

2013 年度博士論文

尿酸のラジカル消去機構を規範とした
新規抗酸化活性医薬品リード化合物の
創製研究

慶應義塾大学大学院

薬学研究科 医薬品化学講座

指導教員 増野 匡彦 教授

81154061 安田 大輔

目次

第 1 章 序論	1
1-1 はじめに	1
1-2 フリーラジカルと活性酸素種 (ROS)	2
1-3 活性酸素種の生成源	4
1-4 活性酸素種による生体組織障害	7
1-5 抗酸化防御システム	10
1-6 酸化ストレスと細胞死制御	11
1-7 酸化ストレスと疾患	12
1-8 抗酸化物質	13
1-9 抗酸化剤の医薬品開発	15
1-10 抗酸化剤の問題点	19
1-11 尿酸	21
1-12 尿酸類縁体の抗酸化活性	24
1-13 5-ヒドロキシオキシインドール	27
1-14 研究目的	28
第 2 章 新規抗酸化剤のデザインと合成	29
2-1 新規抗酸化剤のデザイン	29
2-2 デザインした化合物の合成	36
第 3 章 DPPH ラジカル消去活性	44
3-1 化合物 B-i 、 1-i~iii の DPPH ラジカル消去活性	44
3-2 化合物 C-i~iv の DPPH ラジカル消去活性	48
3-3 DPPH ラジカル消去活性の構造活性相関を考慮した、 誘導体化リード化合物の選択	50
3-4 化合物 1 、 2 、 3a-n 、 4a-c 、 5a-c 、 6a-c の DPPH ラジカル 消去活性	51
第 4 章 脂質過酸化抑制効果の測定	56
4-1 誘導体 1 、 2 、 3a~j 、尿酸及びエダラボンの脂質過酸化 抑制効果	57
4-2 誘導体 3k~n 、 4a~e 、 5a~c 、 6a~c の脂質過酸化抑制 効果	61
第 5 章 プロオキシダント効果の測定	63
5-1 測定方法	63

5-2	結果と考察	
第 6 章	細胞内酸化ストレス抑制効果の測定	67
6-1	誘導体 1 、 2 、 3a~j 、尿酸、エダラボンの細胞内酸化 ストレス抑制効果	68
6-2	誘導体 3k~n 及び 4a~e の細胞内酸化ストレス抑制効果	70
6-3	誘導体 5a~c 及び 6a~c の細胞内酸化ストレス抑制効果	72
第 7 章	細胞毒性の測定	74
7-1	細胞生存率の測定方法	74
7-2	化合物 1 、 2 、 3a~j の細胞毒性	75
7-3	誘導体 3k~n 、 4a~e 、 5a~c 、 6a~c の細胞毒性	76
7-4	考察	78
第 8 章	オキシインドール誘導体の水溶性の測定	79
8-1	方法	79
8-2	結果と考察	79
第 9 章	結論	81
第 10 章	実験の部	84
第 11 章	付表	156
	参考文献	163
	論文目録	168
	謝辞	172

第1章 序論

1-1 はじめに

活性酸素種 (ROS: reactive oxygen species)・フリーラジカルは、シグナル伝達作用や免疫系での殺菌作用など、生体にとって重要な役割を有している。その一方で、過剰の ROS はがん、心血管疾患、神経変性疾患をはじめとする種々の疾病の発症や増悪に関与する。生体は ROS の生成と消去のバランスを調節するために抗酸化酵素や内因性の低分子抗酸化剤を利用しているが、病的な酸化ストレスの増大に対処するためには外部からの抗酸化剤の投与が必要であると考えられる。しかし、これまでに多様な抗酸化剤が医薬品候補として採り上げられたが、その有効性や安全性の観点から多くの薬剤が開発中止となり、抗酸化活性医薬品の開発は難航している。次世代の抗酸化活性医薬品の開発にあたっては、新規な骨格を有する多様な抗酸化剤を見出す必要があり、さらにそれをリード化合物としてよりドラッグライクな分子を創出すべきである。

1-2 フリーラジカルと活性酸素種 (ROS)

フリーラジカルとは、不対電子を有する原子または分子の総称である。一般的に電子は軌道上で対を形成した状態が安定であり、不対電子は対になろうとする性質を持つ。そのためフリーラジカルは反応性が高く不安定な化学種である。

地球大気の構成分子のうち約 21%を占める酸素分子は三重項基底状態 ($^3\text{O}_2$) にあり、二個の不対電子を有するビラジカルとして存在する。不対電子は反結合性の π^* 軌道を占め、そのスピン状態は互いに平行で存在する。酸素分子はその特異なスピン状態に基づき酸化反応に対する速度論的障壁を持つため、有機化合物に対する反応性は低い。生体内の酸素添加酵素は酵素活性中心の金属原子が酸素原子との複合体を形成することでこの障壁を取り除き、効率的な酸素化反応を可能としている¹⁾。

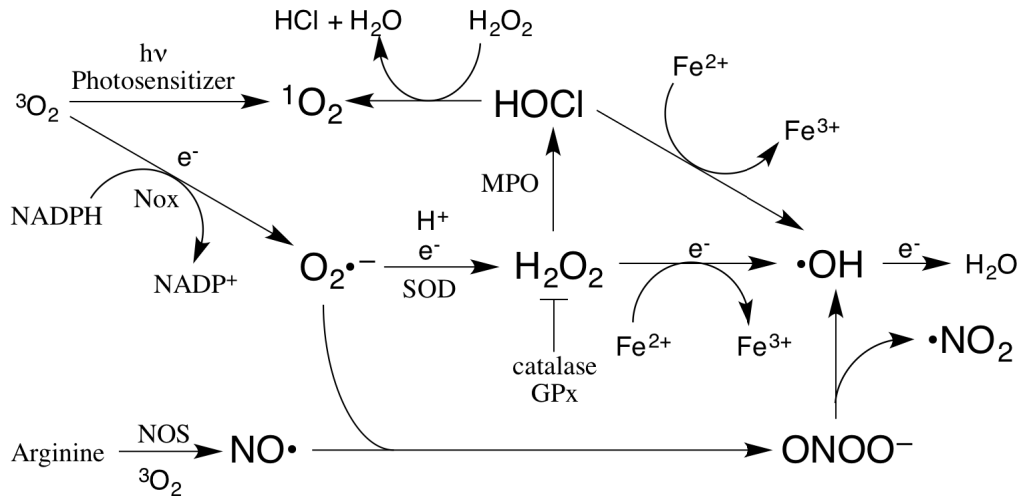
三重項酸素は、一電子還元によってスーパーオキシドアニオンラジカル (O_2^-) となる。スーパーオキシドは代表的な活性酸素であるが、一般的なフリーラジカルと比べ反応性は低い。 O_2^- の共役酸であるヒドロパーオキシラジカルの pK_a は 4.69 であり、中性水溶液中では大部分が O_2^- として存在する²⁾。 O_2^- は不均化により三重項酸素と過酸化水素 (H_2O_2) を生成する。 H_2O_2 は O_2^- の一電子還元体にあたり、二つの π^* 軌道が電子対によって占有されるため、活性酸素であるがフリーラジカルではない。 H_2O_2 がさらに一電子還元を受けると、O-O 結合が開裂し、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) が生じる。 $\cdot\text{OH}$ は、短寿命かつきわめて反応性の高いフリーラジカルである。 $\cdot\text{OH}$ は多くの有機化合物と素早く反応し、C-H 結合から水素原子を引き抜いてアルキルラジカル ($\text{R}\cdot$) を生成する。例えば、 $\cdot\text{OH}$ とメタノールおよびエタノールの反応速度定数はおよそ $10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 程度であると報告されている^{3,4)}。 $\cdot\text{OH}$ は一電子還元によって安定な水 (H_2O) となる。三重項酸素から水への還元は計四電子によってなされる。

スピン量子数が 0 の二原子酸素分子を一重項酸素 ($^1\text{O}_2$) と呼ぶ。一重項酸素はラジカルではないが、エネルギーが高く、一重項である有機化合物と容易に反応する。これら O_2^- 、 H_2O_2 、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ の四つの化学種を狭義の活性酸素と呼ぶ。

一酸化窒素 ($\text{NO}\cdot$) は血管弛緩作用を有する窒素酸化物である。生体内ではアルギニンと酸素から一酸化窒素合成酵素 (NOS) によって生合成される。 $\text{NO}\cdot$ は一個の不対電子を有するフリーラジカルであり、三重項酸素や O_2^- を含む他のフリーラジカルと容易に反応する。またタンパク質の窒素原子やチオール残基と反応しニトロソ化合物を生成する。 $\text{NO}\cdot$ と酸素の反応生成物である二酸化窒素 ($\text{NO}_2\cdot$) もまたフリーラジカルであり、他のラジカル種や不飽和化合物などと反応してニトロ化合物を生成する。 $\text{NO}\cdot$ と O_2^- は拡散律速に近い速さで反応し、パーオキシナイトライト (ONOO^-) を生成する。 $\text{NO}\cdot$ と O_2^- それぞれは比較的安定であるものの、 ONOO^- は生理的条件下で非常に不安定であり高い反応性を有する。 O_2^- 、 H_2O_2 、 $\text{HO}\cdot$ 、 $^1\text{O}_2$ に加え、上述の窒素化合物や、次亜塩素酸 (HClO)、オゾン (O_3)、ヒドロパーオキシド (ROOH)、ヒドロパーオキシラジカル ($\text{ROO}\cdot$)、ア

ルコキシラジカル (RO•) 等を総称して活性酸素種 (ROS) と呼ぶ。

ROS は好気生物の生体内において化学的・酵素的な生成・消去・相互変換を繰り返し (Scheme 1-1)、異物の殺菌・除去、シグナル伝達、生体分子の生合成などの重要な働きを担っている。



Scheme 1-1 生体内における ROS の生成と消去

1-3 活性酸素種の生成源

生体内では各種の ROS が酵素的・非酵素的に生成する。以下、主要な ROS の生成源とその役割について記述する。

1-3-1 NADPH オキシダーゼ^{5,6)}

NADPH オキシダーゼ (Nox) は酸素分子を一電子還元して O_2^- を生成する酵素ファミリーである。ヒト Nox には現在までに Nox1~5 の計五種のサブタイプが同定されている。いずれも 6 回膜貫通型の膜タンパク質で、細胞質の NADPH から細胞外の酸素分子への電子の授受によって O_2^- を生成する。また Nox に近縁の酵素としてデュアルオキシダーゼ (Duox) 1~2 が見出されている。

Nox2 は gp91^{phox} と呼ばれ、食細胞 NADPH オキシダーゼとして Nox ファミリーの中で最初に見出された。食細胞が異物の貪食を行った際に活性化され、 O_2^- の生成によって異物の分解・除去を行うと考えられている。Nox2 の活性は関連分子との相互作用によって巧妙に制御されている。Nox2 関連遺伝子の変異による Nox2 活性の欠損症として慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease; CGD) が知られている。CGD 患者では食細胞による免疫機能が正常に作用せず、幼少期より重篤な感染症の罹患を繰り返す。これらのことは、 O_2^- が単なる酸素呼吸の副生成物ではなく、生体の恒常性維持において重要な役割を担う分子であることを明確に示している。

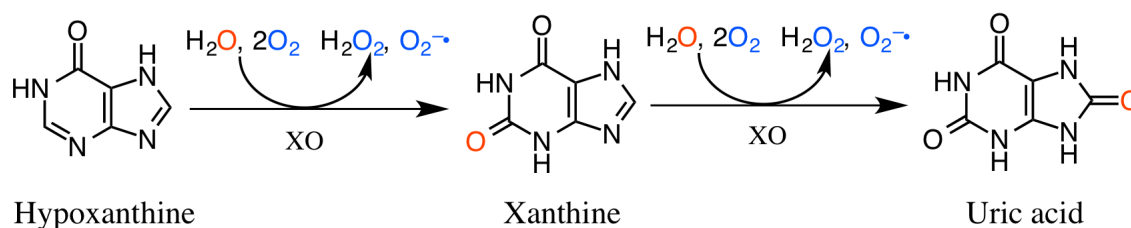
Nox1 はヒト大腸上皮細胞において高発現が見られ、局所免疫に関与することが示唆されている。Nox3 はヒト胎児腎、Nox4 は腎臓遠位尿細管上皮細胞などで高発現が認められているが、生理学的意義は未解明である。Nox5 は Nox1~4 とは進化の系統的に異なる構造を持ち、細胞質 Ca^{2+} 濃度の上昇に伴って活性化されるが、これもその生理学的意義は不明である。

1-3-2 キサンチンオキシダーゼ

核酸代謝のうちヒポキサンチンからキサンチン及びキサンチンから尿酸への二段階酸化反応を触媒する酵素がキサンチンデヒドロゲナーゼ (XDH) である。XDH は微生物から哺乳類に至るまで広く分布しており、特にヒトやチンパンジーなどの高等霊長類においては、尿酸酸化酵素 (ウリカーゼ) の欠損のため XDH がプリン代謝の最終代謝酵素となる。基質特異性は比較的 low、ヒポキサンチンやキサンチンをはじめとするプリン以外にもピリミジン、プテリン、アルデヒドなど多様な化合物を代謝する。XDH は活性中心にモリブドプテリンを有し、基質から受け取った電子はモリブデン、2 個の鉄硫黄クラスター、FAD を介して

NAD⁺へと渡される⁷⁾。

哺乳類の XDH はチオール基の酸化による分子内ジスルフィド結合の形成または Ca²⁺依存性プロテアーゼによる限定分解によってオキシダーゼ型 (xanthine oxidase; XO) へと変換される (D/O 変換)。XO では XDH の NAD⁺ 結合部位相当にコンフォメーション変化が起こり、FAD と NAD⁺ の接近が妨げられている。その一方で、酸素分子が FAD に接近する新たな経路が存在する。鉄硫黄クラスターやモリブドプテリン周辺的环境は XO と XDH で変化しない。その結果、基質の電子は酸素分子へと受容され、O₂^{•-} と H₂O₂ を生成する (Scheme 1-2)。



Scheme 1-2 キサンチンオキシダーゼによる ROS の生成

虚血再灌流障害は脳梗塞、心筋梗塞をはじめとする種々の疾患で起こり得る。その障害メカニズムの一つとして、XO による酸化ストレスの増大が示唆されている。虚血により酸素の供給が停止すると、ATP の分解によってヒポキサンチンが蓄積する。また、虚血時には Ca²⁺ 依存性プロテアーゼの活性化によって XDH から XO への変換が促進される。血流の再開により大量の酸素が供給されると、XO、酸素、ヒポキサンチンの反応により生成した ROS が周辺組織を障害するとされる⁸⁾。また、XO から生じた O₂^{•-} は NO[•] と反応して ONOO⁻ を生成し、これが XDH から XO への変換をさらに促進するとの説⁹⁾もあることから、虚血時には XO と ROS によって酸化ストレスの悪循環が引き起こされる可能性がある。一方で血管内皮に XDH/XO は存在しないとの報告や、虚血時の Ca²⁺ 依存性プロテアーゼによる D/O 変換速度は障害に寄与するほど速くないとする否定的な報告もあるが¹⁰⁾、XDH/XO 特異的阻害剤のフェブキソスタットが動物モデルにおいて虚血再灌流による組織傷害を抑制したとする報告^{11,12)} は、XO 由来の ROS が虚血再灌流傷害時の酸化ストレス増大に関与することを支持している。XO の ROS 生成作用の生理学的意義は Nox2 の場合と異なり不明である。XDH/XO 単独欠損症患者の平均余命は健常者と変わらず、尿路結石の発生率がやや高いことを除けばほとんど無症状であるとされる¹³⁾。

1-3-3 その他の ROS 生成酵素

その他、酵素的な ROS 生成はシトクロム P450、モノアミンオキシダーゼなどで見られる。また、シクロオキシゲナーゼやリポキシゲナーゼによって生成する脂質エンドパーオキサイドから ROS が生成する場合もあり、それらを間接的な ROS 生成酵素と捉える場合もある。

1-3-4 ミトコンドリア電子伝達系による ROS 生成

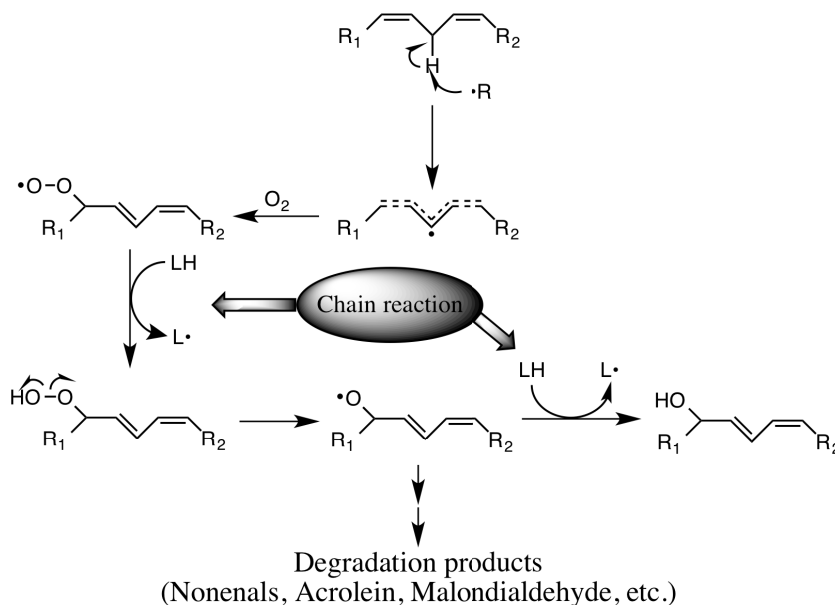
ミトコンドリアは真核生物のエネルギー産生に関与する細胞小器官であり、ATP 合成過程において、I~IV の電子伝達系複合体を介して酸素を四電子還元し水を生成する。この際、部分的に還元された酸素から $O_2^{\cdot-}$ が生成する。呼吸によって大気から取り込まれた酸素のおよそ 90%はミトコンドリアで利用され、そのうち 4%程度が ROS に変換されると言われている¹⁴⁾。細胞内で生成する $O_2^{\cdot-}$ の大部分はミトコンドリア電子伝達系に由来するとも考えられている¹⁵⁾。電子伝達系複合体の機能低下は $O_2^{\cdot-}$ の増大を引き起こす。これは電子伝達系複合体 I 阻害剤のロテノンや、複合体 III 阻害剤のアンチマイシンが $O_2^{\cdot-}$ 生成を増大させるとの報告によっても支持されている¹⁶⁾。ミトコンドリア機能障害による ROS の産生増大は老化や癌、パーキンソン病・アルツハイマー病のような神経変性疾患などと密接に関与することが解明されてきており、今後の研究の進展が期待される分野である。

1-4 活性酸素種による生体組織障害

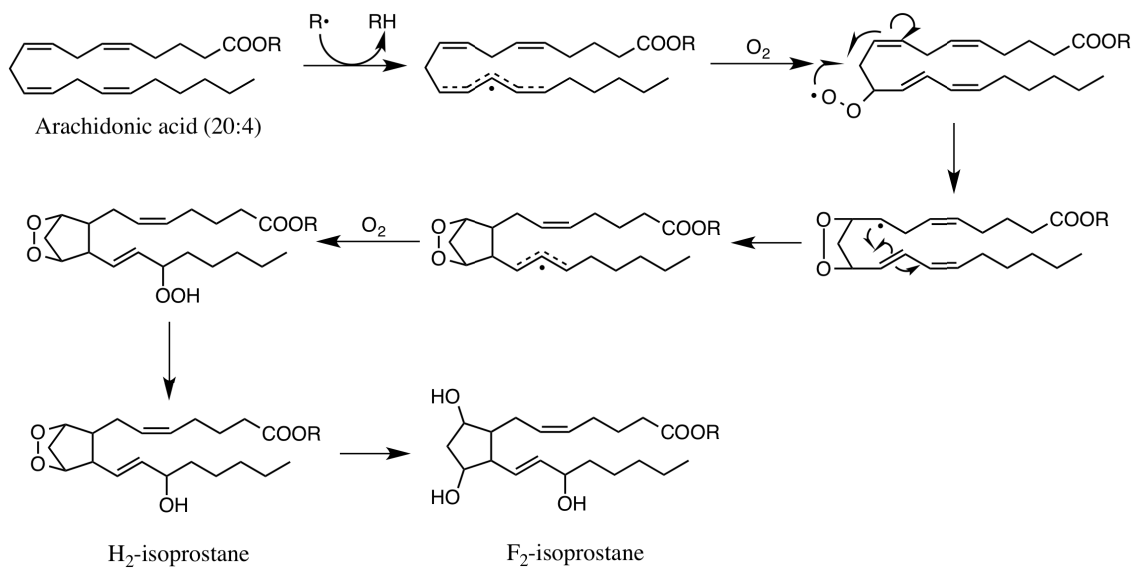
健全な組織においては、ROS の生成、消去、相互変換のバランスは各種酵素や低分子抗酸化剤によって制御されている。しかし、何らかの原因によってそれらのバランスが崩壊すると、過剰な ROS はその反応性の高さから脂質、タンパク質、核酸といった生体成分を傷害し、機能不全を引き起こす。

1-4-1 脂質過酸化

リノール酸、リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸といった高度不飽和脂肪酸は、生体成分の中でも特に ROS による酸化の標的となりやすい。二つの二重結合に挟まれた (ダブルアリル位の) メチレンの水素原子は ROS によって容易に引き抜かれ、脂質ラジカルを生成する。生じた脂質ラジカルは大気中の三重項酸素と反応して脂質パーオキシラジカルを形成し、これがさらに他の脂質分子などと反応することで過酸化連鎖反応を引き起こす (Scheme 1-3)。連鎖反応の停止にはラジカル分子の重合や酸化的分解、または抗酸化剤によるラジカルの消去が必要である。また脂質パーオキシラジカルは分子内反応によるエンドパーオキシドの生成を介し、イソprostano のようなプロスタグランジン類似物質を生成する¹⁷⁾ (Scheme 1-4)。脂質の酸化的分解産物である 2-ノネナール、4-ヒドロキシ-2-ノネナール、マロンジアルデヒド、アクロレインなどのアルデヒド類や、イソprostano の 8-epi-プロスタグランジン F_{2α} などは尿中・血中に検出されることから酸化ストレスマーカーとして用いられる。



Scheme 1-3 脂質過酸化連鎖反応



Scheme 1-4 アラキドン酸からのイソプロスタン類の非酵素的生成経路

1-4-2 DNA の酸化修飾

核酸塩基、糖、リン酸など DNA を構成する各構造が ROS による攻撃の標的となるが、中でもグアニンは酸化電位が低いため修飾を受けやすい。8-ヒドロキシデオキシグアノシン (8-OHdG) や 8-ニトロデオキシグアノシン (8-NO₂dG) (Fig. 1-1) は DNA 損傷のバイオマーカーとして汎用される。

DNA の修飾は異常な塩基対の形成を惹起し、翻訳異常や細胞死、または突然変異などを誘発する原因となる。また、ROS・フリーラジカルによる特定の核酸塩基の修飾や (DNA 本体ではないが) ヒストンの酸化損傷がエピジェネティックな遺伝子変化を誘発し、発癌に繋がるのではないかとする知見もある^{18,19,20}。

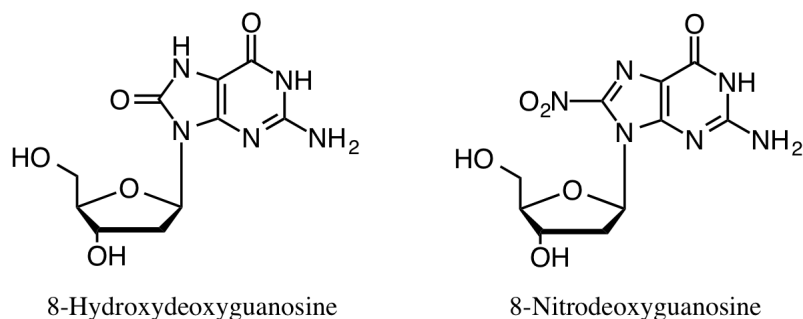
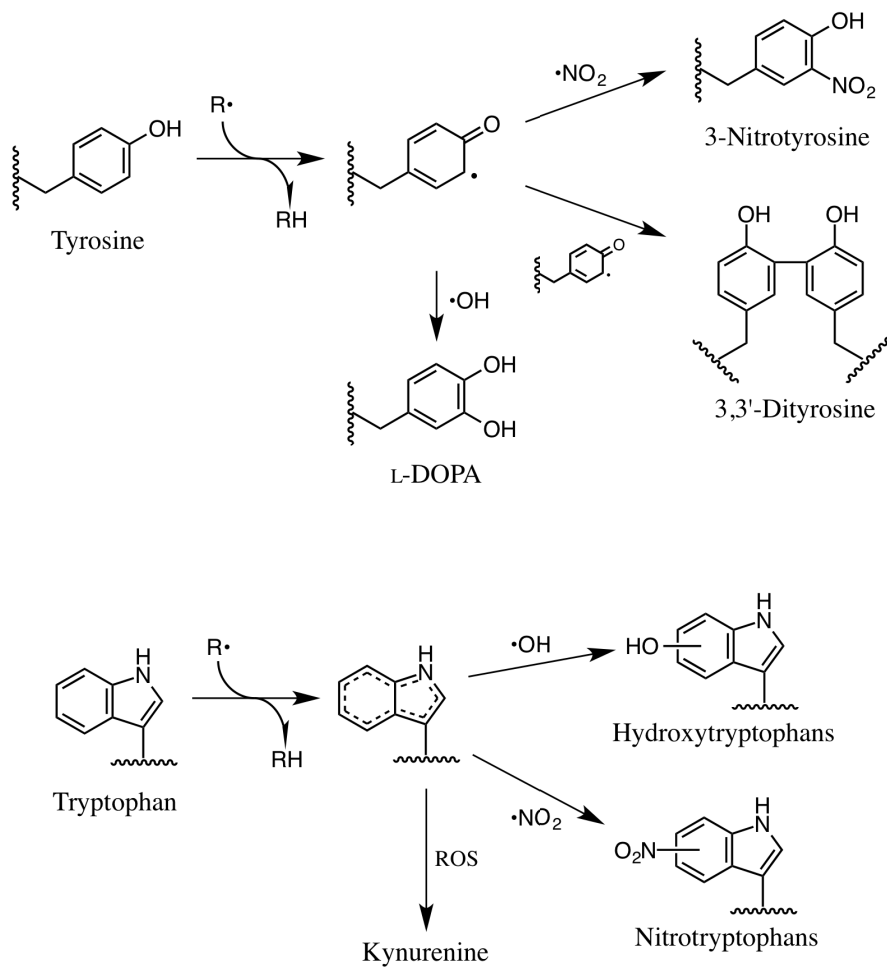


Fig. 1-1 代表的な酸化損傷 DNA

1-4-3 タンパク質の翻訳後修飾

タンパク質のシステイン、メチオニン、チロシン、ヒスチジン、トリプトファンといったアミノ酸残基は ROS による酸化修飾を容易に受ける²¹⁾。システイン残基の酸化修飾は後述するレドックス関連タンパク質の機能調節にも関与している。チロシンは芳香環ヒドロキシ基のオルト位が ROS の標的になりやすい。チロシンから生じたチロシルラジカルは二酸化窒素と反応して 3-ニトロチロシンを、また $\cdot\text{OH}$ と反応して L-DOPA を生成する²²⁾。また、二分子のチロシルラジカルが重合して 3,3'-ジチロシンを形成する^{23,24)} (Scheme 1-5)。トリプトファンも ROS によって容易に酸化され、ヒドロキシ体やニトロ体、また開環体のキヌレニン等を生じる (Scheme 1-3)。

脂質過酸化反応によって生じた不飽和アルデヒドはタンパク質のリジン、アルギニン、プロリン、システインなどの求核性残基と Michael 付加し、カルボニル化タンパク質を生成する。カルボニル化タンパク質は比較的安定に存在することから、生体内の酸化ストレスマーカーとして測定される²⁵⁾。



Scheme 1-5 ROS によるチロシン及びトリプトファンの酸化修飾

1-5 抗酸化防御システム

生体は過剰な ROS を消去し、酸化ストレスから生体を防御する多様なシステムを備えている。

スーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase; SOD) は $O_2^{\cdot-}$ の酸素と H_2O_2 への不均化を触媒する。Cu,Zn-SOD (SOD1) は各組織の細胞質で恒常的に発現している SOD アイソフォームであり、1969 年に Fridovich と McCord によって最初に発見された^{26,27)}。Mn-SOD (SOD2) はミトコンドリアに局在し、酸化ストレスに応じて誘導される。また、血清中に存在する Cu,Zn-SOD アイソザイムが見出されており、EC-SOD (extracellular-SOD, SOD3) と呼ばれる。霊長類における SOD 比活性と寿命には正の相関があることが報告されている²⁸⁾。

カタラーゼはペルオキシソームに局在するヘムタンパクで、 H_2O_2 を水と酸素へ変換する。グルタチオンペルオキシダーゼ (Gpx) は生体内に広く分布しており、グルタチオンの存在下で H_2O_2 及び脂質ヒドロパーオキシドを還元する。 H_2O_2 以外の過酸化物質も消去可能であることがカタラーゼと異なる点である。Gpx は活性中心にセレノシステインを有し、SeH 基が過酸化物質をアルコールへ還元するとともに自身は SeOH へと酸化される。SeOH はグルタチオンから電子を受け取ることで還元型の SeH に再生される。また、近年注目されているシステイン酵素にペルオキシレドキシシン (Prx) ファミリーがある。Prx の活性中心はシステインの SH 基であり、過酸化物質を還元してジスルフィド結合を形成する。このジスルフィド結合はチオレドキシシンの作用によってチオール基に再生される。Prx の機能には未だ不明な点が多いものの、抗炎症・抗癌・抗アポトーシス作用を有することが示唆されている²⁹⁾。

酸化ストレス応答関連タンパク質の発現制御を行う機構に、Keap1-Nrf2 系がある。Nrf2 (nuclear factor erythroid-2-related factor 2) は抗酸化剤応答配列 (antioxidant responsive element; ARE) を有する遺伝子群の転写を活性化する³⁰⁾。Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) は Nrf2 の活性を抑制するタンパク質である。低ストレス時、Nrf2 は Keap1 と結合した状態で細胞質に存在し、ポリユビキチン化を受け分解される^{31,32)}。Keap1 の特定部位のシステイン残基が ROS などの親電子性物質によって酸化されると、Keap1 と Nrf2 の結合が部分的に解離し、Nrf2 の安定化と核内移行が起こる。核内移行した Nrf2 は各遺伝子のプロモーター領域に存在する ARE に結合し、酸化ストレス関連タンパクや第二相解毒代謝酵素の発現を誘導する³³⁾。In vitro または in vivo において、フェノール性抗酸化剤や過酸化物質、重金属、キノン類、イソチオシアネートなどさまざまな物質が Nrf2 を活性化する³⁴⁾。

ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) は Nrf2 によって発現誘導を受ける酵素の一つであり、近年その作用に注目が集まっている。HO-1 はヘムを分解してビリベルジンと一酸化炭素 (CO) を生成する。ビリベルジンやビリルビンは強力な抗酸化物質として作用し、また CO は抗炎症作用を有することが示唆されている³⁵⁾。

1-6 酸化ストレスと細胞死制御

ROS による酸化ストレスは、細胞の分化・生存またはアポトーシスと密接に関与することが知られている。以下、ROS が関連する主要な細胞内シグナル伝達経路について概説する。

PI3K (ホスホイノシチド-3-キナーゼ)/プロテインキナーゼ B (PKB/Akt) 経路は細胞の生存とアポトーシスに関与するシグナル伝達経路の一つである。H₂O₂ は PI3K を直接活性化することが知られている³⁶⁾。PI3K はホスファチジルイノシトール-2-リン酸をホスファチジルイノシトール-3-リン酸 (PIP₃) に変換する。PIP₃ はホスホイノシチド依存性キナーゼ 1 (PDK1) と相互作用して PKB を活性化する。PKB は多様なタンパク質をリン酸化して活性化し、細胞分化の誘導やアポトーシス抑制を起こす。PI3K の活性は PTEN (phosphatase with tensin homology) によって負に制御されている。H₂O₂ は PTEN の不活性化を惹起し、生存シグナルを活性化すると考えられている³⁷⁾。しかし、過剰の H₂O₂ は PKB の変性を誘発しアポトーシスを惹起することも知られている³⁸⁾。プロテインキナーゼ C (PKC) も ROS に応答して活性化される。PKC は多数のシステイン残基を含み、それらが ROS によって酸化されジスルフィド結合を形成すると PKC の V_{max} が上昇することが示されている³⁹⁾。PKC もまた、ROS が過剰となった場合には不活性化される⁴⁰⁾。

MAPK (mitogen-activated protein kinase) は、DNA 修復、免疫機能、細胞増殖サイクルの制御、アポトーシスなど、生体防御に関与する遺伝子の発現を調節する。MAPK ファミリーには古典的 MAPK と言われる ERK1/2 (extracellular-regulated kinase 1/2) と、それより後に同定された JNK (c-Jun N-terminal kinase) 及び p38 MAPK がある。ERK は成長因子のシグナリングに関与し、JNK 及び p38 はストレスに応答した細胞分化に関与する。いずれの MAPK も ROS によって直接的に活性化されることが知られている⁴¹⁾。また、抗酸化剤が MAPK 活性化を抑制することも報告されている⁴²⁾。

炎症反応に関与する NF-κB (nuclear factor κB) は H₂O₂、¹O₂、ONOO⁻ などの ROS によって直接活性化される転写因子である。NF-κB は通常抑制因子の IκB と複合体を形成して細胞質に留まっているが、ストレス刺激によって IκB の抑制が外れると核内移行して各種遺伝子発現を誘導する。炎症反応に際しては好中球の Nox2 によって O₂⁻ が産生され、これは H₂O₂ や ONOO⁻ に変換されることで NF-κB を活性化すると考えられている⁴³⁾。

1-7 酸化ストレスと疾患

ROS やフリーラジカルによる酸化ストレスの増大は、種々の疾病と密接に関与することが知られている (Table 1-1)。しかし、それらの疾病において酸化ストレスが直接の発症原因であるのか、または疾病が進行した結果酸化ストレスが上昇するのかについては未だ不明な点が多い。

Table 1-1 酸化ストレスとの関連が提唱されている疾患

がん
炎症
血管障害…虚血性疾患 (心筋梗塞、脳梗塞)
虚血再灌流障害
動脈硬化
神経変性疾患 (パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症、ハンチントン病、プリオン病)
脱髄疾患 (多発性硬化症、視神経脊髄炎)
ミトコンドリア疾患
皮膚変性 (しみ、しわ、光アレルギー)
眼疾患 (未熟児網膜症、白内障、糖尿病性網膜症、加齢黄斑変性、ドライアイ)
呼吸器疾患 (気管支喘息、COPD、パラコート肺)
消化器疾患 (消化性潰瘍、膵炎、潰瘍性大腸炎、 <i>H.pylori</i> 感染症)
心疾患 (心不全、アドリアマイシン心筋症)
肝疾患 (薬剤性肝障害、非アルコール性脂肪性肝炎、C型肝炎)
腎疾患 (慢性腎不全、糸球体腎炎、尿毒症)
血液疾患 (播種性血管内凝固症候群、ポルフィリン血症)
代謝疾患 (糖尿病、脂質異常症)
精神疾患 (鬱病、統合失調症)
騒音性難聴
自己免疫疾患 (慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス)
後天性免疫不全症候群 (AIDS)

これら疾患のうち、パーキンソン病、アルツハイマー病、筋萎縮性側索硬化症 (ALS) などの神経変性疾患や、多発性硬化症などの脱髄疾患はアンメットメディカルニーズと呼ばれ、既存の治療法や薬剤では満足な治療効果が得られず、革新的な治療薬の登場が求められている。

東日本大震災で生じた原発事故により、放射性物質の危険性がクローズアップされた。被曝に伴う各種放射線障害にも酸化ストレスが関与する。生体内の水分子は放射線の作用によってホモリティックに開裂し、その結果生成した種々の ROS が生体分子を攻撃して障害を惹起すると考えられる⁴⁴⁾。

1-8 抗酸化物質

低分子抗酸化剤は、単独または抗酸化酵素との相互作用によって ROS やフリーラジカルを消去し、酸化ストレスから生体を防御する。天然に存在する低分子抗酸化剤には、ビタミンとして摂取するアスコルビン酸、 α -トコフェロール、内因性物質のグルタチオン、ユビキノール、尿酸、また植物の二次代謝産物であるカテキン、レスベラトロール、クルクミンなどのポリフェノール類、 β -カロテンやアスタキサンチンといったカロテノイドなどがある (Fig. 1-2)。

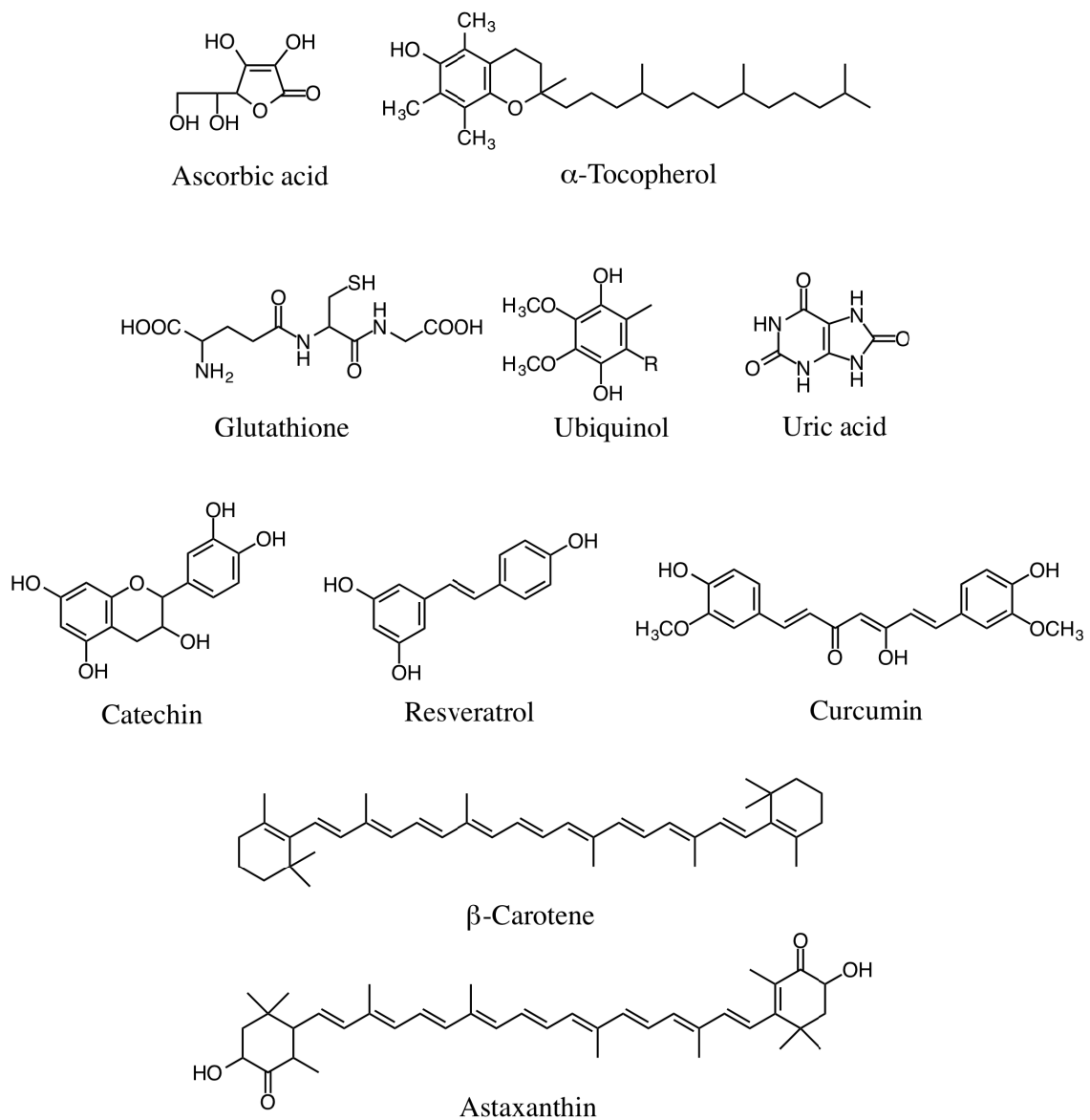


Fig. 1-2 天然に存在する低分子抗酸化剤

人工的に合成された低分子抗酸化剤としては、フェノール性抗酸化剤 3,5-ジ(*tert*-ブチル)-4-ヒドロキシトルエン (BHT) や 4-ヒドロキシ-3-*tert*-ブチルアニソール (BHA)、 α -トコフェロールの水溶性誘導体であるトロロックス、ニトロン系物質 TEMPOL、NXY-059、OT-551、分子内にセレンを有するエブゼレン、医薬品として承認されているエダラボンなどがある (Fig. 1-3)。

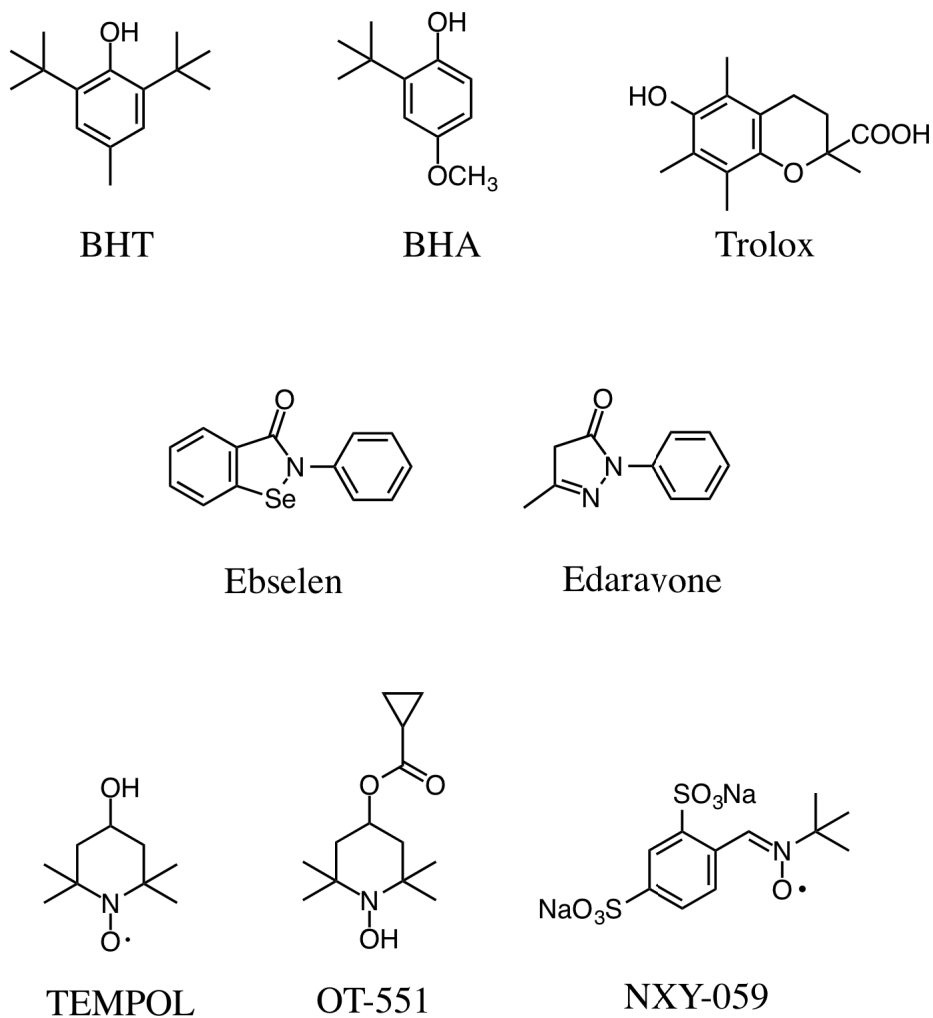


Fig. 1-3 合成低分子抗酸化剤

1-9 抗酸化剤の医薬品開発

1-9-1 抗酸化作用を主作用とした医薬品及びその候補物質

1-9-1-1 エダラボン

エダラボン (3-メチル-N-フェニルピラゾール-5-オン, Fig. 1-3) は抗酸化作用を主作用とする唯一の医薬品である。本邦でラジカット®として 2001 年に承認され、2013 年現在では十数種の後発品が発売されている。エダラボンは脳梗塞時の虚血再灌流によって生成する ROS やフリーラジカルを消去することで、細胞膜脂質の過酸化を抑制し、脳細胞を酸化障害から保護するとされている。またエダラボンは ALS に対する希少疾病用医薬品 (オーファンドラッグ) 指定を受け、臨床試験が実施されている⁴⁵⁾。ほかにも心血管疾患⁴⁶⁾、糖尿病⁴⁷⁾、パーキンソン病⁴⁸⁾、炎症性疾患⁴⁹⁾に対する効果も検討されており、抗酸化物質がさまざまな疾病の治療薬となる可能性を示している。しかし、エダラボンには急性腎不全による死亡例が複数報告され、2002 年には緊急安全性情報が発出された。また、因果関係が否定できない副作用として劇症肝炎の報告もあり、こちらも死亡例が確認されている。

1-9-1-2 エブゼレン

エブゼレン (Fig. 1-3) はグルタチオンペルオキシダーゼ様活性を有する低分子抗酸化剤であり、 H_2O_2 や脂質ヒドロパーオキシドを消去する。 1O_2 や ONOO⁻ に対する消去活性も報告されている^{50,51)}。一方で、ラジカル種に対する消去作用は弱いと考えられている⁵²⁾。脳梗塞急性期の虚血再灌流障害やクモ膜下出血に対する神経保護作用を有することが期待され、本邦で臨床試験も実施された。しかし、第 III 相試験において既存薬オザグレルナトリウムを上回る有効性が得られなかったため、開発は中止された^{53,54)}。

1-9-1-3 ニトロン系抗酸化剤

NXY-059 (Fig. 1-3) はジスフェントンとも呼ばれるニトロン系のフリーラジカルスカベンジャーである。ラット虚血再灌流障害モデルにおいて神経保護効果が確認され⁵⁵⁾、その後 SAINT (stroke-acute ischemic NXY treatment) と名付けられた大規模臨床試験が二度実施された。認容性は良好であったものの、第 III 相試験で有意な効果が確認できず⁵⁶⁾、開発は中止された。

SOD 様の $O_2\cdot$ 消去活性を有する TEMPOL-H (1,4-ジヒドロキシ-2,2,6,6-テトラ

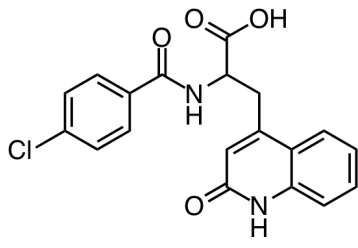
メチルペリジン, Fig. 1-3) のプロドラッグとして開発された OT-551 (Fig. 1-3) は、ラット網膜色素上皮細胞への光障害に対して抑制作用を示し、また認容性も高いことが確認された⁵⁷⁾。米国で加齢黄斑変性症を対象とした第 II 相臨床試験が実施され、中程度の有効性が確認された⁵⁸⁾ものの、その後開発は中止された⁵⁹⁾。

1-9-2 その他の抗酸化作用を有する承認済医薬品

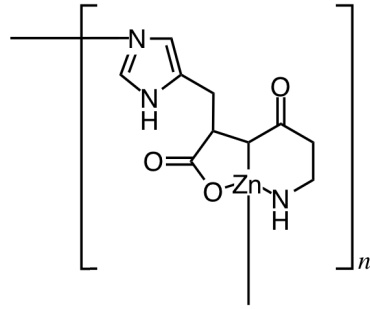
既に臨床使用されている医薬品の中には、その薬理作用の一部に抗酸化作用が関与することが示唆されているものがある。特に ROS 消去活性の関与が示唆されている医薬品について簡単に述べる (Fig. 1-4)。

抗潰瘍薬のレバミピド (ムコスタ[®]) は強力な $\cdot\text{OH}$ 消去作用を有することが知られており、胃粘膜防御作用の一部に抗酸化作用が関与することが示唆されている。同じく抗潰瘍薬のポラプレジック (プロマック[®]) にも $\text{O}_2\cdot$ 消去作用をはじめとする各種抗酸化作用が報告されている。脂質異常症に適応を有するプロブコール (シンレスタール[®]、ロレルコ[®]) の LDL コレステロール低下作用にも ROS 消去作用が関与するとされている。HMG-CoA 還元酵素阻害薬のフルバスタチンナトリウム (ローコール[®]) の抗動脈効果作用にも種々の ROS 消去活性が関与すると言われている⁶⁰⁾。 β 遮断薬のカルベジロール (アーチスト[®]) は他の同効薬に比べ心不全や心筋梗塞への有効性が高いと言われ、それにはラジカル消去作用などの抗酸化作用が関与することが示唆されている。

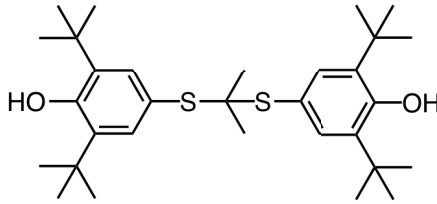
これらは抗酸化作用が種々の疾患に対して有効であることを示唆する重要な知見である。また、基盤となる薬理作用に加えて抗酸化作用を示す医薬品は、相加・相乗的な疾病治療効果を示し、単一の作用機序を有する同効薬よりも優れた医薬品と成り得ることをも示唆している。



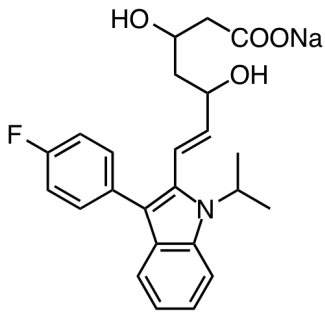
Rebamipide



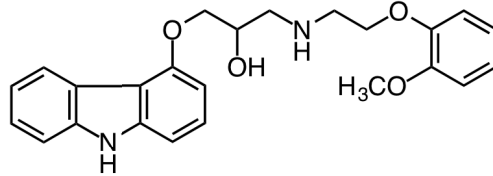
Polaprezinc



Probucol



Fluvastatin sodium



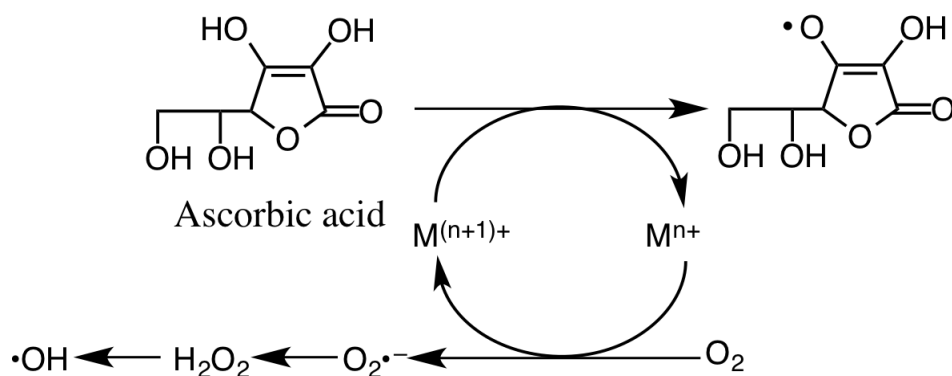
Carvedilol

Fig. 1-4 抗酸化活性を有する承認済医薬品

1-10 抗酸化剤の問題点

1-10-1 抗酸化剤のプロオキシダント効果

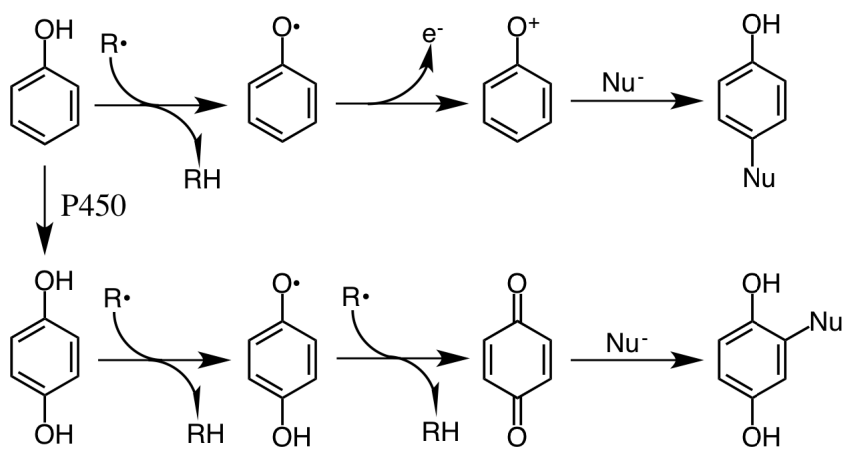
抗酸化剤は生体防御に関与する抗酸化 (antioxidant) 作用を有する一方で、酸化促進 (pro-oxidant) 作用を示す場合もある。特に遷移金属イオンが介在する場合のプロオキシダント効果が良く知られている。アスコルビン酸や、カテキンなどのポリフェノール類、その他還元性を有するフェノール性抗酸化剤などは Fe^{3+} 、 Cu^{2+} などの遷移金属イオンを還元する場合もある。還元された金属イオンは自身の再酸化とともに酸素分子を還元して $\text{O}_2^{\cdot-}$ を生成し、さらに H_2O_2 や $\cdot\text{OH}$ へと変換される (Scheme 1-5)。また、 H_2O_2 と Fe^{2+} の反応によって $\cdot\text{OH}$ が生成する。これは Fenton 反応と呼ばれ、実験室的な $\cdot\text{OH}$ の発生法として広く用いられている。生体内の金属は各種タンパク質と結合しており、遊離金属イオンはごく微量にしか存在しない。そのため、生理的な範囲内ではアスコルビン酸などのプロオキシダント効果はさほど重要でないとする考えもある⁶¹⁾。しかし、炎症や虚血再灌流障害などによって遊離鉄が増加することが知られており⁶²⁾、またパーキンソン病、アルツハイマー病では病変部位において過剰な鉄の沈着が見られることなどから、病的条件下の組織において抗酸化剤のプロオキシダント作用は無視できない因子であると考えられる。



Scheme 1-5 アスコルビン酸の遷移金属介在プロオキシダント効果

1-10-2 フェノール性抗酸化剤の毒性

カテキンや BHT、BHA などのフェノール性抗酸化剤がラジカルを消去した後
に生じるフェノキシルラジカルや、それがさらに酸化されて生じるカチオン体
(Scheme 1-6 top)、またシトクロム P450 等の酵素によって酸化を受けたキノン体
(Scheme 1-6 bottom) は高い反応性を有する。これらはタンパク質のリジン残基や
システイン残基といった求核剤によって攻撃を受け、共有結合を形成すること
によって生体分子の機能を障害し、毒性を発現すると考えられている (Scheme 1-6)。



Nu⁻: 生体高分子由来の求核剤

Scheme 1-6 抗酸化剤と生体高分子の反応

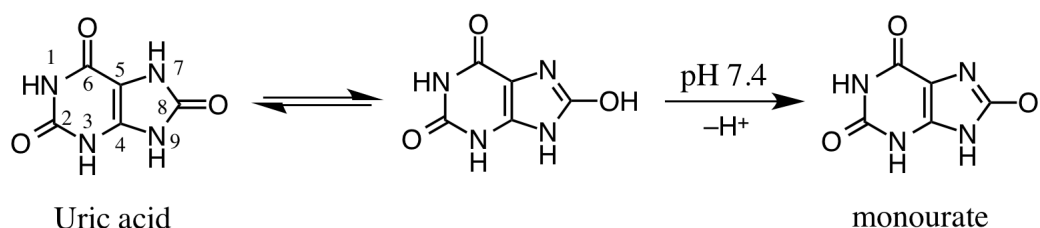
1-11 尿酸

1-11-1 尿酸の物性⁶³⁾

尿酸 (7,9-ジヒドロ-1*H*-プリン-2,6,8-(3*H*)-トリオン) は分子式 $C_5H_4N_4O_3$ 、分子量 168.11 の有機化合物で、常温では無味無臭の白色固体である。波長 292 nm 付近に極大吸収を有する。中性条件の水や有機溶媒に難溶である。

尿酸のオキシプリン構造は水への難溶性の原因であると考えられている。プリン環の窒素原子 α 位や γ 位にヒドロキシ基が置換すると、分子間で会合体を形成するために溶解度は低下する⁶⁴⁾。この溶解度の低さは脂溶性とは無関係であり、有機溶媒には極性・無極性を問わずほとんど溶解しない。

尿酸は水溶液中で互変異性によりエノール型となる。 pK_{a1} (8-OH) は 5.6、 pK_{a2} (2-OH) は 10.3 であり、pH 7.4 の生理的条件下では 8 位のエノール性ヒドロキシ基が解離した一塩基アニオンとして存在する (Scheme 1-6)⁶⁵⁾。



Scheme 1-6 尿酸の互変異性とアニオン化

1-11-2 尿酸の体内動態

尿酸は体液中では大部分がナトリウム塩として存在する。pH 7.4 の正常血清に対する尿酸ナトリウムの溶解度は約 7.0 mg/dL とされている。これはモル濃度に換算すると約 370 μ M である。健常者の体内には約 1,200 mg の尿酸プールが存在し、このうち 1 日約 500 mg は尿中に排出され、約 200 mg は汗や消化液等に排出される⁶⁶⁾。

腎系球体で濾過された尿酸の 90% は尿細管から毛細血管に再吸収される。近位尿細管上皮細胞の管腔側には尿酸トランスポーター URAT 1 (urate transporter in the human kidney) や有機アニオントランスポーター OAT4 (organic anion transporter 4) が存在し、尿酸を細胞内へ輸送する^{67,68)}。また、尿細管基底膜では GLUT 9 (glucose transporter 9) が発現し、細胞内から血管へ尿酸を再吸収する⁶⁸⁾。

1-11-3 高尿酸血症

健常成人の血中尿酸濃度は、男性で 3.8~7.0 mg/dL、女性で 2.4~5.8 mg/dL 程度である。高尿酸血症は「性別、年齢を問わず、血清尿酸値が 7.0 mg/dL を超えた状態」と定義される⁶⁹⁾。高尿酸血症の成因は尿酸産生過剰型と尿酸排泄低下型に大別され、日本人患者の大部分は尿酸排泄低下型である。痛風患者の家系内での発症頻度は一般より高いことからある程度の遺伝子素因の存在が推定されているが、未だ明らかではない。環境因子としては高プリン体食、高カロリー食、ストレス、激しい運動、薬剤等が関与する。高尿酸血症は中年男性に好発し(男女比約 20~50:1)、女性の発症の大部分は閉経後に見られる。これは女性ホルモンが尿酸排泄促進作用を有するためと考えられている⁷⁰⁾。

1-11-4 痛風⁶⁸⁾

痛風は、高尿酸血症が持続した結果、析出した尿酸結晶が関節に沈着することで炎症反応をきたす疾患である。日本人成人男性の有病率は約 1.2 %である。痛風関節炎は体温の低い下肢関節、特に第一中足趾節関節(親指の付け根)に好発し、激しい疼痛、腫脹、発赤を伴う。また、痛風結節と呼ばれる析出した尿酸塩結晶を中心とする肉芽組織を生じる場合がある。さらに高尿酸血症が長期間持続すると、一部は痛風腎と呼ばれる腎髄質の間質性腎炎を併発する。腎機能の低下は尿酸排泄低下型の二次性高尿酸血症を招くほか、尿毒症を合併する場合もある。痛風の治療には血清尿酸値を低下させる薬剤と、炎症を抑制する薬剤が用いられる。前者には尿酸合成酵素キサンチンオキシダーゼ阻害薬のアロプリノールやフェブキソスタット、尿酸排泄促進薬のベンズブロマロンやプロベネシドがある。後者としてはコルヒチンや各種 NSAIDs が用いられる。

1-11-5 尿酸の抗酸化作用

前述の通り、尿酸は内因性の抗酸化物質であり、 $\cdot\text{OH}$ 、 $^1\text{O}_2$ 、 $\text{ONOO}\cdot$ 、といった種々の ROS を消去する⁷¹⁾。生理的な血清尿酸濃度(120-450 μM)はアスコルビン酸(約 50 μM)の 2~9 倍も高く、生体内の主要な抗酸化物質の一つであると考えられている⁷²⁾。また尿酸は鉄イオンと複合体を形成し、遊離鉄による脂質過酸化やアスコルビン酸の酸化を抑制するとも報告されている⁷³⁾。

1-11-6 尿酸の神経保護作用

酸化ストレスは種々の神経変性疾患と密接に関与することが示唆されている。一方で、尿酸の神経保護作用についての報告が数多くなされている。Hooper らは、ONOO⁻ が原因の一つであるとされる多発性硬化症患者では血中尿酸濃度が低下しており、尿酸の生合成前駆体であるイノシンを投与したところ、症状の改善または進行抑制が見られたと報告している⁷⁴⁾。Church らはパーキンソン病患者の黒質では健常人に比べ尿酸濃度が有意に低いことを報告している⁷⁵⁾。同患者の血清尿酸値も健常者より低値を示すことが、Honolulu Heart Program のような大規模スタディを含むいくつかの疫学的調査において明らかとされている^{76,77)}。アルツハイマー病⁷⁸⁾、筋萎縮性側索硬化症^{79,80)}、ハンチントン病⁸¹⁾、変異型クロイツフェルト・ヤコブ病⁸²⁾ などでも、血清尿酸値の低下が示されている。以上のように、尿酸値が低いと神経変性疾患に罹患しやすくなる可能性があり、尿酸はその抗酸化作用を介して神経細胞保護的に働いていると考えられる。

1-11-7 尿酸の毒性

高尿酸血症は痛風発症のみならず、高血圧、動脈硬化といった心血管疾患の独立したリスクファクターとなることが、多くの疫学的調査により示唆されている。その毒性発現機序に関しては不明な点が多いものの、いくつかの仮説が提唱されている。

(1) キサンチンオキシダーゼ活性の上昇に伴う ROS の増加⁸³⁾

プリン体の過剰摂取などにより代謝が亢進した結果、XO の作用で増加した ROS が組織傷害性に作用し、心血管疾患を引き起こすと考えられる。

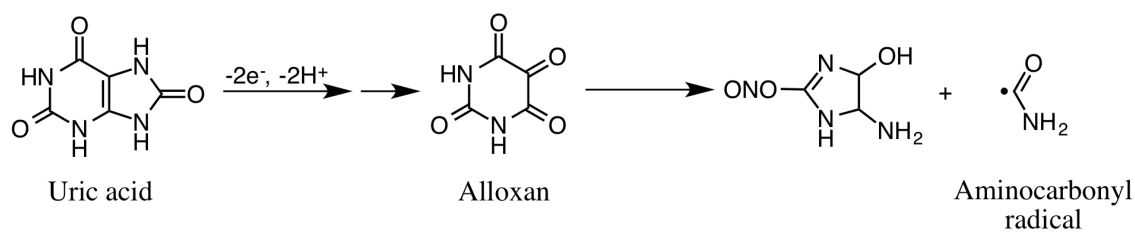
(2) 尿酸分子そのものによる血管障害⁸⁴⁾

尿酸は有機アニオントランスポーターを介して血管平滑筋細胞に取り込まれ、MAPK を活性化し、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2)、血小板由来成長因子 A (PDGF-A)、単球走化活性因子 (MCP-1) 等を誘導する。その結果、血管平滑筋細胞の増殖とともに炎症が惹起され、動脈硬化等の疾患に繋がると考えられる。

(3) 尿酸と ROS の反応生成物に由来する毒性

尿酸は ONOO⁻ 消去の過程で反応性の高い中間体を生成し、これが生体分子を攻撃するとの仮説が提唱されている⁸⁵⁾。Santos らは尿酸と ROS の反応によって生成したアロキサンがさらに ONOO⁻ と反応してアミノカルボニルラジカルを生じ (Scheme 1-7)、これが脂質過酸化を引き起こす可能性があるとして報告している⁸⁶⁾。また、アロキサンも毒性が高く、膵ランゲルハンス島 β 細胞を障害することから

II 型糖尿病モデル動物の作製に用いられる⁸⁷⁾。

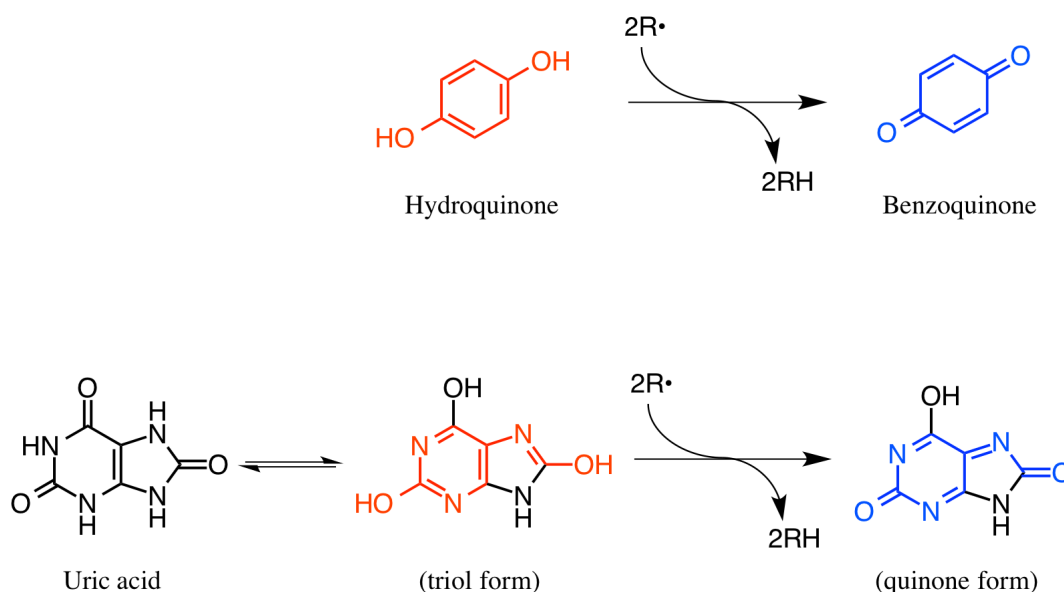


Scheme 1-7 尿酸からのアロキサンとアミノカルボニルラジカルの生成³⁸⁾

これらの機序が単独または複合的に作用し、心血管疾患を誘発すると考えられる。また、尿酸は疎水性環境下では抗酸化活性を発現できないだけでなく、Noxを刺激して ROS 生成を促進するとの報告もある⁷¹⁾。以上のように、高濃度の尿酸は痛風発症以外でも生体に毒性を示す可能性があり、適度な血中濃度を保つことが必要であると考えられる。

1-12 尿酸類縁体の抗酸化活性^{88,89)}

当研究室の柿木らは、新規骨格を有する抗酸化活性医薬品の創製研究の一環として、内因性抗酸化物質の尿酸に着目した。柿木らは尿酸の抗酸化活性発現機構を推定するにあたり、ヒドロキノンのラジカル消去機構をモデルとした。ヒドロキノンは2分子のラジカル種を還元し、自身は酸化されベンゾキノンとなる (Scheme 1-8)。尿酸は互変異性によりヒドロキノンと等価な2,6,8-トリオール型となり、これは2分子のラジカル種を還元してキノン型となりうる。このような機構でラジカル消去活性を発現すると推定した (Scheme 1-8)。



Scheme 1-8 尿酸の抗酸化活性発現推定機構

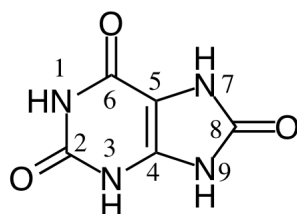
この推定機構において、尿酸のオキシプリン構造のうち一部の官能基はラジカル消去活性発現に不要であると考えられた。また、尿酸の低水溶性には前述のようにオキシプリン構造が関与することが示唆されている。そこで柿木らは、尿酸の抗酸化活性発現に必要な部分構造のみを残し、構造を単純化することで、抗酸化活性と水溶性の向上ができれば、医薬品リード化合物としての応用も可能であると考えた。

柿木らはこの仮説を元に種々の尿酸類縁体をデザイン、合成し、抗酸化活性の指標として DPPH ラジカル消去活性を測定したところ、化合物 **A**、**B**、**C**、**D**、**1** (Fig. 1-5) が尿酸よりも高い活性を示した (Table 1-2)。一方で、Fig. 1-6 に示す化合物はラジカル消去活性を示さなかった。これらの結果から、ラジカル消去活性

発現において、六員環上にヒドロキシ基が一個（この場合は 2 位ヒドロキシ基）あれば、尿酸の 1 位窒素原子及び 6 位カルボニル基は必須ではなく、むしろ無い方が活性は増強すること、また 3 位窒素原子と 8 位カルボニル基は活性に影響し、9 位の窒素原子は炭素原子または酸素原子に変換可能であること、さらに六員環にフェノール性ヒドロキシ基を有する二環構造が必須であることが明らかとなった (Fig. 1-7)。

Table 1-2 尿酸類縁体の DPPH ラジカル消去活性

	Uric acid	A	B	1	C	D
DPPH radical scavenging activity ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	0.7	71	110	11	2.6	8.7



Uric acid

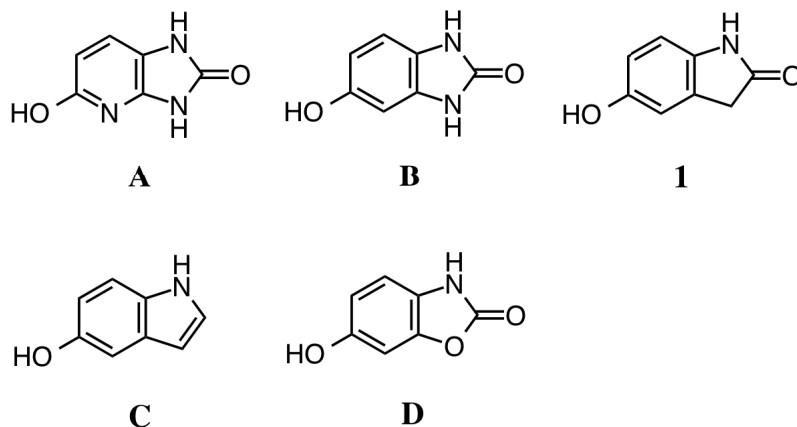


Fig. 1-5 高い DPPH ラジカル消去活性を示した尿酸類縁体

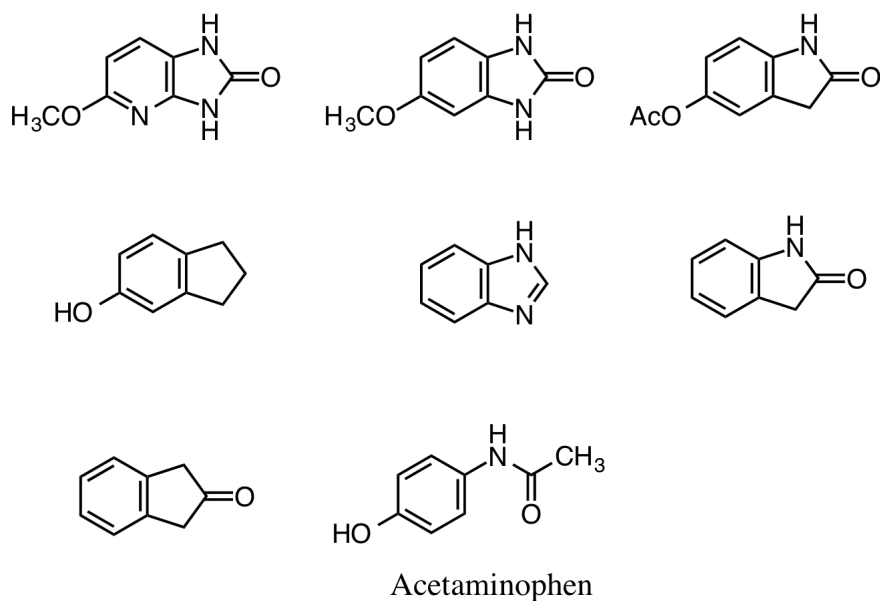


Fig. 1-6 DPPH ラジカル消去活性を示さなかった類縁体

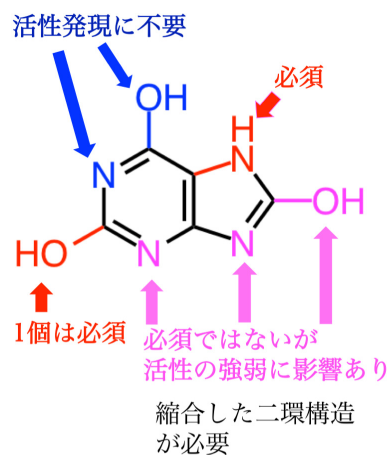


Fig. 1-7 尿酸類縁体のラジカル消去活性における構造活性相関-1

尿酸はフリーラジカルの消去活性の他に、非ラジカル種である ONOO^- の消去活性も有する。当研究室の伊藤らは、*in vitro* における ONOO^- 誘発チロシンニトロ化に対する尿酸及び **A**、**B**、**C**、**D**、**1** の阻害活性を測定した。その結果、**A**、**B**、**C**、**1** が尿酸よりも効果的なチロシンニトロ化阻害活性 (ONOO^- 消去活性) を有することを明らかとした⁹⁰⁾。また、**B** と ONOO^- 反応生成物の同定により、**B** は ONOO^- 由来の活性種によってニトロ化を受けることでチロシンのニトロ化を阻害したことも示されている⁹⁰⁾。

1-13 5-ヒドロキシオキシインドール

柿木らがデザインした尿酸類縁体の中で、5-ヒドロキシオキシインドール (**1**) は哺乳類の生体内に微量存在し、抗酸化活性以外にもいくつかの生理活性を有することが認められている。

¹⁴C ラベルしたインドールをラットに経口投与し、尿中の代謝物を解析したところ、**1** およびそのグルクロン酸抱合体または硫酸抱合体が検出された⁹¹⁾。その後、**1** は健常なヒトを含む哺乳類の血中に数 nM 程度の濃度で存在し、内因性物質であることが示唆された⁹²⁾。また羊の脳において、時刻及び光周期による **1** の濃度変動が見られ、概日リズムとの関連性が示唆されている⁹³⁾。また、モノアミンオキシダーゼ (MAO) 阻害活性を有することも示されており、特に MAO-A に対して中程度の阻害活性を示すことが報告されている⁹⁴⁾。さらに、**1** は ERK2 のリン酸化阻害活性を示したとの報告もある⁹⁵⁾。一方で、抗酸化活性に関しては柿木らの報告が初めてであった。

これらのことは、**1** が内因性の生理活性物質として、何らかの役割を有することを示唆している。しかし、それらに関する報告例は少なく、今後の研究の進展が望まれる。

1-14 研究目的

本研究では、高いラジカル消去活性を示した尿酸類縁体 **A**、**B**、**C**、**1** の構造を規範とし、臨床応用を指向した新規抗酸化活性医薬品リード化合物を創製することを目的とした。初めに、尿酸類縁体のラジカル消去活性における構造活性相関について更なる検討を行い、そこで見出した有望な尿酸類縁体の構造を基盤として、創薬化学的な観点から修飾法を検討、そして抗酸化活性を向上した改良型誘導体の創製を試みた。

1-14-1 ラジカル消去活性における構造活性相関のさらなる検討

DPPH ラジカル消去活性における構造活性相関において、先行研究では尿酸の構造の単純化に焦点を当てた。六員環上には少なくとも 1 個のフェノール性ヒドロキシ基が必要であることが示されたが、その置換位置がラジカル消去活性に与える影響については検討されていない。尿酸類縁体である化合物 **A**、**B**、**C**、**1** はいずれも、六員環上のヒドロキシ基は五員環上窒素原子のパラ位に位置する。しかし、ヒドロキシ基が六員環上の他の位置に置換した場合でも Scheme 1-8 と同様なヒドロキノン等価構造に基づくラジカル消去活性は発現可能であると考えられる。そこで各種の異性体についてラジカル消去活性を評価することとした。

化合物 **C** は六員環部位の構造が **1** と同じであるが、五員環部位にアミド構造を持たない。**C** は **1** よりも低いが、尿酸よりは高いラジカル消去活性を示した。一方で、六員環部位が **A** や **B** に対応し、かつ五員環部位にアミド構造を持たない化合物についてはラジカル消去活性が未解明であった。そこで、五員環部位に単純なアゾール構造を有する化合物のラジカル消去活性を評価することとした。

1-14-2 創薬化学を考慮した修飾法の検討と改良型誘導体の創製

抗酸化物質を医薬品として応用する場合、ROS との化学的な反応性以外に、体内動態や毒性を左右する物性も重要な活性制御因子となる。吸収や毒性発現に関与するパラメータとして脂溶性 (ClogP 値) や極性表面積 (tPSA) などがある。リード化合物の開発成功率を向上するため、これらの物性パラメータは創薬プロセスの初期段階から重視される項目である。このことは *in vivo* 試験に先立つ細胞や組織などのモデル系への適用に際しても同様である。また反応性の高い ROS は主に生成した近傍において傷害を惹起することから、抗酸化剤は標的部位への高い集積性を有する必要がある。物性を調節する最も一般的な手法は各種置換基の導入による誘導体化であるが、その際には主作用である ROS 消去活性への影響は可能な限り低く抑えることが望ましい。この条件を満たし得る化合物を、先

行研究及び 1-14-1 項で活性評価した誘導体の中から選択し、その構造を元に置換基の導入、物性の制御を行って、置換基導入による抗酸化活性への影響を評価し、尿酸類縁体をさらに改良した新規抗酸化活性医薬品リード化合物の創製を試みた。

第2章 新規抗酸化剤のデザインと合成

2-1 新規抗酸化剤のデザイン

2-1-1 尿酸類縁体のヒドロキシ基位置異性体

まず、ラジカル消去活性に対する六員環上ヒドロキシ基の位置の影響を評価するため、化合物 **B** のヒドロキシ基位置異性体 **B-i** 及び **1** の位置異性体 **1-i**、**1-ii**、**1-iii** をそれぞれデザインした (Fig. 2-1)。化合物 **B-i** 及び **1-iii** は、尿酸の六員環上の2個のエノール性ヒドロキシ基のうち6位ヒドロキシ基を残し2位を水素に置換した類縁体と捉えられる (Fig. 2-2)。いずれの化合物も、尿酸、**B**、**1** と同様に、互変異性によってヒドロキノン等価構造を取ることができ、2分子のラジカル種を消去してジオン型へと酸化される可能性がある (Scheme 2-1)。

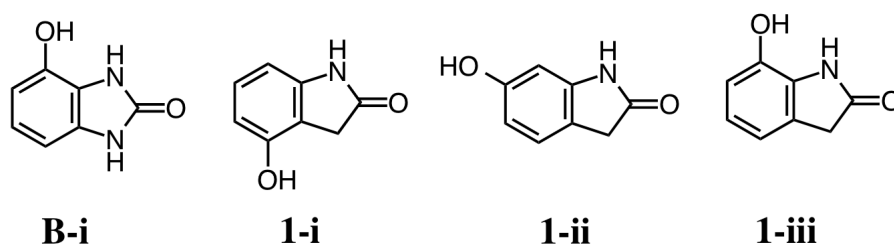


Fig. 2-1 化合物 **A**、**B** のヒドロキシ基位置異性体

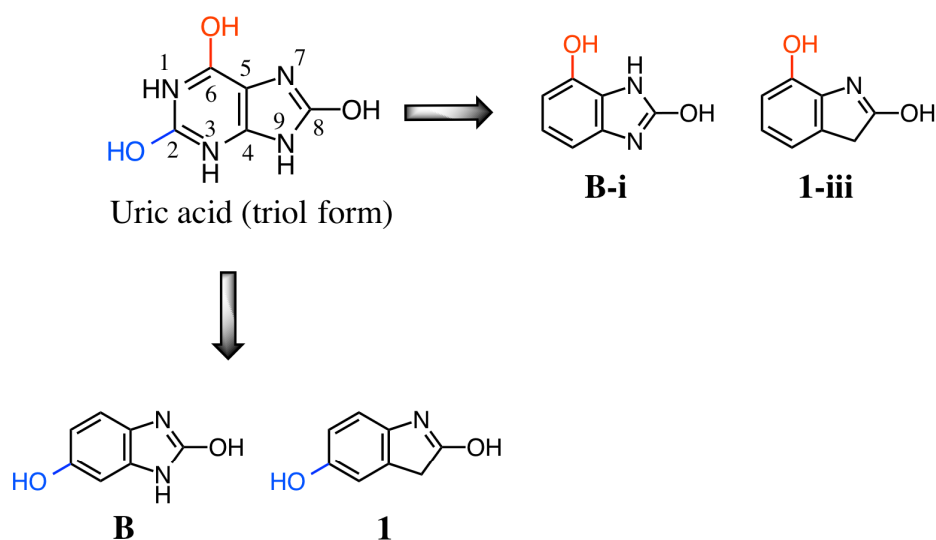
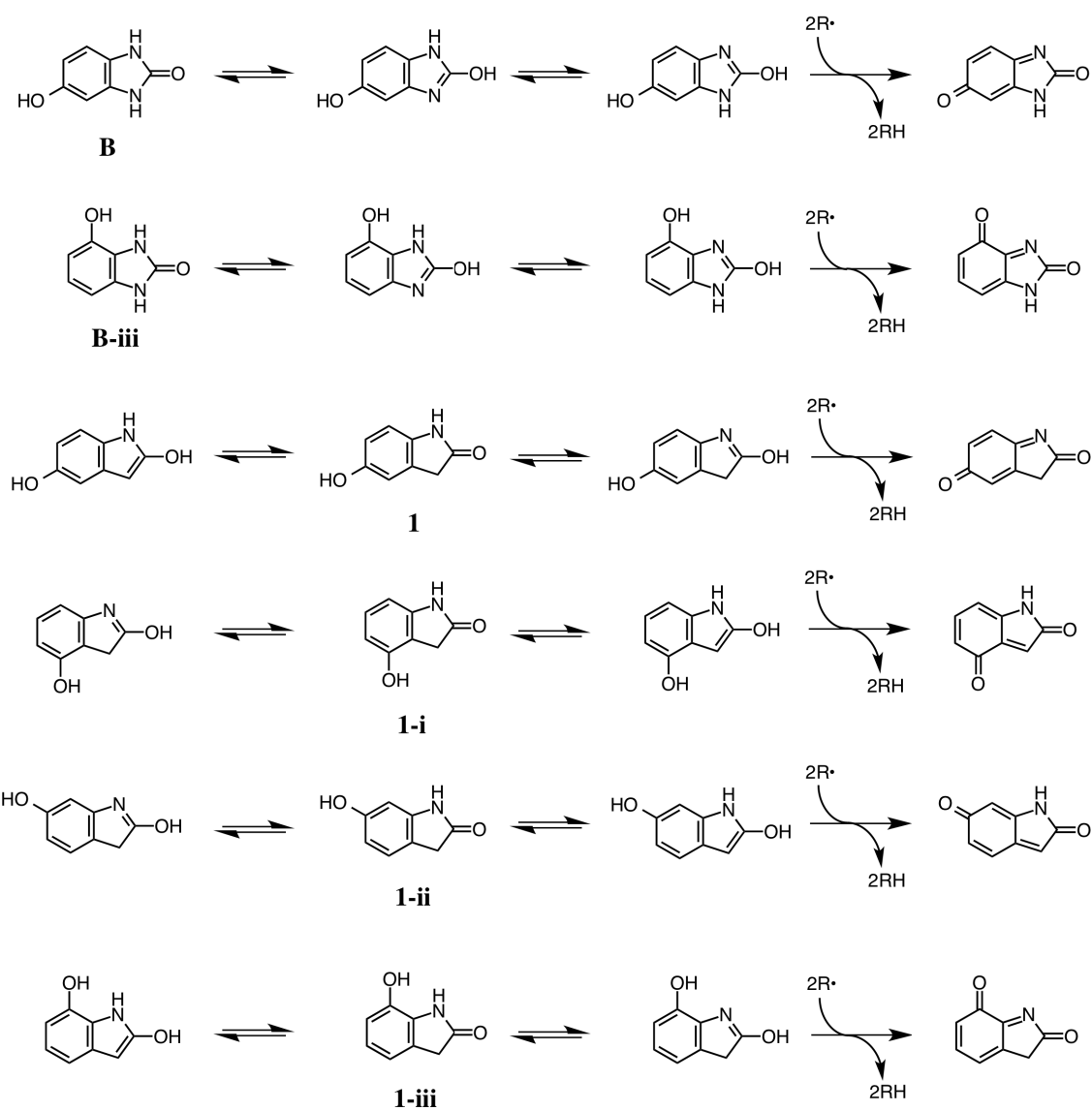


Fig. 2-2 尿酸と類縁体のヒドロキシ基位置の対応



Scheme 2-1 化合物 **B**、**1** 及びそれらの異性体の推定ラジカル消去機構

2-1-2 五員環にアミド構造を持たない尿酸類縁体

化合物**C**は縮合芳香環の母核がインドールと見なせる点で**1**と同じであるが、五員環部位にアミド構造を持たない。**C**は**1**よりも低い、尿酸よりは高いラジカル消去活性を示した。一方で、**A** (Fig. 2-2) の母核であるイミダゾ[4,5-*b*]ピリジンや**B**の母核であるベンズイミダゾールを持ち、かつ五員環部位にアミド構造を持たない化合物のラジカル消去活性は未検討であった。五員環がアミドを持たない単純なイミダゾール構造であれば、そのC-2位 (Fig. 2-2) に修飾を施す余地がある。実際、C-2位置換ベンズイミダゾールはドラッグデザインにおいて汎用される部分構造である。そこで、**A**、**B**に対応し、五員環を単純なイミダゾール構造とした化合物**C-i**、**C-ii**をデザインした (Fig. 2-3)。また、**C-ii**と五員環の窒素原子の位置や数が異なり、イミダゾールと同様に創薬化学のビルディングブロックとしても汎用されるインダゾールまたはベンゾトリアゾールとした**C-iii**、**C-iv** (Fig. 2-3) もデザインし、ラジカル消去活性を比較することとした。

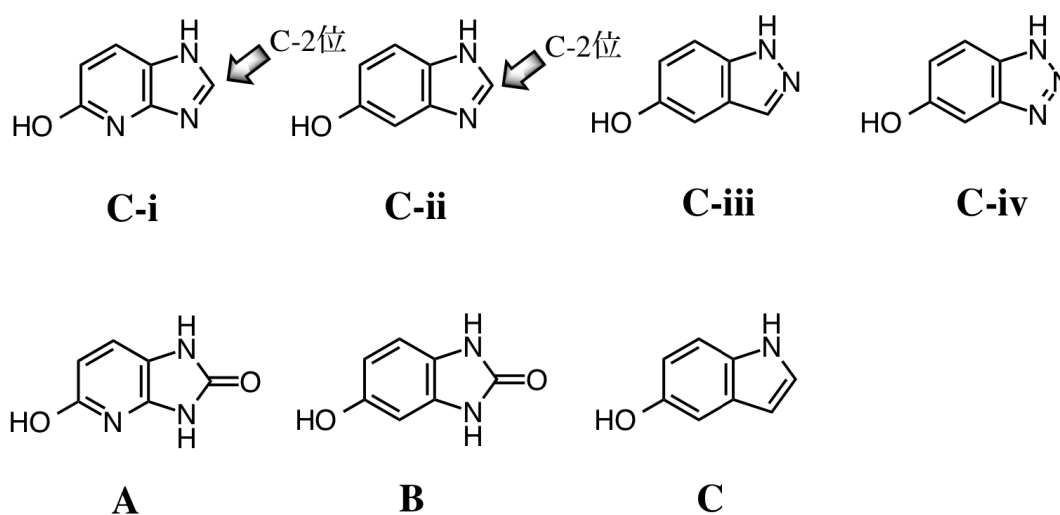


Fig. 2-3 五員環にアミド構造を持たない類縁体 (及び先行研究で用いた類縁体)

2-1-3 化合物 **1** の C-3 位に置換基を導入した誘導体

化合物 **B-i**、**1-i~iii**、**C-i~iv** の DPPH ラジカル消去活性を評価 (第 3 章) し、また先行研究で **A**、**B**、**C**、**1** のラジカル消去活性の値も合わせて考慮した結果、物性の制御を志向した誘導体化を行うための基本構造として **1** を選択した。

先行研究で用いた **B**、**D**、**1** (Fig. 2-4) の 3 位は N、C、O とそれぞれ異なる原子であるが、いずれの場合でも尿酸より強いラジカル消去活性を示した。このことから、3 位の構造変換はラジカル消去活性への影響は少ないと考えられる。

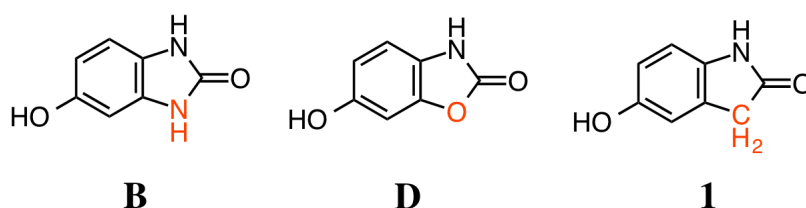
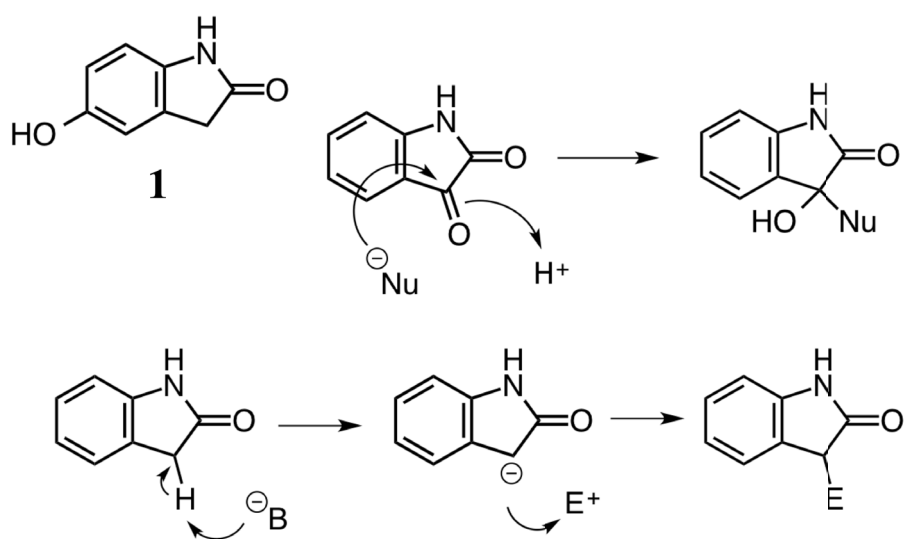


Fig. 2-4 尿酸類縁体 **B**、**D**、**1** (赤字部分が 3 位)

特に、化合物 **1** の C-3 位は sp^3 炭素であり、ラジカル消去に直接関与する π 電子共鳴系から外れていることから、この部位への置換基の導入は抗酸化活性を維持しつつ修飾を行う方法として有効であると予想した。さらに、**1** の基本骨格であるオキシインドールは、C-3 位に置換基を導入する合成法が数多く報告されている。特に、安定かつ安価な前駆体であるイサチンを用いた反応が一般的である。C-3 位にカルボニル基を有するイサチンは、アルドール反応で多様な置換基を短工程で容易に導入できる (Scheme 2-2)。イサチンはカルボニル α 位に水素を持たないため、交差アルドール反応の懸念がなく、単一の生成物を得やすい。また、今回は光学異性体について考慮しなかったものの、C-3 位の立体配置を制御する不斉合成法についても多くの研究が行われており、必要に応じて片方のエナンチオマーを選択的に得ることも可能である。また、**1** の母核であるオキシインドールの C-3 位は塩基で容易に脱プロトン化してエノラートを生じ、アルドール反応をはじめとする各種反応を行うこともできる (Scheme 2-2)。

有機化学的な利便性以外にも **1** を医薬品リード化合物として用いる利点はある。化合物 **1** は、1-13 項で述べた通り健常人の血中に微量存在する内因性の化合物である。一連の化合物はそもそも内因性物質である尿酸の類縁体であり、**1** 自体も内因性であることは、毒性発現リスクの軽減に繋がると考えられる。化合物 **A**、**B**、**D** は現在までに内因性物質として見出された報告はない。



Scheme 2-2 オキシインドール C-3 位の反応例

誘導体 **A** や **B** は **1** より高いラジカル消去活性を有し、N-3 位に置換基を導入することで誘導体化が可能である。しかし、五員環上に二個の N 原子を有することから位置選択性を制御する必要がある。また生体成分への適用にあたっては単純なラジカル消去活性の増強だけでなく物性の改善によってラジカル消去活性の低さを補えると考え、今回は **1** を基本骨格として選択することとした。

今回、C-3 位への置換基の導入による物性の調節と抗酸化活性への影響を評価するため、抗酸化部位と独立した物性調節部位としてアセトニル基を持つ誘導体 **2**、及びフェナシル基を持ち、そのベンゼン環パラ位に様々な物性パラメータを持つ置換基を有する誘導体 **3a~n** をデザインした (Fig. 2-5)。また、先にそれらのラジカル消去活性 (第 3 章) と脂質過酸化抑制効果 (第 4 章) を評価し、そこで良好な活性を示した化合物を基盤として **4a~e**、**5a~c**、**6a~c** をデザインした (Fig. 2-5)。

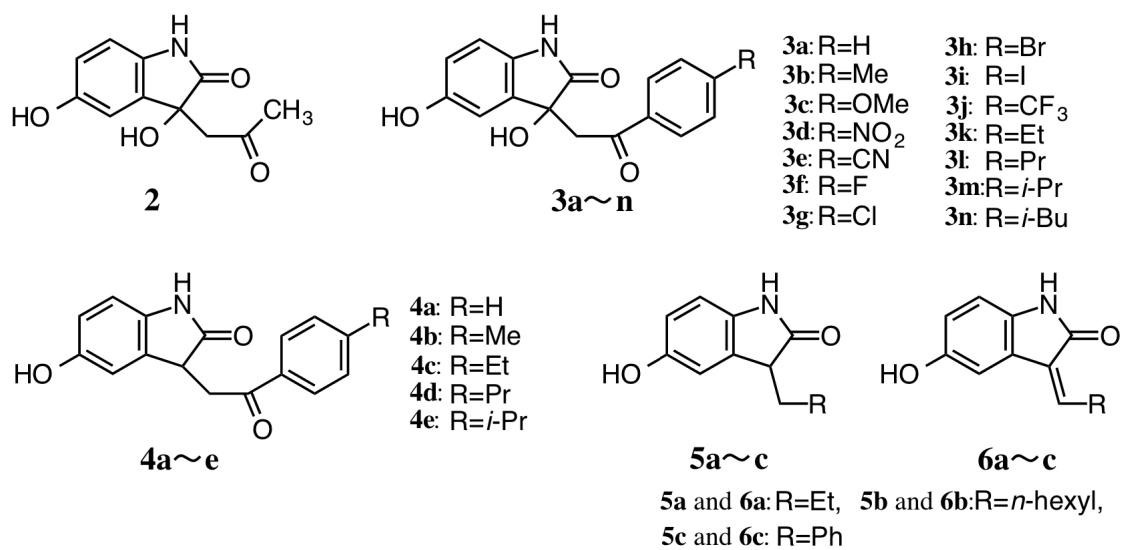
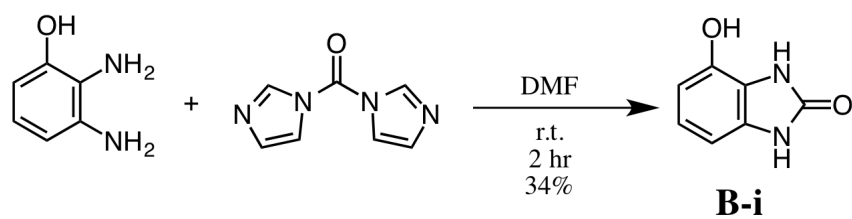


Fig. 2-5 化合物 **1** の 3 位に置換基を導入した誘導体

2-2 デザインした化合物の合成

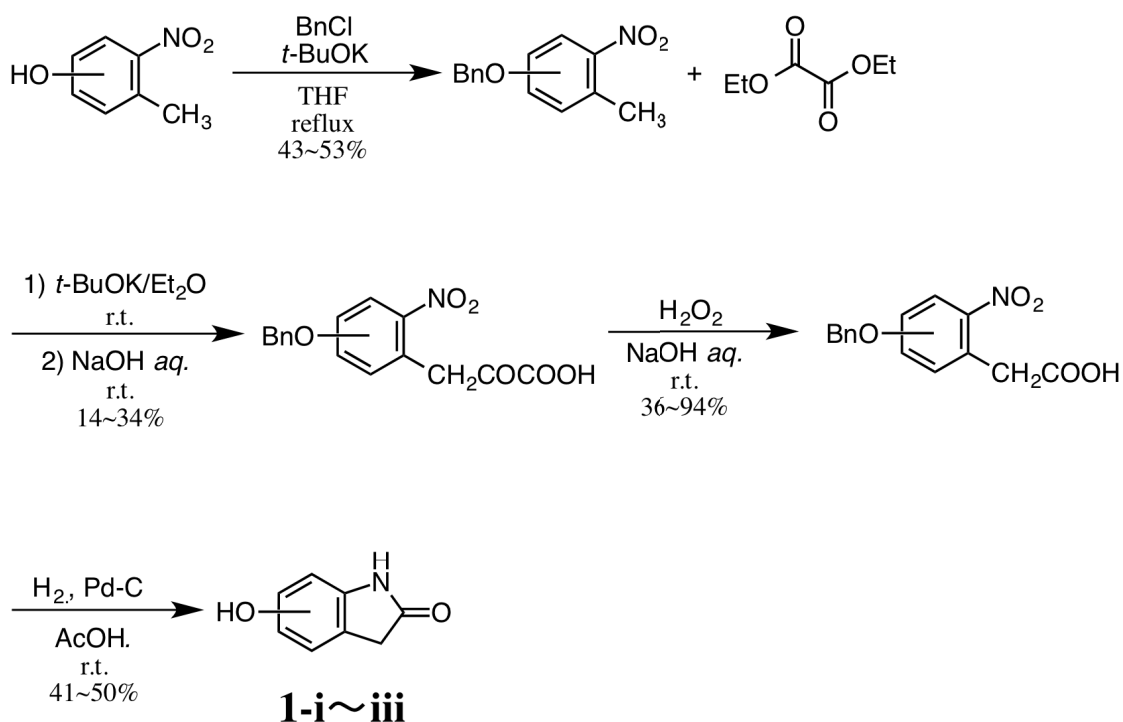
2-2-1 4-ヒドロキシ-2-ベンズイミダゾリノン (**B-ii**) の合成



Scheme 2-3 4-ヒドロキシ-2-ベンズイミダゾリノン (**B-i**) の合成

N,N'-カルボニルジイミダゾールを用いた 2,3-ジアミノフェノールの縮合的閉環反応⁹⁶⁾により、収率 34%で得た。

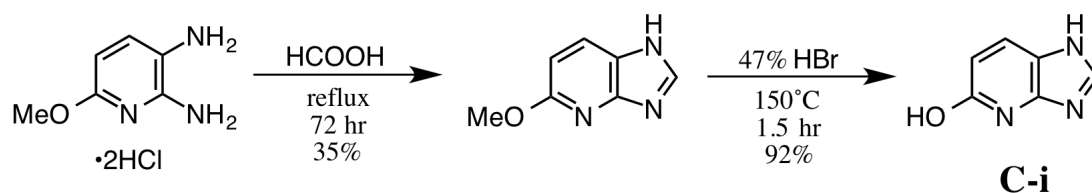
2-2-2 ヒドロキシオキシインドール類 (**1** の異性体) の合成



Scheme 2-4 ヒドロキシオキシインドール類の合成経路

化合物 **1-i**、**1-ii**、**1-iii** は Beer らの報告⁹⁷⁾ を参考に合成した。市販のヒドロキシ-2-ニトロクレゾール誘導体を塩化ベンジルで *O*-ベンジル化し、次いでシュウ酸ジエチルとの反応によりメチル基をピルビン酸構造に変換した。過酸化水素を用いて脱炭酸により酢酸構造とし、最後に接触水素化によってベンジル基の脱保護、ニトロ基の還元及び生じたアミノ基とカルボン酸の縮合を行い、目的物 **1-i** ~ **1-iii** を得た。各工程の収率は Scheme 2-4 中に示した。

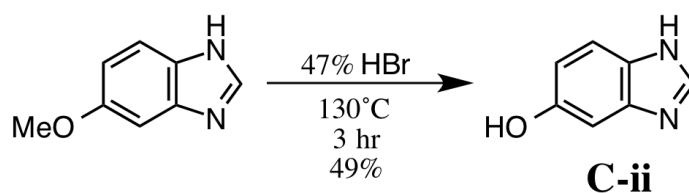
2-2-3 5-ヒドロキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-i**) の合成



Scheme 2-5 5-ヒドロキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-i**) の合成

Banks らの方法⁹⁸⁾を参考に 6-メトキシ-2,3-ジアミノピリジン二塩酸塩とギ酸の縮合的閉環反応を行い、次いで臭化水素酸で *O*-脱メチル化して総収率 32%で得た。

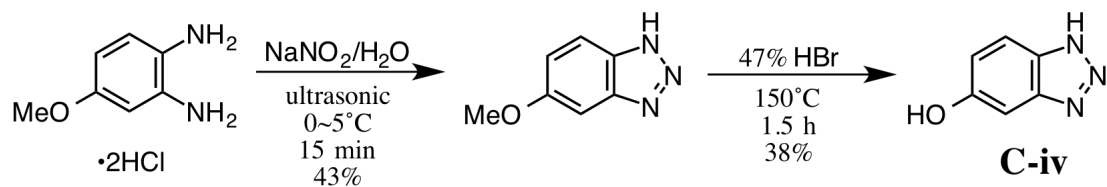
2-2-4 5-ヒドロキシベンズイミダゾール (**C-ii**) の合成



Scheme 2-6 5-ヒドロキシベンズイミダゾール (**C-ii**) の合成

市販の 5-メトキシベンズイミダゾール (103 mg, 0.7 mmol) を臭化水素酸 (0.5 mL) で脱メチル化し、収率 49%で得た。

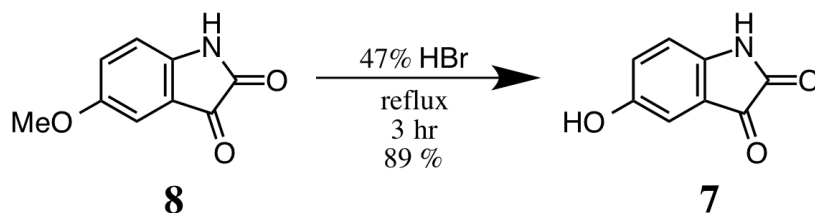
2-2-5 5-ヒドロキシベンゾトリアゾール (C-iv) の合成



Scheme 2-7 5-ヒドロキシベンゾトリアゾール (C-iv) の合成

Pereira らの方法⁹⁹⁾を参考に市販の 4-メトキシ-1,2-フェニレンジアミン二塩酸塩と亜硝酸ナトリウムの反応によりトリアゾール環を構築し、次いで臭化水素酸により *O*-脱メチル化して、総収率 16% で得た。

2-2-6 5-ヒドロキシイサチン (7) の合成

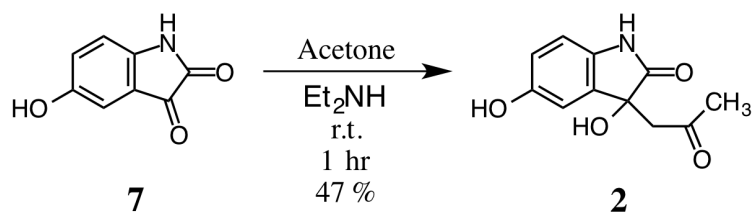


Scheme 2-8 5-ヒドロキシイサチン (7) の合成

市販の 5-メトキシイサチン (**8**) を臭化水素酸で *O*-脱メチル化して粗収率 89% で **7** を得た。副生成物の存在が認められたが、次工程の反応 (**2**, **3** の合成) 後に精製可能であるため、粗生成物のまま次反応に用いることとした。

なお、Ijaz らの報告¹⁰⁰⁾に従いピリジニウムブロミドパーブロミドによる **7** の脱メチル化も試みたが、粗収率は 46% に留まり、また臭化水素酸を用いた場合よりも副生成物が多く存在した。

2-2-7 3-アセトニル-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (2) の合成

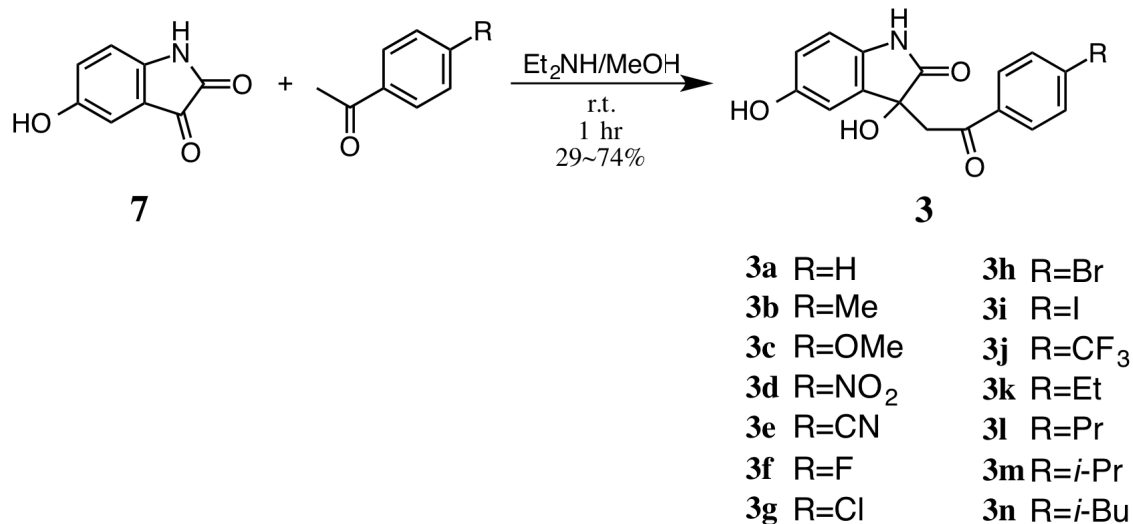


Scheme 2-9 化合物 **2** の合成

化合物 **2** は Garden らの方法¹⁰¹⁾を参考とし、ジエチルアミン存在下、化合物 **7** とアセトンのアルドール反応により収率 47% で **2** を得た

先に化合物 **8** へアセトニル基を導入し、次いで *O*-脱メチル化により **2** を合成する経路も試みた。化合物 **2** の 5-*O*-メチル化体の合成には成功したものの、臭化水素酸、三臭化ホウ素、塩化アルミニウムといった常法では脱メチル化反応が進行しなかった。

2-2-8 3,5-ジヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール誘導体 (**3a~n**) の合成

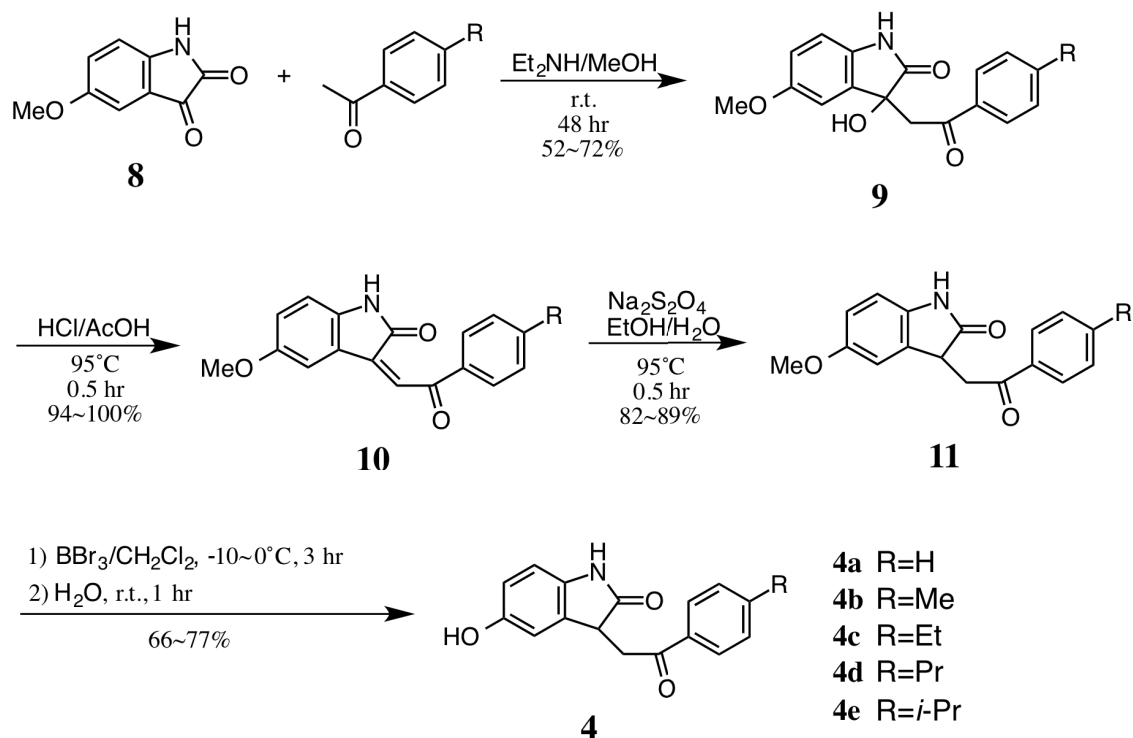


Scheme 2-10 誘導体 **3** の合成

誘導体 **3a~n** は、誘導体 **2** と同様に、ジエチルアミン存在下、**7** と対応するアセトフェノン誘導体のアルドール反応により収率 29~74% で得た。

一部の化合物の収率が低かった原因として、精製に用いたシリカゲルに吸着し、テーリングしやすく分離が良好でなかったことが挙げられる。この工程における不純物の一部には前駆体である **7** の合成時に見られた副生成物と TLC でのスポットが一致するものがあった。よって、**7** を精製してから反応に用いることで収率を改善することが見込まれる。なお、**3a** の合成においてジエチルアミンの当量を増加した場合や加熱を行った場合でも収率の大幅な増減は見られなかった。

2-2-9 5-ヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール誘導体 (**4a~e**) の合成

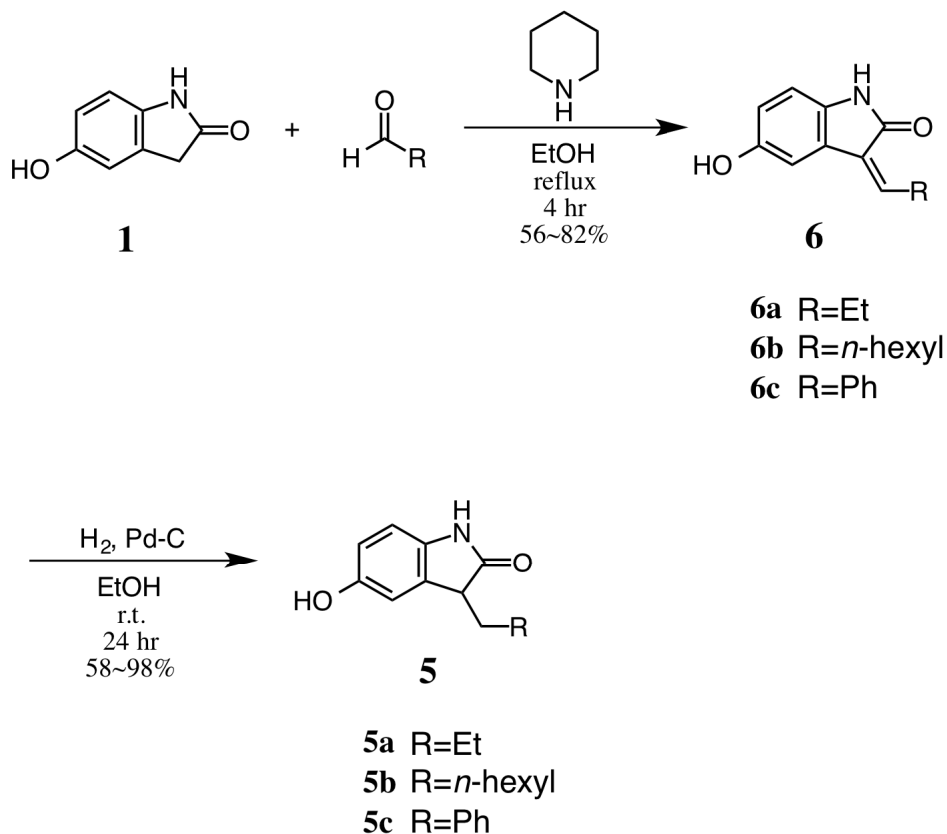


Scheme 2-11 誘導体 **4** の合成

ジエチルアミン存在下、**8** と対応するアセトフェノン誘導体のアルドール反応により **9** を得た後、酸性条件下で加熱して脱水縮合¹⁰²⁾し、フェナシリデン誘導体 **10** を得た。次いで、ヒドロサルファイトナトリウムによりオレフィン部位を還元¹⁰²⁾し **11** を得た。最後に三臭化ホウ素で *O*-脱メチル化して **4** を得た。全4工程での総収率は31~37%であった。

本反応では各工程において生成物の同定のため単離操作を行ったが、**9**、**10**、**11** の合成まではワンポットまたは簡単な抽出操作のみで連続的に進めることも可能であると考えられ、その場合収率の向上や所要時間の短縮が期待できる。

2-2-10 3-アルキル-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール誘導体 (**5**) 及び 3-アルキリデン-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール誘導体 (**6**) の合成



Scheme 2-12 誘導体 **5** 及び **6** の合成

誘導体 **6** は Caballero らの報告¹⁰³⁾を参考とし、ピペリジン存在下、**1** と対応するアルデヒドのアルドール反応により収率 56~82%で得た。

次いで、接触水素化により **6** のオレフィン部位を還元し、**5** を収率 58~98%で得た。

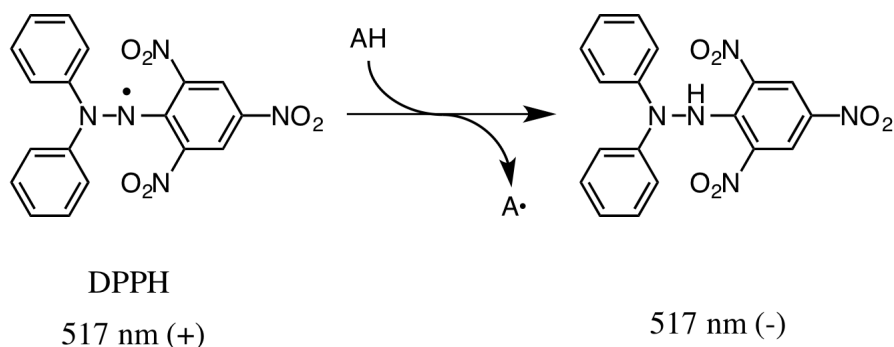
原料 **1** が高価である (2013 年現在、1 g/¥50,000 程度) ことが問題だが、収率は低くなく簡便な操作で目的物が得られた。イサチンを出発物質とした場合と同様に **1** の誘導体合成に有効な経路であると考えられる。

第3章 DPPH ラジカル消去活性

抗酸化活性の指標として、化学反応による直接的なラジカル消去能を、DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ラジカルとの二次反応速度定数から評価した。

DPPH は電子供与性のジフェニルアミノ基と電子求引性のピクリル基に挟まれた窒素ラジカルがいわゆる captodative 効果¹⁰⁴⁾を受け、室温下でも比較的安定に存在する。DPPH ラジカル消去活性は、特定のフリーラジカルや ROS との反応性を必ずしも反映するわけではない。しかし、様々な化合物の還元能を簡便に測定できることから、抗酸化活性の指標として汎用されている。

DPPH のエタノール溶液は紫色を呈し、波長 517 nm に極大吸収を有する。DPPH が抗酸化剤により一電子還元され非ラジカル種となると、共役系の切断によって 517 nm の吸光度が減少する (Scheme 3-1)。この吸光度減少から、抗酸化剤のラジカル消去反応速度やストイキオメトリーを評価することができる。



Scheme 3-1 DPPH ラジカル消去反応

3-1 化合物 **B-i**、**1-i**~**iii** の DPPH ラジカル消去活性

3-1-1 DPPH ラジカル消去活性 (二次反応速度定数) の測定

3-1-1-1 方法

化合物 **B-i**、**1-i**~**iii** は、エタノール/MES 緩衝液 (pH 7.4)=3/2 の溶媒中、ストップフロー法を用いて被検化合物/DPPH=25 μ M/500 μ M の条件での波長 517 nm の吸光度減少曲線を得た後、Unisoku Spectroscopy&Kinetics を用い、得られた曲線へのカーブフィッティングにより二次反応速度定数を算出した。

3-1-1-2 結果

化合物 **B** の異性体 **B-i** 及び **1** の異性体 **1-i**、**1-ii**、**1-iii** のラジカル消去活性の値を Fig. 3-1 に示した。

六員環上のフェノール性ヒドロキシ基と五員環の NH がパラ位の関係にある **B** は尿酸より約 150 倍高いラジカル活性を示した。しかし、ヒドロキシ基と NH がオルト位 (またはメタ位) の関係である **B-i** の活性は尿酸の 1/2 程度しかなく、**B** のおよそ 1/330 であった。

化合物 **1** は尿酸の約 15 倍の活性を示したが、他の 3 種の位置異性体の活性は **1** の約 1/10~1/100 程度であった。化合物 **1-ii** は尿酸と同等の活性を示したが、**1-i** 及び **1-iii** の活性は尿酸の 1/3 未満であった。

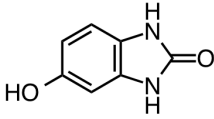
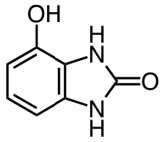
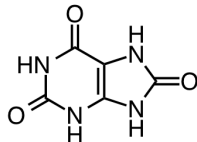
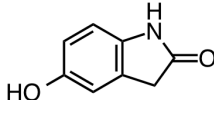
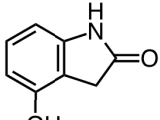
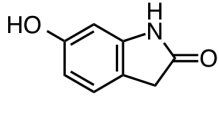
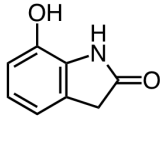
				
	B	B-i	Uric acid	
DPPH radical scavenging activity ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	110	0.37	0.69	
				
	1	1-i	1-ii	1-iii
DPPH radical scavenging activity ($\times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	11	0.21	0.93	0.12

Fig. 3-1 化合物 **B**、**1** のヒドロキシ基位置異性体の DPPH ラジカル消去活性

以上の結果より、六員環のフェノール性ヒドロキシ基と五員環の NH がパラ位の関係に位置することが、ラジカル消去活性発現において非常に有利であることが示された。また、**B** と **1**、**B-i** と **1-iii** をそれぞれ比較すると、いずれもベンズイミダゾリノン骨格を有する **B**、**B-i** の方が高いラジカル消去活性を示した。

3-1-2 DPPH ラジカル消去反応のストイキオメトリー

尿酸類縁体のラジカル消去推定機構では、類縁体 1 分子当たり 2 分子のラジカルを消去可能であると考えられる。実際に、先行研究において尿酸、**A**、**B**、**C**、**1** の DPPH ラジカル消去反応のストイキオメトリーはいずれもほぼ 2 であることを明らかにしている。

化合物 **1** のヒドロキシ基位置異性体である **1-i**、**1-ii**、**1-iii** も共鳴によってヒドロキノンと等価な構造と見なすことができ (Scheme 2-1, p.31)、それによればストイキオメトリーはいずれも 2 となることが予想される。そこで、DPPH/被検化合物=50 μ M/16.7 μ M の条件での吸光度減少量から **1-i**、**1-ii**、**1-iii** のストイキオメトリーを算出した。結果を Table 3-1 に示す。

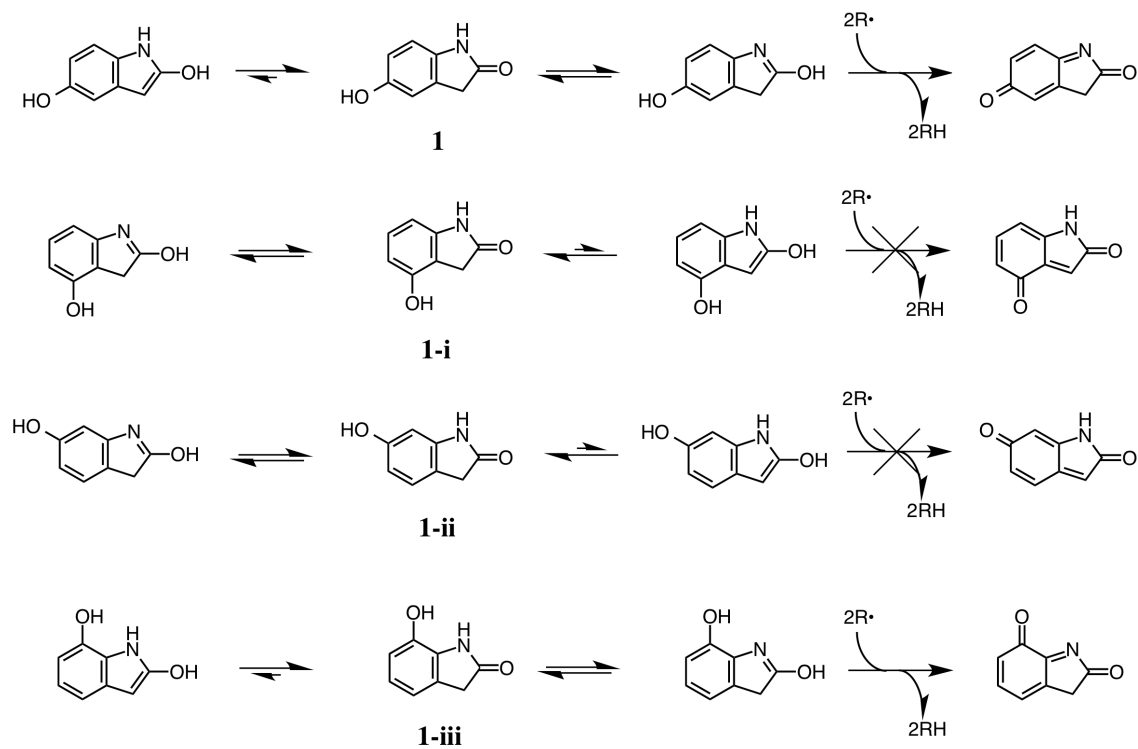
Table 3-1 化合物 **1** 異性体のストイキオメトリー

	1	1-i	1-ii	1-iii
Stoichiometry	1.8	1.0	0.7	1.5

化合物**1**のストイキオメトリーは約2であったのに対し、他の異性体ではそれよりも小さい値となった。化合物**1-iii**は反応が非常に遅く、吸光度変化が見られなくなるまでの追跡ができなかった。そのため、最終的には2程度まで達するものと予想できる。化合物**1-i**及び**1-ii**のストイキオメトリーは1以下であった。これは**1-i**と**1-ii**がDPPHと1:1で反応したことを示しており、これらはいずれも実際にはヒドロキノンと等価ではないことを示唆している。オキシインドール骨格のC-2位C-3位間の互変異性の平衡はケト型に大きく傾いていることが知られている¹⁰⁵⁾。よって、**1-i**と**1-ii**が二電子還元を示し得るような構造はほとんど存在しないために、実質的に単純なフェノールに近くストイキオメトリーが1になった可能性がある。ヒドロキシオキシインドール類が二電子還元能を示すためには、**1**や**1-iii**のように、ヒドロキシ基と共役したイミド酸構造 (-N=C-OH) の互変異性を示し得る構造が必要であると考えられる (Scheme 3-2)。

ストイキオメトリーの大きさとラジカル消去活性の速さは相関するパラメータではない。ROS やフリーラジカルは反応性が高く、生体内で生成した ROS は近傍の分子と反応することから、抗酸化剤の活性としては第一にラジカル消去反応速度が重要であると考えられる。しかし、同等の反応速度を有する抗酸化剤を比較した場合、ストイキオメトリーは大きい方がより低濃度で効率よくラジカルを消去できる。化合物 **1-ii** は尿酸よりわずかに強いラジカル消去活性を示したが、尿酸のストイキオメトリーは 2 であるのに対して **1-ii** のストイキオメトリーは 1 であった。これらを総合すると、**1-ii** はラジカル消去能に関して尿酸に対する利

点は少ないと考えられる。よって、ヒドロキシオキシインドールの異性体の中では**1**が抗酸化剤として最も優れた化合物であると考えられる。



Scheme 3-2 化合物**1**と異性体の推定ラジカル消去機構及び実際の進行の可否

3-2 化合物 C-i~iv の DPPH ラジカル消去活性

3-2-1 方法

エタノール/MES 緩衝液 (pH 7.4)=3/2 の溶媒中、ストップフロー法を用いて [被検化合物] >> [DPPH] の擬一次反応条件での波長 517 nm の吸光度減少曲線から Unisoku Spectroscopy&Kinetics を用いて擬一次反応速度定数を算出した。異なる複数の濃度条件で得た擬一次反応速度定数を被検化合物濃度に対してプロットし、その近似直線の傾きを二次反応速度定数とした。

3-2-3 結果と考察

五員環部位にアミド構造を有する **A**、**B**、**1** と比べて、母核がそれぞれに対応する非アミド化合物 **C-i**、**C-ii**、**C** のラジカル消去活性は低かった (Fig. 3-2)。特に **A** と **C-i** 及び **B** と **C-ii** を比較した場合が顕著であり、**C-i** ではラジカル消去活性が消失した。また、五員環をピラゾールまたはトリアゾールとした **C-iii**、**C-iv** のラジカル消去活性も尿酸未満となり、特に **C-iv** では **C-i** と同様にラジカル消去活性が消失した (Fig. 3-2)。以上のことより、ラジカル消去活性の発現には五員環部位にアミド構造を有する方が、単純なアゾール構造の場合よりも有利であることが示された。また、アゾール構造の場合では窒素原子の数が増加するほど活性が低下することが示された。

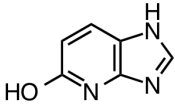
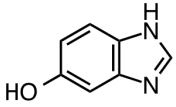
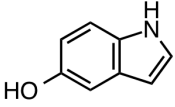
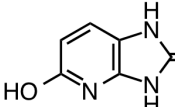
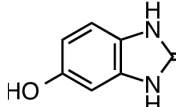
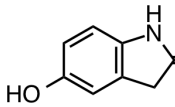
			
	C-i	C-ii	C
DPPH radical scavenging activity (x10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	≈0	0.02	2.6
			
	A	B	1
DPPH radical scavenging activity (x10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	71	110	11

Fig. 3-2 五員環にアミド構造を持たない化合物のラジカル消去活性-1

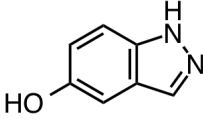
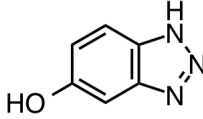
		
DPPH radical scavenging activity (x10 ³ M ⁻¹ s ⁻¹)	C-iii 0.21	C-iv ≈0

Fig. 3-3 五員環にアミド構造を持たない化合物のラジカル消去活性-2

ベンゾアゾール化合物の NH の pK_a は、分子内の窒素原子の数が増加するにつれ直線的に小さくなることが知られている¹⁰⁶⁾。これは五員環部位のみでなく、縮合した六員環部位の窒素原子が増えた場合でも同様に適用される¹⁰⁶⁾。今回の結果では分子内の窒素原子の数が増加するにつれラジカル消去活性は減少した。五員環にアミドを持たない尿酸類縁体のラジカル消去活性には、NH の pK_a が関与する可能性がある。

先行研究では、尿酸の生合成前駆体であり五員環にアミド構造を持たないキサントシン (Fig. 3-4) が、やはりラジカル消去活性を示さなかったことを明らかにしている。キサントシンの窒素原子数は4であり、窒素原子が多いとラジカル消去活性が低下するという今回の傾向に当てはまる。

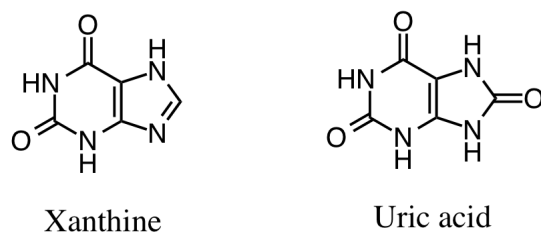


Fig. 3-4 キサンチンと尿酸の構造式

3-3 DPPH ラジカル消去活性の構造活性相関を考慮した、誘導体化リード化合物の選択

先行研究における **A**、**B**、**C**、**D**、**1** の結果と、今回ラジカル消去活性を明らかとした **1-i**、**1-ii**、**1-iii**、**B-i**、**C-i**、**C-ii**、**C-iii**、**C-iv** の結果から、ラジカル消去活性の構造活性相関を検討した。

まず、**A** と **A-i~iii** 及び **B** と **B-i** それぞれの比較から、六員環上ヒドロキシ基は五員環上 NH のパラ位にある場合がラジカル消去活性の向上に最適であることが示された。次いで、**A**、**B**、**1** と **C** 及び **C-i~iv** の比較から、五員環部位には単純なアゾール構造よりもアミド構造を有する方が高活性となることが示された (Fig. 3-5)。

ラジカル消去活性の強さは、生体内での抗酸化活性の強さと必ずしも一致するものではない。しかし、ある程度の強い還元性を有することはラジカル消去を基盤とした抗酸化剤をデザインする上でやはり必須の項目であると考えられる。このことを踏まえ、物性制御のための誘導体化を行う上での基本構造とする抗酸化剤は、規範とした化合物である尿酸以上のラジカル消去活性を示した **A**、**B**、**C**、**D**、**1** から選択することとした。このうち、ラジカル消去活性を維持したまま各種官能基を容易に導入できるとの予測 (2-1-3 項) から、基本構造として **1** を選択した。

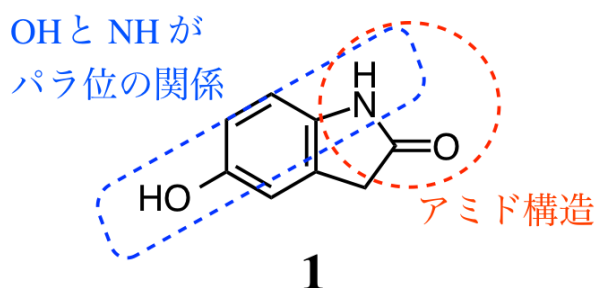


Fig. 3-5 ラジカル消去活性に有利な構造

3-4 化合物 1、2、3a-n、4a-c、5a-c、6a-c の DPPH ラジカル消去活性

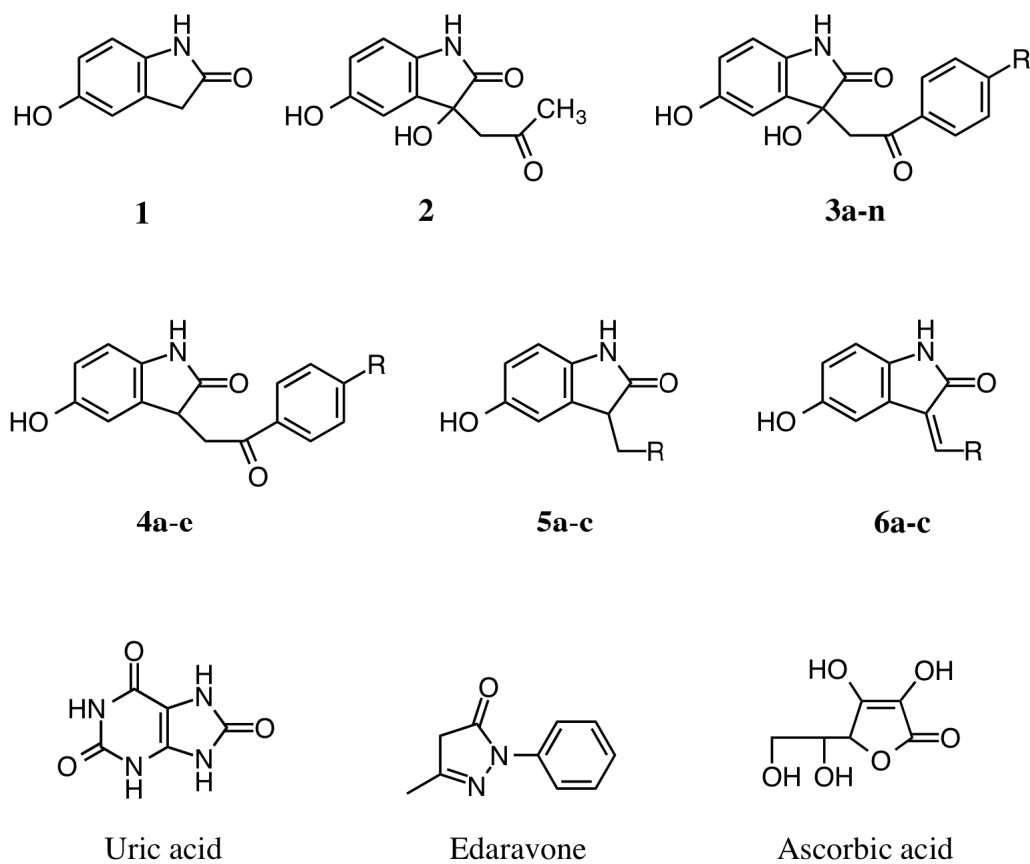


Fig. 3-6 被検化合物の構造式 (置換基 R は Table 3-2 に記載した)

3-4-1 操作

3-2-1 項と同様の方法で行った。代表的な抗酸化剤のアスコルビン酸と承認医薬品であるフリーラジカルスカベンジャーのエダラボンを比較対照として用いた。

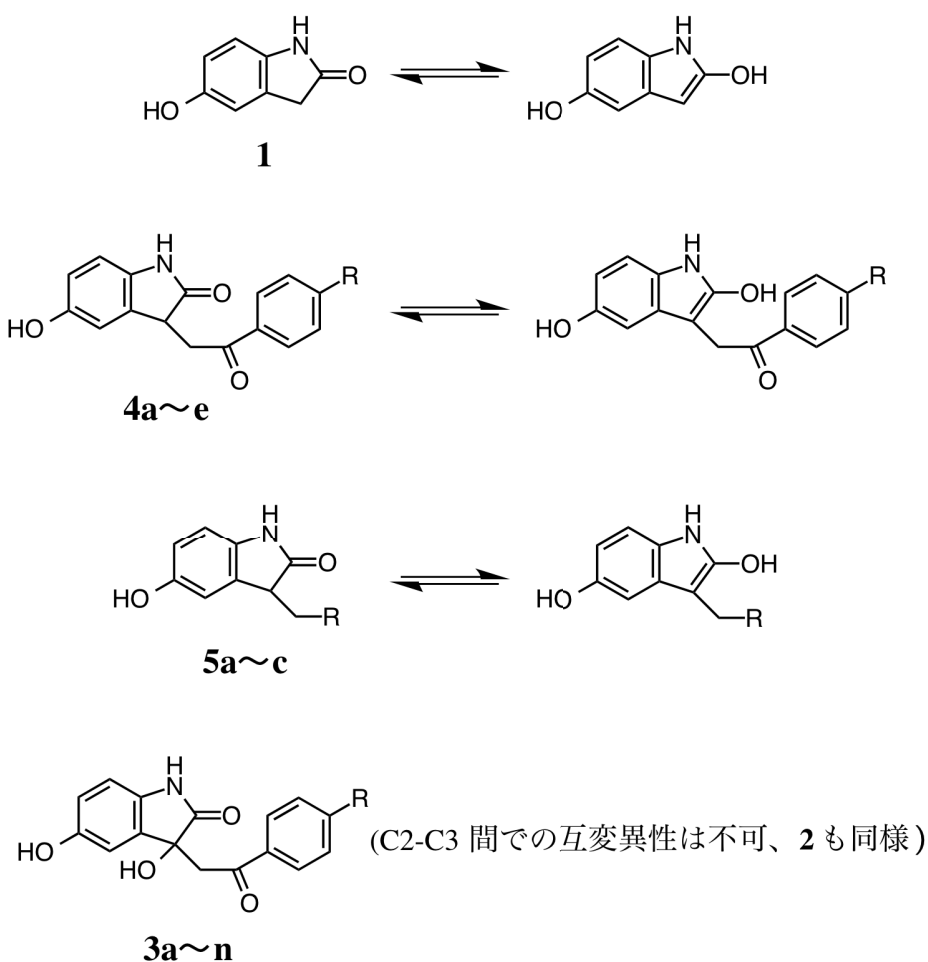
3-4-2 結果と考察

誘導体 **1** は尿酸の約 15 倍のラジカル消去活性を示したが、**2** の活性は **1** よりも低下し、尿酸と同等であった (Table 3-2)。一方で、誘導体 **3a~n** は **1** より弱いながらも尿酸や **2** より強いラジカル消去活性を示した。また、C-3 位が三級の sp^3 炭素である **4a~e** 及び **5a~c** の活性は **3a~n** よりも強く、一部は **1** と同等の活性を示した。さらに、C-3 位に C=C 二重結合を有する **6a~c** は **1** よりもわずかに高い活性を示した。

Table 3-2 置換基と DPPH ラジカル消去活性

Compound	R	DPPH radical scavenging activity ($\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Uric acid	–	0.63
1	–	9.2
2	–	0.74
3a	H	1.9
3b	Me	1.8
3c	OMe	1.5
3d	NO ₂	2.5
3e	CN	1.7
3f	F	1.5
3g	Cl	2.4
3h	Br	1.2
3i	I	2.2
3j	CF ₃	1.6
3k	Et	3.2
3l	Pr	3.0
3m	<i>i</i> -Pr	2.9
3n	<i>i</i> -Bu	2.8
4a	H	7.6
4b	Me	7.8
4c	Et	8.2
4d	Pr	10
4e	<i>i</i> -Pr	9.9
5a	Et	7.2
5b	<i>n</i> -hexyl	6.5
5c	Ph	6.9
6a	Et	11
6b	<i>n</i> -hexyl	12
6c	Ph	13
Edaravone	–	41
Ascorbic acid	–	39

イサチンとアセトフェノンのアルドール反応生成物の C-3 位は、フェナシル基とヒドロキシ基を有する四級炭素である。もとより **1** の C-3 位は sp^3 であり、六員環のフェノールから繋がる π 電子共鳴系からは外れているためラジカル消去活性発現において四級化による影響は少ないと考えていた。しかし実際には、**2** や **3a~n** のラジカル消去活性は **1** よりも低下した。その一方で、C-3 位にヒドロキシ基を持たない **4a~e** は、フェナシル基上の置換基が同一である **3a**、**3b**、**3k~m** よりも強いラジカル消去活性を示し、特に **4d** や **4e** の活性は **1** と同等であった。また、**4a~e** と同じく C-3 位が三級炭素である **5a~c** も **3a~n** より高いラジカル消去活性を示した。誘導体 **1** 及び **4a~e**、**5a~c** の C-3 位は C2-C3 でのエノール化が可能である (Scheme 3-2)。一方で、**2** 及び **3a~n** では C-3 位が四級であり異性化は不可能である。オキシインドールは一般的にほとんどケト型で存在することが知られている。しかし、この互変異性の可否が、1 分子のラジカルを消去した後のラジカルの安定性などに影響を及ぼし、活性の強さに変化を与えた可能性がある。



Scheme 3-2 化合物 **1**、**4a~e**、**5a~c** の C2-C3 間の互変異性

誘導体 **2** では **3a~n** よりも活性が低下したことから、C-3 位の置換基としてアセトニル基よりフェナシル基の方が活性発現に適していることが示唆された。誘導体 **3a~n** をそれぞれ比較した場合、フェナシル基上の置換基 R (Table 3-2) の種類は活性の強さに大きな影響を与えなかった。この傾向は **4a~e** をそれぞれ比較した場合でも同様であった。ラジカル消去活性発現部位である 5-ヒドロキシオキシインドール構造とは共役せず、かつ十分な距離を介した位置に各種置換基を導入することで、それらの置換基によるラジカル消去活性への影響は低く抑えられることが示唆された。

また、**5a~c** においてもそれぞれの活性にほとんど差はなかったことから、5-ヒドロキシオキシインドール構造と共役しない一炭素を挟んでの単純なアルキル基やベンゼン環の置換もラジカル消去活性の維持に問題ないことが示唆された。しかし、**5c** のベンゼン環上に各種置換基を導入した場合の影響については更に検討する必要がある。

C-3 位に C=C 二重結合を有する **6a~c** は **5a~c** や **1** よりも高い活性を示した。誘導体 **6a-c** は C-3 位を含む 5-ヒドロキシオキシインドール構造全体に加え、C-3 に直結した炭素原子も sp^2 炭素で構成されている。よって、ラジカル消去反応に関わる π 電子共役系の延長が起き、生成したラジカル種の安定化によって消去反応速度が上昇した可能性がある。そこで、分子軌道計算によって **6a~c** の最安定構造ならびに **6a~c** から 5-O 位のラジカルが生じた場合のスピンの分布を推定した。まず分子型の最安定構造の比較では、予想通り誘導体 **6a**、**6b** は 5-ヒドロキシオキシインドール部位と C-3 位に直結した炭素までが、**6c** はベンジリデン基を含む炭素骨格全体が同一平面上に位置していた (Fig. 3-7)。しかし、スピンは C-3 位へ僅かに分布したものの、C-3 位に直結した炭素や **6c** のベンジリデン基には分布が見られなかった (Fig. 3-8)。このことは、**6a~c** において C-3 位が sp^2 炭素であることは、**5a~c** と比べた場合のラジカル消去活性の僅かな増強に寄与したものの、それ以遠の置換基の寄与はほとんどないことを示唆している。

誘導体 **2**、**3a~n**、**4a~e**、**5a~c**、**6a~c** は、それぞれの活性の強弱に差はあるものの、すべて尿酸以上のラジカル消去活性を維持していた。このことから、ラジカル消去活性を喪失せずに **1** の誘導体化を行う方法として、C-3 位への置換基導入が有効であることが示された。しかしながら、これらの修飾はラジカル消去活性発現能を維持できるものの、活性の大幅な向上には繋がるものではなかった。一連の誘導体は、**1** を含め、アスコルビン酸やエダラボンを上回る活性は示さなかった。

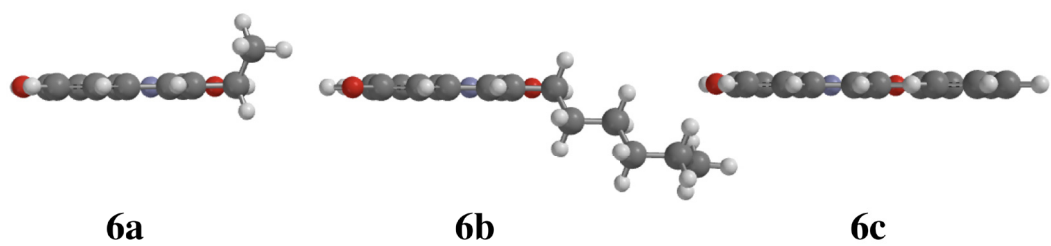


Fig. 3-7 誘導体 **6a**~**c** の最安定構造
(Spartan[®] '10, DFT/B3LYP, 6-31+G*)

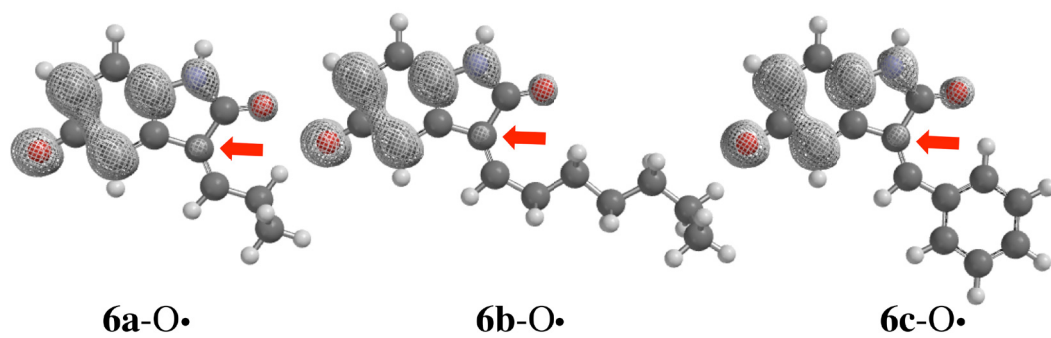


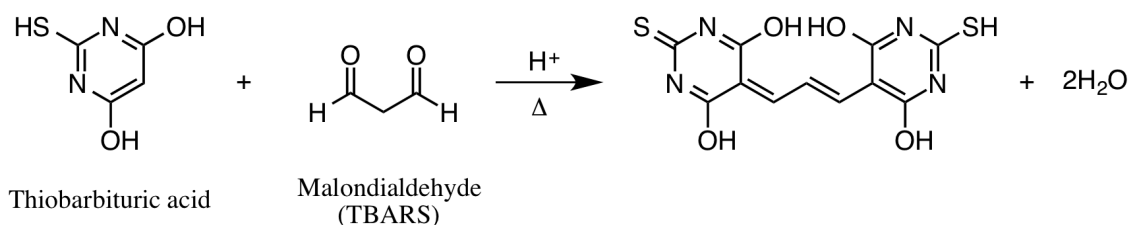
Fig. 3-8 誘導体 **6a**~**c** の 5-O 位ラジカルのスピンドistribution
(Spartan[®] '10, DFT/B3LYP, 6-31+G*)

第4章 脂質過酸化抑制効果の測定

細胞膜の構成成分である脂質は、生体内で発生した ROS による攻撃の標的となりやすい。また、一度過酸化を受けた脂質は周囲の脂質と連鎖的に反応し、酸化ストレスを増悪する。そのため、脂質過酸化連鎖反応を効果的に抑制する抗酸化剤は医薬品リード化合物として期待できる。

本研究では、*in vitro* でもより生体に近い系での抗酸化活性の評価を志向して、ラット肝由来ミクロソームでの脂質過酸化反応に対する抑制効果を常法である TBARS 法により評価した。

肝ミクロソーム中にはシトクロム P450 (CYP) が含まれる。ここに *tert*-ブチルヒドロパーオキシド (*tert*-BuOOH) を添加すると、CYP によって O-O 結合がホモリティックに開裂し *tert*-BuO \cdot が生じる¹⁰⁷⁾。これが近傍の脂質分子から水素原子を引き抜くことで脂質過酸化連鎖反応が開始する。酸化した脂質は数段階の反応を経て、チオバルビツール酸反応性物質 (thiobarbituric acid reactive substances; TBARS) と呼ばれるマロンジアルデヒドなどの最終酸化生成物を生じる。ここに発色剤としてチオバルビツール酸の酸性溶液を加えると、波長 535 nm に極大吸収を有する化合物が生成する (Scheme 4-1)¹⁰⁸⁾。この 535 nm の吸光度を測定し、各抗酸化物質添加時と比較することで、脂質過酸化抑制効果を評価した。



Scheme 4-1 チオバルビツール酸とマロンジアルデヒドの反応

4-1 誘導体 **1**、**2**、**3a~j**、尿酸及びエダラボンの脂質過酸化抑制効果

4-1-1 概要

まず、フェナシル基上にさまざまな性質を持つ置換基を有する化合物 **3a~j** について、**2** 及び一連の誘導体の基本構造である **1**、尿酸と脂質過酸化抑制効果を比較した。また、ポジティブコントロールとして、医薬品として承認されているフリーラジカルスカベンジャーのエダラボンを用いた。

DPPH ラジカル消去活性試験は単純な化学反応モデル系であり、フェナシル基上の置換基の違いによる消去活性への影響は小さかった。しかし、本実験においては生体由来の複雑な混合成分を用いているため、物性がラジカル消去活性と独立して抗酸化活性に影響する可能性がある。誘導体 **3a~j** の置換基は、脂溶性 ($ClogP$)、極性表面積 ($tPSA$)、電子効果 (Hammett の置換基定数) といった各種物性パラメータ (Table 4-1) がそれぞれ異なる。一方で、**3a~j** のラジカル消去活性はそれぞれ同等であることから、これらを比較することで物性の影響を評価することができると考えた。

Table 4-1 置換基、DPPHラジカル消去活性及び物性パラメータ

Compound	R	DPPH radical scavenging activity ($\times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	ClogP ^a	tPSA ^a	Hammett's σ_p value of R
Uric acid	–	0.63	–	99.3	–
1	–	9.2	0.04	49.3	–
2	–	0.74	-0.79	55.4	–
3a	H	1.9	0.81	86.6	0
3b	Me	1.8	1.31	86.6	-0.17
3c	OMe	1.5	1.03	95.9	-0.27
3d	NO ₂	2.5	0.72	138.4	0.78
3e	CN	1.7	0.42	110.4	0.66
3f	F	1.5	1.03	86.6	0.06
3g	Cl	2.4	1.60	86.6	0.23
3h	Br	1.2	1.75	86.6	0.23
3i	I	2.2	2.01	86.6	0.18
3j	CF ₃	1.6	1.83	86.6	0.54
3k	Et	3.2	1.84	86.6	-0.15
3l	Pr	3.0	2.37	86.6	-0.13
3m	<i>i</i> -Pr	2.9	2.24	86.6	-0.15
3n	<i>i</i> -Bu	2.8	2.77	86.6	-0.12
4a	H	7.6	1.52	66.4	0
4b	Me	7.8	2.02	66.4	-0.17
4c	Et	8.2	2.55	66.4	-0.15
4d	Pr	10	3.08	66.4	-0.13
4e	<i>i</i> -Pr	9.9	2.95	66.4	-0.15
5a	Et	7.2	1.62	49.3	–
5b	<i>n</i> -hexyl	6.5	3.73	49.3	–
5c	Ph	6.9	2.13	49.3	–
6a	Et	11	1.90	49.3	–
6b	<i>n</i> -hexyl	12	4.11	49.3	–
6c	Ph	13	2.56	49.3	–
Edaravone	–	41	–	32.7	–

^aCalculated by ChemBioDraw[®] ultra version 13^bReference (109)

4-1-2 結果と考察

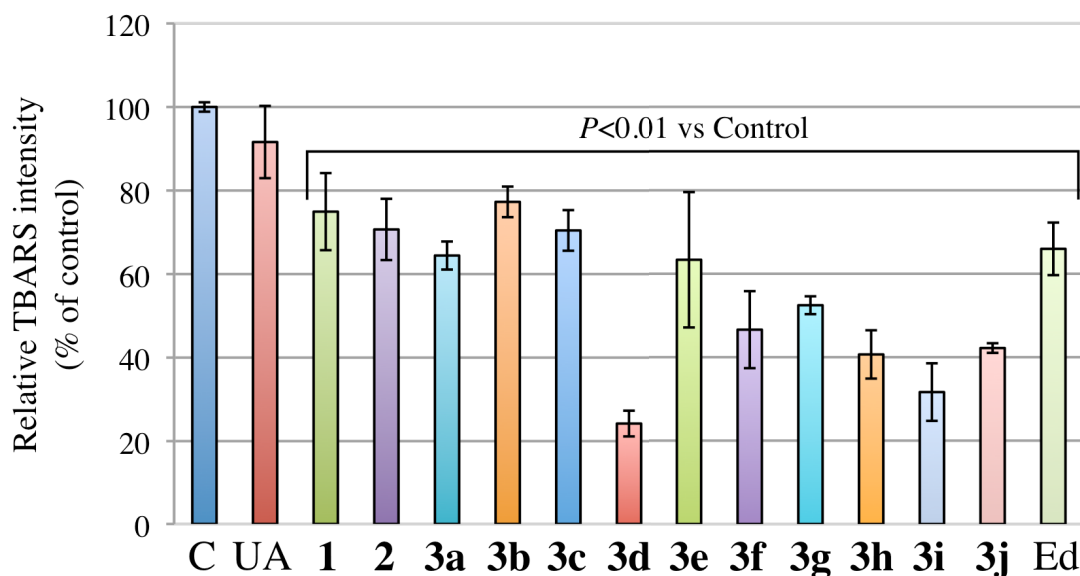


Fig. 4-1 誘導体 1、2、3a~j、エダラボンの脂質過酸化抑制効果
各被検化合物は 100 μ M とした。C: コントロール、UA: 尿酸、Ed: エダラボン

誘導体 1、2、3a~j、エダラボンはいずれもコントロールに対して有意な脂質過酸化抑制効果を示した (Fig. 4-1)。一方で、尿酸は抑制効果を示さなかった。誘導体 1 とエダラボンの抑制効果は互いに同程度であり、有意差は見られなかった。また、誘導体 2、3a、3b、3c、3e は 1 やエダラボンと同等、3d 及び 3f~j は 1 やエダラボンよりも強い効果を示し、それらの効果の強弱は置換基の種類によって異なった。これらの脂質過酸化抑制効果の強弱は、DPPH ラジカル消去活性の強弱とは一致しなかった。フェナシル基のパラ位にニトロ基を有する 3d は、本項で評価した誘導体の中で最も高活性であった。次いでヨウ素原子を有する 3i が強い活性を示し、同様にフッ素原子、塩素原子、臭素原子を有する 3f、3g、3h も比較的高活性であった。また、トリフルオロメチル基を有する誘導体 3j は 3h に匹敵する効果を示した。

一般的に、脂溶性の抗酸化剤は連鎖反応部位である脂質の近傍への集積性が高いため、脂質過酸化抑制効果においても優れた効果を示す傾向がある。一連の誘導体 3a-j の脂質過酸化抑制効果に Table 4-1 で示した物性パラメータを考慮すると、誘導体 3g、3h、3i の脂溶性 (ClogP 値) と抑制効果の強さに相関が見られた。ハロゲン原子の導入は 1 原子であっても ClogP 値を大きく増加させ、またその効果は一般的に原子番号が大きいハロゲン原子ほど強い。また 3j も 3h と同等の大きな ClogP 値を示した。これらの結果から、誘導体 3a~j の脂質過酸化抑制効果

において、脂溶性を増大し得る置換基の導入が活性向上に有効であることが示唆された。*t*PSA や電子効果といったその他の物性に関しては明確に相関したものはなかった。しかし、**3d** は *ClogP* 値がさほど大きくないにも関わらず強い活性を示したことから、脂溶性以外にも活性増強に繋がる因子はあると考えられる。誘導体 **3d** は *t*PSA が大きく、また強力な電子求引性のニトロ基のためフェナシル基が極度に電子不足であり、これらの特徴が溶媒内での挙動に何らかの影響を示した可能性がある。

ラジカル消去活性は低いながらも、誘導体 **3d**、**3f**、**3g**、**3h**、**3i**、**3j** がエダラボンを上回る脂質過酸化抑制効果を示したことは特筆すべき知見である。これは、抗酸化物質のデザインにおいて、化学的な抗酸化活性とともに物性が重要な因子であることを強く支持する結果となった。

ただし、これらの脂質過酸化抑制効果が、ラジカル反応の開始に必要な CYP の阻害によって起きた見かけ上のものである可能性は否定できない。これを確かめるためには、CYP が関与しない系での抗酸化活性の評価が必要である。

4-2 誘導體 3k~n、4a~e、5a~c、6a~c の脂質過酸化抑制効果

4-2-1 概要

前項で、フェナシル基上の置換基による脂溶性の増強が脂質過酸化抑制効果の向上に有効であることが示唆された。そこで、置換基部分の差異をアルキル基の長さのみとし、脂溶性以外の物性の違いを極力排除した 3k~n について、3a、3b との比較を行った。また同様に 3a、3b、3k~m と同じアルキル置換フェナシル基を有し、かつ C-3 位の水酸基を持たない 4a~e、また C-3 位の置換基そのものを単純な炭化水素基とした 5a~c 及び 6a~c について脂質過酸化抑制効果を評価した。

4-2-2 結果と考察

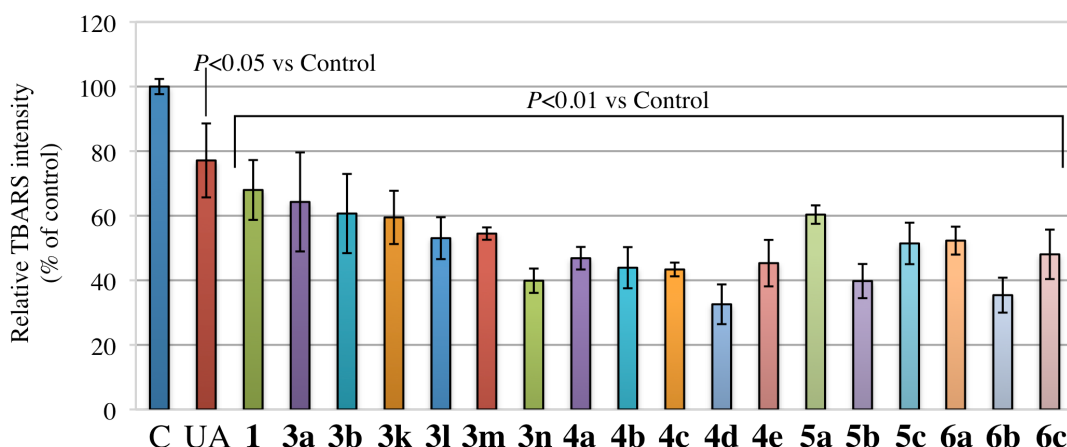


Fig. 4-2 誘導體 1、3a、3b、3k~n、4a~e、5a~c、6a~c の脂質過酸化抑制効果
各被検化合物は 100 μ M とした。C: コントロール、UA: 尿酸

ここでは化合物間の差が見られにくかったものの、化合物群 3 の誘導體ではやはり ClogP 値の大きい 3n が強い抑制効果を示した。この傾向は化合物群 4、化合物群 5、化合物群 6 でも同様で、同系統の誘導體間の比較では脂溶性が活性調節において重要な因子であることが明確に示された。

しかし、C-3 位の環境が異なる化合物間の比較では、ClogP 値の大きさと抑制効果の強さは必ずしも一致しなかった。誘導體 4a~e は、同程度の ClogP 値を持つ 3 系列の誘導體よりも僅かではあるがより強い抑制効果を示す傾向があった。

DPPH ラジカル消去活性試験では、化合物群 **4** は化合物群 **3** よりも強い活性を示した。これは、互いに類似した骨格及び物性を有する化合物間の比較ではラジカル消去活性の値もやはり重要であることを示唆している。また、誘導体 **4a** と **5a** は *ClogP*、ラジカル消去活性ともに同等であったが、**4a** はより強い抑制効果を示した。また **5d** や **6b** は **4d** よりも大きい *ClogP* 値を有するが、抑制効果は **4d** の方が強かった。これには *ClogP* 以外の物性も抑制効果の強弱を左右することを示唆しており、やみくもに脂溶性を上げるだけではなく他の物性とのバランスも考える必要が有る。今回の場合では、C-3 位には単純な炭化水素基よりもフェナシル基を導入した方が高活性となることが示された。

第5章 プロオキシダント効果の測定

医薬品開発において、有害事象の発現は重大な問題である。開発後期において予期せぬ有害事象が発生したために、開発中止を余儀なくされた例は多い。このような場合、莫大な時間とコストが浪費されることとなる。そのため、リード化合物の毒性プロファイルは医薬品開発の初期段階から最重視されるべき項目である。安全性に関する抗酸化剤特有の問題点にプロオキシダント効果がある(1-10-1項参照)。

今回は、鉄触媒プロオキシダント効果の有無と強弱を評価するため、C-3位の構造が異なる**1**、**3k**、**4c**、**5a**、**6a** (Fig. 5-1) について比較検討を行った。また、対照化合物としては、承認医薬品であるエダラボンと、*in vitro* で鉄触媒プロオキシダント効果を示すことが認められているアスコルビン酸を用いた。

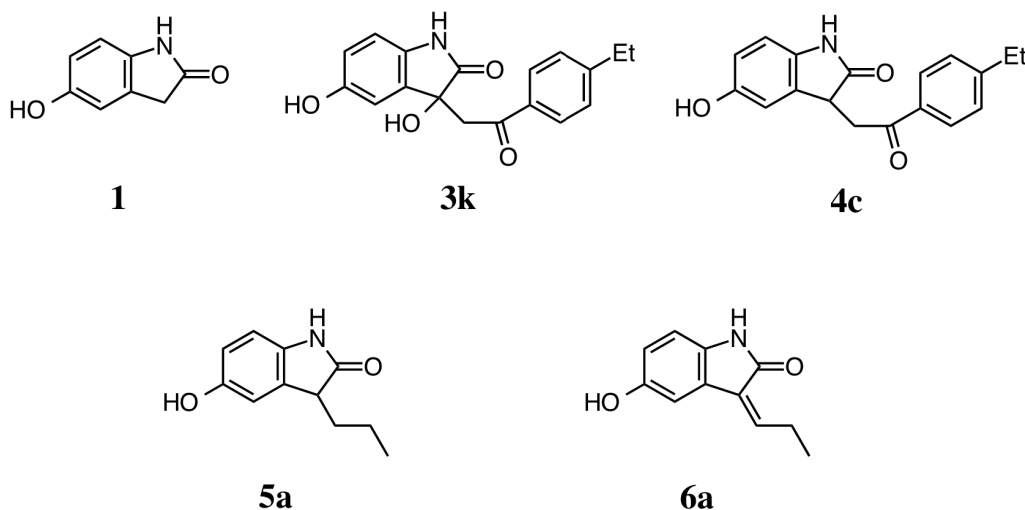


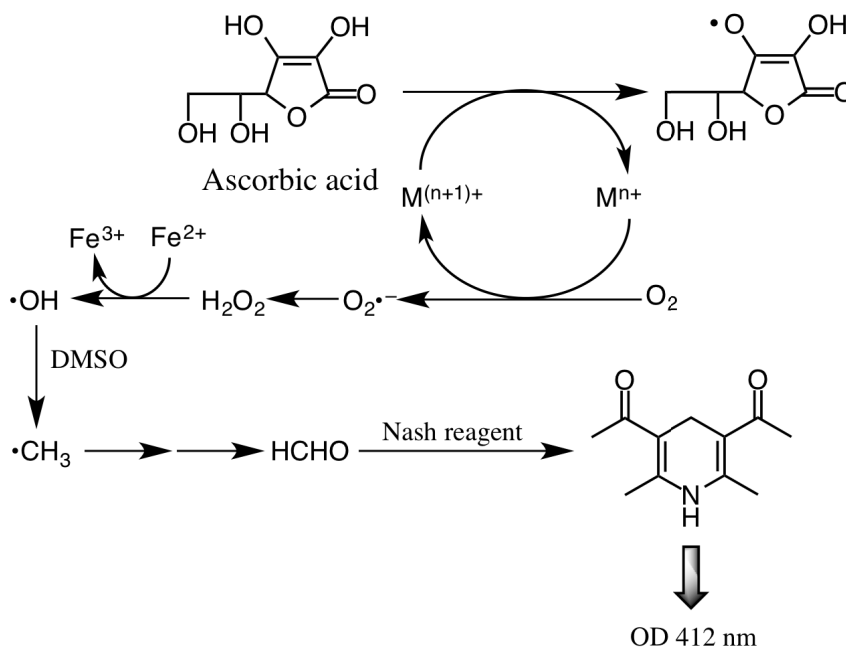
Fig. 5-1 プロオキシダント効果の測定に用いたオキシインドール誘導体

5-1 測定方法

プロオキシダント効果により発生した $O_2^{\cdot-}$ は、不均化により H_2O_2 となり、さらに一電子還元を受け $\cdot OH$ となる。遷移金属イオン存在下では、Fenton 反応によって $\cdot OH$ の生成が促進される。これらの ROS のうち、実際に生体成分に傷害を与えるのは $\cdot OH$ と考えられる。そのため、抗酸化剤の安全性を評価するにあたっては $\cdot OH$ の生成量を評価することが望ましい。

反応性が高い $\cdot OH$ を直接検出することは困難である。そこで、 $\cdot OH$ と何らかの物質の反応生成物を、特定の手法で検出する間接的な検出法が使用される。ESR を用いたスピントラップ法は種々の間接法の中でも汎用される方法であるが、スピニアダクトが抗酸化物質によって更に還元されることでシグナル強度が減少し正確に評価できない可能性がある。

$\cdot OH$ が DMSO と反応すると、メチルラジカルを経てホルムアルデヒド (HCHO) を生成する¹¹⁰⁾。この HCHO の定量法に Nash 法がある¹¹¹⁾。HCHO とアセチルアセトン及びアンモニウムイオンの反応により、Hantzsch のピリジン合成反応によってジヒドロピリジン誘導体である 3,5-ジアセチル-1,4-ジヒドロルチジンが生成する (Scheme 5-1)。この化合物は波長 412 nm に極大吸収を有し、この波長の吸光度測定による HCHO の定量法を Nash 法という。今回、 $\cdot OH$ が DMSO との反応により生じた HCHO を Nash 法により定量することで、 $\cdot OH$ の生成量を間接的に求め、抗酸化剤無添加時の HCHO 生成量に対する生成比をプロオキシダント効果とした。



Scheme 5-1 Nash 法によるアスコルビン酸由来 $\cdot OH$ の定量

5-2 結果と考察

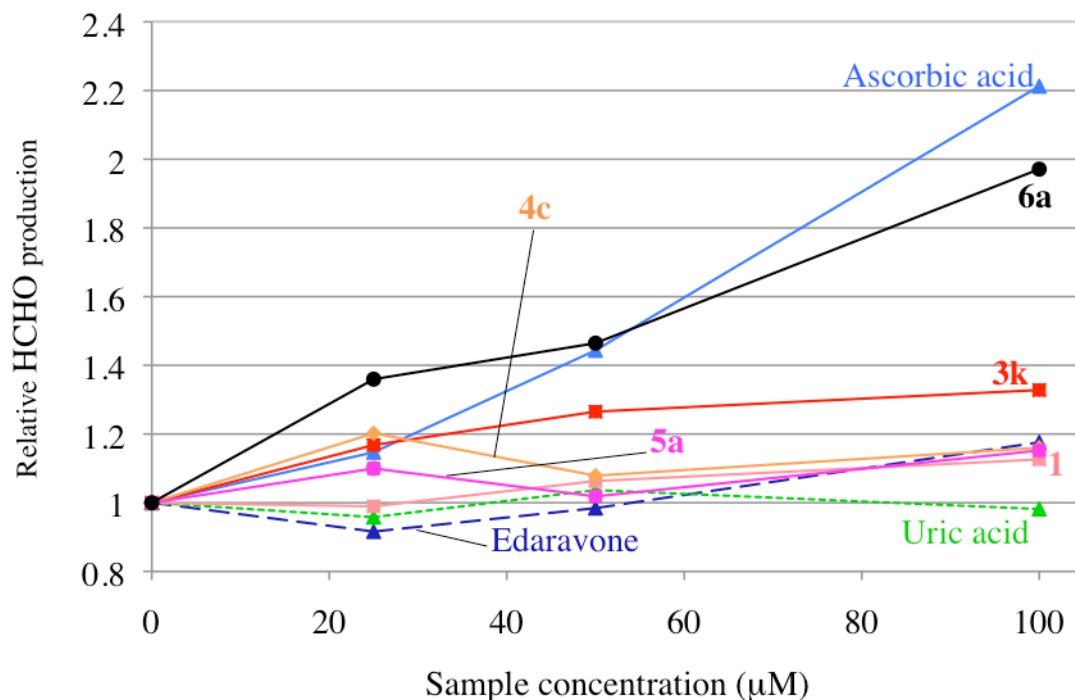


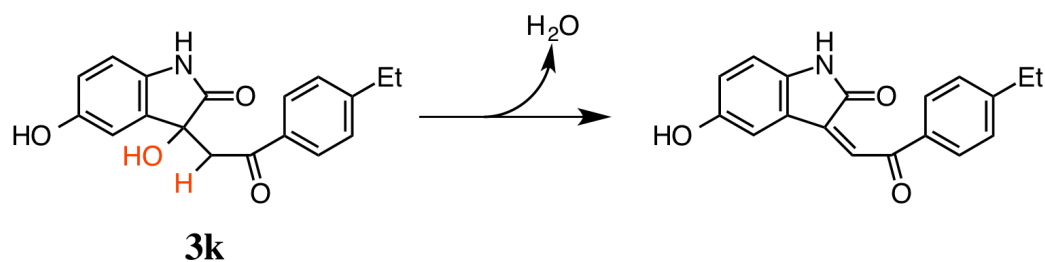
Fig. 5-2 オキシインドール誘導体の鉄触媒プロオキシダント効果

アスコルビン酸は鉄存在下で濃度依存的に HCHO 生成量を増加させ、プロオキシダント効果を示した。一方で、エダラボンとはほとんどプロオキシダント効果を示さなかった。また、化合物 **1** も当研究室の田中らが行った先行研究¹¹²⁾の結果と一致し、ほとんどプロオキシダント効果を示さなかった (Fig. 5-2)。

今回新規にデザイン・合成した誘導体のうち、**4c** と **5a** は 100 μM まで有意なプロオキシダント効果を示さなかった。その一方で、**3k** は弱いプロオキシダント効果を示した。また、**6a** はアスコルビン酸に匹敵する強いプロオキシダント効果を示した。

誘導体 **6a** は **1**、**4c**、**5a** よりもラジカル消去活性が高かった。しかし、誘導体 **3k** のラジカル消去活性は **1**、**4c**、**5a** やエダラボンよりも弱かった。これらのことは、一連のオキシインドール誘導体において還元性の強さとプロオキシダント効果の発現能は必ずしも一致しないことを示唆している。誘導体 **6a** はオキシインドール環 C-3 位がすべて sp^2 炭素であることが他の誘導体との違いである。また、**3k** は C-3 位水酸基とフェナシル基付け根のカルボニル α -プロトンが脱水することでフェナシリデン体を形成し得る (Scheme 5-2)。これは **6a** と同様に C-3 位が sp^2 炭素である。これらのことから、C-3 が sp^2 炭素である、または sp^2 炭素に変換され得る構造がプロオキシダント効果を発現しやすく、医薬品開発におい

て不利であることを示唆している。



Scheme 5-2 誘導体 **3k** の脱水によるフェナシリデン体の生成

化合物 **1** はプロオキシダント効果が低く安全性の高い抗酸化剤の基本構造として有効であることが示された。また、その修飾にあたっては、C-3 位が sp^3 炭素であり、かつ通常の条件では sp^2 炭素への変換が起きない **4,5** のような構造が、プロオキシダント効果の発現を回避できる点で望ましいことが示唆された。

第6章 細胞内酸化ストレス抑制効果の測定

5-ヒドロキシオキシインドール誘導体は、ラジカル消去活性は弱いながらも、脂質過酸化に対してはエダラボンと同等以上の抑制効果を示すことを明らかとした。そこで、より生体内に近い条件として細胞系での抗酸化活性を評価することとした。細胞系で抗酸化活性を示すには、ROS 消去活性の強さ、細胞膜の透過性、酸化ストレス発生部位への局在性などを兼ね備える必要がある。まず、一連の誘導体が細胞内へ移行し、そこで抗酸化活性を発揮できるか評価するため、細胞内 ROS 感受性蛍光プローブである 2',7'-ジクロロジヒドロフルオレシンジアセテート (DCFH-DA) を用い細胞内酸化ストレス抑制効果の測定を行った。

無蛍光の物質である DCFH-DA は、脂溶性が高く容易に細胞内へ取り込まれる。取り込まれた DCFH-DA は細胞内のエステラーゼにより加水分解され、DCFH (2',7'-ジクロロジヒドロフルオレシジン) となる。これは DCFH-DA に比べて水溶性が高く、膜を透過せず細胞内に滞留する。この DCFH が ROS などの酸化剤によって酸化され DCF (2',7'-ジクロロフルオレシジン) となることで蛍光を発する (Fig. 6-1)。この蛍光強度を測定することで、細胞内の酸化ストレスを評価することができる¹¹³⁾。

抗酸化活性の評価に用いる細胞として、ヒト前骨髄球性白血病細胞株 HL60 細胞を用いた。HL60 は研究報告の例も多く、浮遊細胞であるために培養操作が比較的簡便であることから、本実験ではこの細胞を用いることとした。

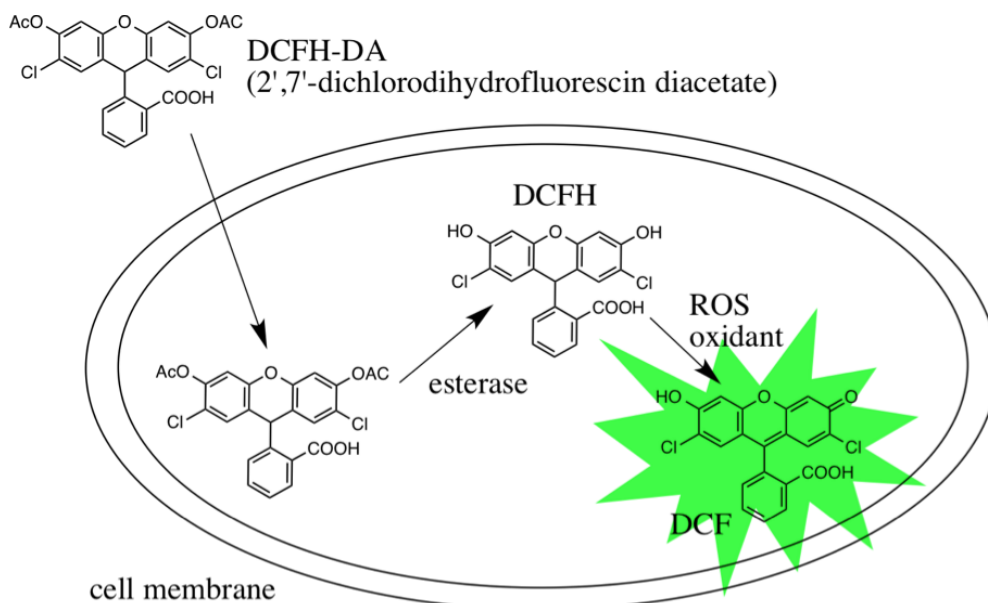


Fig. 6-1 DCFH-DA による細胞内 ROS の検出

6-1 誘導体 **1**、**2**、**3a**~**j**、尿酸、エダラボンの細胞内酸化ストレス抑制効果

まず脂質過酸化抑制効果と同様に、様々な物性を有する **3a**~**j** を中心に細胞内酸化ストレス抑制効果を評価した。

DCFH-DA であらかじめ処理した HL60 細胞に各被検化合物 (10 μ M) を添加して 1 時間プレインキュベート後、 H_2O_2 (200 μ M) を添加して 1 時間インキュベートした。フローサイトメトリーにより細胞内の蛍光強度を測定したところ、 H_2O_2 の添加によって蛍光の強度はコントロールよりも増大した (Fig. 6-1)。被検化合物は、尿酸及び **2** を除き、いずれも細胞内蛍光強度を減少させた。このことは、一連の被検化合物が細胞内に取り込まれ ROS・フリーラジカルを消去したことを示している。誘導体 **2** は脂質過酸化抑制効果を示したものの、本実験では脂溶性が低く、細胞膜を透過できなかったために酸化ストレス抑制効果を示さなかったと考えられる。脂質過酸化抑制試験において **1** と **2** は同等の効果を示したものの、本実験での抑制効果に差がでたことは、細胞膜透過性に物性の影響が強く現れることを示している。誘導体 **3a**、**3b**、**3c**、**3e**、**3f** の細胞内酸化ストレス抑制効果は **1** と同程度であった。エダラボンは、**1** よりもわずかに強い酸化ストレス抑制効果を示した。誘導体 **3j**、**3g** はエダラボンと同等の効果を示し、**3h**、**3i** はそれらよりも強い抑制効果を示した。また、**3d** は被検化合物中で最も強い酸化ストレス抑制効果を示した。これらの効果の強弱は、完全に一致したわけではないものの、脂質過酸化抑制効果の活性の強弱と似た傾向を示した。

脂質過酸化抑制効果の結果に関しては、一連のオキシインドール誘導体が過酸化反応開始剤である CYP を阻害したことで見かけ上の活性が得られたのではないかの懸念があった。しかし、一連の誘導体が細胞内でも抗酸化活性を発現したことは、生体内でもラジカル消去活性に基づく抗酸化活性を発揮できることを示しており、一連の誘導体は抗酸化活性医薬品リード化合物として適していると考えられる。

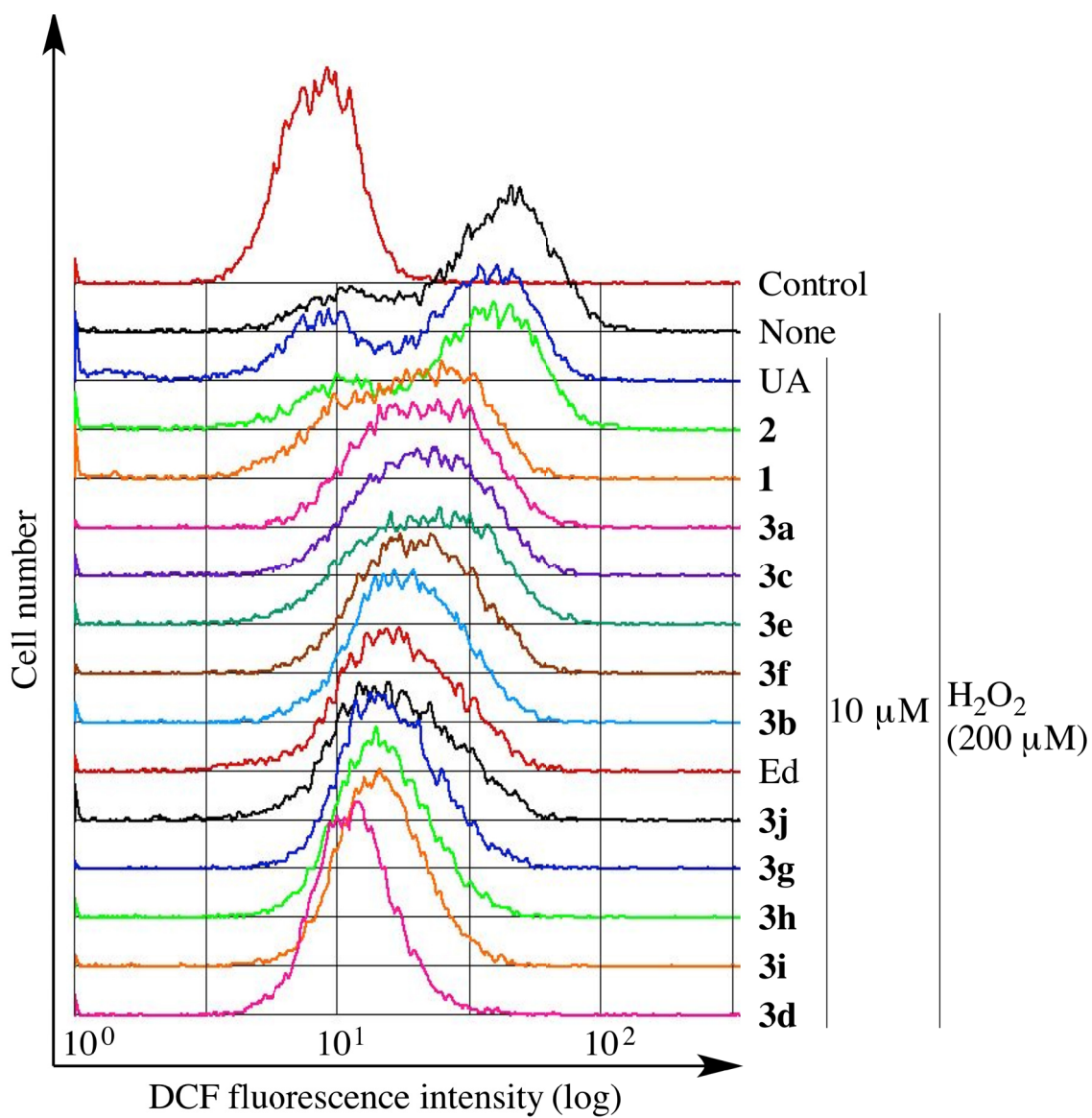


Fig. 6-1 細胞内酸化ストレス抑制効果-1 (**1**、**2**、**3a**~**j**、尿酸、エダラボン)
活性の強かった化合物を下側、弱かった化合物を上側となるように並べ替えて表記した。

6-2 誘導体 **3k~n** 及び **4a~e** の細胞内酸化ストレス抑制効果

次いで、脂溶性に **3k~n** と **4a~e** について、前項と同様の方法で細胞内酸化ストレス抑制効果を評価した。

まず、各被検化合物 10 μM の条件で比較したところ、**3b**、**3k~n**、**4a~e** は **1** より強い酸化ストレス抑制効果を示したが、**1** 以外の各化合物間での差はほとんど見られなかった (Fig. 6-2A)。ただ、**3l**、**3m**、**4d** など、アルキル基が長く *ClogP* 値 (Table 4-1) の大きい誘導体は比較的強い効果を示した。一方で、各被検化合物 1 μM の条件では **1** に加え **3b**、**3k** が抑制効果を示さなかったが、それらよりも *ClogP* 値の大きい誘導体は、強弱は様々ながらいずれも抑制効果を示した (Fig. 6-2B)。特に **3n**、**4c**、**4d** は 1 μM でも比較的強い抑制効果を示した。

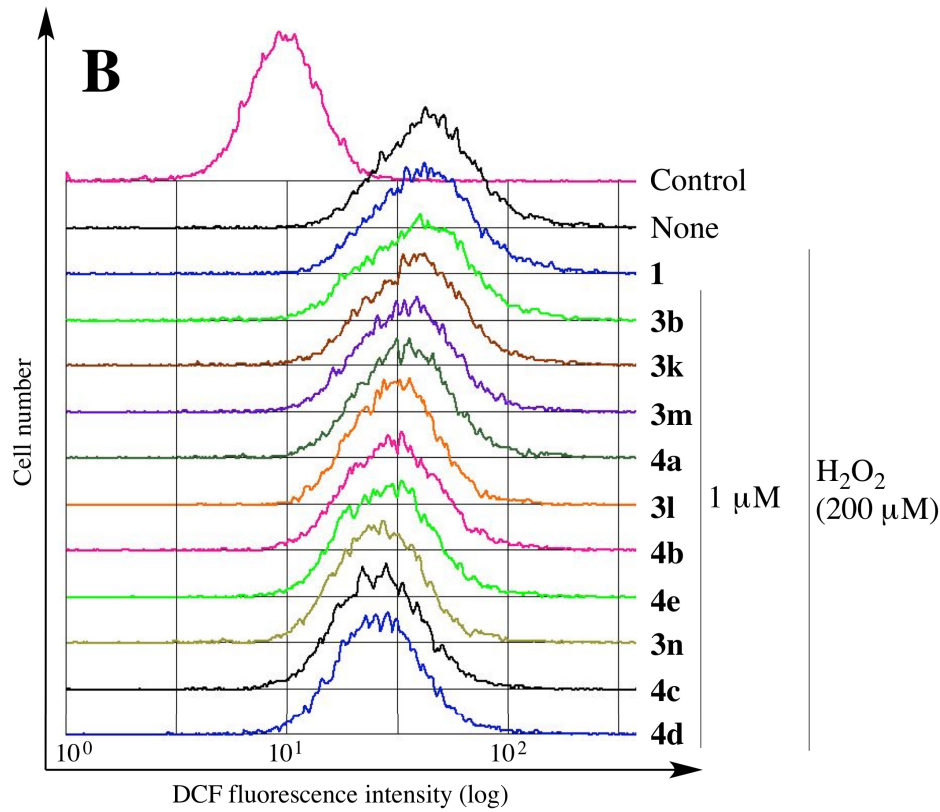
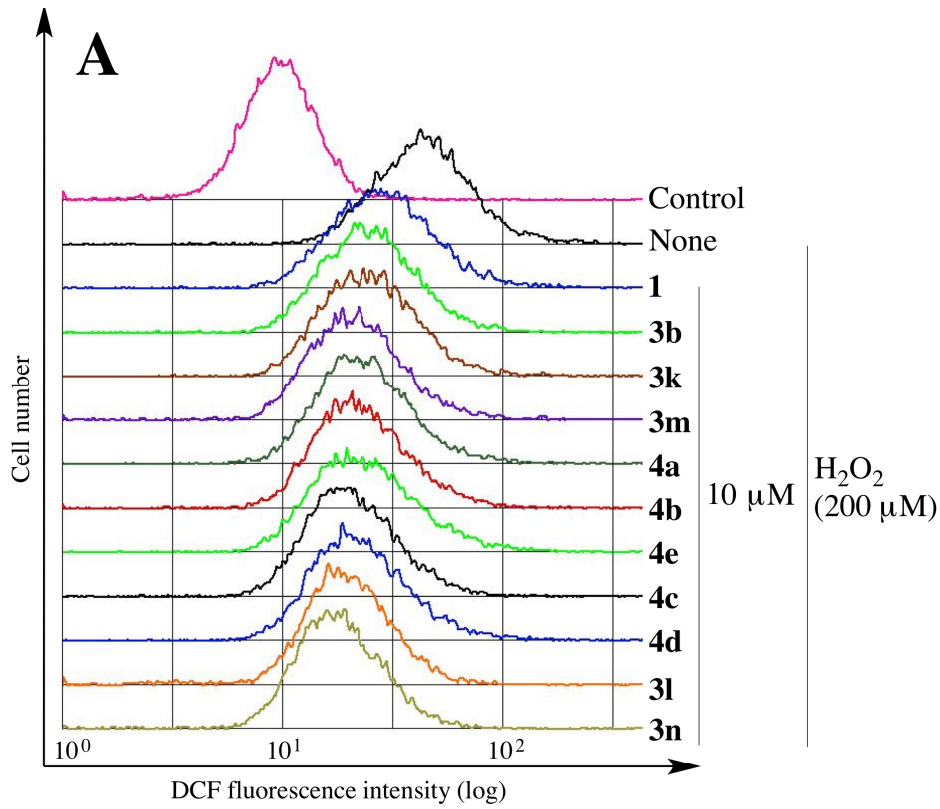


Fig. 6-2 細胞内酸化ストレス抑制効果-2 (3b、3k~n、4a~e)
化合物の並びは Fig. 6-1 と同様である

6-3 誘導体 **5a**~**c** 及び **6a**~**c** の細胞内酸化ストレス抑制効果

最後に、誘導体 **5a**~**c** 及び **6a**~**c** について前項までと同様の条件で細胞内酸化ストレス抑制効果を評価した。

誘導体 **5a**、**5b**、**5c** は、10 μM 及び 1 μM の双方の条件で酸化ストレス抑制効果を示した (Fig. 6-3)。10 μM の条件 (Fig. 6-3A) では **5a**~**c** の差がほとんどなかったものの、1 μM (Fig. 6-3B) の条件では *ClogP* 値の大きい **5b** が最も強い抑制効果を示した。

その一方で、誘導体 **6a**、**6b**、**6c** の効果には濃度条件によって明確な差異が見られた。1 μM の条件では、**6a**~**c** はいずれも酸化ストレス抑制効果を示し、*ClogP* 値の大小と効果の強弱が一致した (Fig. 6-3B)。しかし、**6a** と **6c** は 10 μM の条件では逆に H_2O_2 単独曝露群よりも酸化ストレスを増大した (Fig. 6-3A)。この効果は *ClogP* 値が低いものほど強く現れた。また、**6b** は 10 μM の条件でも酸化ストレス抑制効果を示したが、その効果は 1 μM の場合よりも減弱した。第 5 章において、誘導体 **6a** はアスコルビン酸と同程度の鉄触媒プロオキシダント効果を示すことを明らかとした。このことから、**6a** は一定程度以上の濃度ではプロオキシダント効果によって細胞内酸化ストレスを増大させたと考えられる。またプロオキシダント効果の測定は行っていないものの、**6a** と同じくオキシインドール環 C-3 位が sp^2 炭素でありエキソ二重結合を有する **6b**、**6c** も同様にプロオキシダント効果を示した可能性がある。また酸化ストレスの増大効果が **6b**、**6c**、**6a** の順で強く現れたのは、脂溶性が高い化合物では細胞内酸化ストレス抑制効果も強くなるため、プロオキシダント効果と抗酸化作用が拮抗した結果ではないかと考えられる。今回は H_2O_2 存在下での検討のみ行ったが、誘導体 **6a**~**c** の酸化ストレス増大効果が H_2O_2 に依存するか、それとも単独で増大効果を示すかについては更に検討する必要がある。

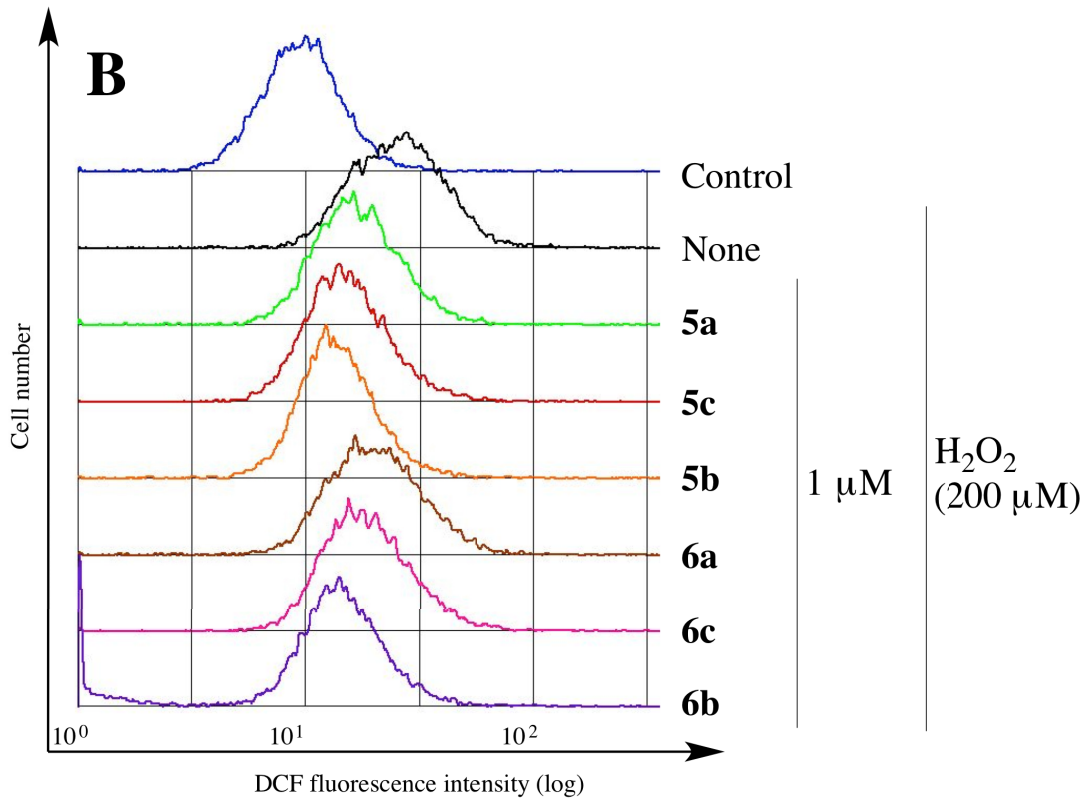
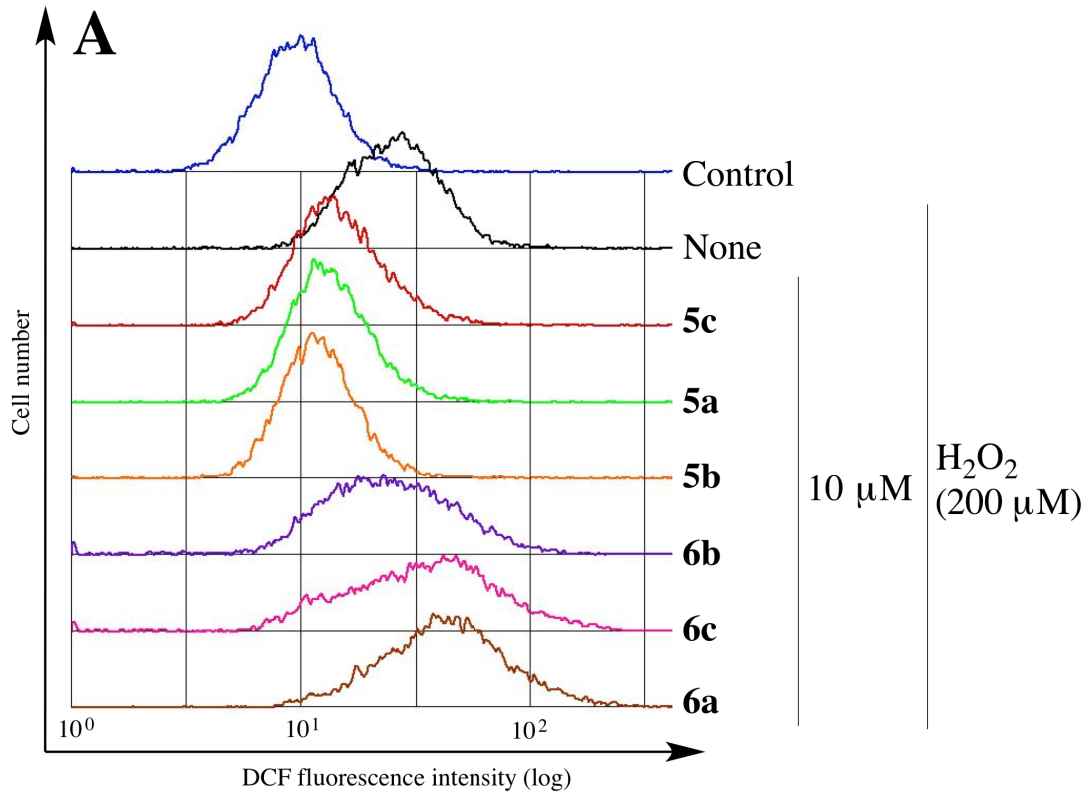


Fig. 6-3 細胞内酸化ストレス抑制効果-3 (5a~c、6a~c)

第7章 細胞毒性の測定

医薬品リード化合物の安全性に関与する項目として、細胞毒性を評価した。培養細胞に対する毒性が生体に対する毒性を必ずしも反映するわけではないが、それに繋がるリスクファクターを早期に明らかにすることは開発確率を向上する上で重要な項目である。

7-1 細胞生存率の測定方法

生細胞数を計数する方法として、MTT (3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムブロミド) 法¹¹⁴⁾が一般的である。これは、生細胞中のミトコンドリアに存在する還元酵素によってテトラゾリウム塩から生成するホルマザンを比色定量する方法であり、高感度かつ簡便な操作で多量のサンプルを測定できることから毒性試験に汎用されている。しかし、抗酸化剤のような還元性物質の存在下では、これらの物質がテトラゾリウム塩を還元する可能性があり、正確な測定が困難であると考えられる。そこで本研究では、トリパンブルーを用いた色素排除試験法を採用した。トリパンブルーは深青色のタンパク結合性の強い色素で、正常な細胞膜を有する細胞には取り込まれないが、死細胞では膜透過性が増加しているため容易に取り込まれる。この性質によって死細胞のみを染色することができ、生細胞数を計数することができる。生細胞数の計数には生死細胞自動カウンターの Vi-CELLTMを用いた。

7-2 化合物 1、2、3a~j の細胞毒性

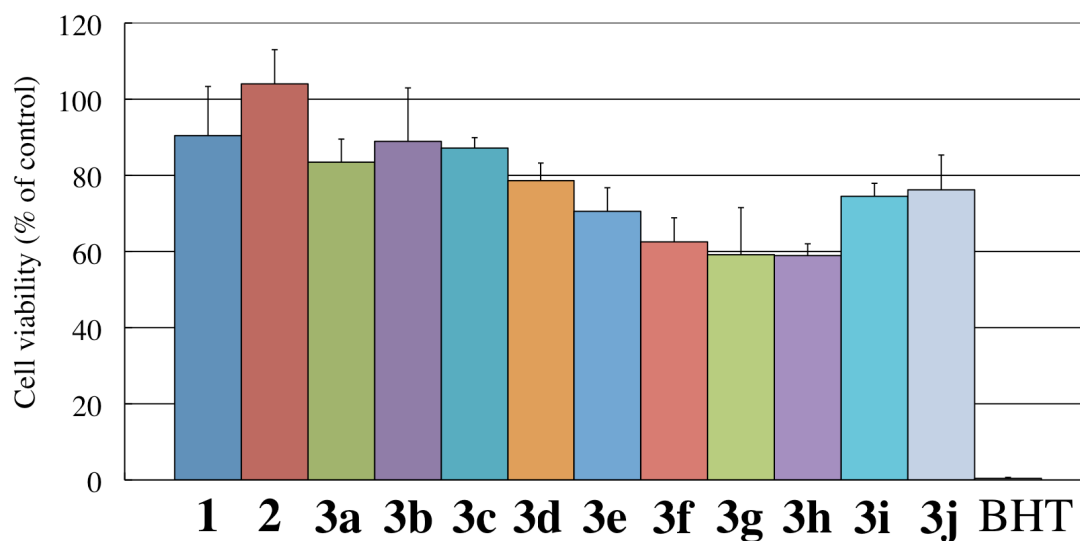


Fig. 7-1 細胞毒性-1 (1、2、3a~j、100 μ M、24 時間曝露)

化合物 **1** は、先行研究での結果と同様に 100 μ M で有意な毒性を示さなかった。誘導体 **3a**、**3b**、**3c** も 85~100 %程度の細胞生存率を維持しており、**1** と同様に毒性を示さなかった。誘導体 **3d**~**j** 曝露時の細胞生存率は 60~80%程度となり、**1** や **3a**~**c** と比較してやや強い毒性を示した。その一方で、一連の誘導体と同じくフェノール性水酸基を有する抗酸化物質の BHT は細胞生存率をほぼ 0%まで低下させる強い毒性を示した。

7-3 誘導体 **3k**~**n**、**4a**~**e**、**5a**~**c**、**6a**~**c** の細胞毒性

誘導体 **3k**、**3l**、**3m**、**3n**、**4a**、**4b**、**4c**、**5a**、**5c** は、50 μM ではおよそ 80%以上の細胞生存率を示した (Fig. 7-2)。また、**4a** と **5a** は 100 μM でもほとんど毒性を示さなかった (Fig. 7-3)。誘導体 **3k**、**3l**、**4b**、**5c** の毒性は 100 μM でもさほど強くなかったが、**3m**、**3n**、**4c** は 100 μM では生存率が 50%を下回った (Fig. 7-3)。また、**4d**、**4e**、**5b** は 50 μM でも比較的強い毒性を示し、100 μM ではさらに毒性が強くなり 0~10%程度の細胞生存率となった。誘導体 **6a**、**6b**、**6c** も 50 μM から強い毒性を示し、特に **6b** は 50 μM の時点で生存率がほぼ 0%となった。誘導体 **6a**、**6c** も 100 μM では生存率を 0%付近まで低下させた。

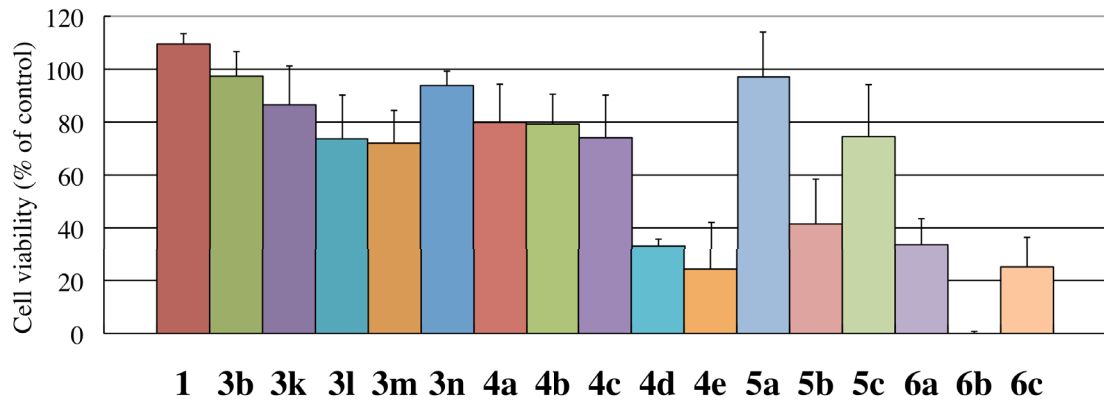


Fig. 7-2 細胞毒性-2
(1、3b、3k~n、4a~e、5a~e、6a~c、50 μM、24 時間曝露)

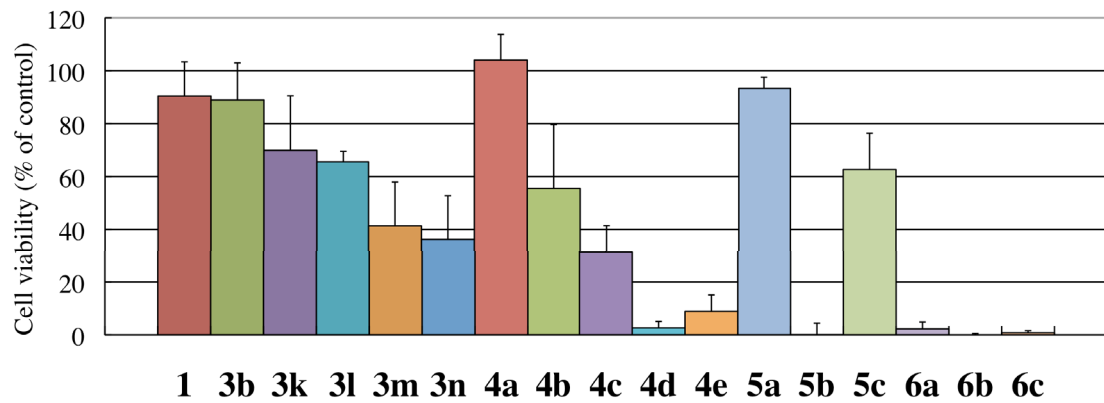


Fig. 7-3 細胞毒性-3
(3k~n、4a~e、5a~e、6a~c、50 μM、24 時間曝露、1、3b は Fig. 7-1 の再掲)

7-4 考察

化合物 **1** は細胞内酸化ストレス抑制効果を示したことから、膜を透過して細胞内へ取り込まれると考えられる。しかし 100 μM まで細胞毒性を示さなかったことから、**1** そのものは低細胞毒性で安全性の高い化合物であると考えられる。一連の **1** 誘導体の細胞毒性は、置換基の種類及び C-3 位の構造によって変化した。ClogP 値と毒性の間に明確な相関は無かったが、主にアルキル基を導入した化合物ではアルキル基が長くなるほど毒性が増強する傾向にあった。一連の誘導体の中で強い毒性を示した **4d**、**4e**、**5b** は ClogP 値がおおよそ 3 かそれ以上であった。このことから、アルキル鎖の延長による脂溶性の向上は毒性の増強に繋がる可能性があり、適度な範囲の延長に留める必要があることが示唆された。しかし、**3a~n**、**4a~e**、**5a~c** はいずれも 200 μM の H_2O_2 による細胞内酸化ストレスに対し 10 μM や 1 μM といった低濃度でも抑制効果を示したことを考慮すると、抗酸化活性発現濃度は毒性発現濃度よりも低く、相対的には安全性の高い化合物であるとも考えられる。また化合物 **4a** や **5a** は ClogP 値が **3g** と同程度でありながらも毒性は示さなかったことから、脂溶性調節部位の構造次第では ClogP 値を増加しながらも毒性発現を抑えることも可能であると考えられる。また、**1**、**2**、**3** 系、**4** 系、**5** 系の誘導体の毒性は一部を除き BHT よりも大幅に低かった。このことから、本研究で用いた尿酸類縁体は見かけ上フェノールであるが、一般的なフェノール系抗酸化剤の示す毒性を持たない安全性の高い化合物であることが示唆された。

一方で、**6a**、**6b**、**6c** は強い毒性を示した。誘導体 **6a** の ClogP 値は 2 未満であり脂溶性は高くない。それにも関わらず強い毒性を示したことは、基本骨格そのものに問題があると考えられる。誘導体 **6a**、**6b**、**6c** は α,β -不飽和カルボニル化合物であり、Michael アクセプターに成り得るため細胞内の各種成分と反応して毒性を示した可能性がある。また、**6a** はプロオキシダント効果を有することを先に示しており、さらに **6a**、**6c** は 10 μM の低濃度で (H_2O_2 存在下であり単独での検討は行っていないものの) 細胞内酸化ストレスを増大する効果を示したことなどから、**6a~c** は細胞内で酸化ストレスを惹起して毒性を示した可能性がある。いずれにせよ、毒性の観点からは **6a~c** のようなオキシインドール C-3 位にエキソオレフィンをもつ構造は回避する必要がある。

第 8 章 オキシインドール誘導体の水溶性の測定

内因性の抗酸化剤である尿酸の問題点として、血清に対する溶解度がおよそ 7.0 mg/dL と低く、痛風の原因物質となることが挙げられる。痛風のリスクを除いても、極端に水溶性の低い物質は製剤化や体内動態の問題から医薬品としての応用は難しい。そのため、尿酸類縁体を医薬品として応用するためには溶解度の改善が求められる。そこで、血清に対する溶解度の簡便な指標として、リン酸生理食塩水緩衝液 (PBS、pH 7.4) に対する 37°C での溶解度を吸光度測定により求めた。ここでは尿酸、**1** に加え、各種置換基を有する化合物から **2**、**3a**、**3g**、**4c**、**5a** を被検化合物として選択した。また、先行研究において溶解度は未検討であったため、**1** よりも縮合環内・環上の窒素原子・酸素原子が多く、尿酸に近い構造を有する **A**、**B** についても比較を行った。

8-1 方法

濃度既知の被検化合物標準溶液と 37°C での飽和溶液をそれぞれ作成し、各溶液の吸光度の比較から溶解度を求めた。

8-2 結果と考察

Table 8-1 溶解度

	Uric acid	A	B	1	2	3a	3g	4c	5a
Solubility in PBS at 37°C (mg/dL)	5.3	8.2	6.5	23	21	11	11	8.2	12

尿酸の溶解度は 5.3 mg/dL であり、血清への溶解度と近い値を示した。化合物 **1** 及び **2** は尿酸の約 4 倍の溶解度を示した。また、**3a**、**3g** はともに尿酸の約 2 倍の溶解度を示したが、**1** や **2** と比べると溶解度は低下した。これはフェナシル基の導入による脂溶性の上昇が関与すると考えられる。また、**5a** の溶解度も尿酸の約 2 倍であり、やはり **1** と比較すると低値であった。また、さらに脂溶性の高い **4c** の溶解度は尿酸よりわずかに高い程度であった。化合物 **A**、**B** の溶解度もまた尿酸とほとんど変わらなかった。

誘導体 **1** よりも尿酸に近い構造を有する **A**、**B** の溶解度は尿酸と比較してさほど改善が見られなかった。一方で **1** は尿酸の約 4 倍の溶解度を示したことから、溶解度改善の観点からはオキシプリン骨格をオキシインドール骨格まで単純化することが有効であることが示された。誘導体 **1** では溶解度の改善に成功したが、

その後の C-3 位誘導化にあたっては脂溶性の増加によって溶解度は低下する傾向にあった。

しかし、一連の誘導体は尿酸に比べて抗酸化活性が高いため、血中濃度が尿酸と同等であったとしても正味の抗酸化活性は尿酸より強いと期待できる。また**3**、**4**、**5**系などの誘導化による溶解度の低下は、脂溶性と水溶性のバランスを考慮した置換基を新たに導入することで抗酸化活性を損なうことなく改善することも可能である。よって**1**の構造を抗酸化活性医薬品リード化合物の基本骨格にすることは溶解度の観点からも有効であることが示唆された。

第9章 結論

本研究では、内因性の抗酸化剤である尿酸のラジカル消去機構を規範として、尿酸類縁構造を有する各種新規抗酸化物質をデザイン・合成し、医薬品リードとして適した化合物の創製を試みた。

まず、尿酸類縁体の DPPH ラジカル消去活性における構造活性相関について、水酸基の位置や五員環部位の構造を中心に構造変換した新規類縁体をデザイン・合成し (第2章)、活性の比較を行った。その結果、六員環上の水酸基と五員環上の NH がパラ位の関係に位置し、かつ五員環にアミド構造を有する化合物が、それらに該当しない化合物に比べ強いラジカル消去活性を示すことを明らかとした。(第3章)

この結果を踏まえ、さらに創薬化学的な利便性・発展性を考慮し、医薬品リード化合物とするための更なる誘導体化を行う基本の抗酸化剤として 5-ヒドロキシオキシインドール (**1**) を選択した。抗酸化剤の医薬品としての応用に際し、ラジカル消去活性だけでなく物性も考慮する必要があるが生じる。化合物 **1** は物性制御に必要な置換基導入を容易かつ C-3 位へ位置選択的に行うことができ、さらにその置換基導入が主作用であるラジカル消去活性に与える影響は低いと予測した。実際、**1** の C-3 位に各種置換基を導入した誘導体 **2**、**3a~n**、**4a~e**、**5a~c**、**6a~c** はいずれも短工程で合成することができた。(第2章)

誘導体 **2~6c** は、尿酸よりも高いラジカル消去活性を示した。このことから、化合物 **1** の C-3 位への置換基導入は、予想通り、抗酸化物質としての機能を喪失せず誘導体化を行う方法として有効であることが示された。特に、C-3 位が三級炭素または sp^2 炭素である場合、**1** と同等以上のラジカル消去活性を維持できることが示された。また、様々な物性パラメータを有するパラ置換フェナシル基を導入した誘導体では、フェナシル基上の置換基によるラジカル消去活性への影響はほとんどないことが明らかとなった。よって **1** の C-3 位への置換基導入は、ラジカル消去活性を維持しつつ物性を制御する方法として有効性の高いものであり、合成の簡便さも含め **1** を基盤としたドラッグデザインへの足掛かりとなることが示された。しかし、これらの修飾はラジカル消去活性を向上するものではなく、一連の誘導体の活性はエダラボンやアスコルビン酸よりも大幅に低かった。(第3章)

一方で、より生体に近い実験系として行った脂質過酸化抑制試験において、誘導体 **1** はエダラボンと同等の抑制効果を示し、更に **3d**、**3g**、**3h**、**3i**、**3j** は **1** やエダラボンよりも強い効果を示した。これには置換基導入による物性の変化が影響したと考え、脂溶性 ($ClogP$)、極性表面積、電子効果の各種パラメータと抑制効果の関連について検討した。その結果、ハロゲンを含む **3g**、**3h**、**3i** の抑制効果の強弱と脂溶性の大小が一致することを見出した。ここに着目して、脂溶性以外の物性の影響を極力排除する観点からフェナシル基上の置換基の違いをア

ルキル基のみとした誘導体 **3k~n** や、同様にアルキル系置換基に焦点を置きつつ C-3 位の構造を変化させた **4a~e**、**5a~c**、**6a~c** についても脂質過酸化抑制効果を評価した。その結果、やはりアルキル鎖が長く脂溶性の高い化合物がより強い抑制効果を示した。ただし、誘導体 **3** 系、**4** 系、**5** 系、**6** 系で脂溶性が同等の化合物同士を比較した場合では脂溶性以外の物性やラジカル消去活性の強弱も活性に影響すると考えられる。各系列の誘導体を比較した場合には、**4** 系が特に強い脂質過酸化抑制効果を示した。(第 4 章)

さらに、一連の誘導体は細胞系における酸化ストレスに対しても抑制効果を示した。その効果の強弱は脂質過酸化抑制効果の強弱と似た傾向が見られ、**3d**、**3g**、**3h**、**3i**、**3j** は細胞系でも **1** やエダラボンより強い酸化ストレス抑制効果を示した。脂溶性の高い誘導体は、脂質過酸化を効果的に抑制するだけでなく、細胞膜を容易に透過できるため、細胞系での抗酸化活性発現において有利であると考えられる。また **4** 系、**5** 系の誘導体も同様に有効で、特にアルキル鎖が長く高脂溶性の **3n**、**4c**、**4d**、**4e**、**5b** は強い $1\ \mu\text{M}$ という低濃度でも特筆すべき効果を示した。しかし、**6** 系の誘導体は細胞内で酸化ストレスを増強した。(第 6 章)

誘導体 **1** や **4c**、**5a** は、抗酸化剤の問題点であるプロオキシダント効果を示さなかった。誘導体 **3k** は弱いながらプロオキシダント効果を示し、また **6a** はアスコルビン酸と同等のプロオキシダント効果を示した。この結果は、**6** 系の細胞内酸化ストレス上昇作用と関連する可能性が高い。プロオキシダント効果回避の観点からは、**4c** や **5a** のように C-3 位が sp^2 炭素でなく、また脱水により sp^2 炭素に変化しない構造が有利であると示唆された。(第 5 章)

誘導体 **1** は細胞毒性を示さなかった。また、**6a~c** を除くほとんどの誘導体の細胞毒性は弱く、フェノール性抗酸化剤 BHT との比較や、細胞内酸化ストレス抑制効果の発現濃度が毒性発現濃度よりも低かったことを考慮すると、**1** を基本骨格とした抗酸化剤は安全性の高い化合物であることが示された。一方で脂溶性を上げすぎることや、脂溶性に関係なく強い毒性を示した **6a~c** のような構造は回避すべきであることも示唆された。(第 7 章)

最初に規範とした尿酸の問題点である溶解度について各誘導体と比較したところ、**1** では改善が見られた。これは尿酸に比べ **1** は環内のアミド構造の数が少ないためであると考えられる。その一方で、化合物 **1** の C-3 位に置換基を導入した誘導体では溶解度の低下が観察された。これは置換基による疎水性向上のためと考えられ、置換基部分のデザイン次第では溶解度と脂溶性を同時に高めるような改善も可能と考えられる。(第 8 章)

以上の結果、化合物 **1** の C-3 位への置換基導入は、抗酸化剤としての機能を喪失させずに誘導体化やそれによる物性制御を行う方法として有効であることが示された。さらに、一部の脂溶性の高い誘導体は脂質過酸化抑制効果や細胞内酸化ストレス抑制効果など、主に生体成分への酸化ストレスに対し **1** やエダラボンよりも強力な抗酸化作用を示した。この場合の脂溶性は、脂溶性抗酸化剤の代表格である α -トコフェロールのような極端なものではなく、一般的な医薬品と同

等の $ClogP$ 値が 1~3 の範囲に収まるような細かな脂溶性の調節で充分であった。このことは、ROS との反応性の高さに焦点が置かれがちであり、創薬化学的な観点からの活性・物性・毒性のバランスの検討が不十分と言える現在の抗酸化剤開発研究に一石を投じる重要な知見となる。

本実験で抗酸化活性を評価した一連の誘導体では、特に **4c** (Fig. 9-1) が脂質過酸化抑制効果、細胞内酸化ストレス抑制効果ともに強く、プロオキシダント効果や細胞毒性は弱かったことから、活性と安全性のバランスが良く、新規抗酸化活性医薬品のリード化合物として有望である。

今後、**4c** の構造を元に更なる物性の最適化や、酸化ストレス部位へのターゲティングが可能となる構造の導入を行うことで、既存の抗酸化剤との大幅な差別化を図り、疾患モデルや臨床への応用を見据えた高次リード化合物の創製を達成することが期待できる。

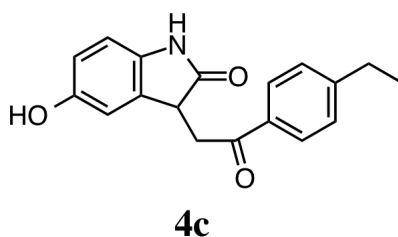


Fig. 9-1 医薬品リード化合物に最適と考えられる誘導体 **4c**

第 10 章 実験の部

10-1 使用機器

FT-NMR (400 MHz)	Varian VARIAN400
FT-NMR (500 MHz)	Varian VARIAN500
FT-NMR (600 MHz)	日本電子 ECP600
GC-MS	日本電子 JMS-700
微量融点測定装置	ヤナコ MP-J3
紫外可視分光光度計	JASCO V-570
超純水製造装置	MILLIPORE
超音波洗浄機	東京超音波技研 UC-1331N
中圧分取自動カラムシステム	EPCLC-AI-580S
ストップフロー分光測定装置	ユニソク RSP-2000
振盪恒温槽	YAMATO BW100, YAMATO BF200
遠心分離機	HITACHI himac CF 7D2
pH メーター	HORIBA カスタニーACT pH メーター D-21
マイクロプレートリーダー	TECAN infinite PRO 200
CO ₂ インキュベーター	Thermo ステリサイクル 370
生死細胞自動アナライザー	BeckmanCoulter Vi-CELL
フローサイトメーター	日本 BD FACSCalibur

10-2 使用試薬

10-2-1 被検化合物の合成

以下の試薬は東京化成工業株式会社製のものをを用いた。

Acetophenone、benzaldehyde、boron tribromide (17% dichloromethane solution)、4'-bromoacetophenone、diethylamine、4'-ethylacetophenone、4'-fluoroacetophenone、heptanal、4'-iodoacetophenone、4'-isobutylacetophenone、4'-isopropylacetophenone、4'-methoxyacetophenone、5-methoxyisatin、4'-methylacetophenone、4'-nitroacetophenone、3-nitro-*o*-cresol、piperidine、propanal、4'-propylacetophenone、pyridinium bromide perbromide、4'-(trifluoromethyl)acetophenone.

以下の試薬は和光純薬工業株式会社製のものをを用いた。

4-Acetylbenzotrile、*N,N'*-carbonyldiimidazole、Celite[®]、4'-chloroacetophenone、*N,N*-dimethylformamide、ethanol、formic acid、6-methoxy-2,3-diaminopyridine dihydrochloride、molecular sieve 4A、4-methoxy-1,2-phenylenediamine dihydrochloride、3-nitro-*p*-cresol、sodium sulfate (anhydrous)、sodium hydrosulfite .

以下の試薬は関東化学工業株式会社製のものをを用いた。

Diethyl ether、tetrahydrofuran (dehydrated)、hydrobromic acid (47% in water)、methanol.

以下の試薬は米山薬品工業株式会社製のものをを用いた。

Chloroform、dichloromethane、glacial acetic acid、hydrochloric acid、sodium hydroxide (pellet)、toluene.

以下の試薬は国産化学工業株式会社製のものをを用いた。

Ethyl acetate、*n*-hexane、sodium nitrite.

以下の試薬は岩井化学薬品株式会社製のものをを用いた。

Magnesium sulfate (anhydrous).

以下の試薬は小島化学薬品株式会社製のものをを用いた。

Palladium on activated charcoal (5%).

以下の試薬は ACLOS 社製のものをを用いた。

Chloroform-*d*₁.

以下の試薬は Aldrich 社製のものをを用いた。

1-Benzyloxy-3-methyl-2-nitrobenzene、diethyl oxalate、dimethyl-*d*₆ sulfoxide、methanol-*d*₄、5-methoxybenzimidazole.

以下の試薬は COMBI-BLOCKS 社製のものをを用いた。

5-Hydroxyoxindole.

以下の試薬は Merck 社製のものをを用いた。

Silica gel 60、tetrahydrofuran-*d*₈、TLC plate.

10-2-3 DPPH ラジカル消去活性の評価

Ascorbic acid、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (contains 10~20% benzene)、uric acid は東京化成工業株式会社製のものを用いた。Ethanol、5-hydroxyindole は和光純薬工業株式会社製のものを用いた。Edaravone、5-hydroxyindazole は Aldrich 社製のものを用いた。2-morpholinoethanesulfonic acid hydrate は SIGMA 社製のものを用いた。5-Hydroxyoxindole は APIN CHEMICALS 社製のものを用いた。

10-2-4 脂質過酸化抑制効果の評価

3,5-Di(*tert*-butyl)-4-hydroxytoluene、2-thiobarbituric acid sodium salt、uric acid は東京化成工業株式会社製のものを用いた。Ethanol、sodium dihydrogen phosphate、trichloroacetic acid は和光純薬工業株式会社製のものを用いた。*tert*-Butyl hydroperoxide (69% in water)、edaravone は Aldrich 社製のものを用いた。5-Hydroxyoxindole は APIN CHEMICALS 社製のものを用いた。Hydrochloric acid は米山薬品工業株式会社製のものを用いた。Ethylenediamine tetraacetic acid sodium salt は同仁化学株式会社製のものを用いた。

10-2-5 プロオキシダント効果の評価

Acetylacetone、ascorbic acid、uric acid は東京化成工業株式会社製のものを用いた。Ethanol、iron (III) chloride (anhydrous)、sodium dihydrogen phosphate は和光純薬工業株式会社製のものを用いた。Dimethyl sulfoxide、edaravone は Aldrich 社製のものを用いた。5-Hydroxyoxindole は APIN CHEMICALS 社製のものを用いた。Glacial acetic acid、hydrochloric acid は米山薬品工業株式会社製のものを用いた。Ammonium chloride は富山薬品工業株式会社製のものを用いた。

10-2-5 細胞内酸化ストレス抑制効果の評価、細胞毒性の評価

3,5-Di(*tert*-butyl)-4-hydroxytoluene、uric acid は東京化成工業株式会社製のものを用いた。Dulbecco's PBS(-)、hydrogen peroxide (30% in water) は和光純薬工業株式会社製のものを用いた。Dimethyl sulfoxide、edaravone は Aldrich 社製のものを用いた。5-Hydroxyoxindole は APIN CHEMICALS 社製のものを用いた。2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate、penicillin-streptomycin solution (100x)、RPMI-1640 medium (with L-glutamine and sodium bicarbonate, liquid, sterile-filtered, cell culture-tested) は SIGMA 社製のものを用いた。Fetal bovine serum (heat

inactivated, certified) は Life technologies 社製のものを用了。

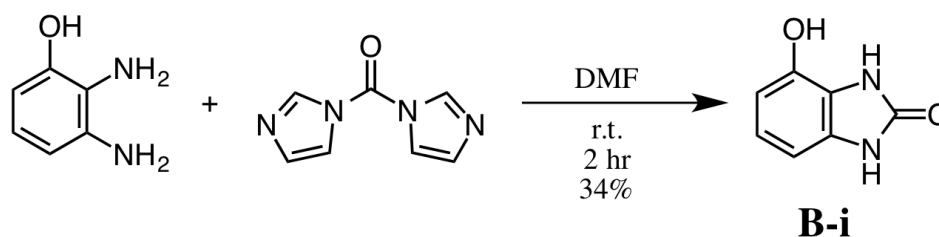
10-2-8 溶解度の評価

Dulbecco's PBS(-) は和光純薬工業株式会社製のものを用了。

10-3 被検化合物の合成

^1H NMR の基準シグナルは TMS ($\delta=0$ ppm) とした。 ^{13}C NMR の基準シグナルは chloroform- d_1 ($\delta=77.2$ ppm)、dimethyl sulfoxide- d_6 ($\delta=39.5$ ppm)、methanol- d_4 ($\delta=49.0$ ppm)、tetrahydrofuran- d_8 ($\delta=25.5$ ppm) とした。

10-3-1 4-ヒドロキシ-2-ベンズイミダゾリノン (**B-i**) の合成



Scheme 10-1 4-ヒドロキシ-2-ベンズイミダゾリノン (**B-i**) の合成

市販の 2,3-ジアミノフェノール (300 mg, 2.4 mmol) を *N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF, 10 mL) に溶解し、*N,N'*-カルボニルジイミダゾール (392 mg, 2.4 mmol, 1.0 当量) を少量ずつ加え、室温で 2 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮し、残渣を酢酸エチルに溶解した。この有機層を 2M 水酸化ナトリウム水溶液で 2 回抽出し、得られた塩基性水層を合わせ、2M 塩酸を加えて酸性とした。これを酢酸エチルで 4 回抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で 1 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。次いで溶媒を減圧下で留去し、黄褐色固体を 231 mg 得た。これにメタノールを加え、析出した沈殿を吸引濾過により濾別した。残った濾液の溶媒を減圧下で留去し、褐色固体を 122 mg (収率 34%) 得た。水から再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

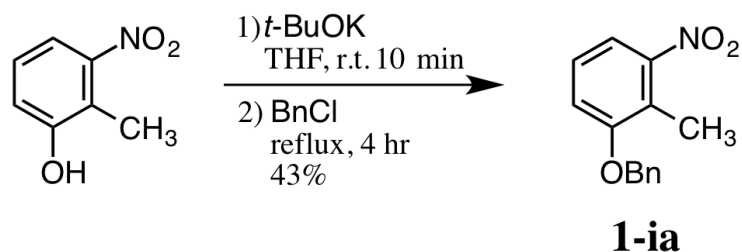
^1H NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 6.44-6.46 (*m*, 2H, H-5 and H-7), 6.72 (*t*, 1H, *J*=8.0 Hz, H-6), 9.46 (*s*, 1H, -OH), 10.31 (*s*, 1H, -NH-), 10.42 (*s*, 1H, -NH-).

^{13}C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 100.80, 107.98, 117.94, 121.29, 131.46, 141.50, 155.51.

M.p. 283.1-285.5 °C

10-3-2 4-ヒドロキシオキシインドール (**1-i**) の合成

10-3-2-1 2-ベンジルオキシ-6-ニトロトルエン (**1-ia**) の合成

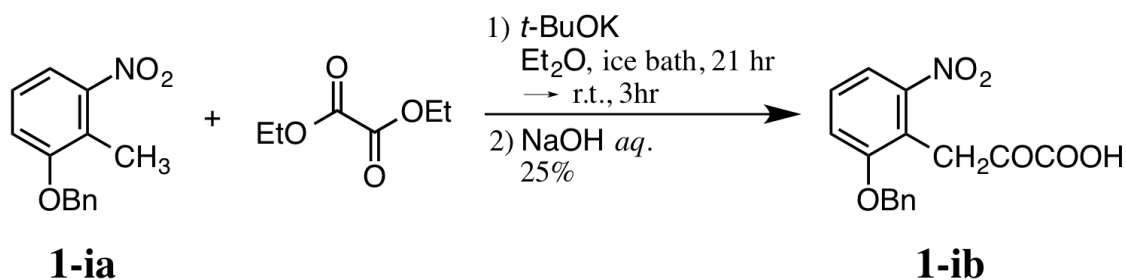


Scheme 10-2 2-ベンジルオキシ-6-ニトロトルエン (**1-ia**) の合成

市販の 3-ニトロ-*o*-クレゾール (1.00 g, 6.53 mmol) を THF (65 mL) に溶解し、カリウム *tert*-ブトキシド (806 mg, 7.18 mmol, 1.1 当量) を加え、室温で 10 分間攪拌した。次いで、塩化ベンジル (826 μ L, 7.18 mmol, 1.1 当量) を少量ずつ加え、95 $^{\circ}$ C の油浴で 4 時間還流攪拌した。氷冷後、水 (65 mL) を加え酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を (1.70 g) 得た。シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、黄色固体を 687 mg (収率 43%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 2.43 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 5.14 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.10 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H-3), 7.24 (dd, 1H, $J=8.2$ Hz, H-4), 7.43 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, H-5).

10-3-2-2 (2-ベンジルオキシ-6-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-ib**) の合成

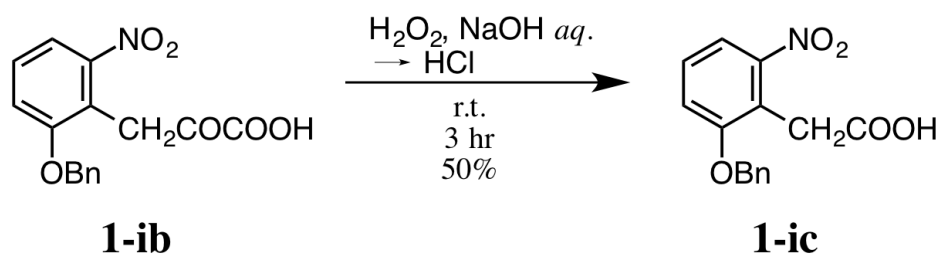


Scheme 10-3 (2-ベンジルオキシ-6-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-ib**) の合成

化合物 **1-ia** (302 mg, 1.24 mmol) をジエチルエーテル (12 mL) に溶解し、氷水浴中でカリウム *tert*-ブトキシド (306 mg, 2.73 mmol, 2.2 当量) 及びシユウ酸ジエチル (0.4 mL, 2.73 mmol, 2.2 当量) を少量ずつ加え、21 時間攪拌した。さらに室温で 3 時間攪拌した後、水酸化ナトリウム水溶液 (3.5 mL, 水酸化ナトリウムとして 180 mg, 4.5 mmol, 3.6 当量) を加えた。水層をジエチルエーテルで 2 回洗浄後、2 M 塩酸を加えて酸性とし、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去し、黄色固体を 104 mg (収率 25%) で得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.31 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COCO}(\text{OH})$), 4.94 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 6.95 (dd, 1H, $J=7.8, 1.4$ Hz, H-3), 7.16-7.40 (m, 7H, H-4 and H-5, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$).

10-3-2-3 (2-ベンジルオキシ-6-ニトロフェニル)酢酸 (**1-ic**) の合成⁴⁴⁾

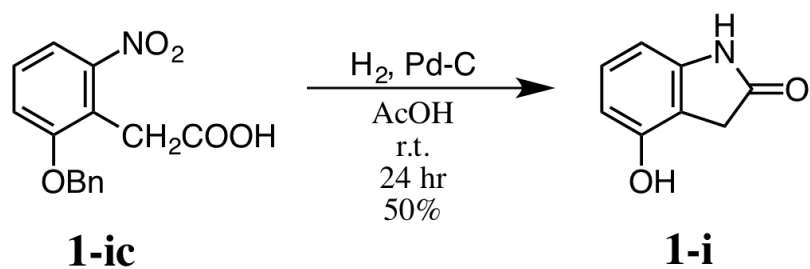


Scheme 10-4 (2-ベンジルオキシ-6-ニトロフェニル)酢酸 (**1-ic**) の合成

化合物 **1-ib** (104 mg, 0.33 mmol) を 0.2 M 水酸化ナトリウム水溶液 (30 mL) に懸濁し、6%過酸化水素水溶液 (15 mL, 0.39 mmol, 1.2 当量) を少量ずつ加え、次いで 2 M 塩酸 (5 mL) を加えて酸性とした。室温で 30 分間攪拌後、生じた沈殿を吸引濾過した。水で洗浄後、乾燥し、黄褐色固体を 47.4 mg (収率 50%) 得た。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 3.31 (s, 2H, -CH₂COOH), 4.94 (s, 2H, -OCH₂Ph), 6.95 (dd, 1H, *J*=7.8, 1.4 Hz, H-3), 7.16-7.36 (m, 7H, H-4 and H-5, -OCH₂Ph).

10-3-2-4 4-ヒドロキシオキシインドール (**1-i**) の合成



Scheme 10-5 4-ヒドロキシオキシインドール (**1-i**) の合成

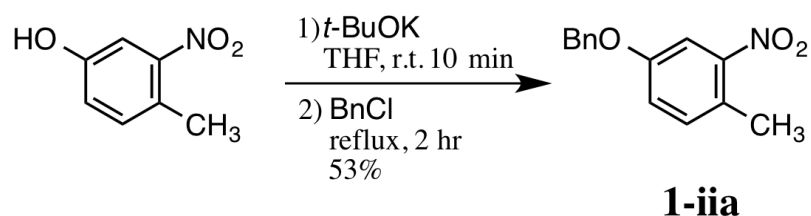
化合物 **1-ic** (47 mg, 0.17 mmol) を氷酢酸 (3 mL) に溶解し、10%パラジウム活性炭 (4.7 mg) を加えた。風船で反応容器内を水素雰囲気とし室温で24時間攪拌した。Celite でパラジウム活性炭を除き、Celite をエタノールで洗い込んで濾液を減圧留去して茶褐色固体 (29 mg) を収率 50%で得た。メタノールと水の混合溶媒から再結晶し、黒褐色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 2.70 (s, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.25 (d, 1H, $J=8.0$ Hz, H-5), 6.30 (d, 1H, $J=7.8$ Hz, H-7), 6.78 (dd, 1H, $J=8.0, 7.8$ Hz, H-6).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 23.00, 105.30, 107.99, 114.20, 126.39, 145.91, 155.36, 212.63.

10-3-3 6-ヒドロキシオキシインドール (**1-ii**) の合成

10-3-3-1 4-ベンジルオキシ-2-ニトロトルエン (**1-iiia**) の合成

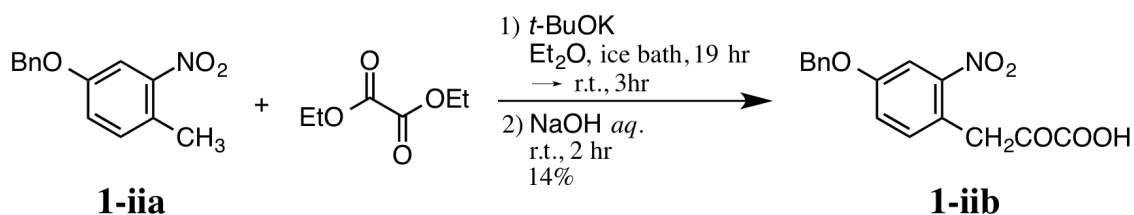


Scheme 10-6 4-ベンジルオキシ-2-ニトロトルエン (**1-iiia**) の合成

市販の 3-ニトロ-*p*-クレゾール (2.00 g, 13.1 mmol) を脱水 THF (45 mL) に溶解し、カリウム *tert*-ブトキシド (1.66 g, 14.4 mmol, 1.1 当量) を加え室温で 10 分間攪拌した。次いで塩化ベンジル (1.66 mL, 14.4 mmol, 1.1 当量) を少量ずつ加え、2 時間還流攪拌した。濃水酸化ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで 2 回抽出した。飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、褐色油状物質を 1.68 g (収率 53%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 2.50 (*s*, 3H, $-\text{CH}_3$), 5.01 (*s*, 2H, $-\text{CH}_2-$), 7.10 (*dd*, 1H, $J=2.4, 8.3$ Hz, H-5), 7.20 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-6), 7.31-7.42 (*m*, 5H), 7.60 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-3).

10-3-3-2 (4-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-iiib**) の合成

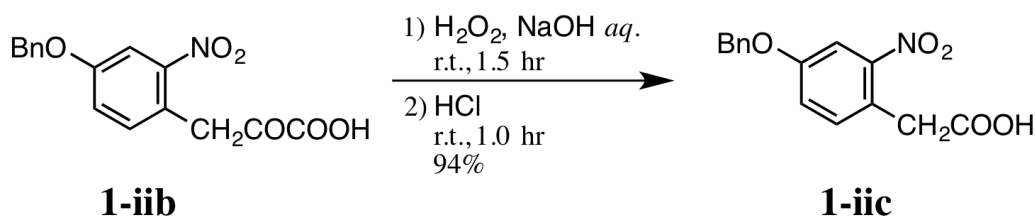


Scheme 10-7 (4-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-iiib**) の合成

化合物 **1-iiia** (1.61 g, 6.6 mmol) をジエチルエーテル (30 mL) に溶解し、カリウム *tert*-ブトキシド (1.63 g, 14.5 mmol, 2.2 当量) 及びシユウ酸ジエチル (2.0 mL, 14.7 mmol, 2.2 当量) を少量ずつ加え、室温で 19 時間攪拌した。次いで、1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (10 mL) を加え室温で 2 時間攪拌した。水層をジエチルエーテルで 2 回抽出し、得られた有機層に水酸化ナトリウム水溶液を加えて分液したところ、有機層、エマルジョン、水層に分離した。エマルジョンを 2 M 塩酸で酸性として、酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄褐色固体を 303 mg (収率 14%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.13 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COCO}(\text{OH})$), 5.10 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 7.14 (dd, 1H, $J=8.4, 2.7$ Hz, H-5), 7.27 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.35-7.44 (m, 5H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 7.55 (d, 1H, $J=2.7$ Hz, H-3).

10-3-3-3 (4-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)酢酸 (**1-iiic**) の合成

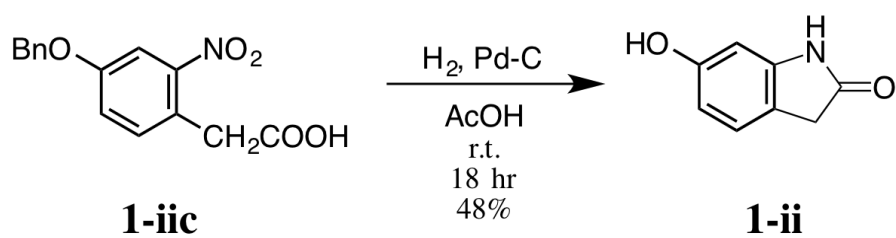


Scheme 10-8 (4-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)酢酸 (**1-iiic**) の合成

化合物 **1-iiib** (297 mg, 0.94 mmol) を 1M 水酸化ナトリウム水溶液 (40 mL) に均一に懸濁し、6%過酸化水素水溶液 (10 mL, 17.6 mmol, 19 当量) を少量ずつ加え、室温で 1.5 時間攪拌した。次いで 2 M 塩酸 (5 mL) を加えて酸性とし、室温で 1 時間攪拌した。析出沈殿を吸引濾過し、橙色固体を 256 mg (収率 94 %) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.13 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COCO}(\text{OH})$), 5.10 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 7.14 (dd, 1H, $J=8.4, 2.7$ Hz, H-5), 7.27 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.35-7.44 (m, 5H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 7.55 (d, 1H, $J=2.7$ Hz, H-3).

10-3-3-4 6-ヒドロキシオキシインドール (**1-ii**) の合成



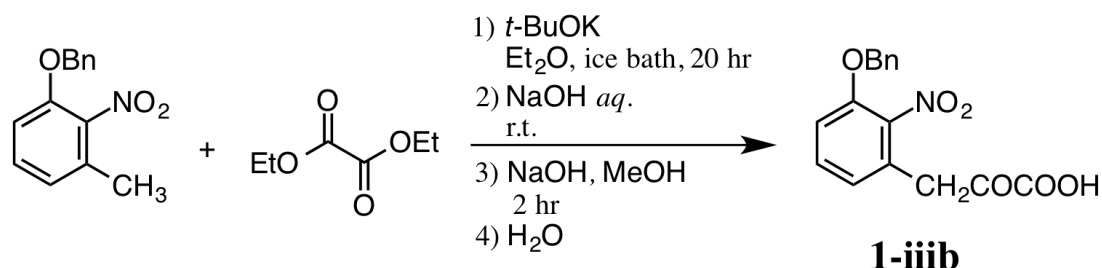
Scheme 10-9 6-ヒドロキシオキシインドール (**1-ii**) の合成

化合物 **1-iiic** (256 mg, 0.89 mmol) を氷酢酸 (40 mL) に懸濁し、10%パラジウム活性炭 (25 mg) を加え、風船で反応容器内を水素雰囲気とし室温で 18 時間攪拌した。パラジウム活性炭を Celite で除去し、Celite をエタノールで洗い込んだ。濾液を減圧下で留去し、黒色固体を 236 mg (収率 48%) 得た。

¹H-NMR (CD₃OD, 400 MHz) δ 3.88 (s, 2H, -CH₂-), 6.12 (dd, 1H, J=8.2, 2.3 Hz H-5), 6.21 (d, 1H, J=2.3 Hz, H-7), 6.77 (d, 1H, J=8.2 Hz, H-4).

10-3-4 7-ヒドロキシオキシインドール (**1-iii**) の合成

10-3-4-1 (3-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-iiib**) の合成



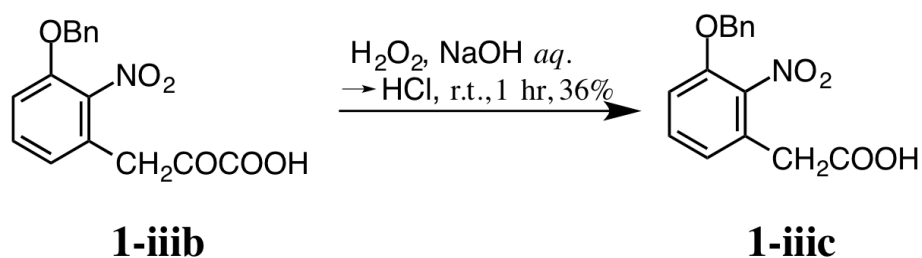
Scheme 10-10 (3-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)ピルビン酸 (**1-iiib**) の合成

市販の3-ベンジルオキシ-2-ニトロトルエン (1.00 g, 4.12 mmol) を氷水浴中でジエチルエーテル (41 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解した。そこへカリウム *tert*-ブトキシド (1.02 g, 9.10 mmol, 2.2 当量) 及びシユウ酸ジエチル (1.30 mL, 8.25 mmol, 2.2 当量) を少量ずつ加え、20 時間攪拌後、カリウム *tert*-ブトキシド及びシユウ酸ジエチルをそれぞれ計 7.7 当量になるまで加えた。次いで水 (20 mL) と水酸化ナトリウム (3.10 g, 77.5 mg, 18.8 当量) を加え攪拌した。ジエチルエーテルで抽出後、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン/酢酸エチル=1/5) により精製し、橙色針状結晶固体 (479 mg) を得た。¹H NMR 測定と¹³C NMR 測定を行い、これをピルビン酸エステルと同定した。

得られたピルビン酸エステル (479 mg, 1.40 mmol) をメタノール (14 mL) に溶解し、そこへ水酸化ナトリウム (0.39 g, 9.78 mmol, 7.0 当量) を加え、2 時間攪拌した。次いで水を加え、酢酸エチルで抽出し、有機層と塩基性水層を得た。この有機層を減圧下で溶媒を留去し、黄色固体 (227 mg) を得た。また、塩基性水層を 2 M 塩酸にて酸性化し、この酸性水層を酢酸エチルで抽出し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、減圧下で溶媒を留去し、橙色固体 (272 mg) を得た。¹H NMR の結果から、得た固体はいずれも **15** であると同定した (収率 34%)。

¹H NMR (CDCl₃, 400 MHz) δ 4.22 (s, 2H, -CH₂COCOOH), 5.14 (d, 2H, J=3.3, -OCH₂Ph), 6.84 (d, 1H, J=8.4 Hz, H-4), 6.97 (d, 1H, J=8.4 Hz, H-6), 7.03 (dd, 1H, J=8.4 Hz, H-5), 7.25-7.37 (m, 5H, -OCH₂Ph), 7.87 (d, 1H, J=8.0 Hz).

10-3-4-2 (3-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)酢酸 (**1-iiic**) の合成

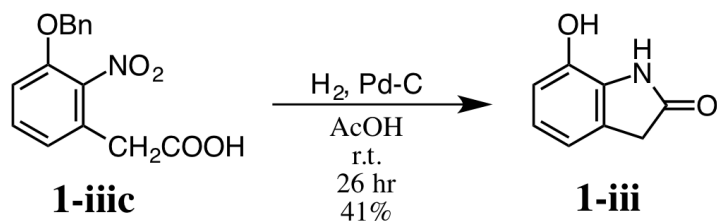


Scheme 10-11 (3-ベンジルオキシ-2-ニトロフェニル)酢酸 (**1-iiic**) の合成

化合物 **1-iiib** (485 mg, 1.54 mmol) を 1 M 水酸化ナトリウム水溶液 (30 mL) に溶解し、6%過酸化水素水溶液 (10 mL, 19.8 mmol, 12.8 当量) を少量ずつ加え、次いで 2 M 塩酸 (5 mL) を加え酸性とし室温で 1.5 時間攪拌した。生じた沈殿を吸引濾過し、水で洗浄後乾燥して、黄褐色固体を 441 mg (収率 36%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz) δ 3.70 (s, 2H, $-\text{CH}_2\text{COOH}$), 5.17 (s, 2H, $-\text{OCH}_2\text{Ph}$), 6.95 (d, 1H, $J=7.4$ Hz, H-4), 7.02 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, H-6), 7.34-7.38 (m, 6H).

10-3-4-3 7-ヒドロキシオキシインドール (**1-iii**) の合成



Scheme 10-12 7-ヒドロキシオキシインドール (**1-iii**) の合成

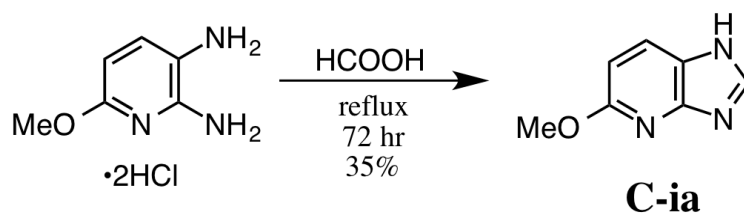
化合物 **1-iiic** (159 mg, 0.55 mmol) を氷酢酸 (10 mL) に溶解し、10%パラジウム活性炭 (15 mg) を加えた。風船により反応容器内を水素雰囲気とし、室温で26時間攪拌した。Celiteによりパラジウム活性炭を除去し、Celiteをエタノールで洗い込んだ。濾液を減圧下で濃縮し、黒緑色固体を得た。これを氷酢酸 (15 mL) に溶解し、活性炭を加えて加熱した。活性炭を熱時濾過し、透明な褐色溶液を得た。溶媒を減圧下で留去後、酢酸水溶液から再結晶し、黒色板状結晶を59 mg (収率41%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.49 (*s*, 2H, $-\text{CH}_2-$), 6.70-6.81 (*m*, 3H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 36.21, 114.31, 115.28, 122.49, 126.84, 130.38, 141.42, 178.23.

10-3-5 5-ヒドロキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-i**) の合成

10-3-5-1 5-メトキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-ia**) の合成



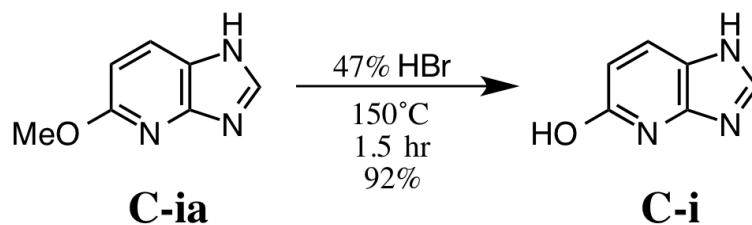
Scheme 10-13 5-メトキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-ia**) の合成

市販の 6-メトキシ-2,3-ジアミノピリジン二塩酸塩 (1.00 g, 4.7 mmol) をギ酸 (50 mL) に溶解し、130°C の油浴で 72 時間還流撹拌した。反応液を減圧下で濃縮後、アンモニア水溶液に溶解し、酢酸エチルで 5 回抽出した。得られた有機層を合わせて無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧留去し、白色粗生成物を得た。これを酢酸エチルから再結晶し、白色針状結晶を 243 mg (収率 35%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 3.93 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.70 (d, 1H, $J=8.8$ Hz, H-6), 7.85 (d, 1H, $J=8.6$ Hz, H-7), 8.11 (s, 1H, H-2).

M.p. 165.8~166.0°C

10-3-5-2 5-ヒドロキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-i**) の合成



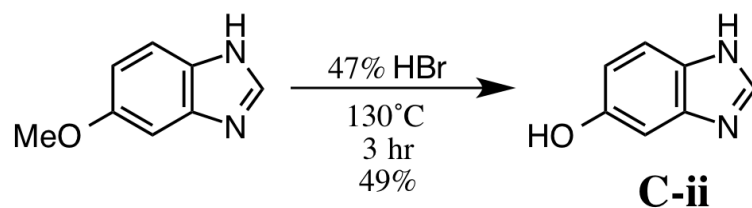
Scheme 10-14 5-ヒドロキシ-1*H*-イミダゾ[4,5-*b*]ピリジン (**C-i**) の合成

化合物 **C-ia** (100 mg, 0.67 mmol) を 47% 臭化水素酸 (0.5 mL) に溶解し、150°C の油浴で 1.5 時間攪拌した。溶媒を加熱留去し得た粗生成物についてクロロホルム/メタノール=10/1 の混合溶媒から再結晶し、灰白色板状結晶を 84 mg (収率 92%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 400 MHz) δ 6.86 (*d*, 1H, $J=9.0$ Hz, H-6), 8.04 (*d*, 1H, $J=9.0$ Hz, H-7), 9.01 (*s*, 1H, H-2).

M.p. 250.5~251.9°C

10-3-6 5-ヒドロキシベンズイミダゾール (C-ii) の合成



Scheme 10-15 5-ヒドロキシベンズイミダゾール (C-ii) の合成

市販の5-メトキシベンズイミダゾール (103 mg, 0.7 mmol) に47%臭化水素酸 (0.5 mL) を加えて溶解し、130 °C の油浴で3時間攪拌した。溶媒を加熱留去し、白色固体を得た。エタノール/メタノール=20/1 の混合溶媒で再結晶し、白色板状結晶を45 mg (収率49%) 得た。

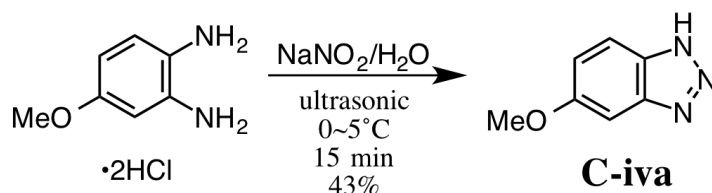
$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz) δ 7.03 (*dd*, 1H, $J=8.8, 2.2$ Hz, H-6), 7.08 (*dd*, 1H, $J=2.2$ Hz, H-4), 7.63 (*dd*, 1H, $J=8.8$ Hz, H-7), 9.29 (*s*, 1H, H-2), 10.01 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD $_3$ OD, 100 MHz) δ 99.34, 115.90, 118.09, 125.36, 133.20, 139.62, 158.57.

M.p. 223.1~225.0°C

10-3-7 5-ヒドロキシベンゾトリアゾール (C-iv) の合成

10-3-7-1 5-メトキシベンゾトリアゾール (C-iva) の合成



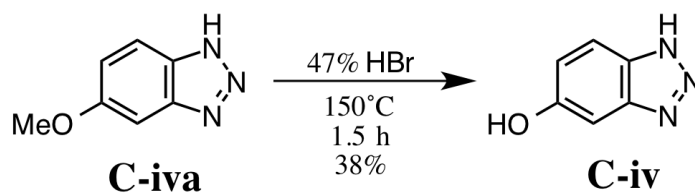
Scheme 10-16 5-メトキシベンゾトリアゾール (C-iva) の合成

市販の4-メトキシ-1,2-フェニレンジアミン二塩酸塩 (2.11 g, 10.0 mmol) を水 (50 mL) に溶解し、超音波洗浄機へ浸した。洗浄機の水温を5°C以下に保ちながら、亜硝酸ナトリウム (1.55 g, 22.0 mmol, 2.2 当量) を加え、超音波を15分間照射した。反応液をジクロロメタンで3回抽出し、有機層を合わせて飽和食塩水で1回洗浄後、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (酢酸エチル:n-ヘキサン=2:1) により精製して、褐色固体を641 mg (収率43%) 得た。

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.33 (*brs*, 1H, -NH-), 3.85 (*s*, 3H, -OCH₃), 7.02 (*dd*, 1H, *J*=9.0, 2.4 Hz, H-6), 7.20 (*d*, 1H, *J*=2.4 Hz, H-4), 7.84 (*d*, 1H, *J*=9.0 Hz, H-7).

M.p. 126.0~126.2°C

10-3-7-2 5-ヒドロキシベンゾトリアゾール (C-iv) の合成



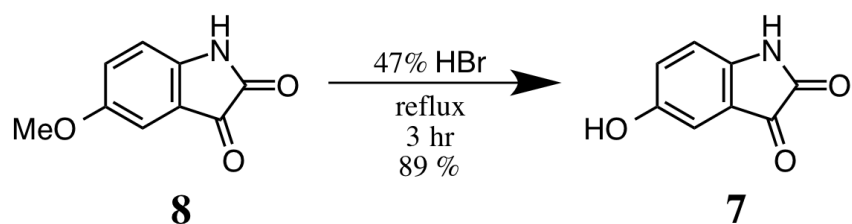
Scheme 10-17 5-ヒドロキシベンゾトリアゾール (C-iv) の合成

化合物 **C-iva** (100 mg, 0.67 mmol) を 47% 臭化水素酸 (0.5 mL) に溶解し、150°C の油浴で 1.5 時間攪拌した。反応終了後、反応液を水 (30 mL) で希釈し、クロロホルムで 3 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去後、粗生成物を 70 mg 得た。これを酢酸エチル:メタノール=10:1 の混合溶媒から再結晶し、淡緑色板状結晶を 35 mg (収率 38%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 6.90 (*dd*, 1H, $J=9.0, 2.2$ Hz, H-6), 6.95 (*d*, $J=2.2$ Hz, H-4), 7.77 (*d*, 1H, $J=9.0$ Hz, H-7), 9.85 (*brs*, 1H, -NH-).

M.p. 203.0~204.1°C

10-3-8 5-ヒドロキシイサチン (7) の合成

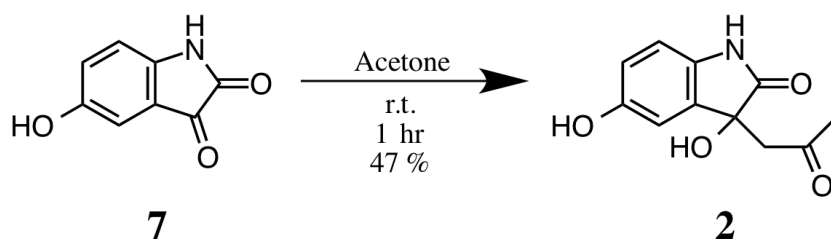


Scheme 10-18 5-ヒドロキシイサチン (7) の合成

市販の5-メトキシイサチン (**8**, 2.00 g, 11.2 mmol) を47%臭化水素酸 (20 mL) に溶解し、150°C の油浴中で還流攪拌した。3 時間後、反応液を室温に戻したのち水で希釈し、酢酸エチルで5回抽出した。有機層を合わせて無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を減圧下で留去して、黒褐色固体を1.64 g (粗収率 89%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 6.78 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.94 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.02 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6).

10-3-9 3-アセトニル-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (2) の合成



Scheme 10-19 化合物 2 の合成

化合物 7 (200 mg 1.22 mmol) をアセトン (20 mL) に溶解し、ジエチルアミン (446 mg, 5.2 当量) を加えて室温で 1 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1→2:3) で精製し、淡黄色固体を 127 mg (収率 47%) 得た。

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 2.08 (*s*, 3H, -COCH₃) 3.11 (*d*, 1H, *J*=16.5 Hz, -CH₂CO-), 3.28 (*d*, 1H, *J*=16.5 Hz, -CH₂CO-), 6.66 (*dd*, 1H, *J*=8.3, 2.4 Hz, H-6), 6.70 (*d*, 1H, *J*=8.3 Hz, H-7), 6.81 (*d*, 1H, *J*=2.4 Hz, H-4).

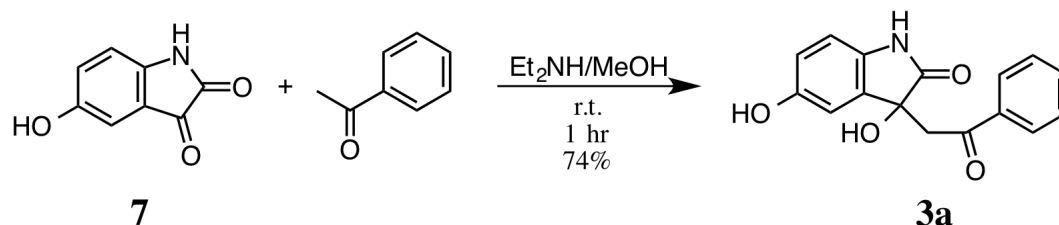
¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 30.78, 51.14, 75.26, 111.77, 112.87, 116.59, 133.38, 135.51, 154.49, 181.08, 207.42.

GC-FAB-HRMS: calcd. for C₁₆H₁₃NO₄ 221.0688, found 221.0670.

M.p. 164.8~166.9 °C (分解).

10-3-10 3,5-ジヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール誘導体 (3a~n) の合成

10-3-10-1 3,5-ジヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール (3a) の合成



Scheme 10-20 化合物 **3a** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、アセトフェノン (733 mg, 710 μL , 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、赤褐色固体を 255 mg (収率 74%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、赤褐色板状結晶を得た。

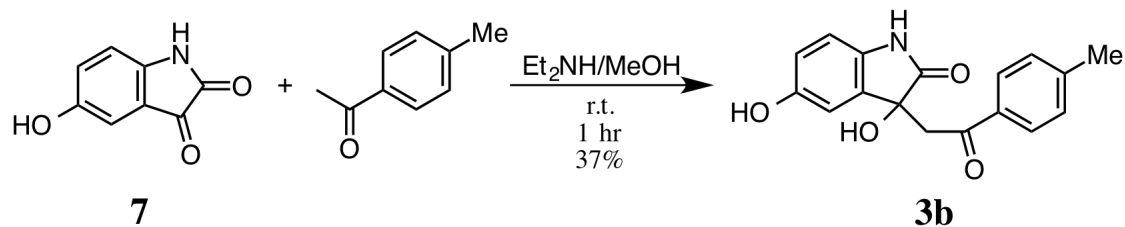
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.66 (*d*, 1H, $J=17.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.96 (*d*, 1H, $J=17.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.5$ Hz, H-6), 6.73 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.80 (*d*, 1H, $J=2.5$ Hz, H-4), 7.44-7.48 (*m*, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.56-7.60 (*m*, 1H, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.89-7.91 (*m*, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_5$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.73, 75.64, 111.75, 112.81, 116.52, 129.13, 129.73, 133.57, 134.55, 135.92, 137.96, 154.38, 181.34, 198.22.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ 283.0845, found 283.0872.

M.p. 194.5~196.2 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-2 3,5-ジヒドロキシ-3-(4'-メチルフェナシル)-2-オキシインドール (3b) の合成



Scheme 10-21 化合物 **3b** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-メチルアセトフェノン (818 mg, 810 μL , 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1→2:3) で精製し、淡橙色固体を135 mg (収率37%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡橙色板状結晶を得た。

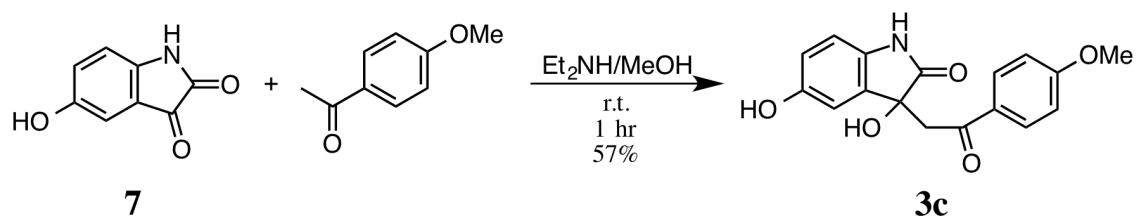
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 2.36 (*s*, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.62 (*d*, 1H, $J=17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.93 (*d*, 1H, $J=17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.73 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.79 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.26 (*d*, 2H, $J=7.9$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.79 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 21.58, 46.58, 75.66, 111.72, 112.78, 116.48, 129.28, 130.32, 133.60, 135.45, 135.89, 145.73, 154.33, 181.14, 197.88.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ 297.1001, found 297.0995.

M.p. 191.9~192.6 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-3 3,5-ジヒドロキシ-3-(4'-メトキシフェニル)-2-オキシインドール
(**3c**) の合成



Scheme 10-22 化合物 **3c** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-メトキシアセトフェノン (916 mg, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 225 mg (収率 57%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色針状結晶を得た。

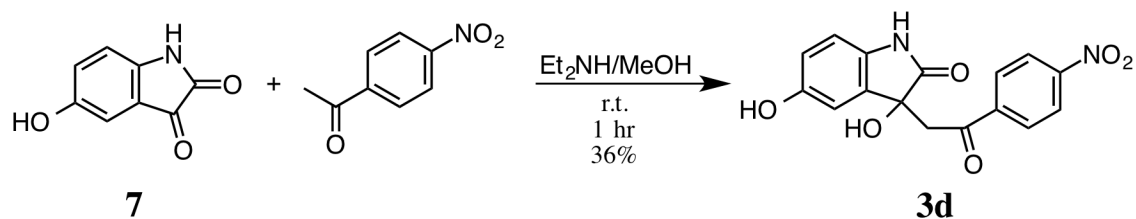
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.59 (*d*, 1H, $J=16.9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.90 (*d*, 1H, $J=16.9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.83 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.64 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.5$ Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.79 (*d*, 1H, $J=2.5$ Hz, H-4), 6.95-6.98 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$), 7.87-7.90 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{OCH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.32, 56.04, 75.75, 111.70, 112.82, 114.86, 116.46, 130.89, 131.57, 133.66, 135.88, 154.33, 165.51, 181.40, 196.88.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$ 313.0950, found 313.0946.

M.p. 187.5~188.6 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-4 3,5-ジヒドロキシ-3-(4'-ニトロフェナシル)-2-オキシインドール (**3d**)
の合成



Scheme 10-22 化合物 **3d** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-ニトロアセトフェノン (1.01 g, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μ L, 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、黄色固体を 142 mg (収率 36%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡黄色針状結晶を得た。

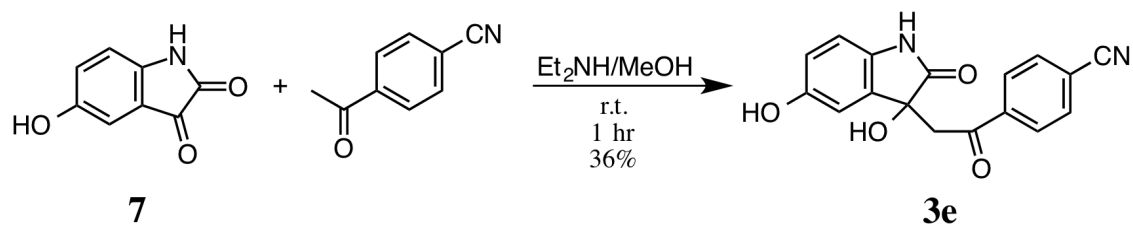
¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 3.67 (*d*, 1H, *J*=16.9 Hz, -CH₂CO-), 4.00 (*d*, 1H, *J*=16.9 Hz, -CH₂CO-), 6.65 (*dd*, 1H, *J*=8.3, 2.5 Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, *J*=8.3 Hz, H-7), 6.80 (*d*, 1H, *J*=2.5 Hz, H-4), 8.10-8.12 (*m*, 2H, C₆H₄NO₂), 8.29-8.31 (*m*, 2H, C₆H₄NO₂).

¹³C NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ 47.27, 75.61, 111.79, 112.98, 116.62, 124.73, 130.45, 133.25, 135.74, 142.49, 151.87, 154.44, 181.06, 196.84.

GC-FAB-HRMS: calcd. for C₁₆H₁₂N₂O₆ 328.0695, found 328.0720.

M.p. 161.2~163.0°C (分解).

10-3-10-5 3-(4'-シアノフェナシル)-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (**3e**)
の合成



Scheme 10-23 化合物 **3e** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4-アセチルベンズニトリル (885 mg, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μ L, 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 157 mg (収率 42%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、褐色針状結晶を得た。

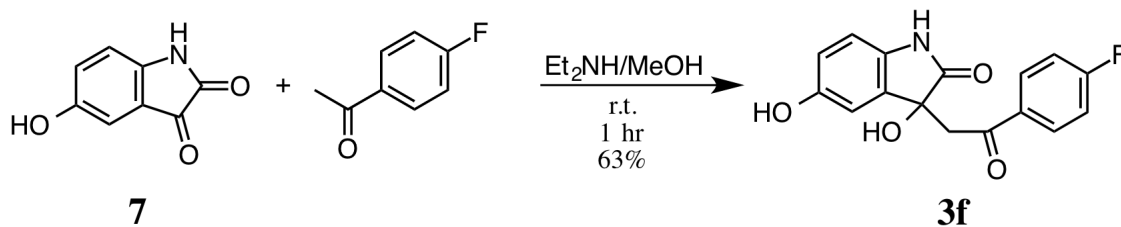
¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 3.64 (*d*, 1H, *J*=17.1 Hz, -CH₂CO-), 3.97 (*d*, 1H, *J*=16.9 Hz, -CH₂CO-), 6.64 (*dd*, 1H, *J*=8.3, 2.4 Hz, H-6), 6.71 (*d*, 1H, *J*=8.3 Hz, H-7), 6.79 (*d*, 1H, *J*=2.4 Hz, H-4), 7.83 (*d*, 2H, *J*=8.5 Hz, C₆H₄CN), 8.04 (*d*, 2H, *J*=8.5 Hz, C₆H₄CN).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ 46.04, 73.48, 109.80, 111.96, 114.76, 115.24, 118.12, 128.61, 132.43, 132.72, 134.36, 139.38, 152.28, 177.92, 196.02.

GC-FAB-HRMS: calcd. for C₁₇H₁₂N₂O₄ 308.0797, found 308.0805.

M.p. 130.0~131.2 °C (分解).

5-3-10-5 3-(4'-フルオロフェナシル)-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (**3f**)
の合成



Scheme 10-24 化合物 **3f** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-フルオロアセトフェノン (843 mg, 737 μL , 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1→2:3) で精製し、淡黄色固体を 230 mg (収率 63%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

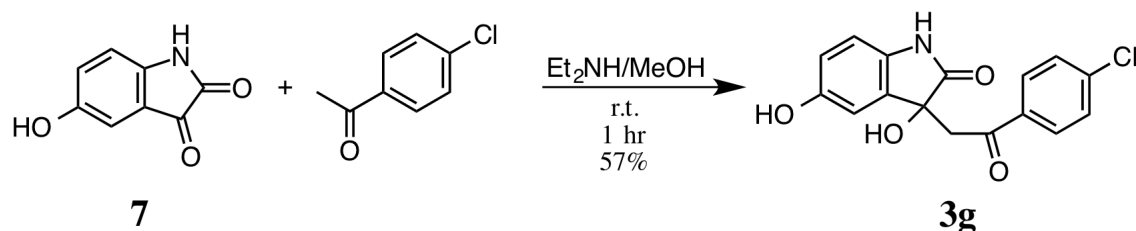
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.63 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.94 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.80 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.15-7.19 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$), 7.96-7.99 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{F}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.65, 75.65, 111.75, 112.86, 116.58, 132.11, 133.49, 134.57, 135.84, 154.36, 166.31, 168.33, 181.27, 196.62.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{FNO}_4$ 301.0750, found 301.0741.

M.p. 187.0~188.9 $^\circ\text{C}$ (分解).

5-3-10-6 3-(4'-クロロフェナシル)-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (**3g**)
の合成



Scheme 10-25 化合物 **3g** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-クロロアセトフェノン (943 mg, 789 μL , 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 219 mg (収率 57%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡褐色針状結晶を得た。

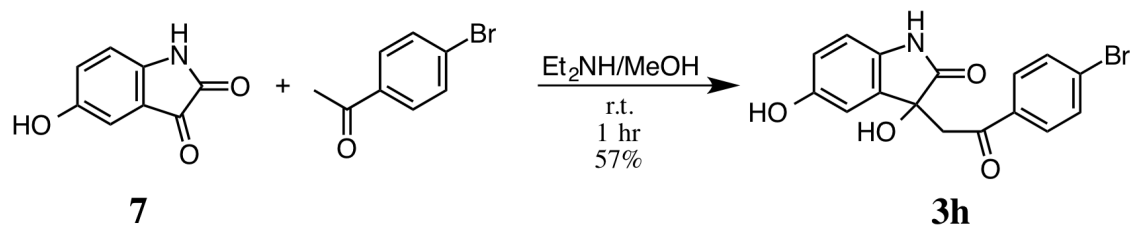
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.62 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.93 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, $J=8.4$ Hz, H-7), 6.80 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.45-7.48 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 7.87-7.90 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.72, 75.62, 111.75, 112.88, 116.56, 129.93, 130.85, 133.44, 135.83, 136.50, 140.78, 154.38, 181.23, 196.96.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClNO}_4$ 317.0455, found 317.0450.

M.p. 166.5~168.0 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-7 3-(4'-ブロモフェナシル)-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (**3h**)
の合成



Scheme 10-26 化合物 **3h** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-ブromoアセトフェノン (1.24 g, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 248 mg (収率 57%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡褐色針状結晶を得た。

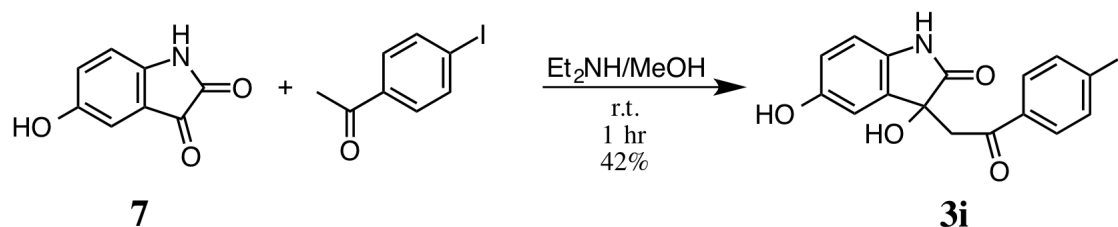
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.61 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.92 (*d*, 1H, $J=17.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.79 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.62-7.65 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$), 7.80-7.82 (*m*, 2H, $\text{C}_6\text{H}_4\text{Br}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.70, 75.62, 111.76, 112.88, 116.56, 129.42, 130.93, 133.00, 133.44, 135.83, 136.88, 154.39, 181.23, 197.16.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{BrNO}_4$ 360.9932, found 360.9950.

M.p. 190.5~192.1 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-8 3,5-ジヒドロキシ-3-(4'-ヨードフェナシル)-2-オキシインドール (**3i**)
の合成



Scheme 10-27 化合物 **3i** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-ヨードアセトフェノン (1.50 g, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 205 mg (収率 42%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡褐色針状結晶を得た。

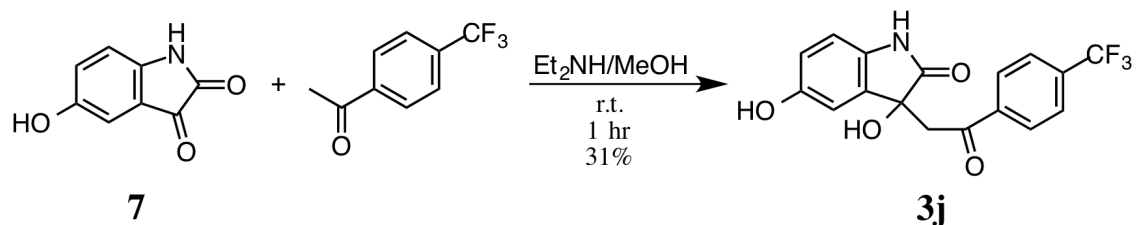
$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz) δ 3.60 (*d*, 1H, $J=17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.91 (*d*, 1H, $J=17.1$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.65 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.72 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.79 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.64 (*d*, 2H, $J=8.6$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_4\text{I}$), 7.95 (*d*, 2H, $J=8.6$ Hz, $\text{C}_6\text{H}_4\text{I}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 46.63, 75.60, 102.10, 111.75, 112.87, 116.55, 130.63, 133.44, 135.83, 137.31, 139.16, 154.38, 181.23, 197.49.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{INO}_4$ 408.9831, found 408.9811.

M.p. 184.6 \sim 185.5 $^\circ\text{C}$ (分解).

10-3-10-9 3,5-ジヒドロキシ-3-[4'-(トリフルオロメチル)フェナシル]-2-オキシインドール (**3j**) の合成



Scheme 10-28 化合物 **3i** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-(トリフルオロメチル)アセトフェノン (1.15 g, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μ L, 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 131 mg (収率 31%) 得た。酢酸エチルと *n*-ヘキサンの混合溶媒から再結晶し、淡褐色針状結晶を得た。

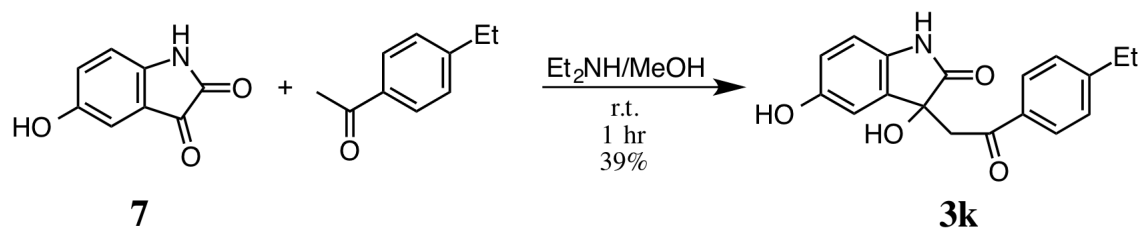
¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz) δ 3.68 (*d*, 1H, *J*=17.1 Hz, -CH₂CO-), 3.99 (*d*, 1H, *J*=17.1 Hz, -CH₂CO-), 6.65 (*dd*, 1H, *J*=8.3, 2.4 Hz, H-6), 6.73 (*d*, 1H, *J*=8.6 Hz, H-7), 6.81 (*d*, 1H, *J*=2.4 Hz, H-4), 7.77 (*d*, 2H, *J*=8.3 Hz, C₆H₄CF₃), 8.07 (*d*, 2H, *J*=8.3 Hz, C₆H₄CF₃).

¹³C NMR (tetrahydrofuran-*d*₈, 125 MHz) δ 46.85, 74.71, 111.24, 113.09, 115.64, 126.17, 129.63, 133.62, 134.27, 134.53, 135.80, 141.24, 153.85, 178.74, 196.24.

GC-FAB-HRMS: calcd. for C₁₇H₁₂F₃NO₄ 351.0718, found 351.0725.

M.p. 174.4~175.8 °C (分解).

10-3-10-10 4'-エチルフェナシル-3,5-ジヒドロキシ-2-オキシインドール (**3k**)
の合成



Scheme 10-29 化合物 **3k** の合成

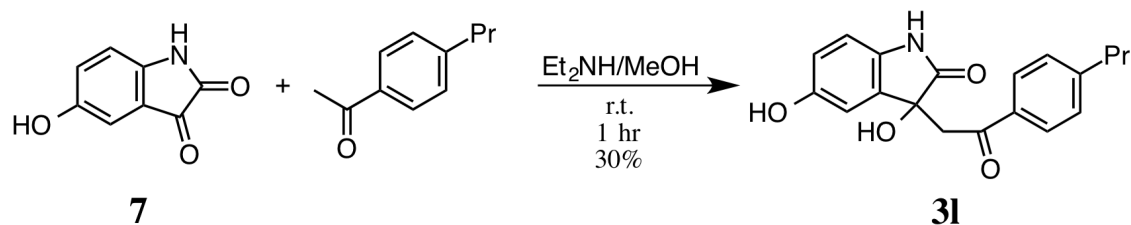
化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-エチルアセトフェノン (904 mg, 910 μL , 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1→2:3) で精製し、淡黄色固体を150 mg (収率39%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ 1.18 (*t*, 3H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.66 (*q*, 2H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.47 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.92 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.55 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.60 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.71 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.33 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 7.81 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 8.85 (*s*, 1H), 9.95 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ 15.11, 28.11, 45.56, 73.42, 109.64, 111.75, 141.54, 128.02, 128.09, 132.77, 134.07, 134.55, 149.72, 152.17, 178.13, 195.84.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ 311.1158, found 311.1123.

10-3-10-11 3,5-ジヒドロキシ-4'-プロピルフェナシル-2-オキシインドール (31) の合成



Scheme 10-30 化合物 **31** の合成

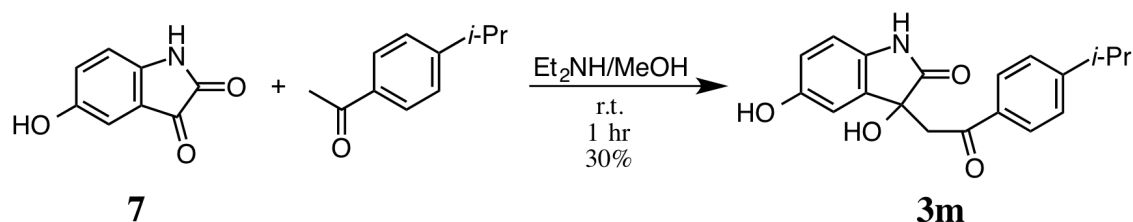
化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-プロピルアセトフェノン (989 mg, 1.01 mL, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 120 mg (収率 30%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、褐色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 0.88 (*d*, 6H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59 (*ttq*, 1H, $J=7.5, 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.61 (*t*, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.47 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.92 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 5.96 (*s*, 1H), 6.54 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.59 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.71 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.31 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 7.80 (*d*, 2H, $J=8.0$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 8.85 (*s*, 1H), 9.95 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ 13.51, 23.64, 37.06, 45.56, 73.41, 109.63, 111.75, 114.54, 127.99, 128.59, 132.78, 134.08, 134.56, 148.14, 152.18, 178.14, 195.84.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ 325.1314, found 325.1339.

10-3-10-12 3,5-ジヒドロキシ-4'-イソプロピルフェナシル-2-オキシインドール
(**3m**) の合成



Scheme 10-31 化合物 **3m** の合成

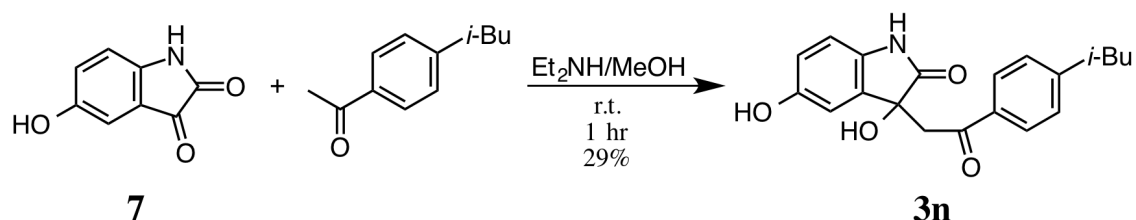
化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-プロピルアセトフェノン (989 mg, 1.02 mL, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μL , 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 119 mg (収率 30%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 1.20 (*d*, 6H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.94 (*sept*, 1H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.47 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.92 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 5.96 (*s*, 1H), 6.54 (*dd*, 1H, $J=8.2, 2.4$ Hz, H-6), 6.59 (*d*, 1H, $J=8.2$ Hz, H-7), 6.70 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.36 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ -*i*-Pr), 7.82 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ -*i*-Pr), 8.85 (*s*, 1H), 9.95 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ 23.43, 33.66, 45.51, 73.42, 109.65, 111.72, 114.55, 126.60, 128.14, 132.78, 134.23, 134.57, 152.18, 154.21, 178.14, 195.84.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ 325.1314, found 325.1297.

10-3-10-13 3,5-ジヒドロキシ-4'-イソブチルフェナシル-2-オキシインドール
(**3n**) の合成



Scheme 10-33 化合物 **3n** の合成

化合物 **7** (200 mg 1.22 mmol) をメタノール (20 mL) に溶解し、4'-イソブチルアセトフェノン (1.08 g, 1.13 mL, 6.10 mmol, 5.0 当量)、ジエチルアミン (446 mg, 630 μ L, 6.45 mmol, 5.2 当量) をそれぞれ加えて室温で1時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=2:1 \rightarrow 2:3) で精製し、淡黄色固体を 120 mg (収率 29%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 0.85 (*d*, 6H, *J*=6.6 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂) 1.82-1.89 (*m*, 1H, -CH₂CH(CH₃)₂), 2.50 (*d*, 2H, *J*=6.9 Hz, -CH₂CH(CH₃)₂), 3.48 (*d*, 1H, *J*=17.4 Hz, -CH₂CO-), 3.93 (*d*, 1H, *J*=17.4 Hz, -CH₂CO-), 5.96 (*s*, 1H), 6.55 (*dd*, 1H, *J*=8.3, 2.4 Hz, H-6), 6.59 (*d*, 1H, *J*=8.3 Hz, H-7), 6.71 (*d*, 1H, *J*=2.4 Hz, H-4), 7.28 (*d*, 2H, *J*=8.3 Hz, -C₆H₄*i*-Bu), 7.81 (*d*, 2H, *J*=8.3 Hz, -C₆H₄*i*-Bu), 8.85 (*s*, 1H), 9.95 (*s*, 1H).

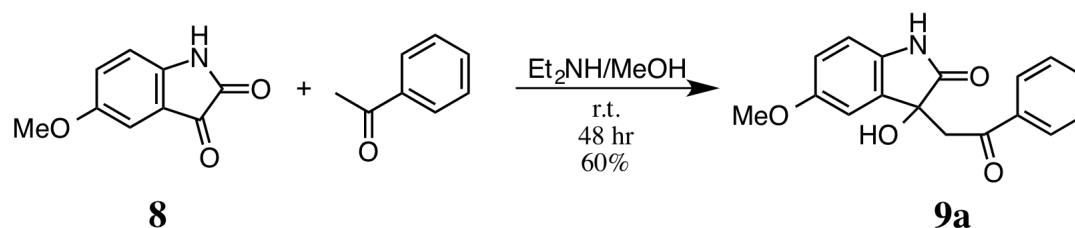
¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 22.06, 29.42, 44.35, 45.57, 73.40, 109.63, 111.77, 114.52, 127.86, 129.18, 132.79, 134.09, 134.56, 147.17, 152.17, 178.14, 195.85.

GC-FAB-HRMS: calcd. for C₂₀H₂₁NO₄ 339.1471, found 339.1468.

10-3-11 5-ヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール誘導体 (4a~e) の合成

10-3-11-1 5-ヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール (4a) の合成

10-3-11-1-1 3-ヒドロキシ-5-メトキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール (9a) の合成



Scheme 10-34 化合物 9a の合成

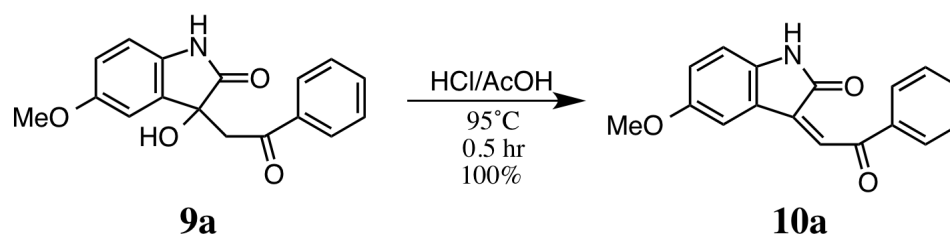
市販の **8** (1.00 g, 5.65 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、アセトフェノン (1.63 g, 1.58 mL, 13.6 mmol, 2.4 当量)、ジエチルアミン (2.11 g, 2.97 mL, 30.5 mmol, 5.4 当量) をそれぞれ加え、室温で 48 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:2→2:3→2:3) で精製し、黄褐色固体を 993 mg (収率 60%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 3.53 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.74 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.80 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.78 (*dd*, 1H, $J=8.4, 2.4$ Hz, H-6), 6.81 (*d*, 1H, $J=8.4$ Hz, H-7), 7.01 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.45 (*dd*, 1H, $J=8.1, 7.6$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.58 (*dd*, 1H, $J=7.5, 7.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_5$), 7.80 (*brs*, 1H), 7.91 (*d*, 2H, $J=7.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_5$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ 44.54, 55.53, 75.55, 110.98, 111.63, 114.85, 128.38, 128.90, 131.74, 133.92, 134.09, 136.50, 156.33, 177.98, 198.61.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ 297.1001, found 297.0984.

10-3-11-1-2 5-メトキシ-3-フェナシリデン-2-オキシインドール (**10a**) の合成



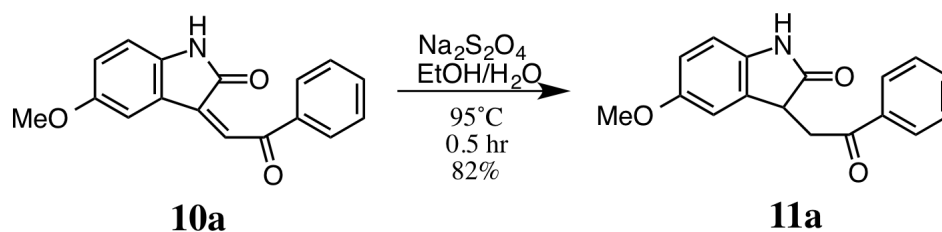
Scheme 10-35 化合物 **10a** の合成

化合物 **9a** (600 mg, 2.02 mmol) を氷酢酸/濃塩酸=34/1 の混液 (35 mL) に溶解し、95°C の油浴中で 30 分間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、水 (70 mL) を加えて希釈し、酢酸エチルで二回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、暗紫色固体を 564 mg (収率 100 %) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 3.80 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.79 (*d*, 1H, $J=8.4$ Hz, H-7), 6.90 (*dd*, 1H, $J=8.4, 2.6$ Hz, H-6), 7.53 (*dd*, 2H, $J=7.9, 7.6$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 7.63 (*dd*, 1H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 7.86 (*s*, 1H, $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-$), 8.00 (*d*, 1H, $J=2.6$ Hz, H-4), 8.11 (*dd*, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 8.25 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ 56.03, 110.75, 113.45, 119.41, 121.50, 126.59, 128.96, 129.07, 133.97, 137.31, 137.52, 137.84, 155.82, 169.70, 191.20.

10-3-11-1-3 5-メトキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール (**11a**) の合成



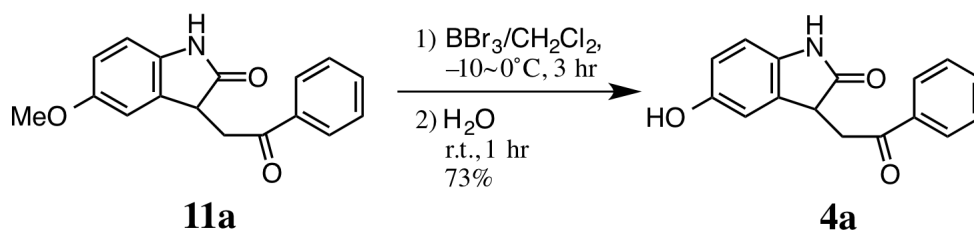
Scheme 10-36 化合物 **11a** の合成

化合物 **10a** (400 mg, 1.43 mmol) にエタノール (20 mL) を加え 95°C の油浴中で還流攪拌して溶解した。そこへ 10 w/v% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて、 95°C の油浴中で 30 分間還流攪拌した。反応液を室温まで放冷し、エタノールを減圧下で濃縮した後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を 331 mg (収率 82%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 3.46 (*dd*, 1H, $J=18.2, 9.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.73 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.82 (*dd*, 1H, $J=18.2, 3.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 4.08 (*d*, 1H, $J=9.0, 3.0$ Hz, H-3), 6.74 (*dd*, 1H, $J=8.5, 2.4$ Hz, H-6), 6.80 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.86 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.47 (*dd*, 2H, $J=8.1, 7.4$ Hz, $-\text{CO}-\text{Ph}$), 7.59 (*dd*, 1H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CO}-\text{Ph}$), 7.84 (*brs*, 1H), 7.99 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{CO}-\text{Ph}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 40.09, 42.12, 55.93, 109.95, 112.12, 112.83, 128.31, 128.86, 131.19, 133.66, 134.81, 155.97, 179.53, 196.96.

10-3-11-1-4 5-ヒドロキシ-3-フェナシル-2-オキシインドール (**4a**) の合成



Scheme 10-37 化合物 **4a** の合成

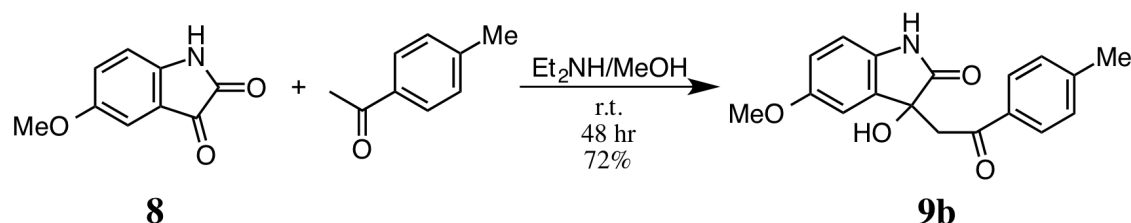
化合物 **11a** (200 mg, 0.71 mmol) をジクロロメタン (20 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解し、食塩を添加した氷水浴中で $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の温度範囲に保ちながら攪拌した。そこへ三臭化ホウ素 (1M ジクロロメタン溶液) を 4 mL (三臭化ホウ素として 1.00g, 4 mmol、5.63 当量) 加え、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で3時間攪拌した。次いで、水 (20 mL) を加えて室温で1時間攪拌した。減圧下でジクロロメタンを留去後、水層を酢酸エチルで2回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチルグラジエント) により精製し、淡黄色固体を 138 mg (収率 73%) 得た。トルエンから再結晶し、淡黄色針状結晶を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 3.51 (*dd*, 1H, $J=18.4, 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.74 (*dd*, 1H, $J=18.4, 3.8$ Hz $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.78 (*dd*, 1H, $J=7.4, 3.8$ Hz, H-3), 6.54 (*dd*, 1H, $J=8.2, 2.2$ Hz, H-6), 6.63-6.64 (*m*, 2H, H-4 and H-7), 7.54 (*dd*, 2H, $J=8.0, 7.7$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 7.66 (*dd*, 1H, $J=7.5, 7.0$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 8.00 (*dd*, 2H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CO-Ph}$), 8.84 (*s*, 1H), 10.15 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 38.72, 41.62, 110.01, 111.87, 113.36, 128.00, 128.74, 130.98, 133.42, 134.67, 136.18, 152.21, 178.40, 197.38.

10-3-11-2 5-ヒドロキシ-3-(4'-メチルフェナシル)-2-オキシインドール (**4b**) の合成

10-3-11-2-1 3-ヒドロキシ-5-メトキシ-3-(4'-メチルフェナシル)-2-オキシインドール (**9b**) の合成



Scheme 10-38 化合物 **9b** の合成

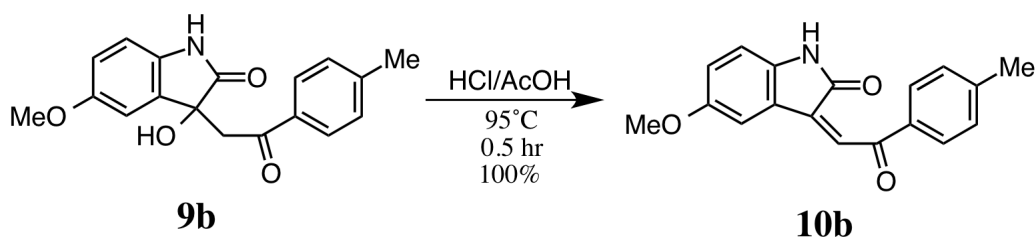
市販の **8** (1.00 g, 5.65 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、4'-メチルアセトフェノン (1.82 g, 1.82 mL, 13.6 mmol, 2.4 当量)、ジエチルアミン (2.11 g, 2.97 mL, 30.5 mmol, 5.4 当量) をそれぞれ加え、室温で 48 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:2→2:3→2:3) で精製し、黄褐色固体を 1.26 g (収率 72%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) δ 2.39 (*s*, 3H, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 3.48 (*d*, 1H, $J=17.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.72 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.76 (*d*, 1H, $J=17.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.77 (*dd*, 1H, $J=8.5$, 2.5 Hz, H-6), 6.80 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 7.06 (*d*, 1H, $J=2.5$ Hz, H-4), 7.24 (*d*, 2H, $J=7.9$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.80 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 21.86, 44.25, 55.92, 75.45, 111.01, 111.60, 114.79, 128.51, 129.57, 131.89, 133.94, 134.08, 145.12, 156.29, 178.22, 198.36.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_4$ 311.1158, found 311.1134.

10-3-11-2-2 5-メトキシ-3-(4'-メチルフェナシリデン)-2-オキシインドール
(**10b**) の合成



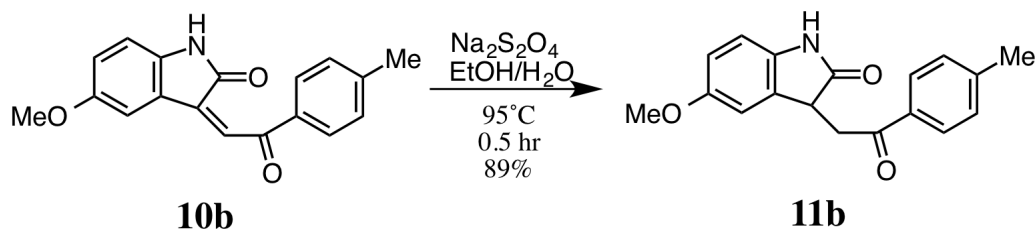
Scheme 10-39 化合物 **10b** の合成

化合物 **9b** (600 mg, 1.93 mmol) を氷酢酸/濃塩酸=34/1 の混液 (35 mL) に溶解し、95°C の油浴中で 30 分間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、水 (70 mL) を加えて希釈し、酢酸エチルで二回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、暗褐色固体を 565 mg (収率 100 %) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 2.44 (s, 3H, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 3.81 (s, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.79 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.74 (d, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.89 (dd, 1H, $J=8.5, 2.8$ Hz, H-6), 7.33 (d, 2H, $J=7.8$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.85 (s, 1H, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.99 (d, 1H, $J=2.8$ Hz, H-4), 8.01 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 21.96, 56.05, 110.55, 113.42, 119.25, 121.60, 127.06, 129.13, 129.78, 135.39, 136.96, 137.00, 145.10, 155.82, 169.37, 190.81.

10-3-11-2-3 5-メトキシ-3-(4'-メチルフェナシル)-2-オキシインドール (**10b**)
の合成



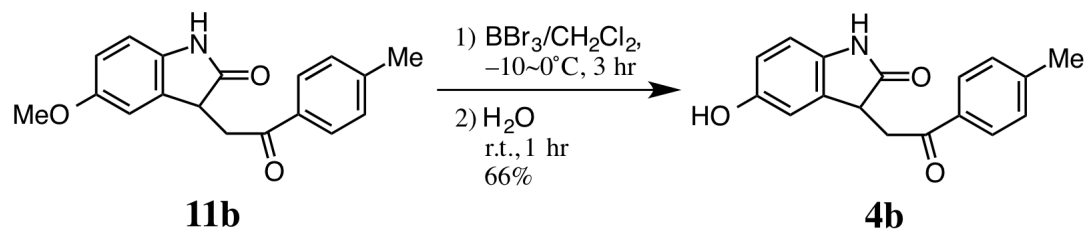
Scheme 10-40 化合物 **11b** の合成

化合物 **10b** (400 mg, 1.36 mmol) にエタノール (20 mL) を加え 95°C の油浴中で還流攪拌して溶解した。そこへ 10 w/v% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて、 95°C の油浴中で 30 分間還流攪拌した。反応液を室温まで放冷し、エタノールを減圧下で濃縮した後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を 360 mg (収率 89%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 2.41 (s, 3H, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 3.43 (dd, 1H, $J=18.1, 9.0\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.89 (dd, 1H, $J=18.1, 3.0\text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 4.07 (d, 1H, $J=9.0, 3.0\text{ Hz}$, H-3), 6.73 (dd, 1H, $J=8.4, 2.5\text{ Hz}$, H-6), 6.80 (d, 1H, $J=8.4\text{ Hz}$, H-7), 6.85 (d, 1H, $J=1.9\text{ Hz}$, H-4), 7.27 (d, 2H, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.82 (brs, 1H), 7.88 (d, 2H, $J=8.2\text{ Hz}$, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 21.83, 39.97, 42.16, 55.92, 109.91, 112.11, 112.82, 128.43, 129.53, 131.29, 134.01, 133.79, 144.52, 155.94, 179.63, 196.54.

10-3-11-2-4 5-ヒドロキシ-3-(4'-メチルフェナシル)-2-オキシインドール (4b) の合成



Scheme 10-41 化合物 **4b** の合成

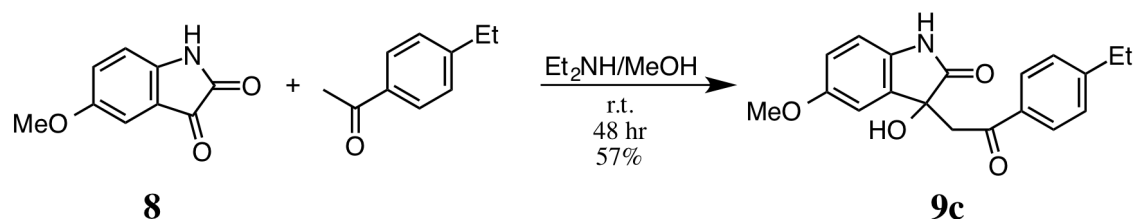
化合物 **11b** (200 mg, 0.68 mmol) をジクロロメタン (20 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解し、食塩を添加した氷水浴中で $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の温度範囲に保ちながら攪拌した。そこへ三臭化ホウ素 (1M ジクロロメタン溶液) を 4 mL (三臭化ホウ素として 1.00g, 4 mmol, 5.63 当量) 加え、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で3時間攪拌した。次いで、水 (20 mL) を加えて室温で1時間攪拌した。減圧下でジクロロメタンを留去後、水層を酢酸エチルで2回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で2回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチルグラジエント) により精製し、淡黄色固体を 127 mg (収率 66%) 得た。トルエンから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 2.38 (s, 3H, $-\text{CH}_3$), 3.45 (dd, 1H, $J=18.1, 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.69 (dd, 1H, $J=18.1, 3.5$ Hz $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.77 (dd, 1H, $J=7.7, 3.5$ Hz, H-3), 6.54 (dd, 1H, $J=8.3, 2.4$ Hz, H-6), 6.61-6.63 (m, 2H, H-4 and H-7), 7.37 (d, 2H, $J=8.0$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.90 (d, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 8.84 (s, 1H), 10.14 (s, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 21.13, 38.62, 41.64, 109.39, 111.86, 113.35, 128.12, 129.26, 131.00, 133.76, 134.65, 143.82, 152.21, 178.43, 196.84.

10-3-11-3 3-(4'-エチルフェナシル)-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (4c) の合成

10-3-11-3-1 3-(4'-エチルフェナシル)-3-ヒドロキシ-5-メトキシ-2-オキシインドール (9c) の合成



Scheme 10-42 化合物 **9c** の合成

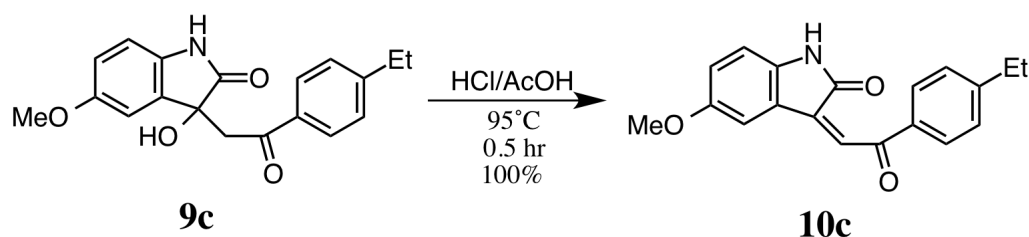
市販の **8** (1.00 g, 5.65 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、4'-エチルアセトフェノン (2.02 g, 2.03 mL, 13.6 mmol, 2.4 当量)、ジエチルアミン (2.11 g, 2.97 mL, 30.5 mmol, 5.4 当量) をそれぞれ加え、室温で 48 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:2→2:3→2:3) で精製し、黄褐色固体を 1.03 g (収率 57%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ 1.17 (*t*, 3H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.65 (*q*, 2H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.53 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.94 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.02 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.71-6.72 (*m*, 2H, H-6 and H-7), 6.71 (*d*, 1H, $J=2.3$ Hz, H-4), 7.33 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 7.81 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 8.85 (*s*, 1H), 10.07 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ 15.12, 28.11, 45.89, 55.33, 73.41, 109.56, 110.90, 113.24, 128.01, 128.10, 132.97, 134.03, 136.09, 149.75, 154.52, 178.22, 195.89.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_4$ 325.1314, found 325.1313.

10-3-11-3-2 3-(4'-エチルフェナシリデン)-5-メトキシ-2-オキシインドール
(10c) の合成



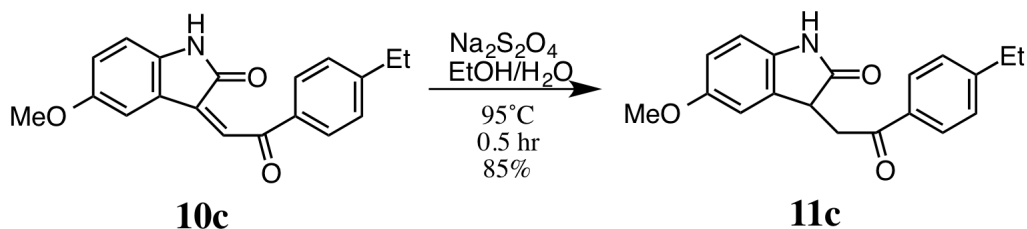
Scheme 10-43 化合物 10c の合成

化合物 **9c** (600 mg, 1.84 mmol) を氷酢酸/濃塩酸=34/1 の混液 (35 mL) に溶解し、95°C の油浴中で 30 分間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、水 (70 mL) を加えて希釈し、酢酸エチルで二回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、暗褐色固体を 566 mg (収率 100 %) 得た。

¹H NMR (CDCl₃, 600 MHz) δ 1.28 (t, 3H, J=7.6 Hz, -CH₂CH₃), 2.74 (q, 2H, J=7.6 Hz, -CH₂CH₃), 3.79 (s, 3H, -OCH₃), 6.79 (d, 1H, J=8.4 Hz, H-7), 6.88 (dd, 2H, J=8.4, 2.6 Hz, H-6), 7.35 (d, 2H, J=8.4 Hz, -C₆H₄Et), 7.85 (s, 1H, -C=CH-), 7.96 (d, 1H, J=2.6 Hz, H-4), 8.04 (d, 2H, J=8.4 Hz, -C₆H₄Et), 8.51 (s, 1H).

¹³C NMR (CDCl₃, 150 MHz) δ 15.27, 29.21, 56.01, 110.78, 113.35, 119.19, 121.53, 127.06, 127.58, 129.23, 135.57, 137.17, 137.30, 151.23, 155.77, 169.96, 190.84.

10-3-11-3-3 3-(4'-エチルフェナシル)-5-メトキシ-2-オキシインドール (**10c**) の合成



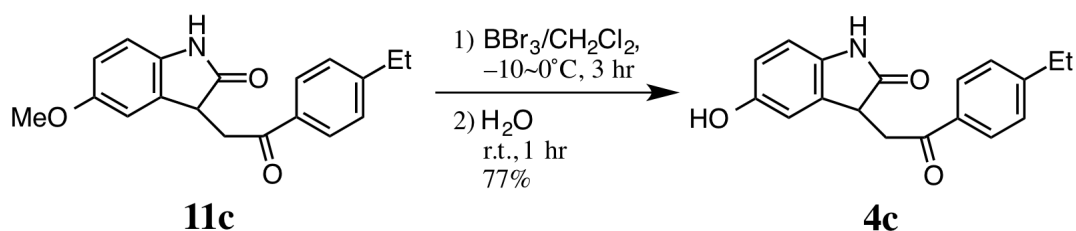
Scheme 10-44 化合物 **11c** の合成

化合物 **10c** (400 mg, 1.30 mmol) にエタノール (20 mL) を加え 95°C の油浴中で還流攪拌して溶解した。そこへ 10 w/v% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて、 95°C の油浴中で 30 分間還流攪拌した。反応液を室温まで放冷し、エタノールを減圧下で濃縮した後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を 342 mg (収率 85%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 1.26 (*d*, 3H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.97 (*q*, 2H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.43 (*dd*, 1H, $J=18.1, 9.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.71 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.80 (*dd*, 1H, $J=18.1, 3.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 4.08 (*d*, 1H, $J=9.0, 3.0$ Hz, H-3), 6.73 (*dd*, 1H, $J=8.5, 2.5$ Hz, H-6), 6.81 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.85 (*d*, 1H, $J=2.0$ Hz, H-4), 7.29 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 7.91 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 8.37 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 15.31, 29.12, 39.99, 42.24, 55.91, 110.05, 112.04, 112.84, 128.34, 128.54, 131.30, 134.23, 134.96, 150.68, 155.91, 180.04, 196.60.

10-3-11-3-4 3-(4'-エチルフェナシル)-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (**4c**) の合成



Scheme 10-45 化合物 **4c** の合成

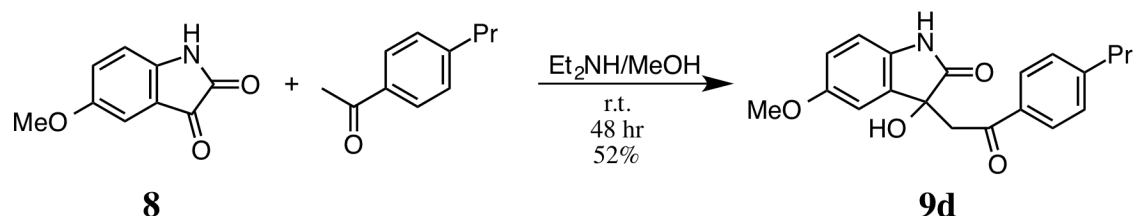
化合物 **11c** (200 mg, 0.65 mmol) をジクロロメタン (20 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解し、食塩を添加した氷水浴中で $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の温度範囲に保ちながら攪拌した。そこへ三臭化ホウ素 (1M ジクロロメタン溶液) を 4 mL (三臭化ホウ素として 1.00 g, 4 mmol, 5.63 当量) 加え、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で 3 時間攪拌した。次いで、水 (20 mL) を加えて室温で 1 時間攪拌した。減圧下でジクロロメタンを留去後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチルグラジエント) により精製し、淡黄色固体を 147 mg (収率 77%) 得た。トルエンから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 1.20 (*t*, 3H, $J=7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.68 (*q*, 2H, $J=7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$) 3.45 (*dd*, 1H, $J=18.1, 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.69 (*dd*, 1H, $J=18.1, 3.9$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.77 (*dd*, 1H, $J=7.7, 3.9$ Hz, H-3), 6.54 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.2$ Hz, H-6), 6.61-6.63 (*m*, 2H, H-4 and H-7), 7.37 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 7.92 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Et}$), 8.83 (*s*, 1H), 10.14 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 15.19, 28.13, 38.63, 41.62, 109.39, 111.84, 113.33, 128.10, 128.21, 131.01, 134.00, 134.63, 149.84, 152.19, 178.41, 196.87.

10-3-11-4 5-ヒドロキシ-3-(4'-プロピルフェナシル)-2-オキシインドール (**4d**)
の合成

10-3-11-4-1 3-ヒドロキシ-5-メトキシ-3-(4'-プロピルフェナシル)-2-オキシイン
ドール (**9d**) の合成



Scheme 10-44 化合物 **9d** の合成

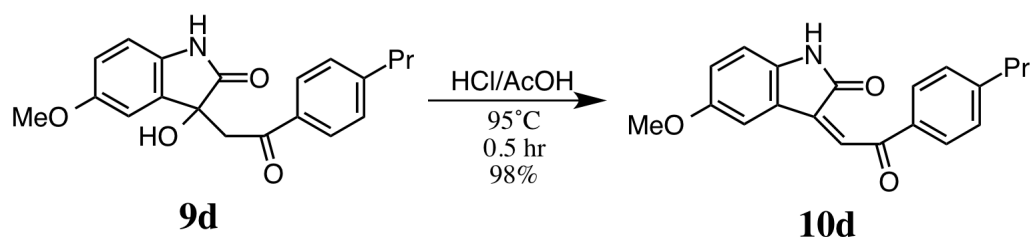
市販の **8** (1.00 g, 5.65 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、4'-プロピルアセトフェノン (2.21 g, 2.25 mL, 13.6 mmol, 2.4 当量)、ジエチルアミン (2.11 g, 2.97 mL, 30.5 mmol, 5.4 当量) をそれぞれ加え、室温で 48 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル=1:2 → 2:3 → 2:3) で精製し、黄褐色固体を 1.03 g (収率 52%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) δ 0.87 (*t*, 3H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.59 (*tq*, 2H, $J=7.5, 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.60 (*t*, 2H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.53 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.63 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.03 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 6.69-6.71 (*m*, 2H, H-6 and H-7), 6.94 (*d*, 1H, $J=2.1$ Hz, H-4), 7.31 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 7.80 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 10.06 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 150 MHz) δ 13.49, 23.64, 37.01, 45.58, 55.33, 73.41, 109.55, 110.90, 113.23, 128.00, 128.58, 132.96, 134.04, 136.09, 148.15, 154.51, 178.22, 195.89.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ 339.1471, found 339.1448.

10-3-11-4-2 5-メトキシ-3-(4'-プロピルフェナシリデン)-2-オキシインドール
(**10d**) の合成



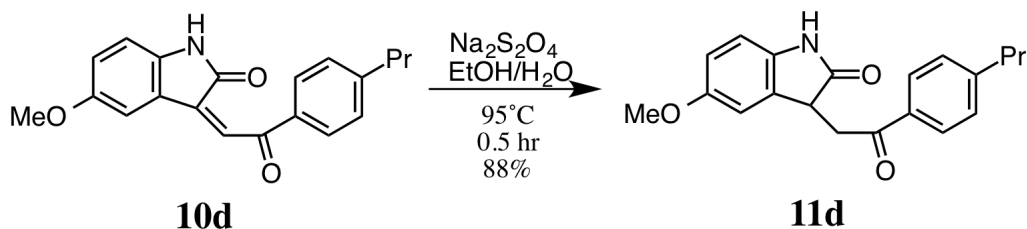
Scheme 10-45 化合物 **10d** の合成

化合物 **9d** (600 mg, 1.77 mmol) を氷酢酸/濃塩酸=34/1 の混液 (35 mL) に溶解し、95°C の油浴中で 30 分間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、水 (70 mL) を加えて希釈し、酢酸エチルで二回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、暗褐色固体を 557 mg (収率 98%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 0.96 (*t*, 3H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.68 (*tq*, 2H, $J=7.5, 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.44 (*t*, 2H, $J=7.5$ Hz $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.78 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.79 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.87, (*dd*, 1H, $J=8.5, 2.7$ Hz, H-6), 7.32 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 7.85 (*s*, 1H, $-\text{C}=\text{CH}-$) 7.96 (*d*, 1H, $J=2.7$ Hz, H-4), 8.03 (*d*, 2H, $J=8.3$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{CH}_3$), 8.80 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 13.88, 24.31, 38.26, 55.98, 110.84, 113.33, 119.16, 121.50, 127.00, 129.12, 129.15, 135.58, 137.25, 137.40, 149.72, 155.74, 170.13, 190.83.

10-3-11-4-3 5-メトキシ-3-(4'-プロピルフェナシル)-2-オキシインドール (**10d**)
の合成



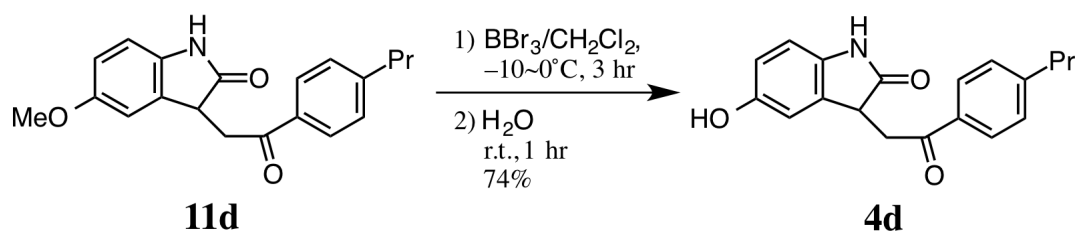
Scheme 10-46 化合物 **11d** の合成

化合物 **10d** (400 mg, 1.24 mmol) にエタノール (20 mL) を加え 95°C の油浴中で還流攪拌して溶解した。そこへ 10w/v% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて、95°C の油浴中で 30 分間還流攪拌した。反応液を室温まで放冷し、エタノールを減圧下で濃縮した後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を 356 mg (収率 88%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 0.95 (*d*, 3H, $J=7.3$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.66 (*tq*, 2H, $J=7.5$, 7.3 Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.64 (*t*, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.43 (*dd*, 1H, $J=18.2$, 9.0 Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.72 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.80 (*dd*, 1H, $J=18.2$, 3.0 Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 4.08 (*d*, 1H, $J=9.0$, 3.0 Hz, H-3), 6.73 (*dd*, 1H, $J=8.5$, 2.6 Hz, H-6), 6.80 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.85 (*d*, 1H, $J=2.0$ Hz, H-4), 7.26 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 7.91 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 8.10 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) δ 13.88, 24.33, 38.19, 39.99, 42.21, 55.92, 109.98, 112.07, 112.83, 128.45, 128.94, 131.30, 134.24, 134.88, 149.18, 155.93, 179.84, 196.60.

10-3-11-4-4 5-ヒドロキシ-3-(4'-プロピルフェナシル)-2-オキシインドール (**4d**)
の合成



Scheme 10-47 化合物 **4d** の合成

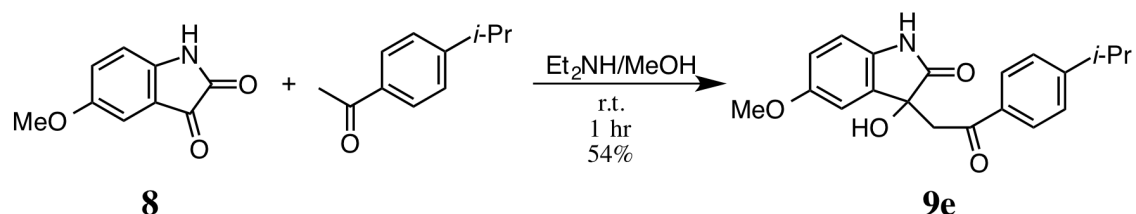
化合物 **11d** (200 mg, 0.62 mmol) をジクロロメタン (20 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解し、食塩を添加した氷水浴中で $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の温度範囲に保ちながら攪拌した。そこへ三臭化ホウ素 (1M ジクロロメタン溶液) を 4 mL (三臭化ホウ素として 1.00 g, 4 mmol, 5.63 当量) 加え、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で 3 時間攪拌した。次いで、水 (20 mL) を加えて室温で 1 時間攪拌した。減圧下でジクロロメタンを留去後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチルグラジエント) により精製し、淡黄色固体を 142 mg (収率 74%) 得た。トルエンから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 0.89 (t, 3H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.20 (tq, 2H, $J=7.5, 7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 2.63 (t, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.46 (dd, 1H, $J=18.4, 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.70 (dd, 1H, $J=18.4, 3.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.77 (dd, 1H, $J=7.7, 3.6$ Hz, H-3), 6.54 (dd, 1H, $J=8.2, 2.2$ Hz, H-6), 6.61-6.63 (m, 2H, H-4 and H-7), 7.35 (d, 2H, $J=8.0$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 7.92 (d, 2H, $J=8.0$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4\text{Pr}$), 8.83 (s, 1H), 10.14 (s, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 13.54, 23.68, 37.09, 38.69, 41.63, 109.25, 111.82, 113.00, 128.13, 128.68, 129.04, 133.93, 134.02, 148.26, 152.16, 178.42, 196.87.

10-3-11-5 3-(4'-イソプロピルフェナシル)-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール
(**4e**) の合成

10-3-11-5-1 3-(4'-イソプロピルフェナシル)-3-ヒドロキシ-5-メトキシ-2-オキシ
インドール (**9e**) の合成



Scheme 10-48 化合物 **9e** の合成

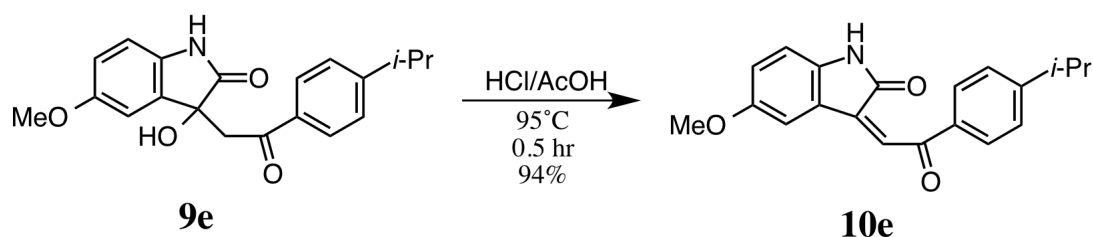
市販の **8** (1.00 g, 5.65 mmol) をメタノール (50 mL) に溶解し、4'-イソプロピルアセトフェノン (2.21 g, 2.28 mL, 13.6 mmol, 2.4 当量)、ジエチルアミン (2.11 g, 2.97 mL, 30.5 mmol, 5.4 当量) をそれぞれ加え、室温で 48 時間攪拌した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン:酢酸エチル = 1:2 → 2:3 → 2:3) で精製し、黄褐色固体を 1.03 g (収率 54%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 600 MHz) δ 1.20 (*d*, 6H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.94 (*sept*, 1H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.53 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.63 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.03 (*d*, 1H, $J=17.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 5.96 (*s*, 1H), 6.70-6.73 (*m*, 2H, H-6 and H-7), 6.94 (*d*, 1H, $J=1.8$ Hz, H-4), 7.36 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4i\text{-Pr}$), 7.82 (*d*, 2H, $J=8.4$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4i\text{-Pr}$), 10.07 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 150 MHz) δ 23.41, 33.45, 45.59, 55.33, 73.42, 109.57, 110.90, 113.25, 126.58, 128.14, 132.97, 134.19, 136.11, 154.23, 154.53, 178.23, 195.89.

GC-FAB-HRMS: calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ 339.1471, found 339.1454.

10-3-11-5-2 3-(4'-イソプロピルフェナシリデン)-5-メトキシ-2-オキシインドール (10e) の合成



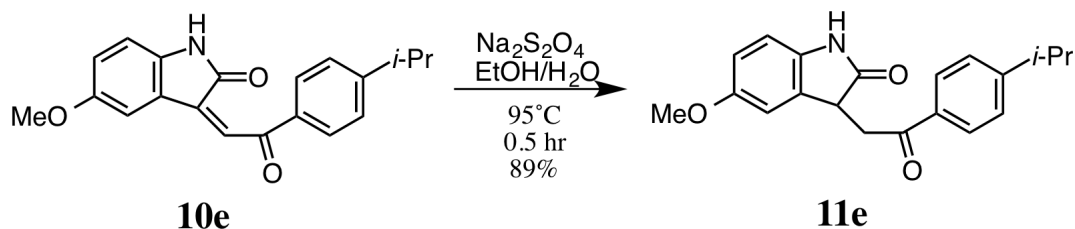
Scheme 10-49 化合物 **10e** の合成

化合物 **9e** (600 mg, 1.77 mmol) を氷酢酸/濃塩酸=34/1 の混液 (35 mL) に溶解し、95°C の油浴中で 30 分間攪拌した。反応液を室温まで放冷した後、水 (70 mL) を加えて希釈し、酢酸エチルで二回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、暗褐色固体を 532 mg (94%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz) δ 1.29 (*d*, 6H, $J=7.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.00 (*sept*, 1H, $J=7.0$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3.72 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 6.79 (*d*, 1H, $J=8.5$ Hz, H-7), 6.88, (*dd*, 1H, $J=8.5$, 2.7 Hz, H-6), 6.71 (*d*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-4), 7.38 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ -i-Pr), 7.81 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ i-Pr), 7.86 (*s*, 1H, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.95 (*s*, 1H, $J=2.4$ Hz, H-7), 8.50 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) δ 23.76, 34.53, 56.01, 110.78, 113.32, 119.20, 121.53, 127.09, 127.18, 129.28, 135.70, 137.15, 137.29, 155.78, 169.96, 190.85. * ピークは 16 本のみ観測された。

10-3-11-5-3 3-(4'-イソプロピルフェニル)-5-メトキシ-2-オキシインドール
(**11e**) の合成



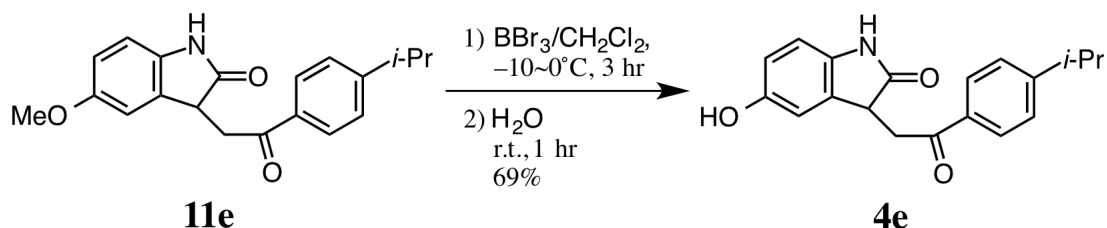
Scheme 10-50 化合物 **11e** の合成

化合物 **10e** (400 mg, 1.24 mmol) にエタノール (20 mL) を加え 95°C の油浴中で還流攪拌して溶解した。そこへ 10 w/v% ハイドロサルファイトナトリウム水溶液 (10 mL) を加えて、 95°C の油浴中で 30 分間還流攪拌した。反応液を室温まで放冷し、エタノールを減圧下で濃縮した後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で留去し、黄色固体を 357 mg (収率 89%) 得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ 1.26 (*d*, 6H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.97 (*sept*, 1H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) 3.51 (*dd*, 1H, $J=18.2, 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.68 (*s*, 3H, $-\text{OCH}_3$), 3.82 (*dd*, 1H, $J=18.2, 3.6$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.91 (*d*, 1H, $J=7.7, 3.6$ Hz, H-3), 6.75 (*dd*, 1H, $J=8.6, 2.4$ Hz, H-6), 6.81-6.83 (*m*, 2H, H-4 and H-7), 7.36 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4i\text{-Pr}$), 7.93 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4i\text{-Pr}$).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz) δ 24.00, 35.79, 40.11, 43.75, 56.24, 111.11, 112.20, 113.67, 127.86, 129.53, 132.67, 135.75, 137.08, 156.43, 157.23, 182.20, 198.66.

10-3-11-5-4 3-(4'-イソプロピルフェニル)-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール
(**4e**) の合成



Scheme 10-51 化合物 **11e** の合成

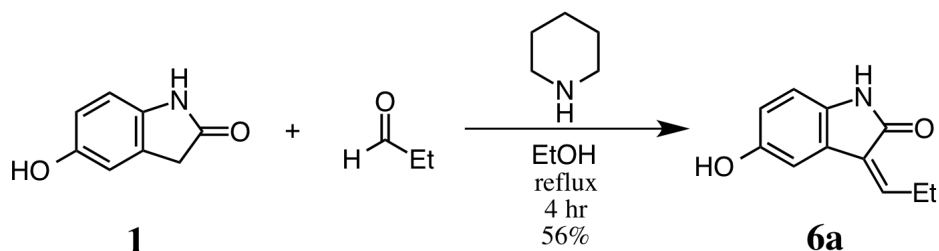
化合物 **11e** (200 mg, 0.62 mmol) をジクロロメタン (20 mL、モレキュラーシーブ 4A で脱水) に溶解し、食塩を添加した氷水浴中で $-10\sim 0^\circ\text{C}$ の温度範囲に保ちながら攪拌した。そこへ三臭化ホウ素 (1M ジクロロメタン溶液) を 4 mL (三臭化ホウ素として 1.00 g, 4 mmol, 5.63 当量) 加え、 $-10\sim 0^\circ\text{C}$ で 3 時間攪拌した。次いで、水 (20 mL) を加えて室温で 1 時間攪拌した。減圧下でジクロロメタンを留去後、水層を酢酸エチルで 2 回抽出した。有機層を合わせて飽和食塩水で 2 回洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を減圧下で濃縮後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチルグラジエント) により精製し、淡黄色固体を 133 mg (収率 69%) 得た。トルエンから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 1.22 (*d*, 6H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2.97 (*sept*, 1H, $J=6.9$ Hz, $-\text{CH}(\text{CH}_3)_2$) 3.46 (*dd*, 1H, $J=18.4, 7.7$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.70 (*dd*, 1H, $J=18.4, 3.5$ Hz $-\text{CH}_2\text{CO}-$), 3.78 (*dd*, 1H, $J=7.7, 3.5$ Hz, H-3), 6.54 (*dd*, 1H, $J=8.2, 2.4$ Hz, H-6), 6.61-6.64 (*m*, 2H, H-4 and H-7), 7.38 (*d*, 2H, $J=8.5$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ -*i*-Pr), 7.93 (*d*, 2H, $J=8.2$ Hz, $-\text{C}_6\text{H}_4$ -*i*-Pr), 8.83 (*s*, 1H), 10.14 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 23.46, 33.46, 38.64, 41.65, 109.40, 111.88, 113.33, 126.67, 128.27, 131.04, 134.16, 134.64, 152.16, 154.34, 178.43, 196.89.

10-3-12 3-アルキル-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール誘導体 (5) 及び 3-アルキリデン-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール誘導体 (6) の合成

10-3-12-1 5-ヒドロキシ-3-プロピリデン-2-オキシインドール (6a) の合成



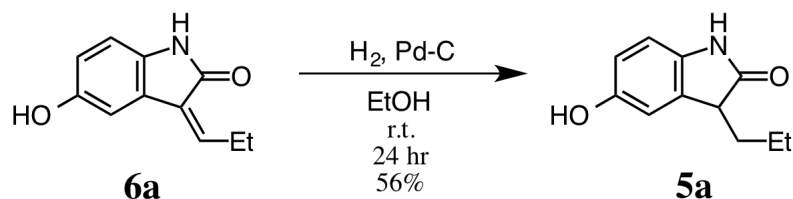
Scheme 10-52 化合物 **6a** の合成

市販の **1** (200 mg, 1.34 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、プロピオンアルデヒド (88.8 mg, 110 μ L, 1.53 mmol, 1.1 当量) を加えて還流撹拌した。そこへピペリジン (430 mg, 0.5 mL, 5.05 mmol, 3.8 当量) を加え、4 時間還流撹拌した。溶媒を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=70/30 \rightarrow 58/42) により精製し、黄色固体を 143 mg (収率 56%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 1.16 (*t*, 3H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_3$), 2.58 (*dq*, 3H, $J=7.6, 7.5$ Hz, $-\text{CH}_3$), 6.62-6.65 (*m*, 1H, H-6 and H-7), 6.79 (*t*, 1H, $J=7.6$ Hz, $-\text{C}=\underline{\text{C}}\text{H}-$), 7.00 (*d*, 1H, $J=1.4$ Hz, H-4), 9.01 (*s*, 1H), 10.12 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 12.86, 21.79, 110.04, 111.15, 115.19, 122.72, 128.27, 134.32, 141.67, 152.15, 168.03.

10-3-12-2 5-ヒドロキシ-3-プロピル-2-オキシインドール (**5a**) の合成



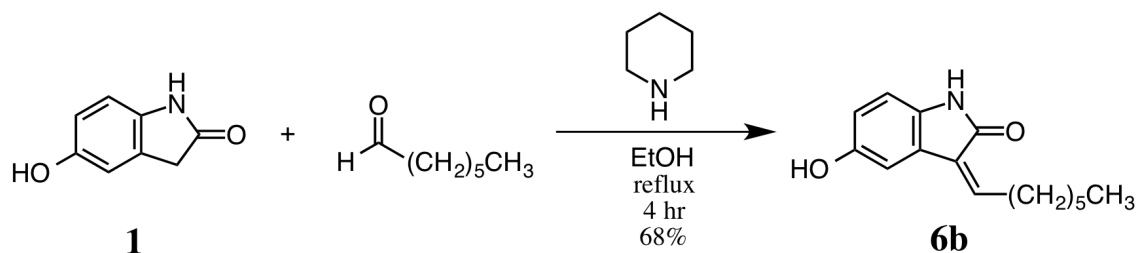
Scheme 10-53 化合物 **5a** の合成

化合物 **6a** (150 mg, 0.79 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、5%パラジウム活性炭 (30 mg) を添加した。風船により反応容器内を水素雰囲気とし、室温で24時間攪拌した。Celiteでパラジウム活性炭を除去後、エタノールでCeliteを洗浄し、濾液を減圧下で濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=64/36→43/57) により精製し、黄色固体を84 mg (収率56%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (CD_3OD , 600 MHz) δ 0.91 (*t*, 3H, $J=7.4$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.21-1.39 (*m*, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1.80-1.95 (*m*, 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 3.41 (*t*, 1H, $J=5.7$ Hz, H-3) 6.61-6.64 (*m*, 1H, $J=8.2, 2.4$ Hz, H-6), 6.70 (*d*, 1H, $J=8.2$ Hz, H-7), 6.73-6.75 (*m*, 1H, H-4).

$^{13}\text{C NMR}$ (CD_3OD , 150 MHz) δ 14.34, 19.76, 33.53, 47.73, 111.14, 113.03, 114.89, 132.62, 135.86, 154.28, 184.43.

10-3-12-3 3-ヘプチリデン-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (**6b**) の合成



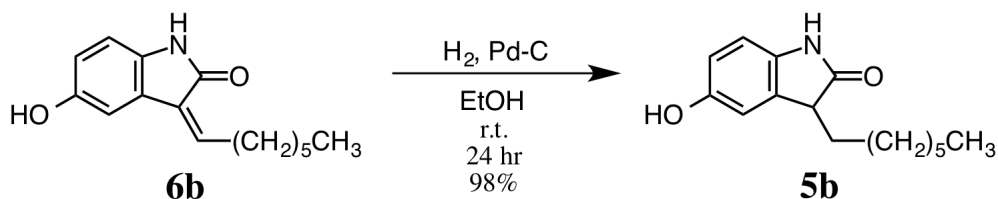
Scheme 10-54 化合物 **6b** の合成

市販の **1** (200 mg, 1.34 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、ヘプタナール (180 mg, 220 μ L, 1.58 mmol, 1.2 当量) を加えて還流撹拌した。そこへピペリジン (430 mg, 0.5 mL, 5.05 mmol, 3.8 当量) を加え、4 時間還流撹拌した。溶媒を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=79/21 \rightarrow 58/42) により精製し、黄色固体を 223 mg (収率 68%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 0.87 (*t*, 3H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_3$), 1.29-1.39 (*m*, 6H), 1.56 (*tt*, 2H, $J=7.5$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 2.57 (*dt*, 2H, $J=7.7, 7.5$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2-$), 6.62 (*dd*, 1H, $J=8.3, 2.1$ Hz, H-6), 6.64 (*d*, 1H, $J=8.3$ Hz, H-7), 6.72 (*t*, 1H, $J=7.7$ Hz, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.01 (*d*, 1H, $J=1.7$ Hz, H-4), 9.01 (*s*, 1H), 10.11 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 13.91, 21.94, 28.03, 28.34, 28.60, 31.02, 109.93, 111.17, 115.18, 122.63, 128.65, 134.33, 140.34, 151.97, 168.02.

10-3-12-4 3-ヘプチル-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (**5b**) の合成



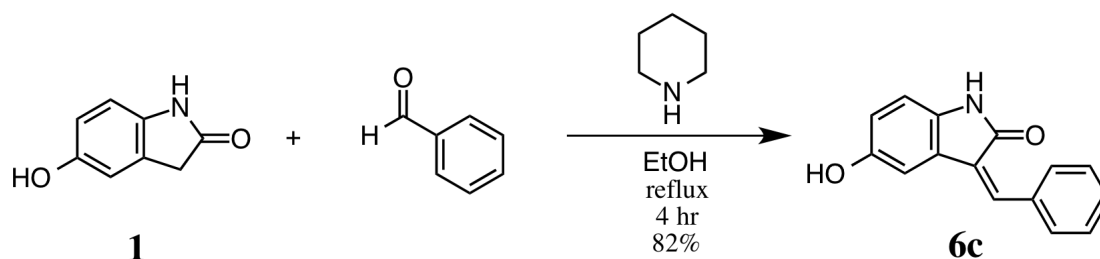
Scheme 10-55 化合物 **5b** の合成

化合物 **6b** (150 mg, 0.61 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、5%パラジウム活性炭 (30 mg) を添加した。風船により反応容器内を水素雰囲気とし、室温で24時間攪拌した。Celiteでパラジウム活性炭を除去後、エタノールでCeliteを洗浄し、濾液を減圧下で濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相:*n*-ヘキサン/酢酸エチル=75/25→54/46) により精製し、黄色固体を148 mg (収率98%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

¹H NMR (DMSO-*d*₆, 600 MHz) δ 0.84 (*t*, 3H, *J*=7.3 Hz, -CH₃), 1.14-1.38 (*m*, 10H, -(CH₂)₅-), 1.68-1.83 (*m*, 2H, -CH-CH₂-), 3.31 (*t*, 1H, *J*=5.7 Hz, H-3), 6.55 (*dd*, 1H, *J*=8.2, 2.4 Hz, H-6), 6.60 (*d*, 1H, *J*=8.2 Hz, H-7), 6.67 (*d*, 1H, *J*=1.4 Hz, H-4), 8.91 (*s*, 1H), 10.02 (*s*, 1H).

¹³C NMR (DMSO-*d*₆, 150 MHz) δ 13.92, 22.02, 25.05, 28.49, 28.94, 29.81, 31.17, 45.45, 109.38, 111.89, 113.35, 130.90, 134.52, 152.28, 178.61.

10-3-12-5 3-ベンジリデン-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (**6c**) の合成



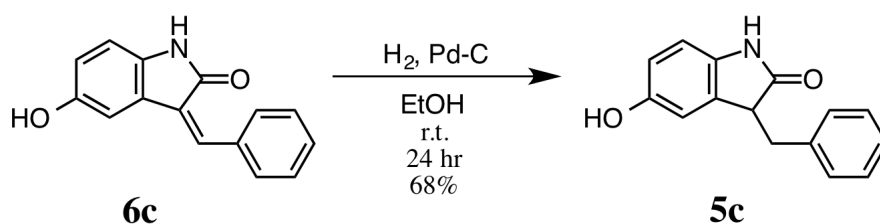
Scheme 10-56 化合物 **6c** の合成

市販の **1** (200 mg, 1.34 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、プロピオンアルデヒド (162mg, 156 μ L, 1.58 mmol, 1.1 当量) を加えて還流撹拌した。そこへピペリジン (430 mg, 0.5 mL, 5.05 mmol, 3.8 当量) を加え、4 時間還流撹拌した。溶媒を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=73/27 \rightarrow 52/48) により精製し、黄色固体を 262 mg (収率 82%) 得た。トルエンから再結晶し、赤橙色針状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 6.66 (*dd*, 1H, $J=8.4, 2.2$ Hz, H-7), 6.69 (*d*, 1H, $J=8.4$ Hz, H-7), 7.04 (*d*, 1H, $J=2.2$ Hz, H-4), 7.47-7.55 (*m*, 3H, $-\text{CHC}_6\text{H}_5$), 7.58 (*s*, 1H, $-\text{C}=\text{CH}-$), 7.68 (*d*, 2H, $J=7.6$ Hz, $-\text{CHC}_6\text{H}_5$), 8.99 (*s*, 1H), 10.29 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 109.91, 110.46, 116.74, 121.51, 128.43, 128.71, 129.12, 129.49, 134.46, 135.32, 135.34, 151.78, 168.60.

10-3-12-6 3-ベンジル-5-ヒドロキシ-2-オキシインドール (**5c**) の合成



Scheme 10-57 化合物 **5c** の合成

化合物 **6c** (150 mg, 0.63 mmol) をエタノール (10 mL) に溶解し、5%パラジウム活性炭 (30 mg) を添加した。風船により反応容器内を水素雰囲気とし、室温で24時間攪拌した。Celiteでパラジウム活性炭を除去後、エタノールでCeliteを洗浄し、濾液を減圧下で濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (中圧分取自動カラムシステム、移動相: *n*-ヘキサン/酢酸エチル=66/34→45/55) により精製し、淡黄色固体を102 mg (収率 68%) 得た。酢酸エチルから再結晶し、淡黄色板状結晶を得た。

$^1\text{H NMR}$ (DMSO- d_6 , 600 MHz) δ 2.88 (*dd*, 1H, $J=13.9, 8.0$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.27 (*dd*, 1H, $J=13.9, 4.9$ Hz, $-\text{CH}_2-$), 3.31 (*dd*, 1H, $J=8.0, 4.9$ Hz, H-3), 6.32 (*brs*, 1H, H-4), 6.49 (*d*, 1H, $J=8.2, 2.2$ Hz, H-6), 6.52 (*d*, 1H, $J=8.2$ Hz, H-7), 7.14-7.24 (*m*, 5H, $-\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$), 8.83 (*s*, 1H), 10.02 (*s*, 1H).

$^{13}\text{C NMR}$ (DMSO- d_6 , 150 MHz) δ 35.52, 46.97, 109.34, 112.42, 113.49, 126.24, 128.01, 129.17, 130.14, 134.37, 138.19, 151.97, 177.78.

10-4 DPPH ラジカル消去活性の評価 (第3章)

10-4-1 測定条件

測定に用いる溶媒系は Yamaji らの方法¹¹⁵⁾を参考とし、エタノール/MES 緩衝液 (pH 7.4)=3/2 の条件とした。

10-4-2 MES 緩衝液 (pH 7.4) の作製

MES (8.15 g) を精製水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7.40 とし、精製水を加えて 1000 mL にメスアップした。

10-4-3 化合物 **B-i**、**1-i**、**1-ii**、**1-iii** の DPPH ラジカル消去活性

DPPH は 0.5 mM のエタノール溶液を予製し、これにエタノール/MES 緩衝液 =3/2 の混液を加えて 10 倍希釈し 50 μ M 溶液とした。化合物 **B-i**、**1-i**、**1-ii**、**1-iii** はエタノール/MES 緩衝液=3/2 の混液に溶解し各 1.0 mM 溶液とした。DPPH 溶液および被検化合物溶液それぞれをストップフロー分光光度計のセルに添加して 250 μ M ずつ混合し、517 nm における吸光度減少を記録した。得られた吸光度減少曲線について Unisoku Spectroscopy&Kinetics[®]を用いてカーブフィッティングを行い、二次反応速度定数を算出した。

10-4-4 化合物 **1-i**、**1-ii**、**1-iii** の DPPH ラジカル消去反応におけるストイキオメトリーの評価

DPPH は 0.5 mM のエタノール溶液を予製し、これにエタノール/MES 緩衝液 =3/2 の混液を加えて 10 倍希釈し 50 μ M 溶液とした。化合物 **1-i**、**1-ii**、**1-iii** はエタノール/MES 緩衝液=3/2 の混液に溶解し各 1.0 mM 溶液とした。DPPH 溶液 (3 mL) をディスポーザブルプラスチックセルに入れ、マイクロシリンジを用いて被検化合物溶液 (50 μ L) を添加し、[DPPH]/[被検化合物]=50 μ M/16.7 μ M の濃度条件において波長 517 nm の吸光度を紫外可視分光光度計により記録した。化合物添加前の吸光度と、吸光度変化が見られなくなった時点の吸光度の差からストイキオメトリーを算出した。

10-4-5 化合物 **1**、**C-i**~**iv**、**2**、**3a**~**n**、**4a**~**e**、**5a**~**c**、**6a**~**c** の DPPH ラジカル消去活性

DPPH は 0.5 mM のエタノール溶液を予製し、これにエタノール/MES 緩衝液=3/2 の混液を加えて 20 倍希釈し 25 μ M 溶液とした化合物 **1**、**C-i**、**C-ii**、**C-iii**、**C-iv**、**2**、**3a**~**n**、**4a**~**e**、**6b**、**6c**、エダラボンはエタノール/MES 緩衝液=3/2 混液に溶解し、2.0 mM、1.5 mM、1.0 mM、0.5 mM の各溶液を予製した。誘導体 **5a**、**5b**、**5c**、**6b** はエタノール/MES 緩衝液=3/2 混液に溶解し 4.0 mM、3.0 mM、2.0 mM、1.0 mM の各溶液を予製した。DPPH 溶液および各被検化合物溶液それぞれをストップフロー分光光度計のセルに添加して 250 μ M ずつ混合し、517 nm における吸光度減少を記録した。得られた吸光度減少曲線より Unisoku Spectroscopy&Kinetics[®]を用いて擬一次反応速度定数を算出し、濃度に対し擬一次反応速度定数をプロットした近似直線の傾きを二次反応速度定数とした。

10-5 脂質過酸化抑制効果の測定 (第4章)

10-5-1 ラット肝ミクロソームの由来

4-1 項では、Ohe らの方法¹¹⁶⁾を参考とし当研究室で Wistar 系雄性ラットから調製した肝ミクロソーム (0.56 mg protein) を用いた。

4-2 項では、SD 系雄性ラットから調製したミクロソームを BIOPREDIC 社から購入して用いた。

10-5-2 0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4, 0.1 mM EDTA) の調製

市販のリン酸二水素ナトリウム二水和物 (7.80 g) 及び EDTA 二ナトリウム二水和物 (18.61 mg) を精製水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7.40 とし、精製水を加えて 1000 mL にメスアップした。

10-5-3 測定方法 (4-1 項)

各被検化合物はエタノール (尿酸及びアスコルビン酸は 0.1 M Na-Pi 緩衝液) に溶解した。*tert*-ブチルヒドロペルオキシドは市販の 69%水溶液を精製水で希釈し、用時まで氷中に保存して用いた。BHT は 2 w/v%のエタノール溶液として用時調製した。氷水浴中の遠心管に被検化合物溶液 (300 μ L、最終濃度 100 μ M)、ラット肝ミクロソーム (10 μ L) を入れ、0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4, 0.1 mM EDTA)及びエタノールを適宜加え、Na-Pi 緩衝液/エタノール=690 μ L/300 μ L 溶液として混合した。そこへ *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (10 μ L、最終濃度 1 mM) を加え、37°C で 20 分間振盪した。BHT 溶液 (100 μ L) を加えて反応を停止した後、15 w/v%トリクロロ酢酸-0.36 w/v % チオバルビツール酸ナトリウム-0.25 M 塩酸溶液 (2 mL) を加えて 85°C で 20 分間加熱した。室温まで放冷した後、1000 rpm、20°C で 20 分間遠心分離した。上清の 535 nm と 600 nm の吸光度の差を測定し、これを TBARS 生成量とした。コントロール群との TBARS 生成量の相対比を脂質過酸化抑制効果とした ($n=3$)。

10-5-4 測定方法 (4-2 項)

各被検化合物はエタノール (尿酸は 0.1 M Na-Pi 緩衝液) に溶解した。*tert*-ブチルヒドロペルオキシドは市販の 69%水溶液を精製水で希釈し、用時まで氷中に保存して用いた。BHT は 2 w/v%のエタノール溶液として用時調製した。氷水浴

中の遠心管に被検化合物溶液 (300 μ L、最終濃度 100 μ M)、ラット肝ミクロソーム (50 μ L)を入れ、0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4, 0.1 mM EDTA) 及びエタノールを適宜加え、Na-Pi 緩衝液/エタノール=690 μ L/300 μ L 溶液として混合した。そこへ *tert*-ブチルヒドロペルオキシド (10 μ L、最終濃度 1 mM) を加え、37°C で 20 分間振盪した。BHT 溶液 (100 μ L) を加えて反応を停止した後、15 w/v% トリクロロ酢酸-0.36 w/v % チオバルビツール酸ナトリウム-0.25 M 塩酸溶液 (2 mL) を加えて 85°C で 20 分間加熱した。室温まで放冷した後、1000 rpm、20°C で 20 分間遠心分離した。上清の 535 nm と 600 nm の吸光度の差を測定し、これを TBARS 生成量とした。コントロール群との TBARS 生成量の相対比を脂質過酸化抑制効果とした ($n=3$)。

10-6 プロオキシダント効果の測定 (第5章)

10-6-1 0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4) の調製

リン酸二水素ナトリウム二水和物 (7.80 g) を精製水に溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加えて pH 7.40 とし、精製水を加えて 1000 mL にメスアップした。

10-6-2 Nash 試薬の調製

酢酸アンモニウム (45 g)、アセチルアセトン (0.6 mL)、氷酢酸 (0.3 mL) を精製水に溶解し 300 mL にメスアップした。

10-6-3 測定方法

アスコルビン酸及び尿酸は 0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4) に溶解した。エダラボン、**1**、**3k**、**4c**、**5a** は DMSO に溶解した。塩化鉄 (III) 無水物は 0.1 M Na-Pi 緩衝液 (pH 7.4) に溶解し 500 μ M 溶液とした。氷中の試験管に塩化鉄 (III) 溶液、所定濃度の各被検化合物溶液をそれぞれ加えて混合し、さらに 0.1 M Na-Pi 緩衝液及び DMSO を適宜加えて、0.1 M Na-Pi 緩衝液/DMSO=2900 μ L/100 μ L 溶液とした。これを 37°C で 60 分間振盪した後、Nash 試薬 (2 mL) を加えてさらに 37°C で 40 分間振盪した。各溶液を 150 μ L ずつ 96 ウェルマルチプレートに移し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 412 nm 及び 600 nm の吸光度を求めた。波長 412 nm と 600 nm の吸光度の差を求め、被検化合物無添加群の吸光度との比較から HCHO 生成量の比を求めた ($n=3$)。

10-7 細胞内酸化ストレス抑制効果の評価 (第6章)

10-7-1 細胞培養

HL60 は 37°C、5% CO₂ 条件下、FBS (5%) 及びペニシリン・ストレプトマイシン溶液 (1%) を添加した RPMI-1640 培地中で培養した。

10-7-2 細胞内 酸化ストレス抑制効果の評価

尿酸は超純水に溶解し 2 mM 予製液とした。被検化合物は DMSO に用時溶解し、2 mM 予製液とした。H₂O₂ は 30 % H₂O₂ 水溶液を超純水で希釈して 40 mM 予製液とし、使用直前まで氷中に保存したものをを用いた。DCFH-DA は DMSO に溶解し、2 mM 予製液とした。100 mm セルカルチャーディッシュへ HL60 を 6.0x10⁶ cells/dish (5.0x10⁵ cells/mL)、培地の全量が 12 mL となるように播種した後、DCFH-DA 溶液を 60 µL (最終濃度 10 µM) 加え 37°C、5% CO₂ 下で 15 分間インキュベートした。1000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離し、培地を除去後、新しい培地に細胞を再懸濁し、6 ウェルマルチプレートへ 2 mL/well (1.0x10⁶ cells/well) ずつ播種した。そこへ各被検化合物溶液を 10 µL 加え、37°C、5% CO₂ 下で 1 時間インキュベートした。次いで過酸化水素水溶液を 10 µL 加え、同条件で 1 時間インキュベートした。1000 rpm、20°C で 5 分間遠心分離し、培地を除去後、シース液 (1 mL) に細胞を懸濁した。セルストレーナーにて懸濁液を濾過後、励起波長 488 nm、蛍光波長 530 nm に設定したフローサイトメーターにて、10,000 個の細胞について検出を行った。BD CellQuest Pro™ を用い、細胞数を縦軸、蛍光強度の対数を横軸としたヒストグラムを得た。なお、被検化合物の代わりに DMSO、H₂O₂ の代わりに超純水をそれぞれ加えた群をコントロール、被検化合物を添加せず H₂O₂ のみを加えた群を none とした。

10-8-1 HL60 細胞に対する細胞毒性 (第 7 章)

10-8-1 細胞培養

HL60 の培養条件は 10-7-1 項に準じた。

10-8-1 操作

HL60 細胞を 1.0×10^6 cells/well (5×10^5 cells/mL) となるように 12 ウェルマルチプレートへ播種した後、所定濃度に調製した被検化合物の DMSO 溶液を 20 μ L (1 v/v%) ずつ加えた。37°C、5% CO₂ 下で 24 時間インキュベーション後、培養液を 20°C、1000 rpm で 5 分間遠心分離し、培地を除去した。沈殿した細胞を PBS (2 mL) に懸濁し、Vi-CELL™ を用いトリパンプルー色素排除法により生細胞数を計数した。DMSO のみを添加したコントロールに対する生細胞数の比を細胞生存率とした ($n=3$)。

10-9 PBS に対する溶解度の測定 (第 8 章)

10-9 測定方法

まず、濃度既知の被検化合物標準 PBS (pH 7.4) 溶液について 37°C、291 nm での吸光度を記録し、モル吸光係数 ϵ を算出した。次に、過剰量の各被検化合物を PBS に加え 50°C に熱して飽和した後、放冷し 37°C の過飽和溶液を作製した。この過飽和溶液を濾過して飽和溶液を得た。飽和溶液を石英セルに入れ、37°C、291 nm における吸光度を記録した。得られた吸光度と予め算出したモル吸光係数 ϵ から 37°C の飽和溶液における濃度を求め、溶解度とした。

10-12 ClogP 及び *t*PSA の計算

ClogP 及び *t*PSA の計算には、ChemBioDraw[®] Ultra version 13.0.2.3020 (PerkinElmer) を用いた

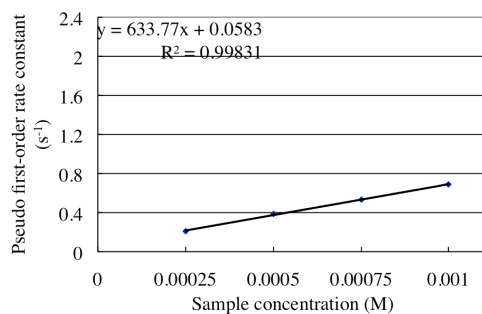
10-11 統計学的処理

Student の *t*-検定を用い、有意水準を 5% または 1% とした。

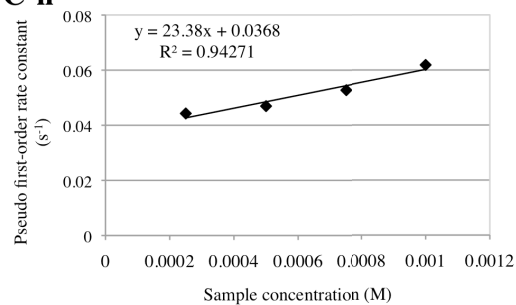
第 11 章 付表

11-1 DPPH ラジカル消去活性の二次反応速度定数算出に用いたプロット (第 2 章)

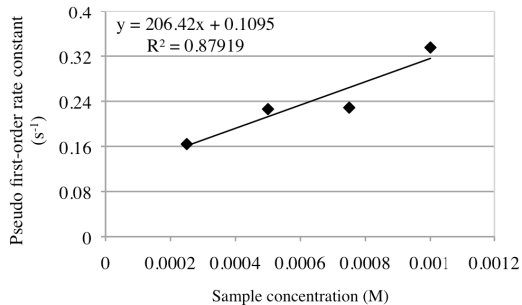
Uric acid



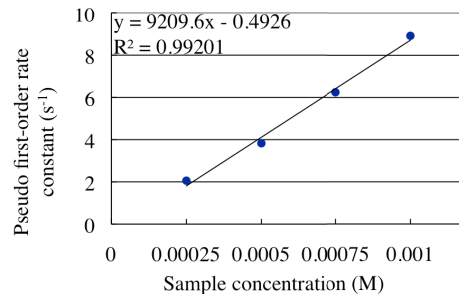
C-ii



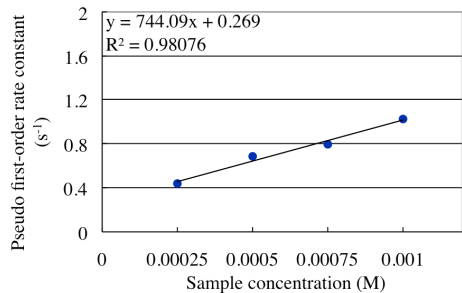
C-iii



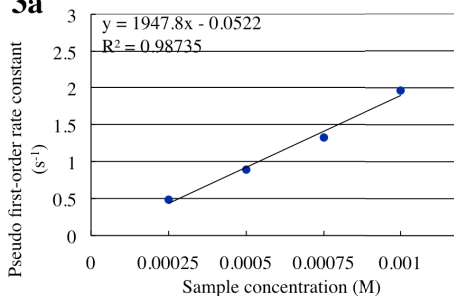
1



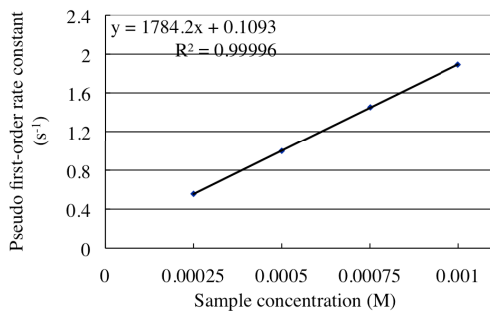
2



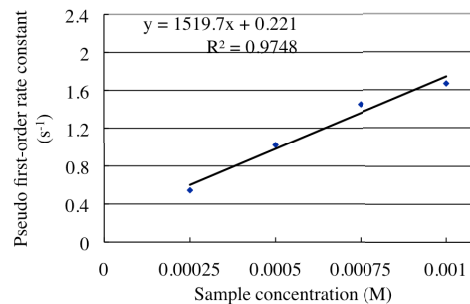
3a

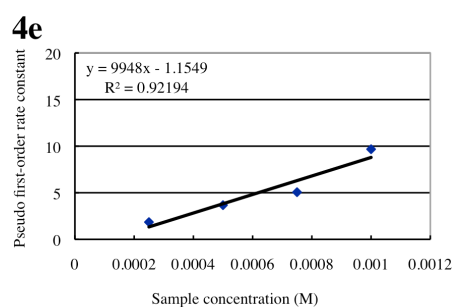
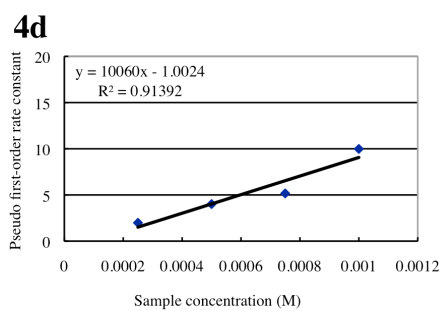
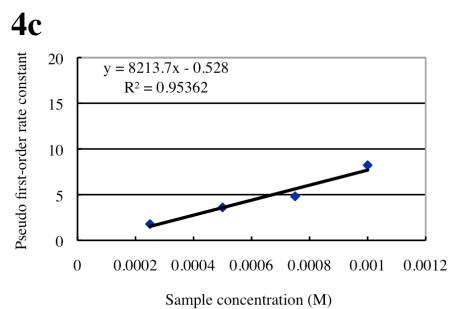
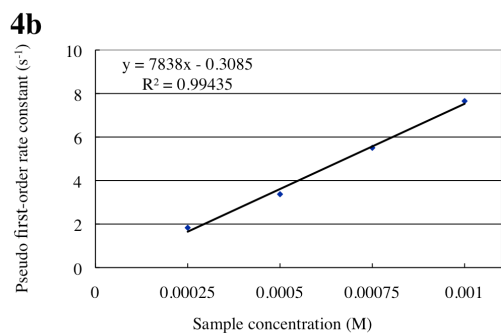
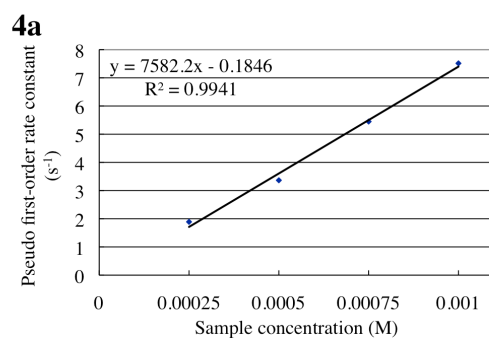
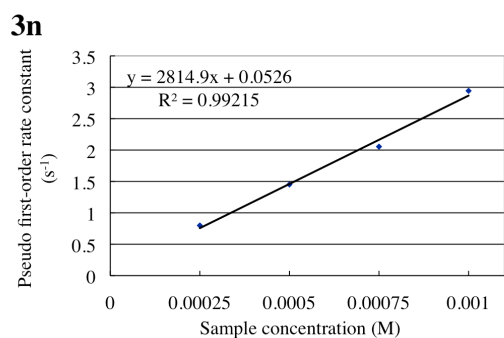
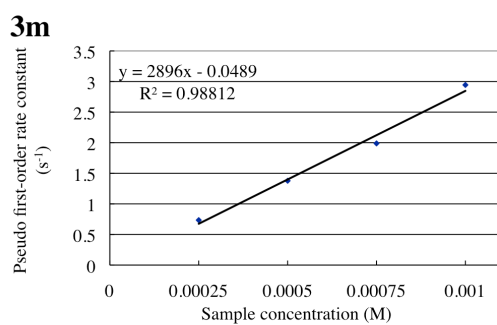
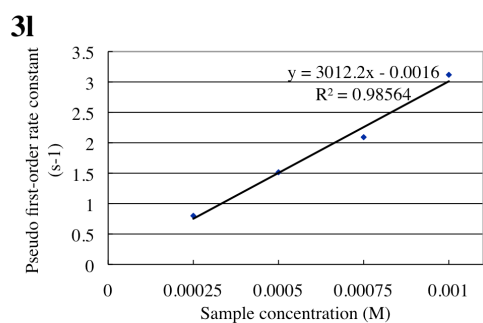


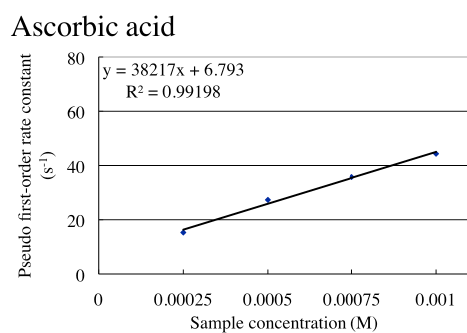
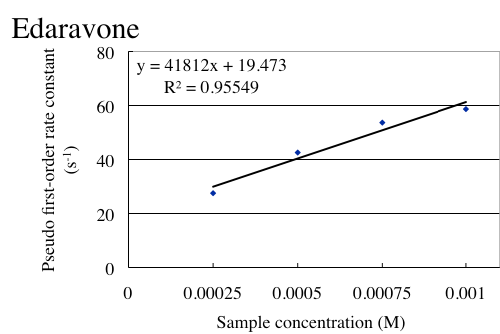
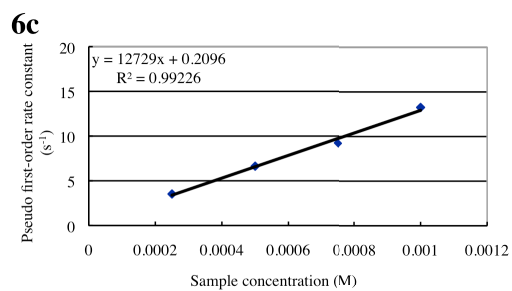
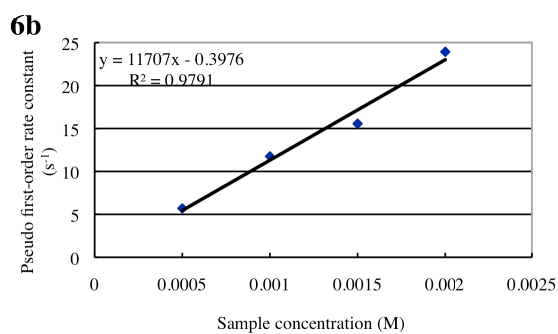
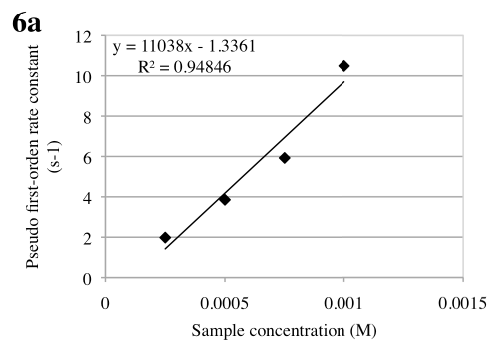
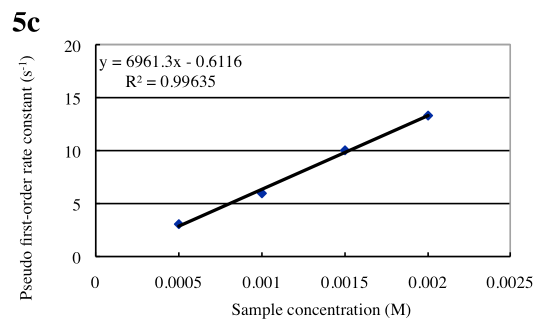
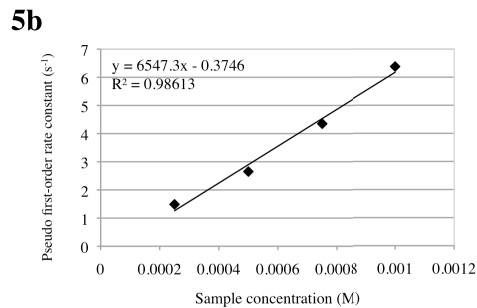
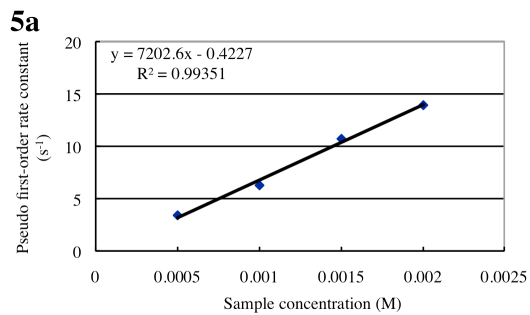
3b

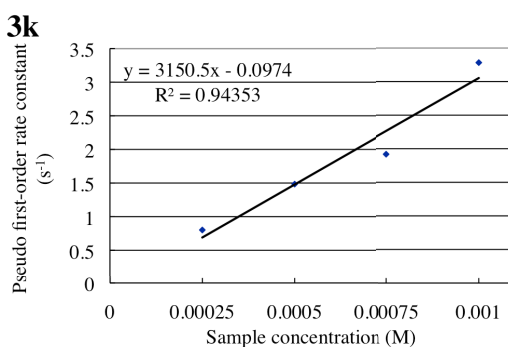
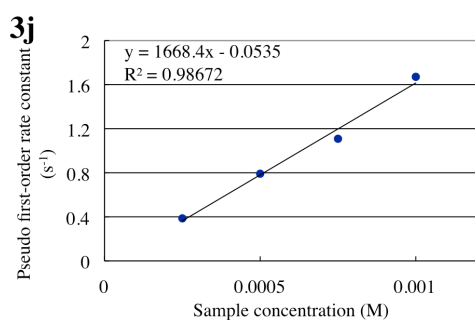
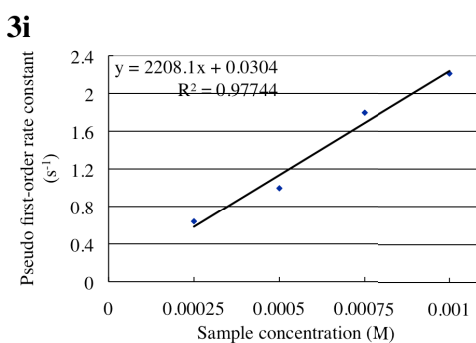
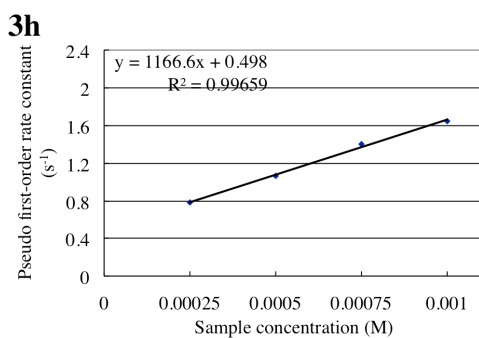
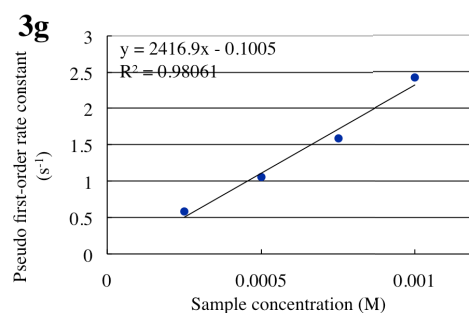
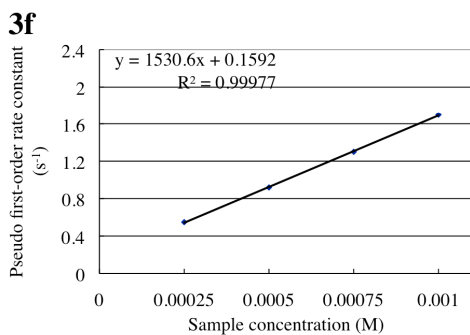
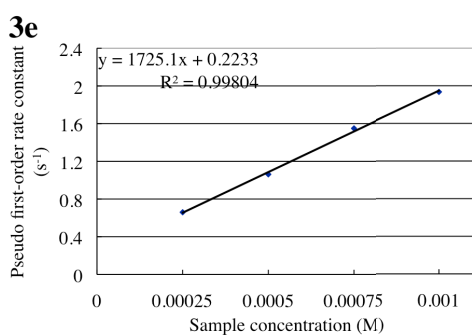
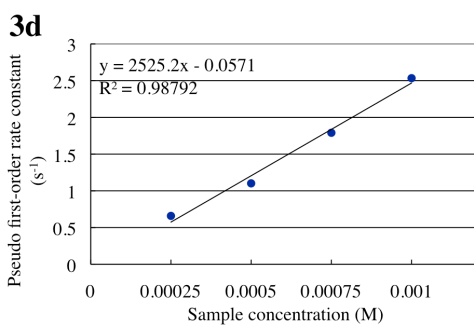


3c









11-3 脂質過酸化抑制効果 (第4章)

11-3-1 脂質過酸化抑制効果の測定-1 (4-1項)

	% inhibition				
	run 1	run 2	run 3	AVERAGE	SD
Control	98.70	100.74	100.56	100.00	1.13
Uric acid	95.75	97.41	81.67	95.81	8.65
1	66.58	84.85	73.41	88.85	9.23
2	74.32	75.49	62.24	84.31	7.33
3a	67.59	64.82	60.91	80.34	3.36
3b	80.01	78.72	73.12	79.83	3.66
3c	68.34	73.87	78.48	75.42	5.08
3d	27.46	23.83	21.34	64.19	3.08
3e	54.96	53.04	82.06	62.26	16.23
3f	53.64	50.00	36.15	58.24	9.23
3g	50.02	53.30	54.04	56.24	2.14
3h	38.08	47.29	36.61	50.14	5.79
3i	37.85	28.88	34.92	43.53	4.58
3j	41.18	41.94	43.46	46.52	1.16
Edaravone	59.69	65.93	72.29	46.96	6.30

11-3-2 脂質過酸化抑制効果の測定-2 (4-2 項)

	% inhibition				
	run 1	run 2	run 3	AVERAGE	SD
Control	97.39	101.96	100.65	100.00	2.36
1	57.52	75.16	71.24	67.97	9.27
2	74.32	75.49	62.24	70.68	7.33
3a	69.28	76.47	47.06	64.27	15.33
3b	53.59	53.59	74.84	60.68	12.26
3k	53.92	55.56	68.95	59.48	8.25
3l	60.13	47.39	51.63	53.05	6.49
3m	55.88	55.23	52.29	54.47	1.91
3n	53.64	50.00	36.15	46.60	9.23
4a	43.79	50.65	46.08	46.84	3.49
4b	48.37	46.73	36.60	43.90	6.37
4c	41.18	45.42	43.46	43.36	2.13
4d	35.62	36.60	25.49	32.57	6.15
4e	40.52	53.59	41.83	45.32	7.20
5a	57.19	61.11	62.75	60.35	2.86
5b	33.66	42.48	43.14	39.76	5.29
5c	48.04	58.82	47.39	51.42	6.42
6a	55.56	53.92	47.39	52.29	4.32
6b	29.74	40.52	35.95	35.40	5.41
6c	52.94	51.96	39.22	48.04	7.66

11-3-2 プロオキシダント効果の測定 (第5章)

	Concentration (μM)	Relative HCHO formation				
		run 1	run 2	run 3	AVERAGE	SD
Control	–	0.93	1.11	0.96	1.00	0.10
Ascorbic acid	25	1.07	1.13	1.24	1.15	0.08
	50	1.55	1.35	1.43	1.44	0.10
	100	2.08	2.13	2.43	2.21	0.19
Uric acid	25	0.98	0.91	0.99	0.96	0.05
	50	1.09	1.07	0.95	1.04	0.07
	100	1.00	0.94	1.00	0.98	0.03
1	25	1.06	0.96	0.94	0.99	0.06
	50	1.09	1.08	1.02	1.06	0.04
	100	1.07	1.20	1.10	1.13	0.07
3k	25	1.19	1.20	1.11	1.17	0.05
	50	1.20	1.26	1.34	1.27	0.07
	100	1.35	1.28	1.35	1.33	0.05
4c	25	1.24	1.20	1.17	1.20	0.03
	50	1.10	1.06	1.07	1.08	0.02
	100	1.06	1.27	1.16	1.16	0.11
5a	25	1.16	1.03	1.11	1.10	0.06
	50	1.06	1.05	0.95	1.02	0.06
	100	1.15	1.12	1.19	1.15	0.04
6a	25	1.31	1.24	1.52	1.36	0.14
	50	1.54	1.44	1.42	1.46	0.06
	100	1.98	1.95	1.98	1.97	0.02
Edaravone	25	0.85	0.92	0.98	0.92	0.06
	50	0.99	0.99	0.97	0.98	0.01
	100	1.18	1.21	1.13	1.18	0.04

参考文献

- 1) Lloyd L. Ingraham, Damon L. Meyer 著、松尾光芳 訳、*酸素の生化学 二原子酸素反応の機構*、学会出版センター、**1991**、p.3
- 2) Donald T. Sawyer, Joan S. Valentine, *Acc. Chem. Res.*, **1981**, *14*, 393-400.
- 3) Buxton, G.V., *Trans. Faraday Soc.* **1970**, *66*, 1656-1660.
- 4) Alam, M.S.; Rao, B.S.M.; Janata, E., *Radiat. Phys. Chem.*, **2003**, *67*, 723-728.
- 5) 宮野佳、住本英樹、*生物資料分析*、**2009**、*32(4)*、289-296.
- 6) 住本英樹、前原優一、宮野佳、*酸化ストレスの医学*、診断と治療社、**2009**、p.12-22.
- 7) Okamoto, K.; Kawaguchi, Y.; Eger, B.T.; Pai, E.F.; Nishino, T.; *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 17080-17083.
- 8) McCord, J.M.; *N. Engl. J. Med.*, **1985**, *312*, 159-163.
- 9) Sakuma, S.; Fujimoto, Y.; Sakamoto, Y.; Uchiyama, T.; Yoshioka, K.; Nishida, H.; Fujita, T.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *230*, 476-479.
- 10) Marubayashi, S.; Dohi, K.; Yamada, K.; Kawasaki, K.T., *Surgery*, **1991**, *110*, 537-543.
- 11) Shafik, A.N., *Dig. Dis. Sci.*, **2013**, *58*, 650-659.
- 12) Tsuda, H.; Kawada, N.; Kaimori, J.; Kitamura, H.; Moriyama, T.; Rakugi, H.; Takahara, S.; Isaka, Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2012**, *427*, 266-272.
- 13) Okamoto, K., *Modern Physician*, **2010**, *30(11)*, 1456-1458.
- 14) Chance, B.; Sies, H.; Boveris, A., *Physiol. Rev.*, **1979**, *59*, 527-605.
- 15) Bandy, B.; Davison, A.J., *Free Radic. Biol. Med.*, **1990**, *8*, 523-539.
- 16) Ide, T.; Tsursui, H.; Kinugawa, S.; Utsumi, H.; Kang, D.; Hattori, N.; Uchida, K.; Arimura, K.; Egashira, K.; Takeshita, A., *Circ. Res.*, **1999**, *85*, 357-363.
- 17) Yin, H.; Havrilla, C.M.; Gao, L.; Morrow, J.D.; Porter, N.A., *J. Biol. Chem.*, **2003**, *278(19)*, 16720-16725.
- 18) For a review, see: (a) Morrow, J.D., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2005**, *25*, 279-286. (b) Galano, J.M.; Mas, E.; Barden, A.; Mori, T.A.; Signorini, C.; Felice, C.D.; Barrett, A.; Opere, C.; Pinot, E.; Schwedhelm, E.; Benndorf, R.; Roy, J.; Guennec, J.Y.L.; Oger, C.; Durand, T., *Prostaglandins and Other Lipid Mediat*, **2013**, *107*, 95-102.
- 19) Kasai, H.; Kawai, K., *Chem. Res. Toxicol.*, **2009**, *22*, 984-989.
- 20) Kawai, K.; Li, Y.; Song, M.; Kasai, H., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2010**, *20*, 260-265.
- 21) Massari, J.; Tokikawa, R.; Zanolli, L.; Tavares, M.F.M.; Assunção, N.A.; Bechara, E.J.H., *Chem. Res. Toxicol.*, **2010**, *23*, 1762-1770.
- 22) 吉川敏一、*フリーラジカルの科学*、講談社サイエンティフィク、**1997**、p16.
- 23) Lymar, S.V.; Jiang, Q.; Hurst, J.K., *Biochemistry*, **1996**, *35(24)*, 7855-7861.
- 24) Grossi, L.; *J. Org. Chem.*, **2003**, *68(16)*, 6349-6353.
- 25) For a review, see: Dalle-Donne, I.; Giustarini, D.; Colombo, R.; Rossi, R.; Milzani, A.; *Trends Mol. Med.*, **2003**, *9(4)*, 169-176.

- 26) McCord, J.M.; Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244(22), 6049-6055.
- 27) McCord, J.M.; Fridovich, I., *J. Biol. Chem.*, **1969**, 244(22), 6056-6063.
- 28) Tolmasoff, J.M.; Ono, T.; Cutler, R.G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, 77, 2777-2781.
- 29) For a review, see: Ishii, T.; Warabi, E.; Yanagawa, T., *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **2012**, 50(2), 91-105.
- 30) Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Katoh, Y.; Oyake, T.; Hayashi, N.; Satoh, K.; Hatayama, I.; Yamamoto, M.; Nabeshima, Y.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, 236, 313-322.
- 31) Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y.; Ishii, T.; Igarashi, K.; Engel, J.D.; Yamamoto, M., *Genes Dev.*, **1999**, 13, 76-86.
- 32) Kobayashi, A.; Kang, M.; Watai, Y.; Tong, K.I.; Shibata T.; Uchida, K.; Yamamoto, M., *Mol. Cell Biol.*, **2006**, 26(1), 221-229.
- 33) 丸山敦史、伊東健、*実験医学*、**2012**, 30(17), 42-49.
- 34) Kensler, T.W.; Wakabayashi, N., *Carcinogenesis*, **2010**, 31(1), 90-99.
- 35) For a review, see: Ryter, S.W.; Choi, M.K.; *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **2009**, 41, 251-260.
- 36) Ushio-Fukai, M.; Alexander, R.W.; Akers, M.; Yin, Q.; Fujio, Y.; Walsh, K.; Griending, K.K., *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(32), 22699-22704.
- 37) Leslie N.R.; Bennett, D.; Lindsay, Y.E.; Stewart, H.; Gray, A.; Downes, C.P., *EMBO J.*, **2003**, 22(20), 5501-5510.
- 38) Martín, D.; Salinas, M.; Fujita, N.; Tsuruo, T.; Cuadrado, A.; *J. Biol. Chem.*, **2002**, 45(8), 42943-42952.
- 39) Kass, G.E.; Duddy, S.K.; Orrenius, S., *Biochem. J.*, **1989**, 260(2), 499-507.
- 40) Gopalakrishna, R.; Anderson, W.B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86(17), 6758-6762.
- 41) Guyton, K.Z.; Liu, Y.; Gorospe, M.; Xu, Q.; Holbrook, N.J.; *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(8), 4138-4142.
- 42) For a review, see: Son, Y.; Cheong, Y.; Kim, N.; Chung, H.; Kang, D.G.; Pae, H.; *J. Signal Trans.*, **2011**, 2011, 792639.
- 43) 近藤隆、田淵圭章、櫻井宏明、*酸化ストレスの医学、診断と治療社*、**2009**、p.62-70.
- 44) 小澤俊彦、安西和紀、松本謙一郎、*放射線の科学 生体影響および防御と除去*、東京化学同人、**2012**、p55.
- 45) Yoshino, H.; Kumura, A.; *Amyotroph. Lateral. Scler.*, **2006**, 7, 241-245.
- 46) For a review, see: Higashi, Y.; Jitsuiki, D.; Chayama, K.; Yoshizumi, M., *Rec. Pat. Cardiovasc. Drug Discov.*, **2006**, 1, 85-93.
- 47) Saini, A.K.; H.S., A.K.; Sharma, S.S., *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, 568, 164-172.
- 48) Kawasaki, T.; Ishihara, K.; Ago, Y.; Nakamura, S.; Itoh, S.; Baba, A.; Matsuda, T., *Eur. J. Pharmacol.*, **2006**, 542, 92-99.
- 49) Yoshida, H.; Kwon, A.; Kaibori, M.; Tsuji, K.; Habara, K.; Yamada, M.; Kamiyama, Y.; Nishizawa, M.; Itoh, S.; Okumura, T., *Nitric Oxide*, **2008**, 18, 105-112.
- 50) Scurlock, R.; Rougee, R.; Bensasson, R.V.; Evers, M.; Dereu, N.; *Photochem. Photobiol.*

- 1991, 54, 733-736.
- 51) Hiroshi, M.; Kissner, R.; Koppenol, W.H.; Sies, H.; *FEBS Lett*, **1996**, 398(2-3), 179-182.
- 52) Noguchi, N.; Yoshida, Y.; Kaneda, H.; Yamamoto, Y.; Niki, E., *Biochem. Pharmacol*, **1992**, 44, 39-44.
- 53) 佐野圭司、高倉公朋。菊池晴彦、太田富雄、阿部弘、吉本高志、斎藤勇、浅野孝雄、石橋貞彦、*医学のあゆみ*、**1997**、182(4)、247-269.
- 54) 山口武典、佐野圭司、高倉公朋、安原一、浅野孝雄、斎藤勇、篠原幸人、*医学のあゆみ*、**1998**、184(2)、163-187.
- 55) Kuroda, S.; Tsuchidate, R.; Smith, M.L.; Maples, K.R.; Siesjö, B.K., *J. Cereb. Blood Flow Metab*, 1999, 19(7), 778-787.
- 56) Diener, H.; Lees, K.R.; Kyden, P.; Grotta, J.; Davalos, A.; Davis, S.M.; Shuaib, A.; Ashwood, T.; Wasiewski, W.; Alderfer, V.; Hårdmark, H.; Rodichok, L., *Stroke*, **2008**, 39, 1751-1758.
- 57) Tanito, M.; Li, Feng.; Anderson, R.E, *Exp. Eye Res*, **2010**, 91, 111-114.
- 58) Wong, W.T.; Kam, W.; Cunningbam, D.; Harrington, M.; Hammel, K.; Meyerle, C.B.; Cukra, C.; Cbew, E.Y.; Satta, S.R.; Ferris, F.L., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*, **2010**, 51(12), 6131-6139.
- 59) 明日の新薬 Web 版、株式会社テクノミック、<https://asushin2.com/>、2014年1月20日閲覧.
- 60) 板倉弘重、寺田幸代、*血管医学*、**2002**、3(2)、204-210.
- 61) Nakanishi, I.; Ohkubo, K.; Miyazaki, K.; Hakamata, W.; Urano, S.; Ozawa, T.; Okuda, H.; Fukuzumi, S.; Ikota, N.; Fukuhara, K.; *Chem. Res. Toxicol*, **2004**, 17, 26-31.
- 62) 井上正康監訳、*レドックス制御と抗酸化治療戦略*、医薬ジャーナル社、p156-189.
- 63) *THE MERCK INDEX THIRTEENTH EDITION*, p1759.
- 64) 山中宏、日野亨、中川晶子、坂本尚夫、*新編 ヘテロ環化合物 基礎編*、講談社サイエンティフィック、**2004**、p.69.
- 65) M. G. Simic, S. V. jovanovic, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 11, 5778-5782.
- 66) 中村明弘、*知っておきたい薬物治療*、東京化学同人、**2006**、p.265
- 67) K. R. Maples, *J. Biol. Chem.*, **1988**, 2623, 1709-1712.
- 68) 細山田真、*高尿酸血症と痛風*、**2010**、18(1)、1-4.
- 69) *高尿酸血症・痛風の治療ガイドライン*、日本痛風・核酸代謝学会、**2002**.
- 70) 山内俊一、*今日の治療薬 2006*、**2005**、p539-541.
- 71) Sautin, Y.Y.; Johnson, J.R.; *Nucleos, Nucleot, Nucl. Acids*, **2008**, 27(6), 608-619.
- 72) Ames, B.N.; Cathcart, R.; Schwiers, E.; Hochstein, P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1981**, 78(11), 6858-6862.
- 73) Davies, K.J.A.; Sevanian, A.; Muakkassah-kelly, S.F.; Hochstein, P., *Biochem. J*, **1986**, 235, 747-754.
- 74) Hooper, D.C.; Spitsin, S.; Kean, R.B.; Champion, J.M.; Dickson, G.M.; Chaudhry, I.; Koprowski, H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95, 675-680.
- 75) Church, W.H.; Ward, V.L., *Brain Res. Bull*, **1994**, 33, 419-425.

- 76) Davis, J.W.; Grandinetti, A.; Waslien, C.I.; Ross, G.W.; White, L.R.; Morens, D.M., *Am. J. Epidem.*, **1996**, *144*(5), 480-484.
- 77) Ascherio, A.; LeWitt, P.A.; Xu, K.; Eberly, S.; Watts, A.; Matson, W.R.C.; Marras, K.; Kiebertz, A.; Rudolpj, M.; Bogdnov, B.; Schwid, S.R.; Tennis, M.; Tanner, C.M.; Beal, M. F.; Lang, A.E.; Oakes, D.; Fahn, S.; Shoulson, I.; Schwarzschild, M.A. *Arch. Neurol.*, **2009**, *66*(12), 1460-1468.
- 78) Kim, T.; Pae, C.; Yoon, S.; Jang, W.; Lee, N.J.; Kim, J.; Lee, S.; Lee, C.; Paik, I.; Lee, C., *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **2006**, *21*, 344-348.
- 79) Keizman, D.; Ish-Shalom, M.; Berliner, S.; Maimon, N.; Vered, Y.; Artamonov, I.; Tsechori, J.; Nefussy, B.; Drory, V.E. *J. Neurol. Sci.*, **2009**, *285*, 95-99.
- 80) Ikeda, K.; Kawabe, K.; Iwasaki, Y. *J. Neurol. Sci.*, **2009**, *287*, 294.
- 81) Beal, M.F., Matson, W.R.; Storey, E.; Milbury, P.; Ryan, E.A.; Ogawa, T.; Bird, E.D., *J. Neurol. Sci.*, **1992**, *108*, 80-87.
- 82) Lekishvili, T.; Sassoon, J.; Thompsett, A.R; Green, A.; Ironside, J.W.; Brown, D.R., *Exp. Neurol.*, **2004**, *190*, 233-244
- 83) 加藤雅彦、久留一郎、*血圧*、**2007**、*14*(6)、618-623.
- 84) Johnson, R.J.; Kang, D.; Feig, D.; Kivlighn, S.; Kanellis, J.; Watanabe, S.; Tuttle, K.R.; Rodriguez-Iturbe, B.; Herrera-Acosta, J.; Mazzali, M.; *Hypertension*, **2003**, *41*, 1183-1190.
- 85) Gersch, C.; Pali, S.P.; Imaram, W.; Kim, K.M.; Karumanchi, S.A.; Angerhofer, A.; Johnson, R.J.; Henderson, G.N., *Nucleos. Nucleot. Nucl. Acids*, **2010**, *28*(2), 118-149.
- 86) Santos, C.X.C.; Anjos, E.I.; Augusto, O.; *Arch. Biochem. Biophys.*, **1999**, *372*(2), 285-294.
- 87) 猪又晃、*日薬理誌*、**2008**、*132*(5)、297-300.
- 88) 柿木智弘、*慶應義塾大学大学院修士論文*、**2009**.
- 89) Yasuda, D.; Takahashi, K.; Kakinoki, T.; Tanaka, Y.; Ohe, T.; Nakamura, S.; Mashino, T.; *MedChemComm*, **2013**, *4*, 527-529.
- 90) 伊藤舞、*慶應義塾大学修士論文*、**2011**.
- 91) King, L.J.; Parke, D.V.; Williams, R.T., *Biochem. J.*, **1966**, *96*, 266-277.
- 92) Papy-García, D.; Barbier, V.; Tournaire, M.; Cane, A.; Brugère, H.; Crumeyrolle-Arias, M.; Barriault, D., *Clin. Biochem.*, **2003**, *36*, 215-220.
- 93) Crumeyrolle-Arias, M.; Tournaire, M.; Rabot, S.; Malpoux, B.; Thiéry, J., *J. Neurosci. Res.*, **2008**, *86*, 202-207.
- 94) Crumeyrolle-Arias, M.; Tournaire, M.; Cane, A.; Launay, J.; Barriault, D.; Medvedev, A., *Biochem. Pharmacol.*, **2004**, *67*, 977-979.
- 95) Cane, A.; Tournaire, M.; Barriault, D., Crumeyrolle-Arias, M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *276*, 379-384.
- 96) Sarah, K.; Simon, T.; Yafeng, X.; Britt-Marie, S.; AstraZeneca, AB., *PCT Int. Appl.*, WO 2003051277, **26-6-2003**
- 97) Beer, R.J.S.; Clarke, K.; Khorana, H.G.; Robertson, A., *J. Chem. Soc.*, **1948**, 1605-1609.
- 98) Banks, E.C.; Doughty S.W.; Toms, S.M.; Wheelhouse, R.T.; Nicolaou, A., *FEBS J.*, **2007**.

274, 287-299.

- 99) Pereira, C.M.P.; Srefani, H.A.; Guzen, K.P.; Orfão, A.T.G., *Lett. Org. Chem*, **2007**, *4*, 43-46.
- 100) Ijaz, A.S.; Alam, M.; Ahmad, B., *Indian J. Chem., sect. B*, **1994**, *33B(3)*, 288-289.
- 101) Garden, S.J.; Silva, R.B. da; Pinto, A.C., *Tetrahedron*, **2002**, *58*, 8399-8412.
- 102) Popp, F.D.; Donigan, B.E., *J. Pharm. Sci*, **1979**, *68(4)*, 519-520
- 103) Caballero, J.; Muñoz, C.; Alzate-Morales, J.H.; Cunha, S.; Gano, L.; Bergmann, R.; Steinbach, J.; Kniess, T., *Eur. J. Med. Chem.*, **2012**, *58*, 272-280.
- 104) Viehe, H.G.; Janousek, Z.; Merenyi, R.; Stella, L., *Acc. Chem. Res.*, **1985**, *18(5)*, 148-154.
- 105) Joule, J.A.; Mills, K., *Heterocyclic Chemistry, fifth edition*, WILEY, **2010**, 20.13.
- 106) Katritzky, A.R.; Ramsden, C.A.; Joule, J.A.; Zhdankin, V.V., *handbook of Heterocyclic Chemistry third edition*, ELSEVIER, **2010**, p.147.
- 107) Minnotti, G., *Arch. Biochem. Biophys*, **1989**, *273*, 144-147.
- 108) Bernheim, F.; Bernheim, M.L.; Wilkur, K.M., *J. Biol. Chem*, **1948**, *174*, 257-264.
- 109) For a review, see: Hansch, C.; Leo, A.; Taft, R.W.; *Chem. Rev*, **1991**, *91*, 165-195.
- 110) Klein, S.M.; Cohen, G.; Cederbaum, A.I., *Biochemistry*, **1981**, *20*, 6006-6012.
- 111) Nash, T.C., *Biochem. J*, **1953**, *55*, 416-421.
- 112) 田中悠貴、慶應義塾大学大学院修士論文、**2011**.
- 113) Lebel, C.P.; Ischiropoulos, H.; Bondy, S.C.; *Chem. Res. Toxicol*, **1992**, *5*, 227-231.
- 114) Mosmann, T.; *J. Immunol, Methods*, **1983**, *65*, 55-63.
- 115) Yamaji, K.; Sarker, K.P.; Maruyama, I.; Hizukuri, S.; *Plant. Med*, **2002**, *60*, 16-19.
- 116) Ohe, T.; Mashino, T.; Hirobe, M., *Arch. Biochem. Biophys*, **1994**, *310*, 402-409.

論文目録

1.主論文

尿酸のラジカル消去機構を規範とした新規抗酸化活性医薬品リード化合物の創製研究

2.主論文に関する原著論文

Yasuda, D.; Takahashi, K.; Ohe, T.; Nakamura, S.; Mashino, T., Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: The suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress, *Bioorg. Med. Chem.*, **2013**, *21*, 7709-7714.

3.参考論文

Yasuda, D.; Takahashi, K.; Kakinoki, T.; Tanaka, Y.; Ohe, T.; Nakamura, S.; Masino, T.; Synthesis, radical scavenging activity and structure-activity relationship of uric acid analogs, *MedChemComm*, **2013**, *4*, 527-529.

本論文に関連した学会発表

1. 口頭発表

- (1) **安田大輔**、柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、ヒドロキノン等価構造を有する尿酸誘導体のデザインと抗酸化活性、第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会、福岡、2009/6/11-12
- (2) **安田大輔**、柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、ヒドロキノン等価構造を有する尿酸誘導体のデザインと抗酸化活性、第 62 回日本酸化ストレス学会学術集会、福岡、2009/6/11-12
- (3) 伊藤舞、**安田大輔**、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸類縁体の peroxynitrite 消去活性、日本薬学会第 130 年会、岡山、2010/3/28-30
- (4) 伊藤舞、**安田大輔**、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸類縁体の peroxynitrite と nitric oxide 消去活性、第 63 回日本酸化ストレス学会学術集会、神奈川、2010/6/24-25
- (5) 田中陽子、**安田大輔**、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸アナログの抗酸化活性と構造活性相関-2、第 55 回日本薬学会関東支部大会、千葉、2011/10/08
- (6) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、3 位置換 Oxindole 誘導体の Xanthine Oxidase 阻害活性と構造活性相関、日本薬学会第 132 年会、北海道、2012/3/28-3
- (7) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、抗酸化活性尿酸アナログのデザイン、合成と構造活性相関、第 28 回日本酸化ストレス学会関東支部会、埼玉、2013/12/21

2. ポスター発表

- (1) Takahashi, K.; Kakinoki, T.; **Yasuda, D.**; Nakamura, S.; Mashino, T., Synthesis, Structure-Activity Relationship and Antioxidant Activity of Uric Acid Analogs. Society for Free Radical Research Europe Meeting, Rome, Italy, 8/25-30/2009.

(次頁へ続く)

- (2) **安田大輔**、柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、新規尿酸アナログの抗酸化活性とキサンチンオキシダーゼ阻害活性、第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム、2009/11/25-27、東京
- (3) **安田大輔**、柿木智宏、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、溶解度の高い尿酸アナログの抗酸化活性、日本薬学会第 130 年会、2010/3/28-30、岡山
- (4) Takahashi, K.; Ito, M.; **Yasuda, D.**; Nakamura, S.; Mashino, T., Peroxynitrite Scavenging Activity of Antioxidative Synthetic Uric Acid Analogs., International Symposium on Free Radical Research: Contribution to Medicine, Kyoto, Japan, 1/20-22/2011
- (5) **安田大輔**、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、尿酸類縁体の抗酸化活性とキサンチンオキシダーゼ阻害活性; 五員環部位の構造変換、日本薬学会第 131 年会、2011/3/28-31、静岡
- (6) **安田大輔**、高橋恭子、中村成夫、増野匡彦、置換 phenacyl 基を有する 5-hydroxyoxindole 誘導体のラジカル消去活性と XO 阻害活性、第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会、北海道、2011/7/2-3
- (7) **Yasuda, D.**; Tanaka, Y.; Kakinoki, T.; Takahashi, K.; Nakamura, S.; Mashino, T., Developing of Novel Antioxidant Based on a Structure of Uric Acid, Potent Endogenous Antioxidant, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Tokyo, Japan, 11/29-12/2/2011
- (8) **Yasuda, D.**; Tanaka, Y.; Kakinoki, T.; Takahashi, K.; Nakamura, S.; Mashino, T., Developing of Novel Antioxidant Based on a Structure of Uric Acid, Potent Endogenous Antioxidant, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium, Tokyo, Japan, 11/29-12/2/2011
- (9) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、脂溶性を向上した 5-Hydroxy-2-oxindole 誘導体の抗酸化活性、第 65 回日本酸化ストレス学会学術集会、徳島、2012/6/7-8
- (10) **Yasuda, D.**; Ito, M.; Takahashi, K.; Ohe, T.; Nakamura, S.; Mashino, T.; Antioxidant activity of synthetic uric acid analogs, Society for Free Radical Research International 16TH BIENNIAL MEETING, London, UK, 9/6-9/2012
[Informa Healthcare Prestigious Poster Award 2012]

(次頁へ続く)

- (12) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、新規創薬テンプレートとしての抗酸化物質 5-Hydroxy-2-oxindole、第 30 回メディシナルケミストリーシンポジウム、東京、2012/11/28-30.
- (13) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、アルキル置換フェナシル基を有する 5-ヒドロキシオキシインドール誘導体の H₂O₂ 誘発細胞死に対する細胞保護効果、第 66 回日本酸化ストレス学会学術集会、名古屋、2013/6/13-14.
- (14) **Yasuda, D.**; Takahashi, K.; Ohe, T.; Nakamura, S.; Mashino, T.; Development of 3,5-dihydroxy-2-oxindole as novel antioxidant for lipid peroxidation and intracellular oxidative stress, Biennial Meeting of Society for Free Radical Research Asia, Linkou, Taiwang, 10/16-19/2013.
[Informa Healthcare Prestigious Poster Award 2013]
- (15) **安田大輔**、高橋恭子、大江知之、中村成夫、増野匡彦、脂溶性を調節した 5-ヒドロキシオキシインドール誘導体の細胞内酸化ストレス抑制効果、日本薬学会第 134 年会、2014/3/27-30、熊本

謝辞

本博士論文研究を行うにあたり、研究の機会を与えていただき、また卒論研究時から 6 年間終始懇切丁寧なご指導を賜りました、本学薬学部医薬品化学講座 増野匡彦教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、適切な助言をいただきました本学薬学部医薬品化学講座 大江知之准教授に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、実験手技から論文執筆まで細部にわたり終始熱心にご指導下さいました、本学薬学部医薬品化学講座 高橋恭子助教に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり、適切な助言をいただきました、日本医科大学化学教室 中村成夫教授に深く感謝致します。

本論文のご高閲を賜り、多くの助言をいただきました、本学薬学部有機薬化学講座 須貝威教授、本学薬学部天然医薬資源学講座 羽田紀康准教授に深く感謝いたします。

GC-HRMS 測定を行っていただき、また実験機器の使用法について懇切丁寧にお教えくださいました、本学薬学部 分子標的創薬研究開発センター 羽田純子氏に深く感謝いたします。

本研究を行うにあたり、実験手技を丁寧にご指導いただき、また博士過程学生としての心構えをお教えくださいました、帝京大学薬学部 畑中雅史助教に深く感謝致します。

本研究の基礎となる知見および実験手技を全般にわたって懇切丁寧にお教えいただき、常に励ましていただきました、柿木智宏修士に心から感謝致します。

本研究の一部を担っていただくとともに、考察の機会を与えていただきました、田中陽子学士、平石至学士に深く感謝致します。

研究室生活をともに過ごした、先輩、同輩、後輩達に感謝致します。

また、日々の生活を支えていただきました家族に心より感謝致します。

本研究は、慶應義塾博士課程学生支援プログラム 2011 (全塾選抜枠)、同 2012 (研究科推薦枠)、同 2013 (全塾選抜枠) の援助を受けて行いました。関係各位に御礼申し上げます。

最後になりましたが、医薬品化学講座の益々の発展をお祈り申し上げます。

2014 年 3 月
安田 大輔