

博士論文

生体内の脂質アルキルラジカルを  
非侵襲的に検出する  
核医学イメージングプローブの開発

神戸薬科大学大学院

薬品物理化学講座

東 里沙

2024

## 目次

### 略語表

序論----- 1

本論----- 6

### 第1章 ニトロキシド化合物を母体とする放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル

検出プローブの合成と構造解析----- 6

1-1 緒言----- 6

1-2 結果----- 8

1-2-1 放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの合成----- 8

1-2-2 ペンチル基を導入したニトロキシドプローブおよび対照化合物の合成- 9

1-2-3 アスコルビン酸ナトリウムとの反応性評価-----13

1-2-4 2,4 位置換基の立体的嵩高さが異なる TEMPO 型ニトロキシド化合物の  
合成-----14

1-2-5 X 線結晶構造解析-----16

1-2-6 立体配置の推定-----20

1-2-7 2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体における還元反応性評価--22

1-2-8 DFT (密度汎関数理論) 計算-----24

1-2-9 *in vivo* ESR -----26

1-3 考察-----28

### 第2章 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブ

としての基礎的評価-----31

2-1	緒言-----	31
2-2	結果-----	32
2-2-1	脂溶性評価-----	32
2-2-2	安定性評価-----	32
2-2-3	脂質ラジカルおよび活性酸素種との反応性評価-----	33
2-2-4	HPLC を用いた脂質ラジカルとの反応物解析-----	34
2-2-5	LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析-----	35
2-2-6	脂質ラジカル付加体の合成と LC/MS 解析-----	37
2-2-7	細胞取り込み評価-----	38
2-2-8	正常マウスにおける生体内放射能分布評価-----	40
2-2-9	炎症誘発マウスにおける生体内放射能分布評価-----	43
2-3	考察-----	44
第3章	一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける脂質ラジカルの追跡-----	46
3-1	緒言-----	46
3-2	結果-----	48
3-2-1	TTC 染色および血液脳関門損傷の評価-----	48
3-2-2	脳内放射能分布評価-----	49
3-2-3	LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析-----	52
3-2-4	エダラボン投与後の脳内放射能分布評価; bregma +0.5 mm-----	55
3-2-5	エダラボン投与後の脳内放射能分布評価; bregma -1.4 mm-----	59
3-3	考察-----	61

総括	63
謝辞	66
実験の部	67
第1章 実験の部	69
第2章 実験の部	85
第3章 実験の部	89
参考文献	92

## 略語表

本文において以下の略号を用いた。

Ac: acetyl (chemical formula;  $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})-$ )

ARG: autoradiography

Bu: butyl (chemical formula;  $\text{C}_4\text{H}_9-$ )

CYP: cytochrome P450

DFT: density functional theory

DMEM: dulbecco's modified eagle medium

DMPO: 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide

DMSO: dimethyl sulfoxide

DMT-MM: 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride

EDR: edaravone

ESI: electrospray ionization

ESR: electron spin resonance

Et: ethyl (chemical formula;  $\text{C}_2\text{H}_5-$ )

Fmoc-Cl: 9-fluorenylmethyl chloroformate

Fmoc-Osu: 9-fluorenylmethyl-succinimidyl carbonate

GSH: reduced glutathione

hfc: hyperfine coupling constant

4-HNE: 4-hydroxynonenal

HPLC: high performance liquid chromatography

HRMS: high-resolution mass spectrometry

i.v.: intravenous injection

LOX: lipoxygenase

Me: methyl (chemical formula;  $\text{CH}_3-$ )

MDA: malondialdehyde

MRI: magnetic resonance imaging

NCS: *N*-chlorosuccinimide

NMR: nuclear magnetic resonance

PBN: *N-tert*-Buthyl- $\alpha$ -phenylnitronone

PBS: phosphate-buffered saline

PEG: polyethylene glycol

PG: propylene glycol

POBN:  $\alpha$ -(4-pyridyl *N*-oxide)-*N-tert*-butylnitronone

ROI: region of interest

ROS: reactive oxygen species

rt-PA: recombinant tissue-type plasminogen activator

TEMPOL: 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl

THF: tetrahydrofuran

tMCAO: transient middle cerebral artery occlusion

TTC: 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride

## 序論

生体内で生じた活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) は、DNA、タンパク質、糖、脂質など様々な機能性分子と反応し、多様な酸化ストレス疾患の発症や進展に関与している[1]。これらの機能性分子の中でも、生体膜構成成分である多価不飽和脂肪酸は活性メチレンを有するため ROS との反応性が高く、容易に連鎖的脂質過酸化反応が進行する (Fig. 1) [2,3]。脂質過酸化反応は、脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) の生成を起点として開始され、続いて脂質ラジカルが酸素分子と反応し脂質ペルオキシラジカル ( $LOO\cdot$ ) を生成する。生成した脂質ペルオキシラジカルがさらに活性メチレンの水素原子を引き抜くことで、脂質ペルオキシド ( $LOOH$ ) と脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) が生じ、連鎖的な過酸化反応へと進行する。この脂質ペルオキシドが分解されると、マロンジアルデヒド (MDA) や 4-ヒドロキシ-2-ノネナル (4-HNE) をはじめとする種々の脂質過酸化最終生成物が生じる[2,4]。これらの脂質過酸化最終生成物は、それ自身が細胞毒性や変異原性を有し[5-7]、さらに DNA やタンパク質などの生体内の機能性分子と反応することでその働きを消失させることから、がん[8,9]や動脈硬化[10,11]をはじめとする種々の疾患と関連することが報告されている。以上のように、脂質ラジカルが生成することにより一連の反応が開始され、その後脂質分子の機能障害や過酸化物の蓄積、生体内の機能性分子との複合体形成などが起こることで、酸化ストレス疾患の様々な病態に関与している[12]。

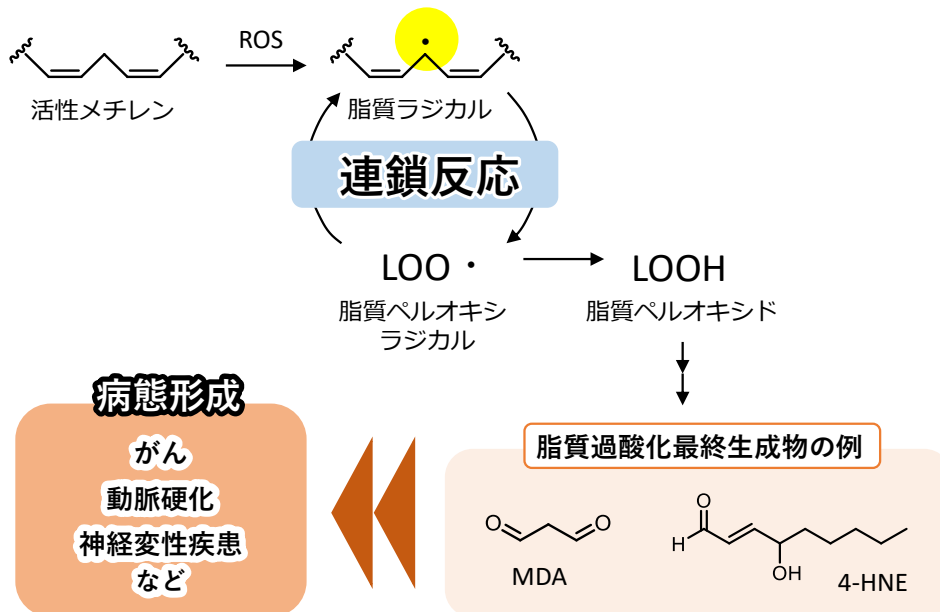
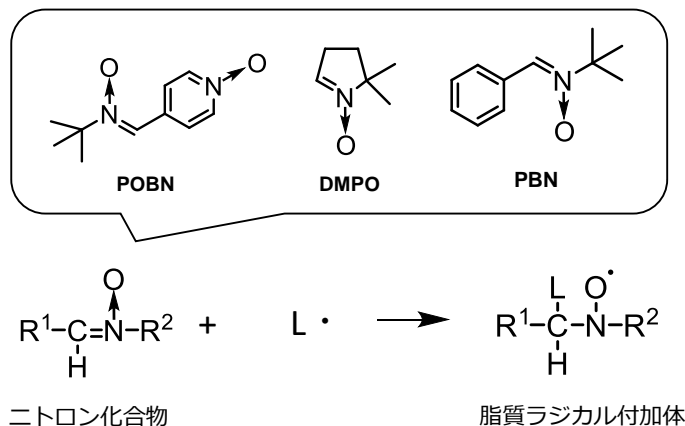


Fig. 1 Lipid peroxidation chain reaction.

そのため、脂質過酸化反応の最上流で発生する脂質ラジカルが、いつ、どこで、どのくらい生成するか明らかにできれば、その後続く反応を抑制するための新規治療薬の創出や、疾患の早期診断へと応用できることが期待される。しかしながら、脂質ラジカルは反応性が高く生体内での存在量が微量であることから、直接検出することが困難であり、生体内で実際に存在する脂質ラジカルの挙動や役割については未解明な部分が多く存在する。

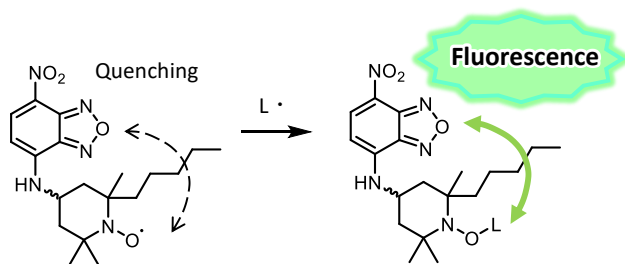
これまでに、 $\alpha$ -(4-pyridyl-1-oxide)-*N*-*tert*-butylnitron (POBN) や 5,5-dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide (DMPO)、*N*-*tert*-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) などのニトロン化合物をスピントラップ剤として脂質ラジカルと反応させ、生じた付加体を電子スピン共鳴 (electron spin resonance; ESR) により検出する手法 (ESR/スピントラップ法) が用いられてきた (Fig. 2) [13,14]。スピントラップ剤との反応により生じた付加体は安定なラジカルとなるため、半減期が比較的長寿命、かつ、室温又は生化学的溫度で取り扱えるという利点がある。さらに、本手法では得られた ESR シグナルの超微細結合定数 (hyperfine coupling constant; hfc) から元の脂質ラジカル体の構造を推測できるという特徴があるため、*in vitro* 系において数多くの研究が行われている。一方、hfc 値をもとに脂質ラジカル体の構造を推測するため、類似の hfc 値をとる脂質ラジカル分子の構造決定や複数成分の解析には不向きである。そこで、 $\omega$ -6 系多価不飽和脂肪酸 (リノール酸やアラキドン酸) や、 $\omega$ -3 系多価不飽和脂肪酸 (リノレン酸やドコサヘキサエン酸) により発生する脂質ラジカルとスピントラップ剤を反応させ、LC/MS と ESR を組み合わせた手法により、脂質ラジカル付加体を同時に複数検出した例が報告されている [15,16]。これらにより、ESR を用いた *in vitro* 研究で様々な脂質ラジカル付加体が検出されるようになった。その一方で、ESR/スピントラップ法は感度が低く多量のスピントラップ剤を必要とする。そのため、生体内でごく微量に存在する脂質ラジカルの検出には適していないという問題点があることから、より感度の高い検出手法の開発が望まれている。





**Fig. 2** Spin-trapping method for lipid radicals.

上記の問題点を解決する手法として、有機スピン化合物であるニトロキシド化合物に蛍光検出手法を組み合わせた NBD-Pen が開発された (Fig. 3) [17]。ニトロキシドとは、アミノキシルまたはニトロキシルラジカルとも呼ばれ、NO ラジカル構造 (>N-O·) を含むフリーラジカル分子である。一般的にニトロキシド化合物単独では常温、常圧下でも安定なフリーラジカルとして存在するため取り扱いが容易であり、さらに水溶液中でも安定に存在することが知られている。ニトロキシドは、そのフリーラジカルとしての特性を生かして、MRI 造影剤[18-20]や抗酸化薬[21-23]、酸化還元物質検出プローブ [24,25]として生体応用されている。また、ニトロキシドはラジカル-ラジカルカップリング反応により脂質ラジカルと反応して、安定な共有結合 (アルコキシアミン) を形成するが、この脂質ラジカルとニトロキシドとの反応 (反応速度定数  $k = 10^8 \sim 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [26]は、脂質ラジカルとスピントラップ剤との反応 (反応速度定数  $k = 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) [27,28]と比較してはるかに高い反応性を有することが知られている。加えて、常磁性種であるニトロキシドは項間交差や電子移動反応により蛍光を減弱させる[29,30]。NBD-Pen は、ニトロキシドが分子内に蛍光団を持つと蛍光消光作用を示し、脂質ラジカルと結合すると蛍光作用が回復する ON/OFF スイッチ機構を利用した蛍光プローブである。NBD-Pen により、脂質過酸化を亢進させた培養細胞で蛍光強度が有意に増加したことや、肝がんモデル動物に NBD-Pen を投与すると、肝臓の組織切片にて蛍光強度が有意に上昇したことが示され、脂質ラジカルの蛍光検出やイメージングにニトロキシド化合物 NBD-Pen が応用可能であることが確認された。



**Fig. 3** Lipid radical detection probe; NBD-Pen.

一方、蛍光は光の生体透過性が低いため、生体深部の脂質ラジカルを非侵襲的に測定できないという課題が存在する。さらに、生成する脂質代謝中間体の量は酸素分圧により劇的に変化することが報告されており[31]、脂質の代謝には酸素分圧が大きく影響する。培養細胞や摘出臓器では実際の生体内と酸素分圧が大きく異なるため、生体内で実際に存在する脂質ラジカルの分布や量が、これまでの細胞実験や摘出臓器の結果と関連しているかは不明である。つまり、疾患に関連している脂質ラジカルの生体内での挙動を正確に把握する手法はいまだ存在せず、生体内の脂質ラジカルに対する選択性、定量性の高い測定技術の開発が求められている。

そこで、生体内の脂質ラジカルを測定する新たな手法として核医学イメージング法に着目した。核医学イメージング法は、放出される電磁波を生体外から検出し、画像化することで体内挙動や分布を可視化できる技術であり、感度が極めて高く、定量性にも優れ、生体深部の検出も可能であるという特徴を有する。さらに、微量の放射性同位元素で標識された化合物を投与するため、化合物そのものの薬理作用や毒性を示すことなくイメージングが可能である。この核医学イメージング法を脂質ラジカル検出プローブに応用できれば、これまで未解明であった脂質ラジカルの生体内での分布や挙動を定量的に追跡でき、疾患との関連性の解明や疾患メカニズムの解明など幅広い応用が可能になると考えられる。

以上より、本研究では脂質過酸化反応の起点である脂質ラジカルの生体内での挙動を非侵襲的に追跡する手法の開発を目的として、脂質ラジカル捕捉能を有するニトロキシド化合物と、高感度に検出可能な核医学イメージング技術に着目した。具体的には、放射性標識したニトロキシド化合物の開発を行い、さらにその生体応用の可能性を検証すべく、以下の研究を行った。

- (1) ニトロキシドを母体化合物とした放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析
- (2) 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価
- (3) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける脂質ラジカルの追跡

## 本論

### 第 1 章 ニトロキシド化合物を母体とする放射性ヨウ素標識

#### 脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析

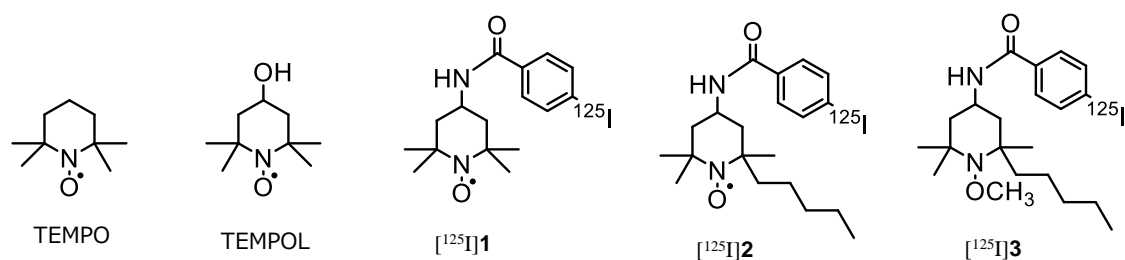
##### 1-1 緒言

ニトロキシドには環状構造や鎖状構造など様々な基本構造が存在するが、本研究では、TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl) を母体構造として選択した。TEMPOL (4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin-1-oxyl, Fig. 1-1) をはじめとする TEMPO 型ニトロキシドは、化学修飾可能な置換基をピペリジン環の 4 位に導入できるため、容易に多様な構造変換を行うことが可能である。例えば、TEMPO 型ニトロキシドのピペリジン環の 4 位にトリフェニルホスホニウム塩を結合し、ミトコンドリアへの標的性を付与したプローブや、ピロールポリアミドの導入により核への局在性を持たせた化合物の開発など、多様な誘導体化が行われている [32–35]。

一方、核医学イメージングに用いる放射性同位元素としては、現在臨床利用されており多種多様な核種が存在するヨウ素を選択した。具体的には、診断用放射性同位元素  $^{123}\text{I}$  (半減期：13.27 時間、 $\gamma$ 線エネルギー：159 keV) や、治療用放射性同位元素  $^{131}\text{I}$  (半減期：8.02 日、 $\beta$ 線エネルギー：606 keV、 $\gamma$ 線エネルギー：305 keV) を用いることを想定し、まずは実験上取り扱いの容易な  $^{125}\text{I}$  (半減期：59.40 日、 $\gamma$ 線平均エネルギー：28.37 keV) を用いた実験を計画した。ニトロキシド誘導体の合成にあたり、まずは市販品を容易に入手可能な TEMPO 誘導体を原料として用い、放射性ヨウ素標識体の合成が可能であるか、またその標識法や反応性を評価した。放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の構造としては、生体内での放射性ヨウ素の遊離を抑制するためにベンゼン環上に放射性ヨウ素を結合し、TEMPO 型ニトロキシドの 4 位にアミド結合でベンゼン環を導入した化合物 **1** を設計した (Fig. 1-1)。

また、ニトロキシドの NO 構造の  $\alpha$  位に 4 つのメチル基を有する TEMPO 型ニトロキシドは、生体内に投与するとアスコルビン酸などの還元性物質により容易にラジカル部位が還元されヒドロキシルアミン体となり [36,37]、脂質ラジカル捕捉能が消失してしま

うという問題点が存在する（反応速度定数  $k=10^1\sim 10^2\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$ ）。本研究で設計した化合物 **1** においても NO 構造の  $\alpha$  位に 4 つのメチル基を有するため、既存の TEMPO 型ニトロキシドと同様の還元反応性が懸念される。これまでに、イソインドリン系ニトロキシドやイミダゾリン系ニトロキシドの  $\alpha$  位に 4 つのエチル基を導入すると、アスコルビン酸に対する還元抵抗性が向上することが示されている[38,39]。さらに、TEMPO 型ニトロキシドにおいても  $\alpha$  位に鎖状アルキル基などの嵩高い置換基を導入することで立体障害が増大し還元抵抗性が向上することが報告されている[40,41]。そこで、ラジカル近傍に鎖状アルキル基であるペンチル基を導入した化合物 **2** (Fig. 1-1) およびその放射性ヨウ素標識体を合成し、テトラメチル置換体である化合物 **1** との比較を行った。また、化合物 **2** の対照化合物として、ニトロキシド ( $>\text{N-O}\cdot$ ) をメトキシアミン ( $>\text{N-OMe}$ ) に変換し、脂質ラジカル捕捉能を消失させた化合物 **3** (Fig. 1-1) およびその放射性ヨウ素標識体も同様に合成した。

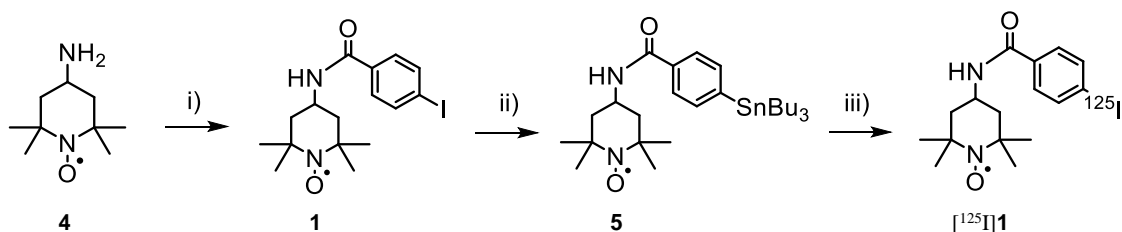


**Fig. 1-1** Chemical structures of TEMPO, TEMPOL and <sup>125</sup>I-labeled nitroxide probes.

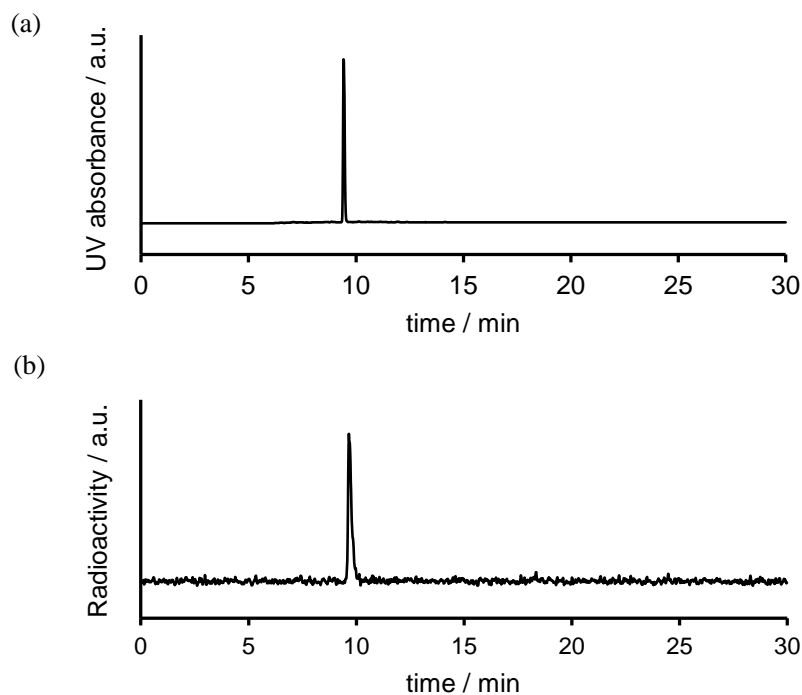
## 1-2 結果

### 1-2-1 放射性ヨウ素標識ニトロキシドプローブの合成

化合物 **1** およびその放射性ヨウ素標識体 $^{125}\text{I}$ **1** の合成経路を Scheme 1 に示す。ニトロキシドの4位にアミノ基を有する化合物 **4** を原料として用い、これに DMT-MM を縮合剤として 4-iodobenzoic acid を反応させ、非標識体である **1** を得た。その後、化合物 **1** を bis(tributyltin)と反応させることで標識前駆体 **5** を得た。続いて、*N*-chlorosuccinimide (NCS) を酸化剤としたスズ-ヨウ素交換反応により放射性ヨウ素標識を行い、 $^{125}\text{I}$ **1** を無担体状態として得た後、逆相高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた **1** との同時分析により同定した (Fig. 1-2)。放射化学的収率は 82%、放射化学的純度は >95% であった。また、 $^{125}\text{I}$ **1** の比放射能は、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  の比放射能に基づいて 80 GBq/ $\mu\text{mol}$  とした。



**Scheme 1** Synthetic scheme for radioiodinated nitroxide  $^{125}\text{I}$ **1**. i) 4-iodobenzoic acid, DMT-MM, THF; ii)  $(\text{SnBu}_3)_2$ , toluene; iii)  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , NCS, MeOH/AcOH (100:1)

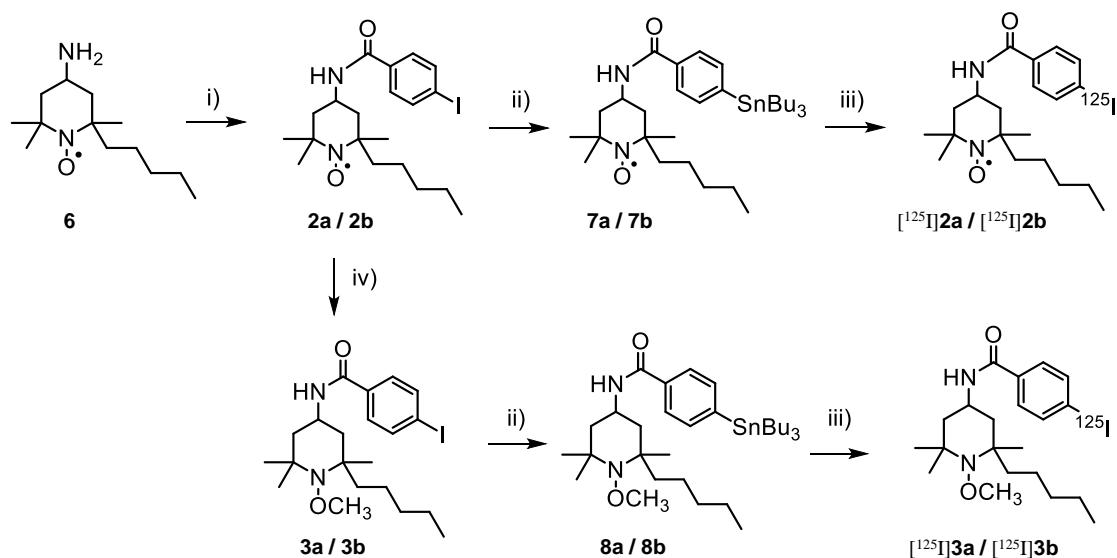


**Fig. 1-2** HPLC chromatograms of nonradioactive **1** and co-injected [ $^{125}\text{I}$ ]**1**. (a) UV chromatogram; (b) RI detected chromatogram, [ $^{125}\text{I}$ ]**1** radiochemical yield: 82%, radiochemical purity : >95%

### 1-2-2 ペンチル基を導入したニトロキシドプローブおよび対照化合物の合成

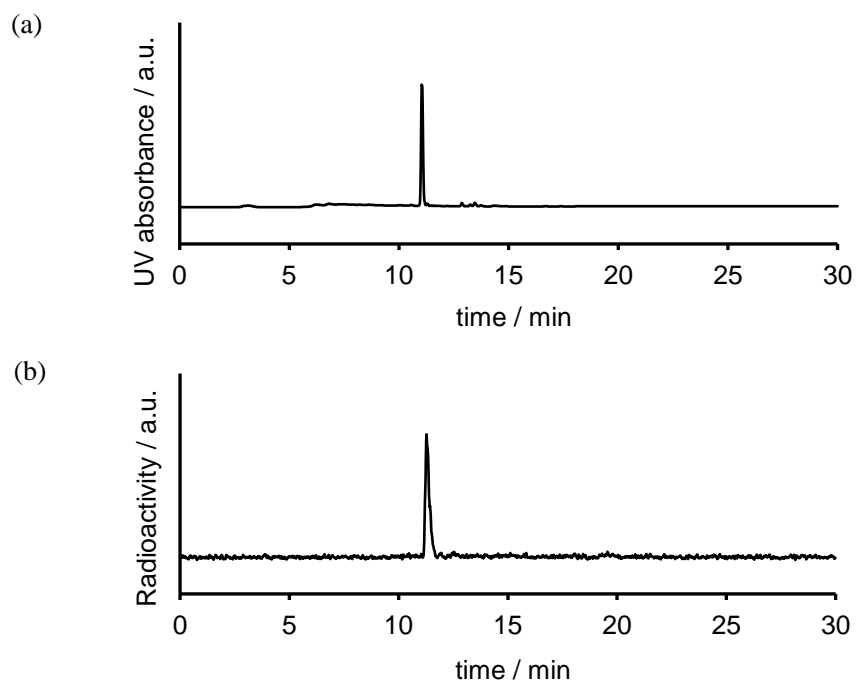
化合物 **2a**、**2b**、**3a**、**3b** およびその放射性ヨウ素標識体 ([ $^{125}\text{I}$ ]**2a**、[ $^{125}\text{I}$ ]**2b**、[ $^{125}\text{I}$ ]**3a**、[ $^{125}\text{I}$ ]**3b**) の合成経路を Scheme 2 に示す。ニトロキシドの 4 位にアミノ基を有する化合物 **6** を既報[17]に従い合成し、これに DMT-MM を縮合剤として 4-iodobenzoic acid を反応させ、非標識体である **2** を得た。化合物 **6** は立体異性体の混合物として得られるが、順相のシリカゲルクロマトグラフィーではテーリングしてしまい異性体の分離が困難であったため、異性体の混合物として次の縮合反応を行った。一方、化合物 **2** は順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより容易に立体異性体を分離可能であったため、先に溶出した低極性化合物を **2a**、後に溶出した高極性化合物を **2b** とした。化合物 **2a**、**2b** をそれぞれ bis(tributyltin) と反応させることで標識前駆体 **7a**、**7b** を得た。さらに、ニトロキシドをメチル化し、脂質ラジカルとの反応性を消失させた対照化合物を合成するため、**2a**、**2b** のラジカル部位をそれぞれメチル化し、**3a**、**3b** を得た後、同様の方法でスズ化し、標識前駆体 **8a**、**8b** を得た。続いて、NCS を酸化剤としたスズ-ヨウ素交換反応により放射性ヨウ素標識を行い、[ $^{125}\text{I}$ ]**2a**、[ $^{125}\text{I}$ ]**2b**、[ $^{125}\text{I}$ ]**3a**、[ $^{125}\text{I}$ ]**3b** を無担

体状態として得た後、逆相高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた **2a** (Fig. 1-3)、**2b** (Fig. 1-4)、**3a** (Fig. 1-5)、**3b** (Fig. 1-6) との同時分析により同定した。放射化学的収率は $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ : 85%、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$ : 87%、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ : 85%、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3b}$ : 84%、放射化学的純度はそれぞれ 95%以上であった。各放射性ヨウ素標識化合物の比放射能は、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  の比放射能に基づいて 80 GBq/ $\mu\text{mol}$  とした。

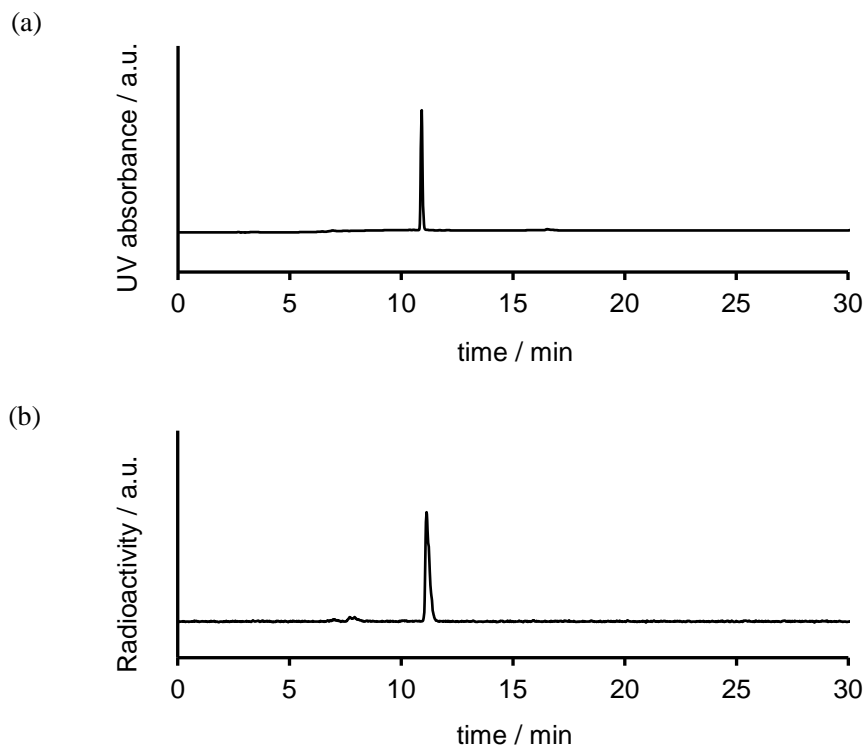


**Scheme 2** Synthetic scheme for radioiodinated nitroxide and methoxyamine. i) 4-iodobenzoic acid, DMT-MM, THF; ii)  $(\text{SnBu}_3)_2$ , toluene; iii)  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , NCS, MeOH/AcOH (100:1); iv)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , DMSO

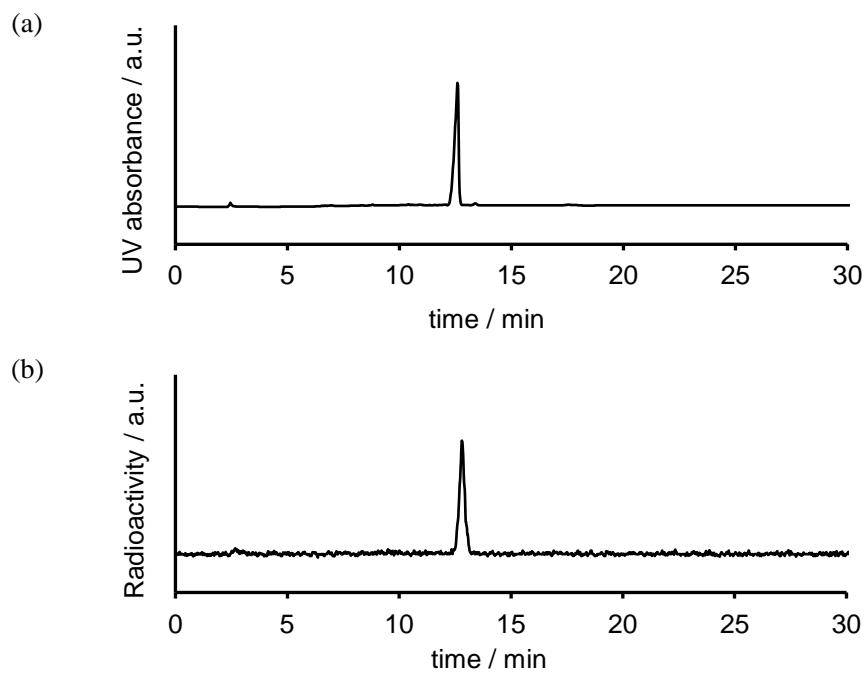




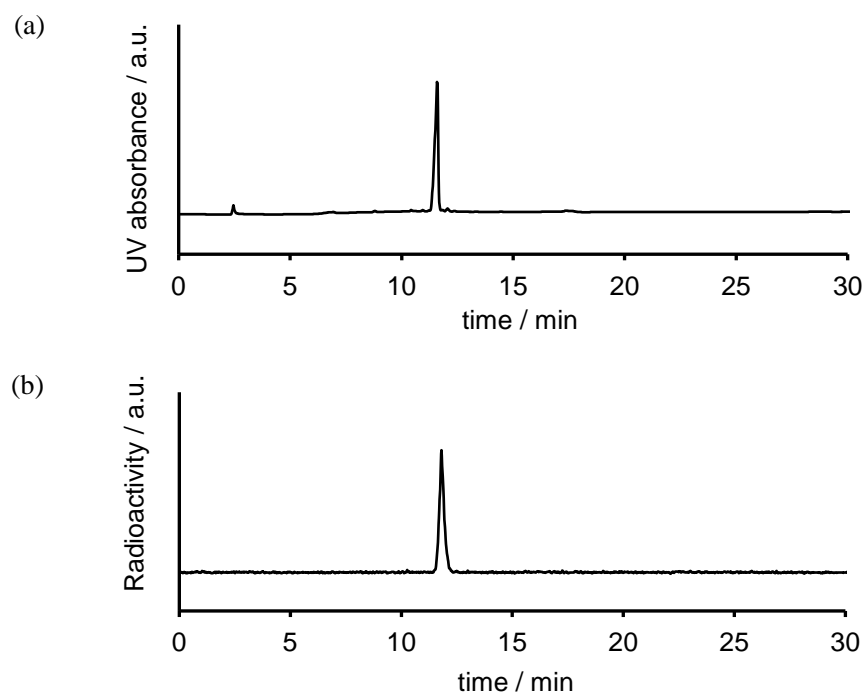
**Fig. 1-3** HPLC chromatograms of nonradioactive **2a** and co-injected [ $^{125}\text{I}$ ]**2a**. (a) UV chromatogram; (b) RI detected chromatogram, [ $^{125}\text{I}$ ]**2a** radiochemical yield: 85%, radiochemical purity : >95%



**Fig. 1-4** HPLC chromatograms of nonradioactive **2b** and co-injected [ $^{125}\text{I}$ ]**2b**. (a) UV chromatogram; (b) RI detected chromatogram, [ $^{125}\text{I}$ ]**2b** radiochemical yield: 87%, radiochemical purity : >95%



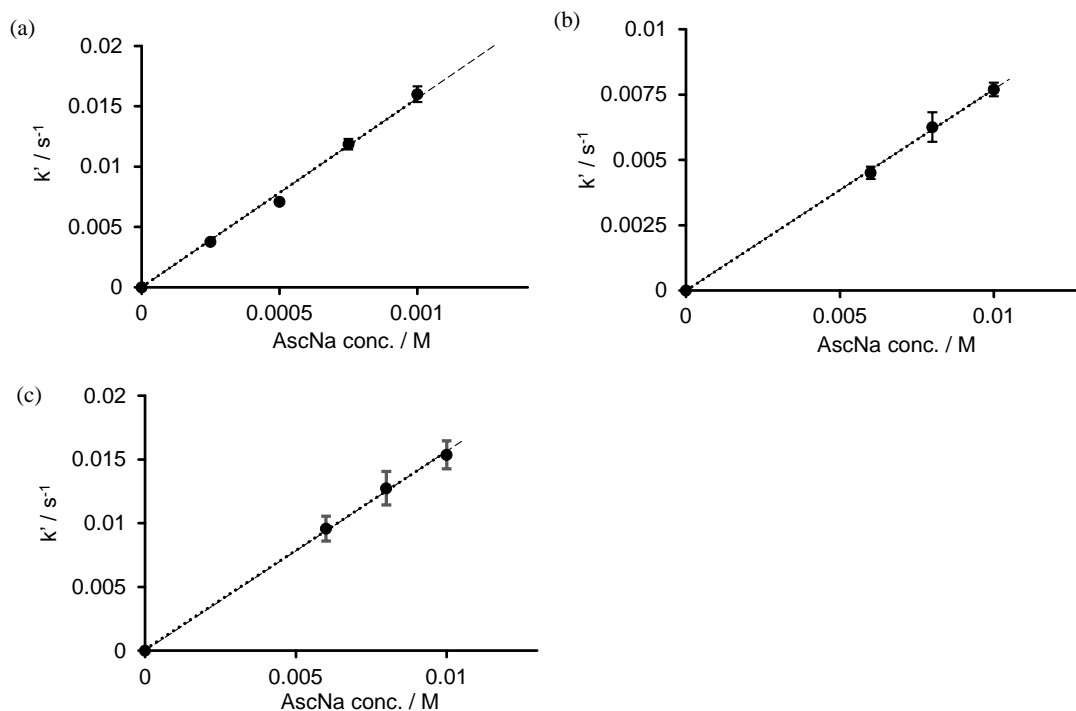
**Fig. 1-5** HPLC chromatograms of nonradioactive **3a** and co-injected [ $^{125}\text{I}$ ]**3a**. (a) UV chromatogram; (b) RI detected chromatogram, [ $^{125}\text{I}$ ]**3a** radiochemical yield: 85%, radiochemical purity : >95%



**Fig. 1-6** HPLC chromatograms of nonradioactive **3b** and co-injected [ $^{125}\text{I}$ ]**3b**. (a) UV chromatogram; (b) RI detected chromatogram, [ $^{125}\text{I}$ ]**3b** radiochemical yield: 84%, radiochemical purity : >95%

### 1-2-3 アスコルビン酸ナトリウムとの反応性評価

ニトロキシド化合物は生体内に投与すると、アスコルビン酸などの還元性物質により還元され、ヒドロキシルアミン体 (N-OH) へと変化することが知られている[36,37]。そこで、本研究で合成した化合物 **1**、**2a**、**2b** とアスコルビン酸との還元反応性を、Ostwald の分離法[42]により速度定数を求めることで評価した。すなわち、化合物 **1**、**2a**、**2b** と過剰量のアスコルビン酸ナトリウムとを反応させ、擬一次反応速度定数を求め、その値をアスコルビン酸ナトリウム濃度に対してプロットして二次反応速度定数を算出した (Fig. 1-7、Table 1-1)。メチル基を有する化合物 **1** と、ペンチル基を導入した化合物 **2a** および **2b** の二次反応速度定数は、**1** では  $15.67 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、**2a** では  $0.77 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、**2b** では  $1.57 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  であることが示された。これらを比較すると、ペンチル基を導入した化合物 **2a** の二次反応速度定数は化合物 **1** の約 1/20、**2b** の二次反応速度定数は化合物 **1** の約 1/10 であることが示された。そのため、ニトロキシド化合物のラジカル近傍に嵩高い置換基を導入することでアスコルビン酸と反応しにくくなることが示された。また、ニトロキシド化合物の基準物質として良く用いられる TEMPOL と比較すると、化合物 **2a** では約 1/10、**2b** では約 1/5 の二次反応速度定数であり、TEMPOL と比較しても還元されにくいことが示された。さらに、化合物 **2a**、**2b** の反応性に差が見られたことから、立体異性体間でアスコルビン酸との還元反応速度定数に差が生じることが示された。



**Fig. 1-7** Plot of pseudo-order reaction rate constants. (AscNa; sodium ascorbate) (a) compound **1**,  $y=15.67x$ ,  $R^2=0.999$ . (b) compound **2a**,  $y=0.7705x$ ,  $R^2=1.000$ . (c) compound **2b**,  $y=1.565x$ ,  $R^2=1.000$ .

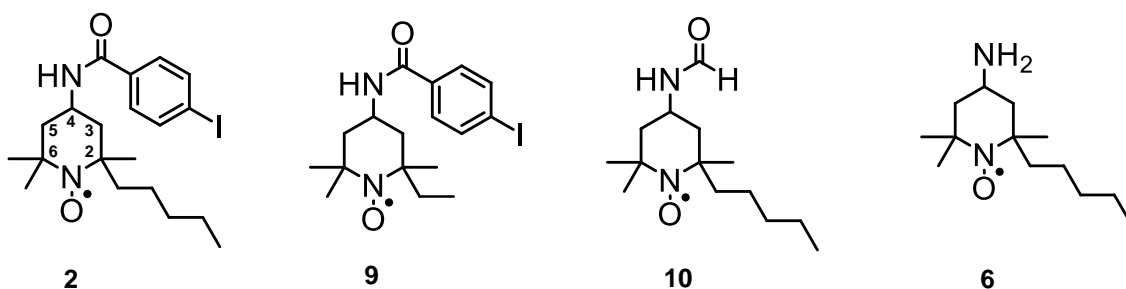
**Table 1-1** Second-order rate constants for the reaction of nitroxide and ascorbate

	$k / M^{-1} s^{-1}$
<b>TEMPOL</b>	7.94
<b>1</b>	15.67
<b>2a</b>	0.77
<b>2b</b>	1.57

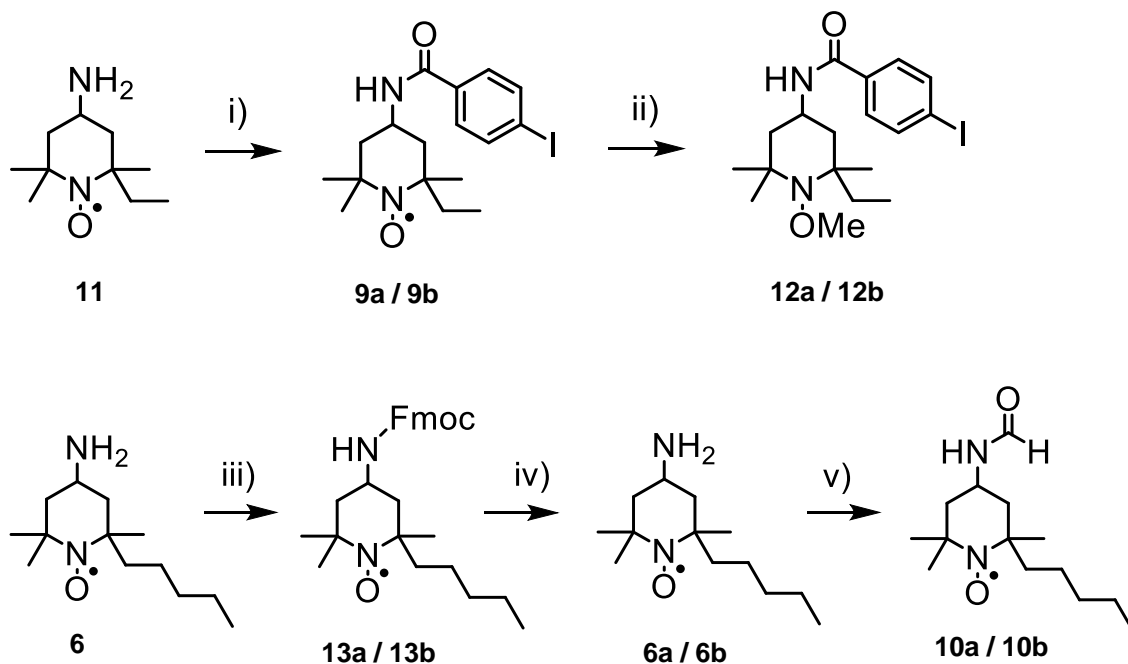
#### 1-2-4 2, 4 位置換基の立体的嵩高さが異なる TEMPO 型ニトロキシド化合物の合成

1-2-3 より、2, 4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体である化合物 **2a**、**2b** において、立体異性の違いによりアスコルビン酸との還元反応性に差が生じることが示された。そこで、立体的な嵩高さが異なる 2, 4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体 (Fig. 1-8) を合成し、立体異性によるアスコルビン酸との反応性の違いを評価した。化合物 **2**

は TEMPO 型ニトロキシドの 2 位にペンチル基、4 位に *p*-ヨードベンズアミドが導入されており、どちらにも嵩高い置換基が結合している。そこで、2 位を立体的な影響の少ないエチル基に置換し、4 位に嵩高い *p*-ヨードベンズアミドを結合した化合物 **9**、及び、2 位に嵩高いペンチル基、4 位を立体的な嵩高さの小さいホルムアミドに置き換えた化合物 **10** を合成した。また、4 位がアミノ基である化合物 **6** および化合物 **11** は既報[17]に従い合成した。化合物 **6a**、**6b**、**9a**、**9b**、**10a**、**10b** の合成経路を Scheme 3 に示す。化合物 **9a**、**9b** は、**1-2-1** で述べた化合物 **2** の合成方法と同様に、化合物 **11** に 4-iodobenzoic acid を縮合して合成した。化合物 **6** は、これまでに行ってきた異性体分離手法である、順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いた方法では分離が困難であった。そこで、4 位のアミノ基を Fmoc 基で保護した化合物 **13** を合成し、順相のシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる分離を行い化合物 **13a**、**13b** を得た。その後、化合物 **13a**、**13b** の Fmoc 基を脱保護し、化合物 **6a**、**6b** を得た後、アミノ基に *N*-formylsaccharin を反応させホルミル化することにより化合物 **10a**、**10b** を得た。



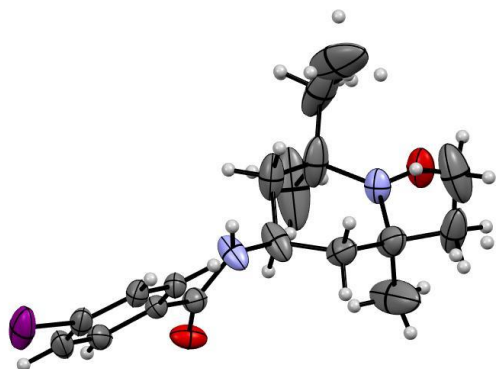
**Fig. 1-8** Chemical structure of 2,4-disubstituted nitroxide derivatives



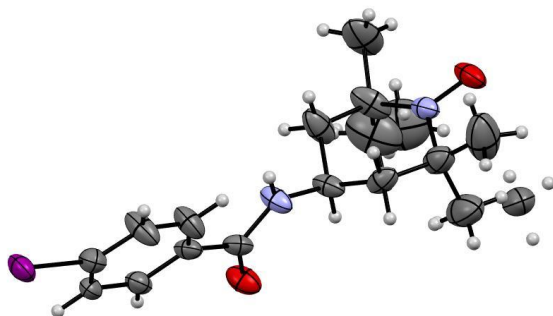
**Scheme 3** Synthetic scheme for nitroxide derivatives **6**, **9** and **10**. i) 4-iodobenzoic acid, DMT-MM, THF; ii)  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 30% $\text{H}_2\text{O}_2$ , DMSO; iii) Fmoc-Cl, dioxane/water; iv) piperidine,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ; v) *N*-formylsaccharin, THF

### 1-2-5 X線結晶構造解析

化合物 **2** は立体異性体を分離して得られたが、ペンチル基を有するため化合物の運動性が高く結晶化が困難であり、立体配置の同定に至らなかった。そこで、側鎖にエチル基を有する化合物 **9a**、**9b** をそれぞれ結晶化し、立体配置を同定することで化合物 **2a**、**2b** の立体配置を推定することを目的とした。ヘキサンと酢酸エチルを溶媒として  $0^\circ\text{C}$  で再結晶を行い、得られた結晶を X 線結晶構造解析により分析した (Fig. 1-9、Fig. 1-10)。結晶構造解析の結果より、化合物 **9a** では R 因子 (reliability factor; R 値、信頼度因子) が 0.0680、重み付き R 因子 (wR2 値) が 0.1552 であり、化合物 **9b** では R 因子が 0.0777、重み付き R 因子が 0.2111 であった。R 因子は観測値と計測値のずれの度合いを表すため、これがどちらの化合物も 10% 以下 (0.1 以下) であり、さらに重み付けした R 因子がどちらの化合物も 20% 程度以下 (0.2 程度以下) であることから、正しい構造が求められたと考える。したがって、**9a** の立体構造は  $2R^*4R^*$  (以下、*RR/SS* と示す) であり、**9b** の立体構造は  $2R^*4S^*$  (以下、*RS/SR* と示す) であることが示された。



**Fig. 1-9** ORTEP diagram (50% probability level) of **9a** (*RR/SS*)



**Fig. 1-10** ORTEP diagram (50% probability level) of **9b** (*RS/SR*)

**Table 1-2** Crystal data for **9a**

Bond precision	C-C = 0.0080 Å	
Wavelength	0.71073	
Cell	a=28.7051(6) alpha=90 b=28.7051(6) beta=90 c=13.2202(5) gamma=120	
Temperature	100 K	
	Calculated	Reported
Volume	9433.8(5)	9433.8(5)
Space group	R -3	R -3
Hall group	-R 3	-R 3
Moiety formula	C17 H24 I N2 O2, 0.333(C6 H12)	C17 H24 I N2 O2, 0.333(C6 H12)
Sum formula	C19 H28 I N2 O2	C19 H28 I N2 O2
Mr	443.33	443.33
Dx,g cm-3	1.405	1.405
Z	18	18
Mu (mm-1)	1.540	1.540
F000	4050.0	4050.0
F000'	4042.80	
h, k, lmax	37,37,17	37,37,17
Nref	5067	5069
Tmin, Tmax	0.946,0.970	0.922,1.000
Tmin'	0.940	
Correction method	# Reported T Limits	
Tmin	0.922	
Tmax	1.000	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
Data completeness	1.000	
Theta(max)	28.000	
R(reflections)	0.0680( 3810)	
wR2(reflections)	0.1552( 5069)	
S	1.061	
Npar	265	

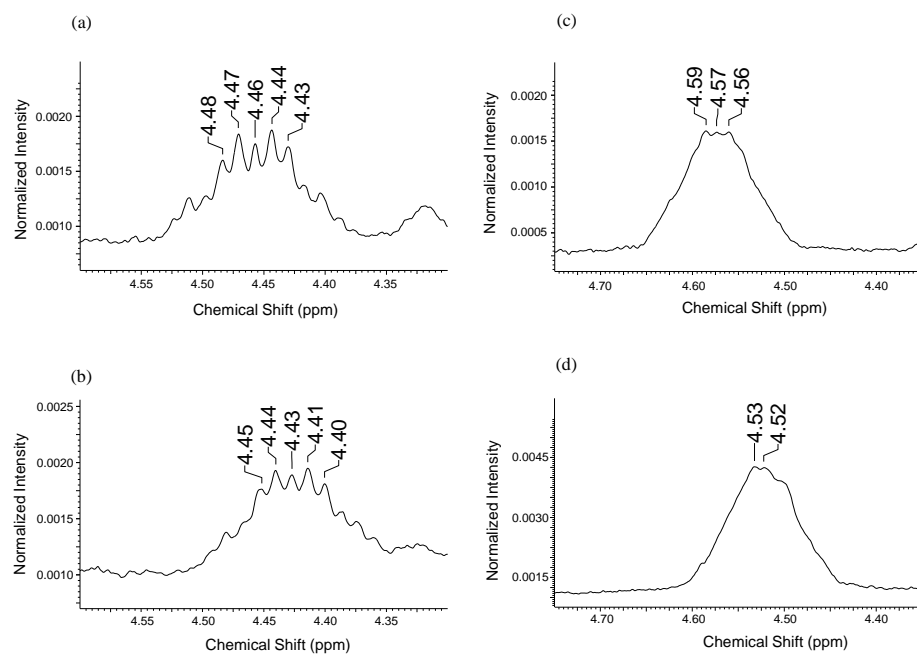


**Table 1-3** Crystal data for **9b**

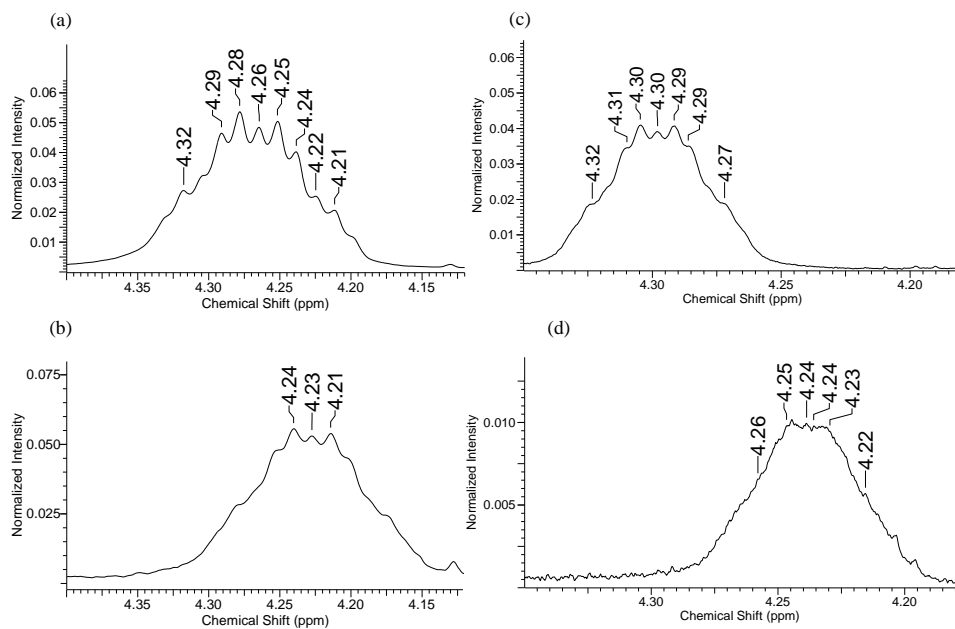
Bond precision	C-C = 0.0115 Å	
Wavelength	0.71073	
Cell	a=10.7468(6)	
	alpha=90	
	b=10.8985(5)	
	beta=100.443(5)	
	c=15.4273(7)	
	gamma=90	
Temperature	293 K	
	Calculated	Reported
Volume	1776.98(15)	1776.98(15)
Space group	P 21/n	P 1 21/n 1
Hall group	-P 2yn	-P 2yn
Moiety formula	C17 H24 I N2 O2	C17 H24 I N2 O2
Sum formula	C17 H24 I N2 O2	C17 H24 I N2 O2
Mr	415.28	415.28
Dx,g cm-3	1.552	1.552
Z	4	4
Mu (mm-1)	1.811	1.811
F000	836.0	836.0
F000'	834.39	
h, k, lmax	13,13,19	13,13,19
Nref	3692	3692
Tmin, Tmax	0.947,0.964	0.040,1.000
Tmin'	0.947	
Correction method	# Reported T Limits	
Tmin	0.040	
Tmax	1.000	
AbsCorr	MULTI-SCAN	
Data completeness	1.000	
Theta(max)	26.500	
R(reflections)	0.0777( 2499)	
wR2(reflections)	0.2111( 3692)	
S	1.064	
Npar	211	

## 1-2-6 立体配置の推定

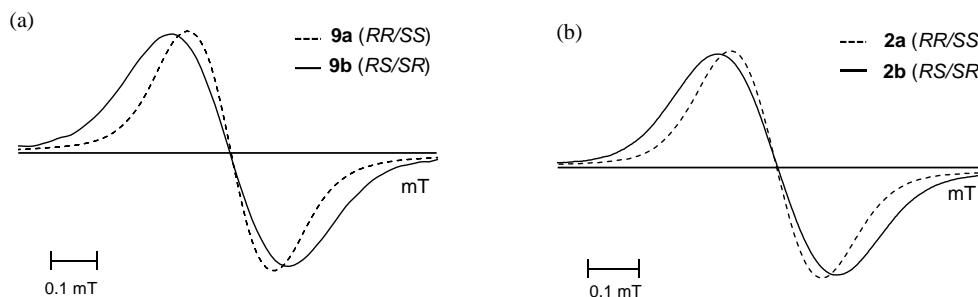
1-2-5 で決定した化合物 **9a**、**9b** の立体配置を基に、化合物 **2a**、**2b** の立体配置の推定を行った。これらの TEMPO 型ニトロキシドの 4 位の炭素は不斉炭素であるため、NMR における化学シフトの差異が生じやすいと考え、まず、化合物 **9a**、**9b** 及び **2a**、**2b** の 4 位のプロトンの NMR スペクトルを比較した (Fig. 1-11)。NMR 測定において、常磁性化合物は不対電子と原子核の間の磁気双極子 - 双極子相互作用により緩和時間を短縮させ、線幅を広げるため測定が困難である。そのため、それぞれの NMR スペクトルは、各化合物の NMR チューブ内にフェニルヒドラジンを加えニトロキシドを還元し、反磁性種を形成した後に測定した。さらに、化合物 **9a**、**9b** 及び **2a**、**2b** のメチル化体である化合物 **12a**、**12b** 及び **3a**、**3b** の 4 位のプロトンの NMR スペクトルも比較した (Fig. 1-12)。これらの NMR 測定は全て  $\text{CDCl}_3$  を溶媒とし、化合物濃度 10 mM で行った。化合物 **9a** の 4 位のプロトンの化学シフト値は、**9b** の値よりも高かった (Fig. 1-11(a)(b))。同様に、化合物 **2a** の 4 位のプロトンの化学シフト値は、**2b** の値よりも高かった (Fig. 1-11(c)(d))。これらと同様の結果が、メチル化体 **12a** と **12b** (Fig. 1-12(a)(b))、**3a** と **3b** (Fig. 1-12(c)(d)) でも得られた。次に、ニトロキシドは不対電子を持つため、電子スピンの状態を測定する ESR を用いて、その線幅 (緩和時間) や超微細結合定数 (電子スピン密度) を比較した。それぞれの ESR スペクトルを測定すると、**9a** の線幅が **9b** の線幅よりも狭いことが示された (Fig. 1-13(a))。また、超微細結合定数 (hfc 値) は **9a** の方が **9b** よりも大きい値を示した (Table 1-4)。一方、化合物 **2a** 及び **2b** の ESR スペクトルは、化合物 **9a** 及び **9b** と同様の傾向を示し、**2a** の線幅は **2b** よりも狭く (Fig. 1-13(b))、**2a** の hfc 値は **2b** よりも大きい値を示した (Table 1-4)。以上より、順相のカラムクロマトグラフィーでの溶出順序や NMR スペクトルの結果、ESR スペクトルの結果に基づいて、化合物 **2a** の立体配置が *RR/SS*、化合物 **2b** の立体配置が *RS/SR* であると推定した。さらに、同様の方法により **6a**、**6b** および **10a**、**10b** の立体配置を求めたところ、**6a** および **10a** が *RR/SS*、**6b** および **10b** が *RS/SR* であると推定した。



**Fig. 1-11** NMR spectra of C4 proton with chemical shift of  $\approx 4.5$  ppm. (a) **9a** (*RR/SS*); (b) **9b** (*RS/SR*); (c) **2a** (*RR/SS*); (d) **2b** (*RS/SR*). The residual solvent signal was used as an internal reference.



**Fig. 1-12** NMR spectra of C4 proton with chemical shift of  $\approx 4.25$  ppm. (a) **12a** (*RR/SS*); (b) **12a** (*RS/SR*); (c) **3a** (*RR/SS*); (d) **3a** (*RS/SR*). The residual solvent signal was used as an internal reference.



**Fig. 1-13** ESR spectra in center peak of triplet. (a) **9a** (*RR/SS*) and **9b** (*RS/SR*); (b) **2a** (*RR/SS*) and **2b** (*RS/SR*)

**Table 1-4** ESR parameters

	Line width ( $\mu\text{T}$ )	g-value	hfc (mT)
<b>2a</b> ( <i>RR/SS</i> )	184	2.0060	1.56
<b>2b</b> ( <i>RS/SR</i> )	238	2.0061	1.52
<b>9a</b> ( <i>RR/SS</i> )	180	2.0061	1.55
<b>9b</b> ( <i>RS/SR</i> )	253	2.0061	1.52
<b>10a</b> ( <i>RR/SS</i> )	177	2.0060	1.56
<b>10b</b> ( <i>RS/SR</i> )	238	2.0060	1.54
<b>6a</b> ( <i>RR/SS</i> )	177	2.0060	1.55
<b>6a</b> ( <i>RS/SR</i> )	224	2.0059	1.54

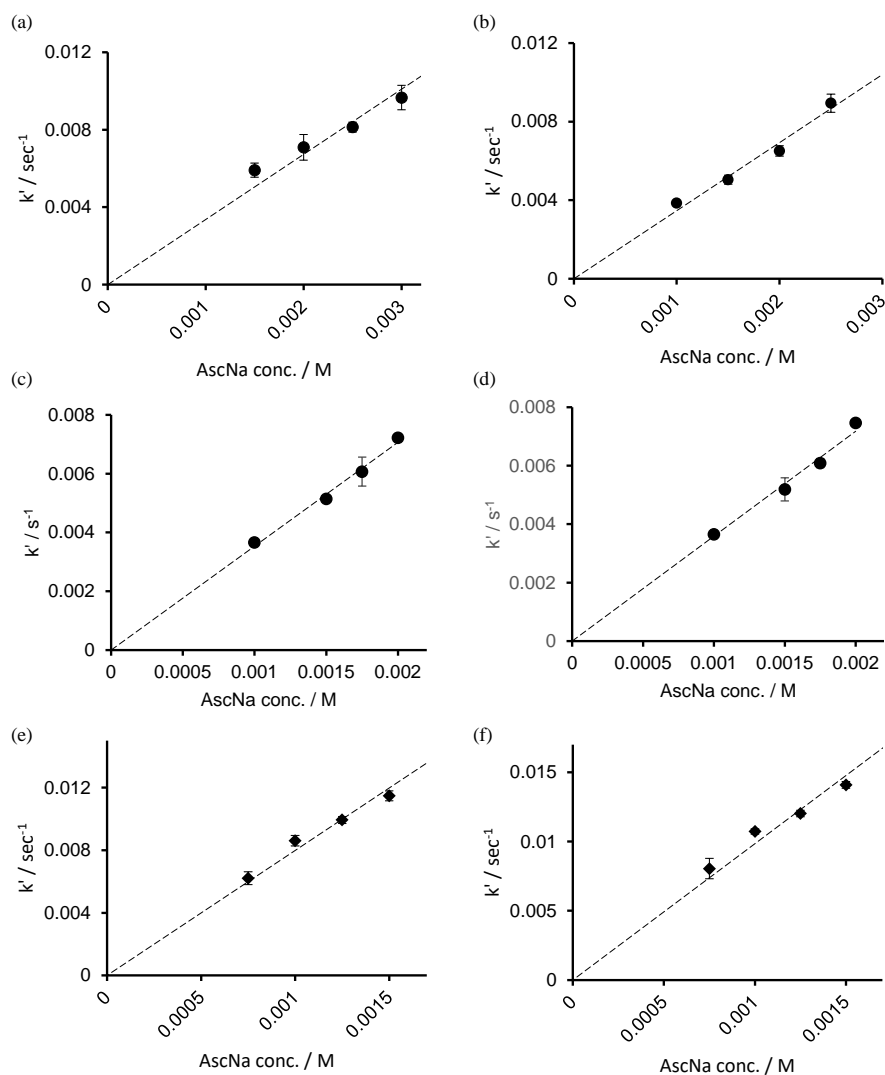
Each compound was dissolved in DMSO

### 1-2-7 2, 4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体における還元反応性評価

ESR を用いて、化合物 **9a**、**9b**、**10a**、**10b**、**6a**、**6b** のアスコルビン酸に対する還元反応性を調べた。**1-2-3** と同様の手法により、各ニトロキシド誘導体を過剰量のアスコルビン酸と反応させ、擬一次反応速度定数を求め、その値をプロットして二次反応速度定数を算出した (Fig. 1-14、Table 1-5)。

**1-2-3** より、ニトロキシドの 2 位及び 4 位のどちらにも嵩高い置換基が結合した化合

物 **2a** と **2b** は、立体異性体間でアスコルビン酸との反応性に差が確認された。一方で、ニトロキシドの 2 位または 4 位のどちらか一方のみに嵩高い置換基が導入された化合物 **9a** と **9b**、および化合物 **10a** と **10b** では立体異性体間の二次反応速度定数に大きな違いが見られなかった。しかしながら、**10** と同じく 2 位のみに嵩高い置換基を有する化合物 **6a** と **6b** では立体異性体間でアスコルビン酸との反応性に差が見られた。



**Fig. 1-14** Plot of pseudo-first order reaction rate constants. (a) compound **9a**,  $y=3.366x$ ,  $R^2=0.995$ . (b) compound **9b**,  $y=3.466x$ ,  $R^2=0.997$ . (c) compound **10a**,  $y=3.532x$ ,  $R^2=0.999$ . (d) compound **10a**,  $y=3.587x$ ,  $R^2=0.999$ . (e) compound **6a**,  $y=7.980x$ ,  $R^2=0.998$ . (f) compound **6a**,  $y=9.848x$ ,  $R^2=0.997$ .

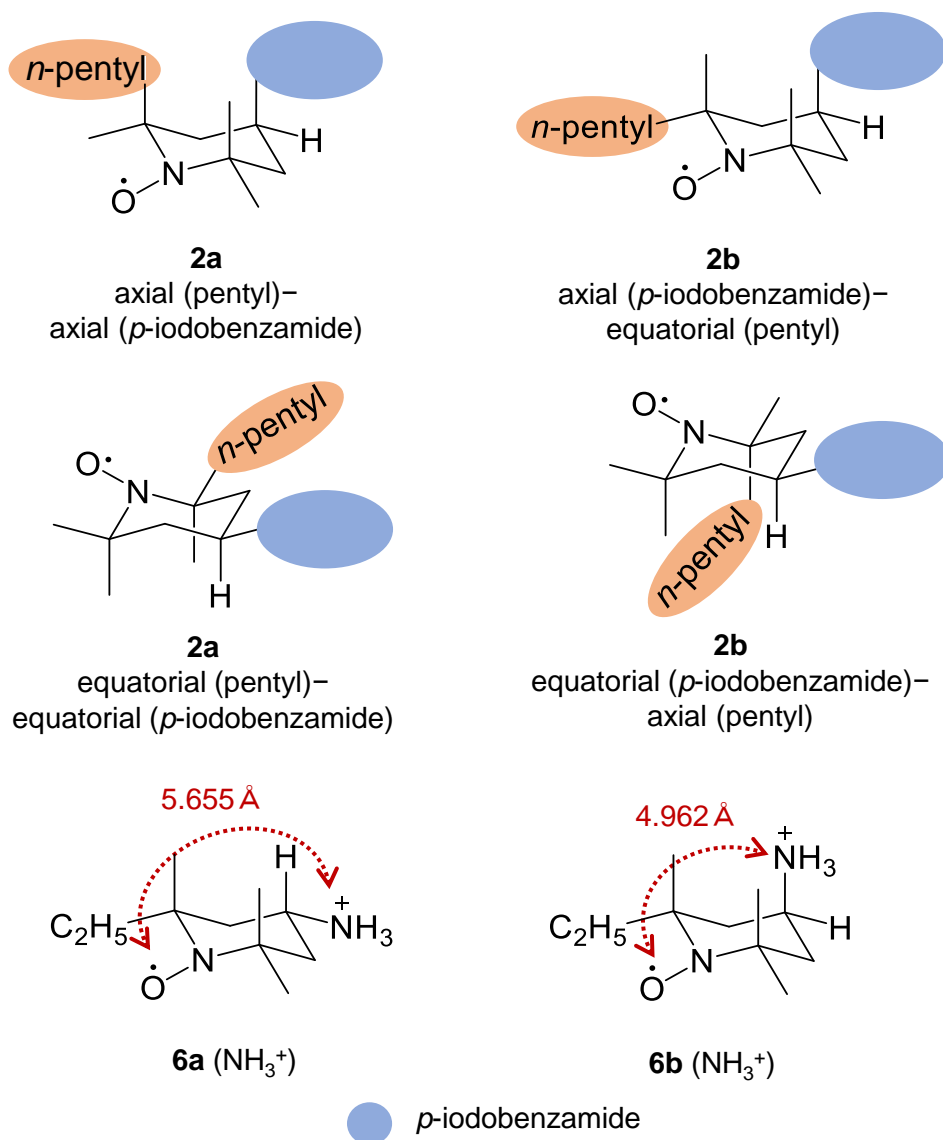
**Table 1-5** Second order rate constants of nitroxide derivatives to sodium ascorbate.

	isomer <b>a</b> ( <i>RR/SS</i> )	isomer <b>b</b> ( <i>RS/SR</i> )
<b>2</b>	0.77	1.57
<b>9</b>	3.37	3.47
<b>10</b>	3.53	3.59
<b>6</b>	7.98	9.85

### 1-2-8 DFT (密度汎関数理論) 計算

Gaussian 16W を用いて、化合物 **2a** と **2b** のいす形配座のギブズエネルギーを計算した (Fig. 1-15、Table 1-6)。その後、平衡定数  $K$  とギブズエネルギーの関係式  $K = \exp(-\Delta G/RT)$  を用いて、25°Cにおける平衡定数を算出した。ここで、 $\Delta G$  はギブズエネルギー変化 ( $\text{J} \cdot \text{mol}^{-1}$ )、 $R$  は気体定数 ( $8.314 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$ )、 $T$  は温度 (298.15 K) である。化合物 **2a** の場合、axial (pentyl)-axial (*p*-iodobenzamide)配座から equatorial (pentyl)-equatorial (*p*-iodobenzamide)配座への環反転の  $\Delta G$  は  $-14.71 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 、平衡定数  $K$  は 377.5 であった。一方、化合物 **2b** では、axial (*p*-iodobenzamide)-equatorial (pentyl)配座から equatorial (*p*-iodobenzamide)-axial (pentyl)配座への環反転に起因する  $\Delta G$  は、 $-17.54 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$  であり、 $K$  値は 1181 であった。

化合物 **6** のアミノ基は、pH 7.4 の条件下ではアンモニウムカチオン ( $\text{NH}_3^+$ ) の形で存在する。そこで、イオン型である化合物 **6** ( $\text{NH}_3^+$ ) の電荷とラジカル部位との距離を決定するために、構造最適化計算を行った (Fig. 1-15、Table 1-6)。化合物 **6** は 2 位に嵩高いペンチル基を有しているため、axial (*p*-iodobenzamide)-equatorial (pentyl)配座として計算した。計算された  $\text{NH}_3^+$ 基の窒素原子とニトロキシドの酸素原子間の距離は、**6a** (*RR/SS*) で  $5.655 \text{ \AA}$ 、**6b** (*RS/SR*) で  $4.962 \text{ \AA}$  であった。すなわち、**6b** (*RS/SR*) 上の  $\text{NH}_3^+$  基の方が、**6a** (*RR/SS*) よりもラジカル部位に近いことが示された。



**Fig. 1-15** Schematic representation of compounds **2a** (axial (pentyl)–axial (*p*-iodobenzamide)), **2a** (equatorial (pentyl)–equatorial (*p*-iodobenzamide)), **2b** (axial (*p*-iodobenzamide)–equatorial (pentyl)), **2b** (equatorial (*p*-iodobenzamide)–axial (pentyl)), **6a** ( $\text{NH}_3^+$ ) and **6b** ( $\text{NH}_3^+$ ).

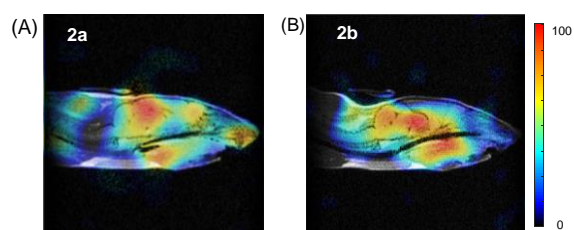
**Table 1-6** Calculated free energy of nitroxides **2** and **6**

	Free Energy (Hartree)
<b>2a</b> axial (pentyl)- axial ( <i>p</i> -iodobenzamide)	-1050.924051
<b>2a</b> equatorial (pentyl)- equatorial ( <i>p</i> -iodobenzamide)	-1050.929653
<b>2b</b> axial ( <i>p</i> -iodobenzamide)- equatorial (pentyl)	-1050.924789
<b>2b</b> equatorial ( <i>p</i> -iodobenzamide)- axial (pentyl)	-1050.931459
<b>6a</b> (NH <sub>2</sub> )	-695.868783
<b>6b</b> (NH <sub>2</sub> )	-695.864316
<b>6a</b> (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	-696.324577
<b>6b</b> (NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> )	-696.315488

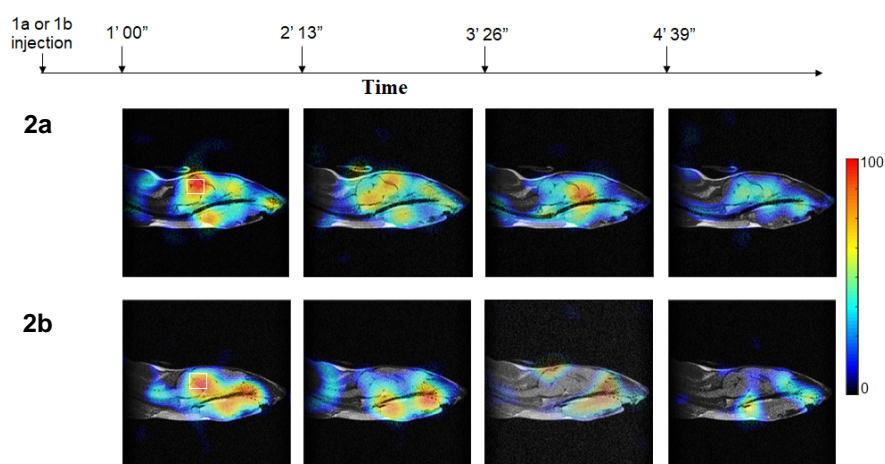
### 1-2-9 *in vivo* ESR

これまでの検討により明らかとなった **2a** と **2b** の還元反応性の差が、生体においても同様に観測されるかを評価するため ESR イメージングによりラジカルの減衰を測定した。化合物 **2a** および **2b** をマウスへ静脈内注射し、マウス頭部の ESR イメージングを行った。Fig. 1-15、Fig. 1-16 に示す ESR 画像（カラーマッピング）は、同じマウスの頭部の MRI 画像と重ね合わせた図（矢状面）である。化合物 **2a** および **2b** をマウスに投与して1分後のマウスの頭部の ESR 画像（Fig. 1-16）から、これらの化合物が脳組織に分布することが示された。また、マウスの頭部の3次元 ESR 画像（Fig. 1-17）を用いて、脳内に関心領域を設定した後、関心領域内の平均画像強度を計算し、**2a** および **2b** 投与後の時間経過に対してプロットした。それにより還元反応速度定数を計算すると、**2a** の還元速度定数は  $0.15 \pm 0.02$ 、**2b** は  $0.22 \pm 0.03$  であり、*in vitro* での実験と同様に **2a** の還元速度定数が **2b** よりも有意に低いことが示された。





**Fig. 1-16** Distribution of compound **2a** (A) and **2b** (B) in mouse heads 1 min after their administration. Sagittal 2D ESR images were co-registered to the anatomical MRI of the same mouse.



**Fig. 1-17** Temporal ESR/MRI co-registered images of mouse heads after administration of **2a** and **2b**. The sagittal 2D ESR images from the 3D image data were co-registered to the MRIs of the examined mice. The ROI ( $10 \times 10$  pixels) within the examined mouse brain is indicated by a white rectangle in the co-registered image.

### 1-3 考察

本章では、新規脂質ラジカル検出核医学イメージングプローブの開発を目的として、誘導体化の容易な TEMPO 型ニトロキシドを母体化合物として用い、その放射性ヨウ素標識体を設計・合成し、物性評価を行った。ニトロキシド化合物 ( $>N-O\cdot$ ) は、生体内に投与するとアスコルビン酸などの還元性物質により還元されることが知られており、ニトロキシド化合物を脂質ラジカル検出プローブとして応用するためには、脂質ラジカル捕捉能を有するラジカル体としての生体内寿命を延長することが必要であると考えられる。これまでに、TEMPO 型ニトロキシドの 2 位に立体的な嵩高さの大きい置換基を結合することでアスコルビン酸に対する還元反応性が低下するという報告がされており[41]、今回の化合物 **1**、**2a**、**2b** においてもペンチル基を導入した化合物 **2** ではテトラメチル体である化合物 **1** と比較して還元抵抗性の向上が確認された (Table 1-1)。

ニトロキシド化合物における還元反応性は、ラジカルとしての寿命や反応選択性に影響することから、生体応用を考えるにあたり重要な因子となる。しかしながら、これまでに 2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体の立体異性が反応性に及ぼす影響について言及した報告は存在しない。そこで、化合物 **2** の立体異性によるアスコルビン酸との反応性の違いが立体構造に起因すると考え、2,4 位の置換基の異なるジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体を合成した (Fig. 1-8)。その結果、2 位または 4 位のどちらか一方のみに嵩高い置換基が導入された化合物 **9a** と **9b**、および化合物 **10a** と **10b** では立体異性体間の二次反応速度定数に大きな違いが見られなかったことから (Table 1-5)、**2a** と **2b** の二次反応速度定数に大きな差が生じたのは、2 位及び 4 位の両方に嵩高い置換基が存在するためであると考えられた。さらに、**2a** と **2b** の立体異性による反応性の違いを考察するために、ESR スペクトルに着目した。化合物 **2** の ESR スペクトルの結果から、**2a** (*RR/SS* 体) の線幅が **2b** (*RS/SR* 体) の線幅よりも狭いことが示された (Table 1-4)。これは、化合物 **9** 及び **10** でも同様の結果が得られ、**9a** または **10a** (*RR/SS* 体) の線幅が **9b** または **10b** (*RS/SR* 体) の線幅よりも狭かった (Table 1-4)。ESR スペクトルの線幅を狭くする要因としては、各構造における分子運動の動的平均化が考えられる[43]。つまり、*RR/SS* 体は *RS/SR* 体よりも分子が環反転しやすいためスペクトルが平均化され、鋭いピークとして現れたのではないかと考えた。以上より、2 位及び 4 位の両方に嵩高い置換基が存在する化合物 **2a** と **2b** では、分子運動の速さに置換基の大きさが影響してアスコルビン酸との反応性に差が生じたと考察した。

この考察を検証する為に、DFT（密度汎関数理論）計算によりギブズエネルギーを計算し（Table 1-6）、環反転の平衡定数を算出した。化合物 **2a**、**2b** の環反転の  $\Delta G$  および平衡定数  $K$  から、化合物 **2a** における axial (pentyl)-axial (*p*-iodobenzamide)配座と equatorial (pentyl)-equatorial (*p*-iodobenzamide)配座の比は 0.26: 99.74 であり、化合物 **2b** における axial (*p*-iodobenzamide)-equatorial (pentyl)配座と equatorial (*p*-iodobenzamide)-axial (pentyl)配座の比は 0.08: 99.92 であることが示された。これらの結果は、**2a** よりも **2b** の方が平衡状態に偏りがあり、それにより **2a** の方が環の反転頻度が高いことを示した。これらの結果に基づいて、2,4位ジ置換 TEMPO 型ニトロキッド誘導体の立体異性によるアスコルビン酸との反応性の違いについて以下のように考察した。化合物 **2a** 及び **2b** は4位の炭素上に *p*-ヨードベンズアミドという嵩高い置換基を持つため、2位の炭素上のペンチル基との相互作用によりペンチル基の自由度が制限され、その結果、ペンチル基はニトロキッド部位により近い位置に存在する。化合物 **2a** は **2b** と比べて環の反転頻度が高いため、ニトロキッド周辺の分子運動が大きくなり、アスコルビン酸がニトロキッドのラジカル部位に近づきにくくなるため反応が制限されたと考えられる。化合物 **9** では、2位の炭素上のエチル基が4位の置換基と相互作用するほど嵩高くなかったため、立体異性体間で反応速度定数に大きな差が見られなかったと考えられた。同様に、化合物 **10** は立体的な嵩高さの小さいホルミル基が4位に導入されているため、2位の炭素上のペンチル基はニトロキッド部分から空間的に離れた位置に存在すると考えられる。そのため、環反転の影響は小さく、立体異性体間でアスコルビン酸との反応性に違いは見られなかったと考えられる。これらの結果から、2位および4位の両方に嵩高い置換基を導入することで、アスコルビン酸との反応性に影響を生じたものと考えられる。

一方、上記の考察からすると、嵩高い置換基が2位のみを導入された化合物 **6** においても還元反応性の差異はないと考えられるが、実際には立体異性体間で反応性に違いが見られた（Table 1-5）。反応液には PBS（pH 7.4）を用いており、化合物 **6a** 及び **6b** のアミノ基は、反応液中ではアンモニウムカチオン（ $\text{NH}_3^+$ ）型として存在すると考えられる。つまり、反応液中の化合物 **6a** 及び **6b** は、ラジカルと電荷が離れた原子上に存在するジストニックラジカルイオンである。ニトロキッドのジストニックラジカルイオンにおいて、その電荷がニトロキッドの安定性に影響することが知られている[44-46]。ニトロキッドは2つの共鳴構造（Fig. 1-18）をとるため[47]、化合物 **6** のアミノ基がプロトン化されアンモニウムカチオン（ $\text{NH}_3^+$ ）になると、電子求引性効果により共鳴構造の

(ii) を不安定化する[45,48]。この不安定化により、共鳴構造が取れず電子が局在化してしまうことでニトロキシドのラジカルとしての安定性が低下し、安定なヒドロキシルアミン体へと変化する。つまり、この共鳴構造への不安定化の影響が大きいほど、ヒドロキシルアミン体への反応が進行しやすくなると考えられる。ジストニックラジカルイオンでは、電荷とラジカル部分の空間的な距離が近くなると不安定化への影響が増大することが報告されていることから[45]、化合物 **6** の立体異性体間での反応性の違いはラジカルと電荷の位置が関係していると考え、構造最適化計算を行った (Table 1-6)。その結果、**6b** 上のアンモニウムカチオン (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) の方が、**6a** よりもラジカル部位に近いことが示された。実際に、アスコルビン酸との反応性評価において、**6a** と比べ **6b** の方がアスコルビン酸により還元されやすいことが示された。一方で、電荷を持たない化合物 **10** では、アスコルビン酸との反応性に大きな差は見られなかったことから、立体異性に起因する電荷とラジカルの位置がアスコルビン酸との反応性の差を引き起こす要因の一つであると推測した。

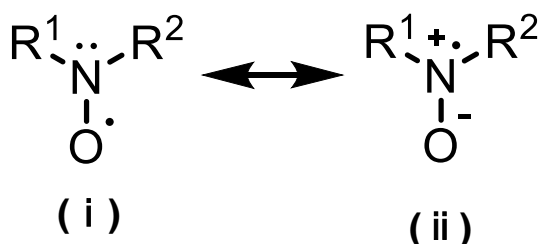


Fig. 1-18 Two resonance forms of a nitroxide radical.

以上の *in vitro* における評価結果から、ペンチル基を導入した化合物 **2a** が最もアスコルビン酸に対する二次反応速度定数が小さく、生体内でのラジカルの寿命を延長できる可能性が示された。そこで、これまで *in vitro* で行ってきた還元反応性評価の結果と同様の結果を *in vivo* でも得られるか検証するため、マウス脳における還元速度を *in vivo* ESR により評価した。その結果、**2a** の還元速度定数は **2b** よりも有意に低く、*in vitro* での評価結果が生体内での還元反応性の結果を反映したことが示された。

## 第2章 放射性ヨウ素標識ニトロキンド化合物の生体内

### 脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価

#### 2-1 緒言

これまでに報告されている蛍光ニトロキンド化合物 NBD-pen[17]は、不対電子をもつニトロキンドの状態では消光状態にあり、脂質ラジカルと反応し常磁性が消失すると蛍光を発するという特徴がある。つまり、ON/OFF 蛍光スイッチング機構を原理としているため、高い標的／非標的シグナル比を得ることが可能である。一方、放射線は常に信号を発しているため、そのままでは反応の有無を区別することが困難である。生体膜内で発生した脂質ラジカル ( $L\cdot$ ) とニトロキンド化合物 ( $>N-O\cdot$ ) は化学反応により共有結合を形成し、アルコキシアミン体 ( $>N-OL$ ) となる。このアルコキシアミン体は安定であるため、脂質ラジカルと反応したその場所、つまり生体膜内に捕捉・蓄積されることで、ニトロキンド化合物がその場に滞留できると想定した。それにより、放射性ニトロキンド化合物が高い標的／非標的シグナル比で脂質ラジカルを捕捉できると考えた。

第1章では、放射性ヨウ素標識ニトロキンド化合物の合成及び構造評価を行ってきた。本章では、放射性ニトロキンド化合物の生体への適用および生体内での有用性評価を目的として、放射性化合物の安定性評価や培養細胞を用いた評価、生体内放射能分布評価を行った。つまり、開発した放射性ニトロキンド化合物が実際に生体内の脂質ラジカルを捉え、体外から放射線で追跡可能か評価することを目的とした。

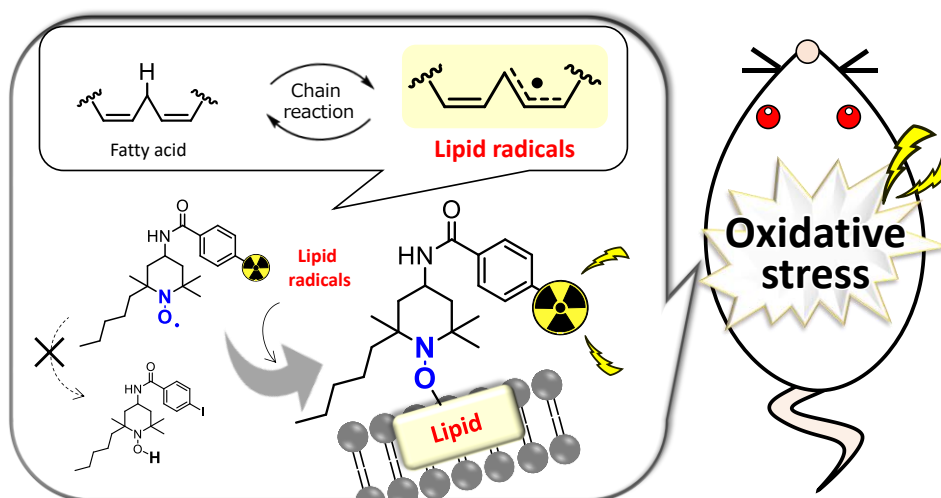


Fig. 2-1 A strategy for the trapping and retention of lipid radicals *in vivo* using compound [ $^{125}\text{I}$ ]2a.

## 2-2 結果

### 2-2-1 脂溶性評価

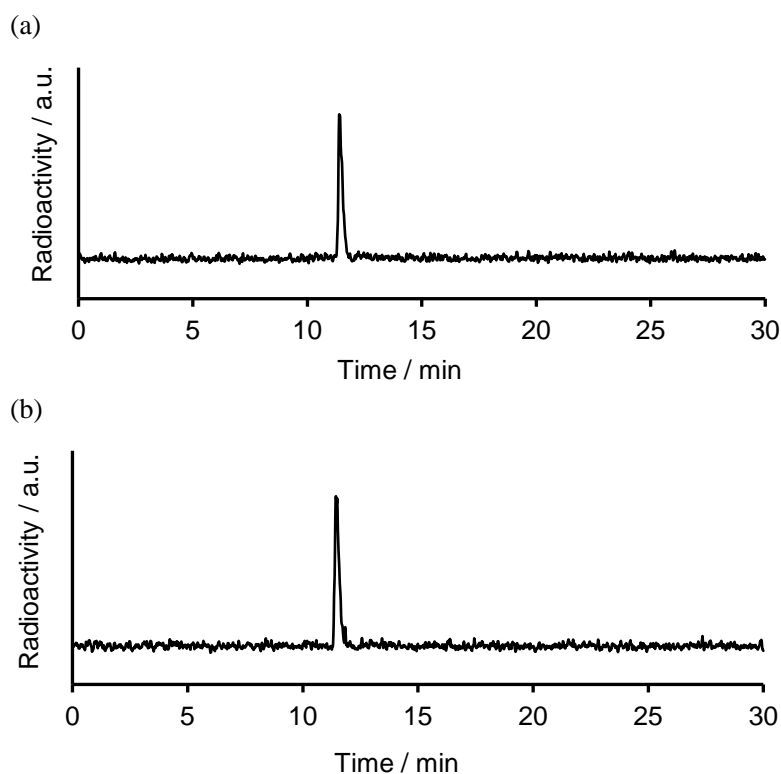
放射性ヨウ素標識ニトロキシド誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3b}$ において、 $\log P$  値を測定し脂溶性評価を行った (Table 2-1)。TEMPO 型ニトロキシドの側鎖にペンチル基を導入した化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  では、側鎖がテトラメチル基である $[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$  と比べて  $\log P$  値が高く、ペンチル基の導入により脂溶性が増大したことが確認された。一方で、立体異性体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$ の間には大きな  $\log P$  値の差は見られなかった。加えて、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  のニトロキシド部位をメチル化した化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3b}$ においても $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$ と同程度の  $\log P$  値を示した。

Table 2-1 LogP values

	LogP
$[^{125}\text{I}]\mathbf{1}$	2.32±0.01
$[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$	2.91±0.01
$[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$	2.95±0.02
$[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$	2.85±0.02
$[^{125}\text{I}]\mathbf{3b}$	2.97±0.00

### 2-2-2 安定性評価

動物実験を想定した投与液 (1% EtOH および 0.1% Tween80 含有 PBS) における $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ の安定性を逆相 HPLC で評価した。投与液を調製直後 (0 day) には、11.4 分に RI ピークが確認され、95%以上の放射化学的純度で投与液が調製できていることが示された (Fig. 2-2(a))。その後 5 日間 4°C で保存し同様に逆相 HPLC を用いて分析したところ、11.4 分に RI ピークが確認され、95%以上の放射化学的純度で $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ が存在していることが示された (Fig. 2-2(b))。そのため、投与液中で数日間安定であることが示された。

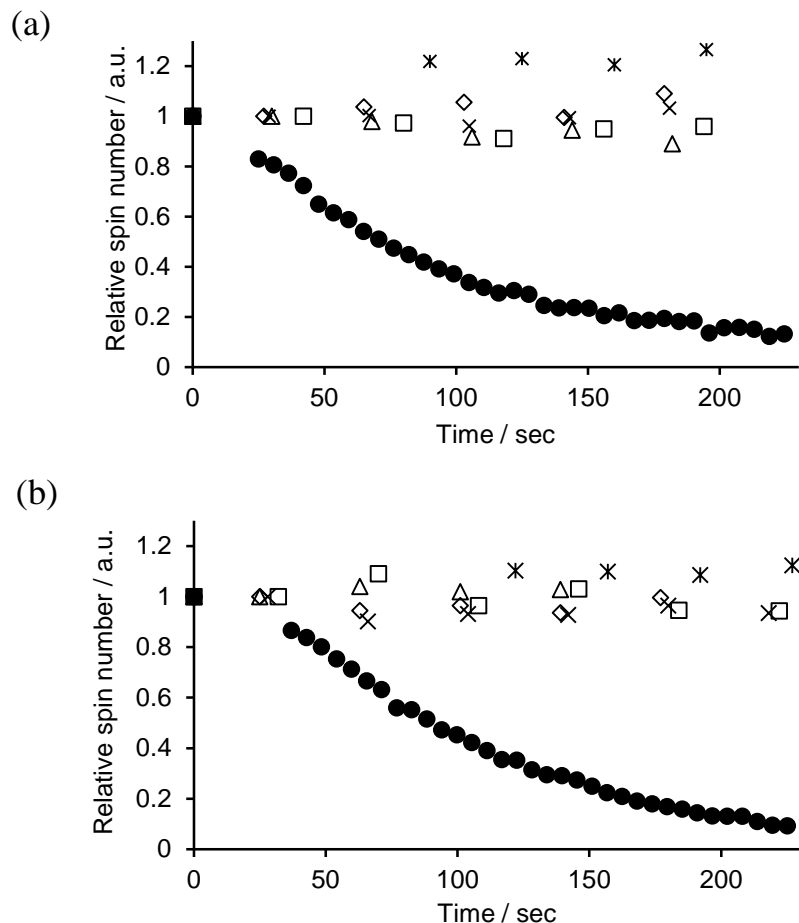


**Fig. 2-2** HPLC chromatogram of [ $^{125}\text{I}$ ]**2a** (1% EtOH and 0.1% Tween 80 in PBS) with radiation detector for (a) 0 day and (b) 5 days.

### 2-2-3 脂質ラジカルや活性酸素種、グルタチオンとの反応性評価

合成したニトロキシド誘導体 **2a**、**2b** の脂質ラジカルとの反応性および反応選択性を評価するため、脂質ラジカルや活性酸素種、グルタチオンと化合物 **2a**、**2b** を反応させ ESR を測定し、ESR シグナルの変化を観測した (Fig. 2-3)。化合物 **2a**、**2b** のどちらの場合においても、脂質ラジカルと反応させると経時的に ESR シグナルが減衰した。一方で、ヒドロキシルラジカルや過酸化水素、スーパーオキシド、次亜塩素酸イオンなどの活性酸素種やグルタチオンと反応させても ESR シグナルの減衰は見られなかった。ニトロキシド化合物は脂質ラジカルへの高い選択性を示し、活性酸素種などの他のラジカル種との反応性は低いことが知られている[49]。化合物 **2a**、**2b** においても、これまでの報告と同様に活性酸素種とは反応せず、脂質ラジカルと選択的に反応することが示された。また、脂質ラジカルと化合物 **2a**、**2b** の反応により ESR シグナルが減衰したことから、ニトロキシドのラジカル部分が脂質ラジカルと反応し、常磁性が消失したことが示された。また、脂質ラジカルとの反応におけるラジカルの減衰速度は、化合物 **2a**

と **2b** の間で大きな違いは見られなかったことから、同程度の脂質ラジカルとの反応性を有することが示された。



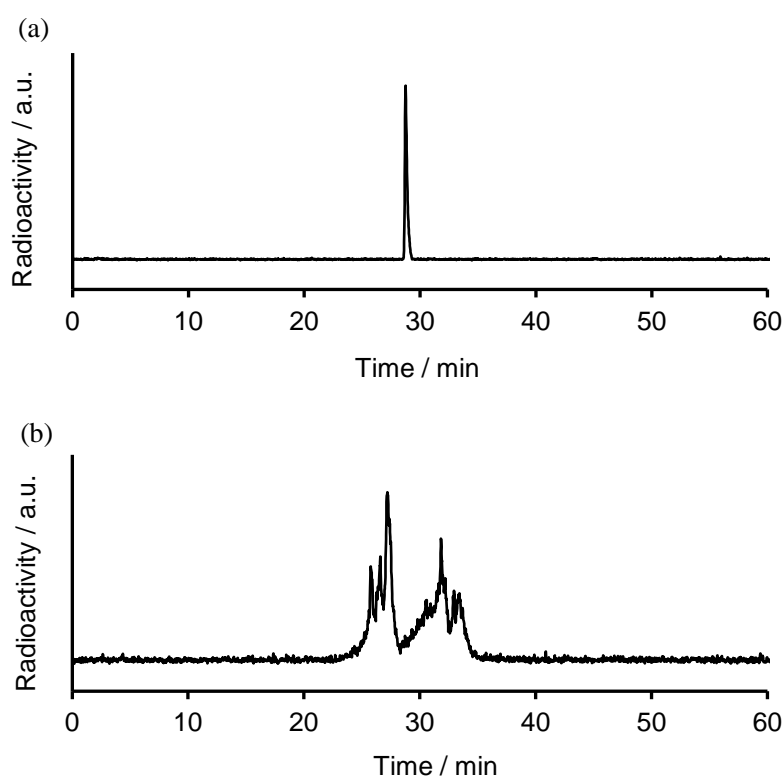
**Fig. 2-3** Reactivity with lipid radicals, reactive oxygen species and reduced glutathione. (a) **2a**, (b) **2b**. ●: lipid alkyl radical generated from 0.8 mM arachidonic acid + 0.05 mg/mL lipoxygenase; ×: hydroxyl radical generated from 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0.2 mM FeSO<sub>4</sub>; ◇: superoxide generated from 1.25 mM hypoxanthine + 78 mU/mL xanthine oxidase; △: 0.1% NaClO; □: 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; \*: 2 mM reduced glutathione.

#### 2-2-4 HPLC を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

脂質ラジカルとニトロキシド誘導体<sup>[125I]</sup>**2a** との反応により、脂質ラジカル付加体が生成することを確認するため、アラキドン酸と lipoxygenase (LOX) により発生させた脂質ラジカルと<sup>[125I]</sup>**2a** を反応させ、逆相 HPLC により分析した (Fig. 2-4)。ニトロキシドのラジカル部位をメチル化したメトキシアミン誘導体<sup>[125I]</sup>**3a** では、アラキドン酸由来の脂質ラジカルと反応させた場合でも化合物<sup>[125I]</sup>**3a** の保持時間の RI ピークのみが



観測された。一方で、ニトロキシド誘導体である化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  とアラキドン酸由来の脂質ラジカルとを反応させると、複数の RI ピークが見られた。ニトロキシドのラジカル部分以外の構造は $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  と $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  で同じであるため、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  で得られた複数のピークはニトロキシドと脂質ラジカルとの反応物であること、および、ベンゼン環部位などのほかの部位とは脂質ラジカルは反応せずニトロキシドのラジカル部分とのみ反応したことが示された。また、ここで得られた脂質ラジカル付加体のピークは、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  よりも保持時間が長いものも多く、脂溶性の向上した付加体が多いことが確認された。以上より、ニトロキシドと脂質ラジカルを反応させることで、種々の脂質ラジカル付加体を得られることが示された。



**Fig. 2-4** HPLC chromatogram of  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  or  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  when reacted with lipid radicals from arachidonic acid.

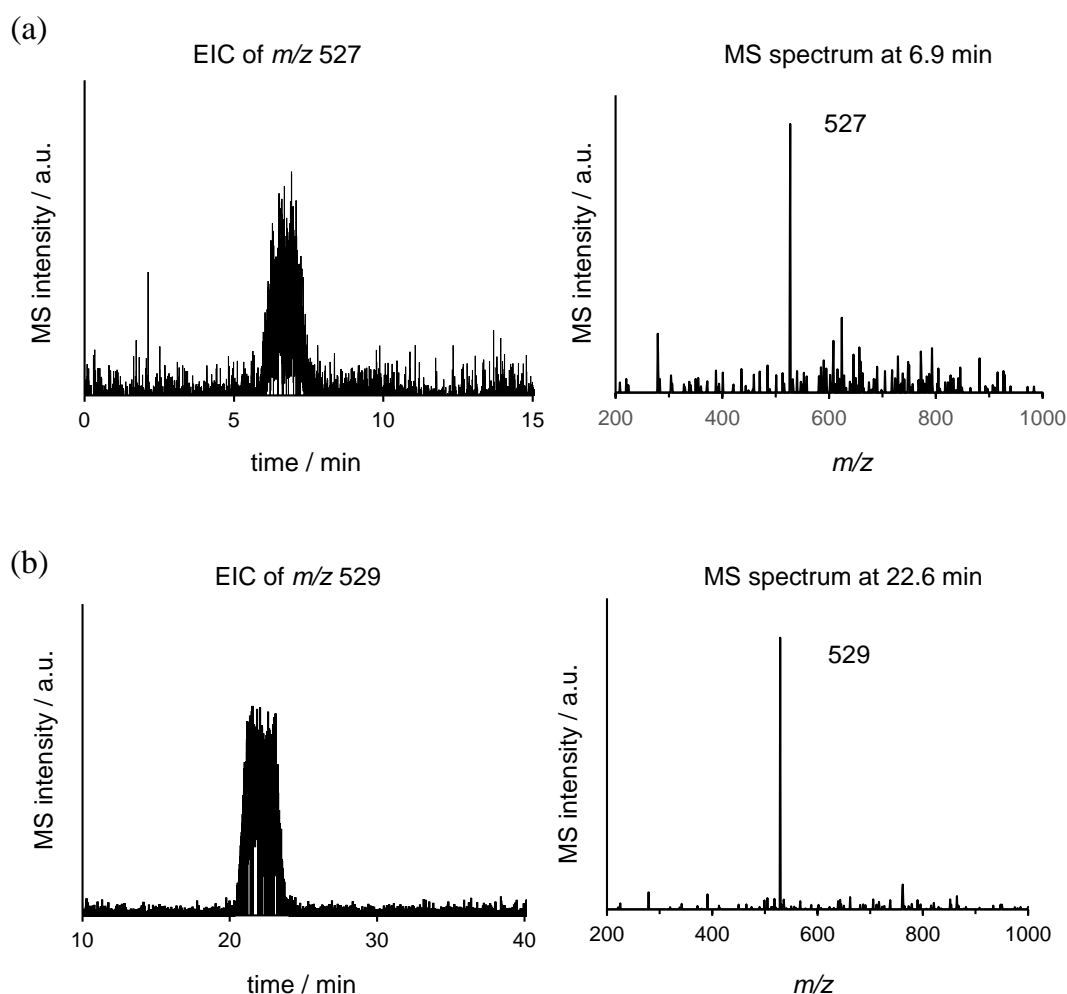
(a)  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ ; (b)  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ .

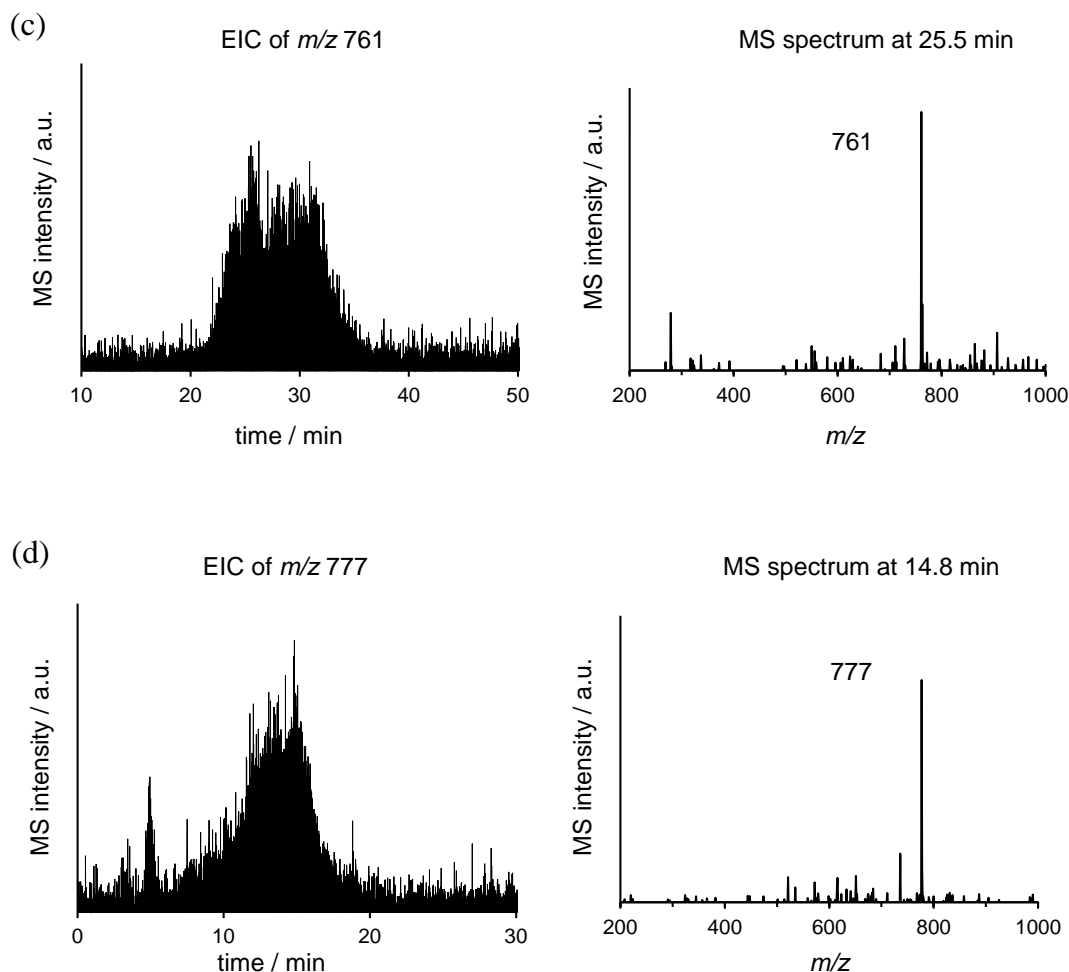
### 2-2-5 LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

**2-2-4** でアラキドン酸由来脂質ラジカルとニトロキシド誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  が反応することを示した。そこで、実際にどの脂質ラジカルと反応しどのような脂質ラジカル付加体

が生成しているかを定性的に分析するため、**2a** とアラキドン酸由来脂質ラジカルとを反応させ、LC/MS 分析を行った (Fig. 2-5)。イオン化法は ESI 法を用い、ポジティブモードで測定した。LC/MS の結果から、保持時間が 6.9 分 ( $C_5H_9$  ラジカル付加体)、22.6 分 ( $C_5H_{11}$  ラジカル付加体)、25.5 分 ( $C_{20}H_{31}O_2$  ラジカル付加体)、14.8 分 ( $C_{20}H_{31}O_3$  ラジカル付加体) などの様々な時間で、**2a** と脂質ラジカルが反応したと考えられる分子イオンピークが検出された。

アラキドン酸は LOX との反応により脂質ラジカルを生成した後、 $\beta$  開裂[15,16]やジオキセタン開裂[50]、ホック開裂[51]などの開裂反応を起こし、多様な脂質ラジカルを生成することが知られている。そのため、LC/MS 分析により得られた、527 ( $C_5H_9$  ラジカル付加体) や 529 ( $C_5H_{11}$  ラジカル付加体) の分子イオンピークは開裂した脂質ラジカルと反応した付加体であることが推定された。



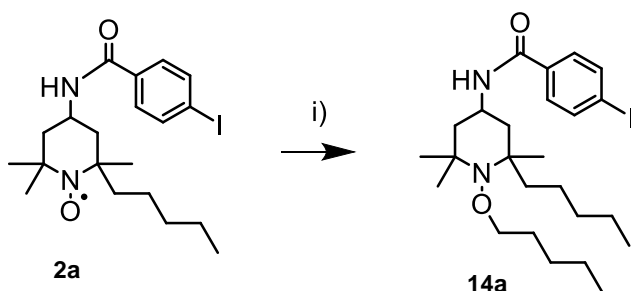


**Fig. 2-5** Extracted ion chromatograms and MS spectra. MS spectra were recorded using ACQUITY QDa.  
 (a)  $\text{C}_5\text{H}_9$ , (a)  $\text{C}_5\text{H}_{11}$ , (b)  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_2$ , (c)  $\text{C}_{20}\text{H}_{31}\text{O}_3$ .

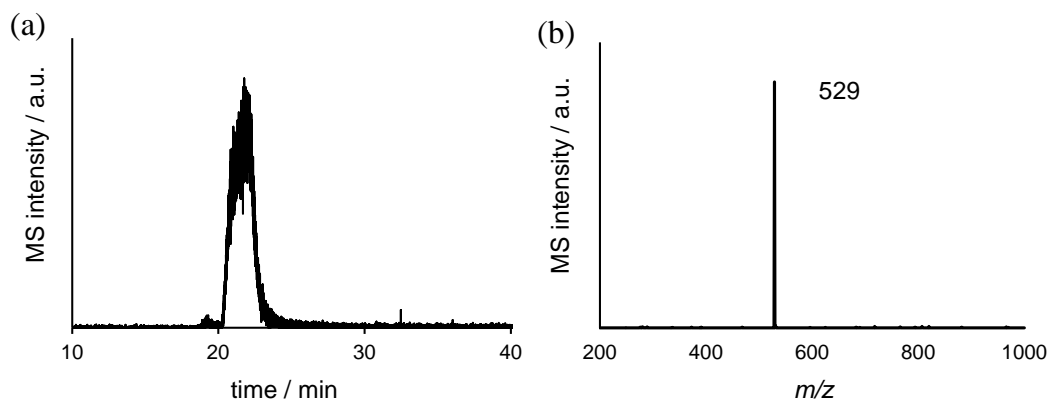
### 2-2-6 脂質ラジカル付加体の合成と LC/MS 解析

2-2-5 で、アラキドン酸由来脂質ラジカルと化合物 **2a** とが反応し複数の脂質ラジカル付加体を生成した可能性が示されたが、分子量が同一である別の構造の分子イオンピークを検出している可能性も否定できない。そこで、脂質ラジカルと化合物 **2a** が反応したという事実を明らかにするため、脂質ラジカル付加体の標品を合成し、LC/MS による保持時間の比較を行った。2-2-5 の結果をもとに、合成の容易さを考慮しながら、標品として  $\text{C}_5\text{H}_{11}$  付加体 (分子量 528.2 ( $m/z$ : 529.2 ( $[\text{M}+\text{H}]^+ \text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{N}_2\text{O}_2\text{I}^+$ ), 化合物 **14a**) を合成することとした (Scheme 4)。ヘキサナールと化合物 **2a** を反応させ、収率 41%

で化合物 **14a** を合成し、**2-2-5** と同じ条件で LC/MS 分析を行った (Fig. 2-6)。化合物 **14a** は約 22 分の保持時間で 529 の分子イオンピークが出現しており、これは Fig. 2-5 (b)で示された 529 の分子イオンピークの保持時間 (22.6 分) と一致していた。標品である化合物 **14a** と保持時間および分子イオンピークが一致していたことから、アラキドン酸由来脂質ラジカルと化合物 **2a** との反応により、化合物 **14a** の構造の脂質ラジカル付加体が生成したことが示された。



**Scheme 4** Synthetic scheme for compound **2a** binding to  $C_5H_{11}$  radical. i) CuCl, Hexanal.

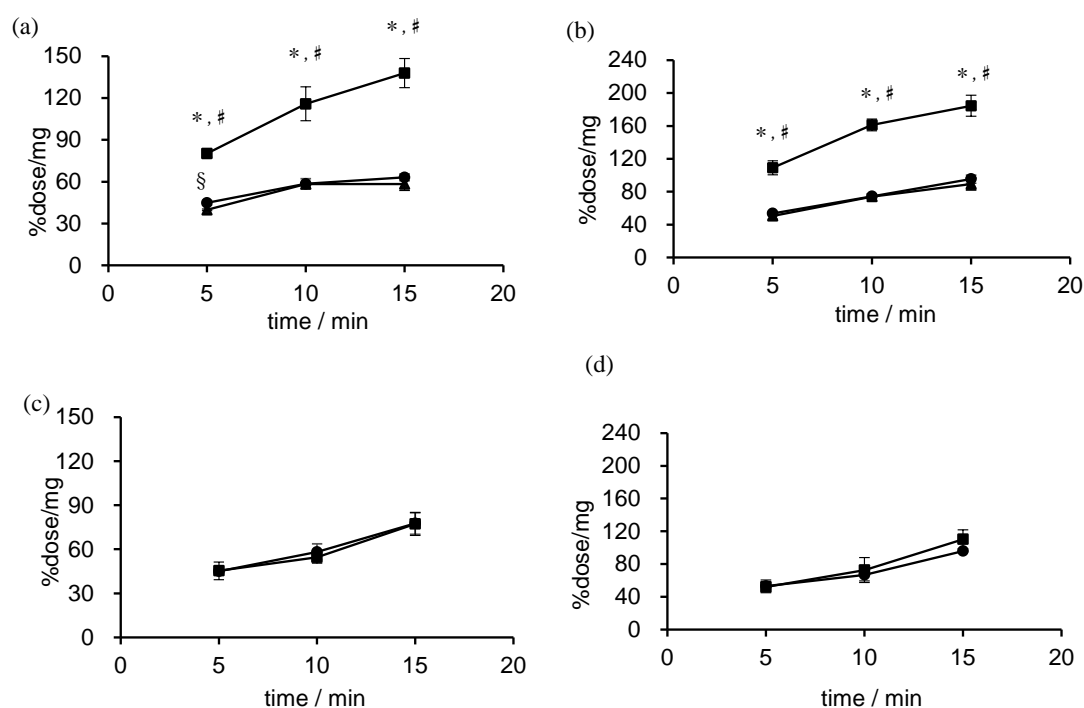


**Fig. 2-6** Extracted ion chromatograms and MS spectra of compound **14a**. MS spectra were recorded using ACQUITY QDa.

### 2-2-7 細胞取り込み評価

脂質ラジカルを発生させた HepG2 細胞を用いて、化合物 $[^{125}I]2a$ 、 $[^{125}I]2b$ 、 $[^{125}I]3a$ 、 $[^{125}I]3b$  の細胞内の放射能を測定し、細胞取り込み量を評価した。不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は培養細胞に添加すると、代謝の過程で脂質ラジカルを生成することが知

られている[52,53]。一方、アラキドン酸と同程度の脂溶性を有するアラキジン酸は、飽和脂肪酸であり二重結合が存在しないため代謝の過程で脂質ラジカルを生じず、対照実験として使用した[54]。ニトロキシド誘導体 $^{125}\text{I}$ 2a と $^{125}\text{I}$ 2b において、脂肪酸非添加群とアラキジン酸添加群を比較するとそれぞれ同程度の細胞取り込み量を示した (Fig. 2-7)。また、 $^{125}\text{I}$ 2a と $^{125}\text{I}$ 3a、 $^{125}\text{I}$ 2b と $^{125}\text{I}$ 3b の脂肪酸非添加群を比較すると、それぞれ同程度の集積量を示した。一方、脂肪酸非添加群とアラキドン酸添加群の細胞取り込み量を比較すると、メトキシアミン誘導体 $^{125}\text{I}$ 3a および $^{125}\text{I}$ 3b では差は見られなかったが、ニトロキシド誘導体 $^{125}\text{I}$ 2a または $^{125}\text{I}$ 2b ではアラキドン酸添加群で有意に取り込みが増加した。化合物 $^{125}\text{I}$ 2b を添加した 15 分後では、脂肪酸非添加群と比べてアラキドン酸添加群で 1.9 倍高く取り込まれ、 $^{125}\text{I}$ 2a では 2.2 倍高く取り込まれた。このことから、 $^{125}\text{I}$ 2a の方が脂質ラジカル付加体の生成後に細胞内へ高く集積することが示された。さらに、立体異性体 $^{125}\text{I}$ 2a と $^{125}\text{I}$ 2b を比較すると、アラキドン酸添加群及び脂肪酸非添加群のどちらの群においても $^{125}\text{I}$ 2b の方が $^{125}\text{I}$ 2a より高く細胞に集積した。



**Fig. 2-7** Accumulation of  $^{125}\text{I}$ -labeled compounds in HepG2 cells with arachidonic acid (■), arachidic acid (▲) and without additives (●). (a)  $^{125}\text{I}$ 2a, (b)  $^{125}\text{I}$ 2b, (c)  $^{125}\text{I}$ 3a, (d)  $^{125}\text{I}$ 3b. §  $p < 0.05$  vs without additives, \*  $p < 0.01$  vs without additives, #  $p < 0.01$  vs arachidic acid.

## 2-2-8 正常マウスにおける生体内放射能分布評価

正常マウスにニトロキシド誘導体<sup>[125I]</sup>1、<sup>[125I]</sup>2a、<sup>[125I]</sup>2b およびメトキシアミン誘導体<sup>[125I]</sup>3a、<sup>[125I]</sup>3b を投与し、2、5、10、30 分、1、3、6、24 時間後の各臓器への放射能分布を評価した (Table 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6)。全ての化合物において、甲状腺への集積は 0.1%dose 以下と低いことから、*p*-ヨードベンズアミドに導入された放射性ヨウ素は脱離せず、生体内の脱ヨウ素に対する安定性が高いことが示唆された。また、化合物<sup>[125I]</sup>2a では、血中の放射能は 2 分から 10 分にかけて上昇し、その後減少した。さらに、化合物<sup>[125I]</sup>2a では化合物<sup>[125I]</sup>1、<sup>[125I]</sup>2b と比較して血中への滞留性が比較的高く、数時間かけて緩やかにクリアランスされた。立体異性体である化合物<sup>[125I]</sup>2a と<sup>[125I]</sup>2b では、よく似た生体内挙動及び臓器への集積を示した。一方、脳では化合物<sup>[125I]</sup>2a は投与後早期に集積しその後早期に除去されることが示され、投与 2 分後では<sup>[125I]</sup>2b の約 2.8 倍集積していた。化合物<sup>[125I]</sup>2a とそのメトキシアミン体<sup>[125I]</sup>3a を比較すると同様の放射能挙動を示しており、また化合物<sup>[125I]</sup>2b とそのメトキシアミン体<sup>[125I]</sup>3b においても似た放射能分布を示した。

**Table 2-2** Biodistribution of radioactivity after injection of <sup>[125I]</sup>1 into normal mice.

	Uptake (%dose/g, mean ± SD.)							
	2 min	5 min	10 min	30 min	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr
<b>blood</b>	3.9±0.2	3.1±0.3	2.6±0.3	1.8±0.1	1.2±0.1	0.8±0.2	0.4±0.1	0.1±0.0
<b>pancreas</b>	2.7±0.3	2.8±0.1	2.5±0.1	1.9±0.1	1.6±0.1	1.3±0.2	0.9±0.1	0.1±0.0
<b>spleen</b>	5.0±0.2	4.6±0.3	4.5±0.4	3.8±0.1	3.6±0.3	3.8±0.3	2.5±0.1	0.5±0.1
<b>stomach</b>	2.1±0.4	4.7±1.2	6.5±1.6	10.9±1.8	9.3±2.6	8.4±3.6	4.2±2.1	0.1±0.1
<b>intestine</b>	2.1±0.2	2.7±0.3	3.4±0.2	4.9±1.3	8.4±1.0	12.2±2.0	5.8±0.7	0.3±0.1
<b>kidney</b>	8.2±0.6	7.2±0.2	7.8±1.2	7.0±0.6	6.1±0.4	5.7±0.9	5.8±0.6	0.3±0.0
<b>liver</b>	12.6±0.6	12.2±0.9	11.0±0.8	8.3±1.0	6.2±0.4	5.8±0.5	4.4±0.3	1.2±0.1
<b>heart</b>	4.0±0.4	3.1±0.3	2.5±0.2	1.9±0.3	1.4±0.1	1.0±0.1	0.6±0.0	0.1±0.0
<b>lung</b>	8.5±1.0	7.6±0.2	7.0±1.0	6.3±0.4	6.0±0.5	5.6±1.1	4.8±0.3	0.5±0.1
<b>thigh muscle</b>	2.1±0.2	1.5±0.1	1.5±0.1	1.2±0.2	0.9±0.0	0.6±0.0	0.4±0.0	0.0±0.0
<b>brain</b>	1.4±0.2	1.3±0.2	0.9±0.1	0.6±0.1	0.4±0.1	0.2±0.2	0.1±0.0	0.0±0.0
<b>thyroid gland<sup>a</sup></b>	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0

Data are shown as means ± S.D. (n = 4). <sup>a</sup> shown as %dose.

**Table 2-3** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]**2a** into normal mice.

	Uptake (%dose/g, mean ± SD.)							
	2 min	5 min	10 min	30 min	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr
<b>blood</b>	3.7±0.5	5.3±0.6	5.6±1.5	5.2±0.4	5.1±0.4	4.0±0.2	3.7±0.1	1.1±0.2
<b>pancreas</b>	1.5±0.4	1.5±0.2	1.5±0.5	1.2±0.2	1.2±0.1	0.9±0.1	0.8±0.2	0.2±0.1
<b>spleen</b>	2.7±0.6	2.6±0.3	2.8±0.8	2.3±0.3	2.4±0.5	1.7±0.1	1.4±0.1	0.4±0.1
<b>stomach</b>	0.8±0.2	1.2±0.2	2.2±0.5	2.6±0.6	4.0±0.3	6.3±1.8	3.4±0.9	1.1±0.9
<b>intestine</b>	1.2±0.3	1.4±0.2	1.7±0.4	1.7±0.2	2.8±0.4	5.5±0.7	6.9±0.6	1.0±0.5
<b>kidney</b>	4.9±0.9	4.4±0.7	4.0±1.0	3.1±0.4	2.9±0.3	2.7±0.3	2.8±0.4	0.7±0.3
<b>liver</b>	8.7±2.2	9.0±1.3	7.7±1.8	5.8±0.3	5.4±0.5	4.0±0.3	3.3±0.3	0.9±0.1
<b>heart</b>	3.9±0.6	3.1±0.2	2.8±0.8	2.1±0.3	2.1±0.2	1.4±0.1	1.3±0.2	0.3±0.1
<b>lung</b>	5.1±0.8	4.9±0.5	4.5±1.3	3.3±0.4	3.2±0.3	2.4±0.2	2.2±0.2	0.5±0.1
<b>thigh muscle</b>	1.9±0.8	1.4±0.1	1.3±0.3	1.2±0.2	1.2±0.2	1.0±0.2	0.8±0.1	0.2±0.0
<b>brain</b>	1.2±0.3	1.2±0.1	0.9±0.2	0.5±0.1	0.4±0.1	0.2±0.0	0.2±0.0	0.1±0.0
<b>thyroid gland<sup>a</sup></b>	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1

Data are shown as means ± S.D. (n = 4). <sup>a</sup> shown as %dose.

**Table 2-4** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]**2b** into normal mice.

	Uptake (%dose/g, mean ± SD.)							
	2 min	5 min	10 min	30 min	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr
<b>blood</b>	2.6±0.1	1.9±0.1	1.6±0.1	1.0±0.0	1.1±0.4	0.8±0.1	0.5±0.1	0.1±0.0
<b>pancreas</b>	1.1±0.1	1.4±0.2	1.9±0.5	1.4±0.2	1.7±0.7	1.2±0.2	0.6±0.1	0.1±0.0
<b>spleen</b>	1.9±0.1	2.2±0.2	2.3±0.2	1.9±0.3	2.3±0.8	2.0±0.2	1.3±0.1	0.3±0.0
<b>stomach</b>	0.5±0.2	1.0±0.3	1.1±0.4	2.5±0.1	3.8±1.5	2.1±0.5	1.6±1.0	0.1±0.0
<b>intestine</b>	0.7±0.1	0.9±0.1	1.4±0.1	2.4±0.9	4.3±2.1	10.2±0.9	6.3±0.7	0.2±0.0
<b>kidney</b>	4.3±0.3	4.2±0.2	4.3±0.5	4.0±1.5	3.7±1.4	3.5±0.4	2.2±0.5	0.3±0.0
<b>liver</b>	6.9±0.4	6.1±0.2	6.1±0.5	5.1±0.5	5.7±2.1	4.3±0.4	2.7±0.4	0.9±0.0
<b>heart</b>	3.0±0.2	1.9±0.1	1.5±0.1	1.1±0.1	1.1±0.4	0.8±0.1	0.4±0.1	0.1±0.0
<b>lung</b>	7.0±0.9	6.2±0.4	6.7±0.6	5.3±0.8	5.7±2.2	3.7±0.5	2.0±0.1	0.3±0.0
<b>thigh muscle</b>	1.0±0.1	0.9±0.1	0.9±0.1	0.7±0.1	0.7±0.3	0.5±0.0	0.2±0.0	0.1±0.1
<b>brain</b>	0.4±0.0	0.5±0.1	0.4±0.0	0.3±0.0	0.2±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.0±0.0
<b>thyroid gland<sup>a</sup></b>	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0

Data are shown as means ± S.D. (n = 4). <sup>a</sup> shown as %dose.

**Table 2-5** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]**3a** into normal mice.

	Uptake (%dose/g, mean ± SD.)							
	2 min	5 min	10 min	30 min	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr
<b>blood</b>	7.1 ± 0.5	4.7 ± 0.9	4.7 ± 0.3	3.6 ± 0.5	3.2 ± 0.5	2.6 ± 0.2	1.4 ± 0.8	0.6 ± 0.2
<b>pancreas</b>	2.8 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.0
<b>spleen</b>	3.4 ± 0.5	2.3 ± 0.5	2.5 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.3 ± 0.1
<b>stomach</b>	1.5 ± 0.6	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.3	3.0 ± 1.0	3.2 ± 1.3	4.8 ± 0.4	2.5 ± 1.7	0.4 ± 0.0
<b>intestine</b>	1.5 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	2.2 ± 0.4	3.1 ± 0.8	6.8 ± 1.5	4.4 ± 2.6	0.8 ± 0.3
<b>kidney</b>	7.7 ± 0.8	4.2 ± 0.9	3.1 ± 0.3	2.5 ± 0.3	2.2 ± 0.3	2.4 ± 0.3	1.8 ± 1.0	0.4 ± 0.2
<b>liver</b>	17.1 ± 2.0	10.1 ± 2.4	8.7 ± 0.3	5.4 ± 0.6	4.5 ± 0.8	3.4 ± 0.2	1.9 ± 1.1	0.7 ± 0.2
<b>heart</b>	8.7 ± 0.9	4.0 ± 0.8	3.2 ± 0.6	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.1 ± 0.0	0.5 ± 0.3	0.2 ± 0.0
<b>lung</b>	10.5 ± 0.9	4.7 ± 1.1	3.7 ± 0.3	2.9 ± 0.7	2.7 ± 0.4	1.8 ± 0.2	1.1 ± 0.6	0.4 ± 0.1
<b>thigh muscle</b>	2.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.6	0.3 ± 0.2	0.1 ± 0.0
<b>brain</b>	1.3 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.1	0.6 ± 0.2	0.3 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0
<b>thyroid gland<sup>a</sup></b>	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0

Data are shown as means ± S.D. (n = 4). <sup>a</sup> shown as %dose.

**Table 2-6** Biodistribution of radioactivity after injection of [<sup>125</sup>I]**3b** into normal mice.

	Uptake (%dose/g, mean ± SD.)							
	2 min	5 min	10 min	30 min	1 hr	3 hr	6 hr	24 hr
<b>blood</b>	2.1 ± 0.3	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.2	1.0 ± 0.2	0.8 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.0
<b>pancreas</b>	2.6 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.2 ± 0.2	1.8 ± 0.6	1.2 ± 0.1	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0
<b>spleen</b>	4.3 ± 0.4	4.5 ± 0.1	4.3 ± 0.4	2.5 ± 0.7	1.9 ± 0.5	1.7 ± 0.9	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.0
<b>stomach</b>	1.1 ± 0.4	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.1	4.3 ± 1.4	5.4 ± 0.3	4.3 ± 0.6	1.8 ± 0.7	0.3 ± 0.2
<b>intestine</b>	1.7 ± 0.4	2.0 ± 0.2	2.6 ± 0.4	4.8 ± 1.5	7.8 ± 0.4	11.4 ± 3.0	8.3 ± 1.8	0.5 ± 0.1
<b>kidney</b>	8.1 ± 1.8	6.5 ± 0.2	5.2 ± 0.7	4.1 ± 0.9	3.6 ± 0.3	2.9 ± 0.4	1.9 ± 0.3	0.3 ± 0.1
<b>liver</b>	14.8 ± 3.1	13.4 ± 0.9	11.5 ± 1.0	8.3 ± 1.6	7.2 ± 0.5	4.4 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1
<b>heart</b>	11.5 ± 0.7	6.4 ± 0.8	3.4 ± 0.7	1.7 ± 0.4	1.3 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.1 ± 0.0
<b>lung</b>	11.9 ± 0.9	7.6 ± 0.9	6.1 ± 1.0	4.3 ± 1.1	3.6 ± 0.3	2.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0
<b>thigh muscle</b>	2.7 ± 0.2	2.4 ± 0.4	1.7 ± 0.2	1.2 ± 0.5	1.2 ± 0.2	0.6 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0
<b>brain</b>	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.3	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
<b>thyroid gland<sup>a</sup></b>	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.1

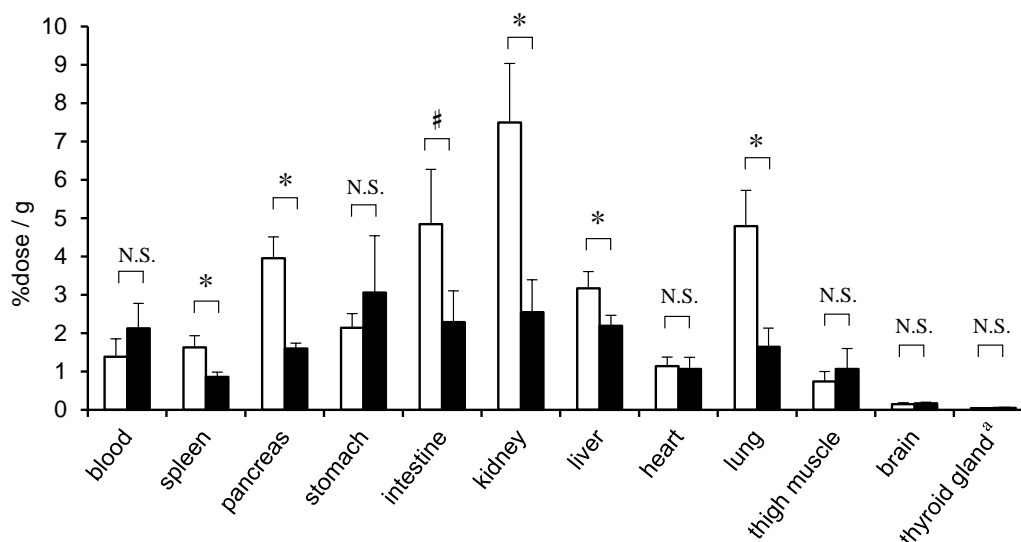
Data are shown as means ± S.D. (n = 4). <sup>a</sup> shown as %dose.



## 2-2-8 炎症誘発マウスにおける生体内放射能分布評価

生体内に投与した四塩化炭素は腎臓や肝臓の CYP により代謝され、トリクロロメチルラジカルとなり脂質過酸化を引き起こすと考えられている[55-58]。そのため、四塩化炭素は急性炎症モデル[59,60]や線維症モデル[61,62]など多様な炎症モデルの作製に使用されている。また、四塩化炭素による炎症は肝臓や腎臓だけでなく、肺や膵臓など様々な臓器で起こることが報告されている[63,64]。そこで、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ の生体内での有用性を検証するために、脂質ラジカルが産生される四塩化炭素誘発脂質過酸化亢進モデルマウスを用いて $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ の生体内分布を評価した。また、対照化合物としてメトキシアミン誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ の生体内分布も評価し、比較検討した。

四塩化炭素を ddY マウスに投与し、24 時間後に化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ または $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ を静脈投与した。化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を投与後、6 時間後に臓器を摘出し、 $\gamma$ カウンタにて放射能を測定した。肝臓、腎臓、膵臓、肺などの脂質過酸化が起こると考えられる臓器では、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ はメトキシアミン誘導体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ と比較して有意に高い放射能集積を示した (Fig. 2-8)。一方で、血、心臓、筋肉、脳、甲状腺などの臓器では化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ と化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ で有意差は見られなかった。



**Fig. 2-8** Biodistribution of  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  (open bars) and  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  (closed bars) in carbon tetrachloride-treated mice. Twenty-four hours after  $\text{CCl}_4$  administration, the mice were intravenously administered  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  or  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  (100  $\mu\text{L}$  (1% EtOH and 0.1% Tween 80 in PBS), 37 kBq/mouse). The mice were sacrificed at 6 h after probe administration. Data are shown as means  $\pm$  SD (n = 4). \* $p$  < 0.01, # $p$  < 0.05, N.S.: not significant.

<sup>a</sup> shown as % dose.

## 2-3 考察

本章では、第1章で合成した新規脂質ラジカル検出核医学イメージングプローブの生体内における有用性評価を目的とした。ニトロキンド化合物と脂質ラジカルとの反応性は、ニトロキンド化合物の脂溶性により変化することが知られている。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  と  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  は同程度の  $\log P$  値を有したことから (Table 2-1)、立体異性体間での反応性の違いに脂溶性は関与しないと考えられる。さらに、化合物の生体内挙動は脂溶性の違いにより変化するため、化合物  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  と同程度の  $\log P$  値を示す化合物  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3b}$  では、生体内での分布の違いに脂溶性という要因を考慮する必要がなく、ニトロキンド化合物の評価における対照化合物として有用であると考えられる。

不対電子を有するニトロキンドは、一電子酸化還元反応性を有する[65]。例えば、ニトロキンド化合物 ( $>\text{N-O}\cdot$ ) が一電子還元され ( $>\text{N-O}^-$ )、プロトンが付加すると安定なヒドロキシルアミン ( $>\text{N-OH}$ ) へと変化する。そのため、ニトロキンドの還元反応性は一電子移動反応の酸化還元電位を考慮することが重要である。生体内の主要な還元性物質として知られるグルタチオン (GSH) が一電子酸化して thiyl radical ( $\text{GS}\cdot$ ) を生成する反応における酸化還元電位は pH7.4 で  $0.92 \pm 0.03 \text{ V}$  であることが報告されている[66]。また、TEMPO 型ニトロキンドの酸化還元電位は置換基により変化するが、0 V から 0.2 V 程度であることが報告されている[41]。以上より、化合物  $\mathbf{2a}$ 、 $\mathbf{2b}$  の酸化還元電位 ( $>\text{N-O}\cdot / >\text{N-O}^-$ ) がグルタチオンの酸化還元電位 ( $\text{GS}\cdot, \text{H}^+/\text{GSH}$ ) より低いいため、ニトロキンドの還元反応が進行しなかったと考えられる (Fig. 2-3)。また、還元性物質であるビタミン E ( $\alpha$ -tocopherol) においても、酸化還元電位 ( $\alpha$ -tocopheroxyl $\cdot, \text{H}^+/\alpha$ -tocopherol) は 0.5 V であるため[67]、ニトロキンドの還元反応は進行しないと考えられる。

細胞取り込み評価の結果から (Fig. 2-7)、化合物  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  または  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  がアラキドン酸由来脂質ラジカルと反応し、脂溶性が向上した脂質ラジカル付加体へと変化したことで細胞内に滞留したと考えられた。化合物  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  は  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  に比べて還元抵抗性が高く、脂質ラジカルと長時間反応することが可能であるためより高く細胞内に集積したと考えられる。また、脂肪酸非添加群において、化合物  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  とメトキシアミン誘導体  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  が同程度の細胞内放射能集積を示したことから、非特異的な集積が同程度であると考えられた。一方、立体異性体  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  の脂肪酸非添加群における細胞集積性を比較すると、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2b}$  の方が  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  より高く集積しており、非特異的な集積は

[<sup>125</sup>I]**2b**の方が高いと考えられる。立体異性体[<sup>125</sup>I]**2a**と[<sup>125</sup>I]**2b**の脂溶性は同程度であることから、この非特異的な集積の差は立体異性体間の立体配座の違いに起因することが示唆された。

正常マウスにおける体内挙動において (Table 2-2, 2-3, 2-4, 2-5, 2-6)、化合物[<sup>125</sup>I]**1**、[<sup>125</sup>I]**2a**、[<sup>125</sup>I]**2b**、[<sup>125</sup>I]**3a**、[<sup>125</sup>I]**3b**は腎臓と比較して肝臓への集積が高く、主な代謝経路は肝排泄であると考えられる。また、化合物[<sup>125</sup>I]**2a**と[<sup>125</sup>I]**2b**は同様の生体内挙動を示した一方で、脳への集積は[<sup>125</sup>I]**2a**が約2.8倍高かった。血液脳関門 (blood-brain barrier; BBB) に存在する薬物トランスポーターである P-糖タンパク質 (P-glycoprotein; P-gp) は、薬物を血中へと排出し、脳への移行を制限している。この P-gp の機能は未解明な部分が多く存在するが、*in vitro* 研究や動物モデルにおいて、化合物の立体異性により輸送に差が生じることや P-gp 阻害活性が異なることが報告されている[68]。そのため、化合物[<sup>125</sup>I]**2a**、[<sup>125</sup>I]**2b**においても、立体異性の違いにより脳への輸送に差が生じ、脳への集積量が異なったのではないかと考えられる。また、化合物[<sup>125</sup>I]**2a**とそのメトキシアミン体 [ <sup>125</sup>I]**3a**、また化合物[<sup>125</sup>I]**2b**とそのメトキシアミン体 [ <sup>125</sup>I]**3b**では同様の生体内分布を示したことから、ニトロキシド部位をメチル化することによる生体内挙動の差は少ないことが示唆された。そのため、炎症誘発マウスにおける評価では (Fig. 2-8)、四塩化炭素の投与により生じた脂質ラジカルを[<sup>125</sup>I]**2a**のニトロキシド部位が捕捉し、それぞれの臓器に集積したと考えられる。また、炎症誘発マウスの結果から、肝臓への[<sup>125</sup>I]**2a**と[<sup>125</sup>I]**3a**の集積に有意な差は見られたものの、腎臓や肺でみられたような大きな差は見られなかった。四塩化炭素の投与により肝臓の脂質過酸化が亢進することは広く知られているが、四塩化炭素投与後のどのタイミングで脂質ラジカルが発生しているかについてはいまだ分かっていない。本実験では四塩化炭素の投与24時間後に化合物[<sup>125</sup>I]**2a**を投与したため、投与24時間後の肝臓では脂質過酸化が進行して脂質ラジカルが過酸化物質へと変化しラジカル体が減少したことで、化合物[<sup>125</sup>I]**2a**の集積が低くなったのではないかと推測する。

以上より、**2a**が脂質ラジカルと選択的な反応性を示し、脂質ラジカル産生を誘導した細胞や脂質過酸化誘発マウスにおいて、メトキシアミン誘導体**3a**と比較して有意に高く集積したことから、側鎖にペンチル基を導入した TEMPO 型ニトロキシド誘導体**2a**の放射性ヨウ素標識体は、脂質ラジカルを生体内で追跡する放射性プローブとして有効である可能性が示された。

## 第3章 一過性中大脳動脈閉塞モデルにおける脂質ラジカルの追跡

### 3-1 緒言

脳血管疾患とは脳動脈の異常により生じる病気の総称である。脳血管疾患は国内死因の第4位であり、その中でも脳梗塞が半数以上を占めている。ヒトの脳は心拍出量の約15%の血流量をもち、全身の酸素消費量の約20%を占めると言われている[69–71]。そのため脳梗塞などの脳動脈の閉塞は重篤な障害や死亡に繋がる恐れがあり、脳への血流を早期に再開させるために遺伝子組み換え組織プラスミノゲン活性化因子 (recombinant tissue-type plasminogen activator: rt-PA) の静脈内投与による薬物治療や、機械的急性期血栓回収療法などの外科的治療が行われている。しかし、梗塞除去後に血流が再開すると再灌流障害が生じ、再出血や浮腫などの二次的脳損傷を引き起こす。そのため発症3か月後でも半数以上が予後不良であり、頭蓋内出血の合併症や脳梗塞拡大による死亡は約15%との報告がある[72]。

脳梗塞などの虚血状態により血流が低下した組織では、ヒポキサンチンおよびキサンチンオキシダーゼの産生が亢進することが知られている[73,74]。両者が過剰に存在する状況下で血流が再開されると、虚血組織の急激な酸素濃度の上昇により、ヒポキサンチンがキサンチンオキシダーゼにより酸化され、スーパーオキシドをはじめとする種々の活性酸素種が生成する。その他にも、ミトコンドリアの電子伝達系や、NADPH オキシダーゼ、血管内皮型一酸化窒素合成酵素の活性化など、種々の経路により活性酸素種が生成すると考えられている[75]。様々な脳は脂質に富む臓器であり、さらに他の臓器と比べて不飽和脂肪酸含量が多いことや、鉄含量が多いこと、抗酸化物質の含量が少ないことから、虚血再灌流時に発生する活性酸素種により障害を受け、脂質ラジカルの生成を起点とする連鎖的な脂質過酸化反応が容易に進行する。この最終生成物は、生体内の機能性分子と反応することでその働きを消失させ、脳内での細胞死や壊死を誘導するため、再灌流障害を惹起すると考えられている[76]。

そこで、再灌流障害により発生したフリーラジカルを消去し、脂質過酸化を抑制する世界初の脳保護薬としてエダラボンが2001年に日本で承認され、脳卒中治療ガイドライン2021では脳保護療法としてのエダラボンの投与が推奨されている。また、エダラボンは脳梗塞のタイプに関係なく使用可能であることから、現在も急性期脳梗塞の治療において約半数近くで使用されている。一方で、エダラボンの有効性について統計学的

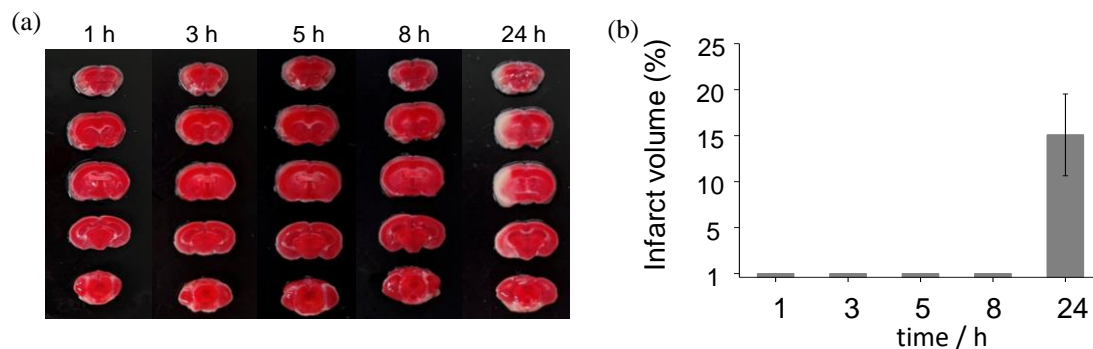
に有意な神経症候改善効果が見られたとする報告はあるものの[72,77,78]、劇的に症状が改善することはなく、エダラボンの化合物としての安定性や腎障害の発現など他の面からの懸念点が多いという問題もある。

脳梗塞の治療成績向上には、血流再開後に生じる脂質ラジカルの時空間的な把握ならびにそれらをターゲットとした薬剤の開発が必須であるにもかかわらず、再灌流障害時に発生する脂質ラジカルについてその挙動を生体内で非侵襲的に追跡可能な手法はいまだ確立されておらず、実際に脳内で発生した脂質ラジカルの量や時間、分布など未解明な部分が多く存在する。さらに、急性期脳保護薬として認可されている薬はいまだエダラボンのみであり、より有効性と安全性に優れた脳保護療法の開発が望まれている。そのため、脳内における脂質ラジカルを非侵襲的に追跡し、発生時間や分布を明らかにすることが出来れば、薬剤の投与タイミングの工夫や、部位特異的に薬剤送達を行うなど新たな治療戦略に繋がると考えられる。本章では、これまでに開発してきた放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物を用いて、脳虚血再灌流後に発生した脂質ラジカルの挙動や分布を可視化することを目的とした。

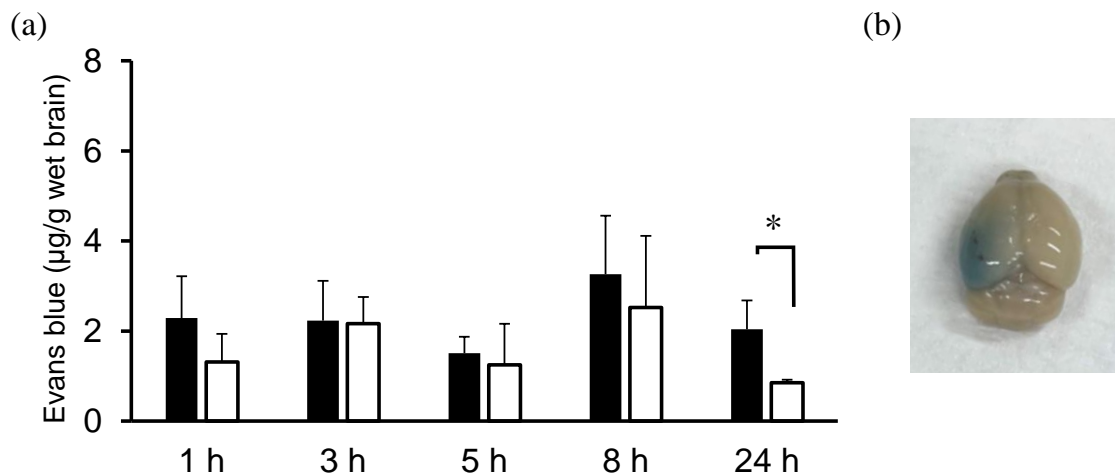
## 3-2 結果

### 3-2-1 TTC 染色および血液脳関門損傷の評価

マウス一過性中大脳動脈閉塞モデル (transient middle cerebral artery occlusion; tMCAO) を作製し、本モデルにおける梗塞巣体積の評価及び血液脳関門損傷の評価を行った。tMCAO (1 時間虚血) マウスは、これまでに報告されている方法を参考に、Longa 法にて作製した[79]。梗塞巣体積の評価は、脳切片の TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) 染色により評価した。TTC 染色では、正常組織が赤色に染色され、壊死部位が染色されず白色となる。tMCAO マウスの再灌流から 1、3、5、8、24 時間後に TTC 染色を行い、その結果をもとに梗塞巣体積を評価した (Fig. 3-1)。再灌流の 1、3、5、8 時間群では白色の壊死部位は認められず、24 時間群でのみ梗塞側で壊死が確認された。そのため、梗塞は再灌流後早期には起こらず、緩やかに進行し 24 時間後に梗塞巣が形成されることが示された。次に、血液脳関門損傷の評価としてエバンスブルー法を用い、エバンスブルーの血管外漏出を評価した (Fig. 3-2)。tMCAO マウスの再灌流 1、3、5、8 時間群では右大脳半球 (非虚血側) と左大脳半球 (虚血側) に有意な血管外漏出の差は認められなかったが、24 時間群では有意な差が確認された。以上より、血液脳関門損傷も梗塞巣形成と同様に緩徐に進行することが示された。



**Fig. 3-1** The infarct volume assessed by TTC staining. (a) Representative images of the infarction areas 1, 3, 5, 8, 24 h after tMCAO occurred: coronal sections stained with TTC. The red region shows intact area; white region shows infarction area. (b) Quantitation of infarct volume.



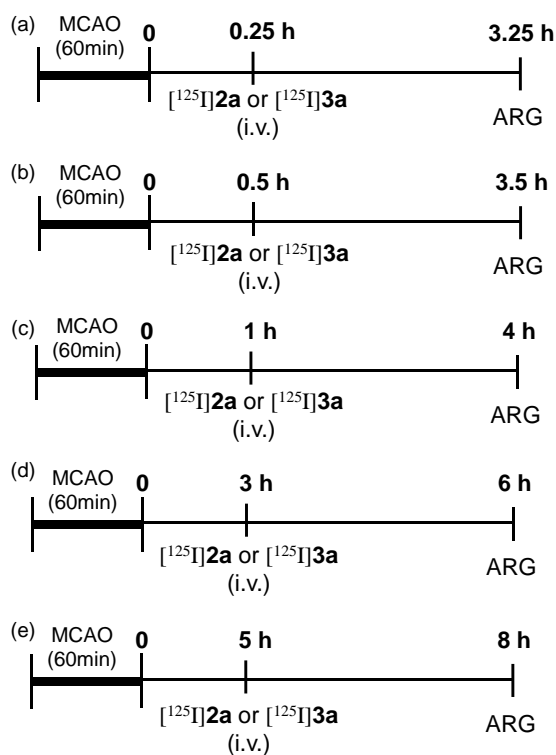
**Fig. 3-2** The assessment of blood-brain barrier disruption in 1 h tMCAO mice using Evans blue staining. (a) Quantitation of Evans blue extravasation from brain extract 1, 3, 5, 8, 24 h after tMCAO. \* $p < 0.05$  for comparisons of the ischemic side (closed column) and non-ischemic side (open column). (b) Representative images of Evans blue dye extravasation of 24 h after tMCAO.

### 3-2-2 脳内放射能分布評価

tMCAO マウスの再灌流後の脳内における脂質ラジカルの分布を評価するため、ニトロキシド化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を用いて集積性評価を行った。中大脳動脈を1時間虚血し、再灌流の15、30分、1、3、5時間後に化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ またはメトキシアミン体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ を投与した。投与から3時間後に脳を摘出し、20  $\mu\text{m}$ 厚の脳の凍結切片を100  $\mu\text{m}$ 間隔で1枚ずつ作製した後、オートラジオグラフィ (ARG) により放射能分布を評価した (Fig. 3-3)。ARGにより得られた画像を比較すると、bregma (頭蓋の矢状縫合と冠状縫合の交差する位置) +0.5 mm および-1.4 mm に位置する脳において虚血側と非虚血側の放射能集積に違いが確認された。そこで、この2つの部位における放射能集積量を Image J により定量し評価を行った。

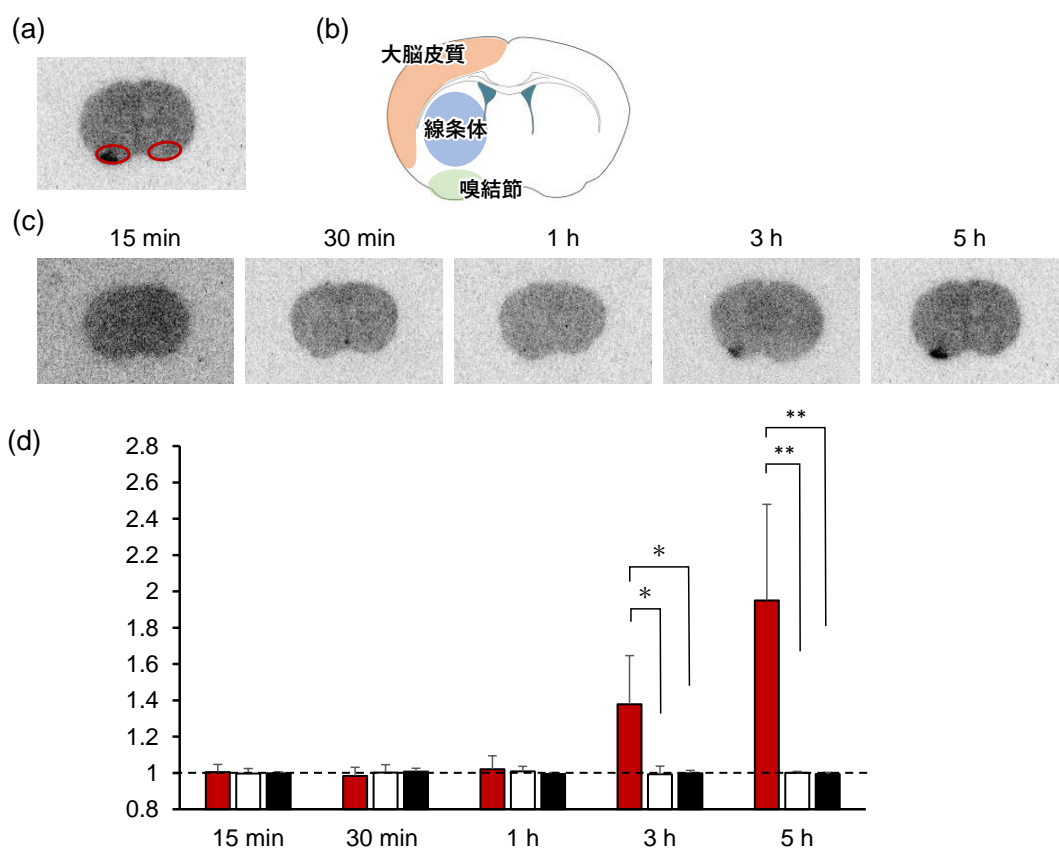
Bregma+0.5 mm では、Paxinos と Franflin の脳地図[80]と照らし合わせると嗅結節に相当する部位に放射能集積が確認されたため、嗅結節付近の集積部位を関心領域に設定した (Fig. 3-4(a)(b))。一方、bregma-1.4 mm では、扁桃体を含む領域に放射能集積が確認され、虚血側および非虚血側の大脳半球を関心領域に設定した (Fig. 3-5(a)(b))。定量した結果は、それぞれ非虚血側に対する虚血側の比として示した。Bregma から+0.5 mm

に位置する脳では (Fig. 3-4) 、15、30分、1時間群では虚血側と非虚血側で集積に差が見られなかったが、3、5時間群では非虚血側と比べて虚血側の嗅結節付近の部位に有意に高く集積していた。また、bregma から-1.4 mm に位置する脳においては (Fig. 3-5) 、15分群で集積に変化がなく、30分、1、3、5時間群では虚血側である左脳側で高い集積が確認された。さらに、メトキシアミン体 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  では30分群における bregma-1.4 mm の位置で虚血側への集積が見られたが、15分、1、3、5時間群では虚血側と非虚血側で差が見られず、sham 群では脳のすべての位置・時間において虚血側と非虚血側で差が見られなかった。

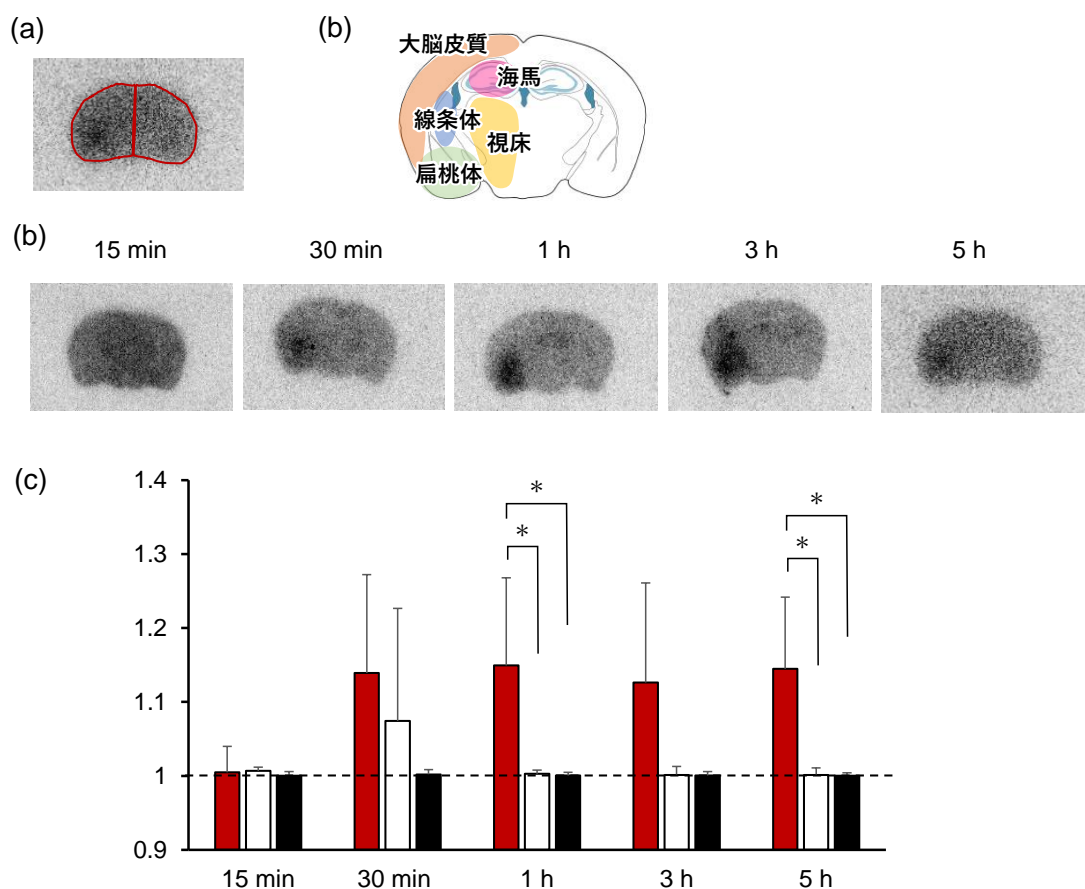


**Fig. 3-3** Schematic diagram of the experimental protocol. The compound  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  or  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  was administered at each time ((a) 15 min (b) 30 min (c) 1 h (d) 3 h (e) 5 h) after tMCAO (60 min) and imaging assessment using ARG was performed.





**Fig. 3-4** Evaluation of radioactive accumulation in *ex vivo* ARG studies with coronal brain section from bregma +0.5 mm. (a) ROI marked on olfactory tubercle in the ischemic and the non-ischemic side (b) brain atlas (c) Representative ARG images of [<sup>125</sup>I]**2a** distribution. (c) Quantitation of the ratio of radioactivity (red; [<sup>125</sup>I]**2a**, open; [<sup>125</sup>I]**3a**, closed; sham.) between the ischemic and the non-ischemic side. \**p*<0.05, \*\**p*<0.01.

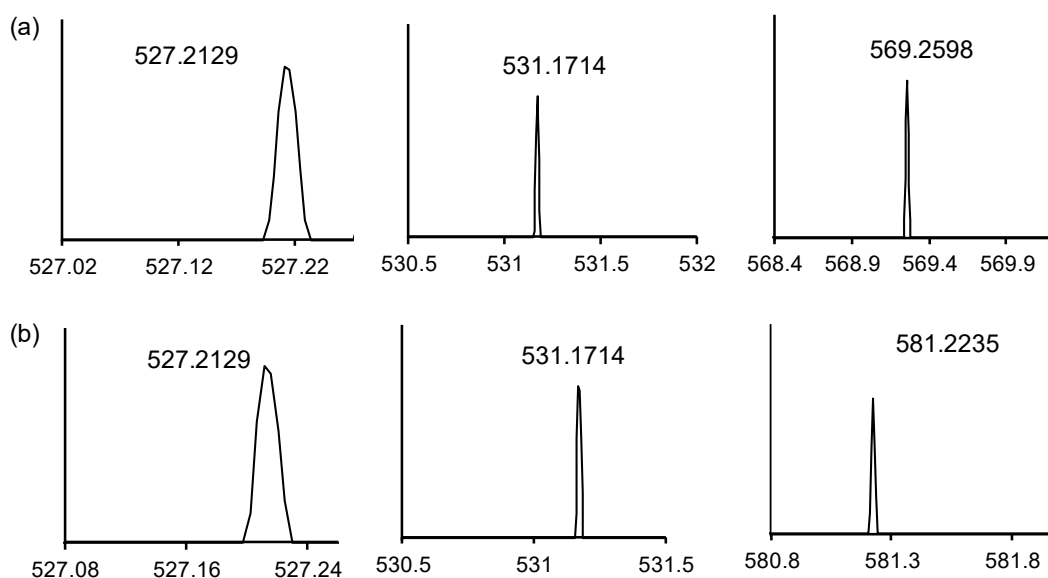


**Fig. 3-5** Evaluation of radioactive accumulation in *ex vivo* ARG studies with coronal brain section from bregma  $-1.4$  mm. (a) ROI marked on the ischemic and the non-ischemic hemisphere (b) brain atlas (c) Representative ARG images of  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  distribution (d) Quantitation of the ratio of radioactivity (red;  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ , open;  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$ , closed; sham.) between the ischemic and the non-ischemic side.  $*p < 0.05$ .

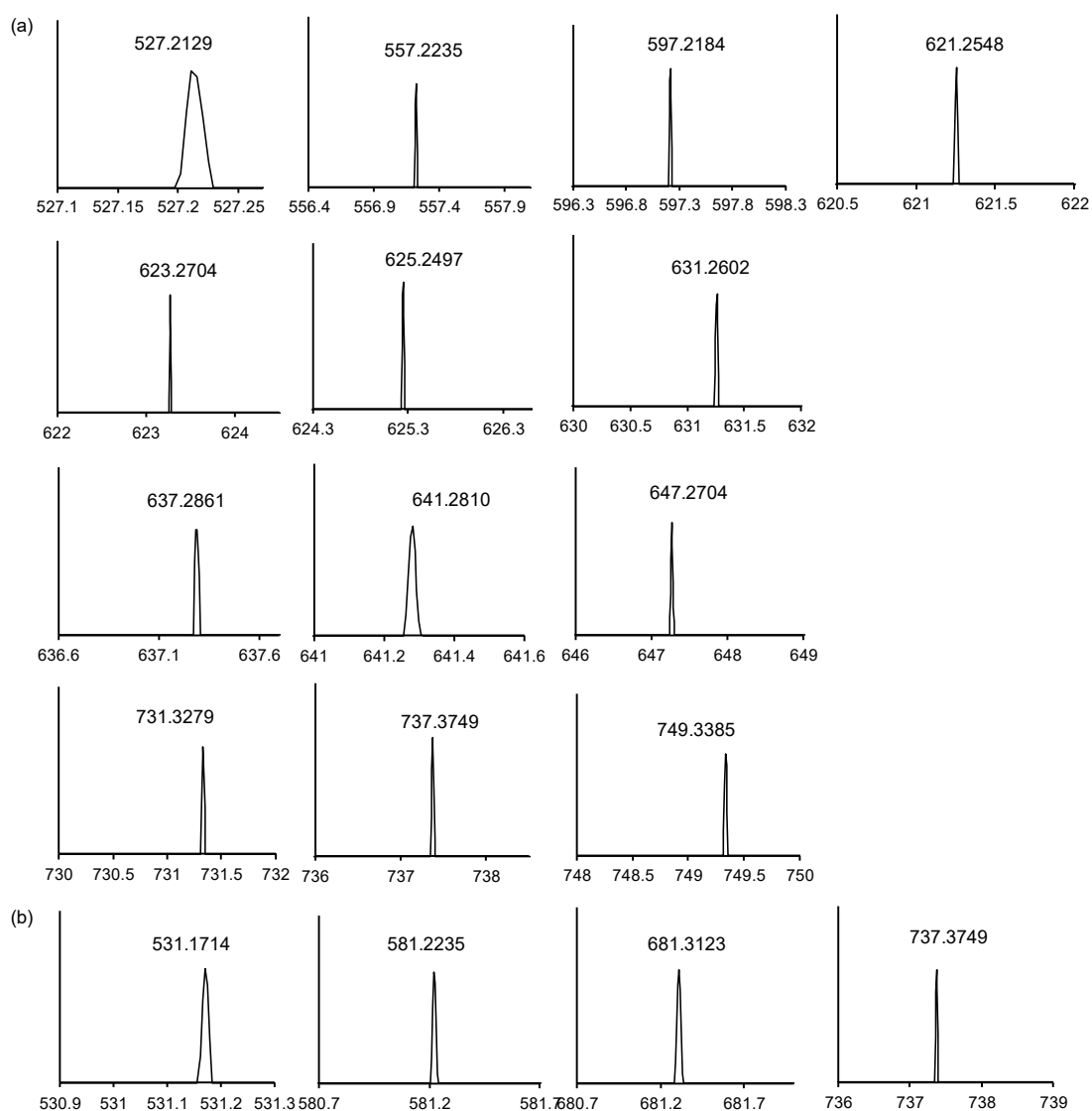
### 3-2-3 LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

tMCAO マウスの再灌流後に生じた脂質ラジカルを化合物 **2a** が捕捉し、ニトロキシドと脂質ラジカルの付加体を形成しているか確認するため、LC/MS を用いて分析した。脂質ラジカル付加体の解析については、これまでに報告されている脂質ラジカルの分子量[81]を参考に行った。再灌流の1時間後または5時間後に化合物 **2a** を投与し、虚血側（左大脳半球）と非虚血側（右大脳半球）をそれぞれ摘出、脂質抽出を行い LC/MS で分析した。再灌流から1時間後に化合物 **2a** を投与すると、虚血側では炭素数が3、5、8 ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$  ラジカル、 $\text{C}_5\text{H}_9$  ラジカル、 $\text{C}_8\text{H}_{15}$  ラジカル) の脂質ラジカル付加体の分子イオンピークが検出され、非虚血側でも炭素数が3、5、8 ( $\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_2$  ラジカル、 $\text{C}_5\text{H}_9$  ラジカル)

ル、 $C_8H_{11}O$  ラジカル) である脂質ラジカル付加体のピークが検出された (Fig. 3-6)。一方、再灌流から 5 時間後に化合物 **2a** を投与すると、虚血側では炭素数が 5 ( $C_5H_9$  ラジカル)、6 ( $C_6H_{11}O$  ラジカル)、8 ( $C_8H_{11}O_2$  ラジカル)、9 ( $C_9H_{17}O_3$  ラジカル)、10 ( $C_{10}H_{15}O_2$  ラジカル)、11 ( $C_{11}H_{15}O$  ラジカル、 $C_{11}H_{17}O$  ラジカル、 $C_{11}H_{19}O_2$  ラジカル)、12 ( $C_{12}H_{19}O$  ラジカル)、13 ( $C_{13}H_{17}O$  ラジカル)、18 ( $C_{18}H_{25}O_2$  ラジカル、 $C_{18}H_{31}O_2$  ラジカル、 $C_{18}H_{27}O_3$  ラジカル) である様々な脂質ラジカル付加体のピークが検出され、非虚血側でも炭素数が 3 ( $C_3H_5O_2$  ラジカル)、8 ( $C_8H_{11}O$  ラジカル)、14 ( $C_{14}H_{23}O_2$  ラジカル)、18 ( $C_{18}H_{31}O_2$  ラジカル) である脂質ラジカル付加体のピークが検出された (Fig. 3-7)。これらの脂質ラジカル付加体のピークは、全て理論値の分子量と 5 ppm 以下の誤差で検出された。再灌流から 1 時間後では、炭素の数が少なく脂質が開裂したと考えられる脂質ラジカル付加体が多く観測され、非虚血脳においても同様の炭素数を有する脂質ラジカル付加体の分子イオンピークが観測された。一方、再灌流から 5 時間後では 1 時間後の結果と比べて比較的炭素の数が多く、つまり鎖長の長い脂質ラジカルとの付加体が多く観測され、さらに、再灌流から 5 時間後の虚血脳では、非虚血脳と比べて多くの脂質ラジカル付加体の分子イオンピークが検出された。



**Fig. 3-6** Structural analysis of lipid radical 1 h after tMCAO. (a) HRMS spectra observed at different  $t_R$  in ischemic hemisphere of the brain for tMCAO mice. 527.2129 ( $C_5H_9$ ,  $t_R$ : 26.7 min), 531.1714 ( $C_3H_5O_2$ ,  $t_R$ : 38.4 min), 569.2598 ( $C_8H_{15}$ ,  $t_R$ : 22.2 min) (b) HRMS spectra observed at different  $t_R$  in non-ischemic hemisphere of the brain for tMCAO mice 527.2129 ( $C_5H_9$ ,  $t_R$ : 26.8 min), 531.1714 ( $C_3H_5O_2$ ,  $t_R$ : 38.2 min), 581.2235 ( $C_8H_{11}O$ ,  $t_R$ : 25.4 min).

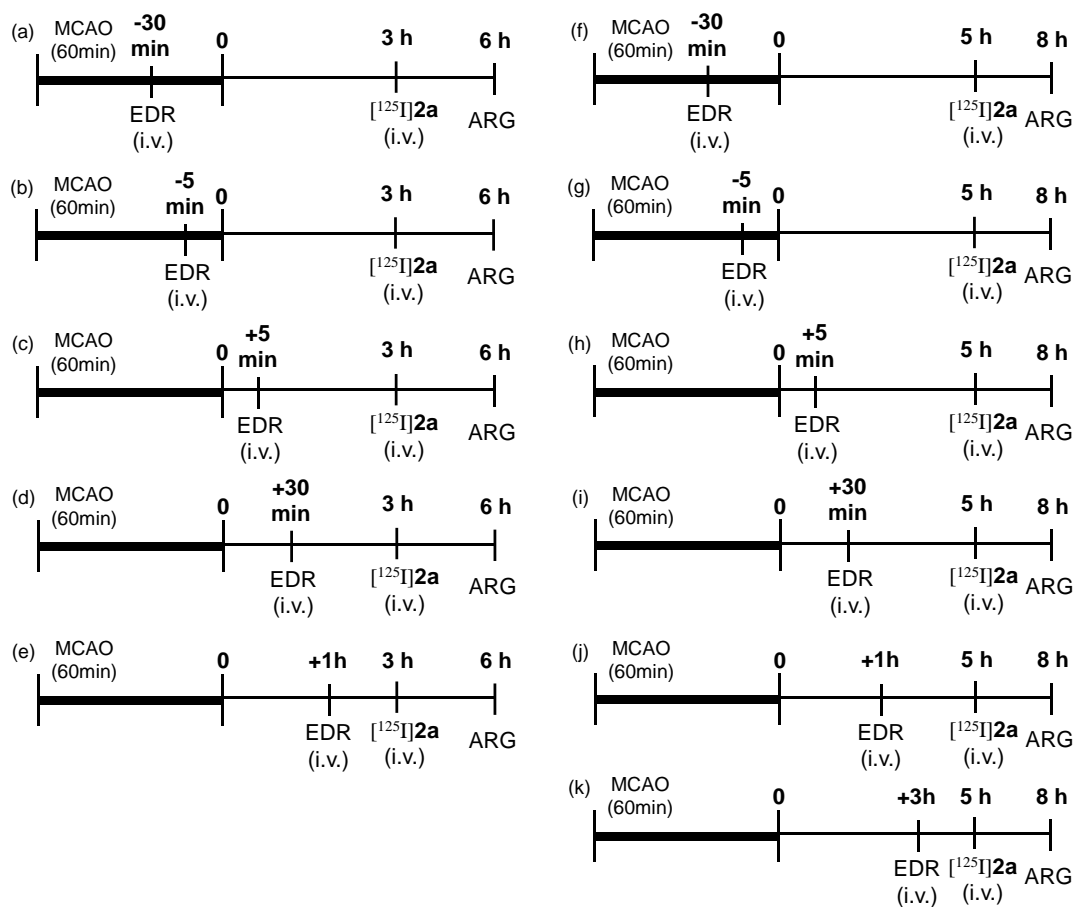


**Fig. 3-7** Structural analysis of lipid radical 5 h after tMCAO. (a) HRMS spectra observed at different t<sub>R</sub> in ischemic hemisphere of the brain for tMCAO mice. 527.2129 (C<sub>5</sub>H<sub>9</sub>, t<sub>R</sub>: 26.7 min), 557.2235 (C<sub>6</sub>H<sub>11</sub>O, t<sub>R</sub>:7.2 min), 597.2184 (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>: 26.6 min), 621.2548 (C<sub>11</sub>H<sub>15</sub>O, t<sub>R</sub>:8.0 min), 623.2704 (C<sub>11</sub>H<sub>17</sub>O, t<sub>R</sub>:27.4 min), 625.2497 (C<sub>10</sub>H<sub>15</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:24.4 min), 631.2602 (C<sub>9</sub>H<sub>17</sub>O<sub>3</sub>, t<sub>R</sub>:28.2 min), 637.2861 (C<sub>12</sub>H<sub>19</sub>O, t<sub>R</sub>:21.4 min), 641.2810 (C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:22.0 min), 647.2704 (C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>O, t<sub>R</sub>:8.3 min), 731.3279 (C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:22.8 min), 737.3749 (C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:12.6 min), 749.3385 (C<sub>18</sub>H<sub>27</sub>O<sub>3</sub>, t<sub>R</sub>:25.5 min). (b) HRMS spectra observed at different t<sub>R</sub> in non-ischemic hemisphere of the brain for tMCAO mice 531.1714 (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:15.9 min), 581.2235 (C<sub>8</sub>H<sub>11</sub>O, t<sub>R</sub>:26.8 min), 681.3123 (C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:28.1 min), 737.3749 (C<sub>18</sub>H<sub>31</sub>O<sub>2</sub>, t<sub>R</sub>:12.5 min).

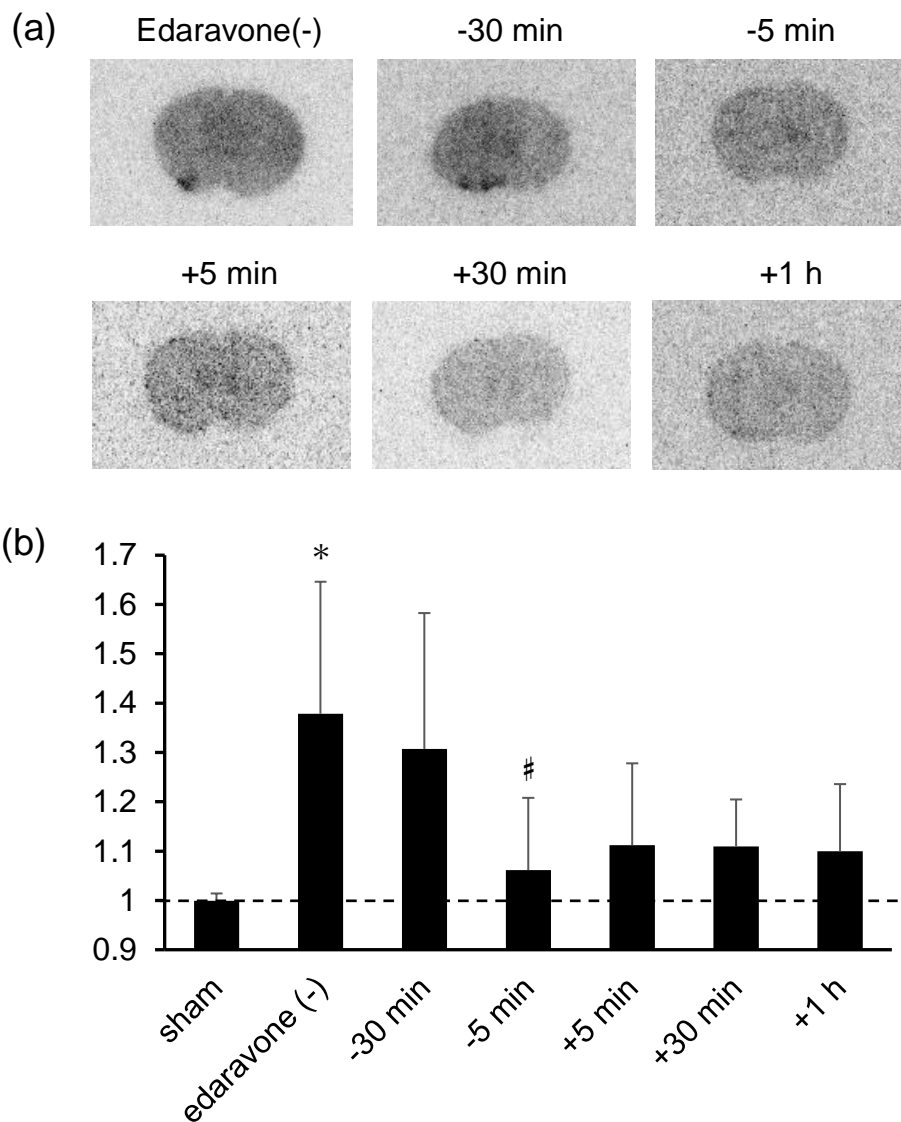
### 3-2-4 エダラボン投与後の脳内放射能分布評価; bregma +0.5 mm

エダラボンは脳梗塞後の脳保護薬として 2001 年に認可されており、再灌流により発生したフリーラジカルを消去し脂質過酸化を抑制することで脳保護効果を示すと考えられている。そこで、エダラボン投与により脳内における脂質ラジカルの分布がどのように変化するかを評価するため、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を用いて集積性評価を行った。**3-2-2**より、bregma から+0.5 mm に位置する脳では再灌流の 3、5 時間後において虚血側と非虚血側で放射能集積に差が見られたことから、bregma から+0.5 mm の位置における評価を行った。中大脳動脈を 1 時間虚血し、再灌流の 30 分、5 分前、5 分、30 分、1 時間、3 時間後にエダラボンを静脈内投与 (3 mg/kg) した。エダラボンの投与方法及び投与量は、Watanabe らの方法[82,83]を参考に、3mg/kg を静脈内投与した。化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ は再灌流の 3、5 時間後に投与し、投与から 3 時間後に脳を摘出した後、凍結切片を作製して ARG により放射能分布を評価した (Fig. 3-8)。関心領域は、**3-2-2**と同様の面積値を用いて、嗅結節付近の集積部位を設定した。

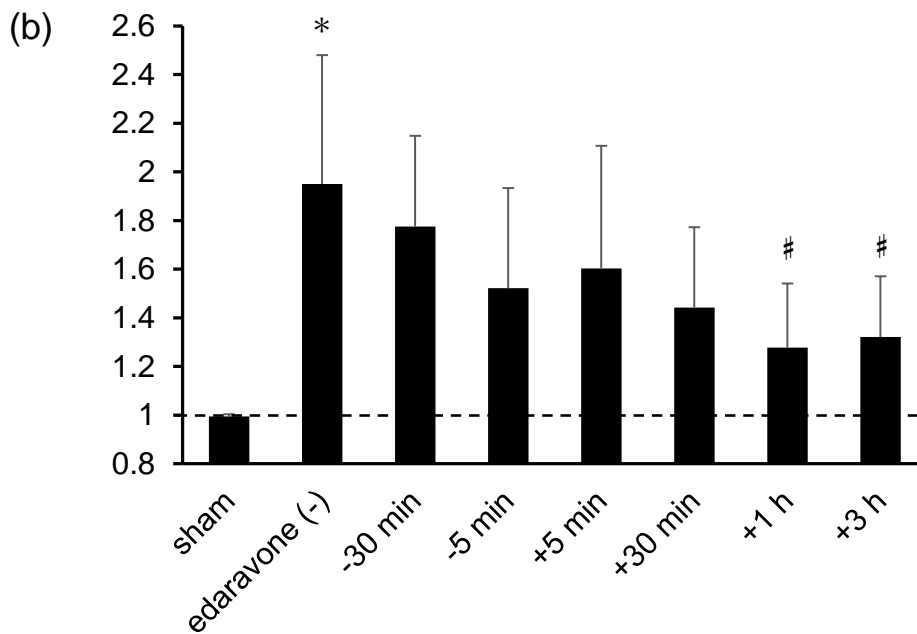
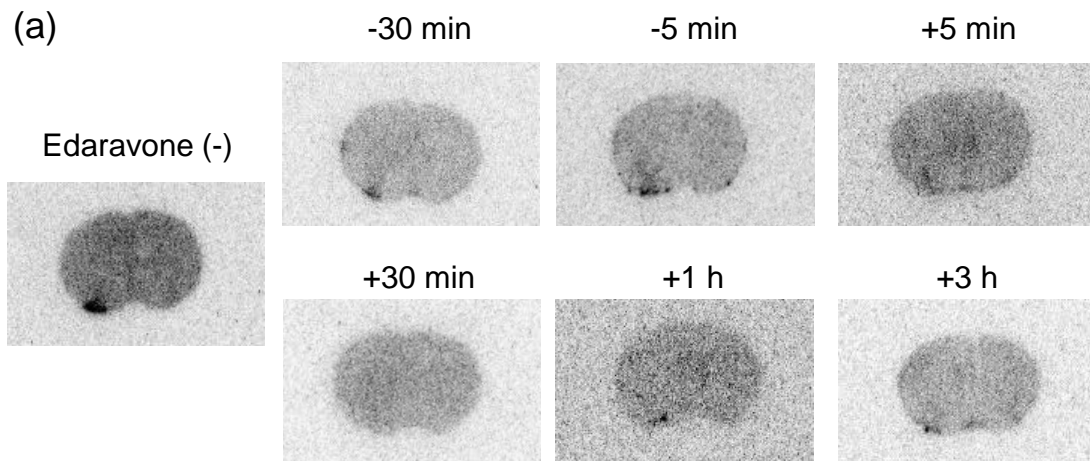
再灌流の 3 時間後に化合物を投与すると (Fig. 3-9)、再灌流の 30 分前にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と比べて集積に差は見られなかった。一方、再灌流の 5 分前にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と比較して $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ の放射能集積が有意に減少し、さらに再灌流の 5 分、30 分、1 時間後にエダラボン投与した群においても、有意差は見られなかったものの放射能集積が抑制する傾向が確認された。また、再灌流の 5 時間後に化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を投与すると (Fig. 3-10)、再灌流の 30 分、5 分前、5 分、30 分後にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と比較して放射能集積に有意な差は見られなかったが、再灌流の 1 時間、3 時間後にエダラボンを投与した群では、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ の放射能集積が有意に減少した。以上より、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$ を用いることで、エダラボンの投与により bregma から+0.5 mm の位置における脂質ラジカルの産生を抑制できること、および、その作用は投与タイミングにより変化することを示した。



**Fig. 3-8** Schematic diagram of the experimental protocol. The compound  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  was administered at 3 h or 5 h after tMCAO (60 min), and edaravone was injected at each time ((a, f) before 30 min (b, g) before 5 min (c, h) after 5 min (d, i) after 30 min (e, j) after 1 h (k) after 3 h) and imaging assessment using ARG was performed. Edaravone; EDR.



**Fig. 3-9** Evaluation of radioactivity accumulation with coronal brain section from bregma +0.5 mm in edaravone-treated tMCAO mice 3 h after reperfusion. Edaravone was injected at each time (before 30 min (-30 min), before 5 min (-5 min), after 5 min (+5 min), after 30 min (+30 min) and after 1 h (+1 h)) of reperfusion in tMCAO mice. (a) Representative ARG images of [<sup>125</sup>I]**2a** distribution. (b) Quantitation of the ratio of radioactivity between the ischemic and the non-ischemic side. \* $p < 0.05$  vs sham, # $p < 0.05$  vs edaravone (-).

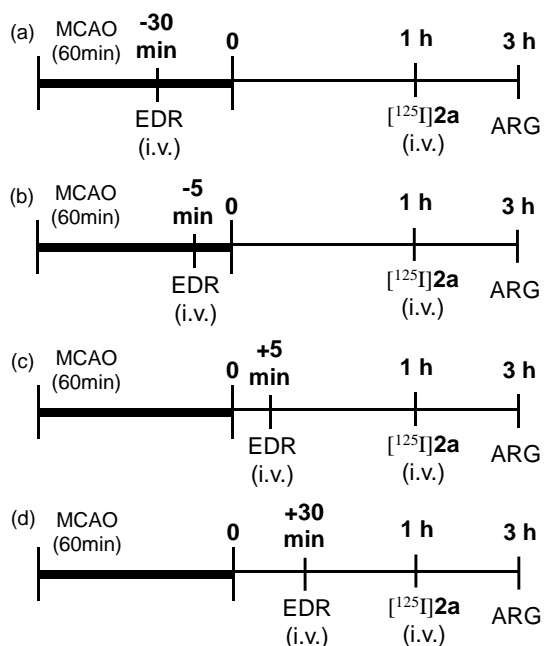


**Fig. 3-10** Evaluation of radioactive accumulation with coronal brain section from bregma +0.5 mm in edaravone-treated tMCAO mice 5 h after reperfusion. Edaravone was injected at each time (before 30 min (-30 min), before 5 min (-5 min), after 5 min (+5 min), after 30 min (+30 min), after 1 h (+1 h) and after 3 h (+3 h)) of reperfusion in tMCAO mice. (a) Representative ARG images of [<sup>125</sup>I]**2a** distribution. (b) Quantitation of the ratio of radioactivity between the ischemic and the non-ischemic side. \* $p < 0.01$  vs sham, # $p < 0.05$  vs edaravone (-).

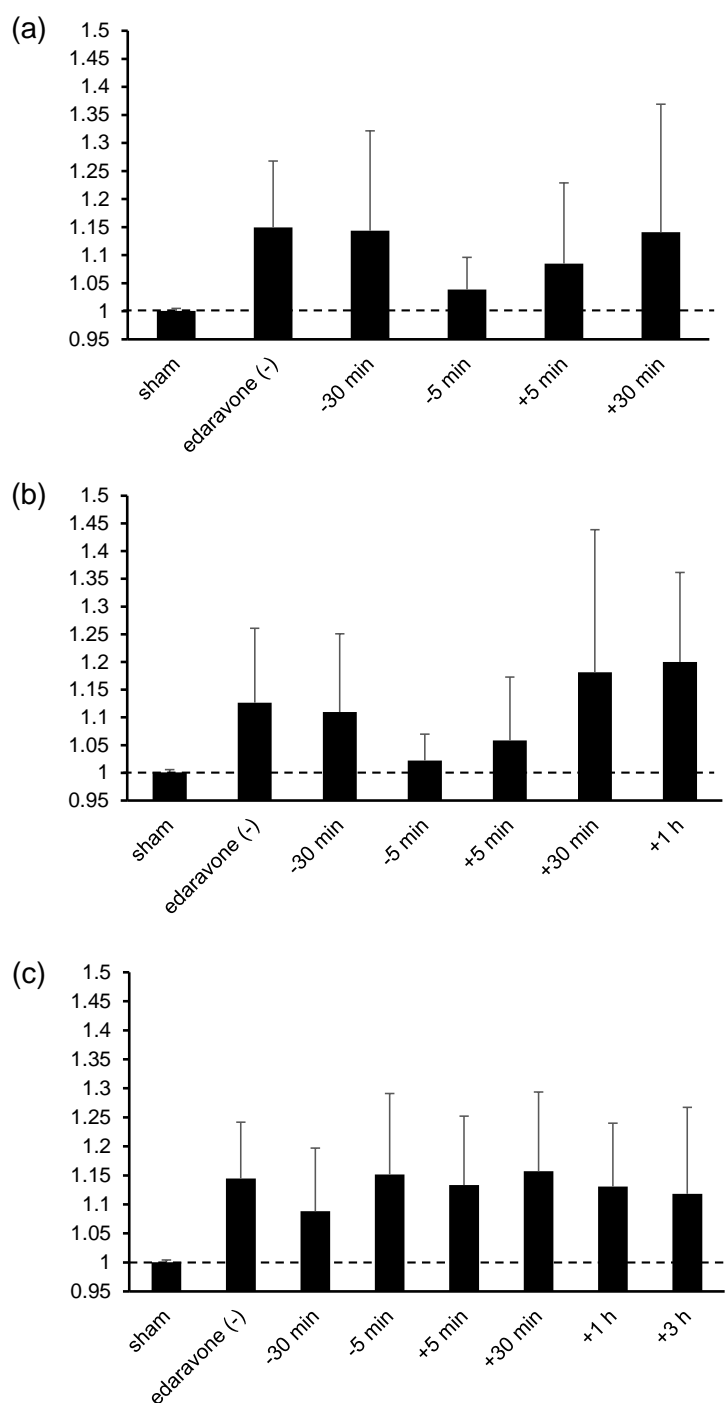


### 3-2-5 エダラボン投与後の脳内放射能分布評価; bregma -1.4 mm

**3-2-4** では、bregma から+0.5 mm に位置する脳でのエダラボン投与時における放射能分布を評価した。一方、**3-2-2** の結果から、bregma から-1.4 mm に位置する脳においても再灌流の 1、3、5 時間後に虚血側と非虚血側で放射能集積に差が見られたことから、化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  を用いてエダラボン投与時の bregma から-1.4 mm の位置における集積性評価を行った。**3-2-4** と同様の方法で tMCAO マウスの作製及びエダラボンを投与し、ARG により放射能分布を評価した。化合物 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  は再灌流の 1、3、5 時間後に投与した (Fig. 3-8, Fig. 3-11)。再灌流の 1、3 時間後に化合物を投与すると (Fig. 3-12(a)(b))、再灌流の 5 分前、5 分後にエダラボンを投与した群において、エダラボン非投与群と比較して $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  の放射能集積が抑制される傾向が示されたが、有意な差は見られなかった。また、再灌流の 30 分前、30 分、1 時間後にエダラボンを投与した群では、エダラボン非投与群と同程度の集積を示した。さらに、再灌流の 5 時間後に化合物を投与した場合には (Fig. 3-12(c))、エダラボンの投与タイミングにかかわらず、エダラボン非投与群との間に有意な放射能集積の差は見られず、同程度の集積を示した。



**Fig. 3-11** Schematic diagram of the experimental protocol. The compound  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  was administered at 1 h after tMCAO (60 min), and edaravone was injected at each time ((a) before 30 min (b) before 5 min (c) after 5 min (d) after 30 min) and imaging assessment using ARG was performed. Edaravone; EDR.



**Fig. 3-12** Quantitation of the ratio of radioactivity with coronal brain section from bregma  $-1.4$  mm on the ischemic to the non-ischemic side in edaravone-treated tMCAO mice. Edaravone was injected at each time (before 30 min (-30 min), before 5 min (-5 min), after 5 min (+5 min), after 30 min (+30 min), after 1 h (+1 h) and after 3 h (+3 h) of reperfusion in tMCAO mice. Compound [ $^{125}$ I]**2a** was injected (a) 1 h, (b) 3 h and (c) 5 h after reperfusion.

### 3-3 考察

脳虚血再灌流後には脳内の脂質過酸化反応が亢進し過酸化物質が増加することが報告されているが[84–87]、これらの過酸化物質の最上流に位置する脂質ラジカルがいつ、どの部位で発生しているかを捉えた例はない。本章では、脳虚血再灌流後に発生する脂質ラジカルの脳内挙動を追跡することを目的として、化合物<sup>[125I]</sup>2a を用いて tMCAO マウスにおける放射能分布評価を行った。Ex vivo ARG の結果より、脳虚血再灌流後では、脳の位置によって脂質ラジカルの生成タイミングが異なること示された (Fig. 3-4, 3-5)。また、メトキシアミン体<sup>[125I]</sup>3a や sham 群では虚血側で有意な放射能集積が見られないことから、ニトロキシドラジカルが虚血側で脂質ラジカルを捕捉し滞留していると考えられた。Fig. 3-1、Fig. 3-2 の結果より、組織の壊死および血液脳関門の損傷は再灌流の直後に生じるのではなく緩やかに進行することが示されたことから、これらの障害が生じるより前の早期の段階で発生した脂質ラジカルを化合物<sup>[125I]</sup>2a により検出できたと考えられる。

生体内の多くの不飽和脂肪酸はリン脂質やコレステロールと複合体を形成しており、炎症が起こると、ホスホリパーゼ A<sub>2</sub> の作用によりリン脂質から不飽和脂肪酸であるアラキドン酸が遊離し、プロスタグランジンやロイコトリエンを産生する。虚血再灌流時にはホスホリパーゼ A<sub>2</sub> が活性化することが知られており[88–90]、正常時と比較して多くの遊離脂肪酸が生成する。LC/MS 分析において、再灌流 1 時間後および 5 時間後における虚血側の脳半球を比較すると (Fig. 3-6, 3-7)、5 時間後の方が多くの脂質ラジカル付加体が検出されたことから、虚血再灌流により遊離脂肪酸が増加し、多くの脂質ラジカル付加体が検出されたと考えられる。本研究では遊離脂肪酸としての脂質ラジカル付加体を LC/MS により解析したが、リン脂質やコレステロールとの複合体として生成した脂質ラジカル付加体も存在していると考えられる。今後、さらに脂質抽出等の条件を検討し LC/MS による解析を進めることで、リン脂質複合体としての脂質ラジカルやコレステロール複合体として生成した脂質ラジカルの構造を同定することも可能であると考えられる。

エダラボン投与後の脳内放射能分布評価において、bregma から +0.5 mm の位置におけるエダラボンの投与タイミングを比較すると (Fig. 3-9, 3-10)、再灌流からの時間が経過するにつれて放射能集積が抑制される傾向が見られたことから、脂質ラジカルの生成は再灌流後すぐに起こるのではなく、緩徐に進行する可能性が考えられた。一方、

bregma から-1.4 mm の位置の脳では (Fig. 3-12) 、再灌流の 5 分前、5 分後にエダラボンを投与することで再灌流により生成した脂質ラジカルを一時的に消去できる可能性があるが、その作用は持続しない可能性が示された。また、再灌流の 30 分、1 時間、3 時間後にエダラボンを投与しても放射能集積の低下が見られなかったことから、エダラボンが再灌流の 5 分後以降に生成した脂質ラジカルに対して消去作用を示さないことが示唆された。LC/MS 解析にて、再灌流後に生じる脂質ラジカル分子が時間によって変化するという結果が得られたことを考慮すると、エダラボンはすべての脂質ラジカル分子を消去できるのではなく、消去可能な脂質ラジカル分子には限りがあることが考えられた。つまり、エダラボンは脳内のすべての部位で脂質ラジカルを抑制するのではなく、消去能を発揮する部位および脂質ラジカル分子には特異性がある可能性が考えられる。エダラボンは、フリーラジカル消去により脂質過酸化を抑制し、脳梗塞後の神経症候改善効果が得られたとする報告はあるものの[72,77,78]、実際にはエダラボンによる効果はかなり限局的であり、劇的に症状が改善することはない。本研究で得られた結果からも、エダラボンによる脂質過酸化抑制作用には限界があることが示された。

以上より、本研究で開発した放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物 **2a** が脳虚血再灌流後に発生した脂質ラジカルを捉えるプローブとして機能することが示された。今後、脳再灌流後に発生したフリーラジカルおよび脂質ラジカルを消去する更なる薬剤の開発が求められるが、本化合物を利用することでその効果判定や投与タイミングの検討に繋げることができると考えられる。さらに、本研究により得られた知見を基に、今後部位特異的に薬剤送達を行うなど新たな治療戦略を立案できるのではないかと期待される。

## 総括

本研究では、脂質過酸化反応の起点である脂質ラジカルの生体内での挙動を非侵襲的に追跡する手法の開発を目的に、(1) ニトロキシドを母体化合物とした放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析、(2) 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価、(3) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける脂質ラジカルの追跡、について検討し、以下の知見を得た。

### (1) ニトロキシドを母体化合物とした放射性ヨウ素標識脂質アルキルラジカル検出プローブの合成と構造解析

新規脂質ラジカル検出プローブとして、脂質ラジカルの捕捉能を有するニトロキシド化合物と、高感度に検出可能な核医学イメージング技術に着目した。そこで、誘導体が容易な TEMPO 型ニトロキシドを用い、TEMPO 型ニトロキシドの 4 位に *p*-ヨードベンズアミドを導入した化合物 **1** および側鎖にペンチル基を有する化合物 **2a**、**2b** を設計・合成し、放射性ヨウ素標識を行った。化合物 **2a**、**2b** は、TEMPO 型ニトロキシドの 2 位と 4 位に異なる置換基を導入した立体異性体として得たが、結晶化が困難であったため、X 線結晶構造解析による立体配置の同定が困難であった。そこで、側鎖にエチル基を有する **9a**、**9b** を合成し X 線結晶構造解析を行うことで、**9a** と **2a** が 2R\*4R\*、**9b** と **2b** が 2R\*4S\*であると立体配置を推定した。アスコルビン酸に対する還元反応性評価を行うと、ペンチル基を有する **2a**、**2b** はメチル基を有する **1** よりも二次反応速度定数が小さく、還元されにくいことが示された。さらに、立体異性体である **2a**、**2b** は、**2b** より **2a** の方が還元されにくいことが示された。そこで、2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体の立体異性による反応性の違いを精査するため、2,4 位の置換基が異なるニトロキシド誘導体を設計・合成し、アスコルビン酸との還元反応性を評価した。2,4 位のどちらにも嵩高い置換基が結合した化合物 **2** では、立体異性による還元反応性に違いが見られた一方で、2,4 位の片側のみが嵩高い化合物 **9** 及び **10** では立体異性による反応性に違いが見られなかった。また、アミノ基を有する化合物 **6** では、立体異性によって反応性に差が見られた。そのため、2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド誘導体の反応性には立体構造と電荷が関係すると考えられた。さらに、*in vivo* ESR により、マウス脳内における **2a** の還元反応速度定数が **2b** よりも優位に低いことが示された。

以上の結果から、生体内で還元されにくい 2,4 位ジ置換 TEMPO 型ニトロキシド化合物 **2a** の合成に成功した。

## (2) 放射性ヨウ素標識ニトロキシド化合物の生体内脂質ラジカル検出プローブとしての基礎的評価

第 2 章では、開発した脂質ラジカル検出プローブの生体内への応用に向けた基礎的評価を行った。化合物 **2a** を用いた反応選択性評価では、**2a** が活性酸素とは反応せず、脂質ラジカル選択的に反応することが示された。また、アラキドン酸由来脂質ラジカルと化合物 **2a** を反応させ LC/MS 分析を行うと、複数の脂質ラジカル付加体の分子イオンピークが検出された。そのため、脂質ラジカルと **2a** が反応することで、複数の脂質ラジカル付加体が生成することが確認された。細胞集積性評価では、脂質ラジカル産生を誘発しない細胞と比較して脂質ラジカル産生を誘発した細胞で化合物<sup>[125I]</sup>**2a** が有意に高く集積した一方で、ニトロキシドをメチル化し脂質ラジカルとの反応性を消失させたメトキシアミン体<sup>[125I]</sup>**3a** では、脂質ラジカル産生を誘発した細胞と誘発しない細胞で同程度の集積を示した。正常マウスに<sup>[125I]</sup>**2a** を静脈内投与し体内動態を評価すると、甲状腺への放射能集積は 0.1%dose 以下と低く、*p*-ヨードベンズアミドに導入された放射性ヨウ素は脱離せず、生体内の脱ヨウ素に対する安定性が高いことが示唆された。さらに、四塩化炭素により誘発した脂質過酸化亢進モデルマウスを用いた生体内放射能分布評価では、脂質過酸化が起こるとされる脾臓、膵臓、腎臓、肝臓、肺などの臓器において、メトキシアミン体<sup>[125I]</sup>**3a** と比較してニトロキシド誘導体<sup>[125I]</sup>**2a** で有意に高く集積した。以上より、化合物<sup>[125I]</sup>**2a** が生体内の脂質ラジカルを非侵襲的に検出可能な放射性プローブとして機能する可能性を示した。

## (3) 一過性中大脳動脈閉塞モデルマウスにおける脂質ラジカルの追跡

第 3 章では、脳虚血再灌流後に発生する脂質ラジカルの脳内挙動を追跡することを目的として、化合物<sup>[125I]</sup>**2a** を用いて tMCAO モデルマウスにおける放射能分布評価を行った。tMCAO (1 時間虚血) マウスに化合物<sup>[125I]</sup>**2a** を投与すると、Bregma から-1.4 mm に位置する脳と Bregma から+0.5 mm に位置する脳では、虚血側で有意な放射能集積が見られる時間や部位が異なっており、脳虚血再灌流後の脂質ラジカルの生成は部位や時間により変化する可能性が示された。また、LC/MS を用いて tMCAO マウスの再灌流後に生じた脂質ラジカルと化合物 **2a** との反応物解析を行うと、様々な脂質ラジカル付加体と考えられるピークが確認され、化合物 **2a** が脳内で生じた脂質ラジカルを捕捉して

いることが示された。フリーラジカル消去作用を示し脂質過酸化を抑制するエダラボンを tMCAO マウスに投与し、化合物<sup>[125I]</sup>2a により放射能分布評価を行うと、Bregma から+0.5 mm に位置する脳では再灌流の 1、3 時間後にエダラボンを投与すると有意に集積が抑制された。一方で、Bregma から-1.4 mm に位置する脳では、エダラボンの投与タイミングに関わらず、非投与群と同程度の放射能集積を示した。以上より、化合物<sup>[125I]</sup>2a を用いることにより虚血再灌流後の脳内で発生する脂質ラジカルを追跡可能であることを示した。

以上、本研究で開発した放射性ヨウ素標識 TEMPO 型ニトロキシド化合物<sup>[125I]</sup>2a を応用すれば、従来の手法では困難であった、生体内の脂質ラジカルを非侵襲的に可視化することや分子種の同定が可能となり、酸化ストレス疾患の発症や進展に関わる脂質ラジカルや脂質過酸化反応の役割を明確にできると強く確信している。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に対し、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました本学薬品物理化学講座教授・向高弘先生に深く感謝の意を表します。

本研究論文の審査にあたり、有益な御助言と御指導を賜りました本学薬品化学講座教授・上田昌史先生、薬理学講座教授・小山豊先生に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、研究内容への適切な御助言・御教示を賜りました本学薬品物理化学講座准教授・佐野紘平先生、本学薬品物理化学講座講師・山崎俊栄先生、金沢大学臨床分析科学研究室助教・宗兼将之先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、有益なる御助言と深い御理解を頂きました本学放射線管理室准教授・安岡由美先生に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多大な御協力を頂きました九州大学大学院薬学研究院創薬科学部門生体分子情報学講座教授・山田健一先生、北海道医療大学医療技術学部講師・江本美穂先生、北海道医療大学先端研究推進センター客員教授・藤井博匡先生、大阪大学大学院基礎工学研究科准教授・赤羽英夫先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり討論に参加して頂きました本学薬品物理化学講座 甘中健登博士、田中寿枝博士、原武芳江博士をはじめとする薬品物理化学講座の諸氏に感謝致します。

令和4年度からの2年間にわたり公益社団法人 日本薬学会長井記念薬学研究奨励事業によるご援助を賜りましたので、ここに深謝の意を表します。

最後に、これまでの研究生活を支え、励まし続けてくれた家族に心から感謝致します。



## 実験の部

### 研究全般に関する項目

本研究に用いた主要な試薬、機器等について以下に一括する。動物実験は、神戸薬科大学動物実験委員会の承認（承認番号：2017-007、2018-034、2019-026、2020-061、2021-042、2022-042、2023-002）を得たのち、神戸薬科大学動物実験実施規定を遵守し、動物に不必要な苦痛を与えぬよう十分に配慮して行った。

### 試薬・使用動物・機器

4-Iodobenzoic acid、 $(\text{SnBu}_3)_2$ 、*n*-octanol、ヘキサナールは、東京化成工業社から購入した。PhNHNH<sub>2</sub>、DMT-MM、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>、Fmoc-Osu、Sodium hydrogen carbonate、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、Tween80、アスコルビン酸ナトリウム、PEG400、プロピレングリコール（PG）、FeSO<sub>4</sub>、次亜塩素酸ナトリウム、*tert*-butanol、塩化銅（I）、アラキジン酸、四塩化炭素、オリーブ油、イソフルラン、TTC、エバンスブルー、トリクロロ酢酸、エダラボン（5-methyl-2-phenyl-2,4-dihydro-3*H*-pyrazol-3-one）、その他合成に用いた有機溶媒は、富士フィルム和光純薬社から購入した。ピペリジンは、渡辺化学工業社から購入した。PBS(-)、NCS、DMEM、アラキドン酸、ヒポキサンチン、キサンチンオキシダーゼは、ナカライテスク社から購入した。生理食塩水は大塚製薬工場社から購入した。LOXは、Sigma-Aldrich社から購入した。Na<sup>125</sup>Iは、PerkinElmer社から購入した。

ddY マウス及び C57BL/6N マウスは、日本 SLC 社から購入した。マウスは、25±2°C の温度、気圧、および制御された照明（12 時間の明暗スケジュール）を備えた認定動物飼育施設で飼育した。

ヒト肝がん細胞 HepG2 細胞株は、理化学研究所より購入した。

中圧分取液体クロマトグラフィーには、山善社製の自動設定中圧分取液体クロマトグラフィシステム（YFLC AI-580）を使用し、Purif-Pack-EX（充填材：シリカゲル SiOH、粒子径：50 μm、カラムサイズ：M-4 L）を装着した。核磁気共鳴（nuclear magnetic resonance; NMR）測定には、Agilent Technologies 社製の Varian Mercury 300 を用い、重水素化溶媒中の残留溶媒を内標準物質として測定した。エレクトロスプレーイオン化高分解能質量分析（electrospray ionization high-resolution mass spectrometry; ESI-HRMS）には、Thermo Fisher Scientific 社製の Thermo Scientific Exactive を使用した。X-band ESR スペクトルは、ADANI 社製の SPINSCAN X 及び JEOL 社製の JES-FA100 を使用した。

ESR イメージングは、デジタルコンソール、電圧制御マルチループギャップ共振器、永久磁石、およびコイルへの電源から構成される特注の 750 MHz 連続波 3 次元 (3D) ESR イメージング装置[91-93]を用いて取得した。ESR データの取得と画像再構成は、どちらも National Instruments 社の LabVIEW ソフトウェアのカスタムプログラムを用いて行った。マウス頭部の解剖学的画像は、0.5 T の永久磁石を備えた MR テクノロジー社の MRmini スキャナーを用いて得た。

放射能の測定には、PerkinElmer 社製の Wizard 1480 および TopCount NXT、Aloka 社製の CURIEMETER IGC-3 を用いた。遠心分離機は、日立製作所社製の Himac CF7D2 を用いた。X 線結晶構造解析は愛媛大学学術支援センター (ADRES) 物質科学部門の Rigaku VariMax SaturnCCD724/ $\alpha$  にて測定した。逆相 HPLC には、日本分光社製の UV 検出器 UV-2075、ポンプ PU-2089 を使用し、ナカライテスク社の Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR-II column 4.6 mmI.D.×250 mm を装着した。LC/MS には、Waters 社の ACQUITY QDa および Thermo Fisher Scientific 社の LTQ-orbitrap discovery mass spectrometer を使用した。プレートリーダーには、Thermo Fisher Scientific 社の MULTISKAN FC を使用した。オートラジオグラムは、GE Healthcare 社製の Typhoon FLA 7000Imager により取得し、画像解析には Image J を使用した。7-0 ナイロン糸 (7022910 PK5Re) は、Docol Corporation から購入した。統計解析ソフトは、GraphPad Software 社の GraphPad Prism 6 を使用した。

## 第 1 章

### 【1】 4-(4-Iodobenzamido)-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (1) の合成

化合物 **4** (0.50 g, 2.9 mmol) を THF (3 mL) に溶解し, 4-iodobenzoic acid (0.72 g, 2.9 mmol) 及び DMT-MM (1.22 g, 4.4 mmol) を加え室温で 1.5 時間攪拌した。水を加え、EtOAc で抽出後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水、減圧留去し、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 2: 1 (R<sub>f</sub>: 0.23)) で精製し、橙色の固体である化合物 **1** を収量 0.92 g、収率 79% で得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> with PhNHNH<sub>2</sub>): δ (ppm) 1.45 (s, 6 H), 1.56 (s, 6 H), 2.02 - 2.14 (m, 2 H), 2.14 - 2.33 (m, 2 H), 4.41 - 4.74 (m, 1 H), 6.43 (d, *J*=7.6 Hz, 1 H), 7.50 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H), 7.78 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H). ESR (DMSO): *g* = 2.0060, *a<sub>N</sub>* = 1.549 mT (triplet). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>IN<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub><sup>+</sup> 424.0618; Found 424.0622.

### 【2】 2,2,6,6-Tetramethyl-4-(4-(tributylstannyl)benzamido)piperidine-1-oxyl (5) の合成

化合物 **1** (0.20 g, 0.5 mmol) を toluene (超脱水、5 mL) に溶解し, Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (29 mg, 25 μmol) を加え、攪拌しながら 5 分間 Ar バブリングを行った。その後、(SnBu<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (0.50 mL, 1.0 mmol) を加え 100°C で 24 時間還流した。反応液を室温に戻し、減圧留去後、中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 3: 1 (R<sub>f</sub>: 0.38)) で精製し、橙色の固体である化合物 **6** を収量 145 mg、収率 51% で得た。<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> with PhNHNH<sub>2</sub>): δ (ppm) 0.88 (t, *J*=7.2 Hz, 9 H), 1.02 - 1.13 (m, 6 H), 1.27 - 1.39 (m, 6 H), 1.47 - 1.59 (m, 6 H), 1.49 (s, 6 H), 1.63 (s, 6 H), 2.05 - 2.18 (m, 2 H), 2.20 - 2.43 (m, 2 H), 4.50 - 4.69 (m, 1 H), 6.25 (d, *J*=8.1 Hz, 1 H), 7.54 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H), 7.67 (d, *J*=8.0 Hz, 2 H). ESR (DMSO): *g* = 2.0060, *a<sub>N</sub>* = 1.572 mT (triplet). HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>28</sub>H<sub>49</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub>Sn<sup>+</sup> 588.2708; Found 588.2711.

### 【3】 4-(4-Iodobenzamido)-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidine-1-oxyl (2a / 2b) の合成

化合物 **2** は、化合物 **1** と同様の方法で合成した。化合物 **6** (0.89 g, 3.89 mmol)、THF (10 mL)、4-iodobenzoic acid (0.97 g, 3.9 mmol)、DMT-MM (1.62 g, 5.9 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 1: 2 (R<sub>f</sub> = 0.35)) で精製し、化合物 **2a** を収量 0.16 g、収率 9%、化合物 **2b** を収量 0.69 g、収率 39% で得た。化合物 **2a**: 橙色の固体; HRMS (ESI/Q-TOF) *m/z*: [M+Na]<sup>+</sup> calculated for C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>IN<sub>2</sub>NaO<sub>2</sub><sup>+</sup> 480.1250, found 480.1249; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> with PhNHNH<sub>2</sub>): δ (ppm) 0.85 (t, *J*=6.5 Hz, 3 H),

1.25 (m, 7 H), 1.48 (s, 3 H), 1.67 (s, 3 H), 1.95 - 2.34 (m, 6 H), 2.40 - 2.56 (m, 2 H), 4.59 (br. s., 1 H), 6.50 (d,  $J=7.6$  Hz, 1 H), 7.50 (d,  $J=8.4$  Hz, 2 H), 7.79 (d,  $J=8.2$  Hz, 2 H); ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ,  $a_N = 1.528$  mT (triplet). 化合物 **2b**: 橙色の固体; HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  calculated for  $C_{20}H_{30}IN_2NaO_2^+$  480.1250, found 480.1251;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  with  $PhNHNH_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.93 (t,  $J=6.6$  Hz, 3 H), 1.24 - 1.40 (m, 7 H), 1.66 (s, 3 H), 1.68 (s, 3 H), 1.78 - 1.94 (m, 2 H), 2.03 - 2.20 (m, 2 H), 2.24 - 2.33 (m, 2 H), 2.37 - 2.53 (m, 2 H), 4.53 (br. s., 1 H), 6.54 (d,  $J=7.7$  Hz, 1 H), 7.51 (d,  $J=8.3$  Hz, 2 H), 7.78 (d,  $J=8.3$  Hz, 2 H); ESR (DMSO):  $g = 2.0061$ ,  $a_N = 1.585$  mT (triplet).

[4] 2,2,6-Trimethyl-6-pentyl-4-(4-(tributylstannyl)benzamido)piperidine-1-oxyl (7a) の合成

化合物 **7a** は、化合物 **5** と同様の方法で合成した。化合物 **2a** (30 mg, 66  $\mu$ mol)、toluene (超脱水、5 mL)、 $Pd(PPh_3)_4$  (3.8 mg, 3.3  $\mu$ mol)、 $(SnBu_3)_2$  (66  $\mu$ L, 0.13 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 1:2 ( $R_f$ : 0.60)) で精製し、橙色の固体である化合物 **7a** を収量 18 mg、収率 44% で合成した。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  calculated for  $C_{32}H_{59}N_2O_2Sn^+$  623.3593, found 623.3586;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  with  $PhNHNH_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.84 - 0.95 (m, 12 H), 1.02 - 1.13 (m, 6 H), 1.22 - 1.39 (m, 20 H), 1.48 (br. s., 3 H), 1.58 - 1.69 (m, 6 H), 1.98 - 2.47 (m, 4 H), 4.59 (br. s., 1 H), 6.16 - 6.43 (m, 1 H), 7.54 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.67 (d,  $J=7.8$  Hz, 2 H); ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ,  $a_N = 1.535$  mT (triplet).

[5] 2,2,6-Trimethyl-6-pentyl-4-(4-(tributylstannyl)benzamido)piperidine-1-oxyl (7b) の合成

化合物 **7b** は、化合物 **5** と同様の方法で合成した。化合物 **2b** (50 mg, 110  $\mu$ mol)、toluene (超脱水、5 mL)、 $Pd(PPh_3)_4$  (6.3 mg, 5.5  $\mu$ mol)、 $(SnBu_3)_2$  (110  $\mu$ L, 0.22 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 1:2 ( $R_f$ : 0.60)) で精製し、橙色の固体である化合物 **7b** を収量 35 mg、収率 51% で合成した。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  calculated for  $C_{32}H_{59}N_2O_2Sn^+$  623.3593, found 623.3584;  $^1H$  NMR (300 MHz,  $CDCl_3$  with  $PhNHNH_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.77 - 0.95 (m, 12 H), 1.02 - 1.12 (m, 6 H), 1.19 - 1.41 (m, 20 H), 1.46 - 1.54 (m, 3 H), 1.64 (br. s., 3 H), 1.69 (s, 3 H), 1.97 - 2.49 (m, 4 H), 4.55 (br. s., 1 H), 6.25 (d,  $J=7.1$  Hz, 1 H), 7.53 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H), 7.67 (d,  $J=7.7$  Hz, 2 H); ESR (DMSO):  $g = 2.0061$ ,  $a_N = 1.560$  mT (triplet).

【6】 *N*-(1-Methoxy-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide (**3a**) の合成

化合物 **2a** (50 mg, 110  $\mu$ mol) を DMSO (3 mL) に溶解し、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (61 mg, 220  $\mu$ mol) を加えた後、0 °C で攪拌しながら 30% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mL) を滴下し、室温で 30 分攪拌した。水を加え、EtOAc で抽出後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水、減圧留去し、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 2: 1 (R<sub>f</sub>: 0.37)) で精製し、白色の固体である化合物 **3a** を収量 10 mg、収率 19% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 473.1665, found 473.1657; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.85 (t, *J* = 6.8 Hz, 3 H), 1.07 (s, 3 H), 1.13 (br. s, 6 H), 1.18 - 1.51 (m, 10 H), 1.65 - 1.82 (m, 2 H), 3.53 (s, 3 H), 3.99 - 4.32 (m, 1 H), 6.57 (d, *J* = 7.7 Hz, 1 H), 7.45 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H), 7.66 (d, *J* = 8.4 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm 14.2, 19.0, 20.9, 22.8, 23.5, 32.6, 33.2, 41.7, 41.9, 43.8, 45.4, 60.0, 62.4, 65.2, 98.3, 128.7, 134.1, 137.6, 166.2.

【7】 *N*-(1-Methoxy-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide (**3b**) の合成

化合物 **3b** は、化合物 **3a** と同様の方法で合成した。化合物 **2b** (100 mg, 220  $\mu$ mol)、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O (122 mg, 440  $\mu$ mol)、30% (w/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1.5 mL)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 2: 1 (R<sub>f</sub> = 0.37)) で精製し、白色の固体である化合物 **3b** を収量 11 mg、収率 11% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>21</sub>H<sub>34</sub>IN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup> 473.1665, found 473.1657; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.86 (t, *J* = 6.5 Hz, 3 H), 1.16 (s, 3 H), 1.18 (s, 3 H), 1.21 (s, 3 H), 1.23 - 1.63 (m, 8 H), 1.63 - 2.19 (m, 4 H), 3.58 (s, 3 H), 4.11 - 4.27 (m, 1 H), 6.24 (br. s., 1 H), 7.43 (d, *J* = 8.3 Hz, 2 H), 7.68 (d, *J* = 8.0 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm 14.5, 21.6, 23.0, 25.9, 29.0, 33.0, 33.3, 33.6, 41.7, 42.2, 45.8, 59.9, 63.2, 65.6, 98.3, 128.4, 133.9, 137.4, 165.8.

【8】 *N*-(1-Methoxy-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-4-yl)-4-(tributylstannyl)benzamide (**8a**) の合成

化合物 **8a** は、化合物 **5** と同様の方法で合成した。化合物 **3a** (10 mg, 21  $\mu$ mol)、Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (1.3 mg, 1.1  $\mu$ mol)、(SnBu<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (24  $\mu$ L, 48  $\mu$ mol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 10: 1 (R<sub>f</sub> = 0.50)) で精製し、白色の固体である化合物 **8a** を収量 8 mg、収率 59% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>33</sub>H<sub>61</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>Sn<sup>+</sup> 637.3755, found 637.3747; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.84 - 0.91 (m, 12 H), 0.98 - 1.11 (m, 6 H), 1.14 (s, 3 H), 1.16 (s, 3 H), 1.18 (s, 3 H), 1.24 - 1.65 (m, 22 H), 1.80

(br. s., 2 H), 3.56 (s, 3 H), 4.17 - 4.42 (m, 1 H), 6.23 (br. s., 1 H), 7.49 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 7.70 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm 9.7, 13.7, 14.2, 19.1, 20.9, 22.8, 23.5, 27.4, 29.1, 32.7, 33.2, 41.5, 42.2, 43.9, 45.6, 60.1, 62.4, 65.1, 126.0, 134.1, 136.5, 147.1, 167.1.

**[9] *N*-(1-Methoxy-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-4-yl)-4-(tributylstannyl)benzamide (8b)**

の合成

化合物 **8b** は、化合物 **5** と同様の方法で合成した。化合物 **3b** (11 mg, 23  $\mu\text{mol}$ )、 $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$  (1.5 mg, 1.3  $\mu\text{mol}$ )、 $(\text{SnBu}_3)_2$  (24  $\mu\text{L}$ , 48 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 10: 1 ( $R_f = 0.50$ )) で精製し、白色の固体である化合物 **8b** を収量 9 mg、収率 61% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{33}\text{H}_{61}\text{O}_2\text{N}_2\text{Sn}^+$  637.3755, found 637.3749;  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.69 - 1.00 (m, 12 H), 1.00 - 1.16 (m, 6 H), 1.21 (s, 3 H), 1.22 (s, 3 H), 1.26 (s, 3 H), 1.27 - 1.72 (m, 20 H), 1.82 - 2.18 (m, 4 H), 3.61 (s, 3 H), 4.27 (dt,  $J = 7.6, 3.6$  Hz, 1 H), 5.93 (br. s., 1 H), 7.51 (d,  $J = 7.7$  Hz, 2 H), 7.66 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) ppm 10.0, 14.0, 14.5, 21.7, 23.1, 26.0, 27.6, 29.1, 29.3, 33.1, 33.3, 33.7, 41.5, 42.5, 46.1, 60.0, 63.3, 65.6, 125.7, 134.0, 136.4, 147.0, 166.8.

**[10] 2-Ethyl-4-(4-iodobenzamido)-2,6,6-trimethylpiperidine-1-oxyl (9a / 9b) の合成**

化合物 **9a** は、化合物 **1** と同様の方法で合成した。化合物 **11** (0.40 g, 2.16 mmol)、THF (10 mL)、4-iodobenzoic acid (0.54 g, 2.16 mmol)、DMT-MM (0.90 g, 3.74 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: diethyl ether = 1: 2 ( $R_f = 0.25$ )) で精製し、化合物 **9a** を収量 22 mg、収率 3%、化合物 **9b** を収量 250 mg、収率 28% で得た。化合物 **9a**: 橙色の泡状; HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}]^+$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{IN}_2\text{O}_2^+$  415.0883; found 415.0885. ESR (DMSO):  $g = 2.0061$ ;  $a_N = 1.55$  mT (triplet).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.86 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.27 (s., 3 H), 1.29 (s, 3 H), 1.36 (s, 3 H), 1.54 - 1.72 (m, 2 H), 1.88 - 2.07 (m, 4 H), 4.38 - 4.52 (m, 1 H), 7.49 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H), 7.79 (d,  $J = 8.5$  Hz, 2 H). 化合物 **9b**: 橙色の泡状; HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}]^+$  calculated for  $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{IN}_2\text{O}_2^+$  415.0883; found 415.0879. ESR (DMSO):  $g = 2.0061$ ;  $a_N = 1.52$  mT (triplet).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.94 (t,  $J = 7.5$  Hz, 3 H), 1.41 (br s, 3 H), 1.41 (br s, 3 H), 1.46 (s, 3 H), 1.73 - 2.11 (m, 4 H), 2.14 - 2.29 (m, 2 H), 4.27 - 4.51 (m, 1 H), 7.51 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H), 7.79 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2 H).

【11】 *N*-(2-Ethyl-1-methoxy-2,6,6-trimethylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide (12a) の合成

化合物 **12a** は、化合物 **3a** と同様の方法で合成した。化合物 **9a** (200 mg, 0.48 mmol)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (268 mg, 0.96 mmol)、30% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.8 mL)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 7: 1 ( $R_f$  = 0.48)) で精製し、白色の泡状化合物 **12a** を収量 113 mg、収率 55% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{IN}_2\text{O}_2^+$  431.1190; found 431.1187.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 0.84 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 3 H), 1.12 (s, 3 H) 1.18 (br s, 3 H), 1.19 (br s, 3 H), 1.27 - 1.44 (m, 2 H), 1.47 - 1.64 (m, 2 H), 1.70 - 1.87 (m, 2 H), 3.57 (s, 3 H), 4.10 - 4.40 (m, 1 H), 6.16 (d,  $J$  = 7.3 Hz, 1 H), 7.45 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 7.72 (d,  $J$  = 8.2 Hz, 6 H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10.4, 21.5, 24.9, 28.2, 29.9, 33.5, 41.6, 45.9, 60.0, 63.6, 65.7, 98.5, 128.6, 134.2, 137.9, 166.1.

【12】 *N*-(2-Ethyl-1-methoxy-2,6,6-trimethylpiperidin-4-yl)-4-iodobenzamide (12b) の合成

化合物 **12b** は、化合物 **3b** と同様の方法で合成した。化合物 **9b** (50 mg, 0.12 mmol)、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (67 mg, 0.24 mmol)、30% (w/v)  $\text{H}_2\text{O}_2$  (1.0 mL)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 7: 1 ( $R_f$  = 0.45)) で精製し、白色の泡状化合物 **12b** を収量 9 mg、収率 17% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{18}\text{H}_{28}\text{IN}_2\text{O}_2^+$  431.1190; found 431.1190.  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm): 0.88 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 3 H), 1.19 (br s, 3 H), 1.22 (br s, 3 H), 1.24 (br s, 3 H) 1.37 - 1.49 (m, 1 H), 1.63 - 1.78 (m, 2 H), 1.84 - 1.97 (m, 2 H), 2.06 (d,  $J$  = 12.9 Hz, 1 H), 3.62 (br s, 3 H), 4.07 - 4.34 (m, 1 H), 5.80 (br s, 1 H), 7.45 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H), 7.77 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 2 H).  $^{13}\text{C}$  NMR (151 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 10.3, 21.5, 25.0, 28.2, 29.9, 33.6, 41.6, 45.9, 60.0, 63.6, 65.7, 98.5, 128.6, 134.2, 137.9, 166.1.

【13】 4-(((9*H*-Fluoren-9-yl)methoxy)carbonyl)amino)-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidine-1-oxyl (13a / 13b) の合成

化合物 **6** (0.50 g, 2.20 mmol) を dioxane/water = 2:1 (4.8 mL) に溶解し、sodium hydrogen carbonate (0.14 g, 1.65 mmol) を加えた後、9-fluorenylmethyl-succinimidyl carbonate (Fmoc-OSu; 0.80 g, 2.31 mmol) を数回に分けて加え、室温で 1 時間攪拌した。水を加え、EtOAc で抽出後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水、減圧留去し、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 3: 1 ( $R_f$ : 0.38)) で精製し、化合物 **13a** を収量 203 mg、収率 21%、化合物 **13b** を収量 517 mg、収率 52% で得た。化合物 **13a**: 橙色の泡状; HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3^+$  450.28769; found 450.28792. ESR (DMSO):  $g$  =

2.0061;  $a_N = 1.55$  mT (triplet).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.88 (t,  $J = 6.8$  Hz, 3 H), 1.01 (d,  $J = 18.0$  Hz, 2 H), 1.17 - 1.42 (m, 6 H), 1.25 (s, 3 H), 1.31 (s, 3 H), 1.37 (s, 3 H), 1.42 - 1.79 (m, 4 H), 1.81 - 2.01 (m, 2 H), 4.18 - 4.25 (m, 1 H), 4.40 (d,  $J = 6.9$  Hz, 2 H), 4.63 - 4.76 (m, 1 H), 6.79 - 6.87 (m, 2 H), 7.28 - 7.35 (m, 2 H), 7.59 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H), 7.77 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H). 化合物 **13b**: 橙色の泡状; HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{28}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_3^+$  450.28769; found 450.28791. ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ;  $a_N = 1.52$  mT (triplet).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.89 (t,  $J = 6.6$  Hz, 3 H), 0.96 - 1.14 (m, 2 H), 1.26 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.35 (s, 3 H), 1.41 (d,  $J = 7.0$  Hz, 4 H), 1.57 - 1.84 (m, 2 H), 1.87 - 2.23 (m, 4 H), 4.17 - 4.25 (m, 1 H), 4.39 (d,  $J = 6.7$  Hz, 2 H), 4.78 (d,  $J = 7.0$  Hz, 1 H), 6.76 - 6.88 (m, 2 H), 7.28 - 7.35 (m, 2 H), 7.59 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H), 7.77 (d,  $J = 7.3$  Hz, 2 H).

#### 【14】 4-Amino-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-1-oxyl (6a) の合成

化合物 **13a** (122 mg, 0.27 mmol) を dichloromethane (5 mL) に溶解し、piperidine (1 mL) を加え室温で 4 時間攪拌した。減圧留去後、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィ (chloroform: MeOH = 9: 1 ( $R_f$ : 0.23)) で精製し、橙色の液体である化合物 **5a** を収量 39 mg、収率 63% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}^+$  228.21962; found 228.21962. ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ;  $a_N = 1.55$  mT (triplet).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.72 - 0.92 (m, 5 H), 1.23 (s, 3 H), 1.25 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.40 (br s, 2 H), 1.45 - 1.68 (m, 2 H), 1.72 - 1.91 (m, 2 H), 1.91 - 2.33 (m, 4 H), 4.05 - 4.27 (m, 1 H).

#### 【15】 4-Amino-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidin-1-oxyl (6b) の合成

化合物 **5b** は、化合物 **6a** と同様の方法で合成した。化合物 **13b** (247 mg, 0.55 mmol)、piperidine (1 mL)。中圧分取カラムクロマトグラフィ (chloroform: MeOH = 9: 1 ( $R_f$ : 0.23)) で精製し、橙色の液体である化合物 **5b** を収量 107 mg、収率 86% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{13}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}^+$  228.21962; found 228.21962. ESR (DMSO):  $g = 2.0059$ ;  $a_N = 1.54$  mT (triplet).  $^1\text{H NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.80 - 0.93 (m, 5 H), 1.25 (s, 3 H), 1.28 (s, 3 H), 1.33 (s, 3 H), 1.40 (br s, 2 H), 1.45 - 1.52 (m, 2 H), 1.55 (br s, 2 H), 1.90 - 2.12 (m, 2 H), 2.19 - 2.66 (m, 2 H), 4.02 - 4.32 (m, 1 H).



#### 【16】 4-Formamido-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidine-1-oxyl (10a) の合成

化合物 **6a** (20 mg, 88  $\mu$ mol) を THF (超脱水、0.1 mL) に溶解し、*N*-formylsaccharin (19 mg, 88  $\mu$ mol) を加え室温で 30 分間攪拌した。水を加え、chloroform で抽出後、 $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水、減圧留去し、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc = 1:1 ( $R_f$ : 0.20)) で精製し、赤色の液体である化合物 **10a** を収量 19 mg、収率 83% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$   $^+$  256.21453; found 256.21456. ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ;  $a_N = 1.56$  mT (triplet).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.72 - 0.96 (m, 5 H), 1.20 - 1.33 (m, 6 H), 1.37 (s, 3 H), 1.41 (s, 3 H), 1.54 (s, 3 H), 1.78 - 2.21 (m, 4 H), 4.40 (br s, 1 H).

#### 【17】 4-Formamido-2,2,6-trimethyl-6-pentylpiperidine-1-oxyl (10b) の合成

化合物 **10b** は、化合物 **10a** と同様の方法で合成した。化合物 **5a** (50 mg, 0.22 mmol)、*N*-formylsaccharin (46 mg, 0.22 mmol)。中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane:EtOAc = 1:1 ( $R_f$ : 0.20)) で精製し、橙色の液体である化合物 **10b** を収量 47 mg、収率 88% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF)  $m/z$ :  $[\text{M}+\text{H}]^+$  calculated for  $\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{N}_2\text{O}_2$   $^+$  256.21453; found 256.21464. ESR (DMSO):  $g = 2.0060$ ;  $a_N = 1.54$  mT (triplet).  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  with  $\text{PhNHNH}_2$ ):  $\delta$  (ppm) 0.73 - 0.98 (m, 5 H), 1.22 - 1.37 (m, 6 H), 1.47 (s, 3 H), 1.55 (s, 3 H), 1.59 (s, 3 H), 1.92 - 2.31 (m, 4 H), 4.37 (br s, 1 H).

#### 【18】 放射性ヨウ素標識

MeOH: AcOH=100:1 の溶液に標識前駆体 (化合物 **5**、**7a**、**7b**、**8a**、**8b**) (1.0 mg/mL、50  $\mu$ L) 及び NCS (0.50 mg/mL、50  $\mu$ L) をそれぞれ溶解し、 $\text{Na}^{125}\text{I}$  (3.7 MBq) を混合した後、室温で 15 分間静置した。放射性ヨウ素標識体は逆相 HPLC (mobile phase: A:  $\text{H}_2\text{O}$ , B: MeCN; 10% B ( $t = 0$  min), 100% B ( $t = 5$  to 30 mins); column: COSMOSIL 5 $\text{C}_{18}$ -AR-II, 4.6 mm I.D. x 250 mm; flow rate: 1 mL/min) にて精製し、非標識体との同時分析により同定した。

#### 【19】 アスコルビン酸ナトリウムとの反応性評価

TEMPOL, **1**, **2a**, **2b**, **9a**, **9b**, **10a**, **10b**, **6a**, **6b** をそれぞれ PBS (1% DMSO, 25% PEG400) に溶解し、50  $\mu$ M の溶液とした。これに、sodium ascorbate (250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 750  $\mu$ M, 1 mM, 6 mM, 8 mM, or 10 mM) をそれぞれ同体積となるように加え、ボルテックス後、直

ちに反応液を ESR チューブに取り、常温下で一定時間経時的に ESR スペクトルを測定した。得られた ESR スペクトルの二重積分面積を時間に対してプロットし、擬一次反応速度定数を求めた。二次反応速度定数は、sodium ascorbate の濃度に対してプロットした擬一次反応速度定数から求めた。ESR スペクトルは、X バンドで測定した。Mn<sup>2+</sup>を外部標準物質として用い、二重積分した ESR シグナル強度からニトロキシドの量を算出した。(ESR 測定条件 : power, 10 mW; frequency, 9.4 GHz; magnetic field, 337 mT; modulation amplitude, approximately one-third of the line width; time constant, 0.03 s.)

### 【20】 X 線結晶構造解析

化合物 **9a**、**9b** を hexane/EtOAc に溶解し、0°C で静置して再結晶を行った。その後、得られた単結晶を用いて X 線結晶構造解析を行った。

### 【21】 DFT 計算

ニトロキシド誘導体の最適化計算は、Gaussian 16 W を用いて行った。汎関数は B3LYP、基底関数に LanL2DZ を用い、密度汎関数法 (DFT) 計算にて行った[94]。

Calculation of compound **2a** at the axial (pentyl)-axial (*p*-iodobenzamide) using gaussian 16W.

Enthalpy= -1050.834411  
Free Energy= -1050.924051

0 2			
C	2.2691906	-2.3662935	0.3549088
C	3.0959193	-1.5906970	1.3875180
C	3.0950158	-2.5513927	-0.9189393
C	3.7925633	-0.3050404	0.9077118
H	2.4515929	-1.3262697	2.2672560
H	3.8855888	-2.3024493	1.7535475
C	3.7286984	-1.2767159	-1.4943606
H	3.9177742	-3.2734218	-0.6628224
H	2.4755394	-3.0244998	-1.7253240
C	4.8992000	-0.0056463	1.9432414
C	2.7873897	0.8668020	0.9552826
C	2.6928020	-0.4243437	-2.2403460
C	4.7573723	-1.7402812	-2.5477292
H	5.6491759	-0.8317002	1.9695849
H	4.4338462	0.0920640	2.9522468
H	1.8179955	0.5653983	0.4827582
H	2.5693813	1.0675425	2.0391094
H	3.2183169	0.3068167	-2.9034866
H	2.0500145	-1.0840183	-2.8698821
H	2.0464807	0.1617326	-1.5452430
H	4.2211391	-2.3008180	-3.3491245
H	5.5247179	-2.4055888	-2.0863430
H	5.2768101	-0.8602350	-2.9979069
N	4.4362130	-0.4875952	-0.4329948
O	5.2465591	0.3437691	-0.7963800
H	5.4294291	0.9424505	1.6871922

C	3.2732900	2.1405652	0.2987834
C	2.3542625	3.2992674	0.6252572
H	3.3210124	2.0023446	-0.8149589
H	4.3168508	2.3755064	0.6369337
C	2.8045298	4.5675324	-0.0682869
H	1.3063476	3.0510562	0.3102729
H	2.3342505	3.4660671	1.7346121
C	1.8991260	5.7271307	0.2571909
H	3.8551014	4.8093410	0.2434536
H	2.8210316	4.4011235	-1.1779107
H	2.2492322	6.6506852	-0.2639310
H	0.8520481	5.5143527	-0.0680976
H	1.8901746	5.9245785	1.3564936
H	2.1078546	-3.4009745	0.8037543
N	0.9465146	-1.8443181	0.1031574
H	0.8355978	-1.1834918	-0.6276139
C	-0.1236121	-2.1332269	0.9258386
O	-0.0172559	-2.9351858	1.8758730
C	-1.4249168	-1.4759106	0.6028321
C	-1.4967052	-0.1337490	0.2192073
C	-2.5966874	-2.2308430	0.7229608
C	-2.7353545	0.4457788	-0.0554473
H	-0.5860848	0.4815401	0.1481471
C	-3.8322182	-1.6486028	0.4420669
H	-2.5340056	-3.2808700	1.0520428
C	-3.9029191	-0.3113313	0.0496840
H	-2.7803690	1.5053864	-0.3533292
H	-4.7475299	-2.2542725	0.5377671
I	-5.6932927	0.5310818	-0.3596326

Calculation of compound **2a** at the equatorial (pentyl)- equatorial (*p*-iodobenzamide) using gaussian 16W.

Enthalpy= -1050.839228  
Free Energy= -1050.929653

0 2			
I	6.9707840	-0.8371150	-0.3807360
C	5.0625670	-0.3157660	0.0308650
C	4.4870590	-0.6736200	1.2507290
C	4.3196940	0.4072820	-0.9031980
C	3.1697220	-0.3154980	1.5342920
H	5.0659450	-1.2360330	2.0006490
C	2.9996060	0.7631830	-0.6262770
H	4.7674910	0.7053130	-1.8645460
C	2.4196700	0.3961060	0.5911440
H	2.7146040	-0.5770350	2.5035190
H	2.4336970	1.3483180	-1.3670560
C	1.0166800	0.7665710	0.9441390
N	0.0769660	0.7024370	-0.0647530
O	0.7083840	1.1101620	2.1033230
C	-1.3227720	0.9968780	0.1500280
H	0.3406050	0.3652050	-0.9583120
C	-1.8249480	2.1060710	-0.7815800
C	-2.2133810	-0.2330110	-0.0641210
H	-1.4290970	1.3456640	1.2232520
C	-3.2770240	2.4966840	-0.4757720
H	-1.1924310	3.0247640	-0.6668380
H	-1.7476960	1.7684810	-1.8486390
C	-3.6957360	0.0381390	0.2581010
H	-2.1252320	-0.5785770	-1.1280450
H	-1.8719890	-1.0709600	0.5986790
C	-3.3325660	3.3342070	0.8093640
C	-3.8802540	0.0766170	1.7800770
C	-4.4686270	-1.1833570	-0.3066610

H	-4.3869630	3.6350580	1.0237860
H	-2.9361760	2.7688090	1.6850930
H	-2.7167160	4.2552070	0.6735200
H	-4.9174930	0.4010350	2.0400500
H	-3.7089580	-0.9462970	2.1938210
H	-3.1560370	0.7764450	2.2599120
H	-3.8821180	-2.1014600	-0.0336650
H	-4.4885480	-1.1177760	-1.4265890
N	-4.1855610	1.2995760	-0.3959400
O	-5.3802770	1.5255820	-0.3762370
C	-3.7509830	3.4023540	-1.6288590
H	-4.7951990	3.7505630	-1.4409820
H	-3.0748640	4.2871490	-1.6942730
H	-3.7271130	2.8542950	-2.6001730
C	-5.8816840	-1.3371280	0.2091010
H	-6.4626720	-0.3932870	0.0310620
H	-5.8678940	-1.5187110	1.3163320
C	-6.5750140	-2.4970920	-0.4767360
H	-6.6143570	-2.3117150	-1.5825460
H	-5.9857150	-3.4387120	-0.3194050
C	-7.9805070	-2.6847380	0.0539670
H	-8.5657660	-1.7397060	-0.1002080
H	-7.9407550	-2.8712540	1.1597840
C	-8.6805210	-3.8317180	-0.6278620
H	-9.7136050	-3.9528100	-0.2215240
H	-8.7532180	-3.6515020	-1.7277510
H	-8.1238460	-4.7864170	-0.4661770

Calculation of compound **2b** at the axial (*p*-iodobenzamide)- equatorial (pentyl) using gaussian 16W.

Enthalpy= -1050.835023  
Free Energy= -1050.924789

0 2			
C	-2.1762438	-2.6494628	0.8863558
C	-2.9322768	-0.2488223	1.0813092
H	-1.3433781	-3.3370403	1.0662807
H	-3.0119898	-2.9939872	1.5123960
C	-3.4191169	-0.1871307	-0.3946297
H	-3.7871676	-0.5434132	1.7045411
H	-2.6467188	0.7613780	1.4017214
C	-1.3824255	-2.7907922	-1.5629066
C	-2.4905280	0.6637734	-1.3087328
H	-1.7347326	-2.7721758	-2.6001290
H	-0.6991079	-1.9517580	-1.4018104
H	-0.8162276	-3.7163927	-1.4010921
H	-2.9530082	0.7739905	-2.2953052
H	-2.3308372	1.6625221	-0.8850598
H	-1.5166420	0.1855638	-1.4630364
N	-3.4972384	-1.5859632	-0.9753993
O	-4.0952551	-1.6799927	-2.1640044
N	-0.4849522	-0.7493503	0.9330286
H	-0.4576870	0.0722318	0.3451079
C	0.6861816	-1.2569342	1.4477723
O	0.6790782	-2.1777899	2.3140993
C	1.9771510	-0.6623214	0.9502312
C	3.1396257	-0.9035204	1.7129580
C	2.0851146	0.0939062	-0.2376001
C	4.3828721	-0.3851551	1.3163162
H	3.0506187	-1.5059427	2.6119505
C	3.3253895	0.6147720	-0.6482441
H	1.2229970	0.2658422	-0.8781468
C	4.4694404	0.3776401	0.1358098
H	5.2663392	-0.5754851	1.9171782

H	3.3943818	1.1875475	-1.5674319
I	6.3577341	1.1732001	-0.4801718
C	-1.8004581	-1.2416912	1.4022849
C	-2.6016699	-2.7517038	-0.5999814
C	-3.4310657	-4.0442027	-0.7948110
H	-4.3486280	-4.0113135	-0.1950381
H	-3.7129402	-4.1669775	-1.8440545
H	-2.8384014	-4.9119215	-0.4788786
C	-4.8701006	0.3862247	-0.4337848
H	-5.2242294	0.3304249	-1.4692307
H	-5.5136813	-0.2864913	0.1529822
C	-5.0353000	1.8290405	0.0917712
H	-4.6810956	1.9073621	1.1307507
H	-4.4250812	2.5238011	-0.5042348
C	-6.5076578	2.2946976	0.0355635
H	-7.1299131	1.6110902	0.6352024
H	-6.8738551	2.2175549	-1.0004508
C	-6.7081159	3.7401492	0.5406849
H	-6.0894966	4.4235786	-0.0617947
H	-6.3389695	3.8178231	1.5754031
C	-8.1809525	4.1971506	0.4851918
H	-8.8174272	3.5499094	1.1042454
H	-8.2951224	5.2270789	0.8482207
H	-8.5662592	4.1583716	-0.5429868
H	-1.7160785	-1.3270245	2.4942882

Calculation of compound **2b** at the equatorial (*p*-iodobenzamide)- axial (pentyl) using gaussian 16W.

Enthalpy= -1050.840887  
Free Energy= -1050.931459

0 2			
I	6.8139826	0.4540813	-0.2922064
C	4.7257565	0.1497696	0.0617471
C	4.2871856	-0.2889174	1.3258938
C	3.8016300	0.3991659	-0.9696774
C	2.9149067	-0.4862762	1.5497013
H	4.9987143	-0.4725130	2.1244931
C	2.4302279	0.1934576	-0.7344486
H	4.1374817	0.7559626	-1.9380388
C	1.9741390	-0.2601335	0.5227819
H	2.5523094	-0.8094506	2.5208260
H	1.7319911	0.4271147	-1.5349372
C	0.5221846	-0.4928565	0.8455698
N	-0.3378738	-0.6644094	-0.2162546
O	0.1136943	-0.5336247	2.0407834
C	-1.7825775	-0.8852669	-0.0172873
H	0.0317074	-0.7601153	-1.1542435
C	-2.5649755	-0.3657794	-1.2344503
C	-2.0986935	-2.3816579	0.1883170
H	-2.0497168	-0.3284357	0.8863200
H	-2.3192022	0.6863096	-1.4211273
H	-2.2526851	-0.9357087	-2.1245178
C	-3.6006858	-2.6630698	0.4431035
H	-1.7728229	-2.9315690	-0.7073835
H	-1.5254703	-2.7648395	1.0402300
C	-4.7647776	-0.3810389	-2.4720351
C	-4.0099249	-2.2910983	1.8953208
C	-3.8912854	-4.1619238	0.2005660
H	-4.4742591	-1.2317687	-3.0997837
H	-4.4459776	0.5416488	-2.9702397
H	-3.7092336	-1.2744783	2.1697910
H	-5.0966955	-2.3767895	2.0041037
H	-3.5312636	-2.9808051	2.6011830

H	-3.2532182	-4.7702883	0.8538892
H	-3.6858173	-4.4343288	-0.8416800
H	-4.9393333	-4.3906058	0.4115858
N	-4.4445917	-1.8732299	-0.5396061
O	-5.7325580	-2.2109729	-0.6010345
H	-5.8546536	-0.3825290	-2.3867266
C	-4.1032168	-0.4950439	-1.0794215
C	-4.6947285	0.5683614	-0.0940302
H	-5.7342916	0.2739878	0.1037162
H	-4.1631264	0.5142490	0.8662259
C	-4.6704067	2.0342639	-0.5811285
H	-5.2863598	2.1420151	-1.4848650
H	-3.6476906	2.3349773	-0.8569183
C	-5.1965231	3.0079039	0.4976850
H	-6.2162777	2.7101854	0.7895899
H	-4.5761105	2.9204974	1.4040543
C	-5.2103830	4.4800840	0.0316641
H	-5.8335611	4.5682382	-0.8719015
H	-4.1916116	4.7768912	-0.2631350
C	-5.7342671	5.4475926	1.1135994
H	-5.7336277	6.4860330	0.7568518
H	-6.7626492	5.1927092	1.4045222
H	-5.1109694	5.4021361	2.0172659

Calculation of compound **6a** using gaussian 16W.

Enthalpy= -695.800955  
Free Energy= -695.868783

O 2			
C	-2.6867080	-0.6474222	-0.3571154
C	-2.7575671	0.8402329	-0.7802907
C	-1.9247043	1.7771258	0.1105894
C	-0.4499960	1.3482179	0.0180460
C	-0.1796776	-0.1011766	0.4949676
H	-2.3952950	0.9566307	-1.8105027
H	-3.8152424	1.1426866	-0.7739238
H	-0.1402635	1.4637256	-1.0296625
H	0.1751239	2.0269032	0.6146522
H	-2.2653137	1.6773079	1.1590141
N	-1.2524866	-1.0320150	-0.0494241
C	1.1726942	-0.6165471	-0.0852848
H	1.3036053	-1.6567204	0.2351340
H	1.0796994	-0.6362355	-1.1815186
C	-0.1878211	-0.2089748	2.0445933
H	-0.0500688	-1.2546534	2.3408037
H	0.6227480	0.3891635	2.4761201
H	-1.1313748	0.1483577	2.4726248
C	-3.1639553	-1.5401091	-1.5262984
H	-3.1409536	-2.5949268	-1.2389550
H	-4.1894881	-1.2664429	-1.8058632
H	-2.5172846	-1.4089113	-2.4020667
C	-3.5641586	-0.9328609	0.8938210
H	-3.4050813	-1.9649022	1.2245962
H	-3.3300680	-0.2608602	1.7274044
H	-4.6245793	-0.8052318	0.6414879
N	-2.0578156	3.1621809	-0.3815165
H	-3.0170253	3.4925924	-0.4614971
H	-1.4555109	3.8370594	0.0847810
O	-1.0372306	-2.3346294	0.1375823
C	2.4237773	0.2038133	0.2970350
H	2.3129337	1.2495657	-0.0265776
H	2.5500372	0.2217988	1.3898013
C	3.7072594	-0.3777567	-0.3372792
H	3.5968604	-0.3948998	-1.4334913

H	3.8255958	-1.4266645	-0.0220081
C	4.9811648	0.4123621	0.0334422
H	4.8611917	1.4615898	-0.2791094
H	5.0930410	0.4256802	1.1289670
C	6.2585457	-0.1713278	-0.6061342
H	6.1865146	-0.1671397	-1.7025594
H	7.1486285	0.4073756	-0.3254673
H	6.4184103	-1.2104359	-0.2868093

Calculation of compound **6b** using gaussian 16W.

Enthalpy= -695.797152  
Free Energy= -695.864316

O 2			
C	-2.6410050	-0.6996890	-0.2966420
C	-2.7026050	0.5343500	-1.2227320
C	-1.8515590	1.7428950	-0.8151840
C	-0.4026630	1.2877000	-0.5946900
C	-0.1787450	0.0986700	0.3670290
H	-2.3674730	0.2325120	-2.2242550
H	-3.7556790	0.8295740	-1.3295250
H	-0.0031310	1.0152800	-1.5811920
H	0.2011560	2.1349340	-0.2449940
N	-1.2222280	-0.9615330	0.1235160
C	1.1871520	-0.5726580	0.0490280
H	1.3044910	-1.4272480	0.7224260
H	1.1254960	-0.9887600	-0.9666080
C	-0.2419110	0.5184250	1.8521050
H	-0.1045580	-0.3614930	2.4887580
H	0.5531050	1.2379950	2.0781390
H	-1.1964070	0.9915160	2.0887870
C	-3.1143220	-1.9309140	-1.0928850
H	-3.1379840	-2.8201950	-0.4594050
H	-4.1230880	-1.7462910	-1.4812340
H	-2.4478240	-2.1301170	-1.9396530
C	-3.5292260	-0.5440680	0.9579750
H	-3.4021150	-1.4165470	1.6064970
H	-3.2863420	0.3626810	1.5144630
H	-4.5829490	-0.4897950	0.6559160
O	-1.0165910	-2.0938940	0.6989630
C	2.4284370	0.3277480	0.1449730
H	2.3462100	1.1770580	-0.5481950
H	2.5113510	0.7574230	1.1527230
C	3.7225000	-0.4390100	-0.1696630
H	3.6514370	-0.8746900	-1.1779740
H	3.8174760	-1.2889530	0.5226040
C	4.9857740	0.4283490	-0.0824220
H	4.8916870	1.2773750	-0.7756510
H	5.0573500	0.8635800	0.9252600
C	6.2728700	-0.3442420	-0.3956420
H	6.2470890	-0.7629970	-1.4100310
H	7.1559200	0.3023950	-0.3245500
H	6.4138760	-1.1790270	0.3029590
N	-2.3965580	2.4174160	0.3763590
H	-1.8362740	3.2389510	0.6018430
H	-3.3406600	2.7537730	0.1885990
H	-1.8361190	2.4256990	-1.6840220

Calculation of compound **6a** with NH<sub>3</sub><sup>+</sup> using gaussian 16W.

Enthalpy= -696.256670  
Free Energy= -696.324577

1	2		
C	-2.6924622	-0.6136839	-0.3512820
C	-2.7595712	0.8819591	-0.7593440
C	-1.8910682	1.7685381	0.1415340
C	-0.4174242	1.3544881	0.0411570
C	-0.1705562	-0.1122639	0.4871150
H	-2.4183612	0.9869591	-1.7981160
H	-3.8108422	1.1914231	-0.7222130
H	-0.0861632	1.4745171	-0.9997040
H	0.2053018	2.0062311	0.6634890
H	-2.2432162	1.7565761	1.1765420
N	-1.2483442	-1.0143739	-0.1015450
C	1.1898138	-0.6072229	-0.0925990
H	1.3438668	-1.6406769	0.2375770
H	1.0998448	-0.6323519	-1.1886300
C	-0.1967482	-0.2524679	2.0329790
H	-0.0765022	-1.3054869	2.3093830
H	0.6227968	0.3201391	2.4791970
H	-1.1327622	0.1118321	2.4695940
C	-3.2268462	-1.4685379	-1.5230510
H	-3.2576422	-2.5262799	-1.2490530
H	-4.2422182	-1.1423899	-1.7776590
H	-2.5921642	-1.3555389	-2.4097090
C	-3.5357532	-0.8979329	0.9221390
H	-3.3926712	-1.9381709	1.2334430
H	-3.2707382	-0.2474999	1.7624300
H	-4.5980472	-0.7453309	0.6986590
N	-2.0244803	3.1850117	-0.2901811
H	-3.0003813	3.5012247	-0.2167451
H	-1.4459653	3.8036727	0.2937259
O	-1.0126177	-2.3917427	-0.0025049
C	2.4264918	0.2365711	0.2887890
H	2.3050178	1.2758991	-0.0489380
H	2.5463948	0.2683301	1.3812610
C	3.7194358	-0.3346569	-0.3355700
H	3.6119518	-0.3655599	-1.4317060
H	3.8554348	-1.3766659	-0.0047860
C	4.9774888	0.4833911	0.0288790
H	4.8350298	1.5275711	-0.2903360
H	5.0903988	0.5045511	1.1239510
C	6.2649408	-0.0782389	-0.6106040
H	6.1903228	-0.0787349	-1.7070090
H	7.1434258	0.5195331	-0.3329780
H	6.4451748	-1.1127939	-0.2868440
H	-1.7261473	3.3011007	-1.2681871

Calculation of compound **6b** with NH<sub>3</sub><sup>+</sup> using gaussian 16W.

Enthalpy= -696.247789  
Free Energy= -696.315488

1	2		
C	-2.6545402	-0.7363185	-0.2858439
C	-2.7447092	0.5228496	-1.1921100
C	-1.8335472	1.7115449	-0.8485042
C	-0.3830391	1.2618468	-0.6147624
C	-0.1494295	0.0608353	0.3446828
H	-2.4572991	0.2325568	-2.2099339
H	-3.7942277	0.8364805	-1.2493245
H	-0.0091996	0.9835861	-1.6079845
H	0.2323934	2.1057395	-0.2839244
N	-1.2141912	-1.0006653	0.1125452
C	1.2215653	-0.5987075	-0.0048969
H	1.3461306	-1.4769948	0.6380620



H	1.1681751	-0.9649114	-1.0407567
C	-0.1711752	0.4646034	1.8464115
H	0.1444236	-0.3856831	2.4599908
H	0.5111106	1.3000679	2.0320658
H	-1.1661813	0.7568523	2.2014925
C	-3.1453594	-1.9496786	-1.1134128
H	-3.1681771	-2.8543396	-0.5005405
H	-4.1577737	-1.7511659	-1.4849657
H	-2.4879400	-2.1252545	-1.9727930
C	-3.5312522	-0.6277559	0.9934300
H	-3.4287821	-1.5438906	1.5840206
H	-3.2627663	0.2118108	1.6443009
H	-4.5834084	-0.5093731	0.7111410
O	-0.9871397	-2.1867432	0.6774281
C	2.4584950	0.3149302	0.1440574
H	2.3749036	1.1921103	-0.5135737
H	2.5312754	0.6934432	1.1736139
C	3.7636455	-0.4378664	-0.1988126
H	3.7063608	-0.8173800	-1.2315752
H	3.8565691	-1.3202735	0.4543085
C	5.0250590	0.4400771	-0.0484794
H	4.9327259	1.3219461	-0.7013201
H	5.0800140	0.8200190	0.9835291
C	6.3264835	-0.3171144	-0.3874959
H	6.3097926	-0.6818515	-1.4239901
H	7.2071818	0.3286899	-0.2716027
H	6.4572583	-1.1868547	0.2713787
N	-2.3797229	2.5626483	0.3200489
H	-1.8003751	3.4035834	0.4474935
H	-3.3399701	2.8702810	0.1166516
H	-1.8483812	2.4103422	-1.6901266
H	-2.3924955	2.0550527	1.2111973

## 【22】 *In vivo* ESR イメージング

C57BL/6 マウス (8 週齢、雄) の腹腔内に、三種混合麻酔 (medetomidine hydrochloride (0.75 mg/kg)、midazolam (4 mg/kg)、butorphanol tartrate (5 mg/kg)) を投与し、全身麻酔をかけた。麻酔下のマウスを ESR 装置に置き、化合物 **2a** または **2b** (0.45  $\mu\text{mol/g}$ 、DMSO:PG= 3:8) を静脈内投与した。ESR の撮像は、マウスの体温を  $37 \pm 0.5$  °C に維持しながら行った。投与 1 分後から、マウス頭部の 3D ESR 画像を 9.1 秒ごとに取得した。

(ESR の撮像条件 : 3D radial sequence; 181 projections, magnetic modulation field; 0.2 mT, magnetic field gradient; 0.6 mT/cm, magnetic field sweep width; 6 mT, field sweep time per projection; 50 ms.) 画像再構成はフィルター補正逆投影法で行った。取得した 3D ESR 画像 (128  $\times$  128  $\times$  128 pixels) から、マウス頭部の 2D ESR 画像 (128  $\times$  128 pixels) を抽出した。また、ESR 画像と解剖学的画像の重ね合わせを目的として、ESR 撮像の前に MRI を撮像した。(MRI の撮像条件 : spin-echo multi-slice T1-weighted sequence: repetition time, 480 ms; echo time, 12 ms; field of view, 60  $\times$  30 mm<sup>2</sup>; matrix, 256  $\times$  128 pixels; number of excitations, 6; slice thickness, 1.2 mm; and space, 0.1 mm.) ESR 画像と MRI 画像の重ね合わせはこれまでの報告[93,95]と同様の方法で行い、重ね合わせた画像を基に関心領域を決

定し、関心領域内の平均画像強度を算出した。関心領域における画像強度変化を、時間経過に対してプロットし、マウス脳における化合物 **2a** と **2b** の還元反応速度定数を算出した。

#### 【22】 統計解析

データは、平均±標準偏差 (S.D.) で示した。*In vivo* ESR イメージングにおける速度定数の評価は、Unpaired *t* 検定を用いた。統計的有意差の基準は  $p < 0.05$  を採用した。

## 第 2 章

### 【1】脂溶性評価

各化合物の脂溶性は *n*-octanol と 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) への分配係数 ( $\log P$ ) で評価した。*n*-octanol (1.8 mL) 及び 0.1 M phosphate buffer (2.0 mL, pH 7.4) を混合し、10 時間静置し、平衡状態にした。これに、*n*-octanol (0.2 mL) に溶解させた化合物 **1** (370 kBq) を加え、1 分間振盪、1 分間静置を 3 回繰り返した後、20 分間静置した。これを 3 回繰り返した後、遠心分離機 (4 °C, 1500 × g, 5 min) により有機層と水層に分画し、有機層、水層それぞれの放射能を  $\gamma$  カウンタで測定した。なお、下層である水層を取り出すときは、上層である有機層を全て抜き取った後、遠心 (4 °C, 1500 × g, 5 min) を行い、下層の下の方を水層として取り出した。 $\log P$  の算出は、 $\log P = \log$  (有機層の放射能 / 水層の放射能) の計算式から行った。

### 【2】注射液中の安定性評価

化合物 [ $^{125}\text{I}$ ]**1** の注射液 (1% EtOH 及び 0.1% Tween80 含有 PBS) を 37°C で 5 日間インキュベートした。5 日後に逆相 HPLC (mobile phase: A: H<sub>2</sub>O, B: MeCN; 10% B (t = 0 min), 100% B (t = 5 to 30 mins); column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6 mm I.D. x 250 mm; flow rate: 1 mL/min) を用いて各化合物を分析し、放射化学的純度を評価した。

### 【3】脂質ラジカル及び活性酸素種との反応性評価

化合物 **2a**、**2b** と脂質ラジカル、活性酸素種およびグルタチオンを次に述べる条件で反応させた。化合物 **2a**、**2b** はすべて 50  $\mu\text{M}$  で反応させた。(i) 脂質ラジカル: arachidonic acid 0.8 mM、LOX (soybean lipoxidase) 0.05 mg/mL (ii) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 1% (iii) hydroxyl radical : H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1%、FeSO<sub>4</sub>, 0.2 mM (iv) superoxide anion radical : hypoxanthine 1.25 mM、xanthine oxidase 78 mU/mL (v) hypochlorite ion : sodium hypochlorite 0.1% (vi) reduced glutathione : 2 mM) 各試薬は 10 mM のリン酸緩衝液 (pH 7.4) に溶解した後、それぞれ同体積 (40  $\mu\text{L}$ ) となるように混合し、その後すぐに反応液を ESR チューブに取り ESR 測定を行った。ESR スペクトルは、X バンド ESR スペクトロメーターで測定した。Mn<sup>2+</sup> を外部標準物質として用い、二重積分した ESR シグナル強度からニトロキシド量を算出した。

(ESR 測定の条件 : power, 10 mW; frequency, 9.4 GHz; magnetic field, 337 mT; modulation amplitude, approximately one-third of the line width; time constant, 0.3 s.)

#### [4] HPLC を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

最終濃度が arachidonic acid ; 0.8 mM、LOX ; 0.025 mg/mL、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  または  $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  ; 185 kBq となるように水 (5% EtOH) で希釈し、各 20  $\mu\text{L}$  で混合させ、37°C で 10 分間反応させた。その後、400  $\mu\text{L}$  の MeCN を加えて混合し、遠心分離 (4 °C, 1500  $\times$  g, 5 min) を行った後、上清 300  $\mu\text{L}$  を取り逆相 HPLC (mobile phase: A: H<sub>2</sub>O, B: MeOH; 50% B (t = 0 to 10 min), 100% B (t = 25 to 60 min); column: COSMOSIL 5C<sub>18</sub>-AR-II, 4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm; flow rate: 1 mL/min) を用いて分析した。

#### [5] 4-iodo-N-(2,2,6-trimethyl-6-pentyl-1-(pentyloxy)piperidin-4-yl)benzamide (**14a**) の合成

化合物 **2a** (0.95 g, 0.2 mmol) を *tert*-butanol/water=2:1 (5 mL) に溶解し、copper(I) chloride および hexanal を加え 5 分間 Ar バブリングを行った。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mL) を滴下し、1 日攪拌した。飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液と diethyl ether で抽出し、diethyl ether 層と NaOH 水溶液で抽出した後、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> で脱水、減圧留去し、残渣を中圧分取カラムクロマトグラフィー (hexane: EtOAc = 9:1 (R<sub>f</sub>: 0.50)) で精製し、白色の固体である化合物 **14a** を収量 45 mg、収率 41% で得た。HRMS (ESI/Q-TOF) m/z: [M+H]<sup>+</sup> calculated for C<sub>25</sub>H<sub>42</sub>O<sub>2</sub>N<sub>2</sub>I<sup>+</sup> 529.2286, found 529.2288; <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 0.84 - 0.96 (m, 6 H) 1.19 (s, 3 H) 1.20 (s, 3 H) 1.25 (m, 7 H) 1.29 - 1.44 (m, 8 H) 1.51 (m, 4 H) 1.76 - 1.95 (m, 2 H) 3.69 (t, 1 H) 4.17 - 4.47 (m, 1 H) 5.74 (d, *J*=7.7 Hz, 1 H) 7.46 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H) 7.77 (d, *J*=8.4 Hz, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) ppm 14.3, 14.4, 19.5, 21.3, 23.0, 23.0, 23.7, 28.7, 28.8, 29.9, 32.8, 33.5, 42.1, 42.4, 44.0, 45.9, 60.2, 62.6, 98.5, 128.6, 134.4, 138.0, 166.2.

#### [6] LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

最終濃度が arachidonic acid ; 0.8 mM、LOX ; 0.025 mg/mL、**2a** ; 0.1 mM となるように水 (5% EtOH) で希釈し、各 50  $\mu\text{L}$  で混合させ、37°C で 10 分間反応させた。その後、Bligh & Dyer 法[96]により脂質抽出を行った。具体的には、chloroform/MeOH=1 : 2 溶液を 600  $\mu\text{L}$  加えてボルテックスし、さらに chloroform 200  $\mu\text{L}$  と水 200  $\mu\text{L}$  を加えてボルテックスした。遠心分離 (4 °C, 1500  $\times$  g, 10 min) を行った後、下層を取り出し窒素ガスにより溶媒を除去した。その後 MeOH で再溶解し、LC/MS (HPLC conditions; mobile phase: 5 mM ammonium acetate in MeCN-H<sub>2</sub>O (90:10); column: Xbrige BHE C18, 3.0 mm I.D.  $\times$  150 mm; flow rate: 0.4 mL/min. MS condition; Ionization mode: ESI positive; Cone voltage: 10 V; Capillary voltage; 1.5 kV; Drying gas flow rate: 20 L/min; Drying gas temp.: 250°C) を用いて

分析した。

#### 【7】細胞培養

ヒト肝がん細胞 HepG2 細胞株は、DMEM（10% ウシ胎児血清、100 U/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin 含有）を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で培養した。

#### 【8】HepG2 細胞への集積性評価

HepG2 細胞を  $2 \times 10^5$  cells/0.5 mL DMEM となるように 24-well plate の各ウェルに播種し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下で一晩インキュベートした。各ウェルの培地を除去し、脂肪酸 (500 µM arachidonic acid、または 500 µM arachidic acid) および化合物 [<sup>125</sup>I]2a、[<sup>125</sup>I]2b、[<sup>125</sup>I]3a、[<sup>125</sup>I]3b (18.5 kBq、1% EtOH、0.1% Tween 80) を含む培地を 0.5 mL ずつ加え、37°C の CO<sub>2</sub> インキュベーターで 5、10、15 分間培養した。その後、培地を除去し、PBS (-) 0.5 mL を用いて洗浄した後、0.2 M NaOH 0.5 mL を加えて細胞溶解液を回収した。細胞溶解液の放射能はγカウンタにより測定した。また、細胞溶解液中のタンパク質量は BCA protein assay kit を用いて測定し、細胞集積量は %dose/mg protein として算出した。

#### 【9】正常マウスにおける生体内分布評価

ddY マウス (5 週齢、雄性、n=4) に化合物 [<sup>125</sup>I]1、[<sup>125</sup>I]2a、[<sup>125</sup>I]2b、[<sup>125</sup>I]3a、[<sup>125</sup>I]3b (PBS 溶液 (1% EtOH +0.1% Tween80) /37 kBq/100 µL/匹) を静脈内に投与し、2、5、10、30 分、1、3、6、24 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、甲状腺、脳を摘出した。また、投与 24 時間後に尿と糞を採取した。各臓器重量と放射能を測定し、臓器への放射能集積は %dose あるいは %dose/g として算出した。

#### 【10】四塩化炭素誘発脂質過酸化促進モデルマウスにおける生体内分布評価

四塩化炭素 (1 mg/kg) を同体積のオリーブ油に溶解し、ddY マウス (5 週齢、雄性、n=4) に腹腔内投与した。投与 24 時間後に、化合物 [<sup>125</sup>I]2a、[<sup>125</sup>I]3a (PBS 溶液 (1% EtOH +0.1% Tween80) /37 kBq/100 µL/匹) を静脈内投与し、6 時間後に屠殺し、血液、脾臓、膵臓、胃、腸、腎臓、肝臓、心臓、肺、筋肉、甲状腺、脳を摘出した。それぞれの臓器重量と放射能を測定し、臓器への放射能集積は %dose あるいは %dose/g として算

出した。

#### 【11】統計解析

データは、平均±標準偏差 (S.D.) で示した。細胞取り込み評価は、one-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 検定を行った。四塩化炭素誘発脂質過酸化亢進モデルマウスの生体内分布評価は、Unpaired *t* 検定を用いた。統計的有意差の基準は  $p < 0.05$  を採用した。

### 第3章

#### 【1】マウス一過性中大脳動脈閉塞モデル (tMCAO モデル) の作製

C57BL/6N マウス (8 週齢、雄性) を使用した。マウス一過性中大脳動脈閉塞モデルは、これまでに報告されている方法を参照し、Longa 法にて作製した[79]。以下、そのプロトコールを簡潔に記述する。マウスに isoflurane を吸入させ、全身麻酔をかけながら実験を行った。顕微鏡下で左総頸動脈、内頸動脈、外頸動脈を剥離、露出し、外頸動脈及び総頸動脈近位部を結紮した。外頸動脈を切開し、先端がシリコンコーティングされた 7-0 ナイロン糸を挿入、内頸動脈を通して抵抗を感じるまで糸を進め、中大脳動脈起始部を閉塞させた。中大脳動脈閉塞 60 分後に塞栓糸を抜去し、再灌流を起こした。麻酔回復はヒートパッド上で行い、体温を 37°C に維持した。

#### 【2】TTC 染色による梗塞巣体積の測定

これまでに報告されている TTC 染色法を参照し、梗塞巣体積を評価した[97-99]。tMCAO マウスを作製し、再灌流の 1、3、5、8、24 時間後に屠殺した ( $n=5$ )。その後脳を摘出し、ブレインマトリックスを用いて 2 mm 厚の脳切片を作製した。梗塞巣体積を評価するため、2% TTC 溶液中で脳切片を 37°C、20 分間インキュベートした。染色されなかった白色部分を脳梗塞領域とし、画像解析ソフト Image J を用いて各切片の嗅球側および小脳側の梗塞面積を計測した。梗塞巣体積は次の式を用いて評価した。

梗塞巣体積 (%) = [左半球体積 - (右半球体積 - 梗塞体積)] / 左半球体積 × 100

#### 【3】血液脳関門損傷の評価

血液脳関門損傷の評価は、これまでに報告されているエバンスブルー法を参照した[100]。tMCAO マウスを作製し、再灌流の 0、2、4、7、23 時間後に 2% エバンスブルー溶液 (4 mL/kg) を静脈内投与した ( $n=5$ )。エバンスブルーを投与して 1 時間後に屠殺し、生理食塩水 100 mL を全身灌流した。脳の重量を計測し、1 mL の 60% トリクロロ酢酸を添加してホモジナイズした。遠心分離後 (4 °C, 1400 × g, 30 min)、上清の 620 nm の吸光度を測定し、標準曲線をもとに血管外へのエバンスブルー漏出量を評価した。

#### 【4】脳内放射能分布評価

tMCAO モデルマウスを作製し、再灌流から 15、30 分、1、3、5 時間後に [<sup>125</sup>I]2a または [<sup>125</sup>I]3a (PBS 溶液 (1% EtOH + 0.1% Tween80) / 2590 kBq/100 μL/匹) を静脈内投与し

た。同様に、糸を挿入しない sham 群として、処置から 15、30 分、1、3、5 時間後に  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  (PBS 溶液 (1% EtOH +0.1% Tween80) /2590 kBq/100  $\mu\text{L}$ /匹) を静脈内投与した。投与 3 時間後に脳を摘出し、凍結切片 (20  $\mu\text{m}$  厚) を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージングアナライザーにて分析を行った。放射能集積の評価は画像解析ソフト Image J を用いて定量した。Bregma からの脳の位置は、Paxinos と Franklin の脳地図[80]を参照して決定した。Bregma-1.4 mm では、虚血側および非虚血側の脳半球を関心領域に設定し、bregma+0.5 mm では、嗅結節付近の集積部位を関心領域に設定した。定量の結果は、それぞれ非虚血側に対する虚血側の比として示した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  投与群はそれぞれ  $n=8$ 、 $[^{125}\text{I}]\mathbf{3a}$  投与群および sham 群は  $n=4$  で行った。

#### [5] LC/MS を用いた脂質ラジカルとの反応物解析

tMCAO マウスを作製し、再灌流から 1、5 時間後に isoflurane 吸入麻酔下で化合物  $\mathbf{2a}$  (0.45  $\mu\text{mol/g}$ 、DMSO:PG= 3:8) を 1 分間かけてゆっくりと静脈内投与した。投与から 5 分後に脳を摘出し、左大脳半球と右大脳半球を取り出した。水 700  $\mu\text{L}$  を加えてホモジナイザーでホモジナイズした後、chloroform/MeOH=1 : 2 溶液を 2.1 mL 加えてボルテックスし、さらに chloroform 700  $\mu\text{L}$  と水 700  $\mu\text{L}$  を加えてボルテックスした。遠心分離 (4  $^{\circ}\text{C}$ , 1500  $\times g$ , 10 min) を行った後、下層を取り出し窒素ガスにより溶媒を除去した。その後メタノールで再溶解し、LCMS (HPLC conditions; mobile phase:  $\text{H}_2\text{O}$  with 0.1% AcOH:  $\text{CH}_3\text{CN}$  with 0.1% AcOH = 97:3 (t=0)  $\rightarrow$  97:3 (t=3)  $\rightarrow$  0:100 (t=10)); column: COSMOSIL 5C18-AR II 4.6 ID  $\times$  150 mm; flow rate: 0.2 mL/min.) を行った。MS 測定には LTQ-orbitrap discovery mass spectrometer を使い、FTMS および ion trap analyzers にて分析した。すべてのイオンは positive mode で分析した。それぞれ 5 匹ずつ行い、分析した結果を合算して結果とした。

#### [6] エダラボン投与後の脳内放射能分布評価

tMCAO モデルマウスの再灌流の 5、30 分前、5、30 分後、1、3 時間後にエダラボン (3 mg/kg、100  $\mu\text{L}$ ) を静脈内投与した。エダラボンは、1 M の NaOH で溶解した後、1 M の HCl を加えて pH を 7.4 に調製し、生理食塩水で 3 mg/kg の投与量となるように希釈した[83]。再灌流の 1、3、5 時間後に  $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  (PBS 溶液 (1% EtOH +0.1% Tween80) /2590 kBq/100  $\mu\text{L}$ /匹) を静脈内投与した。 $[^{125}\text{I}]\mathbf{2a}$  投与 3 時間後に脳を摘出し、凍結切片 (20  $\mu\text{m}$  厚) を作製した。切片をイメージングプレートに露光させ、バイオイメージン



グアナライザーにて分析を行った ( $n=8$ )。Bregma からの脳の位置は、Paxinos と Franflin の脳地図[80]を参照して決定した。放射能集積の評価は画像解析ソフト Image J を用いて定量した。Bregma+0.5 mm の位置では嗅結節の位置で定量し、bregma-1.4 mm の位置では虚血側と非虚血側の半球で定量し、それぞれ非虚血側に対する虚血側の比として算出した。

#### 【7】統計解析

データは、平均±標準偏差 (S.D.) で示した。脳内放射能分布評価およびエダラボン投与後の脳内放射能分布評価は、one-way ANOVA の後、Tukey-Kramer 検定を行った。統計的有意差の基準は  $p < 0.05$  を採用した。

## 参考文献

- [1] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>.
- [2] H. Yin, L. Xu, N.A. Porter, Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis, *Chem. Rev.* 111 (2011) 5944–5972. <https://doi.org/10.1021/cr200084z>.
- [3] E. Niki, Y. Yoshida, Y. Saito, N. Noguchi, Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338 (2005) 668–676. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.072>.
- [4] R.K. Yadav, M. Singh, S. Roy, M.N. Ansari, A.S. Saeedan, G. Kaithwas, Modulation of oxidative stress response by flaxseed oil: Role of lipid peroxidation and underlying mechanisms, *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 135 (2018) 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2018.02.003>.
- [5] B. Tudek, D. Zdzalik-Bielecka, A. Tudek, K. Kosicki, A. Fabisiewicz, E. Speina, Lipid peroxidation in face of DNA damage, DNA repair and other cellular processes, *Free Radic. Biol. Med.* 107 (2017) 77–89. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.043>.
- [6] L.J. Niedernhofer, J.S. Daniels, C.A. Rouzer, R.E. Greene, L.J. Marnett, Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 31426–31433. <https://doi.org/10.1074/jbc.M212549200>.
- [7] H. Esterbauer, P. Eckl, A. Ortner, Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors, *Mutat. Res. Genet. Toxicol.* 238 (1990) 223–233. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(90\)90014-3](https://doi.org/10.1016/0165-1110(90)90014-3).
- [8] L.J. Marnett, Inflammation and cancer: chemical approaches to mechanisms, imaging, and treatment, *J. Org. Chem.* 77 (2012) 5224–5238. <https://doi.org/10.1021/jo300214d>.
- [9] C.R. Santos, A. Schulze, Lipid metabolism in cancer, *FEBS J.* 279 (2012) 2610–2623. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08644.x>.
- [10] K. Uchida, Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases, *Free Radic. Biol. Med.* 28 (2000) 1685–1696. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00226-4](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00226-4).
- [11] R. Stocker, J.F. Keaney, Role of oxidative modifications in atherosclerosis, *Physiol. Rev.* 84 (2004) 1381–1478. <https://doi.org/10.1152/physrev.00047.2003>.
- [12] A. Ayala, M.F. Muñoz, S. Argüelles, Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 1–31. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>.
- [13] K. Stolze, N. Udilova, H. Nohl, Lipid radicals: properties and detection by spin

- trapping., *Acta Biochim. Pol.* 47 (2000) 923–930.  
[https://doi.org/10.18388/abp.2000\\_3947](https://doi.org/10.18388/abp.2000_3947).
- [14] G.R. Buettner, Spin Trapping: ESR parameters of spin adducts 1474 1528V, *Free Radic. Biol. Med.* 3 (1987) 259–303. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(87\)80033-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(87)80033-3).
- [15] S. Qian, Identification of all classes of spin-trapped carbon-centered radicals in soybean lipoxygenase-dependent lipid peroxidations of  $\omega$ -6 polyunsaturated fatty acids via LC/ESR, LC/MS, and tandem MS, *Free Radic. Biol. Med.* 34 (2003) 1017–1028.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00031-5](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00031-5).
- [16] S.Y. Qian, Q. Guo, R.P. Mason, Identification of spin trapped carbon-centered radicals in soybean lipoxygenase-dependent peroxidations of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids by LC/ESR, LC/MS, and tandem MS, *Free Radic. Biol. Med.* 35 (2003) 33–44.  
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00217-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00217-X).
- [17] K. Yamada, F. Mito, Y. Matsuoka, S. Ide, K. Shikimachi, A. Fujiki, D. Kusakabe, Y. Ishida, M. Enoki, A. Tada, M. Ariyoshi, T. Yamasaki, M. Yamato, Fluorescence probes to detect lipid-derived radicals, *Nat. Chem. Biol.* 12 (2016) 608–613.  
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2105>.
- [18] F. Hyodo, K.H. Chuang, A.G. Goloshevsky, A. Sulima, G.L. Griffiths, J.B. Mitchell, A.P. Koretsky, M.C. Krishna, Brain redox imaging using blood-brain barrier-permeable nitroxide MRI contrast agent, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28 (2008) 1165–1174.  
<https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.5>.
- [19] H.V.T. Nguyen, Q. Chen, J.T. Paletta, P. Harvey, Y. Jiang, H. Zhang, M.D. Boska, M.F. Ottaviani, A. Jasanoff, A. Rajca, J.A. Johnson, Nitroxide-based macromolecular contrast agents with unprecedented transverse relaxivity and stability for magnetic resonance imaging of tumors, *ACS Cent. Sci.* 3 (2017) 800–811.  
<https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00253>.
- [20] K. Nagura, Y. Takemoto, S. Moronaga, Y. Uchida, S. Shimono, A. Shiino, K. Tanigaki, T. Amano, F. Yoshino, Y. Noda, S. Koizumi, N. Komatsu, T. Kato, J. Yamauchi, R. Tamura, Preparation of robust metal-free magnetic nanoemulsions encapsulating low-molecular-weight nitroxide radicals and hydrophobic drugs directed toward MRI-visible targeted delivery, *Chem. Eur. J.* 23 (2017) 15713–15720.  
<https://doi.org/10.1002/chem.201702785>.
- [21] M.C. Krishna, A. Russo, J.B. Mitchell, S. Goldstein, H. Dafni, A. Samuni, Do nitroxide antioxidants act as scavengers of O<sub>2</sub><sup>-</sup> or as SOD mimics?, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 26026–26031. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.42.26026>.
- [22] H. Utsumi, K. Yasukawa, T. Soeda, K. Yamada, R. Shigemi, T. Yao, M. Tsuneyoshi, Noninvasive mapping of reactive oxygen species by in vivo electron spin resonance

- spectroscopy in indomethacin-induced gastric ulcers in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 317 (2006) 228–235. <https://doi.org/10.1124/jpet.105.095166>.
- [23] H.D. Black, W. Xu, E. Hortle, S.I. Robertson, W.J. Britton, A. Kaur, E.J. New, P.K. Witting, B. Chami, S.H. Oehlers, The cyclic nitroxide antioxidant 4-methoxy-TEMPO decreases mycobacterial burden in vivo through host and bacterial targets, *Free Radic. Biol. Med.* 135 (2019) 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.03.010>.
- [24] Y. Matsuoka, M. Yamato, T. Yamasaki, F. Mito, K. Yamada, Rapid and convenient detection of ascorbic acid using a fluorescent nitroxide switch, *Free Radic. Biol. Med.* 53 (2012) 2112–2118. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.032>.
- [25] T. Yang, B. Zheng, H. Liang, Y. Wan, J. Du, D. Xiao, A sensitive and selective chemosensor for ascorbic acid based on a fluorescent nitroxide switch, *Talanta*. 132 (2015) 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.08.066>.
- [26] E.G. Bagryanskaya, S.R.A. Marque, Scavenging of organic C-Centered radicals by nitroxides, *Chem. Rev.* 114 (2014) 5011–5056. <https://doi.org/10.1021/cr4000946>.
- [27] P. Schmid, K.U. Ingold, Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. 31. Rate constants for spin trapping. 1. Primary alkyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 100 (1978) 2493–2500. <https://doi.org/10.1021/ja00476a037>.
- [28] Y. Maeda, K.U. Ingold, Kinetic applications of electron paramagnetic resonance spectroscopy. 34. Rate constants for spin trapping. 2. Secondary alkyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 101 (1979) 4975–4981. <https://doi.org/10.1021/ja00511a030>.
- [29] S.A. Green, D.J. Simpson, G. Zhou, P.S. Ho, N. V. Blough, Intramolecular quenching of excited singlet states by stable nitroxyl radicals, *J. Am. Chem. Soc.* 112 (1990) 7337–7346. <https://doi.org/10.1021/ja00176a038>.
- [30] C. Tansakul, E. Lilie, E.D. Walter, F. Rivera, A. Wolcott, J.Z. Zhang, G.L. Millhauser, R. Braslau, Distance-dependent fluorescence quenching and binding of CdSe quantum dots by functionalized nitroxide radicals, *J. Phys. Chem. C*. 114 (2010) 7793–7805. <https://doi.org/10.1021/jp1005023>.
- [31] F. Mito, K. Kitagawa, T. Yamasaki, C. Shirahama, T. Oishi, Y. Ito, M. Yamato, K. Yamada, Oxygen concentration dependence of lipid peroxidation and lipid-derived radical generation: Application of profluorescent nitroxide switch, *Free Radic. Res.* 45 (2011) 1103–1110. <https://doi.org/10.3109/10715762.2011.595410>.
- [32] M. Ikeda, H. Nakagawa, S. Ban, H. Tsumoto, T. Suzuki, N. Miyata, Development of a DNA-binding TEMPO derivative for evaluation of nuclear oxidative stress and its application in living cells, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1792–1797. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.009>.
- [33] H. Yoshioka, H. Tanizawa, T. Ogata, S. Kazama, A novel spin probe with long life in

- vivo for ESR imaging., *Biol. Pharm. Bull.* 18 (1995) 1572–1575.  
<https://doi.org/10.1248/bpb.18.1572>.
- [34] J. Sun, S. Wang, W. Bu, M.Y. Wei, W.W. Li, M.N. Yao, Z.Y. Ma, C.T. Lu, H.H. Li, N.P. Hu, E.H. Zhang, G.D. Yang, A.D. Wen, X.H. Zhu, Synthesis of a novel adamantyl nitroxide derivative with potent anti-hepatoma activity in vitro and in vivo, *Am. J. Cancer Res.* 6 (2016) 1271–1286.
- [35] L. Xia, C. Zhang, M. Li, K. Wang, Y. Wang, P. Xu, Y. Hu, Nitroxide-radicals-modified gold nanorods for in vivo CT/MRI-guided photothermal cancer therapy, *Int. J. Nanomedicine*. Volume 13 (2018) 7123–7134. <https://doi.org/10.2147/IJN.S171804>.
- [36] R.J. Mehlhorn, Ascorbate- and dehydroascorbic acid-mediated reduction of free radicals in the human erythrocyte, *J. Biol. Chem.* 266 (1991) 2724–2731.  
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)49905-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)49905-X).
- [37] R. M. Davis, J. B. Mitchell, M. C. Krishna, Nitroxides as cancer imaging agents, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 11 (2011) 347–358.  
<https://doi.org/10.2174/187152011795677526>.
- [38] I.A. Kirilyuk, A.A. Bobko, S. V. Semenov, D.A. Komarov, I.G. Irtegov, I.A. Grigorev, E. Bagryanskaya, Effect of sterical shielding on the redox properties of imidazoline and imidazolidine nitroxides, *J. Org. Chem.* 80 (2015) 9118–9125.  
<https://doi.org/10.1021/acs.joc.5b01494>.
- [39] L. Marx, R. Chiarelli, T. Guiberteau, A. Rassat, A comparative study of the reduction by ascorbate of 1,1,3,3-tetraethylisindolin-2-yloxyl and of 1,1,3,3-tetramethylisindolin-2-yloxyl, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1.* (2000) 1181–1182.  
<https://doi.org/10.1039/b001891k>.
- [40] Y. Kinoshita, K. Yamada, T. Yamasaki, F. Mito, M. Yamato, N. Kosem, H. Deguchi, C. Shirahama, Y. Ito, K. Kitagawa, N. Okukado, K. Sakai, H. Utsumi, In vivo evaluation of novel nitroxyl radicals with reduction stability, *Free Radic. Biol. Med.* 49 (2010) 1703–1709. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.027>.
- [41] T. Yamasaki, F. Mito, Y. Ito, S. Pandian, Y. Kinoshita, K. Nakano, R. Murugesan, K. Sakai, H. Utsumi, K. Yamada, Structure–reactivity relationship of piperidine nitroxide: electrochemical, ESR and computational studies, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 435–440.  
<https://doi.org/10.1021/jo101961m>.
- [42] W. Ostwald, *Lehrbuch der allgemeinen chemie*, (1902).
- [43] S.R. Burks, M.A. Makowsky, Z.A. Yaffe, C. Hoggle, P. Tsai, S. Muralidharan, M.K. Bowman, J.P.Y. Kao, G.M. Rosen, The effect of structure on nitroxide EPR spectral linewidth, *J. Org. Chem.* 75 (2010) 4737–4741. <https://doi.org/10.1021/jo1005747>.
- [44] D.L. Marshall, G. Gryn'ova, B.L.J. Poad, S.E. Bottle, A.J. Trevitt, M.L. Coote, S.J.

- Blanksby, Experimental evidence for long-range stabilizing and destabilizing interactions between charge and radical sites in distonic ions, *Int. J. Mass Spectrom.* 435 (2019) 195–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2018.10.031>.
- [45] G. Gryn'ova, D.L. Marshall, S.J. Blanksby, M.L. Coote, Switching radical stability by pH-induced orbital conversion, *Nat. Chem.* 5 (2013) 474–481. <https://doi.org/10.1038/nchem.1625>.
- [46] G. Gryn'ova, M.L. Coote, Origin and scope of long-range stabilizing interactions and associated SOMO-HOMO conversion in distonic radical anions, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 15392–15403. <https://doi.org/10.1021/ja404279f>.
- [47] G.A.A. Saracino, A. Tedeschi, G. D'Errico, R. Improta, L. Franco, M. Ruzzi, C. Corvaia, V. Barone, Solvent polarity and pH effects on the magnetic properties of ionizable nitroxide radicals: A combined computational and experimental study of 2,2,5,5-tetramethyl-3-carboxypyrrolidine and 2,2,6,6-tetramethyl-4-carboxypiperidine nitroxides, *J. Phys. Chem. A.* 106 (2002) 10700–10706. <https://doi.org/10.1021/jp026492e>.
- [48] M. V. Edeleva, I.A. Kirilyuk, I.F. Zhurko, D.A. Parkhomenko, Y.P. Tsentalovich, E.G. Bagryanskaya, pH-Sensitive C-ON bond homolysis of alkoxyamines of imidazoline series with multiple ionizable groups as an approach for control of nitroxide mediated polymerization, *J. Org. Chem.* 76 (2011) 5558–5573. <https://doi.org/10.1021/jo200341m>.
- [49] K. Takeshita, K. Saito, J.I. Ueda, K. Anzai, T. Ozawa, Kinetic study on ESR signal decay of nitroxyl radicals, potent redox probes for in vivo ESR spectroscopy, caused by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1573 (2002) 156–164. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00420-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00420-8).
- [50] K. Kaur, R.G. Salomon, J. O'Neil, H.F. Hoff, (Carboxyalkyl)pyrroles in human plasma and oxidized low-density lipoproteins, *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 1387–1396. <https://doi.org/10.1021/tx970112c>.
- [51] M. Sun, R.G. Salomon, Oxidative fragmentation of hydroxy octadecadienoates generates biologically active  $\gamma$ -hydroxyalkenals, *J. Am. Chem. Soc.* 126 (2004) 5699–5708. <https://doi.org/10.1021/ja038756w>.
- [52] Y. Son, Y.-K. Cheong, N.-H. Kim, H.-T. Chung, D.G. Kang, H.-O. Pae, Mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species: how can ROS activate MAPK pathways?, *J. Signal Transduct.* 2011 (2011) 1–6. <https://doi.org/10.1155/2011/792639>.
- [53] M. Araseki, H. Kobayashi, M. Hosokawa, K. Miyashita, Lipid peroxidation of a human hepatoma cell line (HepG2) after incorporation of linoleic acid, arachidonic acid, and docosahexaenoic acid, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69 (2005) 483–490.

- <https://doi.org/10.1271/bbb.69.483>.
- [54] L.T. Rael, G.W. Thomas, M.L. Craun, C.G. Curtis, R. Bar-Or, D. Bar-Or, Lipid peroxidation and the thiobarbituric acid assay: standardization of the assay when using saturated and unsaturated fatty acids, *BMB Rep.* 37 (2004) 749–752.  
<https://doi.org/10.5483/BMBRep.2004.37.6.749>.
- [55] J. V. Bruckner, R. Ramanathan, K.M. Lee, S. Muralidhara, Mechanisms of circadian rhythmicity of carbon tetrachloride hepatotoxicity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 300 (2002) 273–281. <https://doi.org/10.1124/jpet.300.1.273>.
- [56] L. Knockaert, A. Berson, C. Ribault, P.E. Prost, A. Fautrel, J. Pajaud, S. Lepage, C. Lucas-Clerc, J.M. Bégué, B. Fromenty, M.A. Robin, Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver, *Lab. Investig.* 92 (2012) 396–410. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2011.193>.
- [57] B.A. Mico, L.R. Pohl, Reductive oxygenation of carbon tetrachloride: Trichloromethylperoxyl radical as a possible intermediate in the conversion of carbon tetrachloride to electrophilic chlorine, *Arch. Biochem. Biophys.* 225 (1983) 596–609. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(83\)90071-1](https://doi.org/10.1016/0003-9861(83)90071-1).
- [58] P. Abraham, G. Wilfred, S.P. Cathrine, Oxidative damage to the lipids and proteins of the lungs, testis and kidney of rats during carbon tetrachloride intoxication, *Clin. Chim. Acta.* 289 (1999) 177–179. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00140-0](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00140-0).
- [59] C. Dai, X. Xiao, D. Li, S. Tun, Y. Wang, T. Velkov, S. Tang, Chloroquine ameliorates carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice via the concomitant inhibition of inflammation and induction of apoptosis, *Cell Death Dis.* 9 (2018).  
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-1136-2>.
- [60] D.G. Zhang, C. Zhang, J.X. Wang, B.W. Wang, H. Wang, Z.H. Zhang, Y.H. Chen, Y. Lu, L. Tao, J.Q. Wang, X. Chen, D.X. Xu, Obeticholic acid protects against carbon tetrachloride-induced acute liver injury and inflammation, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 314 (2017) 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2016.11.006>.
- [61] W. Chen, Z. Zhang, Z. Yao, L. Wang, F. Zhang, J. Shao, A. Chen, S. Zheng, Activation of autophagy is required for Oroxylin A to alleviate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis and hepatic stellate cell activation, *Int. Immunopharmacol.* 56 (2018) 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.01.029>.
- [62] P. Pääkkö, S. Anttila, R. Sormunen, L. Ala-Kokko, R. Peura, V.J. Ferrans, L. Ryhänen, Biochemical and morphological characterization of carbon tetrachloride-induced lung fibrosis in rats, *Arch. Toxicol.* 70 (1996) 540–552.  
<https://doi.org/10.1007/s002040050311>.
- [63] C.V. Andrițoiu, V. Andrițoiu, M. Cuciureanu, D. Nica-Badea, N. Bibire, M. Popa, Effect

- of apitherapy products against carbon tetrachloride-induced toxicity in wistar rats, *Rom. J. Morphol. Embryol.* 55 (2014) 835–847.
- [64] S.A. Ganie, E. Haq, A. Hamid, Y. Qurishi, Z. Mahmood, B.A. Zargar, A. Masood, M.A. Zargar, Carbon tetrachloride induced kidney and lung tissue damages and antioxidant activities of the aqueous rhizome extract of *Podophyllum hexandrum*, *BMC Complement. Altern. Med.* 11 (2011). <https://doi.org/10.1186/1472-6882-11-17>.
- [65] C. Prescott, S.E. Bottle, Biological relevance of free radicals and nitroxides, *Cell Biochem. Biophys.* 75 (2017) 227–240. <https://doi.org/10.1007/s12013-016-0759-0>.
- [66] E. Madej, P. Wardman, The oxidizing power of the glutathione thiyl radical as measured by its electrode potential at physiological pH, *Arch. Biochem. Biophys.* 462 (2007) 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.03.002>.
- [67] G.R. Buettner, The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation,  $\alpha$ -tocopherol, and ascorbate, *Arch. Biochem. Biophys.* 300 (1993) 535–543. <https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1074>.
- [68] E. Choong, M. Dobrin, P.-A. Carrupt, C.B. Eap, The permeability P-glycoprotein: a focus on enantioselectivity and brain distribution, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 6 (2010) 953–965. <https://doi.org/10.1517/17425251003789394>.
- [69] H.S. Markus, Cerebral perfusion and stroke, *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 75 (2004) 353–361. <https://doi.org/10.1136/jnnp.2003.025825>.
- [70] C.K. Willie, K.J. Smith, Fuelling the exercising brain: a regulatory quagmire for lactate metabolism, *J. Physiol.* 589 (2011) 779–780. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.204776>.
- [71] K.J. Smith, P.N. Ainslie, Regulation of cerebral blood flow and metabolism during exercise, *Exp. Physiol.* 102 (2017) 1356–1371. <https://doi.org/10.1113/EP086249>.
- [72] 脳卒中データベース2021, (2021).
- [73] M.E. Stromski, K. Cooper, G. Thulin, K.M. Gaudio, N.J. Siegel, R.G. Shulman, Chemical and functional correlates of postischemic renal ATP levels., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 (1986) 6142–6145. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.16.6142>.
- [74] S.L. Linas, D. Whittenburg, J.E. Repine, Role of xanthine oxidase in ischemia/reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Physiol.* 258 (1990) F711–F716. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1990.258.3.F711>.
- [75] D.N. Granger, P.R. Kvietys, Reperfusion injury and reactive oxygen species: The evolution of a concept, *Redox Biol.* 6 (2015) 524–551. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.08.020>.
- [76] M.-S. Sun, H. Jin, X. Sun, S. Huang, F. Zhang, Z. Guo, Y. Yang, Free radical damage in ischemia-reperfusion injury: an obstacle in acute ischemic stroke after revascularization



- therapy, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018 (2018) 1–17.  
<https://doi.org/10.1155/2018/3804979>.
- [77] C. Chen, M. Li, L. Lin, S. Chen, Y. Chen, L. Hong, Clinical effects and safety of edaravone in treatment of acute ischaemic stroke: A meta-analysis of randomized controlled trials, *J. Clin. Pharm. Ther.* 46 (2021) 907–917.  
<https://doi.org/10.1111/jcpt.13392>.
- [78] M. Fidalgo, J. Ricardo Pires, I. Viseu, P. Magalhães, H. Gregório, V. Afreixo, T. Gregório, Edaravone for acute ischemic stroke – Systematic review with meta-analysis., *Clin. Neurol. Neurosurg.* 219 (2022) 107299.  
<https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2022.107299>.
- [79] E.Z. Longa, P.R. Weinstein, S. Carlson, R. Cummins, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats., *Stroke.* 20 (1989) 84–91.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.20.1.84>.
- [80] Keith B.J. Franklin, George Paxinos. Paxinos and Franklin's the mouse brain in stereotaxic coordinates, compact. The coronal plates and diagrams (5th Edition). Academic Press., (2019).
- [81] Y. Matsuoka, Y. Izumi, M. Takahashi, T. Bamba, K. Yamada, Method for structural determination of lipid-derived radicals, *Anal. Chem.* 92 (2020) 6993–7002.  
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c00053>.
- [82] T. Watanabe, M. Tanaka, K. Watanabe, Y. Takamatsu, A. Tobe, Research and development of the free radical scavenger edaravone as a neuroprotectant, *YAKUGAKU ZASSHI.* 124 (2004) 99–111. <https://doi.org/10.1248/yakushi.124.99>.
- [83] H. Kawai, H. Nakai, M. Suga, S. Yuki, T. Watanabe, K.I. Saito, Effects of a novel free radical scavenger, MCI-186, on ischemic brain damage in the rat distal middle cerebral artery occlusion model., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281 (1997) 921–7.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9152402>.
- [84] H.K. Lee, J.Y. Jang, H.-S. Yoo, Y.H. Seong, Neuroprotective effect of 1,3-dipalmitoyl-2-oleoylglycerol derived from rice bran oil against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats, *Nutrients.* 14 (2022) 1380. <https://doi.org/10.3390/nu14071380>.
- [85] Q. Zhang, M. Yao, J. Qi, R. Song, L. Wang, J. Li, X. Zhou, D. Chang, Q. Huang, L. Li, N. Wang, Puerarin inhibited oxidative stress and alleviated cerebral ischemia-reperfusion injury through PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway, *Front. Pharmacol.* 14 (2023) 1–14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1134380>.
- [86] H. Yu, Z. Wu, X. Wang, C. Gao, R. Liu, F. Kang, M. Dai, Protective effects of combined treatment with mild hypothermia and edaravone against cerebral ischemia/reperfusion injury via oxidative stress and Nrf2 pathway regulation, *Int. J.*

- Oncol. 57 (2020) 500–508. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.5077>.
- [87] J. Mršić-Pelčić, K. Pilipović, G. Pelčić, D. Vitezić, G. Župan, Decrease in oxidative stress parameters after post-ischaemic recombinant human erythropoietin administration in the hippocampus of rats exposed to focal cerebral ischaemia, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 121 (2017) 453–464. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12833>.
- [88] G.Y. Sun, D.Y. Chuang, Y. Zong, J. Jiang, J.C.M. Lee, Z. Gu, A. Simonyi, Role of cytosolic phospholipase A2 in oxidative and inflammatory signaling pathways in different cell types in the central nervous system, *Mol. Neurobiol.* 50 (2014) 6–14. <https://doi.org/10.1007/s12035-014-8662-4>.
- [89] C. Nito, H. Kamada, H. Endo, K. Niizuma, D.J. Myer, P.H. Chan, Role of the p38 mitogen-activated protein kinase/cytosolic phospholipase A 2 signaling pathway in blood—brain barrier disruption after focal cerebral ischemia and reperfusion, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28 (2008) 1686–1696. <https://doi.org/10.1038/jcbfm.2008.60>.
- [90] M.N. Hoda, I. Singh, A.K. Singh, M. Khan, Reduction of lipoxidative load by secretory phospholipase A2 inhibition protects against neurovascular injury following experimental stroke in rat, *J. Neuroinflammation.* 6 (2009) 21. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-21>.
- [91] H. Sato-Akaba, M. Tseytlin, Development of an L-band rapid scan EPR digital console, *J. Magn. Reson.* 304 (2019) 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2019.05.003>.
- [92] H. Sato-Akaba, M.C. Emoto, H. Hirata, H.G. Fujii, Design and testing of a 750 MHz CW-EPR digital console for small animal imaging, *J. Magn. Reson.* 284 (2017) 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.jmr.2017.09.008>.
- [93] M.C. Emoto, H. Sato-Akaba, N. Hamaue, K. Kawanishi, H. Koshino, S. Shimohama, H.G. Fujii, Early detection of redox imbalance in the APP<sup>swe</sup>/PS1<sup>dE9</sup> mouse model of Alzheimer’s disease by in vivo electron paramagnetic resonance imaging, *Free Radic. Biol. Med.* 172 (2021) 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2021.05.035>.
- [94] Gaussian16, revision A.03, M.J. Frisch, G.W. Trucks, H.B. Schlegel, G.E. Scuseria, M.A. Robb, J.R. Cheeseman, G. Scalmani, V. Barone, G.A. Petersson, H. Nakatsuji, X. Li, M. Caricato, A.V. Marenich, J. Bloino, B.G. Janesko, R. Gomperts, B. Mennucci, H.P. Hratchian, J.V. Ortiz, A.F. Izmaylov, J.L. Sonnenberg, D. Williams-Young, F. Ding, F. Lipparini, F. Egidi, J. Goings, B. Peng, A. Petrone, T. Henderson, D. Ranasinghe, V.G. Zakrzewski, J. Gao, N. Rega, G. Zheng, W. Liang, M. Hada, M. Ehara, K. Toyota, R. Fukuda, J. Hasegawa, M. Ishida, T. Nakajima, Y. Honda, O. Kitao, H. Nakai, T. Vreven, K. Throssell, J.A. Montgomery, Jr., J.E. Peralta, F. Ogliaro, M.J. Bearpark, J.J. Heyd, E.N. Brothers, K.N. Kudin, V.N. Staroverov, T.A. Keith, R. Kobayashi, J. Normand, K. Raghavachari, A.P. Rendell, J.C. Burant, S.S. Iyengar, J.

- Tomasi, M. Cossi, J.M. Millam, M. Klene, C. Adamo, R. Cammi, J.W. Ochterski, R.L. Martin, K. Morokuma, O. Farkas, J.B. Foresman, D.J. Fox, Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2016.
- [95] M.C. Emoto, H. Sato-Akaba, H. Hirata, H.G. Fujii, Dynamic changes in the distribution and time course of blood-brain barrier-permeative nitroxides in the mouse head with EPR imaging: Visualization of blood flow in a mouse model of ischemia, *Free Radic. Biol. Med.* 74 (2014) 222–228. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.06.026>.
- [96] E.G. Bligh, W.J. Dyer, A rapid method of total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (1959) 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>.
- [97] Z.A. Shah, R.A. Gilani, P. Sharma, S.B. Vohora, Cerebroprotective effect of Korean ginseng tea against global and focal models of ischemia in rats, *J. Ethnopharmacol.* 101 (2005) 299–307. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.05.002>.
- [98] X. Qi, Y. Okuma, T. Hosoi, Y. Nomura, Edaravone protects against hypoxia/ischemia-induced endoplasmic reticulum dysfunction, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 311 (2004) 388–393. <https://doi.org/10.1124/jpet.104.069088>.
- [99] M. Okazaki, N. Iwata, S. Horiuchi, S. Kamiuchi, F. Suzuki, H. Iizuka, Y. Hibino, Protective effects of a water-soluble extract from culture medium of *ganoderma lucidum* mycelia against neuronal damage after hypoxia-ischemia in mice, *Japanese J. Complement. Altern. Med.* 5 (2008) 153–162. <https://doi.org/10.1625/jcam.5.153>.
- [100] H. Panahpour, M. Farhoudi, Y. Omid, J. Mahmoudi, An In Vivo assessment of blood-brain barrier disruption in a rat model of ischemic stroke, *J. Vis. Exp.* 2018 (2018) 1–5. <https://doi.org/10.3791/57156>.