
ガドリニウム系磁気共鳴イメージング用造影剤の
機能化に関する研究

(課題番号 13640586)

平成13年度～平成15年度科学研究費補助金（基盤研究(C)(2)）
研究成果報告書

平成16年3月

研究代表者 笛吹修治

(広島国際大学保健医療学部)

は し が き

研究組織

研究代表者：笛吹修治（広島国際大学保健医療学部）

研究協力者：深澤義正（広島大学大学院理学研究科）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	2,400	0	2,400
平成14年度	600	0	600
平成15年度	600	0	600
総計	3,600	0	3,600

研究発表

（1）学会誌等

H. Iwamoto, M. Hirakata, S. Usui, T. Haino and Y. Fukazawa
Dynamic structure of inclusion complexes of
monodeoxycalix[4]arene with small organic guests in solution.
Tetrahedron Letters, 43(1), 85-87 (2002).

M. Hirakata, K. Yoshimura, S. Usui, K. Nishimoto, and Y.
Fukazawa
Binding of guest with monodeoxycalix[4]arene host in solid state.
Tetrahedron Letters, 43(10), 1859-1861 (2002).

（2）口頭発表

笛吹修治、井出本清彦
磁気共鳴イメージング用ガドリニウム系造影剤の機能化
第20回機能性ホスト-ゲスト化学研究会、2004年3月

1. 序 論

磁気共鳴イメージング (MRI) は1980年代に人体の断層映像が臨床に応用されて以来急速に進歩し、現在では医療診断上重要な位置を占めるようになった。一方、MRIの進歩と共に、組織間のコントラストを上げるために、MRI用造影剤の研究も盛んに行われている¹⁾。現在、最も一般的に用いられている造影剤はガドリニウム系の化合物であるが、必ずしも正常組織と病変を明確に区別できない場合もある。そこで病変を早期に発見するためには、特定の組織や細胞に選択的に集まる造影剤が求められている。

本研究においては、このような組織や細胞 (例えば腫瘍細胞) 特異性をもつMRI造影剤の開発を行うことを目的としている。この目的を達成するためには、まず金属配位子の各種官能基化が容易に行えることが必要であるが、従来の造影剤 [ジエチレントリアミン5酢酸 (DTPA) 系やテトラアザシクロドデカン4酢酸 (DOTA) 系等] では選択的な官能基化に困難があった。そこで本研究においては、造影剤の基本骨格として、サリチルアルデヒド誘導体とポリアミン類の縮合で得られるシッフ塩基配位子を用いた。この骨格においてはアミン部分とベンゼン環部分への選択的な官能基の導入が容易であるという特徴をもっている。

このような組織特異的な造影剤の開発は腫瘍の早期発見や診断に有効であるばかりでなく、さらに、これらの造影剤に放射線の増感剤としての機能 (例えば芳香環の色素化やラジカル開裂種の導入) を付加することにより、腫瘍の治療にも応用できる可能性をもつものである。このような、多機能性をもつ造影剤は現在ほとんど知られていないため、本研究で開発する造影剤のもつ意義は大きいと考えている。

近年、国内外で行われている同様な研究としては、例えば、米国の Bertozzi

らによる腫瘍細胞表面の sialic acid をターゲットとした DTPA 系造影剤²⁾、Meade らによるカルシウムイオンに応答する DOTA 系造影剤³⁾、東工大の Maruyama らによる pH 変化に応答する DTPA 系造影剤⁴⁾ などがあり、また、治療を目的とした造影剤としては Sessler らの Texaphyrin (大環状のポルフィリン類縁体) を利用したものも知られている⁵⁾。

しかし、これらの造影剤はいずれも合成法としては煩雑であり、実用に供するには、より合成容易な骨格が望まれる。この点で本研究で用いた骨格は、合成、官能基の導入が容易であるため、より効率的な造影剤となるものと確信する。

参考文献

- 1) "The Chemistry of Contrast Agents in Medical Magnetic Resonance Imaging", Merbach, A. E.; Toth, E. Ed., John Wiley & Sons, Ltd (2001).
- 2) Lemieux, G. A.; Yarema, K. J.; Jacobs, C. L.; Bertozzi, C. R., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 4279-4279 (1999).
- 3) Li, W-h.; Fraser, S. E.; Meade, T. J., *J. Am. Chem. Soc.*, **121**, 1413-1414 (1999).
- 4) Mikawa, M.; Miwa, N.; Brautigam, M.; Akaike, T.; Maruyama, A., *Chem. Lett.*, **1998**, 693-694.
- 5) Sessler, J. L.; Johnson, M. J.; Lynch, V., *Org. Chem.*, **52**, 4394-4397 (1987).

2. ガドリニウム系配位子

2-1. ガドリニウム系配位子の分類

MRI用造影剤にはガドリニウムや鉄イオンなどの常磁性体や、酸化鉄粒子などの超常磁性体が使われている。中でもガドリニウムイオンは7個の不対電子をもつため緩和度が大きく、現在臨床に用いられている造影剤の主流となっている。ガドリニウム系造影剤はガドリニウム配位子の構造により、鎖状と環状、またイオン性と非イオン性に大別されている。鎖状配位子の代表的なものはdiethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) (1) であり、 Gd^{3+} とはイオン性の錯体を形成する。また、DTPAの二つの酢酸基をメチルアミド化したDTPA-BMA (2) は Gd^{3+} と非イオン性錯体をつくる (Fig 2.1)。

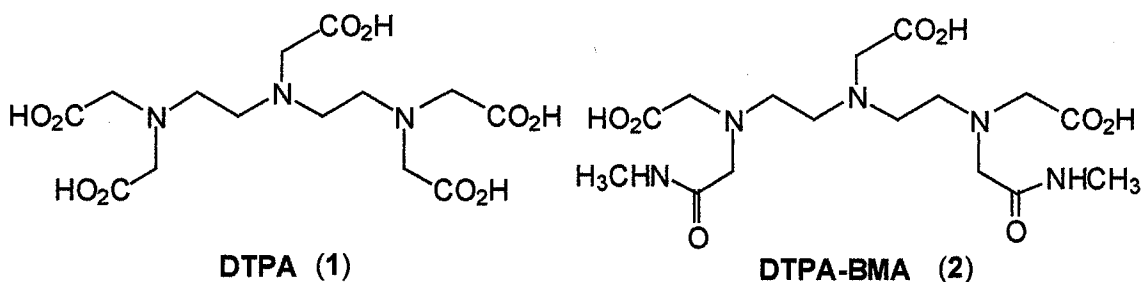


Figure 2.1

一方、環状配位子としては、1,4,7,10-tetra(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecane (DOTA) (3) とその一つの酢酸基を2-hydroxypropyl基に変換したHP-DO3A (4) などがあり、 Gd -DOTA はイオン性、 Gd -HP-DO3A は非イオン性錯体を形成する (Fig 2.2)。

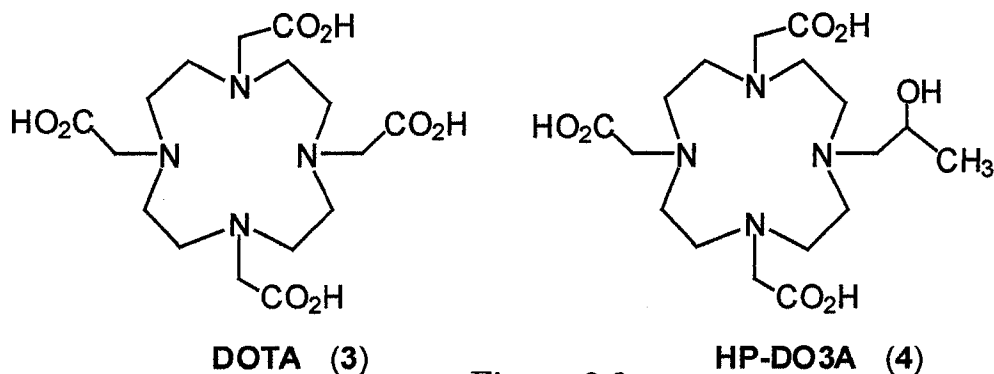


Figure 2.2

Gd 錯体の安定度定数 ($\log K_{GdL}$) は、Gd-DTPA が 22.5、Gd-DTPA-BMA が 16.9 に対して、Gd-DOTA が 25.3、Gd-HP-DO3A が 23.8 と、環状配位子の方が高い¹⁾。また、非イオン性のものが一般には浸透圧が低いため安全性が高く短時間での多量投与が可能である²⁾。臨床的にはX線のヨード系造影剤と比較すると投与量が少ないため、いずれも安全性の高い造影剤として利用されている。

Fig 2.3 に現在、臨床に用いられている造影剤を示す。

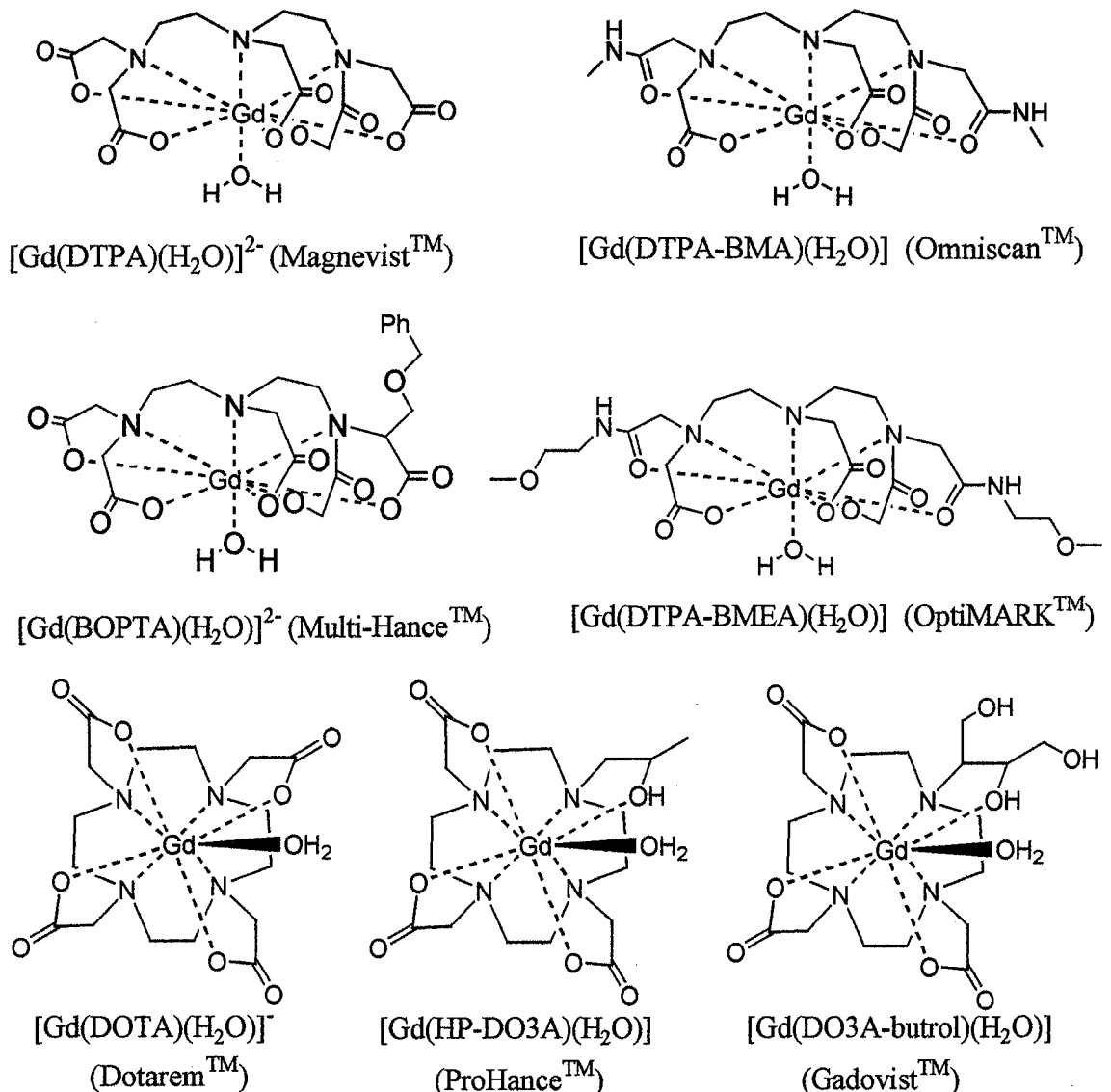


Figure 2.3

これらの造影剤はしかしながら、組織や病変に特異性を示さないため、現在、組織特異性や病変、特に腫瘍細胞をターゲットとした造影剤の開発が盛んに行われている。

2-2. 緩和機構

MR I においては様々な画像化のためのシーケンスが用いられているが、最も基本的なものはスピネコー (SE) 法である。スピネコー法についての詳しい説明は他の成書³⁾にゆずるが、その画像コントラストは主に次の3つのパラメータによって決定されている。1つはプロトン密度 (P_d) であり、生体内の¹H 原子核の数が多いほど信号強度が高くなる。残る2つは¹H 原子核の緩和に関係するもので、縦緩和時間 (T_1) と横緩和時間 (T_2) によって信号強度が変化する。この関係は式(1)で表される。

$$I_{SE} = P_d \cdot \{1 - \exp(-TR/T_1)\} \cdot \exp(-TE/T_2) \quad (1)$$

(TR: 繰り返し時間、 TE: エコー時間)

MR I 用造影剤の役割は、これらの緩和時間を短縮する効果があり、 T_1 短縮が主に効く場合、信号強度は上昇するため陽性造影剤として働く。一方、造影剤の濃度が高くなると T_2 短縮が主に働くため、信号強度は減少し陰性造影剤となる。一般に造影効果は、陽性 (周囲よりも明るくなる) の方が、検出しやすいため T_1 短縮が主に効く濃度条件で使われることが多い。すなわち、 T_1 のみ短縮し T_2 を短縮しない造影剤が理想の陽性造影剤といえる。特に近年、MR I 装置の磁場強度の上昇に伴い、 T_1 値が長くなる傾向があるため、 T_1 値を短縮する造影剤が求められている。

観測される T_1 緩和速度 ($1/T_1$)_{obs} は、反磁性緩和速度 ($1/T_1$)_d と常磁

性緩和速度 $(1/T_1)_p$ の和として表される (式2)。

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_d + (1/T_1)_p \quad (2)$$

常磁性緩和速度は、造影剤 (常磁性体) の濃度 $[C](\text{mmol/l})$ に比例して変化するので、

$$(1/T_1)_{obs} = (1/T_1)_d + R_1 [C] \quad (3)$$

となる。ここで、 $(1/T_1)_d$ は造影剤が無い時の緩和速度、 R_1 は造影剤の緩和度 $(\text{s} \cdot \text{mmol/l})^{-1}$ を示す。すなわち、造影剤の濃度に対して緩和速度をプロットすれば、その直線の傾きから緩和度 R_1 を求めることができる。緩和度 R_1 は温度と磁場の強さに依存し、緩和度が大きい造影剤ほど緩和効果が高い。

常磁性緩和の機構としては、配位圏内緩和 (Inner-Sphere relaxation) と配位圏外緩和 (Outer-Sphere relaxation) の2つに分けられる⁴⁾。前者は常磁性金属イオンに水分子が直接配位するか、または配位子に水素結合している場合であり、後者は水分子が常磁性金属イオンの外配位圏に近づくことによるものである (Fig 2.4)。

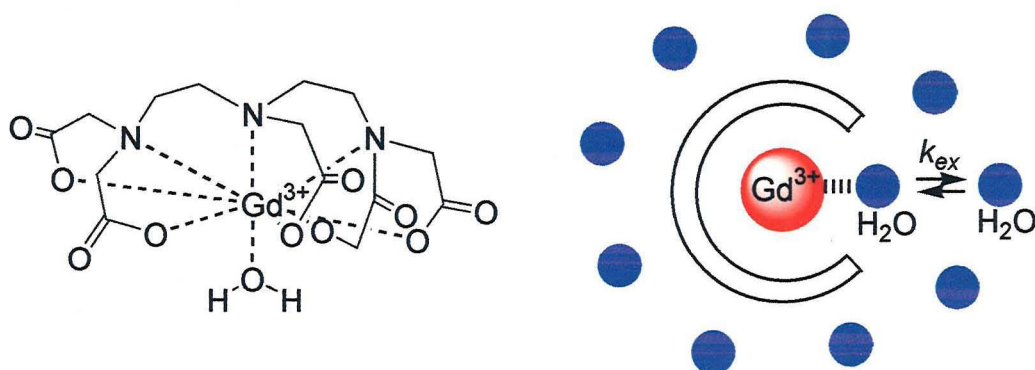


Figure 2.4

常磁性体による T_1 短縮効果は、その電子スピンと水分子中の ^1H 核スピンの

一定時間磁気的な相互作用をし、その後、周囲の水分子と交換することによって生じる。従って、配位水の数が多い程、配位子へ水分子が近づきやすい程、また水分子の交換速度が大きい程、緩和度は大きくなる。

Fig 2.4 に示した Gd-DTPA 錯体では、DTPA 配位子は 8 配位構造 (3つの N、5つの COO^-) であり、水分子が 1 つ配位することによって 9 配位構造となっている。

2-3. 配位子の設計

現在までに合成されている配位子としては、鎖状配位子と環状配位子に分類される。新規ガドリニウム配位子の設計に際しては前項まで述べてきた点を考慮しなければならないが、さらに組織特異性などを構造に付加するためには、様々な官能基の導入が容易な骨格を用いる必要がある。

錯体の安定性では環状配位子が優っているが、環状構造の合成や選択的官能基の導入は容易とは云えない。一方、鎖状配位子の基本骨格としては DTPA 骨格を用いたものが多いが、選択的な官能基の導入をするためには煩雑な合成系路を必要とする。最も合成の容易な系としては、DTPA bisanhydride (5) を經由し、過剰のアミン誘導体との反応により DTPA bisamide (6) とする方法 (Fig 2.5) があるが⁵⁾、この骨格では 2 つのアミド基の酸素原子も配位可能なため、配位子としては DTPA 同様、8 配位構造となっている。

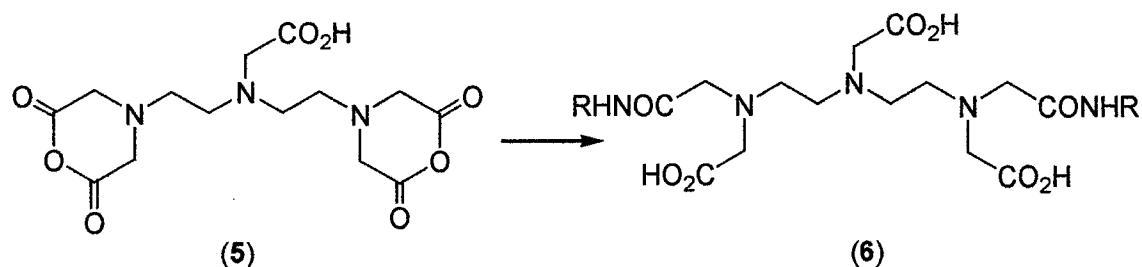


Figure 2.5

このため、ガドリニウムイオンには1分子の水しか配位できない。

他の鎖状配位子としては、アルデヒド誘導体とポリアミン誘導体の縮合で得られるシッフ配位子を経由するものがある。この方法は、アルデヒド誘導体とポリアミン誘導体に別々に官能基化が出来るという利点があり、合成経路としても比較的簡単であることから、様々な構造の配位子が合成されている (Fig 2.6)。

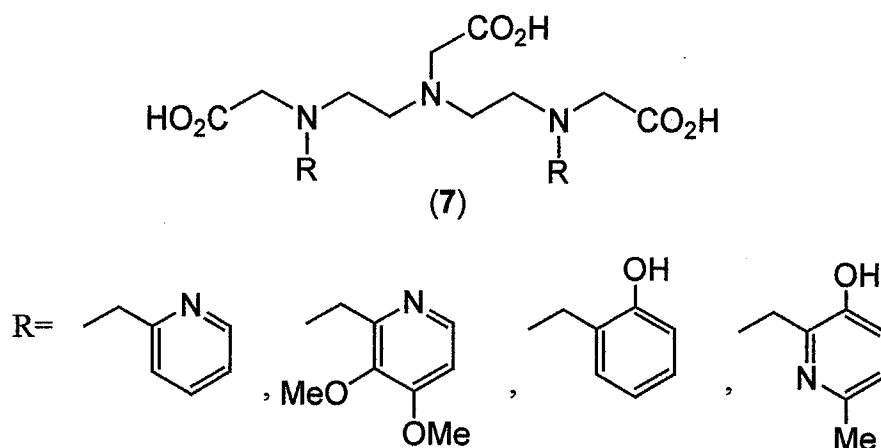


Figure 2.6

さらに、配位子 (7) は導入する R 側鎖にガドリニウムイオンに対して配位部位をもたないアルデヒド誘導体を持ちいることにより、配位数を6配位とすることも可能であり、より広範な化合物の合成ができる。このように7の骨格はいくつかの優れた点をもつことから、本研究においても基本骨格として用いることにした (Fig 2.7)。

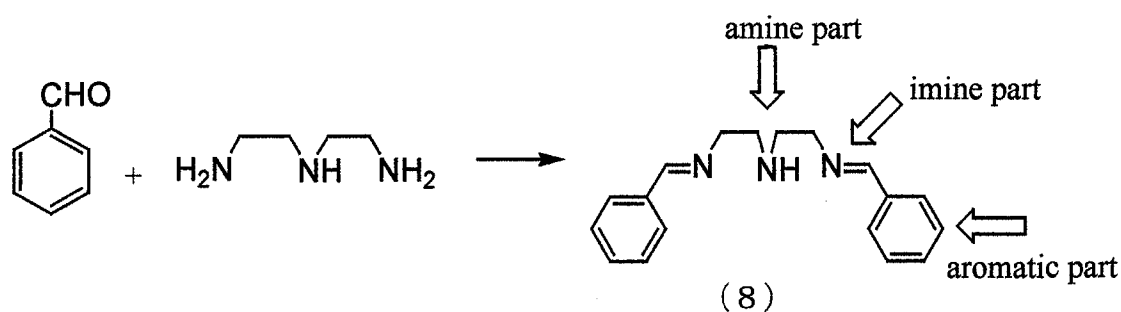


Figure 2.7

すなわち、benzaldehyde と diethylenetriamine との縮合で得られる Schiff 塩基 (8) は、芳香環、アミン、イミンの各部分に様々な官能基の導入ができることを利用し、目的化合物として 6 配位型の配位子 (9) および (10)、さらに tris(2-aminoethyl)amine との縮合により得られる 7 配位型の配位子 (11) の 3 つのシリーズの化合物を選んだ (Fig 2.8)。

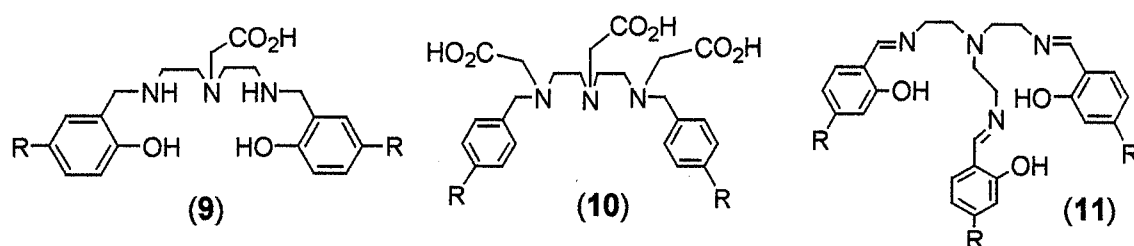


Figure 2.8

まず、配位子 (9) の合成経路は、サリチルアルデヒド誘導体 (12) と diethylenetriamine との縮合、ついでアミン部分への選択的酢酸基の導入を行った後、イミンの還元によって合成可能と考えた (Fig 2.9)。

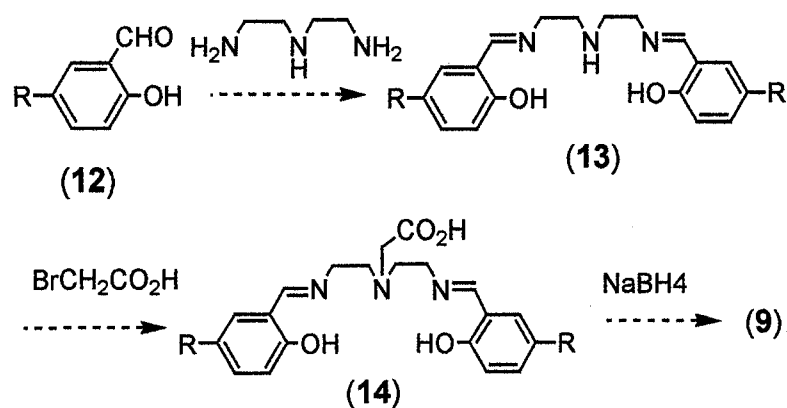


Figure 2.9

配位子 (10) についても同様な経路で合成できると思われる (Fig 2.10)。

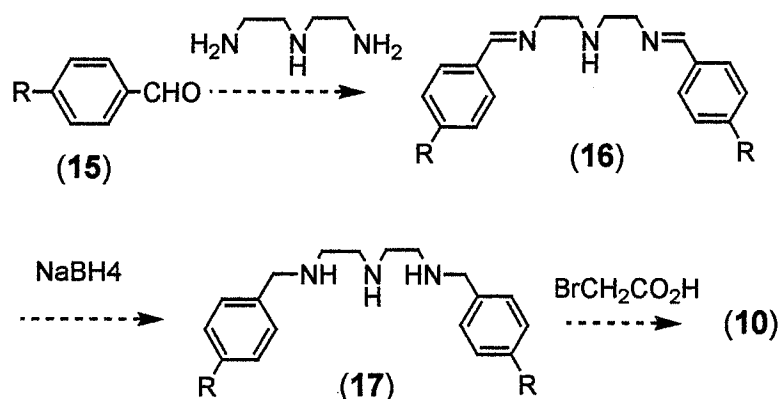


Figure 2.10

また、配位子 (11) は、サリチルアルデヒド誘導体 (18) と tris(2-aminoethyl)amine との縮合により 1 段階で合成可能である (Fig 2.11)。

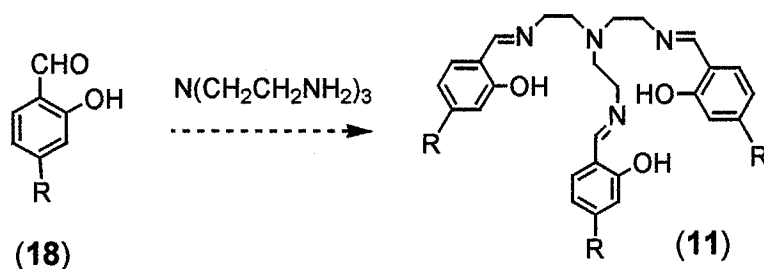


Figure 2.11

2-4. 配位子の合成

配位子 (9) の合成

前項の合成経路に従い、まずモデル実験として salicylaldehyde と diethylenetriamine の縮合を行った。エタノール中、diethylenetriamine に対して 2 当量の salicylaldehyde を反応させることにより、対応する Schiff 塩基 (13a) を得た。次に、13a のアミン部へ酢酸基を導入するため、エタノール中、炭酸ナトリウム存在下、1 当量のプロモ酢酸と反応を行ったが、目的のカルボン酸 (14) の単離構造決定には至らなかった。次に、化合物 13a とプロモ酢酸

メチルとの反応について、MeOH 中、無塩基、又は塩基存在下（炭酸ナトリウム、又はジイソプロピルエチルアミン）で行った。粗生成物の¹H-NMR スペクトルでは化合物 19a のメチルエステル部分に対応するシグナルが観測されるが、全体としてはやや複雑なシグナルを持つ生成物を与えた。粗生成物のスペクトルや、後処理、分離のし易さから、炭酸ナトリウム存在下の反応が最も期待できる結果であった (Fig 2.12)。

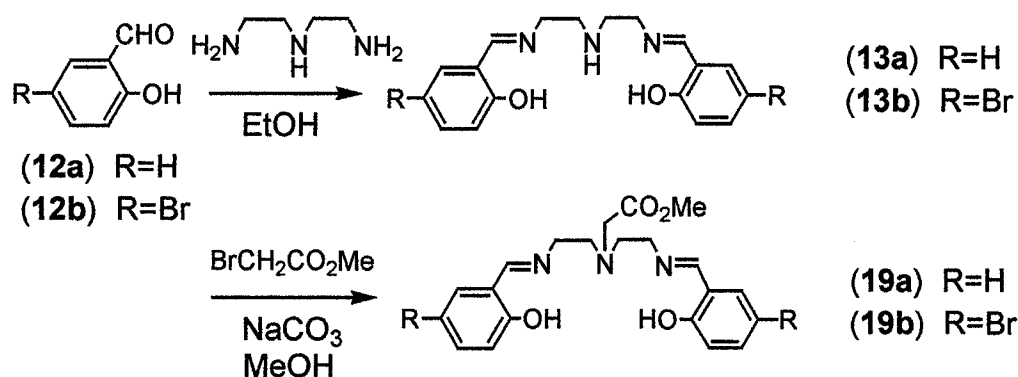


Figure 2.12

次に、結晶性の向上と芳香環水素の帰属のし易さを考慮して 5-bromosalicylaldehyde を用いて同様な反応を行ない、モノエステル体 (19b) の粗生成物を得た。構造決定のため、化合物 19 を Zn 錯体 (黄色固体) 及び Ni 錯体 (黄緑色固体) に誘導したが、X 線結晶解析に良好な結晶は得られなかった。化合物 19 の¹H-NMR スペクトルの複雑さは、フェノール部位へのアルキル化がおこっている可能性もあるため、フェノール部位を保護した化合物で同様な反応を行なった。

常法に従って 5-bromosalicylaldehyde のフェノールをメトキシメチル基で保護し (20)、アミンとの反応によりシッフ塩基 (21) とした。化合物 21 ではイミン二重結合の E、Z により 3 種類の異性体が存在する。化合物 21 をプロモ酢酸メチルと反応し (22)、次いで NaBH₄ でイミンの還元を行ってトリアミン誘

導体 (23) とした。化合物 23 の保護基を除去するため、6M-HCl 次いで、30% NaOH と処理して目的化合物 (9) とした (Fig 2.13)。

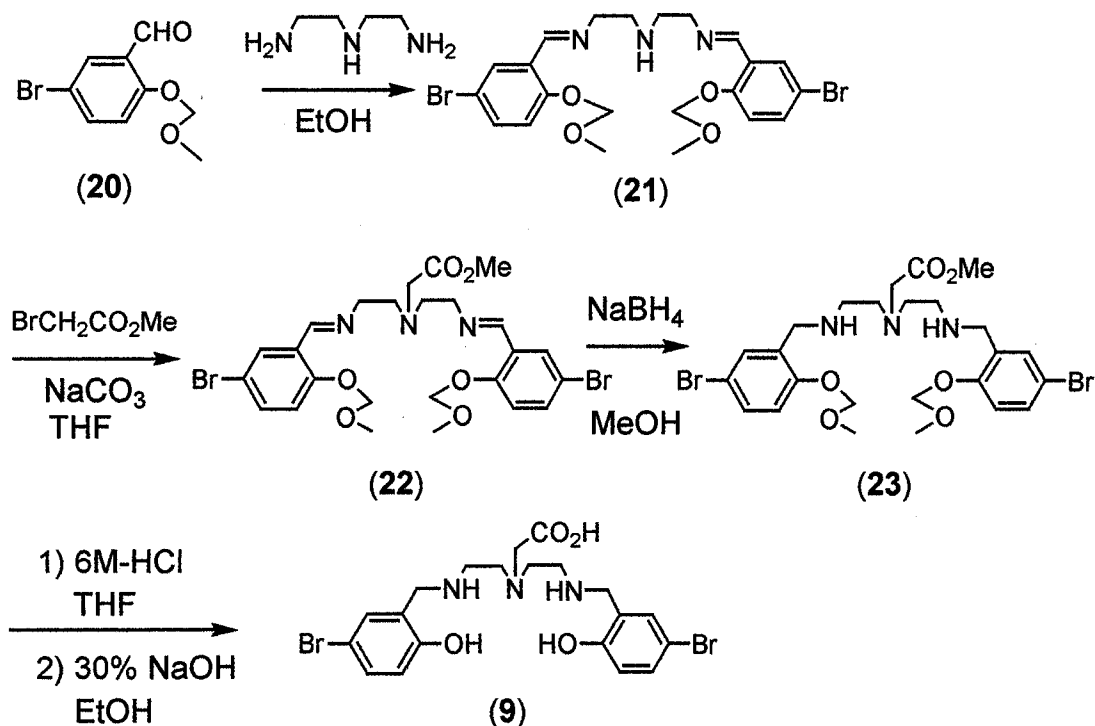


Figure 2.13

配位子 (10) の合成

6 座配位子 (10) については、p-anisaldehyde (15a) $\text{R}=\text{OMe}$ と 4-formyl-phenylboronic acid (15b) $\text{R}=\text{B}(\text{OH})_2$ を出発物質として反応を行った。ここで、ホウ酸基を官能基として選んだのは、ホウ酸誘導体は糖などの 1,2-ジオール構造をもつ化合物とホウ酸エステルをつくりやすいことから、細胞表面などの糖鎖の認識や、糖と結合させることにより体内動態の変化が期待されるからである。

まず、15a と diethylenetriamine との反応により対応するシッフ塩基 (16a) とし、次いで NaBH_4 で還元を行ってトリアミン誘導体 (17a) とした。次に、

酢酸基を導入するためブロモ酢酸と反応したが、目的化合物 (10a) を単離同定できなかった。そこで、*tert*-butyl bromoacetate を用いて酢酸基の導入を行った。THF 中、塩基としてジイソプロピルエチルアミンを用いると、トリエステル体 (24) が得られた。化合物 24 を過剰のトリフロロ酢酸で処理することにより、目的化合物 (10a) を得た (Fig 2.14)。

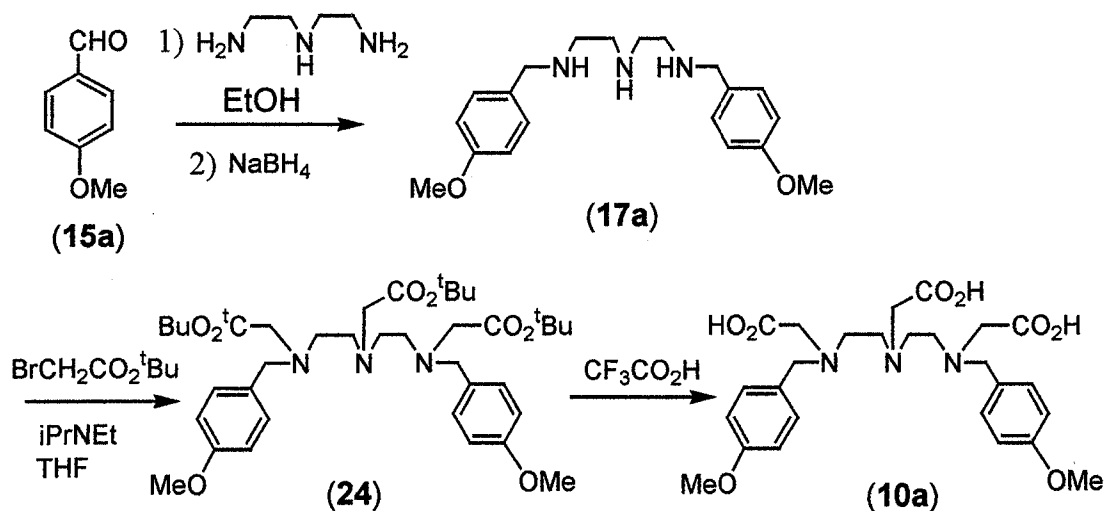


Figure 2.14

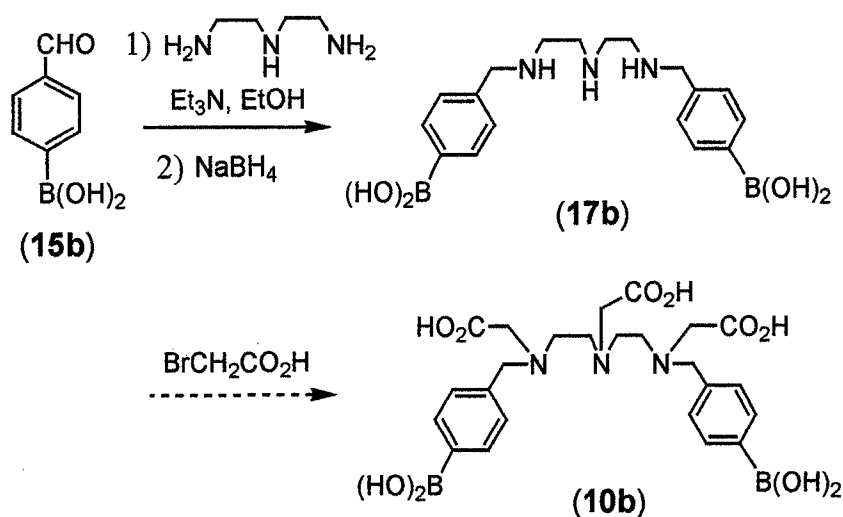


Figure 2.15

次に、4-formylphenylboronic acid (15b)を用いてホウ酸誘導体の合成を行った。diethylenetriamine との縮合後、NaBH₄還元によりトリアミン (17b) としたが、水や有機溶媒への溶解度などの問題があり精製方法が未だ確立していない。現在は、粗生成物に直接、塩基性条件でプロモ酢酸を反応して、最終生成物 (10b) に誘導する経路を検討中である (Fig 2.15)。

配位子 (11) の合成

まず 5-bromosalicylaldehyde と tris(2-aminoethyl)amine との縮合により 1 段階で対応する Schiff 塩基 (25) が黄色固体として得られた。配位子 25 は疎水性の高い配位子であるため、水溶液で用いられる MRI 用造影剤には親水性の置換基を導入する必要がある。そこで、芳香環上に親水性のオキシエチレン鎖をもった配位子(11)の合成も行った。類似化合物としてはオキシエチレン鎖の置換位置の異なる配位子 (26) ⁶⁾ が知られているが、HyperChem を用いた分子モデリングの結果、11の方が置換基間の立体障害が少なく、ガドリニウム錯体の構造がより安定であることが示唆された (Fig 2.16, 17)。

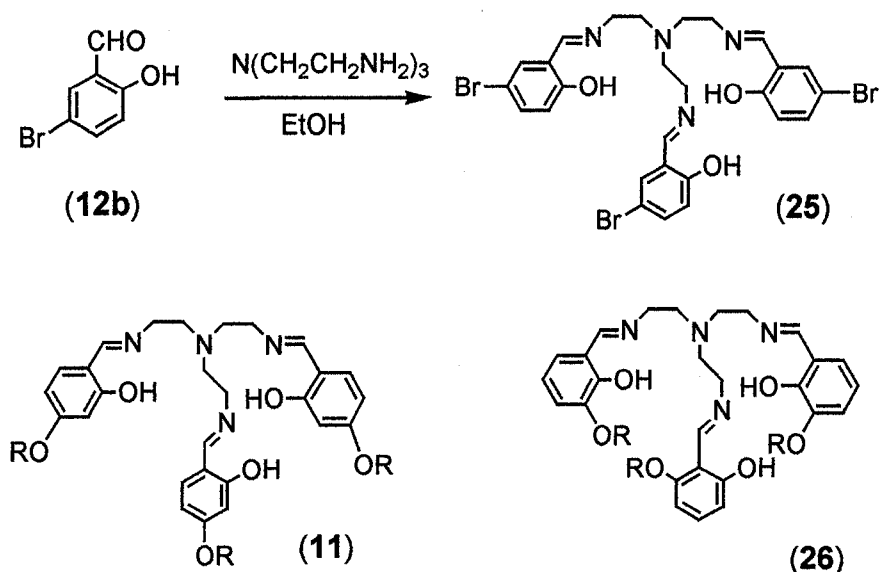
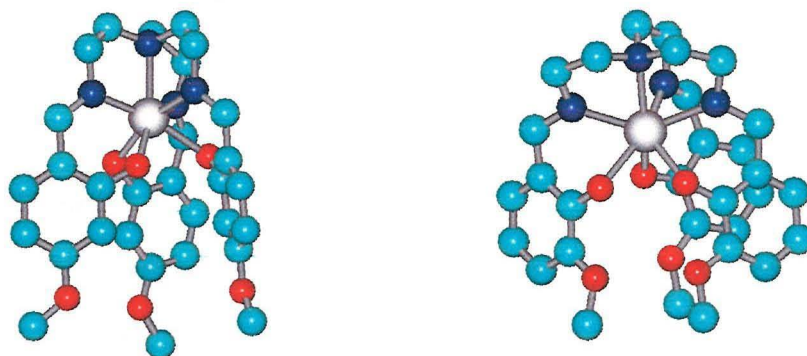


Figure 2.16



(Gd-11) R=OMe E=34.03 kcal/mol (Gd-26) R=OMe E=36.61 kcal/mol

Figure 2.17 Calculated Structures and Energies of Gd complexes.

2,4-Dihydroxybenzaldehyde (27a) に 2 等量の水素化ナトリウムを作用させ、ジアニオンにした後、triethleneglycol monomethyl ether から誘導したトシラートを加えると 4 位の水酸基がアルキル化された生成物 (27b) が 48% で得られた。27b と tris(2-aminoethyl)amine との縮合により目的の 11b を合成できた (Fig. 2-18)。

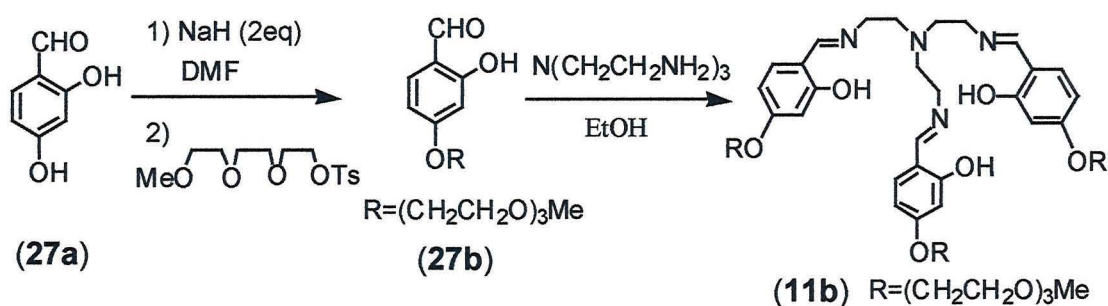


Figure 2.18

配位子 (11b) を塩基性条件下、塩化ガドリニウムと反応させることにより、ガドリニウム錯体 (Gd-11b) に誘導した。この錯体 (Gd-11b) を、ODS ゲルを用いたカラムクロマトグラフィー (メタノール) で精製を試みたが、イミン結合が不安定なためか、不純物との分離ができなかった。現在、配位子 (11b)

のイミン部分をアミンに還元した化合物を用いて、先と同様にガドリニウム錯体に誘導中である。

2-5. 緩和度の測定

MRI 造影剤の性能を評価するためには緩和時間の測定を行う必要がある。本研究では、生体中の様々な組織に特異的な造影剤の開発を目指していることから、その緩和時間の評価には性質の異なるゼラチン及びカラギーナンゲルを用いることとした。ゼラチンは変性コラーゲンを主成分とするタンパク質であり、カラギーナンは海藻から得られ、ガラクトース、3,6-アンヒドロガラクトースを主成分とする多糖類である。

先に述べたように緩和時間には T_1 と T_2 の 2 種類があるが、まずは T_1 に注目して測定を行った。 T_1 緩和時間の測定には S E 法による飽和回復法または反転回復 (I R) 法があるが、ここでは後者を用いて行った。I R 法では、その信号強度 (I_{IR}) は、(4) 式で表される。

$$I_{IR} = P_d \cdot \{1 - 2 \exp(-TI/T_1)\} \cdot \exp(-TE/T_2) \quad (4)$$

(TI : 反転時間、 TE : エコー時間)

実際の測定においては TE を一定にし、TI を変化させて信号を観測するので、(4) 式は、(5) 式となる。

$$I_{IR} = M_o \cdot \{1 - 2 \exp(-TI/T_1)\} \quad (5)$$

(M_o : 定数)

TI と I_{IR} の曲線を、 M_o および T_1 を変数として非線形最小二乗法を用いて解析することにより T_1 を求めることができる。

まず、実際の MR 造影剤の評価をおこなう予備実験として、各ゲルに対する塩化ガドリニウムの緩和度の測定をおこなった。IR 法によって得られた T_1 緩和時間の測定結果を Table 2.1 に示す。

Table 2.1 T_1 Relaxation Times for Gel Phantoms at 0.3T and 25°C.

Gadolinium Conc. ^{a)}	0	2	4	6	8 (10 ⁻² mM)
12 wt% Gelatin	1116	820	765	686	619 (ms)
2 wt% Carrageenan	2255	767	402	299	242 (ms)

a) Concentration of $GdCl_3$

この結果をもとに、塩化ガドリニウムの緩和度を求めると、12wt%ゼラチンファントムに対しては $8.4 \text{ (mM} \cdot \text{s)}^{-1}$ 、2wt%カラギーナンファントムでは $47 \text{ (mM} \cdot \text{s)}^{-1}$ となった。ガドリニウムイオンの水溶液中での緩和度は、 $9.1 \text{ (mM} \cdot \text{s)}^{-1}$ (0.5T) ²⁾ であることから、ゼラチンゲルでは水溶液中と同等であるが、多糖類ゲルでは緩和度が大きくなることがわかった。これはガドリニウムイオンが水酸基に対して親和性が大きいいため、多糖類であるカラギーナンゲルにより強く結合した結果と思われる。

今後は、市販のガドリニウム造影剤の他、本研究で新しく合成したガドリニウム系造影剤を用いて、緩和度の測定を行う予定である。

参考文献

- 1) Caravan, P.; Ellison, J. J.; McMurry, T. J.; Lauffer, R. B., *Chem. Rev.* **99**, 2293-2352 (1999).
- 2) 「NMR医学」基礎と臨床, 日本磁気共鳴医学会編、丸善 (1991).
- 3) 例えば「MRIの基本」パワーテキスト、Hashemi, R. H.; Bradley, Jr., W.G., 荒木 力 監訳、メディカル・サイエンス・インターナショナル (1998).
- 4) (a) Solomon, I., *Phys. Rev.* **99**, 559-565 (1955).
(b) Bloembergen, N., *J. Chem. Phys.* **27**, 572-573 (1957).
- 5) Geraldès, C. F. G. C.; Urbano, A. M.; Alpoim, M. C.; Sherry, A. D.; Kuan, K.-T.; Rajagopalan, R.; Maton, F.; Muller, R. N., *Magn. Reson. Imaging*, **13**, 401 (1995).
- 6) Kocian, O.; Chiu, K. W.; Demeure, R.; Gallez, B.; Jones, C. J.; Thornback, J. R., *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*, 527-535 (1994).

3. 実験項

実験に際し、測定は以下の機器を使用した。

$^1\text{H-NMR}$: 60MHz 日立社製 R-1200

フーリエ変換赤外分光光度計 : 日本分光社製 FT/IR-460

磁気共鳴画像診断装置 : 日立メディコ製 AIRIS II Comfort (0.3 T)

3-1. 配位子の合成

Preparation of 13a.

To a solution of salicylaldehyde (1.0 mL, 9.4 mmol) in EtOH (10 mL) was added diethylenetriamine (0.5 mL, 4.6 mmol). The yellow solution was stirred at room temperature for 5.5 h and the solvent was evaporated *in vacuo* to give a yellow crude oil (13a, 1.65 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8.35 (s, 2H), 6.7-7.5 (m, 8H), 2.96 and 3.69 (each bt, J=6 Hz, 4H).

Preparation of 13b.

To a solution of 4-bromosalicylaldehyde (2.01 g, 10.0 mmol) in EtOH (20 mL) was added diethylenetriamine (0.54 mL, 5.0 mmol), and the solution was stirred at room temperature for 20 h. The solvent was evaporated *in vacuo* to give a yellow crude oil (13b, 2.47 g).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 8.26 (bs, 2H), 7.2-7.5 (m, 4H), 6.81 (bd, J=9 Hz, 2H), 3.5-3.9 (m, 4H), 2.8-3.2 (m, 4H).

Preparation of 19b.

To a solution of the crude 13b (233 mg, 0.50 mmol) in MeOH (5 mL) was added methyl bromoacetate (40 μ L, 0.42 mmol) and Na₂CO₃ (30 mg, 0.28 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 16 h and filtered through short ODS column. The solvent was removed in vacuo to give a crude oil 19b (300 mg).

¹H-NMR (CDCl₃): 8.19 (bs, imine-H), 7.1-7.5 (m, Ar-H), 6.6-7.0 (m, Ar-H), 3.68 (s, -CO₂CH₃), 3.45 (s, -CH₂-CO₂-), 2.5-3.9 (m, N-CH₂CH₂-N).

Zinc complex of 19b.

To a solution of crude 19b (3.0 g, 5.5 mmol) in EtOH (20 mL) was added zinc(II) chloride (650 mg, 4.7 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 6 h and the yellow precipitate was collected by filtration.

Zn-19b (yellow solid, 1.63 g); IR (cm⁻¹, KBr): 2949, 1632, 1525, 1464, 1384, 1308, 1276, 1172, 830, 684.

Nickel complex of 19b.

To a solution of crude 19b (300 mg, 0.55 mmol) in EtOH (5 mL) was added nickel(II) acetate tetrahydrate (138 mg, 0.55 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 21 h and the greenish yellow precipitate was collected by filtration.

Ni-19b (greenish yellow solid, 58 mg); IR (cm⁻¹, KBr): 3398, 2907, 1631, 1591, 1522, 1461, 1387, 1311, 1291, 1172, 825, 686.

5-Bromosalicylaldehyde methoxymethyl ether (20).

Sodium hydride (60 %, 444 mg) was washed twice with dry ether (2 mL) in a three necked flask. To the flask dry DMF (20 mL) and a solution of 5-bromosalicylaldehyde (2.01 g, 10.0 mmol) in dry DMF (20 mL) were added on an ice-water bath. After stirring for 10 min, chloromethylmethyl ether (1.0 mL, 13.2 mmol) was added and the mixture was stirred at 0-5 °C for 20 min and then at room temperature for 40 min. The mixture was quenched with dil HCl and extracted with ether (3 times). The ether layer was dried over anhydrous Na₂SO₄ and evaporated in vacuo to give a crude oil (2.57 g). Purification by short silica gel column chromatography (Merck, 70-230 mesh, 5% ethyl acetate/hexane as an eluent) gave 20 as a colorless oil (2.41 g, 98%).
¹H-NMR (CDCl₃): 10.51 (s, 1H), 7.99 (d, J=3 Hz, 1H), 7.68 (dd, J=3, 9 Hz, 1H), 7.19 (d, J=9 Hz, 1H), 5.33 (s, 2H), 3.55 (s, 3H).
IR (cm⁻¹, film on KBr): 1689, 1591, 1476, 1388, 1265, 1233, 1199, 1181, 1157, 1119, 1082, 978.

Preparation of 21.

To a solution of 20 (2.41 g, 9.82 mmol) in EtOH (20 mL) was added diethylenetriamine (0.53 mL, 4.9 mmol). The yellow solution was stirred at room temperature for 18.5 h and the solvent was evaporated *in vacuo* to give a yellow crude oil (21, 2.87 g).

¹H-NMR (CDCl₃): 8.7, 8.1 (each bs, imine-H), 7.4 (bd, Ar-H), 7.0 (d, Ar-H), 5.21 (s, -O-CH₂-O-), 3.48 (s, -O-CH₃).

Preparation of 9.

To a suspension of 21 (340 mg, 0.61 mmol) and Na₂CO₃ (33 mg, 0.31 mmol) in dry THF (6 mL) was added methyl bromoacetate (60 μL, 0.63 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 4 days and filtered through short ODS column. The filtrate was concentrated *in vacuo* to give a crude oil (22, 351 mg).

The crude 22 (351 mg) was dissolved in 10 mL MeOH and NaBH₄ (42 mg, 1.1 mmol) was added on an ice-water bath. The mixture was stirred for 45 min and the solvent was evaporated *in vacuo*. The residue was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with water, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give a crude oil (302 mg). Purification by MPLC (ODS-40B, MeOH as an eluent) gave 23 (189 mg).

¹H-NMR (CDCl₃): 6.8-7.6 (m, Ar-H), 5.19 (s, -O-CH₂-O-), 4.68 (s, -CH₂CO₂-), 3.47 (s, -O-CH₃), 3.43 (s, -CO₂CH₃).

A solution of 23 (189 mg) and 6M-HCl (0.5 mL) in 5 mL THF was heated at 50 °C for 2.5 h and the solvent was removed *in vacuo*. The residue was dissolved with 5 mL EtOH and 30% NaOH (1 mL) was added. The solution was heated at 60 °C for 2.5 h, neutralized with 6M-HCl, and extracted with THF. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo* to give a crude product. Purification by silica gel column chromatography (Merck, 70-230 mesh, 15 g, 50% MeOH/ethyl acetate as an eluent) gave a brown solid 9 (112 mg).

Preparation of 17a.

To a solution of p-anisaldehyde 15a (246 μ L, 2.0 mmol) in EtOH (4 mL) was added diethylenetriamine (108 μ L, 1.0 mmol). The pale yellow solution was stirred at room temperature for 25 h and then NaBH₄ (80 mg, 2.1 mmol) was added. After stirring at room temperature for 2 days, dil HCl was added. The resultant pale yellow precipitate was separated by centrifugation to give 17a \cdot 3HCl as a colorless solid (356 mg, 79%).

IR (cm⁻¹, KBr): 3434, 2980, 2934, 2763, 2724, 2693, 2556, 2427, 1615, 1519, 1254, 1034, 819.

Preparation of 24.

To a suspension of 17a \cdot 3HCl (234 mg, 0.52 mmol) and diisopropylethylamine (600 μ L, 3.4 mmol) in 7 mL THF was added *tert*-butyl bromoacetate (250 μ L, 1.7 mmol). After stirring at 50°C for 6.5 h, 1M-NaOH was added and the mixture was extracted with ethyl acetate. The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na₂SO₄, and concentrated *in vacuo*. The residue was purified by silica gel column chromatography (Merck, 70-230 mesh) using ethyl acetate as an eluent to give 24 as colorless oil (182 mg, 51%).

¹H-NMR (CDCl₃): 7.23 (d, J=9 Hz, 4H), 6.84 (d, J=9 Hz, 4H), 3.78 (s, 6H), 3.73 (s, 4H), 3.32 (s, 2H), 3.22 (s, 4H), 2.76 (s, 8H) 1.46 (s, 18H), 1.43 (s, 9H).

Preparation of 10a.

Trifluoroacetic acid (1 mL) was added to 24 (182 mg, 0.27 mmol) on an

ice-water bath and the mixture was stirring at room temperature for 2.5 h. The solvent was removed by azeotropic distillation with hexane to give 10a. $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD): 7.5 (d, $J=9$ Hz, 4H), 7.0 (d, $J=9$ Hz, 4H), 3.9 (s, 6H).

Preparation of 25.

To a solution of 5-bromosalicylaldehyde 12b (1.21 g, 6.0 mmol) in EtOH (10 mL) was added tris(2-aminoethyl)amine (96%, 312 μL , 2.0 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 23 h and the solvent was removed *in vacuo*. The crude product was treated with MeOH and filtered to give a yellow solid (25, 1.28 g, 92%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 7.94 (s, 3H), 7.41 (dd, $J=3, 9$ Hz, 3H), 6.84 (d, $J=9$ Hz, 3H), 6.59 (d, $J=3$ Hz, 3H), 3.4-3.7 (m, 6H), 2.7-3.0 (m, 6H).

Preparation of 27b.

Sodium hydride (60 %, 1.00 g) was washed twice with dry ether (5 mL and 3 mL) in a three necked flask. To the flask dry DMF (20 mL) and a solution of 2,4-dihydroxybenzaldehyde (1.39 g, 10.0 mmol) in dry DMF (25 mL) were added on an ice-water bath. After stirring for 15 min, a solution of 8-methoxy-3,6-dioxahexyl toluene-*p*-sulfonate (3.19 g, 10.0 mmol) in dry DMF (25 mL) was added and the mixture was stirred at room temperature for 18 h. The mixture was successively quenched with EtOH and 6M-HCl and concentrated *in vacuo*. The residual oil was extracted with CHCl_3 (3 times). The organic layer was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , and evaporated *in vacuo* to give a brown oil (3.16 g). The crude product was

through silica gel column (Merck, 70-230 mesh, 30 g, CHCl₃ as an eluent) and then purified by MPLC (SI-40B, 26×300 mm, 1%MeOH/CHCl₃ as an eluent) to give **27b** as a colorless oil (1.37 g, 48%).

¹H-NMR (CDCl₃): 11.54 (s, 1H), 9.79 (s, 1H), 7.50 (d, J=9 Hz, 1H), 6.59 (bd, J=9 Hz, 1H), 6.51 (bs, 1H), 3.8-4.3 (m, 4H), 3.73 (s, 4H), 3.62 (s, 3H), 3.40 (s, 4H).

Preparation of **11b**.

To a solution of **27b** (135 mg, 0.47 mmol) in EtOH (2 mL) was added tris(2-aminoethyl)amine (96%, 25 μL, 0.16 mmol). The mixture was stirred at room temperature for 24 h and the solvent was removed *in vacuo* to give a yellow oil (**11b**, 152 mg).

¹H-NMR (CDCl₃): 7.77 (s, 3H), 6.2-6.4 (m, 9H), 3.7-4.3 (m, 12H), 3.72 (s, 12H), 3.63 (bs, 12H), 3.38 (s, 9H), 2.6-3.0 (m, 12H).

3-2. 緩和度の測定

材料

カラギーナン：マリン・サイエンス（株）カラギーナンKK-9

ゼラチン：新田ゼラチン（株）豚皮ゼラチンパウダー

2 wt%カラギーナンファントムの作成

50mL のガラス製サンプル瓶にカラギーナン 400 mg を 20 mL の蒸留水に懸濁させる。電子レンジを用いて加熱し、カラギーナンを溶かす。室温で冷却してゲル化させる。同様に調整したカラギーナン懸濁液に、0.1M-GdCl₃ をそれぞれ 4 μ L, 8 μ L, 12 μ L, 16 μ L 加えてゲル化させることにより、Gd³⁺濃度で 0.02 mM, 0.04 mM, 0.06 mM, 0.08 mM のゲルファントムを調整した。

12wt%ゼラチンファントムの作成

カラギーナンファントムと同様に、ゼラチン 2.4 g と 20 mL 蒸留水を用いて、Gd³⁺濃度で 0 mM, 0.02 mM, 0.04 mM, 0.06 mM, 0.08 mM のゲルファントムを調整した。

T₁ 緩和時間の測定

先に調整したゲルファントムの T₁ 緩和時間を磁気共鳴画像診断装置 (AIRIS-II) を用いて測定をおこなった。試料は頭部用 QD コイルの中心に置き、コロナル方向に断面選択し以下の条件で測定した。本来は IR 法で測定する方が正確に T₁ が求まるが、高速 IR (FastIR) 法でもほぼ同様な結果が得られたため、測定時間の短い FIR 法を用いることとした。IR 法では一つの TI に対して測定時間は約 20 分であるが、FIR では約 3 分であった。

測定温度：25°C ± 2°C

測定法：FIR

FOV=220 mm, TR=10 s, TE=15 ms, Thickness=15 mm, ETL=7,

Matrix=128×128, NSA=1

TI の値を 150 ms ~ 2000 ms まで変化させ、得られた各画像のファントム中に約 350 mm² の ROI を設定し、その信号強度を測定した。信号強度は絶対値表示であるので、グラフをみて負と推定される点はマイナスの符号をつけて解析をおこなった。解析には汎用ソフトである Plot32 を使い、式(5)を用いて Mo と T₁ の 2 変数の非線形最小 2 乗曲線近似をおこない、T₁ 値を求めた(Fig. 3.1,2)。

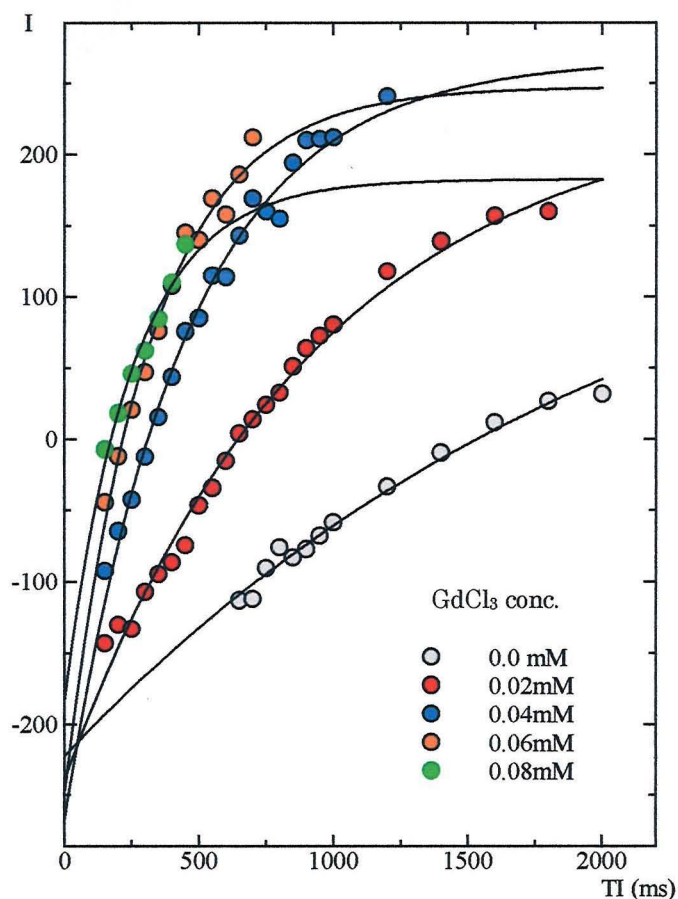


Figure 3.1 Signal Intensity vs TI plots for Carrageenan Gel with Various Gd³⁺ concentrations.

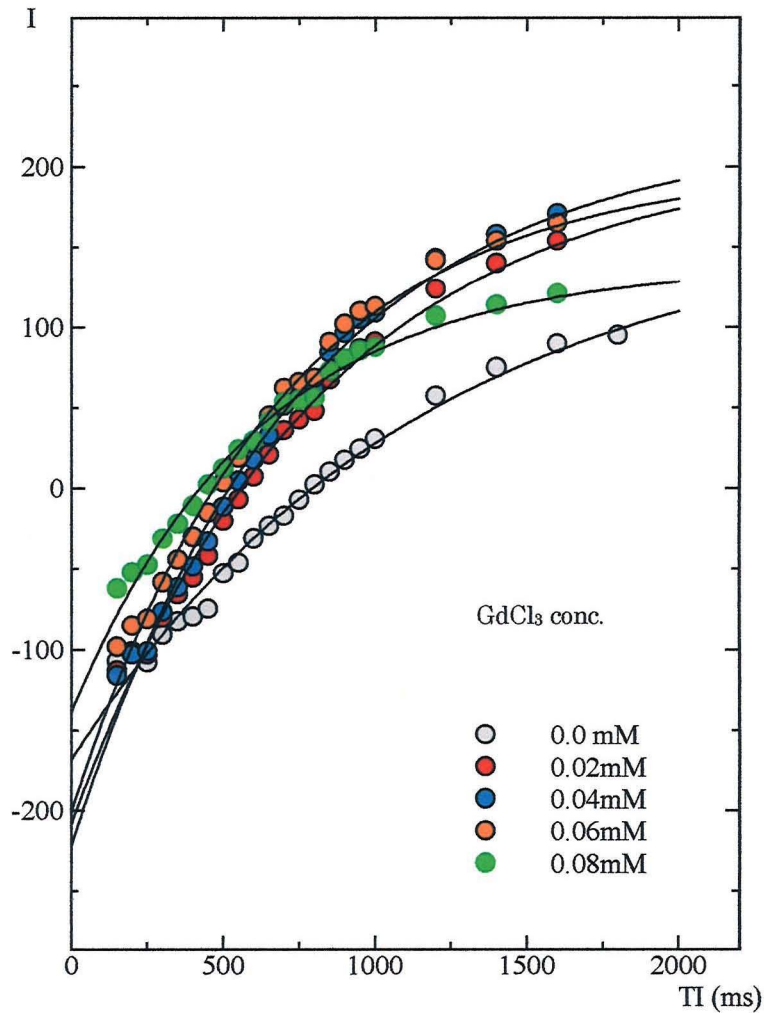


Figure 3.2 Signal Intensity vs TI plots for Gelatin Gel with Various Gd^{3+} concentrations.

Fig. 3.3 は、以上の解析によって得られた T_1 値 (Table 2.1) の逆数 (緩和速度 s^{-1}) を各ガドリニウム濃度に対してプロットしたものである。これを直線回帰することにより、その傾きからカラギーナンおよびゼラチンファントムに対する Gd^{3+} イオンの緩和度を求めた。

カラギーナン : $47(\text{mM} \cdot \text{s})^{-1}$, $R=0.998$

ゼラチン : $8.4 (\text{mM} \cdot \text{s})^{-1}$, $R=0.978$

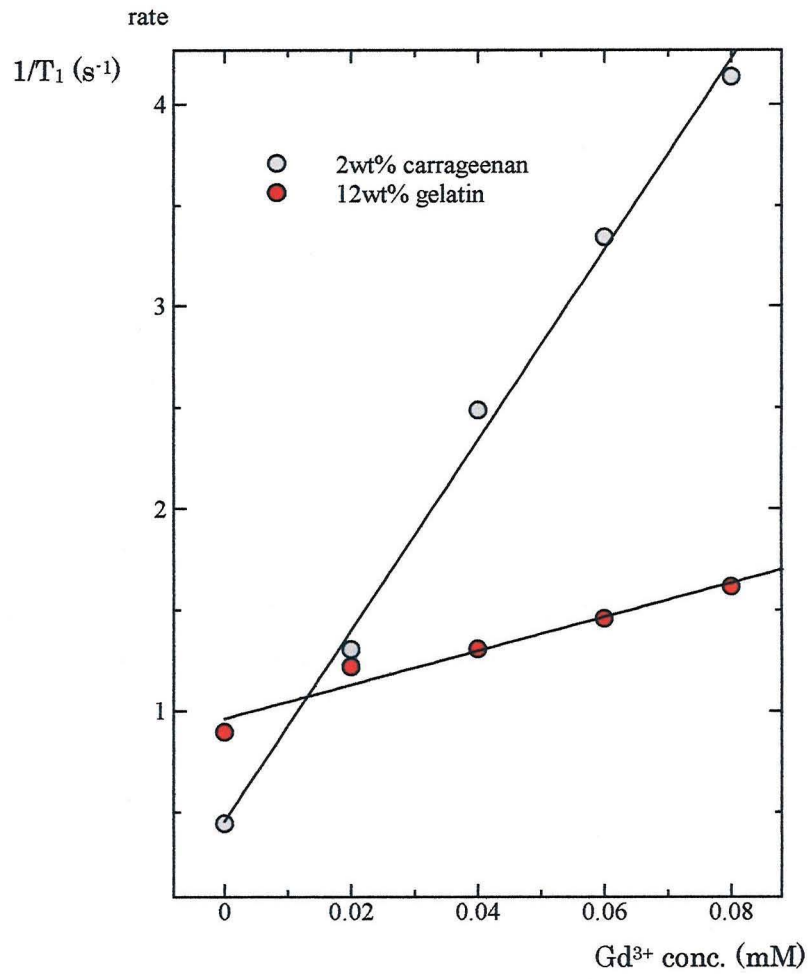


Figure 3.3 Relaxation Rates of Gd^{3+} for Carrageenan and Gelatin Gel.