

ホウ素中性子捕捉療法用ホウ素-10 含有薬剤の
高感度蛍光分析のための蛍光センサーの開発に
関する研究

2023 年

高田 慎也

略語表

BNCT	Boron Neutron Capture Therapy
BPA	4-[¹⁰ B]Borono-L-Phenylalanine
BSH	Mercaptoundecahydro- <i>closo</i> -dodecaborate
F.I.	Fluorescence Intensity
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HPBI	2-(2-Hydroxyphenyl)-1 <i>H</i> -benzimidazole
ICP	Inductively Coupled Plasma
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer
LET	Liner Energy Transfer
φ	Quantum Yield
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SS	Stokes Shift

目次

序論	1
第1章 ボロン酸蛍光センサーの反応性改善に関する検討	
1.1. 背景	4
1.2. 実験材料および実験方法	8
1.3. 結果	12
1.4. 考察	20
第2章 ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に関する検討	
2.1. 背景	22
2.2. 実験材料および実験方法	24
2.3. 結果	26
2.4. 考察	30
第3章 生体試料中ボロン酸の高感度定量分析のためのボロン酸蛍光センサーの開発	
3.1. 背景	32
3.2. 実験材料および実験方法	34
3.3. 結果	38
3.4. 考察	44
結語	46
合成の部	48
論文目録	57
謝辞	58
参考文献	59

序論

がんはわが国における最大の死因であり^[1]、超高齢化社会を迎えがんによる死亡者数は今後も増加すると考えられている。ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy、BNCT) は ^{10}B 原子と熱中性子線との $^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる高 LET 放射線 (α 線、Li 反跳原子核) を利用するがん治療法であり、その飛程の短さ (4-9 μm) 故に予め ^{10}B 原子をがん細胞内に集積させることができれば、がん細胞を選択的に傷害することができる^[2,3]。2020 年に ^{10}B 薬剤 4- ^{10}B borono-L-phenylalanine (BPA) が加速器熱中性子線照射装置とともに薬事承認され、切除不能な局所進行又は局所再発頭頸部がんに対する優れた治療効果を示していることから^[4,5]、他がん種への BNCT 適用を拡大し得る新たな ^{10}B 薬剤開発が切望されている。 ^{10}B 薬剤開発にあたっては、 $^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる短飛程高 LET 放射線が DNA 等を効率的に傷害するか調べるため、細胞内における ^{10}B 分布を評価する必要があるが、現状その方法は確立されていない。簡便かつ信頼性の高い細胞内 ^{10}B 分布評価法を開発できれば、 ^{10}B 薬剤開発に大きく貢献し得ると期待される。そこで本研究では、定性・定量分析のいずれにも適用可能な蛍光分析法の特徴に着目し、 ^{10}B 含有部位として頻用されるボロン酸構造^[6-8]を標的とした高感度定性・定量分析のための蛍光センサーの開発を計画した。

新規ボロン酸蛍光センサーの開発にあたり、第 1 章・第 2 章で既存センサー DAHMI の問題点である①ボロン酸との低反応性、②蛍光特性の悪さ、を解決し得る分子設計の検証を順次行い、第 3 章でこれらを統合して新規センサーを設計・合成しその有効性を明らかとした。

第 1 章では、DAHMI のボロン酸との反応速度の改善を目的としてボロン酸捕捉部位の可動性が錯形成反応速度に影響する可能性に着目し、DAHMI 基本骨格中の (methylimino)methyl 基を pyridyl 基へと変更した 2-(2-pyridyl)phenol 骨格を有する PPN-1 を設計・合成してその有効性を調べた。その結果、DAHMI は BPA 添加後 120 分経過しても蛍光強度が最大値に至らなかった一方で、PPN-1 は BPA 添加後 5 分以内に最大値に達し、その後 120 分間一定値を示した。このことから、ボロン酸捕捉部位の分子運動を抑制する本分子設計がボロン酸との反応速度の向上に有効である可能性を認めた。なお、PPN-1 の量子収率は DAHMI と同等で、BPA 添加後に添加前比 15 倍以上の蛍光を示し、その強

度は BPA 濃度との間に高い直線性を示した。

第 2 章では、DAHMI の蛍光特性の改善を目的として基本骨格への電子供与性部位の導入が有効である可能性に着目し、DAHMI の基本骨格である (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分を導入した BS-631 を設計・合成してその有効性を調べた。その結果、BS-631 は (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol と比較して、150 nm 以上の極大蛍光波長の長波長化と 1.7 倍のストークスシフトの拡大を示し、同基本骨格に diethylamino 基を有する DAHMI と比較しても 200 nm 以上の極大蛍光波長の長波長化と 10 倍のストークスシフトの拡大を示した。このことから、ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分の導入が有効である可能性を認めた。なお、BS-631 は蛍光極大波長が 631 nm と大きく長波長化したことから、固定化細胞において一般的な核染色試薬との共染色が可能となり、有用な蛍光試薬となる可能性を認めた。

第 3 章では新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発を目的として、第 1 章の知見から高いボロン酸反応性と量子収率が期待できる 2-(2-hydroxyphenyl)-1H-benzimidazole を基本骨格とし、第 2 章の知見から蛍光波長の長波長化とボロン酸反応前の蛍光強度抑制が期待できる 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分を導入した BITQ を設計・合成してその有効性を調べた。その結果、BITQ は所期の通り、ボロン酸反応後の高い量子収率、高い蛍光強度 Post/Pre 比、ボロン酸との速やかな反応性、蛍光波長の長波長化、およびストークスシフトの拡大を示した。BITQ は DAHMI と比べ、10 倍以上の量子収率、ボロン酸との反応性の高速化、およびストークスシフトの 4 倍以上の拡大を示し、次世代の高感度ボロン酸蛍光センサーとして DAHMI に置き換わるに足る十分な性能を有することが明らかとなった。これらの優れた特性に基づき、BITQ を用いてマウス血液中 BPA の定量を試みたところ、ICP-MS 法による定量値との間に傾き 1.0 の直線的な相関関係を示したことから、BITQ は固定化を要しない生細胞内ボロン酸分布の可視化のみならず、臨床 BNCT における血液中 BPA 濃度定量にも使用し得る有効なボロン酸蛍光センサーである可能性が示された。

以上本研究において、 ^{10}B 薬剤開発のボトルネックである細胞内 ^{10}B 分布評価法の開発のためには蛍光分析法のための新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発が重要と考え、既存センサーの有する諸問題点を解決し、得られた分子設計に関する考察を基盤にそれらを統合して優れた特性を有する新規高感度ボロン酸蛍光センサー BITQ を開発した。これらの知見は、今後の ^{10}B 薬剤開発研究および BNCT 領域における生物・医学的研究の

発展に有用な情報と手段を提供するものであると考えられる。

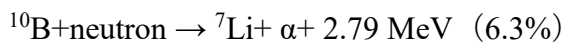
これらについて、以下に詳述する。

第 1 章

ボロン酸蛍光センサーの反応性改善に関する検討

1.1. 背景

ホウ素中性子捕捉療法 (Boron Neutron Capture Therapy, BNCT) は、 ^{10}B と熱中性子線との核変換反応 ($^{10}\text{B}(\text{n}, \alpha)^7\text{Li}$, 式 1) により生じる短飛程の高 LET 放射線 (α 線、Li 反跳原子核) を利用するがん治療法であり、がん細胞選択性を有する ^{10}B 薬剤と組み合わせることにより、がん選択的な治療が可能である^[2,3]。



2020 年に BNCT 用 ^{10}B 薬剤 4- ^{10}B]borono-L-phenylalanine (BPA, Fig. 1) が局所進行又は局所再発頭頸部がんを対象として薬事承認され、他治療法の適用が困難となった頭頸部がん患者に対して優れた治療効果を示してきている^[4,5]。この結果を受け BNCT の他がん種への適用拡大が期待されているが^[9,10]、これまでに、BPA 以外で臨床上的有効性を調べた ^{10}B 薬剤は mercaptoundecahydro-*closo*-dodecaborate (BSH, Fig. 1) しか存在しない。BSH の有効性はグリオーマを対象として調べられたが、高親水性の BSH は細胞膜透過性が低く腫瘍組織間質への集積機序は血液脳関門の破綻であったことから^[11,12]、L-type amino acid transporter 1 (LAT-1) を介してがん細胞内に集積する BPA のように^[13,14]、がん細胞内への能動的な集積機序を有する新たな ^{10}B 薬剤の開発が切望され、種々の検討が行われている^[15-17]。

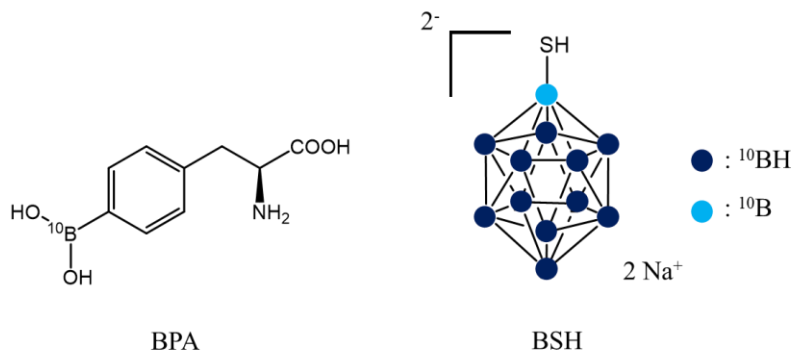


Fig. 1. Structures of BPA and BSH

BNCT の治療原理は、がん細胞内において $^{10}\text{B}(n, \alpha)^7\text{Li}$ 反応により生じる高 LET 放射線と DNA 等細胞内成分との相互作用の結果引き起こされる細胞死を基盤とする。したがって、細胞一個分に相当するとされる高 LET 放射線の飛程の長さ (4-9 μm) を考慮すると、 ^{10}B 薬剤の開発プロセスにおいてはその有効性を評価するための手段の一つとして、細胞内取込後の ^{10}B 薬剤の局在評価が重要と考えられる (Fig. 2) [18,19]。しかしながら現状その分析方法は確立されておらず、 ^{10}B 薬剤開発プロセスにおけるハードルの一つとなっている。簡便かつ信頼性の高い細胞内 ^{10}B 分布評価法を開発できれば、 ^{10}B 薬剤開発の効率化に大きく貢献すると期待される。現在までに、二次イオン質量分析法による細胞内 ^{10}B 分布解析が報告されたが[20]、本法は試料の煩雑な前処理や専用の施設を要するため汎用性に乏しく、また、生細胞には適用し得ない問題点を有していた。

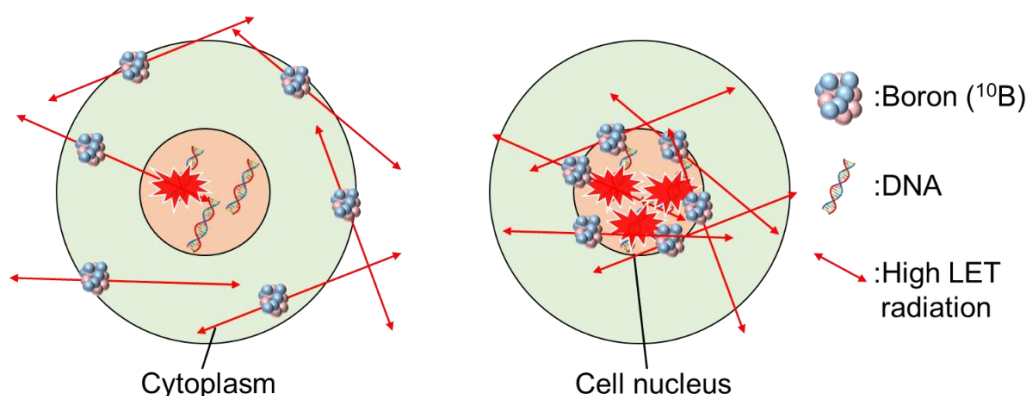


Fig. 2. The effect of intracellular ^{10}B distribution on BNCT

そこで筆者は、定性・定量分析のいずれにも適用可能な蛍光分析法の特徴に着目し、BPA を始め多くの ^{10}B 薬剤の ^{10}B 含有部位として頻用されるボロン酸構造^[6-8]を標的とした高感度定性・定量分析のためのボロン酸蛍光センサーの開発を計画した。本研究において高感度ボロン酸蛍光センサーの開発に成功すれば、 ^{10}B 薬剤の細胞内分布の蛍光顕微鏡による可視化や、血液や腫瘍ホモジネート等の生体由来試料中 ^{10}B 薬剤の定量分析への応用も可能と期待され、BNCT 領域における生物・医学的研究あるいは BNCT 実臨床の発展に大いに貢献し得る。

本目的に資する蛍光センサーの開発にあたり、細胞膜透過性を担保する適切な疎水性と分子量を前提条件とし、①ボロン酸との速やかかつ選択的な反応性、②優れた蛍光特

性、を満たすセンサーの開発が有効と考えた。これまでにボロン酸蛍光センサーとして DAHMI が報告されているが^[21]、①、②いずれにも問題を残していることから、著者は本研究において、DAHMI の特性を改善する分子設計に関する検証を行い、その結果を基盤として新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発に繋げることを計画した。

DAHMI はボロン酸と反応後、430 nm 付近に極大蛍光波長を示すことから (Fig. 3)、細胞内ボロン酸の検出試薬として利用されてきているが^[8,21,22]、ボロン酸との反応が遅く定常状態に達するまでに長い時間を要するため、動的な変動があり得る条件下での細胞内ボロン酸分布の評価や、ボロン酸の定量用途には適用しにくい問題点があった。著者は、DAHMI のボロン酸との反応が遅い理由として、構造中のボロン酸捕捉部位である N 原子を含む(methylimino)methyl 基が立体障害が少なく柔軟な構造であることから分子運動が起りやすく、錯形成反応に不利となっていると考えた。

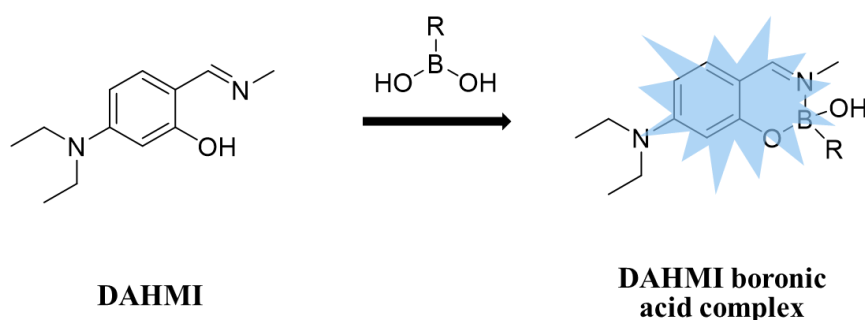


Fig. 3. Schematic of boronic acid detection by fluorescent complex with DAHMI

そこで著者は、ボロン酸との反応性の向上を目的に、(methylimino)methyl 基を嵩高い構造に変更し N 原子を含む部位の分子運動を抑制すればボロン酸との反応性が改善できるのではないかと考え、(methylimino)methyl 基を pyridyl 基に置換した 2-(2-pyridyl)phenol を基本骨格とした新規センサーの開発を計画した。新規センサーの設計にあたり、2-(2-pyridyl)phenol と類似する 2,2'-bipyridine 骨格を有する亜鉛蛍光センサーが優れた細胞膜透過性を示した報告に着目し^[23]、同亜鉛センサー構造を 2-(2-pyridyl)phenol 骨格に置換した PPd-1 を設計した (Fig. 4)。PPd-1 は CLogP が 4.3 となり細胞内標的化のためには疎水性がやや高い可能性が考えられたことから、ボロン酸捕捉部位の対側に位置するベンゼン環をピリジン環に置換した PPN-1 (ClogP 3.0, Fig. 4) も併せて設計し、以下の検討を

行った。

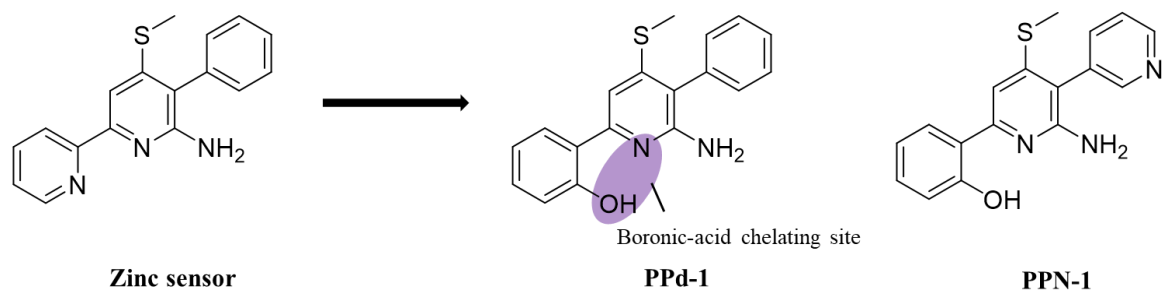


Fig. 4. Structures of PPd-1 and PPN-1

1.2. 実験材料および実験方法

1.2.1. 実験材料

試薬および分析機器

試薬はすべて和光純薬工業（日本、大阪）、ナカライテスク（日本、京都）、または東京化成工業（日本、東京）から購入した。また BPA はステラファーマ（日本、大阪）から提供された ^{10}B 濃縮 BPA (4-[^{10}B]borono-L-phenylalanine: BPA) を使用した。さらに、これらを精製することなく使用した。

反応に用いた溶媒は市販品の特級グレードを使用した。スペクトル測定には、市販の分光分析用のものを使用した。 ^1H NMR スペクトルは、Varian NMR システム (400 MHz、Agilent Technologies、CA、USA) を用いて測定し、化学シフトはテトラメチルシランを内部標準とした δ (ppm) 値で示した。質量スペクトル (MS) および高分解能質量スペクトル (HRMS) は、JMS-700 (2) 質量分析計 (日本電子株式会社、東京、日本) を用いて測定した。励起・蛍光スペクトル測定および蛍光強度測定には、FP-8600 spectrometer (JASCO Corporation、日本、東京) または EnSpire Multilabel Reader 2300 (PerkinElmer Japan、日本、神奈川) を使用した。

1.2.2. 実験方法

PPd-1、PPN-1 および DAHMI は DMSO 中にストック溶液として保存し、測定前に PBS、Tris-HCl、HBSS で希釈して用いた。

1. PPd-1 および PPN-1 の蛍光特性評価

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPd-1、PPN-1 (0.01 mM) とフェニルボロン酸 (1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 1130V) を用いて励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定し、それぞれの極大励起波長 ($\lambda_{\text{ex-max}}$)、極大蛍光波長 ($\lambda_{\text{em-max}}$) および蛍光強度 (Fluorescence Intensity (F.I.)) を求めた。

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPd-1、PPN-1 (0.01 mM) とフェニルボロン酸 (0 or 1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 1130V) を用いてそれぞれの $\lambda_{\text{ex-max}}$ における蛍光スペクトルを測定した。

2. PPN-1 および DAHMI の蛍光特性比較

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (1.0 mM) と BPA (1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 700V) を用いて励起スペクトルおよび蛍光スペクトルを測定し、それぞれの λ_{ex-max} および λ_{em-max} を求めた。

DAHMI は、調製 120 分後に光電子増倍管電圧: 800V とした以外は同様に行った。

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (1.0 mM) と BPA (0 or 1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 700V) を用いて λ_{ex-max} における蛍光スペクトルを測定した。

3. BPA 添加後の蛍光強度の経時的変化

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (1.0 mM) と BPA (1.0 mM) となるように調製した。調製後 0-120 分間における蛍光強度を蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 700V、水冷ペルチェセルホルダー: 25°C、 λ_{ex} : 387 nm、 λ_{em} : 442 nm) を用いて各 3 回測定し、時間に対してプロットした。

DAHMI は、 λ_{ex} : 411 nm、 λ_{em} : 431 nm とした以外は同様に行った。

4. 絶対量子収率測定

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (0.2 mM) と BPA (0.2 mM) となるように調製し、調製 5 分後に C9920-02G (浜松ホトニクス、日本、浜松) を用いて λ_{ex} : 386 nm の条件で絶対量子収率 (ϕ_{BPA}) を測定した。

DAHMI は、最終濃度を DAHMI (0.05 mM) と BPA (0.05 mM) とし、調製 120 分後、 λ_{ex} : 408 nm とした以外は同様に測定した。

5. BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (1.0 mM) と BPA (0, 0.1, 0.5, 0.75, 1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 700V) を用いて λ_{ex} : 387 nm における蛍光スペクトルを各 3 回測定し、442 nm における蛍光強度を BPA 濃度に対してプロットし、相関性を評価した。

6. 検出・定量限界の算出

50% DMSO/PBS 中、最終濃度が PPN-1 (1.0 mM) と BPA (0, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04 mM) となるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 1130V) を用いて λ_{ex} : 387 nm における蛍光スペクトルを 5-6 回測定し、442 nm における蛍光強度を BPA 濃度に対してプロットした。また、得られたデータに対して線形回帰分析を行い、検出限界と定量限界を算出した。

式は以下のものを用いた

$$\text{検出限界} = 3\sigma/\text{slope}$$

$$\text{定量限界} = 10\sigma/\text{slope}$$

σ : PPN-1 1.0 mM における蛍光強度の標準偏差, slope: 回帰線の傾き。

7. 錯体形成比率の決定 (Job's plot 解析)

50% DMSO/PBS 中、PPN-1 と BPA の濃度の和を 1.0 mM に固定し、モル比がそれぞれ 1:9~9:1 の割合になるように調製した。調製 5 分後に蛍光分光光度計 (光電子増倍管電圧: 1130V) を用いて λ_{ex} : 387 nm における蛍光スペクトルを 3 回測定し、442 nm における蛍光強度をモル比に対してプロットした。また、モル比の両半値について線形回帰分析を行い、2 つの回帰直線の交点から錯体形成比率を決定した。

8. 各種金属カチオン存在下における蛍光強度変化

50% DMSO/Tris-HCl 中、最終濃度が PPN-1 (0.1 mM) と BPA または金属カチオン (NaCl、KCl、MgCl₂ · 6H₂O、CaCl₂、FeCl₂ · 4H₂O、FeCl₃ · 6H₂O、CoCl₂ · 6H₂O、ZnCl₂、CdCl₂ · 2.5H₂O、NiCl₂ · 6H₂O、CuCl₂、MnCl₂ · 4H₂O、AlCl₃ · 6H₂O: 1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後にプレートリーダーを用いて λ_{ex} : 387 nm における λ_{em} : 442 nm の蛍光強度を 3 連で 3 回測定し、金属カチオンを添加していない PPN-1 溶液と比較した相対値で表した。

DAHMI は、調製 120 分後、 λ_{ex} : 411 nm、 λ_{em} : 431 nm とした以外は同様に行った。

9. BPA および各種金属カチオン共存下における蛍光強度変化

50% DMSO/Tris-HCl 中、最終濃度が PPN-1 (0.1 mM) と BPA および金属カチオン (NaCl、KCl、MgCl₂ · 6H₂O、CaCl₂、FeCl₂ · 4H₂O、FeCl₃ · 6H₂O、CoCl₂ · 6H₂O、ZnCl₂、CdCl₂ · 2.5H₂O、NiCl₂ · 6H₂O、CuCl₂、MnCl₂ · 4H₂O、AlCl₃ · 6H₂O: 1.0 mM) となるように調製した。調製 5 分後にプレートリーダーを用いて λ_{ex} : 387 nm における λ_{em} : 442 nm の蛍光強度を 3 連で 3 回測定し、金属カチオンを添加していない PPN-1-BPA 溶液と比較した相対値で表した。

DAHMI は、調製 120 分後、 λ_{ex} : 411 nm、 λ_{em} : 431 nm とした以外は同様に行った。

10. 細胞内 BPA の検出

T3M-4 ヒト膵臓腺癌細胞 (RCB1021) は、理研バイオリソース研究センター (日本、茨城) から提供され、10% 牛胎児血清を含む DMEM/Ham's F-12 中、37°C、5% CO₂ 下の条件下において培養した。実験の 2 日前に、T3M-4 細胞をガラス底付き 35 mm ディッシュ (松浪硝子工業、大阪、日本) に播種し培養した。Hank's balanced salt solution (HBSS: 125 mM choline chloride, 4.8 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 5.6 mM D-Glucose, 25 mM HEPES) で 3 回洗浄後、BPA-Fructose (1 mM) 含有 HBSS を添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。BPA 未添加群は、HBSS のみを添加して 30 分間インキュベートした。HBSS で 3 回洗浄後、PPN-1 (10 μ M) 0.5% DMSO/HBSS を添加し、氷上で 5 分間静置し、BZ-X810 (Keyence, Osaka, Japan) 装置を用いてそのまま蛍光画像を撮像した。

1.3. 結果

合成

2-ヒドロキシアセトフェノンを出発原料とし、4段階反応により PPd-1 および PPN-1 を総収率 1.1%、4.2%で合成した。

PPd-1 および PPN-1 の蛍光特性

Table 1 にフェニルボロン酸添加後における PPd-1 および PPN-1 の極大励起波長、極大蛍光波長および蛍光強度を示した。PPd-1、PPN-1 とともにフェニルボロン酸添加により蛍光強度の増大を示し、PPd-1 は、PPN-1 と比較して 1.5 倍程度強い蛍光強度を示した。

Table 1, Fluorescence properties of PPd-1 and PPN-1 after phenylboronic acid addition.

Compound	λ_{ex-max}	λ_{em-max}	F.I. (Post/Pre)
PPd-1	368 nm	433 nm	252.8 / 46.2
PPN-1	369 nm	441 nm	175.9 / 38.5

PPN-1 および DAHMI の蛍光特性比較

PPN-1 の BPA 添加有無における蛍光スペクトルを Fig. 5 に、PPN-1 および DAHMI の BPA 添加後の蛍光特性を Table 2 にまとめた。PPN-1 の BPA 添加後における極大励起波長、極大蛍光波長はそれぞれ 387 nm、442 nm でありストークスシフトは 55 nm であった。また、BPA 添加後の PPN-1 の絶対量子収率は 0.9% であった。DAHMI は既報^[24]と同等の結果であった。

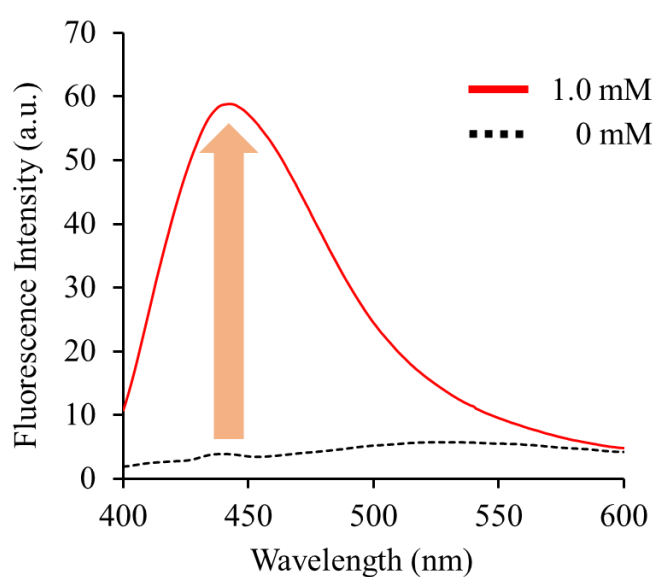


Fig. 5. Fluorescence spectra of 1.0 mM PPN-1 with (red line) or without (black dot line) the addition of 1.0 mM BPA in 50% DMSO/PBS ($\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$).

Table 2, Fluorescence properties of PPN-1 and DAHMI after BPA addition.

Compound	$\lambda_{\text{ex-max}}$	$\lambda_{\text{em-max}}$	Stokes shift (SS)	F.I. (Post/Pre)	ϕ_{BPA}
PPN-1	387 nm	442 nm	55 nm	58.8 / 3.9	0.9%
DAHMI	411 nm	431 nm	20 nm	78.7 / 0.5	0.8%

BPA 添加後の蛍光強度の経時的変化

PPN-1 は、BPA 添加後速やかに蛍光強度が上昇し 5 分以内に最大値に達し、その後 120 分間一定であった。一方、DAHMI は BPA 添加後に経時的に蛍光強度が増大し、120 分後においても定常状態に至らなかった。

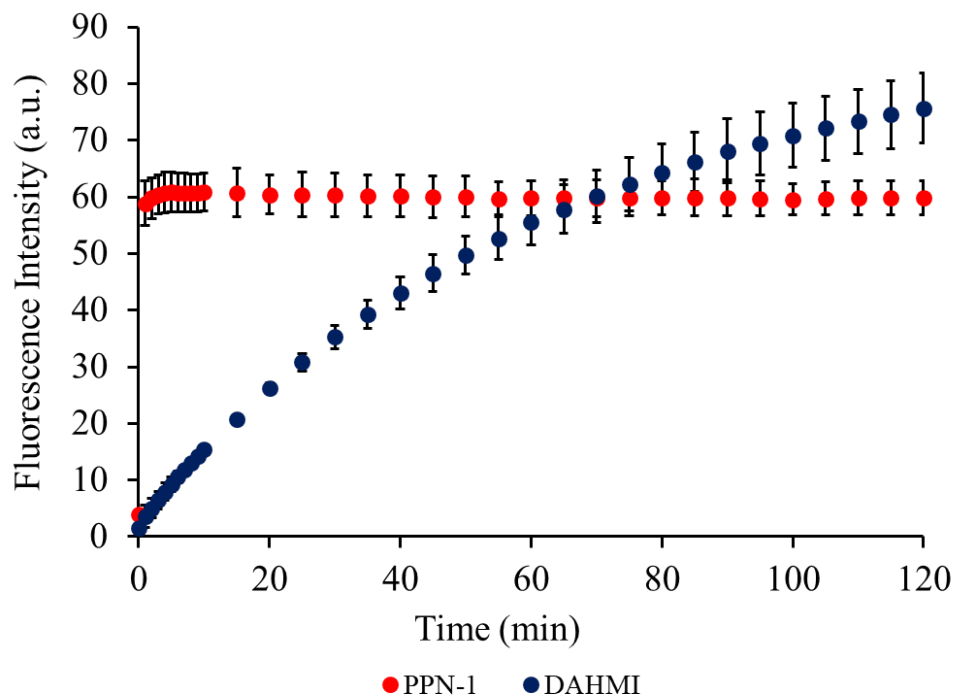


Fig. 6. Temporal change in fluorescence intensity of PPN-1 and DAHMI after BPA addition in 50% DMSO/PBS ($\lambda_{ex} = 387$ nm and 411 nm for PPN-1 and DAHMI, respectively, $\lambda_{em} = 442$ nm and 431 nm for PPN-1 and DAHMI, respectively).

BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性および検出限界・定量限界

BPA 添加濃度に対する PPN-1 の蛍光強度の変化を Fig. 7、8 に示す。Fig. 7 は広範囲の BPA 濃度変化に対する直線性を調べ、Fig. 8 は BPA 低濃度域での直線性を調べ検出限界、定量限界の算出のために用いた。Fig. 7 より、PPN-1 は、測定した BPA 添加濃度 0~1 mM までの間で R^2 値 0.9995 と高い直線性を示した。また、Fig. 8 より算出された PPN-1 の BPA に対する検出限界、定量限界はそれぞれ 1.80 μM 、6.01 μM (^{10}B としてそれぞれ 0.018 ppm, 0.060 ppm) であった。

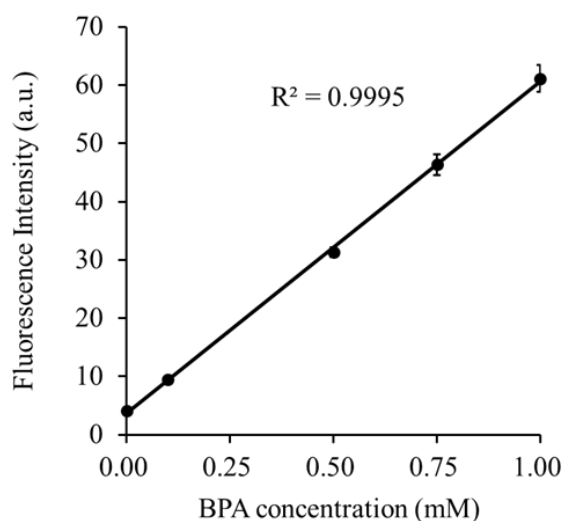


Fig. 7. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of PPN-1 and BPA concentrations (0.00-1.00 mM) in 50% DMSO/PBS.

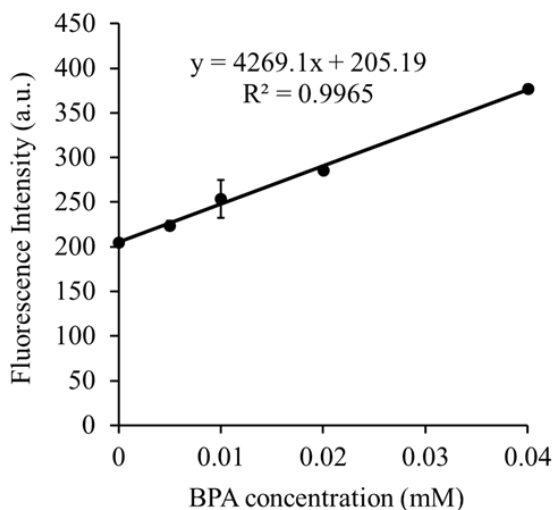


Fig. 8. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of PPN-1 and BPA concentrations (0-0.04 mM) in 50% DMSO/PBS.

Job's plot 解析

Job's plot 解析の結果を Fig. 9 に示す。直線の交点が 0.5 付近であることから、PPN-1 の BPA との錯体形成比率は 1:1 であることが示唆された^[23]。

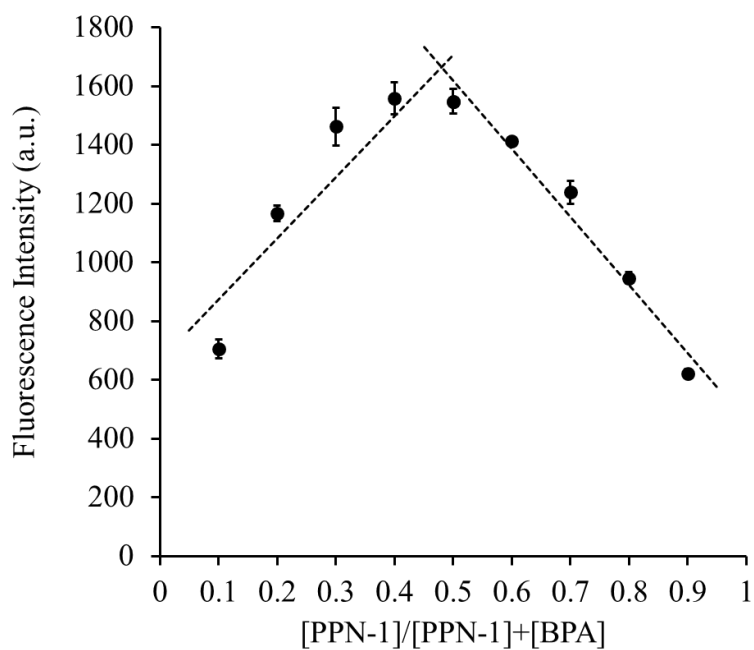


Fig. 9. Job's plot of PPN-1 and BPA. The total concentration of PPN-1 and BPA is fixed to 1.0 mM in 50% DMSO/PBS ($\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 442 \text{ nm}$).

金属カチオンとの反応性

PPN-1 および DAHMI のそれぞれに対する各種金属カチオン添加による蛍光強度変化を Fig. 10、11 に示す。PPN-1 は金属カチオンの添加により蛍光強度の上昇を示さなかった。また、DAHMI においても同様の結果であった。一方で、PPN-1・DAHMI とともに Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 添加で蛍光強度の抑制が確認され、PPN-1 でより大きな抑制を示した。

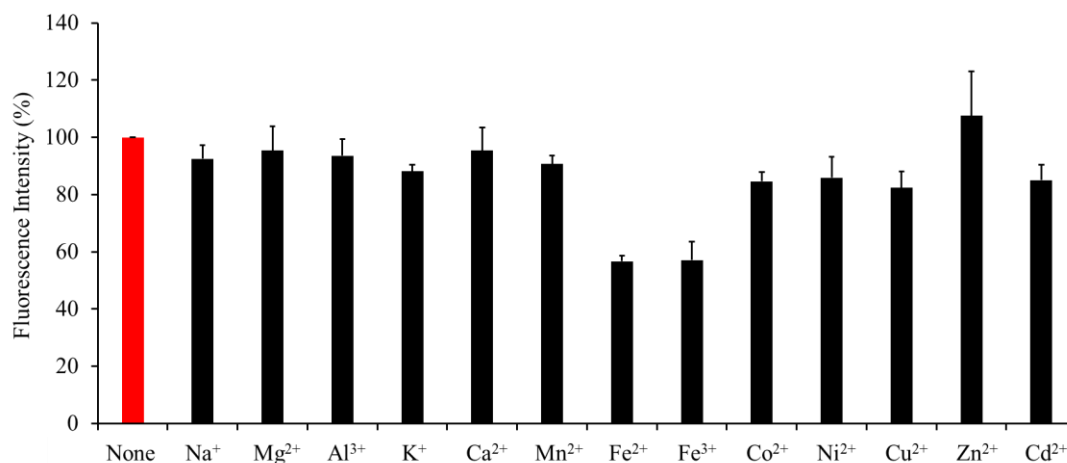


Fig. 10. Fluorescence intensities of PPN-1 ($\lambda_{\text{ex}} = 387 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 442 \text{ nm}$) after the addition of various metal cations in 50% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of the PPN-1 and metal cations are 0.1 mM and 1.0 mM, respectively.

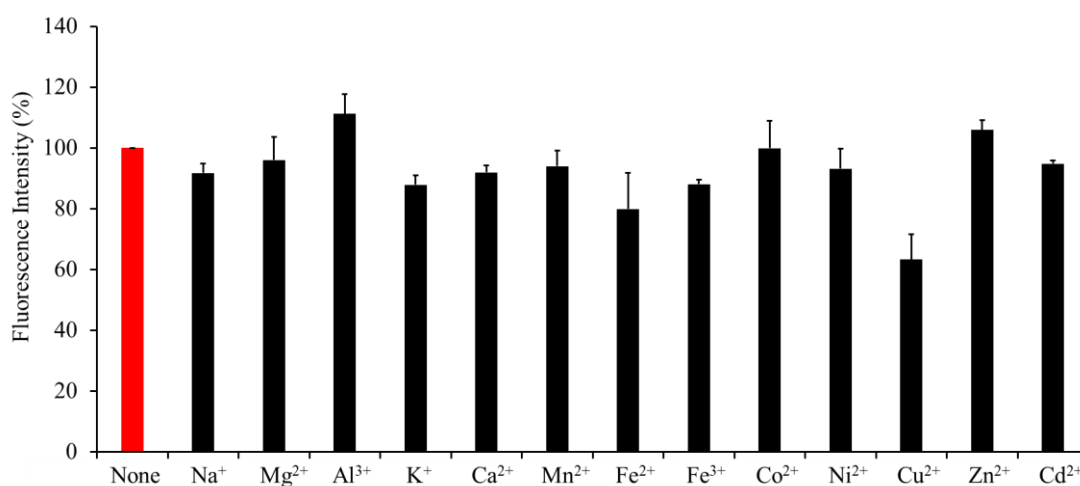


Fig. 11. Fluorescence intensities of DAHMI ($\lambda_{\text{ex}} = 411 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 431 \text{ nm}$) after the addition of various metal cations in 50% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of the DAHMI and metal cations are 0.1 mM and 1.0 mM, respectively.

BPA と金属カチオンの共存下における蛍光強度変化

PPN-1 および DAHMI のそれぞれに対して、BPA と種々金属カチオンを共存させた場合の蛍光強度変化を Fig. 12、13 に示す。PPN-1 は、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} と BPA の共存下で蛍光強度の上昇に抑制を示した。また、この傾向は DAHMI においても同様の傾向であった。

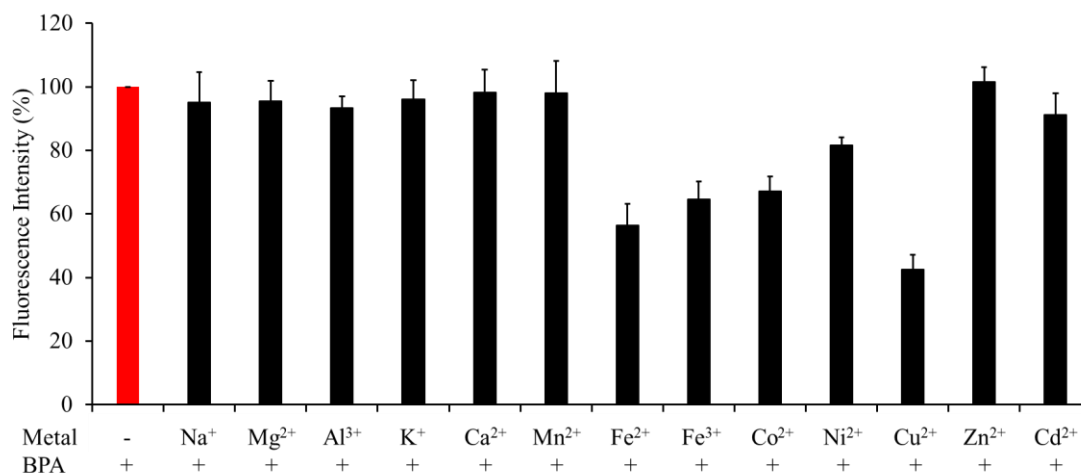


Fig. 12. The effects of the coexistence of metal cations in the PPN-1-BPA fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 387$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 442$ nm) in 50% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of PPN-1, BPA, and metal cations are 0.1 mM, 1.0 mM, and 1.0 mM, respectively.

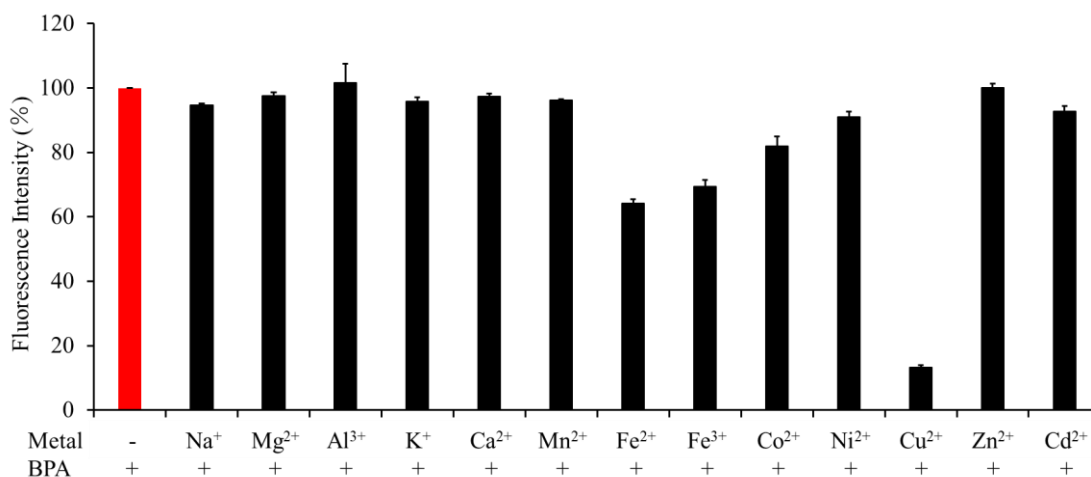


Fig. 13. The effects of the coexistence of metal cations in the DAHMI-BPA fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 411$ nm, $\lambda_{\text{em}} = 431$ nm) in 50% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of DAHMI, BPA, and metal cations are 0.1 mM, 1.0 mM, and 1.0 mM, respectively.

T3M-4 細胞を用いた細胞内 BPA 蛍光イメージング

Fig. 14 に PPN-1 を用いた細胞の蛍光顕微鏡画像を示す。得られた蛍光画像を比較すると、BPA-Fructose 添加の有無によって蛍光強度に明確な差を認めなかった。

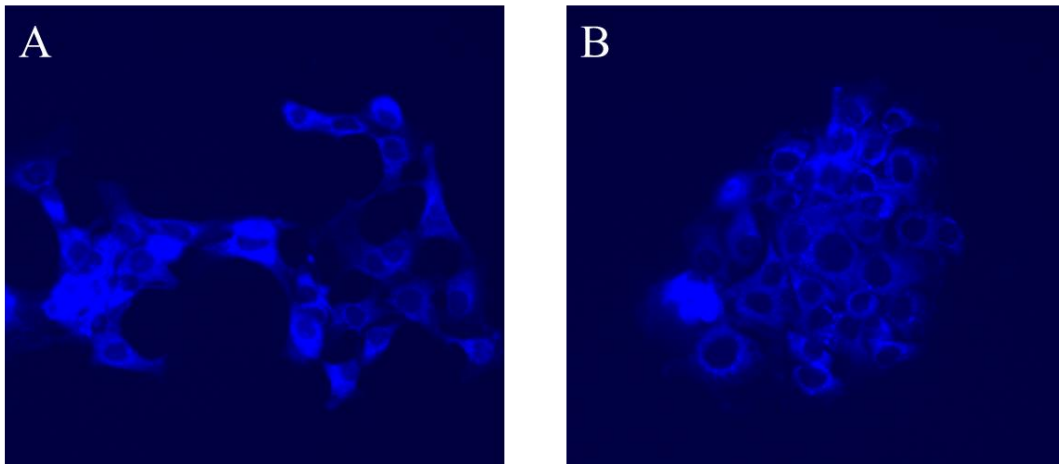


Fig. 14. Fluorescent microscopic images of T3M-4 Cells obtained with PPN-1 (10 μ M) 30 min after the addition of BPA-Fructose (1.0 mM) (A) or HBSS (B).

1.4. 考察

本章では、既存のボロン酸蛍光センサーDAHMIが有する問題点のひとつであるボロン酸との反応速度の遅さの改善を目的として、ボロン酸捕捉部位の可動性がボロン酸との錯形成反応速度に影響する可能性に注目し、DAHMIの(methylimino)methyl基から嵩高いpyridyl基へと変更した2-(2-pyridyl)phenol骨格の有効性を検討することとした。まず、新たに設計したPPd-1とPPN-1はいずれもボロン酸との反応後に蛍光を生じ、その蛍光強度に大きな差を認めなかったことから、より高い細胞内標的化の可能性を有すると期待されるPPN-1を以降の検討に用いることとした。その結果、PPN-1はDAHMIと異なり、BPA添加後速やかに蛍光強度の上昇を認め、所期の通り、ボロン酸捕捉部位の分子運動を抑制する化合物設計がボロン酸蛍光センサーの反応性の向上に有効であることが示された。そこで引き続き、PPN-1のボロン酸蛍光センサーとしての性能を詳細に調べた。

PPN-1は、BPA添加後に蛍光強度の増大と、DAHMIと同等の蛍光量子収率と蛍光波長を示し、ボロン酸蛍光センサーとしての基礎的な性質を示した。Job's plot解析より、BPAとの錯体形成比率は1:1であることが示唆された。また、ストークスシフトはDAHMIより2倍程度拡大を認めた。一般に、ストークスシフトが大きいほど蛍光検出時に励起光の混入を抑制しやすくなることから、PPN-1はDAHMIと比較して蛍光分析に使用しやすいセンサーであると考えられる。

PPN-1に様々な金属カチオンを添加したところ、いずれの金属カチオン添加によっても蛍光強度上昇を認めず、PPN-1の高いボロン酸選択性が示された。また、この結果はDAHMIでも同様であった。Fe²⁺、Fe³⁺の添加において蛍光強度が減少したのは、Fe²⁺、Fe³⁺が50% DMSO/Tris-HCl溶液において紫外域に吸収を示すことから、励起光が吸収されたことが原因であると考えられる。PPN-1とDAHMIの各励起波長におけるFe²⁺、Fe³⁺の吸光度を比較するとPPN-1の励起波長における吸光度の方が大きいことが結果に反映されたものと考えられる。

PPN-1に対してBPAと種々金属カチオンを共存させたところ、Na⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺など生体内に豊富に存在する金属カチオンは、BPA添加によるPPN-1の蛍光強度上昇を抑制しないことが示された。この結果は、PPN-1が生体に適用できる蛍光センサーであることを示唆する。一方で、Fe²⁺、Fe³⁺、Co²⁺、Ni²⁺、Cu²⁺といった遷移金属カチオンの共存下

では PPN-1 の蛍光強度の減弱を認めた。 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} では上記と同様の励起光の吸収による影響と考えられる。 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} に関しては PPN-1、DAHMI のどちらとも錯体を形成し、ボロン酸蛍光センサーとしての働きを競合的に阻害した可能性が考えられる。人の体内では、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Cu^{2+} は微量元素として、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} は超微量元素として存在しているが、その中で体内に最も多く存在する Fe であっても、細胞内に存在する可溶性鉄の濃度は $1 \mu\text{M}$ 程度であり^[25]、BNCT に要求される ^{10}B 濃度を考慮すると腫瘍内には BPA が 2mM 必要^[26]であることから、これらの金属カチオンによる影響は限定的であると考えられる。

PPN-1 は BPA 添加濃度に応じて優れた直線性と高い定量性を示した。得られた検出限界、定量限界はホウ素濃度に換算すると 0.1ppm 以下であり、実際の臨床 BNCT に求められる腫瘍組織内ホウ素濃度 20ppm ^[27]と比較して十分に高い値であることが示された。

蛍光顕微鏡観察において、PPN-1 では BPA 添加有無で十分な S/N を得ることができず細胞内 BPA を可視化できなかつた。PPN-1 と同程度の量子収率を示す DAHMI では細胞内 BPA の蛍光顕微鏡観察が報告されていること^[22]、PPN-1 のリード化合物である亜鉛蛍光センサー (Fig. 4) においても細胞内亜鉛の蛍光顕微鏡観察が報告されていること^[23,28]から、PPN-1 自身の細胞内局在のため細胞内で BPA と効率的に錯形成されなかつた可能性が考えられる。

以上、本章では既存ボロン酸蛍光センサーDAHMI のボロン酸との反応速度の改善を目的として、ボロン酸捕捉部位の可動性が錯形成反応速度に影響する可能性に着目し、2-(2-pyridyl)phenol 骨格を有する PPN-1 を新たに設計・合成し諸性質を調べた結果、所期の通りボロン酸との反応速度の改善に成功した。錯形成部位の運動を抑制する環構造を基本とした分子設計に基づき、蛍光量子収率の改善ができれば、理想的なボロン酸蛍光センサーの開発に繋がり得ると期待される。

第 2 章

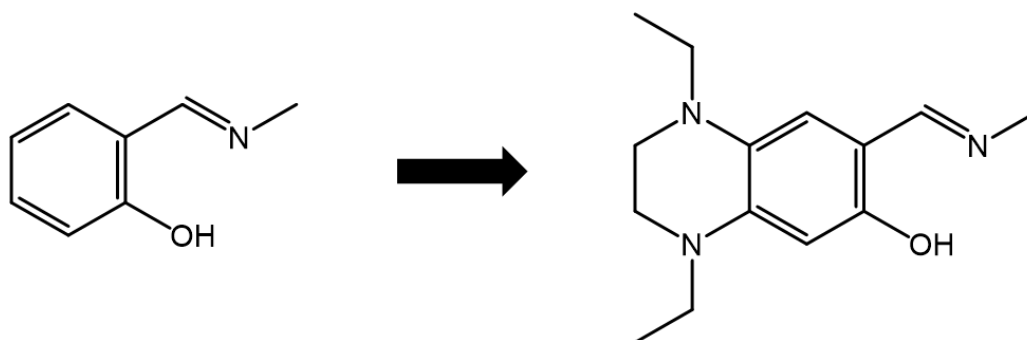
ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に関する検討

2.1. 背景

第 1 章において、既存のボロン酸蛍光センサー DAHMI の反応速度改善に関する検討を行い、ボロン酸捕捉部位の可動性を抑制する分子設計の有効性に関する知見を得た。そこで本章では、DAHMI が有するもう一つの問題点である蛍光特性の改善を目的とした検討に着手することとした。

一般に、蛍光センサー基本骨格への置換基導入は蛍光特性の改変に有効であり、化合物の電子密度や電子の流れに影響する置換基導入では、その種類に応じて蛍光特性すなわち励起・蛍光波長や蛍光強度に変化を生じ得る。中でも、hydroxy 基・alkoxy 基・amino 基等に代表される電子供与性置換基群では基本骨格の性質に応じて蛍光波長の長波長シフトや蛍光強度の上昇等、蛍光特性改善の例が報告されていることから^[29]、電子供与性置換基の導入は DAHMI の蛍光特性改善のために有効な手段となることが期待できる。

最近、1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxaline 構造を有する蛍光色素が優れた蛍光特性を示すことが報告され^[30]、著者は、同構造中の 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分が強い電子供与性部位として機能し、同蛍光色素の優れた蛍光特性に寄与しているものと考えた。そこで本研究では、DAHMI のボロン酸捕捉のための基本骨格である (*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol 構造中のベンゼン環を 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxaline に置換した BS-631 を設計・合成し (Fig. 15)、ボロン酸蛍光センサー基本骨格への 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分の導入が蛍光特性改善に貢献し得るかどうか調べるために、以下の検討を行った。



(E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol

BS-631

Fig. 15. Structures of (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol (left) and BS-631 (right).

2.2. 実験材料および実験方法

2.2.1. 実験材料

試薬および分析機器

試薬・測定溶媒はすべて 1 章と同様に入手した。¹³C NMR スペクトルは、DD2 NMR Spectrometer (600 MHz, Agilent Technologies, CA, USA)を用いて測定した。その他の機器は 1 章と同じものを使用した。

2.2.2. 実験方法

測定に関して、1 章と同様に行った。以下に、変更点のみを記載する。本章における光電子増倍管の電圧は 1200 V に固定して行った。(E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol および BS-631 は DMSO 中にストック溶液として保存し、測定前に H₂O、Tris-HCl、PBS で希釈して用いた。

1. (E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol および BS-631 の蛍光特性評価

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が(E)-2-[(methylimino)methyl]phenol および BS-631 (0.1 mM) と BPA (1.0 mM) となるように調製した。調製 60 分後に λ_{ex-max} および λ_{em-max} を求めた。

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が(E)-2-[(methylimino)methyl]phenol (0.1 mM) および BPA (0 or 1.0 mM)となるように調製した。BPA (0 mM) は調製直後、BPA (1.0 mM) は調製 60 分後に λ_{ex} : 356 nm における蛍光スペクトルを測定した。

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BS-631 (0.1 mM) および BPA (0 or 1.0 mM) となるように調製した。調製 60 分後に λ_{ex} : 430 nm における蛍光スペクトルを測定した。

2. BS-631 の BPA 添加における蛍光強度経時変化

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BS-631 (0.1 mM) および BPA (1.0 mM) となるように調製した。調製 30・60・120 分後に λ_{ex} : 430 nm における蛍光スペクトルを測定した。

3. BS-631 の BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性および検出・定量限界の算出

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BS-631 (0.1 mM) および BPA (0-0.25 mM) となるように調製した。調製 60 分後に λ_{ex} : 430 nm における λ_{em} : 630 nm の蛍光強度をプレートリーダーを用いて 3 連で測定した。また、得られたデータに対して線形回帰分析を行い、1 章と同様にして求めた。

4. BS-631 の各種金属カチオン存在下における蛍光強度変化

0.5% DMSO/PBS 中、最終濃度が BS-631 (0.1 mM) および BPA または金属カチオン (NaCl, MgCl₂ · 6H₂O, KCl, CoCl₂ · 6H₂O, NiCl₂ · 6H₂O: 1.0 mM) となるように調製した。また、AlCl₃ · 6H₂O, CaCl₂, MnCl₂ · 4H₂O, FeCl₂ · 4H₂O, FeCl₃ · 6H₂O, CuCl₂, ZnCl₂, CdCl₂ · 2.5H₂O は、0.5% DMSO/Tris-HCl (100 mM, pH = 7.4) 中で同濃度となるよう調製し、60 分後、 λ_{ex} : 430 nm における λ_{em} : 630 nm の蛍光強度を 3 連で 3 回測定し、BS-631 単体における蛍光強度と比較した相対値で表した。

5. BS-631 を用いた細胞内 BPA の検出

T3M-4 細胞を 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 中、37°C、5% CO₂ 下の条件下において培養した。実験の 2 日前に、T3M-4 細胞をガラス底付き 35 mm ディッシュに播種し培養した。HBSS で 2 回洗浄後、BPA (1 mM) 含有 HBSS を添加して 37°C で 10 分間インキュベートした。BPA 未添加群は、HBSS のみを添加して 10 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで室温下 30 分間固定した。その後、BS-631 (100 μ M) 0.5% DMSO/PBS 溶液を添加し、室温で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、Hoechst 33342 (5 μ g/mL、ナカライテスク社製) を添加し、室温で 10 分間インキュベートすることで核染色を行った。蛍光画像は BZ-X810 装置を用いて撮像した。

2.3. 結果

合成

4-メトキシ-2-ニトロアニリンを出発原料とし、6段階反応により総収率 3.2%で BS-631 を合成した。

蛍光特性評価

(*E*)-2-[(Methylimino)methyl]phenol および BS-631 の BPA 添加有無における蛍光スペクトルを Fig. 16 に、(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol および BS-631 の BPA 添加後の蛍光特性を Table 3 に示す。(*E*)-2-[(Methylimino)methyl]phenol は BPA 添加後に極大蛍光波長を 478 nm とする蛍光強度の上昇を示し、BS-631 は BPA 添加後に極大蛍光波長を 631 nm とする蛍光強度の上昇を示した。BPA 添加後におけるストークスシフトは、(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol、BS-631 でそれぞれ 122 nm、206 nm であった。

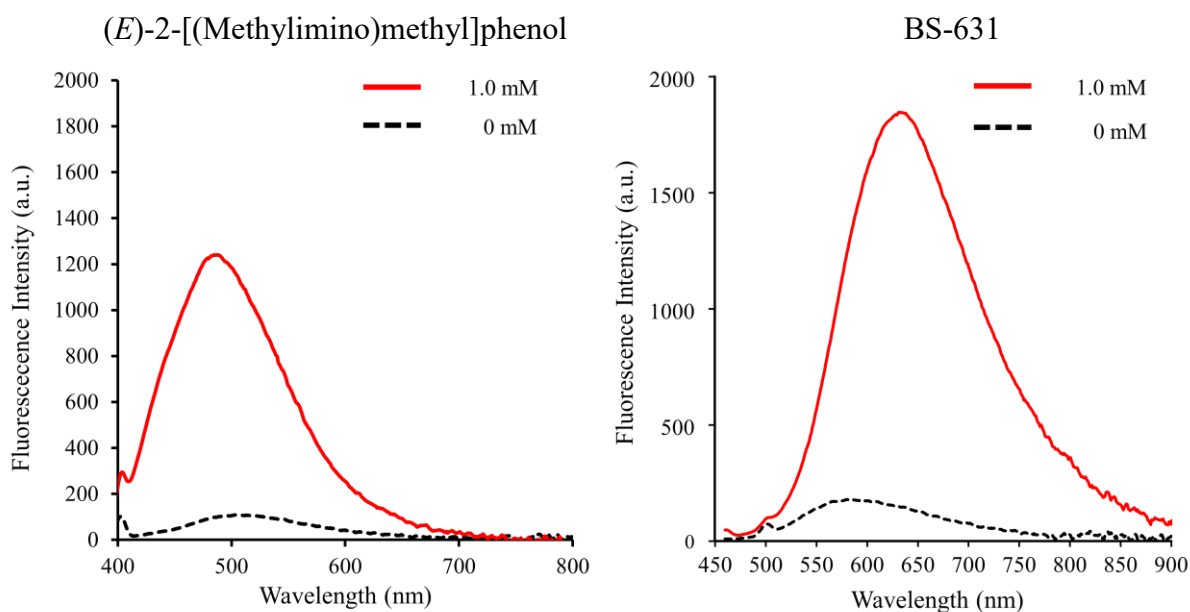


Fig. 16. Fluorescence spectra of (*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol (0.1 mM, $\lambda_{\text{exc}} = 356$ nm) and BS-631 (0.1 mM, $\lambda_{\text{exc}} = 430$ nm) after the addition of BPA (0 or 1.0 mM) in 0.5% DMSO/H₂O.

Table 3, Fluorescence properties of (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol and BS-631 after BPA addition.

Compound	λ_{ex-max}	λ_{em-max}	SS	F.I. (Post/Pre)
(E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol	356 nm	478 nm	122 nm	1223 / 90
BS-631	425 nm	631 nm	206 nm	*1843 / 149

※ λ_{ex} = 430 nm

BPA 添加後における BS-631 蛍光スペクトルの経時変化

BPA 添加後における BS-631 蛍光スペクトルの経時変化を Fig. 17 に示す。BS-631 は、BPA 添加後 0 分~60 分の間で経時的に蛍光強度の増大を示し、120 分後では減少を認めた。

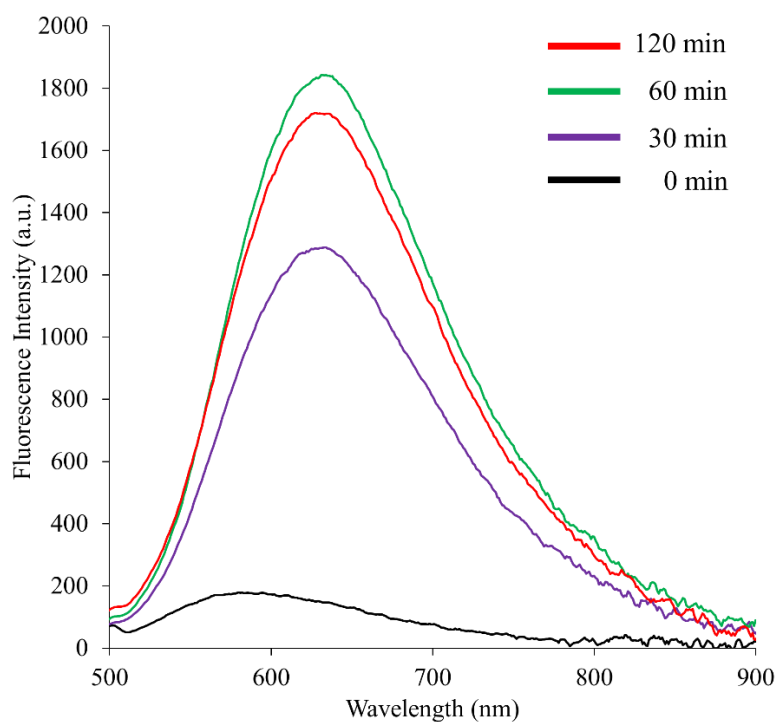


Fig. 17. Fluorescence spectra of BS-631 (0.1 mM) at 0, 30, 60 and 120 min after addition of BPA (1.0 mM) in 0.5% DMSO/H₂O (λ_{ex} = 430 nm).

BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性および検出・定量限界

BPA 添加濃度に対する BS-631 蛍光強度の変化を Fig.18 に示す。BS-631 は、測定した BPA 添加濃度 0~250 μM の間で $R^2=0.999$ と高い直線性を示した。また、得られた検出限界、定量限界は、それぞれ 19.6 μM 、65.3 μM (^{10}B 換算: 0.196 ppm, 0.653 ppm) であった。

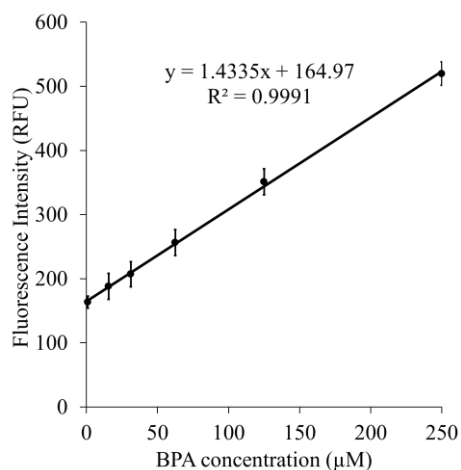


Fig. 18. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of BS-631 and BPA concentrations in 0.5% DMSO/ H_2O .

金属カチオンとの反応性

BS-631 への各種金属カチオン添加による蛍光強度変化を Fig. 19 に示す。BS-631 は金属カチオン添加により蛍光強度の増加を示さなかった。

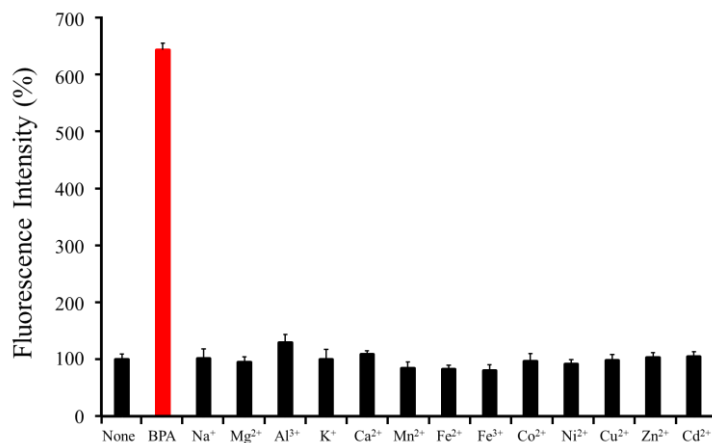


Fig. 19. BS-631 fluorescence intensity (0.1 mM) 60 min after addition of BPA or metal cation (1.0 mM, pH = 7.4).

T3M-4 細胞を用いた細胞内 BPA 蛍光イメージング

BPA 添加後の細胞の BS-631 を用いた蛍光顕微鏡画像を Fig. 20 に示す。BPA 未添加細胞 (D) と比較して、BPA 添加細胞 (A) で強い蛍光が確認された。BPA 添加細胞における蛍光画像 (A) では、Hoechst33342 によって示された細胞核 (B) と重なる場所で強い蛍光が確認された。

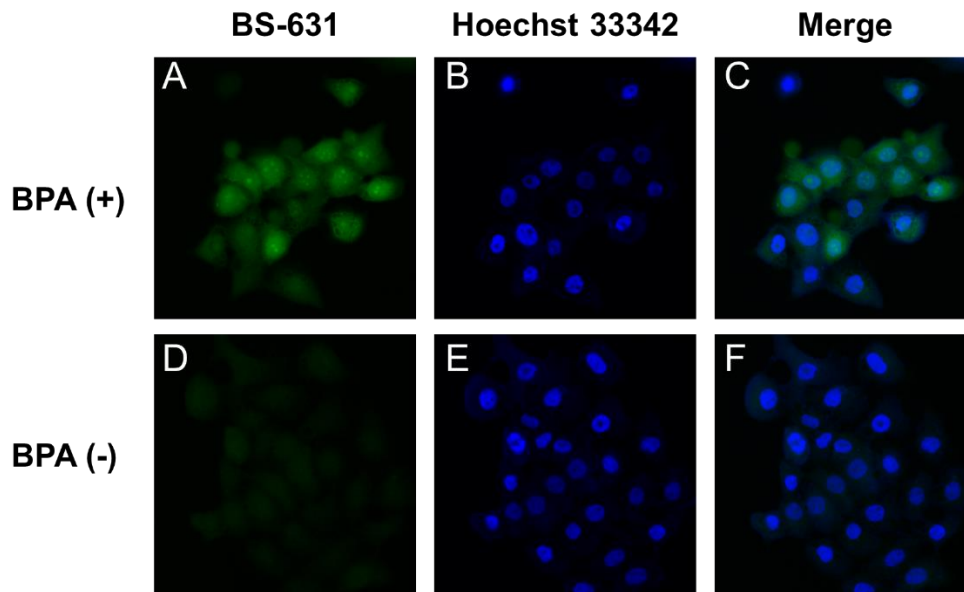


Fig. 20. Representative fluorescent microscopic images of T3M-4 cells: (A–C) BPA-present group, (D–F) BPA-absent group. (A, D) Fluorescence images after 30 min incubation with BS-631 (100 μ M) (GFP filter: Ex: 470 ± 20 nm, Em: 525 ± 25 nm), (B, E) nucleus staining using Hoechst 33342 (DAPI filter: Ex: 360 ± 20 nm, Em: 460 ± 25 nm), and (C, F) merged images of fluorescence from BS-631 and Hoechst 33342.

2.4. 考察

本章では、既存のボロン酸蛍光センサーDAHMIが有するもう一つの問題点である蛍光特性の改善を目的として、電子供与性部位の導入が蛍光特性の改善に資する可能性に注目し、DAHMIの基本骨格(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol中のベンゼン環を1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalineに置換したBS-631を設計・合成し、その有効性を調べた。その結果、BPA添加後にBS-631は(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenolと比較して、150 nm以上の極大蛍光波長の長波長化と1.7倍のストークスシフトの拡大を示し、所期の通り、本分子設計がボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善のために有効であることが示された。さらにBS-631はDAHMIと比較しても、200 nm以上の極大蛍光波長の長波長化と10倍のストークスシフトの拡大を認めたことから、ボロン酸蛍光センサーとしてのBS-631の有効性が示されただけでなく、本分子設計で用いた電子供与性部位である1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine構造がDAHMIの有するdiethylamino基と比べてボロン酸蛍光センサーの高性能化に有効である可能性が示された。そこで引き続き、PPN-1の場合と同様に、BS-631のボロン酸蛍光センサーとしての性能を詳細に調べた。

BS-631はDAHMIやPPN-1の場合と同様に、高いボロン酸との反応性・選択性を示した。このことは、BS-631、DAHMIの有する1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部分、diethylamino基がいずれも基本骨格の蛍光特性の改変に寄与する一方で、それらに含まれるN原子がボロン酸や金属カチオンとの錯形成に関与しないことを示唆するものと考えられる。BS-631はBPA添加濃度に応じて直線的に蛍光強度の増大を示した。検出限界、定量限界はPPN-1の場合と比較して約10倍高値であったが、BNCT領域におけるホウ素の定量分析には十分に使用可能であると考えられる。

BS-631を用いた蛍光顕微鏡観察により、細胞内BPAの可視化が可能であることが示された。また、得られた蛍光顕微鏡画像から蛍光は細胞全体で確認された一方で、細胞核付近にて強い蛍光が認められた。この結果は、薄切組織切片中の高解像度質量分析イメージングが可能な二次イオン質量分析装置NanoSIMSにより解析された細胞内BPAの局在報告と一致しており^[31]、BS-631によりSIMSと同様の細胞内ボロン酸局在解析が可能であることが示唆された。またDAHMIは一般的な核染色試薬(DAPI、Hoechst 33342)と蛍光波長が重なるためそれらとの共染色は困難であった^[8,22]が、BS-631は蛍光波長が長波

長化したことで一般的な核染色試薬との共染色が可能となり、インビトロ実験における有用な蛍光試薬となる可能性が示された。

BS-631 は DAHMI と同じ(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol 構造をボロン酸捕捉部位とする蛍光センサーであるため、本章の結果からもボロン酸との反応速度が緩やかであることが示され、錯形成部位の可動性に影響する構造改変が反応速度に影響するという前章の結論を支持する結果となった。また、BS-631 のボロン酸との反応後の蛍光強度の絶対値は DAHMI の場合と同程度であり、蛍光強度の向上の観点からは、(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol 構造への 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分あるいは diethylamino 基の導入は、ほぼ同様の効果であったことが示唆された。これは、(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol 構造では(methylimino)methyl 基の可動性が大きいいため、励起光の吸収により得たエネルギーが分子の運動エネルギーとして使用される無輻射遷移の寄与が大きく、蛍光エネルギーへの変換効率が低いことに起因すると考えられる。

以上、本章では既存ボロン酸センサーDAHMI の蛍光特性の改善を目的として、基本骨格への電子供与性部位の導入が有効である可能性に着目し、DAHMI の基本骨格である(*E*)-2-[(methylimino)methyl]phenol 構造に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分を導入した BS-631 を新たに設計・合成し諸性質を調べた結果、ボロン酸反応後の蛍光波長の長波長化とストークスシフトの拡大を達成し、所期の通り、蛍光特性の改善に成功した。(*E*)-2-[(Methylimino)methyl]phenol 構造を基本骨格とするボロン酸蛍光センサーの蛍光強度の低さに対する上記考察と前章の結果を合わせると、錯形成部位の可動性の低い基本骨格を有するボロン酸反応性蛍光化合物への 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 部分の導入は、理想的なボロン酸蛍光センサーの開発に繋がり得ると期待される。

第3章

生体試料中ボロン酸の高感度定量分析のための

ボロン酸蛍光センサーの開発

3.1. 背景

前章までにボロン酸蛍光センサーの反応速度と蛍光特性の改善のための分子設計に関する重要な知見を得た。そこで本章では、これまでに得られた知見を総合し、BNCT領域の発展に貢献し得る新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発を目的とした検討に着手することとした。

著者は、新規ボロン酸蛍光センサーの基本骨格として 2-(2-hydroxyphenyl)-1*H*-benzimidazole (HPBI, Fig. 20) に着目した。HPBI は分子サイズが小さくボロン酸捕捉部位の可動性の小さな環状構造であり、1章の結果からボロン酸との速やかな反応性が期待される。また、分子運動が小さければ励起エネルギーのうち運動エネルギーに消費される無輻射遷移の寄与が小さくなり高い量子収率が期待されるが、実際に HPBI はボロン酸との反応の前後いずれにおいても強い蛍光を示すことが報告されており^[32,33]、ボロン酸蛍光センサーの基本骨格として高い可能性が期待できる。

著者は2章の結果から、HPBI に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 構造を導入すれば、ボロン酸反応後の蛍光波長の長波長化とストークスシフトの拡大を達成できると考えた。これに加えて、同電子供与性部位の導入は hydroxy 基と imidazole 環 N 原子との間のプロトン移動を促進し、ボロン酸反応前の状態においては無輻射遷移の寄与を増大する、すなわちボロン酸反応前の蛍光強度を抑制するのではないかとの着想を得た。

本章では、HPBI に 1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine 構造を導入した BITQ を合成し、ボロン酸蛍光センサーとしての基礎的性質を調べた。結果として BITQ の高い有効性が示されたことから、前章までと同様の細胞中ボロン酸分布の蛍光顕微鏡観察に加え、臨床での血液検体中ボロン酸濃度定量測定への展開可能性を調べるため、マウス血中ボロン酸定量に関する検討を行った。

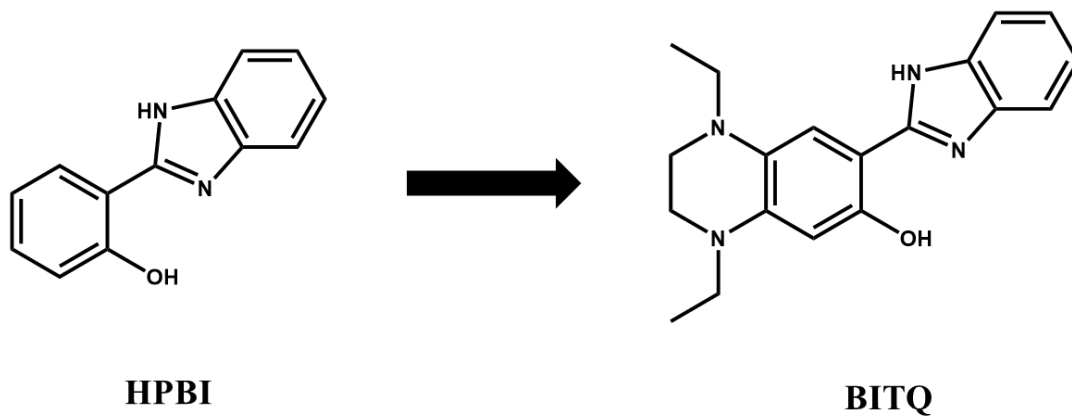


Fig. 20. Structures of HPBI (left) and BITQ (right).

3.2. 実験材料および実験方法

3.2.1. 実験材料

試薬および分析機器

試薬・測定溶媒はすべて1章と同じ場所から提供・購入されたものを用いた。また、これらを精製することなく使用した。測定機器も1章および2章と同じものを使用した。

3.2.2. 実験方法

測定に関して、1章と同様に行った。以下に、変更点のみを記載する。本章における光電子増倍管の電圧は700 Vに固定して行った。HPBI および BITQ は DMSO 中にストック溶液として保存し、測定前日に H₂O、Tris-HCl、HBSS で希釈して用いた。

1. HPBI、BITQ の蛍光特性評価

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が HPBI (1 μM) および BPA (1000 μM) となるように調製した。調製 15 分後に λ_{ex-max} および λ_{em-max} を求めた。

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BITQ (1 μM) および BPA (100 μM) となるように調製した。調製 15 分後に λ_{ex-max} および λ_{em-max} を求めた。

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が HPBI、BITQ (1 μM) と BPA (0 or 100 μM) となるように調製した。調製 15 分後にそれぞれの λ_{ex-max} における蛍光スペクトルを測定した。

2. 相対量子収率測定

EtOH 中、HPBI または BITQ にフェニルボロン酸が 0 または 50 当量となる溶液を調製し、調製 15 分後に HPBI は λ_{ex} : 310 nm、BITQ は λ_{ex} : 330 nm の条件で蛍光スペクトルを測定し、それぞれの λ_{ex} を用いたアントラセン ($\phi = 0.27$) を基準物質とすることで求めた。また、DAHMI についても EtOH 中、フェニルボロン酸が 50 当量となる溶液を調製し、120 分後に λ_{ex} : 330 nm を用いて測定し同様にして求めた。

相対量子収率の算出には以下の式を用いた。

$$\phi_x = \phi_{st} \times (A_{st}/A_x) \times (F_x/F_{st}) \times (n_x^2/n_{st}^2) \times (D_x/D_{st})$$

ϕ : 量子収率

ϕ_{phB} : フェニルボロン酸添加時の量子収率 ϕ_{Free} : フェニルボロン酸未添加時の量子収率

A: 励起波長における試料の吸光度 F: 蛍光スペクトル面積

n: 溶媒の平均屈折率 D: 希釈率

X: 未知試料を示す添え字 St: 標準試料を示す添え字

※平均屈折率および希釈率は 1 として計算した。

3. BPA 添加後の蛍光強度の経時的変化

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BITQ (1 μ M) および BPA (100 μ M) となるように調製した。調製後 0-30 分間において λ_{ex} : 390 nm、水冷ペルチェセルホルダー: 25°C の条件で蛍光スペクトルを各時間 3 回測定し、480 nm における蛍光強度を時間に対してプロットした。

4. BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性および検出・定量限界の算出

0.5% DMSO/H₂O 中、最終濃度が BITQ (1 μ M) および BPA (0, 10, 20, 30, 40, 50 μ M) となるように調製した。調製 15 分後、 λ_{ex} : 390 nm における蛍光スペクトルを各 3 回測定し、480 nm における蛍光強度を BPA 濃度に対してプロットした。

検出・定量限界は、BPA (0, 2.5, 5.0, 7.5, 10 μ M) とした以外は同様に各濃度 5 回測定し、1 章と同様の方法で算出した。

5. 各種金属カチオン存在下における蛍光強度変化

0.5% DMSO/Tris-HCl (100 mM, pH = 7.4) 中、最終濃度が BITQ (1 μ M) と BPA または金属カチオン (100 μ M) となるように調製した。調製 15 分後に λ_{ex} : 390 nm における λ_{em} : 480 nm の蛍光強度を 4 連で 3 回測定し、金属カチオンを添加していない BITQ 溶液と比較した相対値で表した。

6. BPA および各種金属カチオン共存下における蛍光強度変化

0.5% DMSO/Tris-HCl (100 mM, pH = 7.4) 中、最終濃度が BITQ (1 μ M) と BPA および 1 章と同様の金属カチオン (100 μ M) となるように調製した。調製 15 分後に λ_{ex} : 390 nm における λ_{em} : 480 nm の蛍光強度を 4 連で 3 回測定し、金属カチオンを添加していない BITQ-BPA 溶液と比較した相対値で表した。

7. 細胞内 BPA の検出

実験の 2 日前に、T3M-4 細胞をガラス底付き 35 mm ディッシュに播種し培養した。HBSS で 3 回洗浄後、BPA-Fructose (1 mM) 含有 HBSS を添加して 37°C で 30 分間インキュベートした。BPA 未添加群は、HBSS のみを添加して 30 分間インキュベートした。HBSS で 3 回洗浄後、BITQ (10 μ M) 0.5% DMSO/HBSS 溶液を添加し、室温で 5 分間静置した。HBSS で 3 回洗浄後、NucRed Live647 (Thermo Fisher 製、HBSS 1.5 mL に対し約 100 μ L) を添加し 30 分間、37°C でインキュベートすることで核染色を行った。蛍光画像は BZ-X810 装置を用いて撮像した。

8. マウス血漿中における BPA 濃度定量

雄性 ddY マウスから血液を採取後、480 μ L ずつ分取した。その後、BPA-Fructose 溶液 (0, 4.5, 9.0, 13.5, 18.0, 22.5 mM) を 20 μ L 添加し、全量を 500 μ L として、数回転倒混和した。混和後、5 分間静置し、8000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し血漿を回収した。血漿を各サンプルから 200 μ L 分取し、メタノール 400 μ L を加え 30 秒間振盪攪拌し、10000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し除タンパクし、上澄み 100 μ L を分取した。上澄みに BITQ (5.17 μ M) 0.5% DMSO/H₂O を 2900 μ L 添加し、数回転倒混和した。このサンプルを 15 分間静置し、 λ_{ex} : 390 nm における蛍光スペクトルを 3 回測定し、480 nm における蛍光強度を濃度に対してプロットした。検出・定量限界は 1 章と同様にして算出した。

9. マウス血漿中における BPA 濃度定量の ICP-MS との比較

雄性 ddY マウスから血液を採取後、480 μL ずつ分取した。その後、BPA-Fructose 溶液 (0-22.5 mM 内の濃度未知溶液 5 点) を 20 μL 添加し、全量を 500 μL とし、数回転倒混和し 5 分間静置した。各サンプルから 50 μL ずつ血液を分取し ICP-MS 測定用とした。残りの血液を 8000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離し血漿を回収した。血漿を各サンプルから 60 μL 分取し、メタノール 120 μL を加え 30 秒間振盪攪拌し、10000 rpm、4°C で 15 分間遠心分離し除タンパクし、上澄み 100 μL を分取した。上澄みに BITQ (5.17 μM) 0.5% DMSO/H₂O を 2900 μL 添加し、数回転倒混和した。このサンプルを 15 分間静置し、 λ_{ex} : 390 nm における λ_{em} : 480 nm の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定し、事前に作製した検量線から BPA 濃度を求め、ICP-MS の結果と比較した。

ICP-MS に用いた測定サンプルは、全血 50 μL に硝酸 950 μL を加え 120°C で湿式灰化した。その後、超純水 9 mL を加え転倒攪拌し、さらに超純水で 2 倍希釈することにより調製した。

3.3. 結果

合成

DMF 中、ピロ亜硫酸ナトリウム存在下で 1,4-diethyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline-6-carbaldehyde とベンゼン-1,2-ジアミンを反応させ、収率 41.3%で BITQ の合成に成功した。

蛍光特性評価

HPBI および BITQ の BPA 添加有無における蛍光スペクトルを Fig. 21、それぞれの蛍光特性を Table 4、に示す。BPA 添加後の極大励起波長、極大蛍光波長は HPBI でそれぞれ 337 nm、399 nm、BITQ でそれぞれ 390 nm、480 nm であった。ストークスシフトはそれぞれ 62 nm、90 nm であった。フェニルボロン酸添加後の相対量子収率は、HPBI、BITQ、DAHMI の順に 89%、53%、5.3%であった。また、フェニルボロン酸添加前後での量子収率比は HPBI が 1.3 倍、BITQ は 5.6 倍であった。

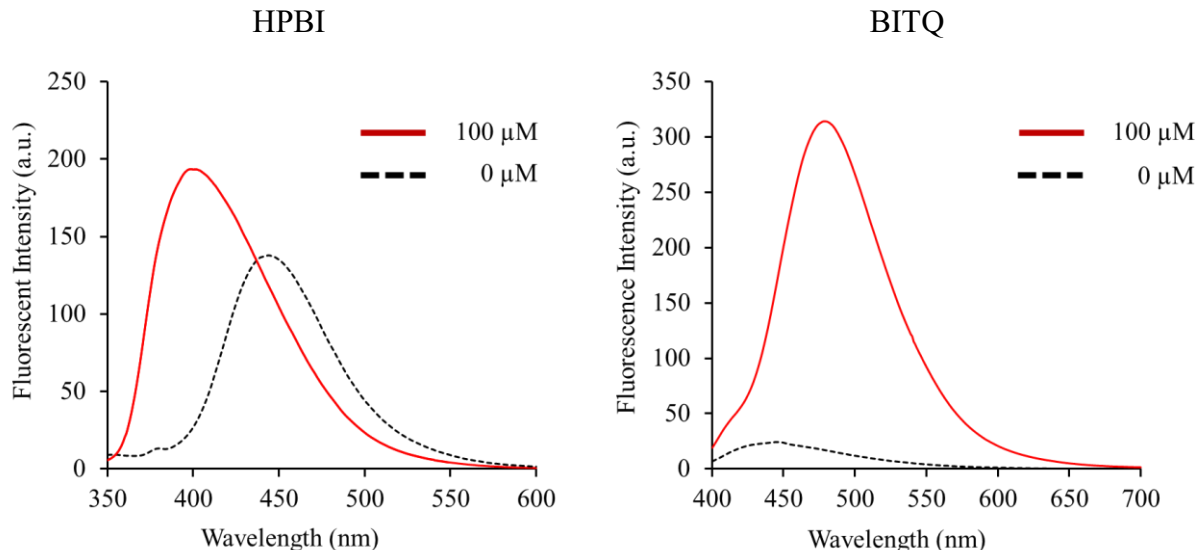


Fig. 21. Fluorescence spectra of HPBI (left) and BITQ (right) after BPA addition in 0.5% DMSO/H₂O. The concentrations of HPBI, BITQ and BPA are 1 μ M and 0 or 100 μ M. (λ_{ex} =HPBI/337 nm, BITQ/390 nm)

Table 4, Fluorescence properties of BITQ and HPBI after Boronic-acid addition.

Compound	λ_{ex-max}	λ_{em-max}	SS	Φ_{phB}	$\Phi_{phB/Free}$
BITQ	390 nm	480 nm	90 nm	0.53	5.6
HPBI	337 nm	399 nm	62 nm	0.89	1.3
DAHMI	-----	-----	-----	0.053	-----

BPA 添加後の蛍光強度の経時的変化

BPA 添加後の蛍光強度の経時的変化を Fig. 22 に示す。BITQ の BPA 添加後の蛍光強度は 1 分以内に最大値に達し、測定した 30 分間において一定であった。

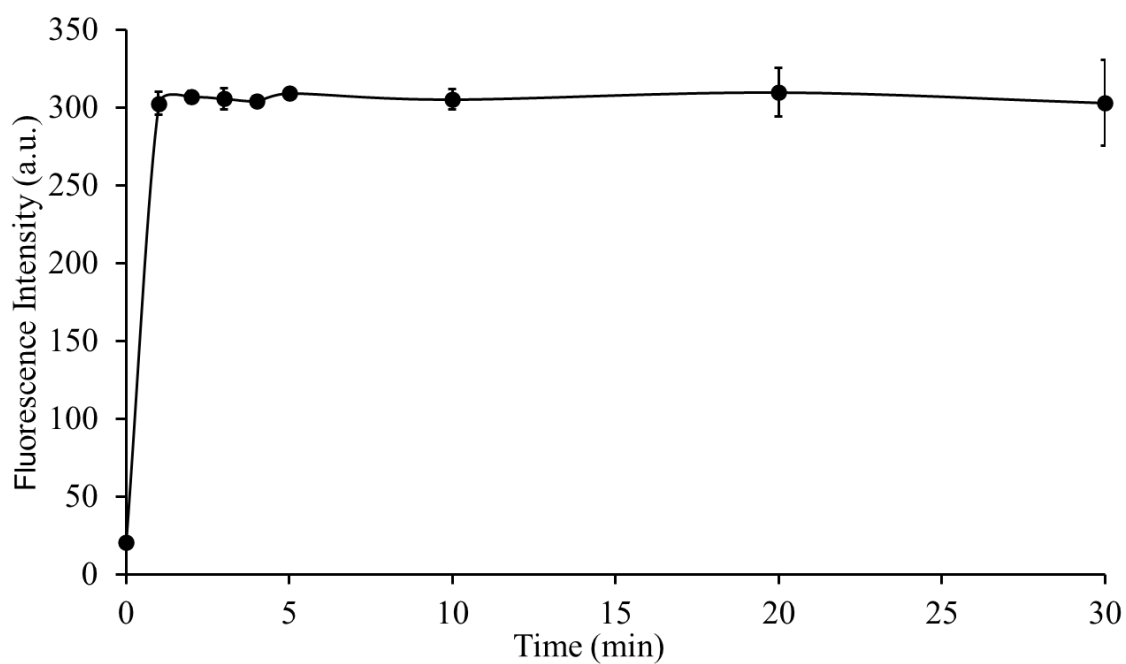


Fig. 22. Temporal change in fluorescence intensity of BITQ after BPA addition in 0.5% DMSO/H₂O ($\lambda_{ex} = 390$ nm, $\lambda_{em} = 480$ nm). The concentrations of the BITQ and BPA are 1 μ M and 100 μ M.

BPA 添加濃度に対する蛍光強度の相関性および検出・定量限界

BPA 濃度に対する BITQ の蛍光強度との相関図を Fig. 23 に示す。BITQ は、測定した BPA 添加濃度 0~50 μM の間で $R^2=0.9907$ と高い直線性を示した。検出限界と定量限界の算出に用いた相関図を Fig. 24 に示す。算出された検出限界、定量限界はそれぞれ 0.24 μM 、0.82 μM (^{10}B 換算: 0.0024 ppm, 0.0082 ppm) であった。

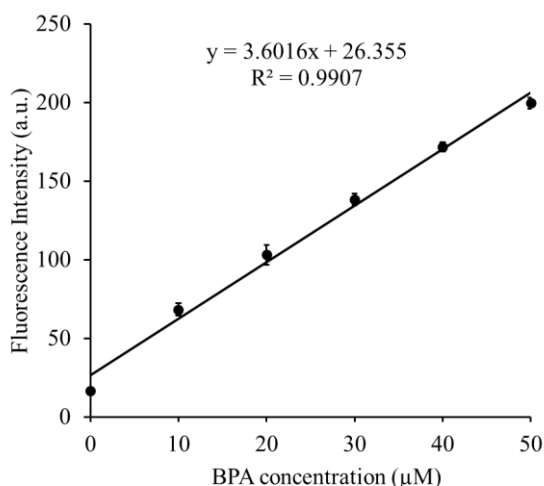


Fig. 23. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of BITQ and BPA concentrations (0-50 μM) in 0.5% DMSO/ H_2O .

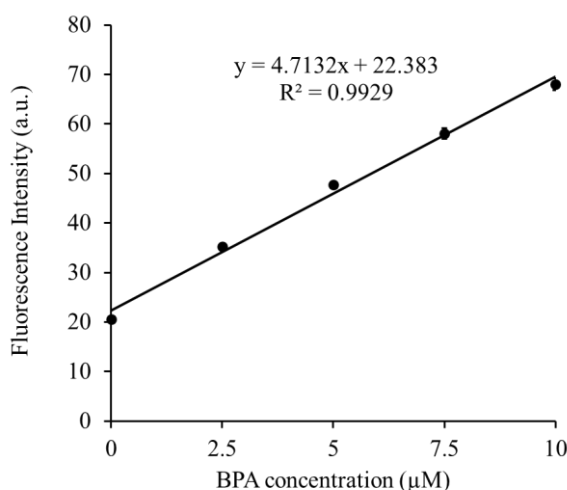


Fig. 24. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of BITQ and BPA concentrations (0-10 μM) in 0.5% DMSO/ H_2O .

金属カチオンとの反応性

BITQ に対する各種金属カチオン添加による蛍光強度変化を Fig. 25 に示す。BITQ の蛍光強度は BPA 添加により上昇し、亜鉛カチオン添加によって上昇する傾向を示した。その他の金属カチオン添加においては BITQ の蛍光強度は上昇しなかった。

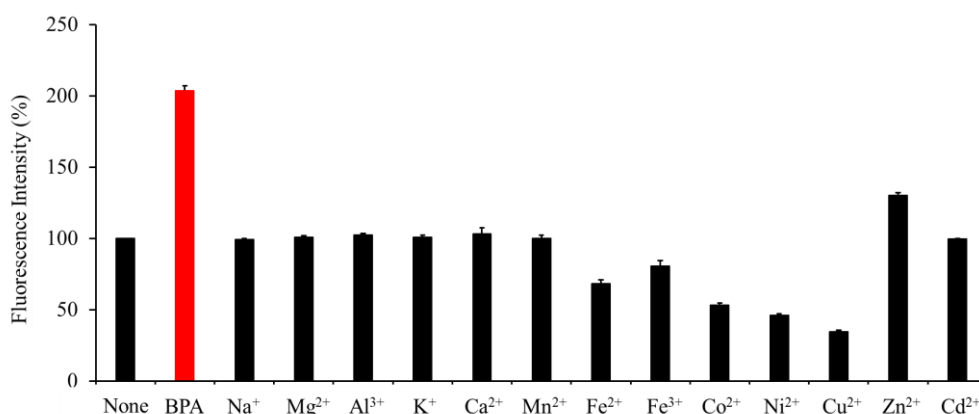


Fig. 25. Fluorescence intensities of BITQ ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) after the addition of various metal cations in 0.5% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of the BITQ and metal cations are 1 μM and 100 μM , respectively.

BPA と金属カチオンの共存下における蛍光強度変化

BITQ に対して、BPA と種々金属カチオンを共存させた場合の蛍光強度変化を Fig. 26 に示す。BITQ は、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} といった遷移金属において、BPA と共存時に蛍光強度上昇の抑制を示した。

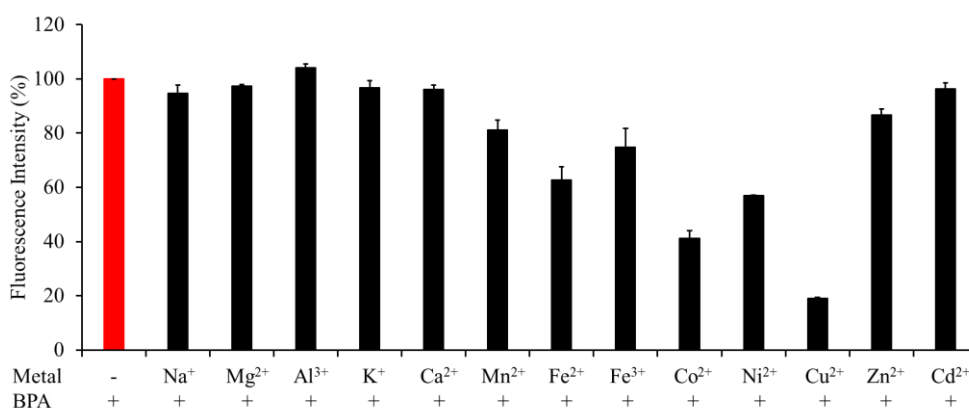


Fig. 26. The effects of the coexistence of metal cations in the BITQ fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 390 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 480 \text{ nm}$) in 0.5% DMSO/Tris-HCl buffer (100 mM, pH = 7.4). The concentrations of BITQ, BPA, and metal cations are 1 μM , 100 μM , and 100 μM , respectively.

T3M-4 細胞を用いた細胞内 BPA 蛍光イメージング

BPA 添加後の細胞の BITQ を用いた蛍光顕微鏡画像を Fig. 27 に示す。BPA 未添加細胞 (D) と比較して、BPA 添加細胞 (A) で強い蛍光が確認された。BITQ の蛍光は細胞全体で確認され、特に NucRed Live647 画像によって示される細胞核領域 (B) に強い蛍光が観察された。

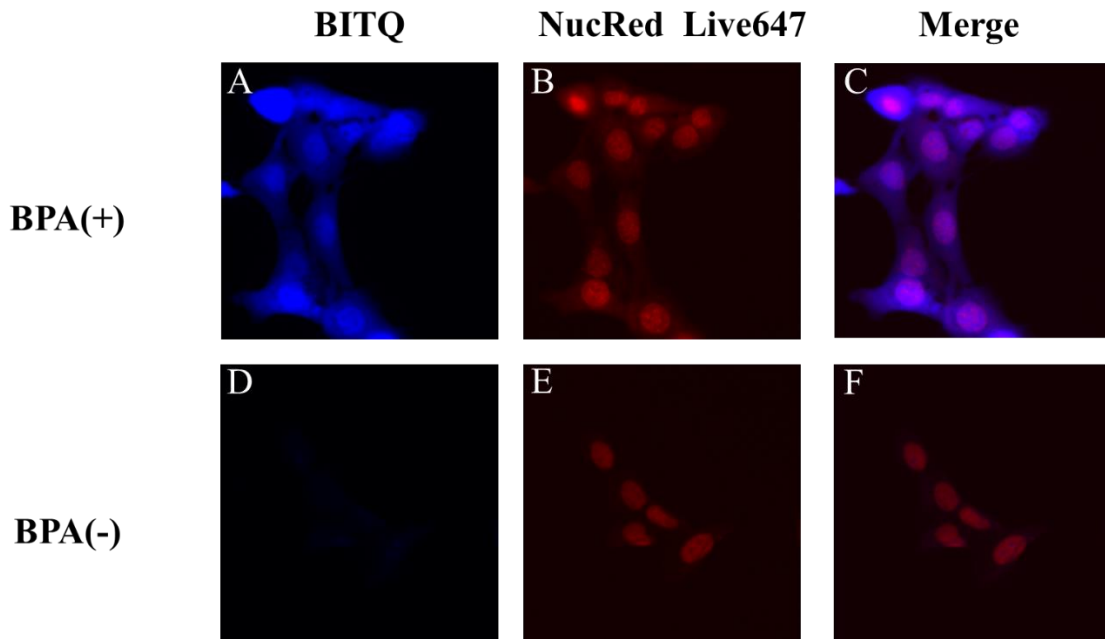


Fig. 27. Representative fluorescent microscopic images of T3M4 Cells: (A-C) BPA-present group, (D-F) BPA-absent group. (A, D) fluorescence images after 5 min incubation with BITQ (10 μ M), (DAPI-V filter: Ex: 395 ± 12.5 nm, Em: 460 ± 25 nm), (B, E) Nucleus staining using NucRed Live647, (Cy5 filter: Ex: 620 ± 30 nm, Em: 700 ± 37.5 nm) and (C, F) merged images of fluorescence from BITQ and NucRed Live647.

BITQ を用いたマウス血中 BPA 濃度測定

マウス血液中 BPA 濃度と、血漿分離・除タンパク処理後に添加した BITQ の蛍光強度との関連を調べた図を Fig. 28 に示す。BITQ の蛍光強度は、マウス血液中 BPA 濃度との間に、濃度範囲 0~900 μM において $R^2=0.9902$ と高い直線性を示した。また、得られた検出・定量限界はそれぞれ、4.36 μM 、14.5 μM (^{10}B としてそれぞれ 0.044 ppm, 0.14 ppm) であった。BITQ による定量値と、全血を対象に実測した ICP-MS 法による定量値との関連を調べた図を Fig. 29 に示す。その結果、BITQ を用いた蛍光分析法は、ICP-MS 法との間に、傾き 1.0 の直線的な相関関係を示した。

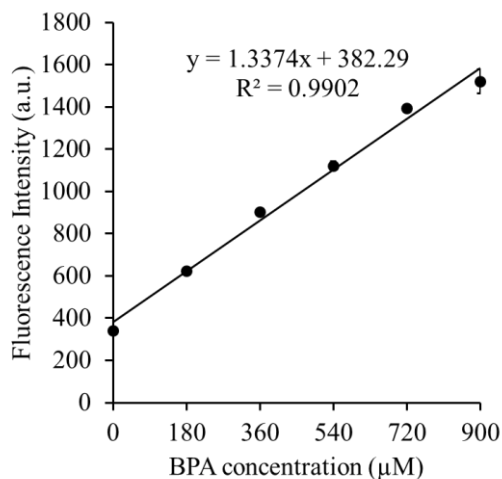


Fig. 28. Linear regression analysis between the fluorescence intensities of BITQ and BPA Fructose concentrations (0-900 μM) in plasma sample.

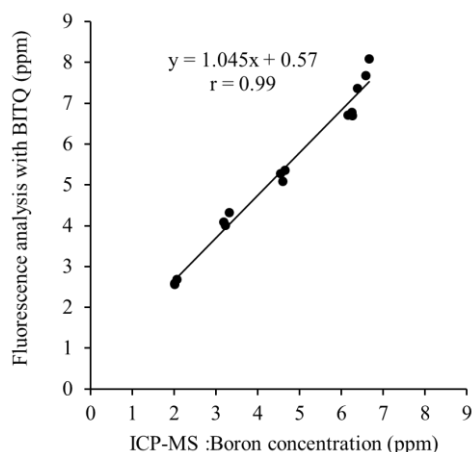


Fig. 29. Correlation of boron concentrations between BITQ fluorescence analysis and ICP-MS analysis.

3.4. 考察

本章では、前章までに得られた分子設計に関わる知見を総合し、BNCT領域の発展に貢献し得る新たな高感度ボロン酸蛍光センサーを開発することを目的として検討を行った。すなわち、1章の結果を踏まえ高いボロン酸反応性と量子収率が期待できる環状構造のHPBIを基本骨格として選択し、2章の結果を踏まえ蛍光波長の長波長化とボロン酸反応前の蛍光強度抑制を期待して1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine構造を導入したBITQを設計・合成し、ボロン酸蛍光センサーとしての有効性を調べた。その結果、BITQは所期の通り、ボロン酸反応後の高い量子収率、高い蛍光強度 Post/Pre 比、ボロン酸との速やかな反応性、蛍光波長の長波長化、およびストークスシフトの拡大を示した。既存のボロン酸蛍光センサーDAHMIと比較するとBITQは、10倍以上の量子収率、ボロン酸との反応性の高速化、およびストークスシフトの4倍以上の拡大を認め、次世代の高感度ボロン酸蛍光センサーとしてDAHMIに置き換わるに足る十分な性能を有することが明らかとなった。

BITQはDAHMIをはじめ前章までのボロン酸蛍光センサーと比べて、ボロン酸との反応後の高い量子収率を示し、実際に、BITQによるBPAの定量限界はPPN-1の場合と比べて約7倍向上した。これはICP-OES法と同等の感度と認められることから^[34]、BITQは水溶液中ボロン酸の高感度定量分析に適した蛍光センサーであると考えられる。

BITQは、BPA添加後1分以内に蛍光強度が最大値に達しその後定常化したことから、迅速なBPAとの反応性に加え、BPAとの反応後の蛍光性錯化合物が水溶液中で安定であることが示唆された。(E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol構造を基本骨格とするDAHMIでは、ボロン酸との反応性が遅いだけでなく水溶液中における不安定性が指摘され^[22]、ボロン酸の精密な定量用途には適していないと考えられることから、高反応性と高安定性を兼ね備えるBITQは精密なボロン酸定量解析や、動的な細胞内ボロン酸分布の変動があり得る条件下での顕微鏡観察等、様々な局面で有用なボロン酸蛍光センサーとなると考えられる。実際に、BITQを用いた蛍光顕微鏡観察では、DAHMIやBS-631の場合と異なり、細胞の固定を必要とせず生細胞内でのボロン酸分布の可視化が可能であることが示された。BITQは添加5分以内と短時間で蛍光画像の取得が可能であることから、ボロン酸添加後経時的な生細胞内局在解析など動的なインビトロ評価研究用途に適したボロン

酸蛍光センサーであると期待される。

BITQ は、BPA 以外に Zn^{2+} の添加で蛍光強度の上昇を示し、BPA と共存させた条件下では、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Cu^{2+} との場合に蛍光強度上昇が抑制された。これらは PPN-1 の場合と同様の機序であると考えられる。これらの金属カチオンは生体内で微量にしか存在せず、例えば遊離亜鉛は細胞内で pM レベル^[35]、ヒト血漿中においても nM 以下である^[36]ことから、実際の測定条件において影響は少ないと考えられる。

臨床 BNCT の現場において BPA は静脈内に持続点滴投与され、熱中性子線照射を開始するに足る十分な腫瘍内 ^{10}B 濃度が得られているか推定するために、血液中 ^{10}B 濃度の定量測定が ICP-MS 法あるいは ICP-OES 法を用いて行われている。これら ICP-MS/OES 法は定量分析法として極めて有効であるが、機器が高額で市井の病院が通常備えるべき分析機器ではなく、BNCT 普及へのハードルの一つとなっている。そこで著者は、比較的簡便かつ安価な蛍光分析法で血液中 ^{10}B 濃度の定量が可能となれば有用と考え、BITQ を用いたマウス血中 BPA 定量の可能性を調べた。その結果、BITQ を用いた蛍光分析法では、一般に BNCT に求められる血液中ホウ素濃度範囲^[37,38]において、ICP-MS 法との間に傾き 1.0 の直線的な相関関係を示したことから、BITQ は臨床 BNCT における血液中 BPA 濃度定量にも使用し得る有効なボロン酸蛍光センサーである可能性が示された。

以上、本章では前章までに得られた知見を総合して BITQ を設計・合成し、既存センサーの問題点を解決し、優れた蛍光特性と高いボロン酸反応性の達成に成功した。BITQ は既存のボロン酸蛍光センサーでは不可能であった生細胞を用いた蛍光顕微鏡観察や血液中ボロン酸定量への適用をも可能としたことから、BITQ は BNCT 領域の発展に貢献し得る真に有用な次世代の高感度ボロン酸蛍光センサーとなり得る可能性が示された。

結語

本研究では、蛍光分析法によるボロン酸の定性・定量分析のための高感度蛍光センサーの開発を目的として、既存センサーDAHMIの問題点を解決する分子設計の提案・評価と、それに基づく新たなボロン酸蛍光センサーの設計・合成・有効性評価を行い、以下の知見を得た。

1. 第1章では、DAHMIのボロン酸との反応速度の改善を目的としてボロン酸捕捉部位の可動性が錯形成反応速度に影響する可能性に着目し、ボロン酸捕捉部位の可動性を抑制した2-(2-pyridyl)phenol骨格を有するPPN-1を設計・合成し、ボロン酸との反応性を調べた。その結果、PPN-1は5分以内と迅速なボロン酸との反応性を示し、所期の通り本分子設計がボロン酸との反応速度の向上に有効である可能性を認めた。
2. 第2章では、DAHMIの蛍光特性の改善を目的として基本骨格への電子供与性部位の導入が有効である可能性に着目し、(E)-2-[(methylimino)methyl]phenolに1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部位を導入したBS-631を設計・合成し、蛍光特性を調べた。その結果、DAHMIと比較して極大蛍光波長の長波長化とストークスシフトの拡大を示し、所期の通り本分子設計が蛍光特性改善に有効である可能性を認めた。
3. 第3章では、上記で得られたボロン酸捕捉部位の可動性の抑制と電子供与性部位の導入の観点を統合し、HPBIに1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydropyrazine部位を導入したBITQを設計・合成してその特性を調べた。その結果、BITQは量子収率、蛍光波長、蛍光強度Post/Pre比、ボロン酸との反応性・選択性のいずれにおいても優れた性質を示し、生細胞内BPA分布の可視化や血液中BPA定量に利用可能な高感度ボロン酸蛍光センサーであることを見出した。

以上著者は、 ^{10}B 薬剤開発のボトルネックである細胞内 ^{10}B 分布評価法の開発のためには蛍光分析法のための新たな高感度ボロン酸蛍光センサーの開発が重要と考え、既存センサーの有する諸問題点の解決を経てそれらの考察を統合し、優れた特性を有する新規高感度ボロン酸蛍光センサーBITQを開発した。これらの知見は、今後の ^{10}B 薬剤開発研究およびBNCT領域における生物・医学的研究の発展に有用な情報と手段を提供するも

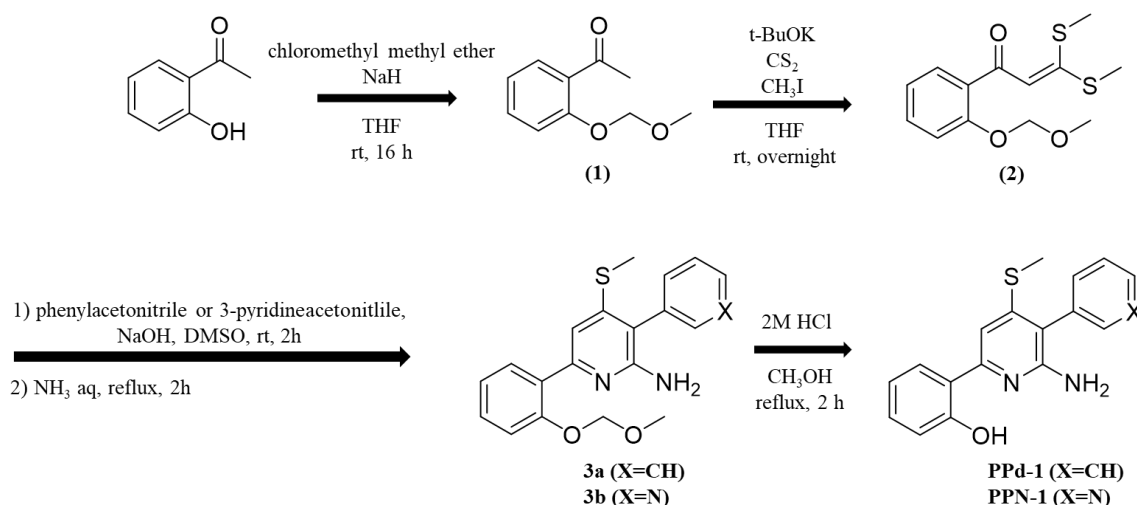
のであると考えられる。

合成の部

第 1 章

ポロン酸蛍光センサーの反応性改善に関する検討

以下の Scheme に従い合成を行った。



1-(2-(Methoxymethoxy)phenyl)ethan-1-one (1) の合成

2-ヒドロキシアセトフェノン (3.0 mL, 24.9 mmol) と水素化ナトリウム (1.34 g, 55.9 mmol) を無水 THF 45 mL 中で混合し、氷浴下 0°C で 30 分攪拌した。その後、クロロメチルメチルエーテル (3.78 mL, 49.8 mmol) をゆっくり滴下し、室温で 16 時間攪拌した。反応溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え、酢酸エチルで抽出した。有機層を飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 64% (2.37 g) で無色油状物質 (1) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.65 (3H, s), 3.52 (3H, s), 5.29 (2H, s), 7.05 (1H, t, *J* = 7.2 Hz), 7.19 (1H, d, *J* = 8.8 Hz), 7.44 (1H, m), 7.72 (1H, dd, *J* = 7.6 Hz, 1.6 Hz). EI-MS *m/z*: 180. Found: 180.

1-(2-(Methoxymethoxy)phenyl)-3,3-bis(methylsulfanyl)prop-2-en-1-one (2) の合成

1 (2.37 g, 13.1 mmol) をカリウム *tert*-ブトキシド (3.04 g, 27.1 mmol) を懸濁した無水 THF 31 mL にゆっくりと添加しアルゴン気流下にした。その後、氷浴下 0°C で二硫化炭素 (0.84 mL, 13.9 mmol)、ヨードメタン (2.53 mL, 40.7 mmol) の順に滴下し、この溶液を室温で一晩攪拌した。反応溶液に水 60 mL を加え、ジクロロメタンで抽出した。有機層を無水硫酸マグネシウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 54% (2.02 g) で黄色固体 (2) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.50 (3H, s), 2.53 (3H, s), 3.50 (3H, s), 5.23 (2H, s), 6.85 (1H, s), 7.07 (1H, t, *J*=7.2 Hz), 7.15 (1H, d, *J*=8.0 Hz), 7.39 (1H, m), 7.71 (1H, dd, *J*=7.6 Hz, 1.6 Hz). FAB-MS *m/z*: 284. Found: 285 [M+H]⁺.

6-(2-(Methoxymethoxy)phenyl)-4-(methylthio)-3-phenylpyridin-2-amine (3a) の合成

2 (1.78 g, 6.2 mmol) とフェニルアセトニトリル (0.72 mL, 6.2 mmol) を溶解した DMSO 20 mL に、粉末水酸化ナトリウム (0.50 g, 12.5 mmol) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応溶液に、水 100 mL を加え、10% HCl で中和後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を再度水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣に 28%アンモニア水溶液 60 mL を加え、2 時間加熱還流した。溶媒を減圧留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 12% (0.262 g) で黄色固体 (3a) を得た。

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 2.36 (3H, s), 3.49 (3H, s), 4.30 (2H, brs), 5.23 (2H, s), 7.13 (2H, m), 7.22 (1H, d, *J*=8.4 Hz), 7.38 (4H, m), 7.52 (2H, m), 7.74 (1H, dd, *J*=7.6 Hz, 1.6 Hz). FAB-MS *m/z*: 352. Found: 353 [M+H]⁺.

6-(2-(Methoxymethoxy)phenyl)-4-(methylsulfanyl)-[3,3'-bipyridin]-2-amine (3b) の合成

2 (1.0 g, 3.48 mmol) と 3-ピリジンアセトニトリル (0.38 mL, 3.48 mmol) を溶解した DMSO 20 mL に、粉末水酸化ナトリウム (0.28 g, 6.96 mmol) を加えて室温で 2 時間攪拌した。反応溶液に、水 100 mL を加え、10% HCl で中和後、ジクロロメタンで抽出した。有機層を再度水で洗浄し、無水硫酸マグネシウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、得られた茶色残渣に 28%アンモニア水溶液 60 mL を加え、2 時間加熱還流した。溶媒を減圧

留去し、残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 18% (0.225 g) で黄色固体 (3b) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 2.38 (3H, s), 3.49 (3H, s), 4.30 (2H, brs), 5.23 (2H, s), 7.14 (2H, m), 7.22 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 7.34 (1H, m), 7.45 (1H, m), 7.74 (2H, m), 8.64 (1H, m), 8.69 (1H, dd, $J = 4.8$ Hz, 1.6 Hz). FAB-MS m/z : 353. Found: 354 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

2-(6-Amino-4-(methylthio)-5-phenylpyridin-2-yl)phenol (PPd-1) の合成

3a (0.14 g, 0.40 mmol) を懸濁したメタノール 15 mL に 8 当量の 2M HCl を加えて 2 時間加熱還流した。反応溶液に水 50 mL を加え、1M NaOH で中和後、酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 28% (0.034 g) で淡黄色固体 (PPd-1) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.46 (3H, s), 5.79 (2H, brs), 6.87 (2H, m), 7.15 (1H, s), 7.26 (3H, m), 7.43 (1H, m), 7.51 (1H, m), 8.00 (1H, d, $J = 8.0$ Hz), 14.2 (1H, s). FAB-MS m/z : 308. Found: 309 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (FAB) m/z : Calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 309.1062. Found: 309.1060.

2-(2-Amino-4-(methylthio)-[3,3'-bipyridin]-6-yl)phenol (PPN-1) の合成

3b (0.167 g, 0.47 mmol) を懸濁したメタノール 5 mL に 8 当量の 2M HCl を加えて 2 時間加熱還流した。反応溶液に水 50 mL を加え、1M NaOH で中和後、酢酸エチルで抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで乾燥させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 67% (0.098 g) で淡黄色固体 (PPN-1) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6) δ : 2.49 (3H, s), 6.04 (2H, brs), 6.88 (2H, m), 7.16 (1H, s), 7.27 (1H, m), 7.52 (1H, m), 7.70 (1H, m), 8.01 (1H, d, $J = 7.2$ Hz), 8.43 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 8.62 (1H, dd, $J = 4.8$ Hz, 1.2 Hz), 14.2 (1H, s). FAB-MS m/z : 309. Found: 310 $[\text{M}+\text{H}]^+$. HRMS (FAB) m/z : Calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{OS}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$: 310.1014. Found: 310.1015.

5-(Diethylamino)-2-((methylimino)methyl)phenol (DAHMI) の合成

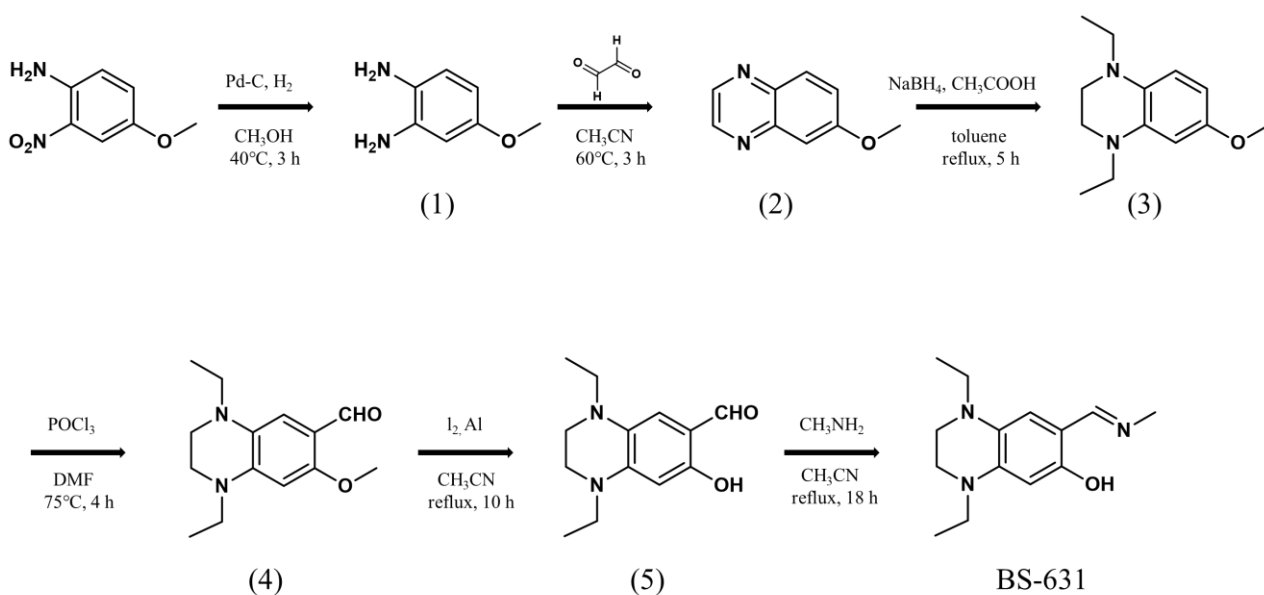
4- (ジエチルアミノ) サリチルアルデヒド (0.4 g, 2.07 mmol) をメタノール 5 mL に溶解し、メチルアミン (2.07 mmol) を加え、24 時間加熱還流した。還流後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をメタノール/クロロホルムを移動相とするカラムクロマトグラフィーで精製し、収率 79% (0.34 g) で褐色油状物質として DAHMI を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.18 (6H, t, $J=7.2$ Hz), 3.33 (3H, s), 3.36 (4H, q, $J=7.2$ Hz), 6.08 (1H, d, $J=2.4$ Hz), 6.13 (1H, dd, $J=8.8$ Hz, 2.4 Hz), 6.96 (1H, d, $J=8.8$ Hz), 7.94 (1H, s). EI-MS m/z : 206. Found: 206.

第2章

ボロン酸蛍光センサーの蛍光特性改善に関する検討

以下の scheme に従い合成した。



4-Methoxybenzene-1,2-diamine (1) の合成

4-メトキシ-2-ニトロアニリン (2.10 g, 12.5 mmol) をメタノール 140 mL に懸濁し、10% Pd-C (1.90 g) を加え、40°Cで3時間、接触還元した。反応溶液をセライト濾過し、濾液を減圧留去することで、褐色油状物質 (1) を得た。1 は、精製せずに次の反応に用いた。

6-Methoxyquinoxaline (2) の合成

1 をアセトニトリル 45 mL に溶解し、40%グリオキサール溶液 (69 mmol) を加え、60°Cで3時間攪拌した。反応溶液を室温まで冷却した後、溶媒を減圧留去した。得られた残渣を、酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 51% (1.01 g) で、淡黄色固体 (2) を得た。

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 3.98 (3H, s), 7.38 (1H, d, *J* = 2.8 Hz), 7.44 (1H, dd, *J* = 9.2, 2.4 Hz), 7.99 (1H, d, *J* = 9.2 Hz), 8.71 (1H, d, *J* = 2.0 Hz), 8.77 (1H, d, *J* = 2.0 Hz).

1,4-Diethyl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoxaline (3) の合成

2 をトルエン 30 mL に溶解し、氷浴下 0°C で水素化ホウ素ナトリウム (2.47 g, 65.3 mmol) をゆっくりと添加し、添加後 10 分間攪拌した。攪拌後、氷浴下 0°C で酢酸 (10 mL) をゆっくりと滴下し、室温で 1 時間攪拌した。その後さらに 5 時間加熱還流を行った。反応溶液を室温に戻し、水 80 mL を加え、酢酸エチル 150 mL で抽出した。有機層を飽和炭酸ナトリウム水溶液および水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。減圧留去により溶媒を除去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 77% (1.08 g) で、淡茶色油状物質 (3) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz CDCl_3) δ : 1.14 (6H, t, $J=7.2$ Hz), 3.29 (8H, m), 3.74 (3H, s), 6.16 (1H, dd, $J=8.4$ Hz, 2.4 Hz), 6.20 (1H, d, $J=2.8$ Hz), 6.49 (1H, d, $J=8.4$ Hz). EI-MS m/z : 220. Found: 220.

1,4-Diethyl-7-methoxy-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline-6-carbaldehyde (4) の合成

氷浴下 5°C で DMF 0.98 mL に塩化ホスホリル (0.79 mL, 27.0 mmol) を滴下し、15 分間攪拌した。攪拌後、3 (1.08 g, 4.9 mmol) を溶解した DMF 0.64 mL を加え、75°C で 4 時間攪拌した。その後、室温に戻し氷水を加え、15% NaOH 水溶液で中和し、酢酸エチル 200 mL で抽出後、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 43% (0.53 g) で、橙色油状物質 (4) を得た。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.16 (3H, t, $J=6.8$ Hz), 1.23 (3H, t, $J=6.8$ Hz), 3.16 (2H, m), 3.31 (2H, q, $J=6.8$ Hz), 3.42 (2H, q, $J=6.8$ Hz), 3.51 (2H, m), 3.85 (3H, s), 6.03 (1H, s), 6.99 (1H, s), 10.14 (1H, s). EI-MS m/z : 248. Found: 248.

1,4-Diethyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline-6-carbaldehyde (5) の合成

アセトニトリル 2.2 mL にアルミニウム粉末 (0.08 g, 3.0 mmol) を懸濁させ、ヨウ素 (0.98 g, 7.7 mmol) を加えた。溶液が黄色になるまで攪拌し、4 (0.53 g, 2.3 mmol) を溶解したアセトニトリル 1.2 mL を加え、アルゴン雰囲気下で 10 時間、加熱還流した。その後、室温に戻し水を加え、酢酸エチル 200 mL で抽出した。有機層を飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで脱水させた。溶媒を減圧留去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 58% (0.29 g) で、濃黄色油状物質 (5) を得た。

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 1.20 (6H, m), 3.14 (2H, t, $J = 5.2$ Hz), 3.27 (2H, q, $J = 6.8$ Hz), 3.39 (2H, q, $J = 7.2$ Hz), 3.52 (2H, t, $J = 4.8$ Hz), 6.04 (1H, s), 6.48 (1H, s), 9.45 (1H, s), 11.58 (1H, s). EI-MS m/z : 234. Found: 234.

(E)-1,4-Diethyl-7-((methylimino)methyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-6-ol (BS-631) の合成

アセトニトリル 60 mL に 5 (0.29 g, 1.24 mmol) を溶解させ、メチルアミン (1.24 mmol) を加えた後、18 時間加熱還流した。還流後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をメタノール/クロロホルムを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 33% (0.10 g) で、茶色油状物質として BS-631 を得た。

^1H and ^{13}C -NMR (DD2 NMR Spectrometer, Agilent, CA, USA, 600 MHz). ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ : 1.16 (3H, t, $J = 5.0$ Hz), 1.17 (3H, t, $J = 5.0$ Hz), 3.11 (2H, t, $J = 5.0$ Hz), 3.20 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 3.29 (3H, s), 3.35 (2H, q, $J = 7.0$ Hz), 3.44 (2H, t, $J = 5.0$ Hz), 6.04 (1H, s), 6.18 (1H, s), 7.76 (1H, s). ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ : 10.3, 10.6, 41.8, 45.4, 45.6, 45.6, 47.5, 98.5, 107.4, 112.0, 127.1, 143.0, 162.2, 165.0. EI-MS m/z : 247. Found: 247. HRMS (EI) m/z : Calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}$: 247.1685. Found: 247.1681.

(E)-2-[(Methylimino)methyl]phenol の合成

メタノール 5 mL にサリチルアルデヒド (0.4 g, 3.28 mmol) を溶解させ、メチルアミン (3.28 mmol) を加えた後、24 時間加熱還流した。還流後、溶媒を減圧留去し、得られた残渣をクロロホルムを移動相とするカラムクロマトグラフィーにより精製し、収率 5.9% (0.026 g) で、黄色油状物質として (E)-2-[(methylimino)methyl]phenol を得た。

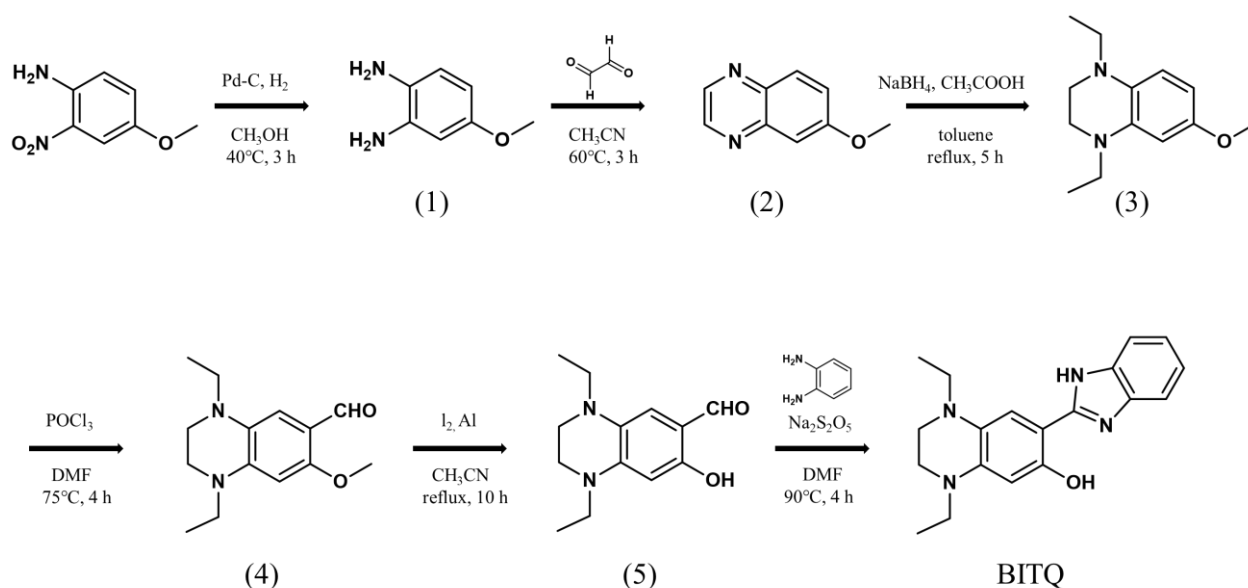
^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ : 3.49 (3H, s), 6.87 (1H, m), 6.96 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.24 (1H, dd, $J = 7.6$ Hz, 1.6 Hz), 7.29 (1H, m), 8.35 (1H, d, $J = 1.6$ Hz), 13.5 (1H, brs). EI-MS m/z : 135. Found: 135. HRMS (EI) m/z : Calcd. for $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}$: 135.0684. Found: 135.0683.

第 3 章

生体試料中ボロン酸の高感度定量分析のための

ボロン酸蛍光センサーの開発

以下の scheme に従い合成した。



7-(1H-Benzo[d]imidazol-2-yl)-1,4-diethyl-1,2,3,4-tetrahydroquinoxalin-6-ol (BITQ) の合成

1,4-Diethyl-7-hydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-quinoxaline-6-carbaldehyde (5) までは、2 章と同様にして合成した。

DMF 2 mL に 5 (0.06 g, 0.26 mmol) とベンゼン-1,2-ジアミン (0.03 g, 0.26 mmol) を溶解させ、室温で 1 分間攪拌した。その後、0.5 mL の超純水に溶解したピロ亜硫酸ナトリウム (50.2 mg, 0.26 mmol) を加え、90°C で 4 時間攪拌した。攪拌後、室温に戻し、冷水 30 mL を加え、酢酸エチル 150 mL で抽出し、有機層を無水硫酸ナトリウムで脱水した。減圧留去により溶媒を除去し、得られた残渣を酢酸エチル/ヘキサンを移動相とするカラムクロマトグラフィーで精製し、収率 56% (0.05 g) で、橙色固体として BITQ を得た。

^1H and ^{13}C -NMR (DD2 NMR Spectrometer, Agilent, CA, USA, 600 MHz). ^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6) δ : 1.10 (3H, t, $J=7.2$ Hz), 1.14 (3H, t, $J=6.6$ Hz), 3.15 (2H, m), 3.34 (4H, m), 3.40 (2H,

m), 6.11 (1H, s), 7.06 (1H, s), 7.17 (2H, m), 7.49 (1H, m), 7.56 (1H, m), 12.5 (1H, s), 12.6 (1H, s).
¹³C NMR (150 MHz, DMSO-d₆) δ: 9.65, 10.03, 44.44, 44.69, 44.71, 46.44, 97.37, 99.10, 107.16, 110.42, 116.64, 121.53, 121.71, 127.80, 132.97, 139.30, 141.39, 152.71, 153.50. FAB-MS *m/z*: 322. Found: 323 [M+H]⁺. HRMS (FAB) *m/z*: Calcd. for C₁₉H₂₃N₄O [M+H]⁺: 323.1872. Found: 323.1868.

論文目録

1. Shinya Takada, Naoya Kondo, Masayori Hagimori, Takashi Temma,
Development of a switching-type fluorescence sensor for the detection of
boronic acid-containing agents, *Analytical Sciences*, **38**, 1289-1296, (2022)
2. Naoya Kondo, Erika Aoki, Shinya Takada, Takashi Temma,
A red-emitting fluorescence sensor for detecting boronic acid-containing agents
in cells, *Sensors*, **22**(19), 7671, (2022)

謝辞

終わりに鑑み、本研究に対して終始懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました大阪医科薬科大学薬学部生体分析学研究室 天満 敬 教授に深甚なる謝意と敬意を表します。同時に、本研究の遂行、並びに本稿を纏めるにあたり、直接の御指導、御討論、並びに御激励を賜りました大阪医科薬科大学薬学部生体分析学研究室 近藤 直哉 助教に心より厚く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、直接の御指導、御助言、並びに御激励を賜りました武庫川女子大学薬学部薬品分析学研究室 萩森 政頼 教授に深く御礼申し上げます。本研究の遂行にあたり、直接の御指導、御助言、並びに御激励を賜りました大阪医科薬科大学薬学部生体分析学研究室 平田 雅彦 講師に深謝いたします。PPd-1、PPN-1 の合成にあたり、有益な御助言をいただきました大阪医科薬科大学薬学部生薬科学研究室 平田 佳之 助教に厚く感謝致します。蛍光スペクトルの測定にあたり、蛍光分光光度計の取り扱いについて御指導いただきました大阪医科薬科大学薬学部医薬分子化学研究室 平野 智也 教授に厚く御礼申し上げます。NMR スペクトルの測定を行っていただきました大阪医科薬科大学薬学部薬学研究支援センター 箕浦 克彦 准教授、MS スペクトルの測定を行っていただきました大阪医科薬科大学薬学部薬学研究支援センター 藤嶽 美穂代 講師に心より御礼申し上げます。御助力、御激励をいただきました大阪医科薬科大学薬学部生体分析学研究室 高木 陽子 様、宮崎 杏奈 博士、平野 楓子 学士、若森 恵太 学士、青木 映里香 氏、大西 智貴 氏ならびに研究室諸氏に心から感謝の意を表します。最後に、著者が研究に専念できるよう支えてくださった家族、友人に感謝いたします。

参考文献

1. 令和3年(2021)人口動態統計月報年計(概数)の概況、厚生労働省
<https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/jinkou/geppo/nengai21/index.html>、2022年12月15日アクセス
2. Miyatake, S.I.; Wanibuchi, M.; Hu, N.; Ono, K. Boron neutron capture therapy for malignant brain tumors. *J Neurooncol* **2020**, *149*, 1-11
3. Suzuki, M. Boron neutron capture therapy (BNCT): A unique role in radiotherapy with a view to entering the accelerator-based BNCT era. *Int J Clin Oncol* **2020**, *25*, 43-50.
4. Hirose, K.; Konno, A.; Hiratsuka, J.; Yoshimoto, S.; Kato, T.; Ono, K.; Otsuki, N.; Hatazawa, J.; Tanaka, H.; Takayama, K.; Wada, H.; Suzuki, M.; Sato, M.; Tamaguchi, H.; Seto, I.; Ueki, Y.; Iketani, S.; Imai, S.; Nakamura, T.; Ono, T.; Endo, H.; Azami, Y.; Kikuchi, Y.; Murakami, M.; Takai, Y. Boron neutron capture therapy using cyclotron-based epithermal neutron source and borofalan (^{10}B) for recurrent or locally advanced head and neck cancer (JHN002): An open-label phase II trial. *Radiother Oncol* **2021**, *155*, 182-187
5. Kanno, H.; Nagata, H.; Ishiguro, A.; Tsuzuranuki, S.; Nakano, S.; Nonaka, T.; Kiyohara, K.; Kimura, T.; Sugawara, A.; Okazaki, Y.; Takae, S.; Nakabayashi, T.; Arai, H.; Suzuki, H. Designation Products: Boron neutron capture therapy for head and neck carcinoma. *Oncologist* **2021**, *26*, e1250-e1255.
6. Asano, R.; Nagami, A.; Fukumoto, Y.; Miura, K.; Yazama, F.; Ito, H.; Sakata, I.; Tai, A. Synthesis and biological evaluation of new boron-containing chlorin derivatives as agents for both photodynamic therapy and boron neutron capture therapy of cancer. *Bioorg Med Chem Lett* **2014**, *24*, 1339-1343.
7. Barth, R.F.; Kabalka, G.W.; Yang, W.; Huo, T.; Nakkula, R.J.; Shaikh, A.L.; Haider, S.A.; Chandra, S. Evaluation of unnatural cyclic amino acids as boron delivery agents for treatment of melanomas and gliomas. *Appl Radiat Isot* **2014**, *88*, 38-42.

8. Fukuo, Y.; Hattori, Y.; Kawabata, S.; Kashiwagi, H.; Kanemitsu, T.; Takeuchi, K.; Futamura, G.; Hiramatsu, R.; Watanabe, T.; Hu, N.; Takata, T.; Tanaka, H.; Suzuki, M.; Miyatake, S.I.; Kirihata, M.; Wanibuchi, M. The therapeutic effects of dodecaborate containing boronophenylalanine for boron neutron capture therapy in a rat brain tumor model. *Biology (Basel)* **2020**, *9*, 437.
9. Suzuki, M.; Endo, K.; Satoh, H.; Sakurai, Y.; Kumada, H.; Kimura, H.; Masunaga, S.; Kinashi, Y.; Nagata, K.; Maruhashi, A.; Ono, K. A novel concept of treatment of diffuse or multiple pleural tumors by boron neutron capture therapy (BNCT). *Radiother Oncol* **2008**, *88*, 192-195.
10. Farías, R.O.; Bortolussi, S.; Menéndez, P.R.; González, S.J. Exploring boron neutron capture therapy for non-small cell lung cancer. *Phys Med* **2014**, *30*, 888-897.
11. Futamura, G.; Kawabata, S.; Nonoguchi, N.; Hiramatsu, R.; Toho, T.; Tanaka, H.; Masunaga, S.I.; Hattori, Y.; Kirihata, M.; Ono, K.; Kuroiwa, T.; Miyatake, S.I. Evaluation of a novel sodium borocaptate-containing unnatural amino acid as a boron delivery agent for neutron capture therapy of the F98 rat glioma. *Radiat Oncol* **2017**, *12*, 26.
12. Ono, K.; Kinashi, Y.; Suzuki, M.; Takagaki, M.; Masunaga, S.I. The combined effect of electroporation and borocaptate in boron neutron capture therapy for murine solid tumors. *Jpn J Cancer Res* **2000**, *91*, 853-858.
13. Wongthai, P.; Hagiwara, K.; Miyoshi, Y.; Wiriyasermkul, P.; Wei, L.; Ohgaki, R.; Kato, I.; Hamase, K.; Nagamori, S.; Kanai, Y. Boronophenylalanine, a boron delivery agent for boron neutron capture therapy, is transported by ATB0,+ , LAT1 and LAT2. *Cancer Sci* **2015**, *106*, 279-286.
14. Detta, A.; Cruickshank, G.S. L-amino acid transporter-1 and boronophenylalanine-based boron neutron capture therapy of human brain tumors. *Cancer Res* **2009**, *69*, 2126-2132.
15. Tsurubuchi, T.; Shirakawa, M.; Kurosawa, W.; Matsumoto, K.; Ubagai, R.; Umishio, H.; Suga, Y.; Yamazaki, J.; Arakawa, A.; Maruyama, Y.; Seki, T.; Shibui, Y.; Yoshida, F.; Zaboronok, A.; Suzuki, M.; Sakurai, Y.; Tanaka, H.; Nakai, K.; Ishikawa, E.; Matsumura, A. Evaluation of a novel boron-containing α -D-Mannopyranoside for BNCT. *Cells* **2020**, *9*, 1277.
16. Nomoto, T.; Inoue, Y.; Yao, Y.; Suzuki, M.; Kanamori, K.; Takemoto, H.; Matsui, M.; Tomoda, K.; Nishiyama, N. Poly(vinyl alcohol) boosting therapeutic potential of *p*-boronophenylalanine in neutron capture therapy by modulating metabolism. *Sci Adv* **2020**, *6*, eaaz1722.

17. Kondo, N.; Hirano, F.; Temma, T. Evaluation of 3-borono-L-phenylalanine as a water-soluble boron neutron capture therapy agent. *Pharmaceutics* **2022**, *14*, 1106.
18. Michiue, H.; Sakurai, Y.; Kondo, N.; Kitamatsu, M.; Bin, F.; Nakajima, K.; Hirota, Y.; Kawabata, S.; Nishiki, T.; Ohmori, I.; Tomizawa, K.; Miyatake, S.I.; Ono, K.; Matsui, H. The acceleration of boron neutron capture therapy using multi-linked mercaptoundecahydrododecaborate (BSH) fused cell-penetrating peptide. *Biomaterials* **2014**, *35*, 3396-3405.
19. 日本中性子捕捉療法学会、BNCT 基礎から臨床応用まで-BNCT を用いて治療に関わる人のためのテキスト-、大阪公立大学共同出版会、2018 年
20. Chand ra, S.; Lorey, D.R. SIMS ion microscopy imaging of boronophenylalanine (BPA) and ¹³C¹⁵N-labeled phenylalanine in human glioblastoma cells: Relevance of subcellular scale observations to BPA-mediated boron neutron capture therapy of cancer. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260*, 90–101.
21. Hattori, Y.; Ishimura, M.; Ohta, Y.; Takenaka, H.; Watanabe, T.; Tanaka, H.; Ono, K.; Kirihata, M. Detection of boronic acid derivatives in cells using a fluorescent sensor. *Org Biomol Chem* **2015**, *13*, 6927-6930.
22. Hattori, Y.; Ishimura, M.; Ohta, Y.; Takenaka, H.; Kirihata, M. Visualization of boronic acid containing pharmaceuticals in live tumor cells using a fluorescent boronic acid sensor. *ACS Sens* **2016**, *1*, 1394-1397.
23. Hagimori, M.; Temma, T.; Mizuyama, N.; Uto, T.; Yamaguchi, Y.; Tominaga, Y.; Mukai, T.; Saji, H. A high-affinity fluorescent Zn²⁺ sensor improved by the suppression of pyridine-pyridone tautomerism and its application in living cells. *Sens. Actuators B Chem* **2015**, *213*, 45-52.
24. Hattori, Y.; Ogaki, T.; Ishimura, M.; Ohta, Y.; Kirihata, M. Development and elucidation of a novel fluorescent boron-sensor for the analysis of boronic acid-containing Compounds. *Sensors (Basel)* **2017**, *17*, 2436.
25. Kakhlon, O.; Cabantchik, Z.I. The labile iron pool: Characterization, measurement, and participation in cellular processes. *Free Radic. Biol. Med* **2002**, *33*, 1037-1046.
26. Balcerzyk, M.; De-Miguel, M.; Guerrero, C.; Fernandez, B. Quantification of boron compound concentration for BNCT using positron emission tomography. *Cells* **2020**, *9*, 2084.

27. Soloway, A.H.; Tjarks W.; Barnum B.A.; Rong F.G.; Barth R.F.; Codogni I.M.; Wilson J.G. The chemistry of neutron capture therapy. *Chem. Rev* **1998**, *98*, 1515-1562.
28. 藤田 英明、亜鉛イオン応答性ピリジン-ピリドン型蛍光プローブを用いた細胞内亜鉛分布解析への挑戦 (その 1), 長崎大学論叢 15 巻, 185-192.
29. 中澤 裕之監修、中島 憲一郎・早川 和一編集、最新分析化学、南山堂、2000 年
30. Ren, X.; Zhang, F.; Luo, H.; Liao, L.; Song, X.; Chen, W. Red-emitting boron difluoride complexes with a mega-large Stokes shift and unexpectedly high fluorescence quantum yield. *Chem Commun (Camb)* **2020**, *56*, 2159-2162.
31. Aldossari, S.; McMahon, G.; Lockyer, N.P.; Moore, K.L. Microdistribution and quantification of the boron neutron capture therapy drug BPA in primary cell cultures of human glioblastoma tumour by NanoSIMS. *Analyst* **2019**, *144*, 6214-6224.
32. Konoshima, H.; Nagao, S.; Kiyota, I.; Amimoto, K.; Yamamoto, N.; Sekine, M.; Nakata, M.; Furukawa, K.; Sekiya, H. Excited-state intramolecular proton transfer and charge transfer in 2-(2'-hydroxyphenyl)benzimidazole crystals studied by polymorphs-selected electronic spectroscopy. *Phys Chem Chem Phys* **2012**, *14*, 16448-16457.
33. Martínez-Aguirre, M.A.; Flores Alamo, M.; Elisa Trejo-Huizar, K.; Yatsimirsky, A.K. Boronic acid complexes with amino phenolic N,O-ligands and their use for non-covalent protein fluorescence labeling. *Bioorg Chem* **2021**, *113*, 104993.
34. Kmiecik, E.; Tomaszewska, B.; Wątor, K.; Bodzek, M. Selected problems with boron determination in water treatment processes. Part I: Comparison of the reference methods for ICP-MS and ICP-OES determinations. *Environ Sci Pollut Res Int* **2016**, *23*, 11658-11667.
35. Maret, W. Analyzing free zinc(II) ion concentrations in cell biology with fluorescent chelating molecules. *Metallomics* **2015**, *7*, 202-211.
36. Maares, M.; Haase, H. A guide to human zinc absorption: General overview and recent advances of in vitro intestinal models. *Nutrients* **2020**, *12*, 762.
37. Luderer, M.J.; de la Puente, P.; Azab, A.K. Advancements in tumor targeting strategies for boron neutron capture therapy. *Pharm Res* **2015**, *32*, 2824-2836.
38. Barth, R.F.; Vicente, M.G.; Harling, O.K.; Kiger, W.S.; Riley, K.J.; Binns, P.J.; Wagner, F.M.; Suzuki, M.; Aihara, T.; Kato, I.; Kawabata, S. Current status of boron neutron capture therapy of high grade gliomas and recurrent head and neck cancer. *Radiat Oncol* **2012**, *7*, 146.