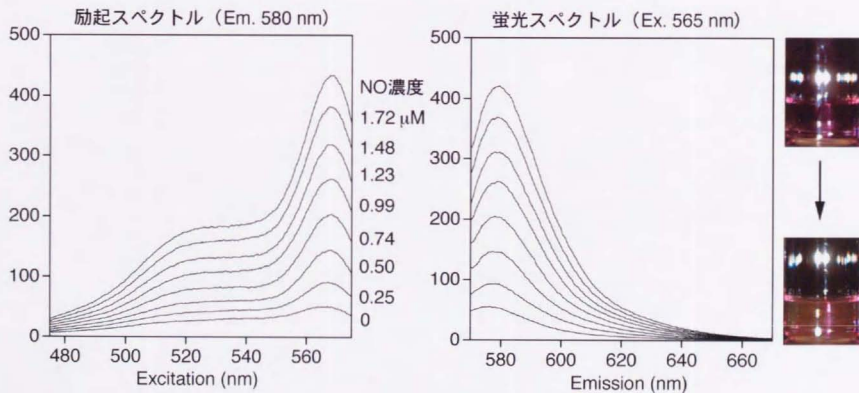
そこで、Scheme 4-3 に示すスキームで DAR-4M 誘導体を合成した。DAR-4M の特性は Fig. 4-6, Table 4-1 に示すように若干短波長にシフトしたものの、量子収率に優れ、NO に対する感度もさらに良くなり、DAR-1 の 2 倍になった (Fig. 4-8)。DAF-FM に比較すれば感度は半分ではあるが、pH 特性、光安定性や波長の点からユニークな優れた特性を有しており、有用な色素である。

DAR-4M AM を血管内皮細胞に適用したところ、細胞への負荷は従来の DAR 誘導体に比べ、はるかに行きやすくなり、bradykinin によって生成する NO をイメージングすることに成功した (Fig. 4-9)。

しかし、DAF-FM DA と比べると、濃度、負荷時間、ポストインキュベーション時間等の負荷条件の検討をより丁寧に行う必要があることが分かった。というのも、ローダミンは脂溶性があり、正電荷を分子内に有するため、負荷電を帯びているミトコンドリアなどの膜に分極化することが明らかとなっているからである。今後、DAR に特有の性質を生かしつつ、慎重に様々な細胞や組織に応用していきたい。



Scheme 4-1 DAR-1, DAR-2の合成経路



ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) 中で測定。NO溶液添加後、蛍光強度が安定してから測定。

Fig. 4-1 DAR-1にNOを添加したときの励起・蛍光スペクトル変化

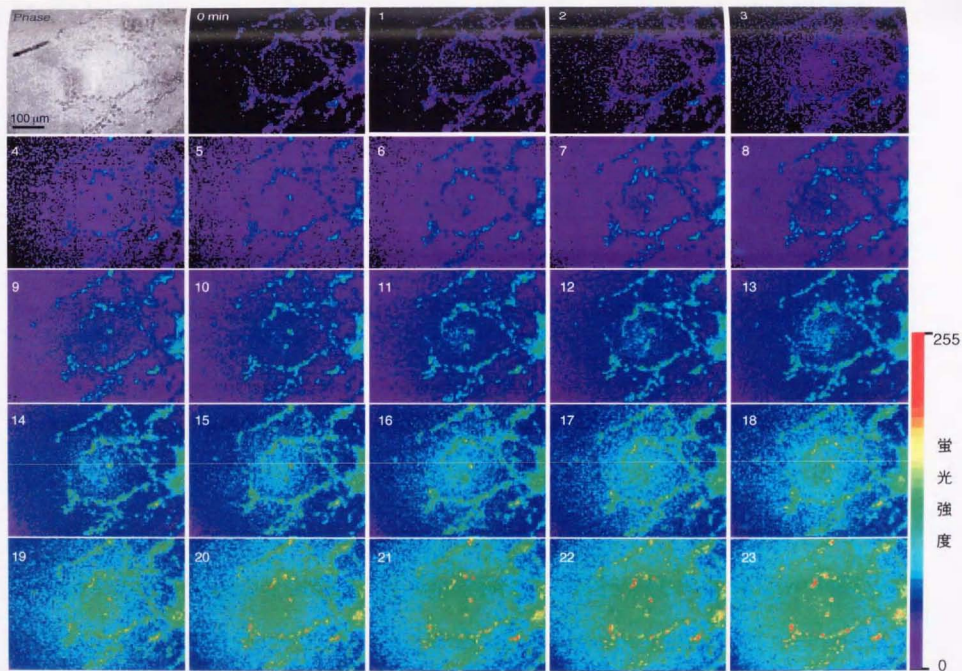
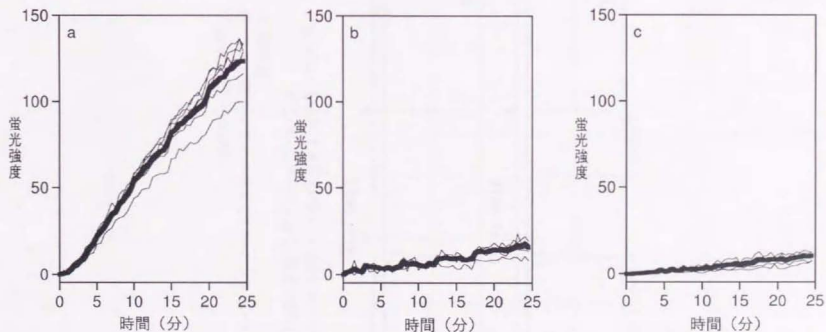


Fig. 4-2 ラット大動脈平滑筋細胞が刻々と生成するNOのDAR-1 EEによるイメージング



a: 刺激した細胞の1 mM L-Argを含む培養液中での変化 (Fig. 4-5 に対応するデータ)

b: 刺激した細胞の10 mM L-NMMAと1 mM L-Argを含む培養液中での変化

c: 無刺激の細胞の1 mM L-Argを含む培養液中での変化

細線は個々の細胞の蛍光強度を示し、
太線はその平均値を示す。

Fig. 4-3 各条件下におけるDAR-1 EEを負荷した個々の血管平滑筋細胞の蛍光強度変化

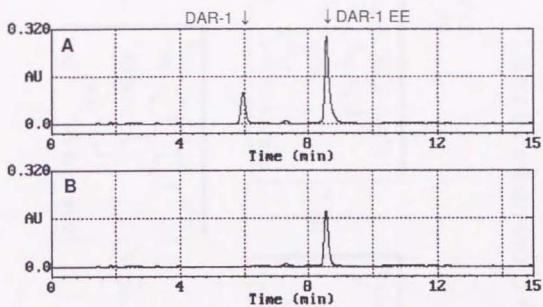
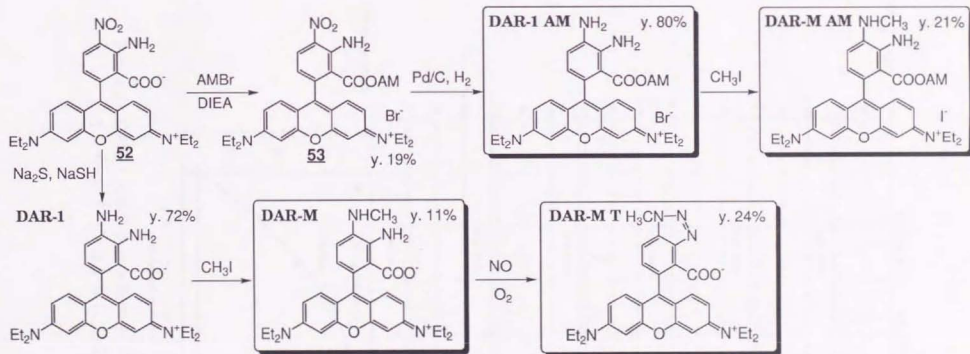


Fig. 4-4 DAR-1 EEのラット脳ホモジネートと
インキュベーション後のHPLCチャート

A: 標準品

B: ラット脳ホモジネートと30分インキュベーション後の
DAR-1 EE (10 μ M)



AM: acetoxymethyl $\text{CH}_3\text{COOCH}_2-$
 DIEA: diisopropylethylamine

Scheme 4-2 DAR-M誘導体の合成経路

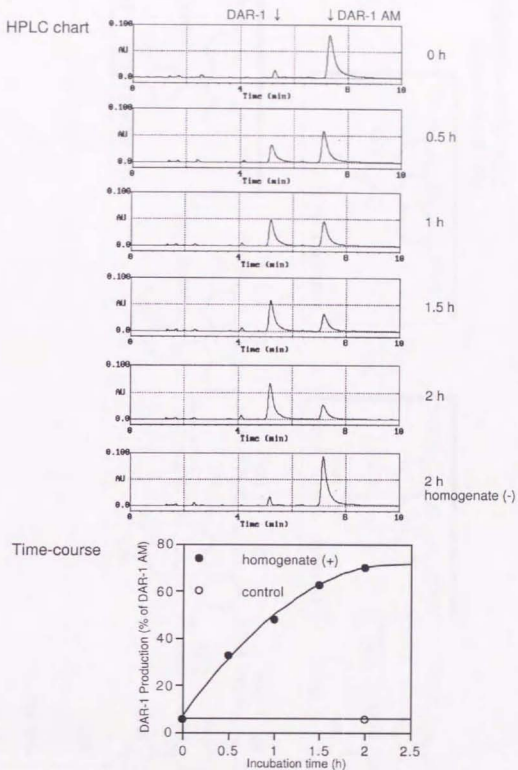
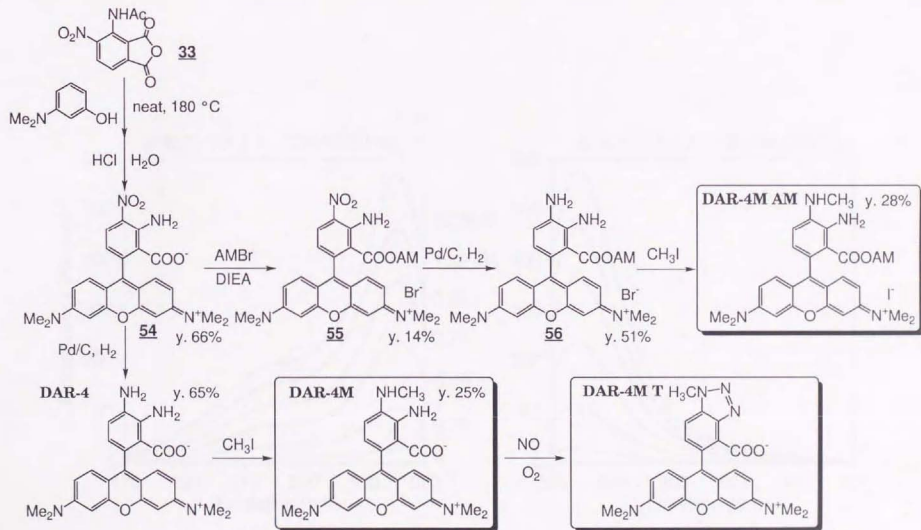
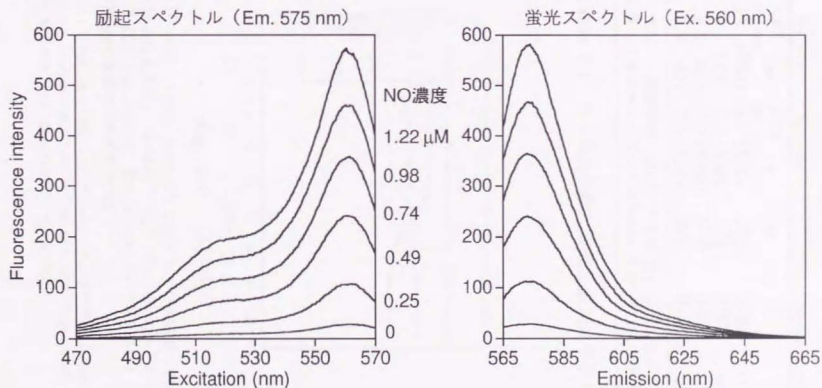


Fig. 4-5 DAR-1 AMのラット脳ホモジネートとインキュベーション後に生成するDAR-1



AM: acetoxymethyl
 DIEA: diisopropylethylamine

Scheme 4-3 DAR-4M誘導体の合成経路



ナトリウムリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 M) 中で測定。NO溶液添加後、蛍光強度が安定してから測定。

Fig. 4-6 DAR-4MにNOを添加したときの励起・蛍光スペクトル変化

DAR	Extinction coefficients and absorption maxima		Fluorescence maximum of triazole form	Relative quantum efficiencies	
	Diamine	Triazole		Diamine	Triazole
	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	$\times 10^4$ $M^{-1} cm^{-1}$	nm		
1	12 (550)	8.7 (556)	575	0.004	0.25
2	10 (549)	7.1 (552)	571	0.006	0.34
M	9.8 (550)	7.5 (558)	574	0.007	0.29
4M	7.8 (543)	7.6 (554)	572	0.0005	0.42

ナトリウムリン酸緩衝液 (20 °C, 0.1 M, pH 7.4) 中でのデータ。
量子収率はエタノール中での rhodamine B を 0.97 として算出。

Table 4-1 モル吸光係数、波長と蛍光量子収率

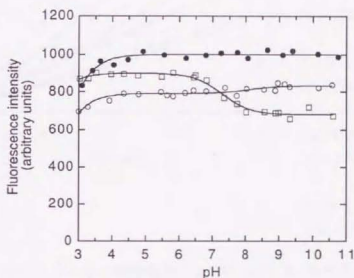


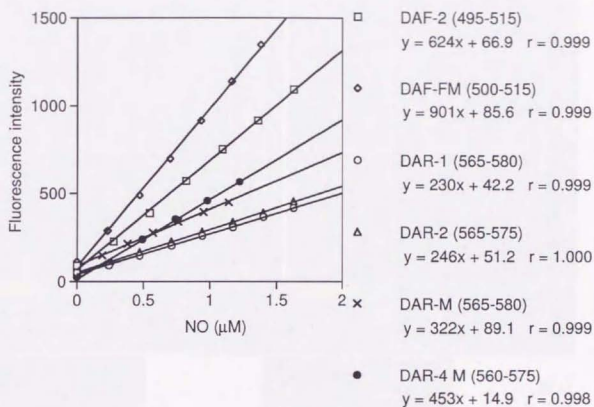
Fig. 4-7 pH 特性

トリアゾール体 (1 μM) を 0.1 M リン酸ナトリウム溶液に溶かし、pH と蛍光強度を測定。(DAR-1 T (○) : Ex. 565 nm - Em. 580 nm, DAR-2 T (□) : Ex. 565 nm - Em. 575 nm, DAR-M T (●) : Ex. 560 nm - Em. 575 nm) 次式でそれぞれ fitting.

$$\text{DAR-1 T, Intensity} = 783 / (1 + 10^{2.13 - \text{pH}}) + 42.7 / (1 + 10^{6.69 - \text{pH}}), R = 0.956;$$

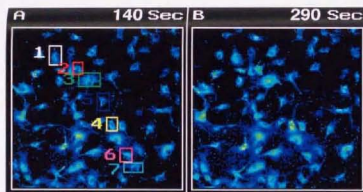
$$\text{DAR-2 T, Intensity} = 899 / (1 + 10^{1.62 - \text{pH}}) - 218 / (1 + 10^{7.27 - \text{pH}}), R = 0.987;$$

$$\text{DAR-M T, Intensity} = 1000 / (1 + 10^{2.39 - \text{pH}}), R = 0.951.$$

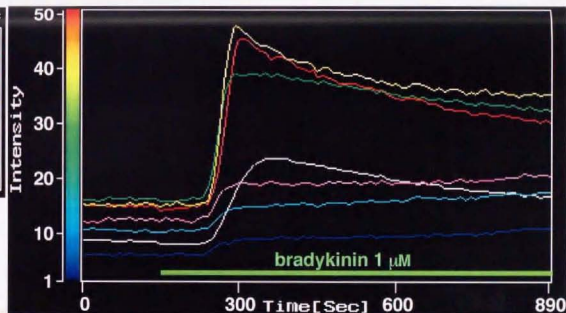


ナトリウムリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.4) 中で測定。

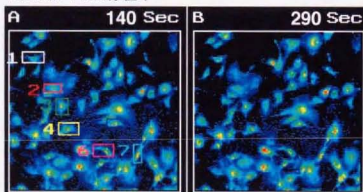
Fig. 4-8 DAR (10 μM) によるNOの検量線



蛍光強度を擬似カラーで示している。



L-NAME 1 mM存在下



10 μ M DAR-4M AMを含むDMEMに細胞の上清を37 $^{\circ}$ Cで30分間置換した後、1時間色素を含まないDMEMでポストインキュベーションを行って細胞内に色素を負荷する。その後、蛍光顕微鏡下にシャーレを移して測定を開始した。

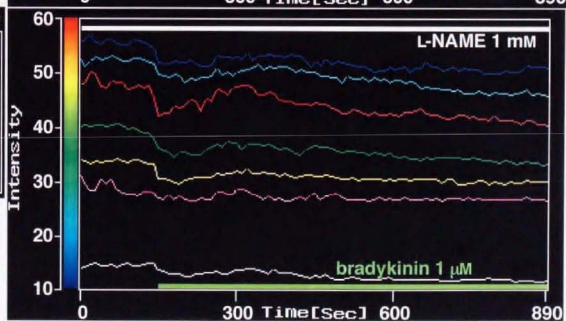


Fig. 4-9 DAR-4M AMによるウシ大動脈内皮細胞が生成するNOのイメージング

第5章 総括

本研究で得られた成果を以下にまとめる。

- 1 NO 感受性蛍光色素 DAF, DAR の開発に成功した。中でも, DAF-FM DA と DAR-4M AM が最もバイオイメーシングに適している。
- 2 DAF を用いる細胞外に生成する NO の大量アッセイ系を開発した。
- 3 上記色素を各種培養細胞, 組織切片に応用し, 生成する NO を蛍光画像として得ることに初めて成功し, 細胞内 Ca^{2+} との同時イメーシング法も開発した。
- 4 虚血時におけるラット海馬において, 酸素濃度の違いによって NO の生成パターンが異なること分かり, 酸素濃度が低い場合には虚血時はほとんど NO は生成せず, 再灌流時に大量の NO が生成することが示唆された。

尚, 私が開発した DAF 類, DAR 類に関しては国内および海外において特許を出願している。また, DAN-1 EE は米国 Cayman 社より, DAF-2 および DAF-2 DA は第一化学薬品株式会社および米国 Sigma 社より既に上市されており, DAF-FM 誘導体および DAR-4M 誘導体についても近い将来市販される予定である。

実験の部

●紫外可視吸光スペクトル

島津 UV-265 で測定。

●蛍光スペクトル

日立 F-4500 で測定。

●蛍光マイクロプレートリーダー

Titertek Fluoroscanner II, Flow Laboratories, McLean, VA を使用。

DAF による測定時の設定波長: Ex. 485 nm - Em. 538 nm

●¹H-NMR

JEOL JNM GSX-400 または JNM-LA300 spectrometer で測定。

スペクトルの記載方法

¹H-NMR (operating frequency, 溶媒)

chemical shift (δ) (内部標準物質としてテトラメチルシランを用い, ppm 単位で示した。)

プロトン数, 分裂様式 (s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublet; t, triplet; q, quartet; quin, quintet; m, multiplet; br, broad), 帰属。

●赤外スペクトル

KBr を matrix とし, JASCO FT/IR-5300 で測定。

●質量分析

EI: JEOL DX-300, FAB: JEOL SX-102A で測定。

●相対蛍光量子収率の測定 成書⁵⁶⁾によった。

●標準 NO 溶液の調製

NO gas (高千穂化学) を Ar 置換した 0.1 M, pH 7.4 のナトリウムリン酸緩衝液にゴムキャップしたガラス容器内でバブルする。濃度は HRP 法³⁷⁾により定量した。

●DAN を用いた血管平滑筋細胞より生成する NO の測定

細胞培養: 雄性 Wistar ラットの動脈平滑筋細胞を Ross らの方法により摘出し³⁷⁾, 10% FBS と抗生物質を含む DMEM 培地で培養する。それをマイクロプレート上に移して培養する。実験の前に無血清の DMEM 培地に取り替え, 24 時間培養後, 25 U/ml IL-1β, 30 ng/ml TNF-α, 150 U/ml IFN-γ, 12.5 μg/ml LPS を培地に加え, 細胞を刺激し,

さらに12時間ほど培養する。実験には10-20代の細胞を用いた。

測定：L-Arg, DAN, PTIO等の試薬を溶かしたKRPに上清を取り替え、一定時間後培養液を採取し、蛍光セルに移し、蛍光(Ex. 375 nm - Em. 425 nm)を測定する。なお、1条件につき3サンプル測定し、その平均を示した。

●DANを用いた血管内皮細胞より生成するNOの測定

細胞培養：ウシ大動脈内皮細胞を摘出したものを継代培養する。それをマイクロプレート上に移して培養する。

測定：L-Arg, DAN, bradykinin等の試薬を溶かしたPBS(+)またはKRPに上清を取り替え、一定時間後培養液を採取し、蛍光セルに移し、蛍光(Ex. 375 nm - Em. 425 nm)を測定する。なお、1条件につき2サンプル測定し、その平均を示した。

●血管平滑筋細胞のイメージングの方法

細胞培養：雄性Wistarラットの大動脈平滑筋細胞をRossらの方法により摘出し⁵⁷⁾、10% FBSと抗生物質を含むDMEM培地で培養する。底がガラス製のシャーレ(MaTeK P35G-101)上に移して培養する。実験の前に無血清のDMEM培地に取り替え、24時間培養後、25 U/ml IL-1 β , 30 ng/ml TNF- α , 150 U/ml IFN- γ , 12.5 μ g/ml LPSを培地に加え、細胞を刺激し、さらに12時間ほど培養する。実験には10-20代の細胞を用いた。

イメージング：それぞれの色素(10 μ M)のKRP溶液(0.2% DMSO 含)に細胞の培養液を取り替え、37℃で1時間(DAR-1 EEの場合のみ15分間。さらにポストインキュベーションを30分以上行った。)インキュベートして色素を負荷する。wash out後L-ArgまたはL-NMMAを含むKRPに取り替え、DAN-1 EEの場合：励起フィルター330-385 nm, dichroic mirror 400 nm, バリアフィルター420 nm (long pass), DAF-2誘導体の場合：励起フィルター490 nm, dichroic mirror 505 nm, バリアフィルター515 nm (long pass), DAN-1 EEの場合：励起フィルター536-556 nm, dichroic mirror 560 nm, バリアフィルター550-610 nm (Omega XF-37)の付いた蛍光顕微鏡(オリンパス IX-70)で観察する。なお、ステージは37℃に保った。露光時間、撮像間隔はDAN-1 EEの場合それぞれ264 ms, 10 s, DAF-2誘導体の場合132 ms, 30 s, DAR-1 EEの場合それぞれ132 ms, 30 s, に設定した。Charge-coupled device (CCD) カメラに取り込んだ画像はMCID (Imaging Research) で処理、記録した。

●DAFを用いたマクロファージ様(RAW 264.7)細胞からのNOの測定

96穴マイクロプレート上でRAW 264.7細胞を10% FBS, 13 mM NaHCO₃, 20 mM glucose, 70 μ g/ml benzylpenicillin, 100 μ g/ml streptomycinを含むDMEM中5% CO₂/95% air incubatorにて培養する(1 \times 10⁶ cells/well)。実験の前に無血清のDMEMに置換する。24時間後10 ng/ml LPS, 10 U/ml IFN- γ を含むDMEMで培養細胞を刺激し、iNOSを誘導する。16時間後、2回KRPで洗い、DAF-2 (10 μ M), L-Arg (1 mM), NOS阻害剤等を溶かしたKRP (200 μ l/well)に取り替えて更に培養する。2時間後、上清を蛍光測定用

マイクロプレートに取り (180 μ l/well), マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定する。

●DAFを用いた血管内皮細胞からのNOの測定

ウシ大動脈内皮細胞を24穴マイクロプレート上に培養する。実験の12時間前に無血清のDMEMに取り替える。2回PBSで洗い、DAF-4 (1 μ M), L-Arg (100 μ M), bradykinin (1 μ M), NOS阻害剤等を溶かしたPBS (200 μ l/well)に取り替えて更に培養する。一定時間後、培養液の上清を蛍光測定用マイクロプレートに取り (180 μ l/well), マイクロプレートリーダーにて蛍光強度を測定する。

●タンパク定量法

細胞のタンパク量は, BSAを標品としてBCA Protein Assayにより行った⁵⁸⁾。

A. Reagent A 1% BCA Na₂, 2% Na₂CO₃, 0.16% Na₂ tartrate, 0.4% NaOH, 0.95% NaHCO₃ (50% NaOHでpH=11.25に調製)

B. Reagent B 4% CuSO₄

C. BSA Standard Solution BSA濃度はBSAの $\epsilon_{280}=43600$, BSAの分子量66000より, 以下の式より求める。

$$c \text{ (mg/ml)} = A/\epsilon l = A \text{ (280 nmの吸光度)} \times 66000/43600$$

D. Working Reagent A 50 mlに対してB 1 mlを加える。

E. Sample Solution 細胞のはえていたマイクロプレートの各wellに500 μ lずつ蒸留水を入れ, シリコンラバーで細胞を底面からはがし, ソニファイアーで超音波処理する。

CよりBSA希釈系列を作製する (100-400 μ g/ml)。このBSA希釈系列またはEをRIA tubeに50 μ l入れる。D 1 mlをそれぞれに加え, すぐに攪拌し, 37°Cで30分間incubation。30分後, 室温に戻し, 562 nmの吸光度を測定する。BSA希釈系列の検量線からタンパク量を計算する。

試薬, 器具: Reagent A (Pierce), Sonifier (Branson, cell disruptor 200), UV/VIS spectrophotometer (Jasco, V-550)

●DAF-2 DA, DAR-1 EE及びDAR-1 AMの加水分解の測定

Rat brain homogenateの調製: 雄性Sprague-Dawleyラット(8週齢, 250-280 g)を断頭後, 全脳を素早く摘出し外科鉗で細片にする。脳重量の5倍量の0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) with 0.1% Triton X-100を加え, ホモジナイズする。40000 g (20000 rpm)で10分間遠心し上清をとり酵素溶液とする。

酵素反応: 10 μ M DAF-2 DA (又はDAR-1 EE, DAR-1 AM)の0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6) 1.8 mlを37°Cで保温し, 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.6)を100 μ l, 酵素溶液100 μ lを加え, 吸光度の変化を30分間追う。

遠心機 (Hitachi, 55P-72C), UV/VIS spectrophotometer (Simadzu, UV-1600)

●共焦点レーザー顕微鏡による細胞の観察

NORAN Instruments の装置を使用。(Ex. 488 nm (Ar laser), Em. 515 nm 以上, 倍率 40 倍)

●NMDA 刺激時の海馬スライスにおける NO イメージング

組織切片の作成: 雄性 SD ラット (8 週齢) を断頭後, 全脳を素早く摘出し, 氷冷した人工髄液の中に入れる。人工髄液の組成は 127 mM NaCl, 1.6 mM KCl, 1.24 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM MgSO_4 , 2.4 mM CaCl_2 , 26 mM NaHCO_3 , and 10 mM glucose で 95% O_2 /5% CO_2 の混合ガスをバブルしたものである。氷冷後直ちに, 約 500 μm ずつの冠状断スライスに切断し, 人工髄液 (34 °C) 中に入れ, 約 1 時間かけて安定化を待つ。切断は, 剃刀とラットの脳を 500 μm ずつに切断できるようになった金属製のガイドを用いてわれわれは行ったが, 瑩板よりスライサーが市販されているのでそれを用いるとよい。

イメージング: DAF-2 DA (10 μM) を含む人工髄液に大脳スライスを入れ, 細胞の上清を取り替え, 30 分かけて色素を負荷した。負荷後, 灌流により, 残った色素を洗い流した。染色されたスライスは白金・イリジウム合金の針金を環状にしたものにナイロン製のネットを張ったもので押さえつけて固定し, 励起フィルター 450–490 nm, ダイクロイックミラー 505 nm, バリアフィルター 520–560 nm の付いた正立蛍光顕微鏡 (ニコン製, 光源: Hg ランプ, 水浸対物レンズ: 10 倍) で観察した。ビデオカメラ (Fastcam-ultima, Photron) から取り込んだ画像は解析装置 (DIG-98, Ditect) で処理した。

●培養海馬スライスの NO イメージング

培養海馬スライスの作成⁵⁹⁾:

Medium MEM (Hanks' 塩) 培地

HBSS

馬血清

培地として各々 MEM:HANK's:HS=50:25:25 になるように混合し, ペニシリン/ストレプトマイシン (最終濃度 50 U, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を加える。また最終濃度 6.5 g/l となるように Glucose を加える。血清は熱非動化しておく。Ara-C は, $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 加えた方がよい。

- ① ディスポシャーレに海馬取り出し用の培地 25 ml, 6 穴型セルデスクに Millicell を各々の穴に入れて 1 ml の培地を加え, よくしめらせて CO_2 incubator 内で保温しておく。
- ② 生後 5~7 日までの Wistar ラットをエーテルで麻酔し, 100 ml ピーカーに入ったエタノールの中にラットごとつけて消毒する。
- ③ 頭皮, 及び頭蓋をハサミで切って脳を摘出し, 保温しておいた培地入りのシャーレに脳を入れる。
- ④ ディスポメスで正中線に沿って左右 2 つにして裏返し, 片方のピンセットで脳を固定し, もう一方で小脳などの余分な所を取り除く。軟膜もこのとき取り除く。
- ⑤ 先曲がりピンセットの背側を使ってめくように海馬部を取り出す。取り出した海馬はディスポメスでトリミングする。

- ⑥スライサーの台にオートクレープ済みのシリコンラバーをのせて海馬を置く。
- ⑦余分な水分をピペットで吸い取り、400 μm の厚さでスライサーのスピード約1回/secになるように調節して切っていく。
- ⑧海馬を切ったら培地を足してスパーテルですくって培地入りのシャーレに戻す。
- ⑨メスの背を使って海馬をバラバラにする。
- ⑩スパーテルの柄側を使ってスライスをしてメンブレンフィルターの入った6穴型セルデスクに移す。

⑪3日おきに全量培地交換する。大体スライスはその後1週間から2ヶ月は使える。

測定方法：画像はHgランプ光源下、励起用フィルター（450-490 nm）、ダイクロックミラー（505 nm）、蛍光用フィルター（520-560 nm）を通して、CCDカメラにより取り込み、Argus-50（浜松ホトニクス）により解析した。

●血管内皮細胞のイメージングの方法

細胞培養：ウシ大動脈血管内皮細胞を10% FBSと抗生物質を含むDMEM培地で培養する。底がガラス製のシャーレ（MarTek P35G-101）上に移して培養する。実験には10-16代の細胞を用いた。

イメージング：それぞれの色素（DAF-FM DA 10 μM 、同時イメージング：DAF-FM DA 10-15 μM + Fura-Red AM 5-10 μM 、DAR-4M AM 10 μM ）のPBS(+)溶液（0.2% DMSO 含）に細胞の培養液を取り替え、37℃でインキュベートして色素を負荷する（DAF-FM DA 1時間、NOと Ca^{2+} の同時イメージング：1時間、DAR-4M AM 30分間）。wash out後、ポストインキュベーションを行い（DAF-FM DA、NOと Ca^{2+} の同時イメージング：20分間、DAR-4M AM 1時間）、ステージを37℃に保った蛍光顕微鏡（オリンパスIX-70）で観察する。DAF-FMを用いる場合、励起フィルター490 nm、dichroic mirror 505 nm、バリアフィルター515 nm（long pass）、DAR-4M AMの場合、励起フィルター520-550 nm、dichroic mirror 565 nm、バリアフィルター580 nm（long pass）を用いた。cooled CCD（浜松ホトニクス C4880）またはCCD（浜松ホトニクス C2440）カメラに取り込んだ画像はArgus-50（浜松ホトニクス）で処理、記録した。

●海馬スライスにおける虚血モデルのNOイメージング

方法：Wistar rat（200-250 g, male）をエーテル麻酔し、断頭する。全脳を摘出し、シャーベット Ringer 液中で氷冷。左右の半球に切り分け、ピンセットとスパーテルを用いて間脳を除いてから海馬を取り出す。海馬を寒天に置き、ロータースライサー（堂坂）で300 μm の厚さに切断する。5% CO_2 +95% O_2 をバブルしているRinger液中に海馬スライスを入れ、1時間放置。10 μM DAF-FM DAを1時間かけて負荷する。ポストインキュベーションを30分以上行い、倒立顕微鏡（オリンパスIX-70）のステージ上のチャンパーに移し、34℃ or 37℃のRinger液を2.5 ml/minで灌流する。対物レンズ：4倍、dichroic mirror：505 nm。15分後、測定を開始し、2分～12分（10分間）虚血用Ringer液を灌流する。（虚血用Ringer液：10 mM glucoseを10 mM 2-deoxyglucoseに変更し、5% CO_2 +95% N_2 or

5% CO₂+95% O₂ をバブルしたもの。) SIT カメラ (浜松ホトニクス C2400-08) で撮ったイメージングデータは Argus 50 (浜松ホトニクス) にて解析した。なお, L-NAME や D-NAME は灌流開始時から用いている。

●DAR-1, DAR-1 EE の HPLC による分離条件

Pump JASCO PU-980

Detector JASCO MD-910

Column GL Sciences Inc. Inertsil ODS-2 (4.0×150 mm)

Eluent 10mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) -acetonitrile (25:75, v/v)

↓ 15 min.

(0:100, v/v)

Flow rate 1.0 ml/min

Absorbance 500-600 nm

Injection volume 10 µl

●DAR-1, DAR-1 AM の HPLC による分離条件

Pump JASCO PU-980

Detector JASCO MD-910

Column GL Sciences Inc. Inertsil ODS-2 (4.0×150 mm)

Eluent 0.1% H₃PO₄-methanol (60:40, v/v) —10 min.→ (40:60, v/v)

Flow rate 1.0 ml/min

Absorbance 500-600 nm

Injection volume 10 µl

合成法および機器データ

第2章 第2節

4-[(3-Amino-2-naphthyl)aminomethyl]benzoic acid (DAN-1)

9.26 g の 2,3-Diaminonaphthalene (DAN) (58.5 mmol) を 20 ml の DMF に 100 °C で溶かし、その温度のまま、4-(Bromomethyl)benzoic acid (39.0 mmol) の DMF 溶液 (20 ml) を滴下する。その後 145 °C に上げて、2 h 加熱し、冷後、氷冷水にあげ、pH 4 にして析出している固体を濾取、乾燥。(y. 61% (4-(Bromomethyl)benzoic acid に対して))

シリカゲルクロマトグラフィーにて精製。EtOH により再結晶して薄茶色の丸状の固体を得る。

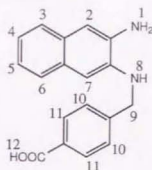
• ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)

δ 4.50 (2H, d, *J* = 3.9 Hz, 9); 5.13 (2H, s, 1); 5.80 (1H, t, *J* = 3.9 Hz, 8); 6.54 (1H, s, 7); 6.86 (1H, s, 2); 6.97 (2H, m, 4 & 5); 7.31 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, 6); 7.36 (1H, d, *J* = 7.2 Hz, 3); 7.52 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, 10); 7.90 (2H, d, *J* = 8.3 Hz, 11); 12.7 (1H, br, 12)

• MS *m/z* 292 (M⁺); 248 (M⁺-CO₂) • IR (cm⁻¹) 1698 (C=O) • m.p. 223-4 °C

• EA Calcd. for C₁₈H₁₆N₂O₂: C, 73.95; H, 5.52; N 9.59.

Found: C, 74.01; H, 5.39; N 9.30.



4-[(3-Amino-2-naphthyl)aminomethyl]benzoic acid ethyl ester (DAN-1 EE)

60 mg の DAN-1 (0.21 mmol) を 1 ml の EtOH に溶かし、0.1 ml の H₂SO₄ を加え、100 °C で 3.5 h 加熱する。冷後 EtOH を溜去し、水にあげ、析出した結晶を濾取。(82 mg, quantitatively) それを NaHCO₃ 水溶液に溶かし、CH₂Cl₂ で抽出後、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製、減圧溜去。

一塩酸塩: 最少量の Et₂O にとかし、濃塩酸を加え、析出する固体を濾取、乾燥。Et₂O-EtOH より再結晶すると無色針状晶が得られる。

• ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

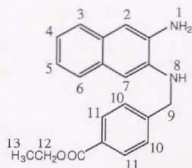
δ 1.39 (3H, t, *J* = 7.2 Hz, 13); 3.7 (2H, br, 1); 4.0 (1H, br, 8); 4.38 (2H, q, *J* = 7.2 Hz, 12); 4.51 (2H, s, 9); 6.85 (1H, s, 7); 7.10 (1H, s, 2); 7.20 (2H, m, 4 & 5); 7.51 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 10); 7.55 (2H, m, 3 & 6); 8.04 (2H, d, *J* = 8.8 Hz, 11)

• MS *m/z* 320 (M⁺) • IR (cm⁻¹) 1714 (C=O) • m.p.

143 °C (一塩酸塩, decomp.)

• EA Calcd. for C₂₀H₂₁ClN₂O₂: C, 67.31; H, 5.93; N 7.85.

Found: C, 66.89; H, 6.02; N 7.61.



4-[(1-Naphtho[2',3':4,5]triazolyl)methyl]benzoic acid (DAN-1 T)

DAN-1 を MeOH に溶かし、酸素存在下 NO gas をバブルする。溶媒溜去後、エタノールより再結晶すると無色針状晶が得られる。

 $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

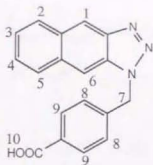
δ 6.19 (2H, s, 7); 7.42 (2H, d, J = 8.2 Hz, 8); 7.48 (1H, td, J = 8.3, 1.6 Hz, 3); 7.54 (1H, td, J = 8.3, 1.6 Hz, 4); 7.90 (2H, d, J = 8.2 Hz, 9); 8.04 (1H, d, J = 8.3 Hz, 5); 8.16 (1H, d, J = 8.3 Hz, 2); 8.36 (1H, s, 6); 8.79 (1H, s, 1); 13.0 (1H, br, 10)

• MS m/z 303 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1688 (C=O)

• m.p. 300 °C以上

* EA Calcd. for $C_{18}H_{13}N_3O_2$: C, 71.27; H, 4.32; N 13.86.

Found: C, 71.01; H, 4.21; N 13.86.



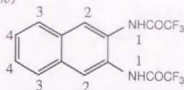
第2章 第3節

2,3-Naphthalenebis(trifluoroacetamide) 1

DANをTHFに懸濁させ、3当量のPyridineを加える。Ar下で無水TFAを2.2当量加え、2-3h還流する。溶媒溜去後、 CH_2Cl_2 に溶かし、水で洗浄、乾燥後、溶媒を溜去し、Benzeneより再結晶すると、無色針状晶が得られる。(y. 80%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.58 (2H, m, 4); 7.85 (2H, m, 3); 8.02 (2H, s, 2); 8.60 (2H, s, 1)

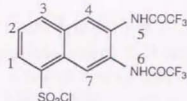


6,7-Bis(trifluoroacetamido)-1-naphthalenesulfonyl chloride 2

1gの1に対し5mlの CHCl_3 を入れ、懸濁させ、氷冷する。そこに3mlの ClSO_3H を滴下後5minしたら室温に戻し、2h攪拌。氷にあげ、アモルファスを濾取後、 CH_2Cl_2 に溶かし、冷水で洗浄、乾燥後、溶媒を溜去し、濾過カラム(シリカゲル)をする。溶媒溜去後、 CHCl_3 より再結晶すると、無色針状晶が得られる。(y. 46%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.72 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, 2); 8.25 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 1); 8.43 (1H, s, 7); 8.45 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, 3); 8.79 (1H, s, 4); 8.81 (1H, s, 5); 8.95 (1H, s, 6)



6,7-Diamino-1-naphthalenesulfonamide 3

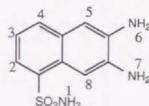
2を熱 NH_3 水中煮沸する。乾燥させ、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製。minor productである。希EtOH水より再結晶。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 5.22 (2H, s, 6); 5.25 (2H, s, 7); 6.90 (1H, s, 8); 7.04 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, 3); 7.19 (2H, s, 1); 7.55 (1H, s, 5); 7.57 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 2); 7.61 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 4)

• MS m/z 237 (M^+)

• m.p. $183-4^\circ\text{C}$ (decomp.)

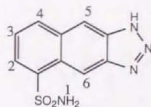


Triazolo[4,5':6,7]-1-naphthalenesulfonamide 4

3にNO gasをバブルする。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$ & D_2O)

δ 7.59 (1H, dd, $J = 8.8, 7.3$ Hz, 3); 8.16 (1H, d, $J = 7.3$ Hz, 2); 8.39 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 4); 8.73 (1H, s, 6); 9.16 (1H, s, 5)



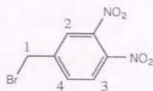
3,4-Dinitrobenzyl bromide 5

15gの3,4-Dinitrotoluene (82 mmol), 14.7gのN-Bromosuccinimide (83 mmol), 0.5g

の Benzoyl peroxide を 780 ml の CCl_4 に溶かし、ハロゲンランプに当て、還流する。(20 h) 濾過し、濾液の溶媒を溜去し、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製。(約 y. 50%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 4.52 (1H, s, 1); 7.77 (1H, dd, $J = 8.4, 1.8$ Hz, 4); 7.93 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 3); 7.94 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, 2)

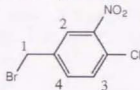


4-Chloro-3-nitrobenzyl bromide 6

15 g の 4-Chloro-3-nitrobenzyl alcohol (80 mmol) を 200 ml の CHCl_3 に溶かし、室温にて 8 g の PBr_3 を滴下する。溶媒溜去後、濾過カラム (シリカゲル)。(19.8 g, 99%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 4.47 (1H, s, 1); 7.59 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3); 7.75 (1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 4); 7.92 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 2)

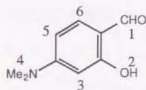


4-(N,N-Dimethylamino)salicylaldehyde 7

47 ml の DMF を氷冷下攪拌し、そこに 19 ml の POCl_3 (0.21 mol) をゆっくり滴下した後、室温にて 30 min 攪拌。そこへさらに 25 g の 3-(N,N-Dimethylamino)phenol (0.18 mol) を最少量の DMF に溶かしたものを 1 h かけて滴下。その後、さらに 80 °C で 1 h 加熱し、水にあげ、6 h 攪拌 (Vilsmeier reaction)。氷冷し、沈殿物を濾取、乾燥。(12.6 g, y. 41%) n-Hexane より再結晶。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 3.08 (6H, s, 4); 6.09 (1H, d, $J = 2.6$ Hz, 3); 6.28 (1H, dd, $J = 8.8, 2.6$ Hz, 5); 7.30 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 6); 9.35 (1H, s, 1)



5-Chloro-6-nitrosalicylaldehyde 8

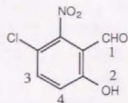
9.5 g の 4-Chloro-3-nitrophenol (55 mmol) と 8.3 g の Hexamethylenetetramine (59 mmol) を 100 ml の酢酸に溶かし、そこへ 15 ml の無水酢酸を加え、128 °C で 3 h 加熱し、MeOH, 水, 濃塩酸をそれぞれ 20 ml ずつ混合したものを加え、80 °C で 20 min 攪拌。その後 MeOH を 125 ml 加え、室温に 30 min 放置。溶媒溜去後、Benzene で抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製⁶⁰⁾。(0.73 g, y. 6.6%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.15 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 4); 7.62 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3); 9.80 (1H, s, 1); 11.63 (1H, s, 2)

• MS m/z 201:203=3:1 (M^+)

• m.p. 115-6 °C

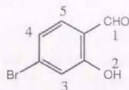


4-Bromosalicylaldehyde 9

25.8 g の 3-Bromophenol (0.145 mol) を 340 ml の 13% NaOH 水溶液に溶かし, CHCl_3 を 25 ml 加え, Ar 雰囲気下で 4 h 還流。酸性にして CH_2Cl_2 で抽出し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(2.41 g, y. 8% (6-bromo 体); 1.53 g, y. 6% (4-bromo 体))

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.17 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 4); 7.20 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 3);
7.42 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 5); 9.86 (1H, s, 1); 11.12 (1H, s, 2)

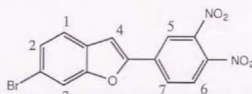


6-Bromo-2-(3,4-dinitrophenyl)benzofuran 10

1.5 g の 9 (7.6 mmol) を 4 ml の DMF に溶かしたものを 0.20 g の Na (8.7 mmol) を EtOH (4 ml) に溶かした液へ滴下する。その後, 2.0 g の 5 (7.7 mmol) を 5 ml の DMF に溶かしたものを更に滴下し, 110 °C で 3 h 加熱し, EtOH を溜去後, 水にあけて CH_2Cl_2 で抽出し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.30 (1H, s, 4); 7.45 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 2);
7.42 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 1); 7.77 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 3);
8.07 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 6); 8.13 (1H, dd, $J = 8.8, 1.7$ Hz, 7); 8.27 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 5)

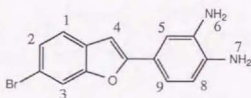


6-Bromo-2-(3,4-diaminophenyl)benzofuran 11

10 を Fe/HCl (EtOH 混合溶液) 還元する。アルカリ性にして, CH_2Cl_2 で抽出し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 3.55 (4H, br, 6&7); 6.75 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, 8);
6.76 (1H, s, 4); 7.21 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 5); 7.23
(1H, dd, $J = 7.7, 1.7$ Hz, 9); 7.31 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 2); 7.38 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 1); 7.63 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 3)

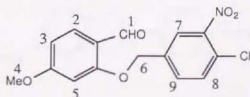


4-Methoxy-2-(4-chloro-3-nitrobenzyloxy)benzaldehyde 12

10.2 g の 4-Methoxysalicylaldehyde (67.1 mmol) を 34 ml の DMF に溶解し, これを 1.66 g の Na (72.2 mmol) を 34 ml の EtOH に溶かしたものに滴下する。その後, 18.5 g の 6 (73.8 mmol) を 30 ml の DMF に溶かしたものを更に滴下し, 110 °C で 2 h 加熱し, EtOH を溜去後, 水にあけて CH_2Cl_2 で抽出し, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。
 CHCl_3 より再結晶。(15.5 g, y. 72%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 3.19 (3H, s, 4); 5.19 (2H, s, 6); 6.46 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 5); 6.62 (1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 3); 7.61



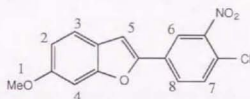
(1H, d, $J = 8.3$ Hz, 8); 7.65 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 9); 7.87 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 2); 7.98 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 7); 10.34 (1H, s, 1)

6-Methoxy-2-(4-chloro-3-nitrophenyl)benzofuran 13

0.644 g の 12 (2.0 mmol) を 3 ml の DMF に溶かしたものに、0.13 g の KOH powder (2.3 mmol) を加え、すばやく Ar 雰囲気下にし、室温で 2 h 攪拌。0.3 ml 濃 HCl を含む 10 ml の氷冷水にあげ、 CH_2Cl_2 で抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(0.068 g, y. 11%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 3.89 (3H, s, 1); 6.92 (1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 2); 7.07 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 4); 7.08 (1H, s, 5); 7.48 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 3); 7.59 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 7); 7.90 (1H, dd, $J = 8.3, 1.7$ Hz, 8); 8.29 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, 6)

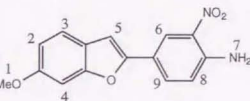


6-Methoxy-2-(4-amino-3-nitrophenyl)benzofuran 14

180 mg の 13 (0.59 mmol) を 50 ml の EtOH に溶かし、 NH_3 雰囲気下塩水浴中数分攪拌してから、オートクレーブに移す。 NH_3 を充填し、3 kgf/cm² 位になってから、油浴中で 210 °C で 5 h 加熱 (30 kgf/cm² 程度に上昇)。冷却後、オートクレーブから溶液を取り出し、溜去後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(132 mg, y. 93%; 28 mg 原料回収)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 3.88 (3H, s, 1); 6.21 (2H, s, 7); 6.86 (1H, s, 5); 6.87 (1H, dd, $J = 8.3, 2.2$ Hz, 2); 6.89 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 8); 7.07 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 4); 7.43 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, 3); 7.79 (1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 9); 8.58 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 6)

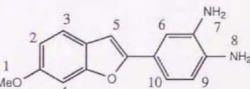


6-Methoxy-2-(3,4-diaminophenyl)benzofuran (6OMeBF) 15

0.10 g の 14 (0.35 mmol) を 250 ml の EtOH に溶かし、50 mg の 10% Pd/C 触媒を加え、 H_2 雰囲気下、室温で 1 h 攪拌。濾過後、溶媒を溜去し、アルミナクロマトグラフィーで精製。(80 mg, y. 89%) CHCl_3 より再結晶。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 1.57 (2H, s, 7); 3.49 (2H, s, 8); 3.86 (3H, s, 1); 6.74 (1H, s, 5); 6.75 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 9); 6.84 (1H, dd, $J = 8.2, 2.2$ Hz, 2); 7.04 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 4); 7.19 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, 6); 7.20 (1H, dd, $J = 8.8, 2.2$ Hz, 10); 7.38 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3)



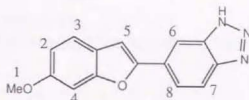
- m.p. 182-3 °C
- MS m/z 254 (M^+)

6-Methoxy-2-(6-benzotriazolyl)benzofuran 16

12 mg の 15 を 1 N の HCl 8 ml に懸濁し、NaNO₂ を加える。CH₂Cl₂ で抽出し、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(7 mg, y. 57%)

• ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.88 (3H, s, 1); 6.88 (1H, d, J = 8.8 Hz, 2); 7.04 (1H, s, 5); 7.06 (1H, s, 4); 7.45 (1H, d, J = 8.8 Hz, 3); 7.84 (1H, d, J = 8.8 Hz, 7); 7.94 (1H, d, J = 8.8 Hz, 8); 8.26 (1H, s, 6)

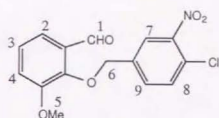


3-Methoxy-2-(4-chloro-3-nitrobenzyloxy)benzaldehyde 17

3-Methoxysalicylaldehyde と 6 を用い、12 と同様にする。(DMF に溶けない場合、70-80 °C で溶かして扱った。) (y. 87%)

• ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.93 (3H, s, 5); 5.19 (2H, s, 6); 7.21 (2H, m, 2&4); 7.43 (1H, m, 3); 7.58 (1H, d, J = 8.3 Hz, 8); 7.63 (1H, dd, J = 8.3, 2.2 Hz, 9); 8.03 (1H, d, J = 2.2 Hz, 7); 10.35 (1H, s, 1)

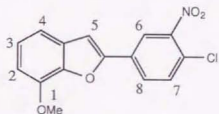


7-Methoxy-2-(4-chloro-3-nitrophenyl)benzofuran 18

17 を用い、13 と同様にする。(y. 5.5%)

• ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 4.05 (3H, s, 1); 6.87 (1H, m, 3); 7.15 (1H, s, 5); 7.21 (2H, m, 2&4); 7.61 (1H, d, J = 8.8 Hz, 7); 8.00 (1H, dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 8); 8.35 (1H, d, J = 2.2 Hz, 6)

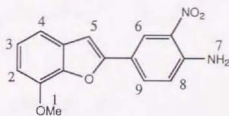


7-Methoxy-2-(4-amino-3-nitrophenyl)benzofuran 19

18 を用い、14 と同様にする。Benzene より再結晶。(y. 66%)

• ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 4.05 (3H, s, 1); 6.22 (2H, s, 7); 6.81 (1H, m, 3); 6.90 (1H, d, J = 8.8 Hz, 8); 6.93 (1H, s, 5); 7.15 (2H, m, 2&4); 7.88 (1H, dd, J = 8.8, 2.2 Hz, 9); 8.64 (1H, d, J = 2.2 Hz, 6)

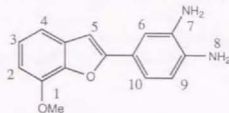


7-Methoxy-2-(3,4-diaminophenyl)benzofuran (7OMeBF) 20

19を酢酸中 Sn/HCl で還元し (70 °C, 30 min) , アルミナクロマトグラフィーで精製。

・¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.52 (4H, br, 7&8); 4.04 (3H, s, 1); 6.73 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, 9); 6.76 (1H, m, 3); 6.80 (1H, s, 5); 7.13 (2H, m, 2&4); 7.25 (2H, m, 6&10)

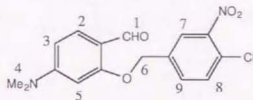


4-(N,N-Dimethylamino)-2-(4-chloro-3-nitrobenzyloxy)benzaldehyde 21

7と6を用い, 12と同様にする。(DMFに溶けない場合, 70-80 °Cで溶かして扱った。) (y. 85%)

・¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.08 (6H, s, 4); 5.21 (2H, s, 6); 6.05 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, 5); 6.37 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 3); 7.60 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, 8); 7.68 (1H, dd, *J* = 8.1, 1.8 Hz, 9); 7.76 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 2); 7.98 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, 7); 10.21 (1H, s, 1)

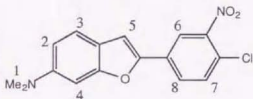


6-(N,N-Dimethylamino)-2-(4-chloro-3-nitrophenyl)benzofuran 22

21を用い, 13と同様にする。(y. 19%)

・¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.04 (6H, s, 1); 6.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2); 6.82 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, 4); 7.03 (1H, s, 5); 7.43 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 7); 7.55 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 3); 7.86 (1H, dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 8); 8.25 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, 6)

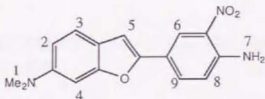


6-(N,N-Dimethylamino)-2-(4-amino-3-nitrophenyl)benzofuran 23

22を用い, 14と同様にする。Benzeneより再結晶。(y. 56%)

・¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)

δ 3.01 (6H, s, 1); 6.17 (2H, s, 7); 6.75 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 2); 6.81 (1H, s, 5); 6.86 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, 4); 6.87 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 8); 7.39 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, 3); 7.77 (1H, dd, *J* = 8.8, 2.2 Hz, 9); 8.55 (1H, d, *J* = 2.2 Hz, 6)

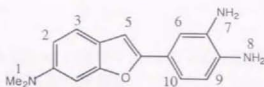


6-(N,N-Dimethylamino)-2-(3,4-diaminophenyl)benzofuran (NMe₂,BF) 24

19を20と同様, 酢酸中 Sn/HCl で還元し (70 °C, 30 min) , アルミナクロマトグラフィーで精製。

・¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.91 (6H, s, 1); 4.60 (2H, s, 7); 4.75 (2H, s, 8);
 6.54 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, 9); 6.69 (1H, dd, $J = 8.4$,
 2.2 Hz, 2); 6.71 (1H, s, 5); 6.82 (1H, d, $J = 2.2$ Hz,
 4); 6.88 (1H, dd, $J = 8.1$, 1.8 Hz, 10); 6.96 (1H, d,
 $J = 1.8$ Hz, 6); 7.31 (1H, d, $J = 8.4$ Hz, 3)

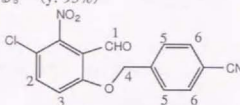


3-Chloro-2-nitro-6-(4-cyanobenzoyloxy)benzaldehyde 25

8 と 4-Cyanobenzyl bromide を用い, 12 と同様にする。 (y. 93%)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)

δ 5.50 (2H, s, 4); 7.59 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3); 7.73
 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 5); 7.89 (2H, d, $J = 8.3$ Hz, 6);
 8.54 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 2); 10.31 (1H, s, 1)

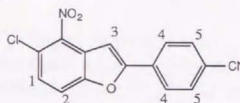


5-Chloro-4-nitro-2-(4-cyanophenyl)benzofuran 26

25 を用い, 13 と同様にする。Benzene より再結晶。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 7.50 (1H, s, 3); 7.50 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 2); 7.69
 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 1); 7.79 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 4);
 8.00 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 5)



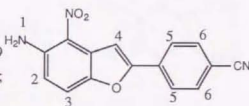
5-Amino-4-nitro-2-(4-cyanophenyl)benzofuran 27

26 を用い, 14 と同様にする。 (y. 40%) (180

$^{\circ}\text{C}$ 位にすれば最も収率が良いと思われた。)

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)

δ 6.43 (2H, s, 1); 6.77 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, 2); 7.59
 (1H, d, $J = 9.2$ Hz, 3); 7.75 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 5);
 7.92 (1H, s, 4); 7.98 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 6)

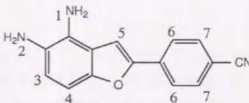


4,5-Diamino-2-(4-cyanophenyl)benzofuran 28

27 を EtOH に溶かし, 10% Pd/C 触媒を加え, H_2 雰囲気下, 室温で 15 min 攪拌。濾過後, 溶媒を溜去し, アルミナクロマトグラフィーで精製。

• $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6)

δ 4.7 (2H, br, 2); 5.0 (2H, br, 1); 6.81 (1H, d, $J = 8.8$
 Hz, 4); 7.27 (1H, d, $J = 8.8$ Hz, 3); 7.33 (1H, s, 5);
 7.90 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 6); 8.02 (2H, d, $J = 8.8$ Hz,
 7)



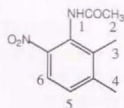
第2章 第4節

2,3-Dimethyl-6-nitroacetanilide 29

25.3 g の 2,3-Dimethyl-6-nitroaniline (0.152 mol) を 290 ml の酢酸中, 15 ml の無水酢酸 (0.159 mol) を加え, 1 h 還流する。溶媒溜去後, EtOH から再結晶。(29.3 g, y. 98%; 原料回収 1.53 g)

・¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.18 (3H, s, 3); 2.24 (3H, s, 2); 2.39 (3H, s, 4); 7.18 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 5); 7.80 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 6); 8.46 (1H, s, 1)

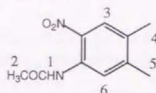


4,5-Dimethyl-2-nitroacetanilide 30

4,5-Dimethyl-2-nitroaniline を原料に 29 と同様にして合成した。(y. 97%)

・¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.27 (3H, s, 2); 2.28 (3H, s, 4); 2.35 (3H, s, 5); 7.98 (1H, s, 6); 8.54 (1H, s, 3); 10.30 (1H, s, 1)

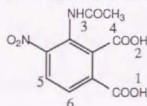


3-Acetamido-4-nitrophthalic acid 31

29.2 g の 29 (0.140 mol) を 1 l の水に懸濁させ, 100 g の MgSO₄ (0.831 mol) を加え, 還流させ, 133 g の KMnO₄ (0.841 mol) を合計 2 l の水に懸濁させながら, 小分けにして入れる。(紫色が消えたら継ぎ足すようにする。原料が溶けきったら, 残っている KMnO₄ を全て入れ, 80 °C で紫色が消えるまで攪拌する。) 熱時ブフナー濾過し, 濾液に食塩を飽和させ, 冷後 HCl で酸性にし析出物を濾取し, 濾液は AcOEt で抽出し, 溶媒を溜去する。(19.6 g, y. 52%)

・¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 1.97 (3H, s, 4); 7.90 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 6); 8.04 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 5); 10.13 (1H, s, 3); 13.5 (2H, br, 1&2)

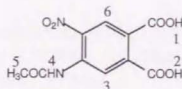


4-Acetamido-5-nitrophthalic acid 32

30 を原料に 31 と同様にして合成する。(y. 59%)

・¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.10 (3H, s, 5); 7.91 (1H, s, 3); 8.26 (1H, s, 6); 10.53 (1H, s, 4); 13 (2H, br, 1&2)



この酸化反応のポイント

1. 水系で反応しているので, 原料のキシレンが溶解しにくい。そこで初めは reflux の状態で基質をよく溶かしつつ, 少量ずつ KMnO₄ 懸濁液を加える。(火傷に注意!) MgSO₄ は初めより全量溶かしておく。ある程度反応が進行して溶けてきたら(まず, 一つめのメチル基が酸化されて水溶性が増す。), 完全に二つ目のメチル基を酸化するため, oil bath を 70-80 °C に下げ, over night にてゆっくり酸化する。(reflux を続けると,

KMnO₄の自己分解が速いようである。) 私は水を溶媒に用いたが、ピリジンを co-solvent に用いると最初の溶けづらいう状態が解消できるとの報告を共同研究者より受けた。

2. 熱時にブフナー濾過するが、熱湯でしっかり MnO₂ を洗う必要がある。濾液は NaCl を飽和させる。

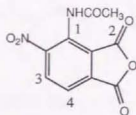
3. 3 1 と 3 2 では、性質が異なり、3 1 の方は分子内水素結合があるためか、水溶性が低く、酸性にすると、析出が見られた。3 2 の方は析出しないので黄色い水溶液である。3 2 への反応が中途半端な場合、水より再結晶すると、モノメチル体が結晶として出てくるので、ジカルボン酸と分離できる。ただし手早く行わないと、アセチル基の加水分解が起こる。

3-Acetamido-4-nitrophthalic anhydride 3 3

0.538 g の 3 1 (2.00 mmol) を 10 ml の無水酢酸に 80 °C で溶かし、そこに AcCl 1ml を加え、2 h そのまま攪拌。溶媒を溜去し、少量の無水 CH₂Cl₂ を加え、析出物を濾取。(0.29 g, y. 58%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.35 (3H, s, 2); 7.89 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 4); 8.45 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 3); 9.01 (1H, s, 1)

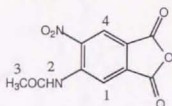


4-Acetamido-5-nitrophthalic anhydride 3 4

6.0 g の 3 2 (22 mmol) を 60 ml の AcCl を加え、2 h 還流。溶媒を溜去し、Benzene より再結晶⁶¹⁾。(5.0 g, y. 90%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.40 (3H, s, 3); 8.85 (1H, s, 1); 9.54 (1H, s, 4); 10.64 (1H, s, 2)



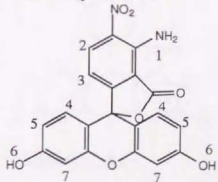
4-Amino-5-nitro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one

(3-Amino-4-nitrofluorescein) 3 5

3 3 と 2 当量の Resorcinol を 180 °C で溶融し、2 h 後 0.25 当量の ZnCl₂ を加え、210 °C で乾燥固化させる。黒い固まりを砕いた後、0.6N HCl を加え、2 h 還流。冷後沈殿物を濾取⁶²⁾、乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y. 5%以上)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 6.38 (1H, d, *J* = 8.6, 3); 6.56 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.4, 5); 6.66 (2H, d, *J* = 2.4, 7); 6.80 (2H, d, *J* = 8.6, 4); 7.96 (2H, s, 1); 8.35 (1H, d, *J* = 8.6, 2); 10.18 (2H, s, 6)



4,5-Diamino-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

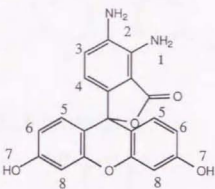
(3,4-Diaminofluorescein) (DAF-1)

3 5 を Na_2S および NaSH の水溶液中、24 h 還流し、冷後 HCl で pH 4 にし、沈殿物を濾取⁴⁶⁾。乾燥後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。(y, 76%) 必要であれば、硫黄を除くため、2N HCl で再結晶した後、 NaOH 水溶液に溶かし、再度 HCl で pH 4 にし、沈殿物を濾取。DAF 類は 2-propanol より再結晶可能である。

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

8 5.01 (2H, s, 2); 5.88 (2H, s, 1); 6.05 (1H, d, $J = 7.5$, 4);
6.52 (2H, dd, $J = 8.6$, 2.4, 6); 6.60 (2H, d, $J = 2.4$, 8);
6.64 (2H, d, $J = 8.6$, 5); 6.78 (1H, d, $J = 7.5$, 3); 9.97
(2H, s, 7)

• MS m/z 362 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1730 (C=O); 1615,
1453 (aromatic) • m.p. 300 °C 以上 • EA Calcd. for
 $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5 \cdot 2\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$: C, 64.71; H, 6.27; N 5.81. Found:
C, 64.62; H, 6.21; N 5.48.



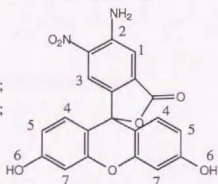
5-Amino-6-nitro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

(4-Amino-5-nitrofluorescein) 3 6

3 4 を用い、3 5 と同様に合成。(y, 19%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

8 6.55 (2H, dd, $J = 8.6$, 2.2, 5); 6.65 (2H, d, $J = 2.2$, 7);
6.74 (2H, d, $J = 8.6$, 4); 7.59 (1H, s, 1); 7.73 (2H, s, 2);
7.74 (1H, s, 3); 10.12 (2H, s, 6)



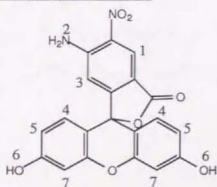
6-Amino-5-nitro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

(5-Amino-4-nitrofluorescein) 3 7

3 6 と同時にできてくる。(y, 34%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

8 6.58 (2H, dd, $J = 8.6$, 2.2, 5); 6.63 (1H, s, 3); 6.65 (2H,
d, $J = 2.2$, 7); 6.75 (2H, d, $J = 8.6$, 4); 7.92 (2H, s, 2);
8.49 (1H, s, 1); 10.17 (2H, s, 6)



5,6-Diamino-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

(4,5-Diaminofluorescein) (DAF-2)

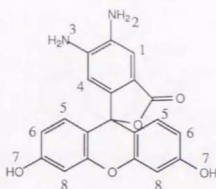
36 または 37 を用い, DAF-1 と同様に合成。(y. 36 より 30%, 37 より 97%)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 5.00 (2H, s, 2); 5.58 (2H, s, 3); 6.07 (1H, s, 4); 6.52 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.2, 6); 6.60 (2H, d, *J* = 2.2, 8); 6.60 (2H, d, *J* = 8.6, 5); 6.89 (1H, s, 1); 9.99 (2H, s, 7)

• MS *m/z* 362 (M⁺) • IR (cm⁻¹) 1732 (C=O); 1618, 1458, 1383 (aromatic) (1586 (C=O&aromatic); 1535 (pyrylium cation); 1460, 1370 (aromatic); yellow form)

• m.p. 240-250 °C • EA Calcd. for C₂₀H₁₄N₂O₅·2C₂H₅O: C, 64.71; H, 6.27; N 5.81. Found: C, 64.67; H, 6.15; N 6.08.



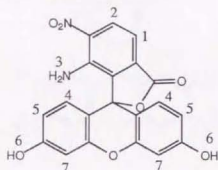
7-Amino-6-nitro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

(6-Amino-5-nitrofluorescein) 38

35 と同時にできてくる。(y. 2%以上)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 6.40 (2H, s, 3); 6.56 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.4, 5); 6.71 (2H, d, *J* = 2.4, 7); 6.72 (2H, d, *J* = 8.6, 4); 7.22 (1H, d, *J* = 8.6, 1); 8.38 (1H, d, *J* = 8.6, 2); 10.18 (2H, s, 6)



6,7-Diamino-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one

(5,6-Diaminofluorescein) (DAF-3)

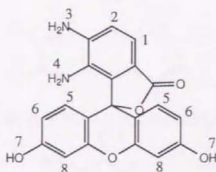
38 を用い, DAF-1 と同様に合成。(y. 30%以上)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 3.80 (2H, s, 4); 5.58 (2H, s, 3); 6.53 (2H, dd, *J* = 8.6, 2.4, 6); 6.62 (2H, d, *J* = 8.6, 5); 6.65 (2H, d, *J* = 2.4, 8); 6.79 (1H, d, *J* = 7.9, 2); 7.07 (1H, d, *J* = 7.9, 1); 10.01 (2H, s, 7)

• MS *m/z* 362 (M⁺) • IR (cm⁻¹) 1730 (C=O); 1611, 1453, 1383 (aromatic) • m.p. 220-230 °C • EA

Calcd. for C₂₀H₁₄N₂O₅·1.4H₂O: C, 61.98; H, 4.37; N 7.23. Found: C, 61.70; H, 4.09; N 7.18.



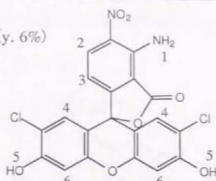
4-Amino-5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one (3-Amino-4-nitro-dichlorofluorescein) 3 9

3 3 と 4-Chlororesorcinol を用い, 3 5 と同様に合成。 (y. 6%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 6.41 (1H, d, $J = 8.6$, 3); 6.87 (2H, s, 6); 7.03 (2H, s, 4);

7.83 (2H, s, 1); 8.36 (1H, d, $J = 8.6$, 2); 11.23 (2H, s, 6)



4,5-Diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one (3,4-Diamino-dichlorofluorescein) (DAF-4)

3 9 を用い, DAF-1 と同様に合成。 (y. 52%)

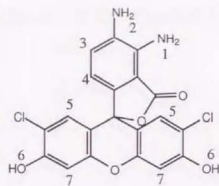
• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 5.14 (2H, s, 2); 5.97 (2H, s, 1); 6.12 (1H, d, $J = 7.7$, 4);

6.68 (2H, s, 7); 6.81 (1H, d, $J = 7.7$, 3); 6.85 (2H, s, 5);

10.97 (2H, s, 6)

• MS m/z 430 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1705 (C=O); 1610, 1381 (aromatic) (red form) • m.p. 240°C で昇華し始め, 300°C で溶けず。 • EA Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5 \cdot \text{C}_7\text{H}_4\text{O}$: C, 56.22; H, 4.10; N 5.70. Found: C, 55.82; H, 4.15; N 5.79.



5-Amino-6-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one (4-Amino-5-nitro-dichlorofluorescein) 4 0

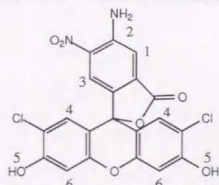
3 4 と 4-Chlororesorcinol を用い, 3 5 と同様に合成。

(y. 4 1 と合わせて 30%以下)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 6.9 (2H, br, 6); 6.91 (2H, s, 4); 7.63 (1H, s, 1); 7.77

(2H, s, 2); 7.86 (1H, s, 3); 11.07 (2H, s, 5)



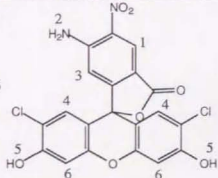
6-Amino-5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-(9H)xanthen]-3-one (5-Amino-4-nitro-dichlorofluorescein) 4 1

4 0 と同時にできてくる。

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 6.66 (1H, s, 3); 6.89 (2H, s, 6); 6.91 (2H, s, 4); 7.96

(2H, s, 2); 8.48 (1H, s, 1); 11.11 (2H, s, 5)



5,6-Diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
(4,5-Diamino-dichlorofluorescein) (DAF-5)

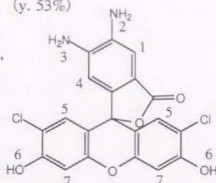
4 0 と 4 1 の混合物のまま, DAF-1 と同様に合成した。 (y. 53%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ 5.12 (2H, s, 2); 5.69 (2H, s, 3); 6.12 (1H, s, 4); 6.63 (2H, s, 7); 6.85 (2H, s, 5); 6.93 (1H, s, 1); 10.96 (2H, s, 6)

• MS m/z 430 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1717 (C=O)

• m.p. 215-220 $^{\circ}\text{C}$ • EA Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{C}_3\text{H}_4\text{O}$: C, 56.22; H, 4.10; N 5.70. Found: C, 56.22; H, 3.98; N 5.84.

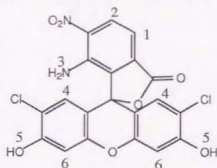


7-Amino-6-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
(6-Amino-5-nitro-dichlorofluorescein) 4 2

3 9 と同時にできてくる。 (y. 1%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ 6.60 (2H, s, 3); 6.93 (2H, s, 4); 6.93 (2H, s, 6); 7.22 (1H, d, $J = 8.6$, 1); 8.40 (1H, d, $J = 8.6$, 2); 11.17 (2H, s, 5)



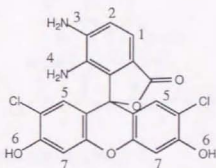
6,7-Diamino-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3H),9'-[9H]xanthen]-3-one
(5,6-Diamino-dichlorofluorescein) (DAF-6)

4 2 を用い, DAF-1 と同様に合成。 (y. 16%以上)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)

δ 4.06 (2H, s, 4); 5.74 (2H, s, 3); 6.61 (2H, s, 7); 6.84 (1H, d, $J = 7.9$, 2); 6.89 (2H, s, 5); 7.10 (1H, d, $J = 7.9$, 1); 10.97 (2H, s, 6)

• MS m/z 430 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1719 (C=O); 1456, 1385 (aromatic) • m.p. 230 $^{\circ}\text{C}$ で昇華し始め, 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上で完全に溶けず。 • EA Calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_5 \cdot \text{C}_3\text{H}_4\text{O}$: C, 56.22; H, 4.10; N 5.70. Found: C, 55.97; H, 4.02; N 6.00.



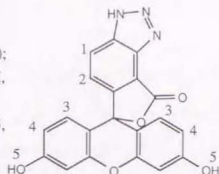
DAF 類のトリアゾール体はそれぞれの DAF を MeOH に溶かして、NO gas をバブルし、溶媒を溜去後、シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した。

3",6"-Dihydroxy-spiro[triazolo[4',5':4,5]isobenzofuran-1(3H),9''-[9H]xanthen]-3-one
(3,4-Fluorescein triazole) (DAF-1 T)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.60 (2H, dd, $J = 8.6, 2.4, 4$); 6.77 (2H, d, $J = 2.4, 6$);
6.77 (2H, d, $J = 8.6, 3$); 7.23 (1H, d, $J = 7.7, 2$); 8.43 (1H,
d, $J = 7.7, 1$); 9.05 (2H, s, 5)

• MS m/z 373 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1734 (C=O); 1615,
1453 (aromatic) • m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上

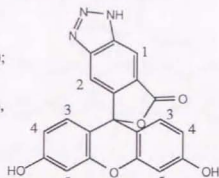


3",6"-Dihydroxy-spiro[triazolo[4',5':5,6]isobenzofuran-1(3H),9''-[9H]xanthen]-3-one
(4,5-Fluorescein triazole) (DAF-2 T)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.59 (2H, dd, $J = 8.8, 2.4, 4$); 6.72 (2H, d, $J = 8.8, 3$);
6.75 (2H, d, $J = 2.4, 5$); 7.68 (1H, s, 2); 8.56 (1H, s, 1)

• MS m/z 373 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1725 (C=O); 1616,
1474, 1383 (aromatic) • m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上

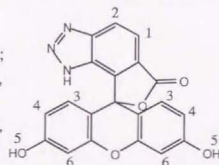


3",6"-Dihydroxy-spiro[triazolo[4',5':6,7]isobenzofuran-1(3H),9''-[9H]xanthen]-3-one
(5,6-Fluorescein triazole) (DAF-3 T)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.54 (2H, dd, $J = 8.6, 2.4, 4$); 6.67 (2H, d, $J = 8.6, 3$);
6.79 (2H, d, $J = 2.4, 6$); 8.00 (1H, d, $J = 8.0, 1$); 8.24 (1H,
d, $J = 8.0, 2$); 9.00 (2H, s, 5)

• MS m/z 373 (M^+) • IR (cm^{-1}) 1734 (C=O); 1611,
1474, 1383 (aromatic) • m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上



3",6"-Dihydroxy-2',7"-dichloro-spiro[triazolo[4',5':4,5]isobenzofuran-1(3H),9''-[9H]xanthen]-3-one
(3,4-Dichlorofluorescein triazole) (DAF-4 T)

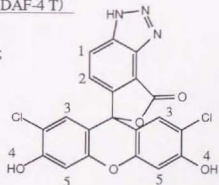
• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.97 (2H, s, 5); 7.00 (2H, s, 3); 7.31 (1H, d, $J = 9.0, 2$);
8.46 (1H, d, $J = 9.0, 1$); 9.70 (2H, s, 4)

• MS m/z 441 (M^+)

• IR (cm^{-1}) 1748 (C=O); 1582, 1491, 1385 (aromatic)

• m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上



3'',6''-Dihydroxy-2'',7''-dichloro-spiro[triazolo[4',5':5,6]isobenzofuran-1(3H),9''-

[9H]xanthen]-3-one (4,5-Dichlorofluorescein triazole) (DAF-5 T)

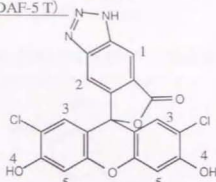
• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.86 (2H, s, 5); 6.93 (2H, s, 3); 7.8 (1H, br, 2); 8.6 (1H, br, 1); 9.62 (2H, s, 4)

• MS m/z 441 (M^+)

• IR (cm^{-1}) 1724 (C=O); 1385 (aromatic)

• m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上



3'',6''-Dihydroxy-2'',7''-dichloro-spiro[triazolo[4',5':6,7]isobenzofuran-1(3H),9''-

[9H]xanthen]-3-one (5,6-Dichlorofluorescein triazole) (DAF-6 T)

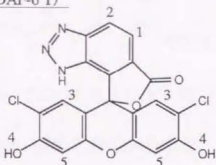
• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 6.88 (2H, s, 5); 7.00 (2H, s, 3); 8.04 (1H, d, $J = 8.0$, 1); 8.23 (1H, d, $J = 8.0$, 2); 9.68 (2H, s, 4)

• MS m/z 441 (M^+)

• IR (cm^{-1}) 1717 (C=O); 1636, 1458, 1385 (aromatic)

• m.p. 300 $^{\circ}\text{C}$ 以上



フルオレセインの IR は 3 種の form で異なることが知られている⁶³⁾。

第2章 第6節

5,6-Diamino-3',6'-bis(acetyloxy)-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one
(4,5-Diaminofluorescein diacetate) (DAF-2 DA)

124 mg の DAF-2 (3.41 mmol) に 120 mg の Cs_2CO_3 を含む 50 ml の CH_3CN 中, 70 μl の 無水酢酸 (2.2 当量) を加え, 1 h 室温で搅拌。減圧溜去後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。 (137 mg, y. 90%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 2.27 (6H, s, 7); 4.68 (2H, s, 2); 5.16 (2H, s, 3);

6.34 (1H, s, 4); 6.92 (2H, dd, $J = 8.6, 2.2$, 6);

7.00 (2H, d, $J = 8.6, 5$); 7.12 (2H, d, $J = 2.2, 8$);

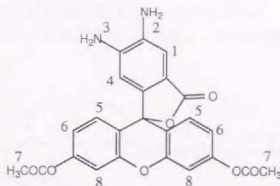
7.15 (1H, s, 1)

• MS m/z 446 (M^+)

• IR (cm^{-1}) 1750 (C=O); 1606 (aromatic)

• m.p. 110-120 $^\circ\text{C}$

• EA Calcd. for $\text{C}_{24}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_7$: C, 64.57; H, 4.06; N 6.28. Found: C, 64.27; H, 4.16; N 6.18.



6-Amino-5-(octadecylamino)-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-2 C18)

36 mg の DAF-2 (0.10 mmol) と 35 mg の 1-iodooctadecane (0.092 mmol) を 5 ml の EtOH に溶かし, 16 h 還流。減圧溜去後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。 (5 mg, y. 29%; 原料回収 26 mg)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 0.87 (3H, t, $J = 6.0$, 7); 1.28 (28H, m, 5); 1.52

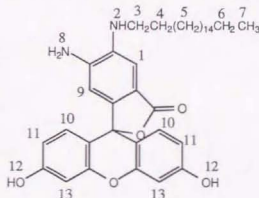
(2H, m, 6); 1.76 (2H, quin, $J = 7.7$, 4); 3.26 (2H, td,

$J = 7.0, 5.3$, 3); 4.29 (1H, t, $J = 5.3$, 2); 5.10 (2H, s,

8); 6.30 (1H, s, 1); 6.60 (2H, dd, $J = 8.6, 2.2$, 11);

6.68 (2H, d, $J = 2.2$, 13); 6.72 (2H, d, $J = 8.6$, 10);

6.90 (1H, s, 9); 8.86 (2H, s, 12)

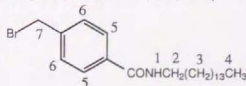


N-(Pentadecyl)-4-(bromomethyl)benzamide 43

6.67 g の 4-Bromomethylbenzoic acid (31 mmol) を 250 ml の Benzene に溶かし, 室温にて 20 ml の SOCl_2 を滴下し, 80 $^\circ\text{C}$ で 8 h 還流。溶媒を溜去した後, CHCl_3 を 200 ml 加え, 7.05 g の 1-Aminopentadecane (31 mmol) を 30 ml の CHCl_3 に溶かしたものを入れる。さらに 6 g の Cs_2CO_3 を加え, 1 h 搅拌。AcOEt で抽出後, シリカゲルクロマトグラフィーで精製。 n-Hexane より再結晶。 (2.3 g, y. 17%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 0.88 (3H, t, $J = 6.6$, 4); 1.26 (26H, m, 3); 3.45 (2H,



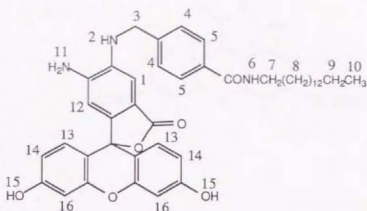
td, $J = 7.0, 5.9, 2$; 4.50 (2H, s, $J = 5.3, 7$); 6.06 (1H, br, 1); 7.45 (2H, d, $J = 8.4, 6$); 7.73 (2H, d, $J = 8.4, 5$)

DAF-2 C15

26 mg の DAF-2 (0.072 mmol) と 30 mg の 43 (0.071 mmol) を 10 ml の EtOH に溶かし、15.5 h 還流。減圧溜去後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(17 mg, y. 79%; 原料回収 15 mg)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)

δ 0.83 (3H, t, $J = 6.4, 10$); 1.22 (24H, m, 8); 1.50 (2H, m, 9); 3.25 (2H, td, $J = 7.1, 5.5, 7$); 4.46 (2H, d, $J = 5.7, 3$); 5.72 (1H, t, $J = 5.7, 2$); 5.79 (2H, s, 11); 6.34 (1H, s, 12); 6.49-5.7 (5H, m, 1, 13, 14); 6.60 (2H, d, $J = 2.0, 16$); 7.49 (2H, d, $J = 8.4, 4$); 7.82 (2H, d, $J = 8.4, 5$); 8.40 (1H, t, $J = 5.5, 6$); 9.98 (2H, s, 15)



第2章 第7節

6-Amino-3',6'-bis(acetyloxy)-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one
(4-Aminofluorescein diacetate) (4AF DA)

4-Aminofluorescein (176.1 mg, 5.1 mmol) を Cs_2CO_3 を懸濁した 50 ml の CH_3CN に溶かし、96 μl の無水酢酸を加え 1 h 室温で攪拌。溶媒減圧留去後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(y. 72%)

$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

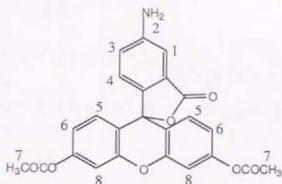
δ 2.29 (6H, s, 7); 5.85 (2H, s, 2); 6.90-6.99

(6H, m, 3-6); 7.05 (1H, d, $J = 1.3$, 1); 7.25

(2H, d, $J = 1.8$, 8)

MS m/z 431 (M^+); 388 ($\text{M}^+ - \text{CH}_3\text{CO}$)

m.p. 122-128 $^\circ\text{C}$



第3章 第1節

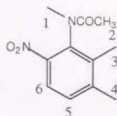
3-(*N*-Methylacetamido)-4-nitroxylylene 4 4

11.8 g の 2,3-Dimethyl-6-nitroaniline (0.057 mol) を 300 ml の THF に溶解し, 1.5 g の NaH (0.063 mol) を少量ずつ加える。水素の発生が終わり次第, MeI (7 ml) を加え, 室温にて 1 h 攪拌。溶媒溜去後, シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH 3% / CH₂Cl₂ 97% v/v) により精製。(12.3 g, y. 98%; 二つの異性体の混合物)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.76 (3H, s, 2); 2.22 (3H, s, 3); 2.42 (3H, s, 4); 3.14 (3H, s, 1); 7.32 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 5); 7.72 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 6)

δ 2.18 (3H, s, 2); 2.26 (3H, s, 3); 2.36 (3H, s, 4); 3.29 (3H, s, 1); 7.24 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 5); 7.78 (1H, d, *J* = 8.3 Hz, 6)



4-(*N*-Methylacetamido)-5-nitroxylylene 4 5

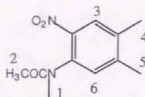
4,5-Dimethyl-2-nitroaniline (7.88 g, 38 mmol) を原料に 4 4 と同様にして合成した。(8.04 g, y. 95%; 二つの異性体の混合物)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.81 (3H, s, 2); 2.38 (6H, s, 4,5); 3.19 (3H, s, 1); 7.13 (1H, s, 3); 7.84 (1H, s, 6)

δ 2.24 (3H, s, 2); 2.32 (6H, s, 4,5); 3.38 (3H, s, 1); 7.07 (1H, s, 3); 7.82 (1H, s, 6)

• MS *m/z* 176 (M⁺)

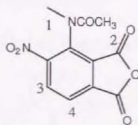


3-(*N*-Methylacetamido)-4-nitrophthalic anhydride 4 6

4 4 (12.2 g, 140 mmol) を原料として, 3 1 と同様に合成し, 粗 3-(*N*-methylacetamido)-4-nitrophthalic acid (14 g) を得る。これを 3 4 と同様の方法で脱水し, 3 1 を得る。(11.4 g, y. 79%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.31 (3H, s, 2); 3.50 (3H, s, 1); 8.10 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 4); 8.39 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, 3)

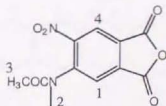


4-(*N*-Methylacetamido)-5-nitrophthalic anhydride 4 7

4 5 を原料に 4 6 と同様に合成する。(y. 53%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.29 (3H, s, 3); 3.56 (3H, s, 2); 8.01 (1H, s, 1); 8.47, (1H, s, 4)

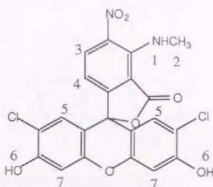


4-(*N*-Methylamino)-5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one 4 8

4 6 (2.51 g, 9.5 mmol) と 4-chlororesorcinol (2.78 g, 19 mmol) を methanesulfonic acid (18 ml) 中, Ar 雰囲気下 80 °C で 38 h 攪拌後 220 ml の水を加え, 2 h 還流。冷後, pH 2 にして沈殿物を濾取し, 乾燥後, シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH 5% / CH₂Cl₂ 95% v/v) により精製。 (1.55 g, y. 34%)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 3.05 (3H, d, *J* = 5.3, 2); 6.36 (1H, d, *J* = 8.4, 4); 6.87 (2H, s, 7); 7.01 (2H, s, 5); 8.09 (1H, q, *J* = 5.3, 1); 8.15 (1H, d, *J* = 8.4, 3); 11.09 (2H, br, 6)

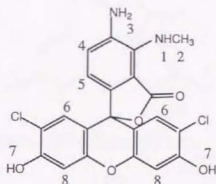


5-Amino-4-(*N*-methylamino)-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-4 M1)

4 8 (1.53 g, 3.2 mmol) を DAF-1 への還元方法と同様に還元する。 (0.87 g, y. 61%)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 3.05 (3H, d, *J* = 5.5, 2); 5.06 (2H, br, 3); 5.48 (1H, q, *J* = 5.5, 1); 6.26 (1H, d, *J* = 7.8, 5); 6.70 (2H, s, 8); 6.84 (2H, s, 6); 6.91 (1H, d, *J* = 7.8, 4); 11.0 (2H, br, 7)

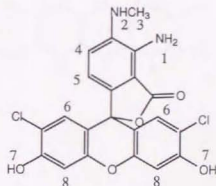


4-Amino-5-(*N*-methylamino)-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-4 M2)

DAF-4 (0.18 g, 0.41 mmol) を 15 ml の EtOH 中 Mel (1.4 ml) を数回に分けて加えながら, Ar 雰囲気下 80 °C で 3 h 攪拌。シリカゲルクロマトグラフィー, プレパラティブ TLC により精製。 (30 mg, y. 16%, 原料回収 0.13 g)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.78 (3H, d, *J* = 4.6, 3); 5.35 (1H, q, *J* = 4.6, 2); 6.07 (2H, br, 1); 6.24 (1H, d, *J* = 7.7, 5); 6.65 (1H, d, *J* = 7.7, 4); 6.68 (2H, s, 8); 6.85 (2H, s, 6); 11.0 (2H, br, 7)

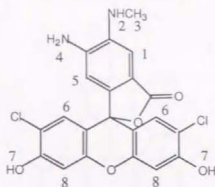


6-Amino-5-(*N*-methylamino)-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-5 M1)

DAF-5 (94 mg, 0.22 mmol) を DAF-4 M1 と同様の方法で合成。(25 mg, y. 26%, 原料回収 48 mg)

・¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.83 (3H, d, *J* = 4.6, 3); 5.25 (1H, q, *J* = 4.6, 2); 5.76 (2H, br, 4); 6.15 (1H, s, 5); 6.62 (2H, s, 8); 6.67 (1H, s, 1); 6.86 (2H, s, 6); 11.0 (2H, br, 7)

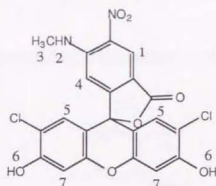


6-(*N*-Methylamino)-5-nitro-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one 4 9

4 7 を原料に, 4 8 と同様に合成する。(y. 30%)

・¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.83 (3H, d, *J* = 4.8, 3); 6.71 (1H, s, 4); 6.86 (2H, s, 7); 6.95 (2H, s, 5); 8.55 (1H, s, 1); 8.65 (1H, q, *J* = 4.8, 2); 11.07 (2H, br, 6)

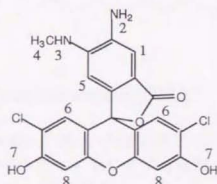


5-Amino-6-(*N*-methylamino)-2',7'-dichloro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-
[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-5 M2)

4 9 (0.62 g, 1.3 mmol) を DAF-1 への還元方法と同様に還元する。(0.14 g, y. 25%)

・¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.62 (3H, d, *J* = 4.6, 4); 5.13 (2H, s, 2); 5.89 (1H, q, *J* = 4.6, 3); 5.94 (1H, s, 5); 6.60 (2H, s, 8); 6.85 (2H, s, 6); 6.94 (1H, s, 1); 11.0 (2H, br, 7)

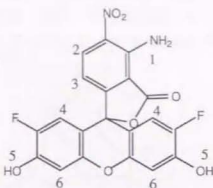


4-Amino-5-nitro-2',7'-difluoro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (3-Amino-4-nitrodifluorofluorescein) 50

33 (1.3 g, 5.0 mmol) と 4-fluororesorcinol (1.3 g, 10 mmol) を methanesulfonic acid (10 ml) 中, Ar 雰囲気下 80 °C で 60 h 攪拌後 120 ml の水を加え, 2 h 還流。冷後, pH 2 にして沈殿物を濾取し, 乾燥後, シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH 3% / CH₂Cl₂ 97% v/v) により精製。 (1.3 g, y. 61%)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 6.40 (1H, d, *J* = 8.6, 3); 6.87 (2H, d, *J* = 7.3, 6); 6.89 (2H, d, *J* = 11.3, 4); 7.95 (2H, br, 1); 8.36 (1H, d, *J* = 8.6, 2); 10.8 (2H, br, 5)

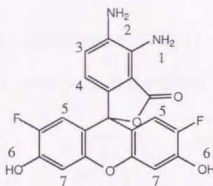


4,5-Diamino-2',7'-difluoro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (3,4-Diaminodifluorofluorescein) (DAF-7)

50 (1.3 g, 3.0 mmol) を Na₂S および NaSH の水溶液中, 24 h 還流し, 冷後 HCl で pH 3 にし, 沈殿物を濾取⁴⁶⁾。乾燥後, シリカゲルクロマトグラフィーにより精製。 (0.94 g, y. 78%)

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 5.10 (2H, s, 2); 5.94 (2H, s, 1); 6.11 (1H, d, *J* = 7.9, 4); 6.48 (2H, d, *J* = 11.3, 5); 6.81 (1H, d, *J* = 7.9, 3); 6.83 (2H, d, *J* = 7.5, 7); 10.6 (2H, br, 6)



4-Amino-5-(*N*-methylamino)-2',7'-difluoro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-FM)

DAF-7 (0.94 g, 2.4 mmol) を 200 ml の EtOH 中 methyl iodide を使い, Ar 雰囲気下 80 °C で 3 h 攪拌。シリカゲルクロマトグラフィー, プレパラティブ TLC により精製。

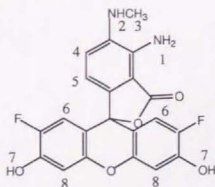
(0.15 g, y. 15%, 原料回収 0.53 g) methanol か 2-propanol により再結晶。

• ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 2.79 (3H, d, *J* = 4.6, 3); 5.32 (1H, q, *J* = 4.6, 2); 6.05 (2H, s, 1); 6.23 (1H, d, *J* = 7.8, 5); 6.48 (2H, d, *J* = 11.3, 6); 6.65 (1H, d, *J* = 7.8, 4); 6.83 (2H, d, *J* = 7.5, 8); 10.6 (2H, br, 7)

• MS *m/z* 412 (*M*⁺) • m.p. 265 °C

• EA Calcd. for C₂₁H₁₄F₂N₂O₅·CH₄O: C, 59.46; H, 4.08; N 6.31. Found: C, 59.45; H, 3.78; N 6.02.



4-Amino-5-(*N*-methylamino)-3',6'-bis(acetyloxy)-2',7'-difluoro-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-FM DA)

DAF-FM (94 mg, 0.23 mmol) と Cs_2CO_3 (84 mg, 0.26 mmol) を懸濁させた 20 ml の CH_2CN 中、無水酢酸 (52 μl , 0.55 mmol) を加え、2 h 室温で攪拌。減圧溜去後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製した。(84 mg, 75%) さらに、2-isopropanol から再結晶。

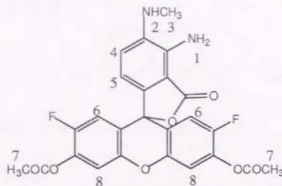
• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 2.34 (6H, s, 7); 2.93 (3H, s, 3); 3.40 (1H, br, 2); 5.05 (2H, s, 1); 6.48 (1H, d, $J = 7.9$, 5); 6.73 (2H, d, $J = 10.1$, 6); 6.87 (1H, d, $J = 7.9$, 4); 7.09 (2H, d, $J = 6.2$, 8)

• MS m/z 496 (M^+)

• m.p. 135 $^\circ\text{C}$

• EA Calcd. for $\text{C}_{25}\text{H}_{18}\text{F}_2\text{N}_2\text{O}_7 \cdot \text{C}_3\text{H}_8\text{O} \cdot 0.1\text{H}_2\text{O}$: C, 60.23; H, 4.73; N 5.02. Found: C, 60.01; H, 4.43; N 5.00.



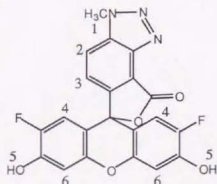
2',7"-Difluoro-3",6"-dihydroxy-spiro[1'-methyltriazolo[4',5':4,5]isobenzofuran-1(3*H*),9'-[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-FM T)

DAF-FM (27 mg, 65 μmol) を MeOH に溶かして、NO gas をバブルし、溶媒を溜去後、シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH 10% / CH_2Cl_2 90% v/v, acetic acid 0.02% v/v) により精製した。乾燥後、少量の 2 N NaOH 水溶液に溶かし、塩酸で pH 3-4 にして沈殿物を濾取、乾燥。(13 mg, 48%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, Acetone- d_6)

δ 4.50 (3H, s, 1); 6.69 (2H, d, $J = 11.2$, 4); 6.94 (2H, d, $J = 7.5$, 6); 7.41 (1H, d, $J = 8.6$, 3); 8.25 (1H, d, $J = 8.6$, 2); 9.6 (2H, br, 5)

• MS m/z 423 (M^+) • m.p. 300 $^\circ\text{C}$ 以上



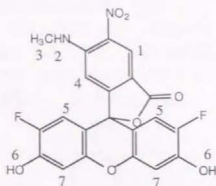
6-(*N*-Methylamino)-5-nitro-2',7'-difluoro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-

[9*H*]xanthen]-3-one 51

47 を原料に, 50 と同様に合成する。 (y. 20%)

・ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 2.84 (3H, d, $J = 3.8$, 3); 6.7 (3H, m, 4,5); 6.86 (2H, d, $J = 6.2$, 7); 8.56 (1H, s, 1); 8.68 (1H, q, $J = 3.8$, 2); 10.76 (2H, br, 6)



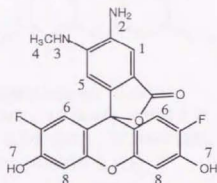
5-Amino-6-(*N*-methylamino)-2',7'-difluoro-3',6'-dihydroxy-spiro[isobenzofuran-1(3*H*),9'-

[9*H*]xanthen]-3-one (DAF-8 M2)

51 を原料に, DAF-7 と同様に合成する。 (y. 60%)

・ $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)

δ 2.63 (3H, d, $J = 4.2$, 4); 5.12 (2H, s, 2); 5.87 (1H, br, 3); 5.92 (1H, s, 5); 6.41 (2H, d, $J = 11.2$, 6); 6.84 (2H, d, $J = 7.5$, 8); 6.95 (1H, s, 1); 10.63 (2H, s, 7)



第4章

3,6-Bis(diethylamino)-9-(3-amino-2-carboxy-4-nitrophenyl)xanthylum inner salt 52

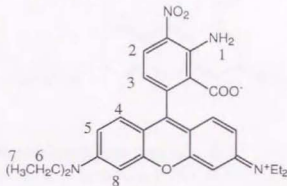
33 (2.95 g, 0.010 mol) と *N,N*-Diethyl-3-aminophenol (3.33 g, 0.020 mol) を乳鉢でよく混ぜ、180 °C で溶解。80 ml (200 ml 程度で行った方がよいと思われる。) の 2 N HCl を加え、2 h 還流。NaOH 水溶液で中和し、析出物を濾取。シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 5/95) で精製 (*R*_f = 0.3, MeOH/CH₂Cl₂ = 5/95)。 (y. 2.97 g, 59%)

・ ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.09 (12H, t, *J* = 7.0, 7); 3.35 (8H, q, *J* = 7.0, 6); 6.38 (1H, d, *J* = 8.6, 3); 6.42-6.45 (4H, m, 5, 8); 6.67 (2H, d, *J* = 9.7, 4); 8.04 (2H, br, 1); 8.33 (1H, d, *J* = 8.6, 2)

尚, neat ではなく, キシレン中 reflux 18 h,

dry up, 希 HCl 中 reflux することにより合成することも可能。



3,6-Bis(diethylamino)-9-(3,4-diamino-2-carboxyphenyl)xanthylum inner salt (DAR-1)

105 ml の水に 6.1 g の Na₂S · 9H₂O を溶かし、52 (2.97 g, 5.9 mmol) を懸濁させ、更に 2.83 g の NaSH · nH₂O を加え Ar 雰囲気下 24 h 還流。塩酸性にし、析出物を濾取。シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(conversion y. 72%, 原料回収 2.22 g)

・ ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)

δ 1.08 (12H, t, *J* = 6.8, 8); 3.33 (8H, m, 7); 4.98 (2H, s, 2); 5.86 (2H, s, 1); 6.06 (1H, d, *J* = 7.7, 4); 6.37-6.41 (4H, m, 6); 6.55 (2H, d, *J* = 8.6, 5); 6.78 (1H, d, *J* = 7.7, 3)

・ MS *m/z* 472 (*M*⁺) · IR 1717 (C=O)

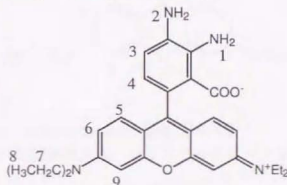
・ m.p. 145 °C

・ EA Calcd. for C₂₈H₃₂N₄O₃ · 0.5H₂O: C, 69.83;

H, 6.91; N 11.64. Found: C, 69.85; H, 6.83; N

11.44.

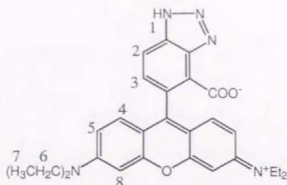
尚, 原料回収が多いのは水に溶けにくい為で, エタノールを溶媒として Pd/C 触媒を用いた接触還元によると改善されると考えている。



3,6-Bis(diethylamino)-9-(4-carboxy-benzotriazol-5-yl)xanthylum inner salt (DAR-1 T)

DAR-1 を MeOH に溶かして、NO gas をバブルし、溶媒を溜去後、シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 7/93 v/v) により精製した。

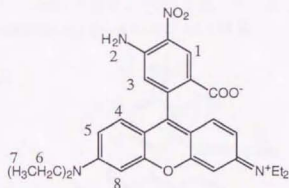
- ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)
 δ 1.10 (12H, t, *J* = 6.4, 7); 3.34 (8H, m, 6);
 6.50-6.71 (7H, m, 3,4,5,8); 8.01 (1H, d, *J* = 8.1, 2)
- FAB-MS *m/z* 484 ((M+H)⁺)
- m.p. 300 °C 以上



3,6-Bis(diethylamino)-9-(5-amino-2-carboxy-4-nitrophenyl)xanthylum inner salt 5 3

3 4 (1.9 g, 7.7 mmol) を原料に、5 2 と同様に合成。 (y. 0.30 g, 7.7%)

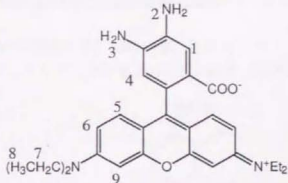
- ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)
 δ 1.09 (12H, t, *J* = 7.0, 7); 6.41 (2H, d, *J* = 2.4, 8); 6.45 (2H, dd, *J* = 8.8, 2.4, 5); 6.63 (2H, d, *J* = 8.8, 4); 6.65 (1H, s, 3); 7.90 (2H, s, 2); 8.47 (1H, s, 1)



3,6-Bis(diethylamino)-9-(4,5-diamino-2-carboxyphenyl)xanthylum inner salt (DAR-2)

5 3 をエタノールに溶かし、Pd/C 触媒を用いた接触還元後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製。(定量的)

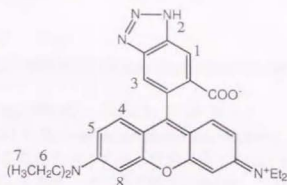
- ¹H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)
 δ 1.08 (12H, t, *J* = 6.8, 8); 4.95 (2H, br, 2);
 5.52 (2H, br, 3); 6.09 (1H, s, 4); 6.37 (2H, d, *J* = 2.4, 9); 6.41 (2H, dd, *J* = 8.8, 2.4, 6); 6.51 (2H, d, *J* = 8.8, 5); 6.89 (1H, s, 1)
- MS *m/z* 472 (M⁺)
- m.p. 158-163 °C(dec.)



3,6-Bis(diethylamino)-9-(5-carboxy-benzotriazol-6-yl)xanthylum inner salt (DAR-2 T)

DAR-2 を原料に DAR-1 T と同様に合成。

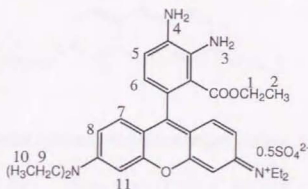
- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6)
 δ 1.08 (12H, t, $J = 7.0, 7$); 6.38 (2H, dd, $J = 8.2, 2.2, 5$); 6.44 (2H, d, $J = 2.2, 8$); 6.49 (2H, d, $J = 8.6, 4$); 7.63 (1H, s, 3); 8.57 (1H, s, 1)
 • MS m/z 483 (M^+) • m.p. 300 °C 以上



3,6-Bis(diethylamino)-9-(2-ethoxycarbonyl-3,4-diaminophenyl)xanthylum sulfate (DAR-1 EE の合成)

DAR-1 (113 mg, 2.39 mmol) を最少量の EtOH に溶かし、濃硫酸 1 滴ずつ加えて reflux しつつ TLC で反応を追う。エタノールを溜去し、NaOH 水溶液で中和した後の析出物を濾取。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 8/92$ v/v) にて精製。(26 mg, y. 20%, 原料回収 62 mg)

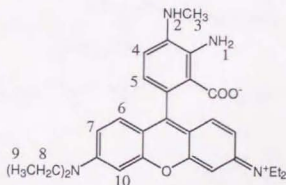
- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)
 δ 0.66 (3H, t, $J = 7.1, 2$); 1.33 (12H, t, $J = 7.1, 10$); 3.61 (8H, q, $J = 7.1, 9$); 4.19 (2H, q, $J = 7.1, 1$); 4.55 (2H, s, 4); 6.05 (2H, s, 3); 6.33 (1H, d, $J = 7.9, 6$); 6.74 (2H, d, $J = 2.2, 11$); 6.83 (2H, dd, $J = 9.7, 2.2, 8$); 6.94 (1H, d, $J = 7.9, 5$); 7.45 (2H, d, $J = 9.7, 7$)
 • MS m/z 501 (M^+)



3,6-Bis(diethylamino)-9-[3-amino-4-(N-methylamino)-2-carboxyphenyl]xanthylum inner salt (DAR-M)

DAR-1 (231 mg, 0.489 mmol) を 10 ml の EtOH に溶解させ、MeI 50 μl (1.7 eq.) 加え、oil bath つけ、80 °C に昇温。1 h 毎に TLC チェックして、MeI を 50 μl ずつ追加 (原料消失とジメチル体生成のバランスにより程良いところで止める)。シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 10/90$, $R_f = 0.4-0.5$.) & プレパラティブ TLC (MeOH/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 15/85$) で精製。(y. 25 mg, 11%)

- $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)
 δ 1.13 (12H, t, $J = 7.0, 9$); 2.86 (3H, s, 3); 3.33 (8H, q, $J = 7.0, 8$); 6.37-6.43 (5H, m, 5,7,10);



6.75 (1H, d, $J = 7.9$, 4); 6.81 (2H, d, $J = 9.0$, 6)

• FAB-MS m/z 487 ($(M+H)^+$) • m.p. 150-154 °C

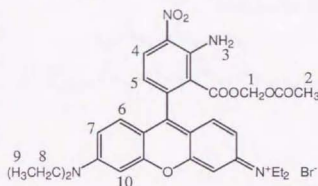
3,6-Bis(diethylamino)-9-(2-acetoxymethoxycarbonyl-3-amino-4-nitrophenyl)xanthylium bromide

5 3

5 2 (494 mg, 0.98 mmol) を 5 ml CH_2ClCH_2Cl (dist.) に溶解し, diisopropylethylamine (DIEA) (dist.) 200 μ l 入れた後, acetoxymethyl bromide (AMBr) 100 μ l 加える。室温にて攪拌 (密栓)。1 日後に TLC チェックし, 状況によって DIEA と AMBr 先と同量加える。さらに 18 h 後, CH_2Cl_2 を加え, 水でよく洗う。dry up。シリカゲルクロマトグラフィー ($MeOH/CH_2Cl_2 = 6/94$) (TLC: $R_f = 0.4$ • $MeOH/CH_2Cl_2 = 10/90$) により精製。 (124 mg, y. 19%, 原料回収 359 mg)

• 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

δ 1.36 (12H, t, $J = 7.1$, 9); 1.74 (3H, s, 2); 3.70 (8H, q, $J = 7.1$, 8); 5.45 (2H, s, 1); 6.55 (1H, d, $J = 8.6$, 5); 6.88 (2H, d, $J = 2.4$, 10); 7.05 (2H, dd, $J = 9.5, 2.4$, 7); 7.16 (2H, d, $J = 9.5$, 6); 8.47 (2H, br, 3); 8.53 (1H, d, $J = 8.6$, 4)



3,6-Bis(diethylamino)-9-(2-acetoxymethoxycarbonyl-3,4-diaminophenyl)xanthylium bromide
(DAR-1 AM)

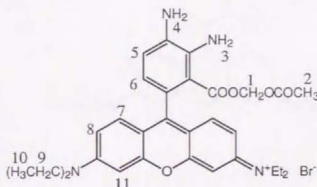
5 3 (381 mg, 0.58 mmol) を EtOH 90 ml に溶かし, 98 mg Pd/C (10% Pd) を少量ずつ加え, H_2 雰囲気下, 2 h 室温にて攪拌。ろ過後, dry up。

シリカゲルクロマトグラフィー ($MeOH/CH_2Cl_2 = 10/90$) (TLC: $R_f = 0.3$, $MeOH/CH_2Cl_2 = 10/90$) により精製。 (291 mg, y. 80%)

• 1H -NMR (300 MHz, $CDCl_3$)

δ 1.31 (12H, t, $J = 7.0$, 10); 1.67 (3H, s, 2); 3.59 (8H, q, $J = 7.0$, 9); 5.34 (2H, s, 1); 6.24 (1H, d, $J = 7.9$, 6); 6.71 (2H, d, $J = 2.6$, 11); 6.82 (2H, dd, $J = 9.5$, 2.6, 8); 6.93 (1H, d, $J = 7.9$, 5); 7.41 (2H, d, $J = 9.5$, 7)

• FAB-MS m/z 545 (M^+)



3,6-Bis(diethylamino)-9-[2-acetoxymethoxycarbonyl-3-amino-4-(*N*-methylamino)phenyl]-xanthylum iodide (DAR-M AM)

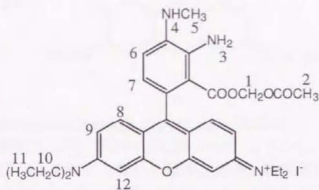
DAR-1 AM (300 mg, 0.48 mmol) を 30 ml の EtOH に溶解させ、MeI 500 μ l (17 eq.) を加え、oil bath つけ、80 $^{\circ}$ C に昇温。4 h 後に TLC チェックを行い、さらに MeI を 500 μ l 追加し、2 h 攪拌。(原料消失とジメチル体生成のバランスにより、程良いところまで繰り返す。) シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90, R_f = 0.6) & プレパラティブ TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90) で精製。(y. 68 mg, 21%, DAR-1 AM⁺Br⁻: 87 mg, DAR-1 AM⁺I⁻: 67 mg をそれぞれ回収。)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.34 (12H, t, *J* = 7.0, 11); 1.67 (3H, s, 2); 2.98 (3H, s, 5); 3.63 (8H, q, *J* = 7.0, 10); 5.36 (2H, s, 1); 6.42 (1H, d, *J* = 8.0, 7); 6.66 (1H, d, *J* = 8.0, 6); 6.75 (2H, d, *J* = 2.4, 12); 6.84 (2H, dd, *J* = 9.3, 2.4, 9); 7.43 (2H, d, *J* = 9.3, 8)

• FAB-MS *m/z* 559 (M⁺)

• m.p. 147-150 $^{\circ}$ C



3,6-Bis(dimethylamino)-9-(4-carboxy-1-methylbenzotriazol-5-yl)xanthylum inner salt (DAR-M T)

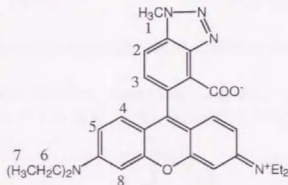
DAR-M (8.0 mg, 16 μ mol) を MeOH 溶かして、NO gas をバブルし、溶媒を溜去後、プレパラティブ TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90 v/v) により精製した。(2.0 mg, y. 24%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.12 (12H, t, *J* = 7.1, 7); 3.32 (8H, q, *J* = 7.1, 6); 4.37 (3H, s, 1); 6.31 (2H, dd, *J* = 9.0, 2.5, 5); 6.43 (2H, d, *J* = 2.5, 8); 6.58 (2H, d, *J* = 9.0, 4); 7.26 (1H, d, *J* = 8.6, 3); 7.83 (1H, d, *J* = 8.6, 2)

• FAB-MS *m/z* 498 ((M+H)⁺)

• m.p. 155-160 $^{\circ}$ C

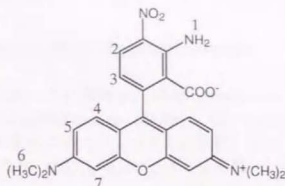


3,6-Bis(dimethylamino)-9-(3-amino-2-carboxy-4-nitrophenyl)xanthylum inner salt 5 4

3 3 (6.33 g, 21.6 mmol) と *N,N*-Dimethyl-3-aminophenol (7.01 g, 50.8 mmol) を 180 °C で溶融し, 2 h 攪拌。360 ml の 1 N HCl を加え, 1 h 還流。NaOH 水溶液で中和し, CH₂Cl₂ で抽出, 溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 7/93 v/v, R_f = 0.5) で精製。 (6.40 g, y. 66.4%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.99 (12H, s, 6); 6.36 (1H, d, *J* = 8.6, 3); 6.43 (2H, dd, *J* = 8.8, 2.6, 5); 6.48 (2H, d, *J* = 2.6, 7); 6.70 (2H, d, *J* = 8.8, 4); 7.81 (2H, br, 1); 8.37 (1H, d, *J* = 8.6, 2)



3,6-Bis(dimethylamino)-9-(3,4-diamino-2-carboxyphenyl)xanthylum inner salt (DAR-4)

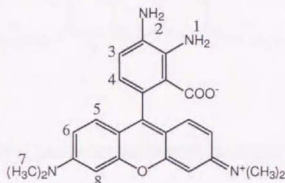
70 ml の CH₂Cl₂ と 130 ml の EtOH の混合溶媒に 5 4 (0.973 g, 2.18 mmol) を溶かし, 3.6 g の 10% Pd/C 触媒を加え, 水素雰囲気下 2 h 室温にて激しく攪拌。濾過, 溶媒溜去後, シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 5/95 → 10/90 v/v) (TLC: R_f = 0.3-0.4, MeOH/CH₂Cl₂ = 7/93 v/v) で精製。

(0.584 g, y. 65.4%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.97 (12H, s, 7); 5.03 (2H, br, 1); 6.34 (1H, d, *J* = 7.7, 4); 6.40 (2H, dd, *J* = 8.8, 2.6, 6); 6.46 (2H, d, *J* = 2.6, 8); 6.75 (2H, d, *J* = 8.8, 5); 6.90 (1H, d, *J* = 7.7, 3)

• FAB-MS: *m/z* 417 ((M+H)⁺)

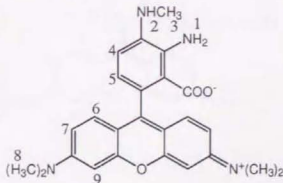


3,6-Bis(dimethylamino)-9-[3-amino-4-(*N*-methylamino)-2-carboxyphenyl]xanthylum inner salt (DAR-4M)

DAR-4 (553 mg, 1.33 mmol) を 100 ml の EtOH に溶解させ, methyl iodide 1 ml 加え, oil bath つけ, 80 °C に昇温。3.5 h 後, methyl iodide を 1 ml 追加し, 1 h 後に反応を止める (TLC で追いつながら, 原料消失とジメチル体生成のバランスにより程良いところで止める)。

溶媒溜去後, シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 7/93 v/v) (R_f = 0.6, MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90 v/v) & プレパラティブ TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90 v/v) で精製。 (140 mg, y. 24.5%, 原料回収 0.25 g)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)



δ 2.92 (3H, s, 3); 2.97 (12H, s, 8); 4.99 (2H, br, 1); 6.40 (2H, dd, $J = 8.6, 2.6$, 7); 6.47 (2H, d, $J = 2.6$, 9); 6.47 (1H, d, $J = 8.0$, 5); 6.75 (2H, d, $J = 8.6$, 6); 6.85 (1H, d, $J = 8.0$, 4)

• FAB-MS: m/z 431 ((M+H)⁺) • m.p. 219 °C

3,6-Bis(dimethylamino)-9-(2-acetoxymethoxycarbonyl-3-amino-4-nitrophenyl)xanthylum

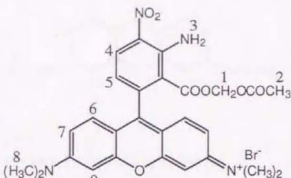
bromide 55

54 (2.44 g, 5.46 mmol) を 120 ml dist. $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{Cl}$ に溶解し, diisopropylethylamine (dist. DIEA) (1 ml, 5.6 mmol) 入れた後, acetoxymethyl bromide (AMBr) (0.55 ml, 5.6 mmol) を加える。室温にて攪拌 (密栓)。1 日後毎に TLC チェックし, 状況によって DIEA と AMBr を初回の半量ずつ加える。3~4 日後, CH_2Cl_2 を加え, 水でよく洗い, 溶媒溜去。シリカゲルクロマトグラフィー

($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 7/93 \rightarrow 10/90$ v/v) (TLC: $R_f = 0.3-0.4$, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 10/90$ v/v) により精製。(0.445 g, y. 13.6%, 原料回収 1.70 g)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 1.75 (3H, s, 2); 3.40 (12H, s, 8); 5.41 (2H, s, 1); 6.56 (1H, d, $J = 8.6$, 5); 6.97 (2H, d, $J = 2.4$, 9); 7.07 (2H, dd, $J = 9.5, 2.4$, 7); 7.18 (2H, d, $J = 9.5$, 6); 8.45 (2H, br, 3); 8.54 (1H, d, $J = 8.6$, 4)



3,6-Bis(dimethylamino)-9-(2-acetoxymethoxycarbonyl-3,4-diaminophenyl)xanthylum bromide

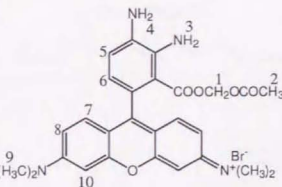
56

55 (443 mg, 0.739 mmol) を EtOH 100 ml と CH_2Cl_2 100 ml の混合溶媒に溶かし, 0.25 g の 10% Pd/C 触媒を加え, 水素雰囲気下, 2 h 室温にて攪拌。濾過, 溶媒溜去後, シリカゲルクロマトグラフィー

($\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 10/90$ v/v) (TLC: $R_f = 0.3$, $\text{MeOH}/\text{CH}_2\text{Cl}_2 = 10/90$ v/v) にて精製。(214 mg, y. 50.9%)

• $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)

δ 1.69 (3H, s, 2); 3.33 (12H, s, 9); 4.81 (2H, br, 4); 5.32 (2H, s, 1); 6.29 (1H, d, $J = 7.9$, 6); 6.47 (2H, br, 3); 6.78 (2H, d, $J = 2.6$, 10); 6.91 (2H, dd, $J = 9.5, 2.6$, 8); 6.94 (1H, d, $J = 7.9$, 5); 7.45 (2H, d, $J = 9.5$, 7)



3,6-Bis(dimethylamino)-9-[2-acetoxymethoxycarbonyl-3-amino-4-(*N*-methylamino)phenyl]-xanthylum iodide (DAR-4M AM)

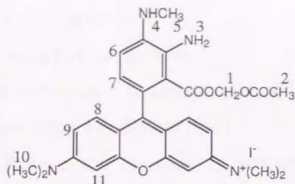
DAR-4 AM (133 mg, 0.234 mmol) を 15 ml の EtOH に溶解させ、methyl iodide 500 μ l を加え、oil bath つけ、80 $^{\circ}$ C に昇温。2 h 後、methyl iodide を 300 μ l 追加し、さらに 1 h 攪拌。(TLC チェックにより原料消失とジメチル体生成のバランスにより程良いところで止める。) 溶媒溜去後、シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 7/93 v/v) & プレパラティブ TLC (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90 v/v) で精製。(40.5 mg, y. 27.5%, DAR-AM⁺ I⁻: 70 mg 回収)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 1.69 (3H, s, 2); 2.99 (3H, d, J = 4.6, 5); 3.36 (12H, s, 10); 5.06 (1H, q, J = 4.6, 4); 5.33 (2H, s, 2); 6.34 (2H, s, 3); 6.46 (1H, d, J = 7.9, 7); 6.69 (1H, d, J = 7.9, 6); 6.79 (2H, d, J = 2.6, 11); 6.91 (2H, dd, J = 9.5, 2.6, 9); 7.48 (2H, d, J = 9.5, 8)

• FAB-MS: m/z 503 (M⁺)

• m.p. 177-178 $^{\circ}$ C



3,6-Bis(dimethylamino)-9-(4-carboxy-1-methylbenzotriazol-5-yl)xanthylum inner salt (DAR-4M T)

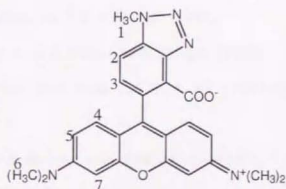
DAR-4M (25 mg, 58 μ mol) を 10 ml MeOH と 10 ml CH₂Cl₂ の混合溶媒に溶かして、NO gas をバブルし、溶媒を溜去後、シリカゲルクロマトグラフィー (MeOH/CH₂Cl₂ = 10/90 v/v \rightarrow 20/80 v/v + acetic acid 0.02% v/v) により精製した。溶媒溜去後、CH₂Cl₂ に溶かし、不溶物を濾去して CH₂Cl₂ 溜去。(18.5 mg, y. 72%)

• ¹H-NMR (300 MHz, CDCl₃)

δ 2.98 (12H, s, 6); 4.41 (3H, s, 1); 6.36 (2H, dd, J = 9.0, 2.6, 5); 6.50 (2H, d, J = 2.6, 7); 6.62 (2H, d, J = 9.0, 4); 7.24 (1H, d, J = 8.5, 3); 7.77 (1H, d, J = 8.5, 2)

• FAB-MS: m/z 442 ((M+H)⁺)

• m.p. 242-245 $^{\circ}$ C



References

- 1) Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. *Nature* **327**, 524-526 (1987).
- 2) 長 哲郎, 佐藤 伸, 幸田清一郎, 吉田忠雄, 高橋 甫 & 富永博夫 NOx の化学 共立出版 (1978).
- 3) Feelisch, M. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **17** (suppl. 3), S25 (1991).
- 4) Drago, R. S. & Paulik, F. E. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 96-98 (1960).
- 5) Drago, R. S. & Karstetter, B. R. *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1819-1822 (1961).
- 6) Maragos, C. M., Morley, D., Wink, Dunams, T. M., Saavedra, J. E., Hoffman, A., Bove, A. A., Isaac, L., Hrabie, J. A. & Keefer, L. K. *J. Med. Chem.* **34**, 3242-3247 (1991).
- 7) Hrabie, J. A., Klose, J. R., Wink, D. A. & Keefer, L. K. *J. Org. Chem.* **58**, 1472-1476 (1993).
- 8) Blough, N. V. & Zafiriou, O. C. *Inorg. Chem.* **24**, 3502-3504 (1985).
- 9) Goldstein, S. & Czapski, G. *Inorg. Chem.* **35**, 5935-5940 (1996).
- 10) Uppu, R. M., Squadrito, G. L. & Pryor, W. A. *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 335-343 (1996).
- 11) Nagano, T., Takizawa, H. & Hirobe, M. *Tetrahedron Lett.* **36**, 8239-8242 (1995).
- 12) Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. & Stamler, J. S. *Nature* **380**, 221-226 (1996).
- 13) Iyengar, R., Stuehr, D. J. & Marletta, M. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6369-6373 (1987).
- 14) Muscara, M. N. & Nucci, G. *J. Chromatography B: Biomed. Appl.* **686**, 157-164 (1996).
- 15) 石井里枝, 斉藤貢一, 高橋邦彦, 星野庸二, 鈴木澄子 & 中澤裕之 分析化学 **44**, 829-833 (1995).
- 16) Lagerwerf, F. M., Wever, R. M. F., Rijn, H. J. M., Versluis, C., Heerma, W., Haverkamp, J., Koomans, H. A., Rabelink, T. J. & Boer, P. *Anal. Biochem.* **257**, 45-52 (1998).
- 17) Leone, A. M., Furst, V. W., Foxwell, N. A., Celtek, S. & Moncada, S. *Biochem. Biophys.*

- Res. Commun.* **221**, 37-41 (1996).
- 18) Zhou, X. & Arnold, M. A. *Anal. Chem.* **68**, 1748-1754 (1996).
- 19) Gunasekar, P. G., Kanthasamy, A. G., Borowitz, J. L. & Isom, G. E. *J. Neurosci. Methods* **61**, 15-21 (1995).
- 20) Miles, A. M., Bohle, D. S., Glassbrenner, P. A., Hansert, B., Wink, D. A. & Grisham, M. B. *J. Biol. Chem.* **271**, 40-47 (1996).
- 21) Bätz, M., Korth, H. G. & Sustman R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **36**, 1501-1503 (1997).
- 22) Ichimori, K., Ishida, H., Fukahori, M., Nakazawa, H. & Murakami, E. *Rev. Sci. Instrum.* **65**, 2714-2718 (1994).
- 23) Friedemann, M. N., Robinson, S. W. & Gerhardt, G. A. *Anal. Chem.* **68**, 2621-2628 (1996).
- 24) Blatter, L. A., Taha, Z., Mesaros, S., Shacklock, P. S., Wier, W. G. & Malinski, T. *Circ. Res.* **76**, 922-924 (1995).
- 25) Vallance, P., Patton, S., Bhagat, K., MacAllister, R., Radomski, M., Moncada, S. & Malinski, T. *Lancet* **346**, 153-154 (1995).
- 26) Shibuki, K. & Okada, D. *Nature* **349**, 326-328 (1991).
- 27) Shibuki, K. & Kimura, S. *J. Physiol.* **498**, 443-452 (1997).
- 28) Kosaka, H., Watanabe, M., Yoshihara, H., Harada, N. & Shiga, T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **184**, 1119-1124 (1992).
- 29) Yoshimura, T. *Anal. Sci.* **13**, 451-454 (1997).
- 30) Komarov, A., Mattson, D., Jones, M. M., Singh, P. K. & Lai, C. -S. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **195**, 1191-1198 (1993).
- 31) Wang, P. & Zweier, J. L. *J. Biol. Chem.* **271**, 29223-29230 (1996).
- 32) Tominaga, T., Sato, S., Ohnishi, T. & Ohnishi, S. T. *Brain Res.* **614**, 342-346 (1993).
- 33) Yoshimura, T., Yokoyama, H., Fujii, S., Takayama, F., Oikawa, K. & Kamada, H. *Nature Biotech.* **14**, 992-994 (1996).

- 34) Fujii, H., Xiaoming, W., Jianhui, Z., Lawrence, J. B. & Yoshikawa, K. *Magn. Reson. Med.* **42**, 235-239 (1999).
- 35) Zhang, Y., Samson, F. E., Nelson, S. R. & Pazdernik, T. L. *J. Neurosci. Methods* **68**, 165-173 (1996).
- 36) Ignarro, L. J., Fukuto, J. M., Griscavage, J. M., Rogers, N. E. & Byrns, R. E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8103-8107 (1993).
- 37) Kikuchi, K., Nagano, T. & Hirobe, M. *Biol. Pharm. Bull.* **19**, 649-651 (1996).
- 38) Grynkiewicz, G., Poenie, M. & Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **260**, 3440-3450 (1985).
- 39) Minta, A., Kao, J. P. Y. & Tsien, R. Y. *J. Biol. Chem.* **264**, 8171-8178 (1989).
- 40) 佐瀬一郎, 宮田英威 & 木下一彦 *ファルマシア* **32**, 281-284 (1996).
- 41) Misko, T. P., Schilling, R. J., Salvemini, D., Moore, W. M. & Currie, M. G. *Anal. Biochem.* **214**, 11-16 (1993).
- 42) Miles, A. M., Chen, Y., Owens, M. W. & Grisham, M. B. *Methods* **7**, 40-47 (1995).
- 43) Peterson, M. A. & Harrison DG, T. *Circulation* **83**, 1404-1409 (1991).
- 44) Bamberger, E. & Schieffelin, W. J. *Ber.* **22**, 1374-1384 (1889).
- 45) Munkholm, C., Parkinson, D. -R. & Walt, D. R. *J. Am. Chem. Soc.* **112**, 2608-2612 (1990).
- 46) McKinney, R. M., Spillane, J. T. & Pearce, G. W. *J. Org. Chem.* **27**, 3986-3988 (1962).
- 47) de Silva, A. P., Gunaratne, H. Q. N., Gunlaugsson, T., Huxley, A. J. M., McCoy, C. P., Rademacher, J. T. & Rice, T. E. *Chem. Rev.* **97**, 1515-1566 (1997).
- 48) Lewis, R. S., Tannenbaum, S. R. & Deen, W. M. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 3933-3939 (1995).
- 49) Rotman, B. & Papermaster, B.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55**, 134-141 (1966).
- 50) Bredt, D. S., Hwang, P. M. & Snyder, S. H. *Nature* **347**, 768-770 (1990).
- 51) Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M. & Snyder, S. H. *Neuron* **7**, 615-624 (1991).

- 52) Sun, W. -C., Gee, K. R., Klaubert, D. H. & Haugland, R. P. *J. Org. Chem.* **62**, 6469-6475 (1997).
- 53) Griscavage, J. M., Fukuto, J. M., Komori, Y. & Ignarro, L. J. *J. Biol. Chem.* **269**, 21644-21649 (1994).
- 54) Chopp, M., Frinak, S., Walton, D. R., Smith, M. B. & Welsh, K. M. A. *Stroke* **18**, 919-923 (1987).
- 55) 渡辺光夫 ケイ光分析 廣川書店 (1970).
- 56) 西川泰治 & 平木敬三 蛍光・りん光分析法 共立出版 (1984).
- 57) Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. & Harker, L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**, 1207-1210 (1974).
- 58) Smith, P. K., Krohn, R. L., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. & Klenk, D. C. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85 (1985).
- 59) Stoppini, L., Buchs, P. A. & Muller, D. *J. Neurosci. Methods* **37**, 173-82 (1991).
- 60) Ishibashi, F., Miyoshi, N., Okahashi, H., Mizuno, M., Yamada, M. & Katagiri, M. *Chemistry Express* **6**, 37-40 (1991).
- 61) Goldstein, H. & Merminod, J. -P. *Helvetica Chim. Acta.* **35**, 1476-1480 (1952).
- 62) 亀谷哲治 有機合成化学 **IX**, 215 南江堂 (1979).
- 63) Markuszewski, R. & Diehl, H. *Talanta* **27**, 937-946 (1980).

謝辞

研究を共同で行い、ご助言いただいた、

東京大学大学院薬学系研究科神経物理学教室・桐野 豊教授、同・川原茂敬博士、

現 名古屋市立大学薬学部・平嶋尚英博士

同研究科生体異物理学教室・入村達郎教授、同・前田大輔氏、

現 静岡県立大学薬学部・今井康之教授

同大学医学部第二内科・平田恭信講師、同・名越 洋博士

熊本大学医学部・前田 浩教授、同・赤池孝章助教授

東京薬科大学生命科学部・工藤住久教授、平田三保子氏

理化学研究所・岡田大助博士

第一製薬(株)・田中淳二氏

第一化学薬品(株)の方々に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、終始親身になられ、ご指導下さいました、東京大学大学院薬学系研究科薬品代謝化学教室・長野哲雄教授に心より感謝いたします。

並びに、廣部昭名誉教授をはじめ、樋口恒彦助教授、菊地和也博士、浦野泰照博士、現 広島大学・太田 茂教授、現 共立薬科大学・増野匡彦助教授にもご指導、ご助言、ご討論していただき、深く感謝いたします。

元素分析・質量分析でお世話になりました平田涼子技官、小林 葆技官に感謝いたします。

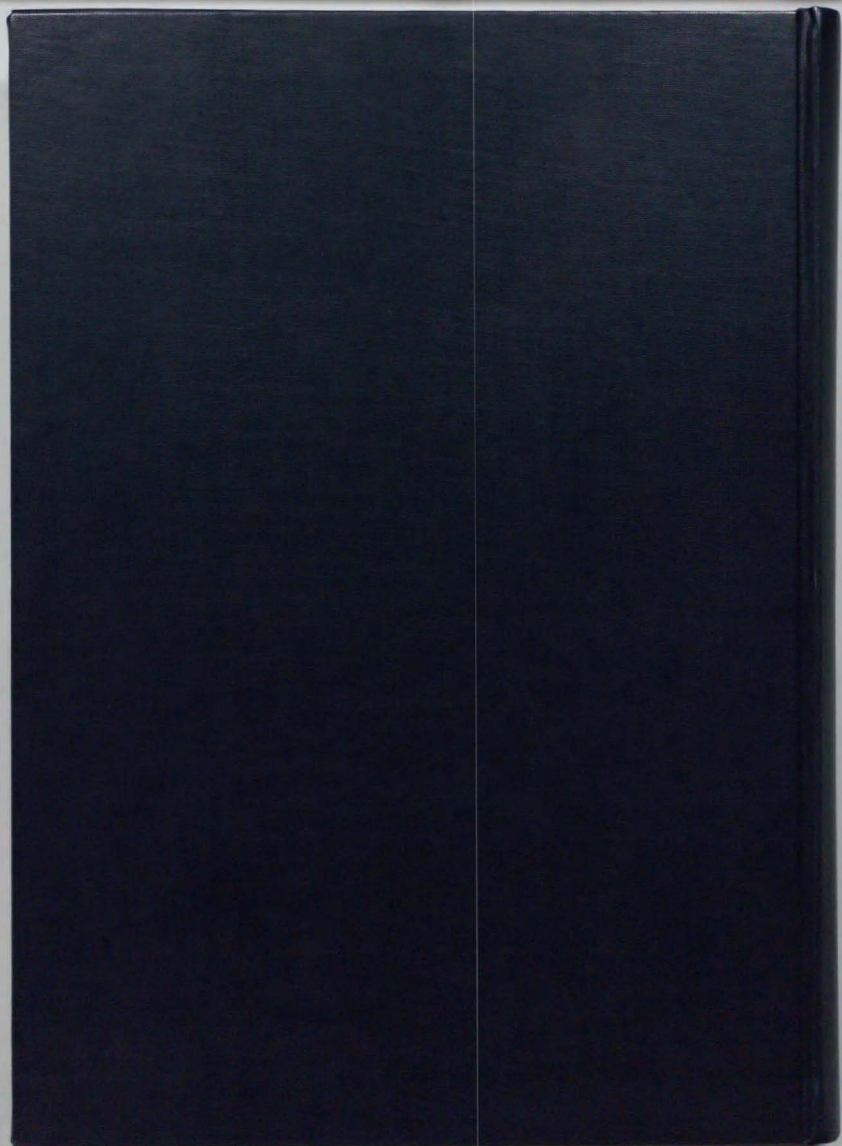
共に研究し、絶えず励まし、助言をしていただいた薬品代謝化学教室の皆様にも深く感謝いたします。

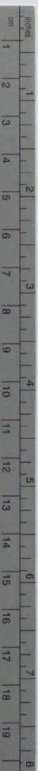
長い学生生活を共に支え合い、励まし合った友人に感謝いたします。

最後に、博士課程修了まで温かく見守り、支えて下さった両親に心より感謝いたします。

2000年 1月20日

東京大学大学院薬学研究科
分子薬学専攻薬品代謝化学教室
小 島 宏 建





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

