

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6463005号
(P6463005)

(45) 発行日 平成31年1月30日 (2019. 1. 30)

(24) 登録日 平成31年1月11日 (2019. 1. 11)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 Q 1/04 (2006. 01)

G O 1 N 33/48 (2006. 01)

C 1 2 N 5/0786 (2010. 01)

C 1 2 M 1/34 (2006. 01)

G O 1 N 21/64 (2006. 01)

C 1 2 Q 1/04

G O 1 N 33/48 P

C 1 2 N 5/0786

C 1 2 M 1/34 A

G O 1 N 33/48 M

請求項の数 24 (全 112 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-111593 (P2014-111593)

(22) 出願日 平成26年5月29日 (2014. 5. 29)

(65) 公開番号 特開2015-6173 (P2015-6173A)

(43) 公開日 平成27年1月15日 (2015. 1. 15)

審査請求日 平成29年5月22日 (2017. 5. 22)

(31) 優先権主張番号 特願2013-114578 (P2013-114578)

(32) 優先日 平成25年5月30日 (2013. 5. 30)

(33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(出願人による申告) 平成25年度独立行政法人科学技術振興機構 研究成果展開事業 研究成果最速展開支援プログラム 産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(73) 特許権者 000001007

キヤノン株式会社

東京都大田区下丸子3丁目30番2号

(74) 代理人 100094112

弁理士 岡部 譲

(74) 代理人 100101498

弁理士 越智 隆夫

(74) 代理人 100106183

弁理士 吉澤 弘司

(74) 代理人 100128668

弁理士 齋藤 正巳

(72) 発明者 小出 史代

東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 マクロファージ識別剤、該マクロファージ識別剤を用いた識別方法、分取方法、評価方法、スクリーニング方法、およびキット

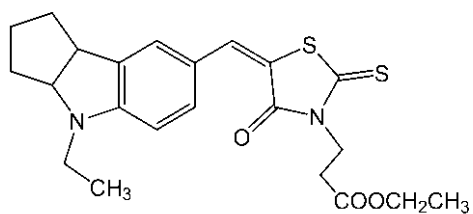
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

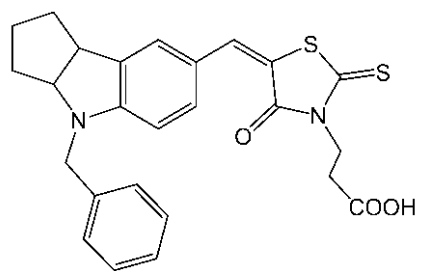
マクロファージのサブタイプM1とサブタイプM2とを識別する方法であって、有機化合物を付与して得られた分光特性に基づいて前記サブタイプM1と前記サブタイプM2とを識別し、

前記有機化合物が、下記化合物(1)、(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(11)、(12)、(13)、(15)、(17)、(19)~(26)、(28)、(30)~(33)、(35)、(36)、(38)、(42)~(45)、(48)~(62)、(65)、(67)、(74)~(76)、(82)、(83)、及び(85)からなる群より選ばれるいずれか1つの化合物で表されることを特徴とする方法。

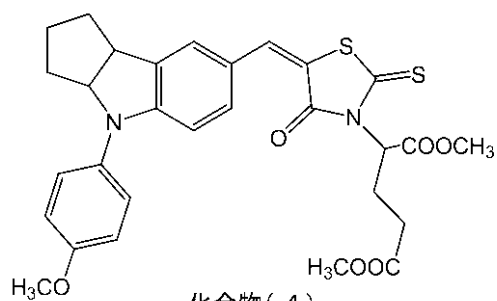
【化 1】



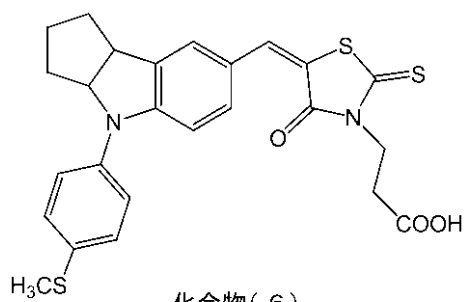
化合物(1)



化合物(3)

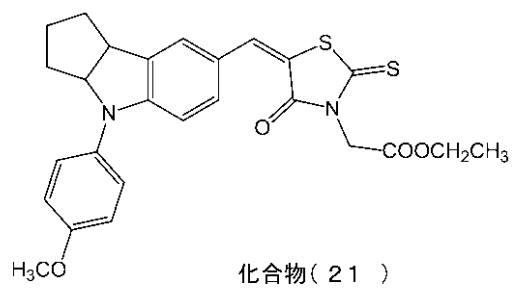
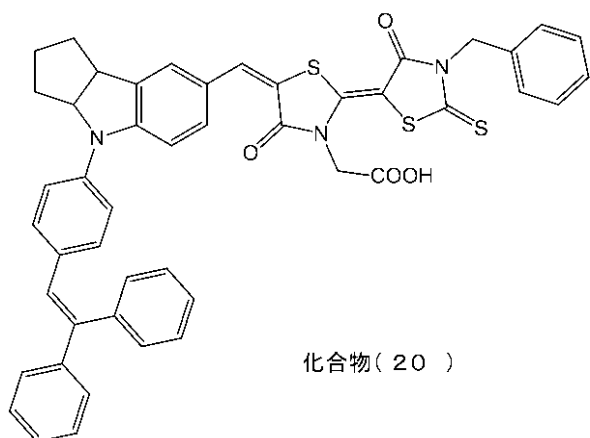
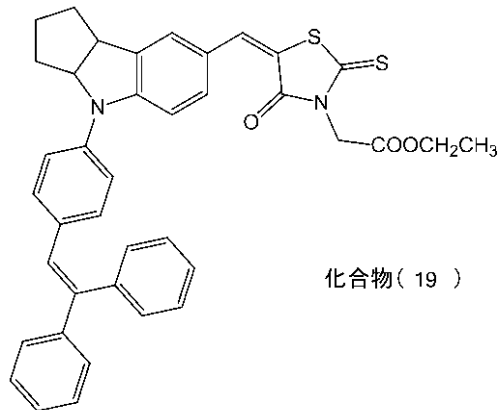
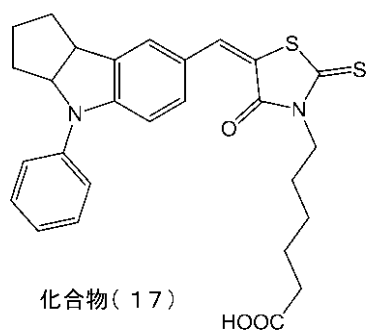
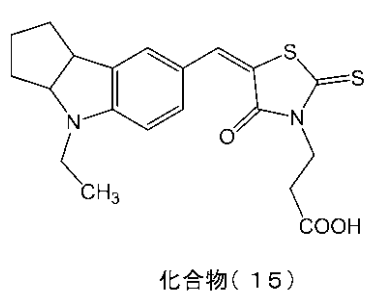
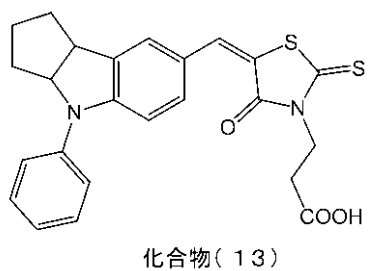
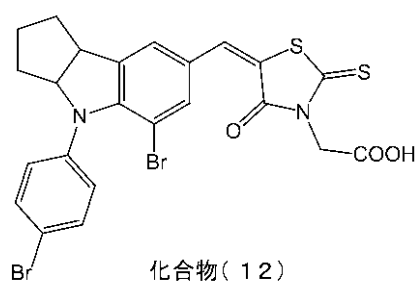
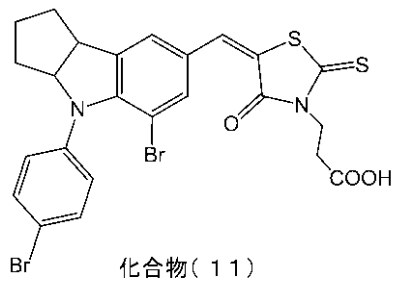
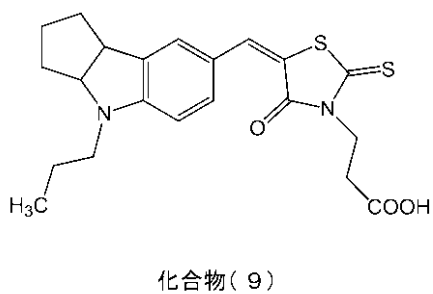
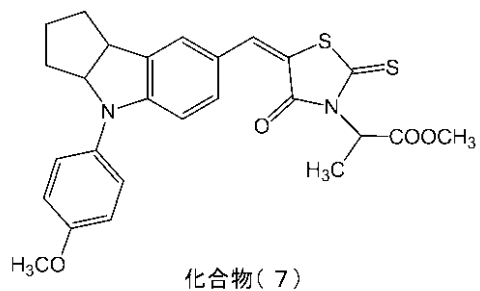


化合物(4)



化合物(6)

【化 2】



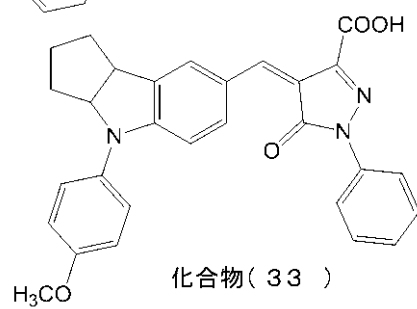
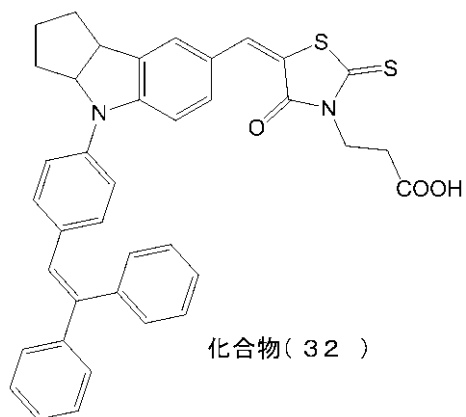
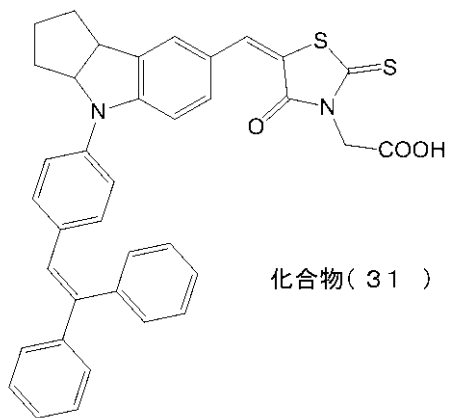
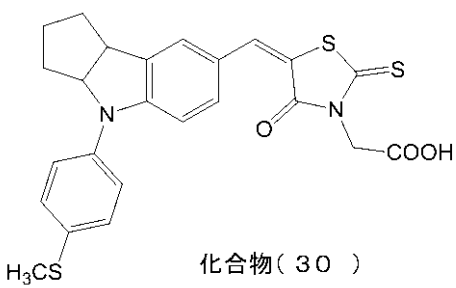
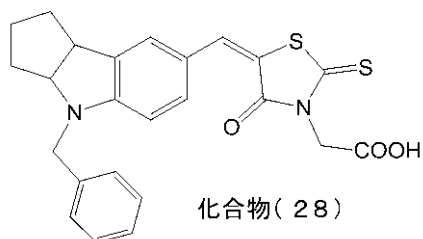
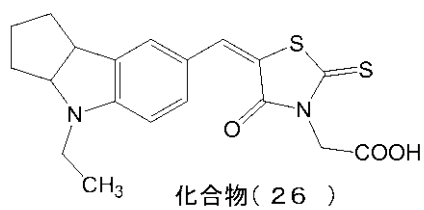
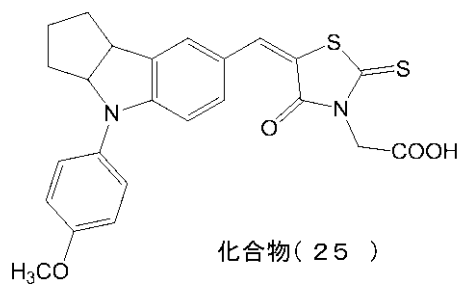
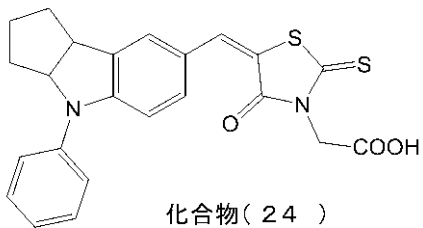
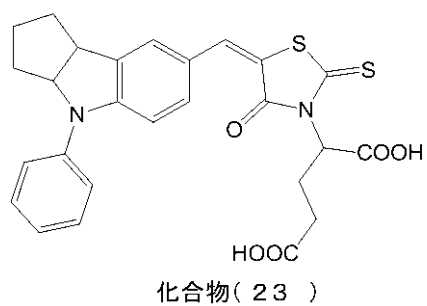
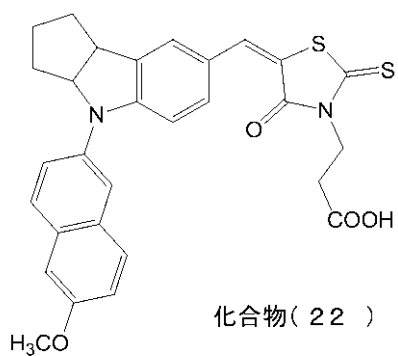
10

20

30

40

【化 3】



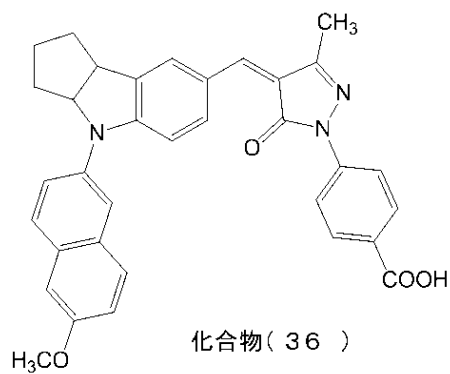
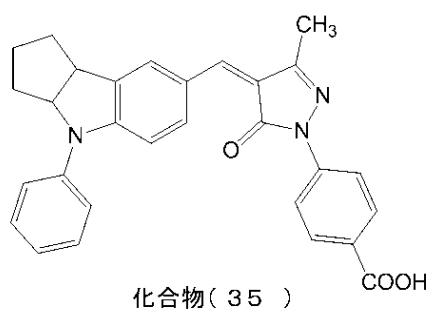
10

20

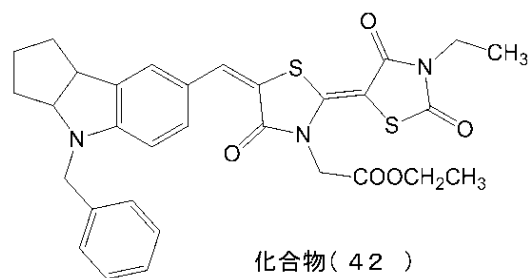
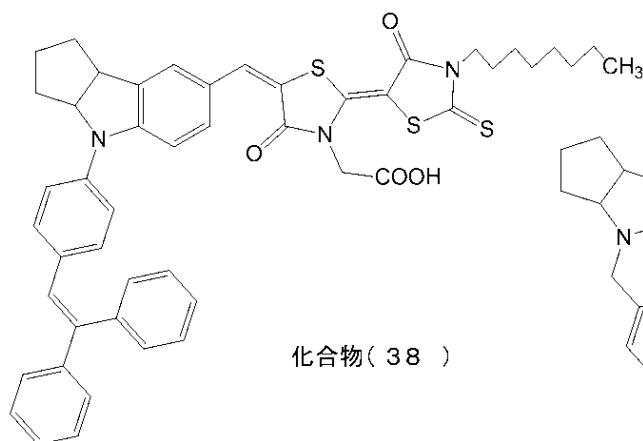
30

40

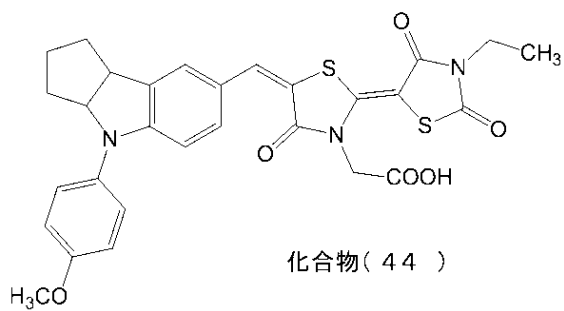
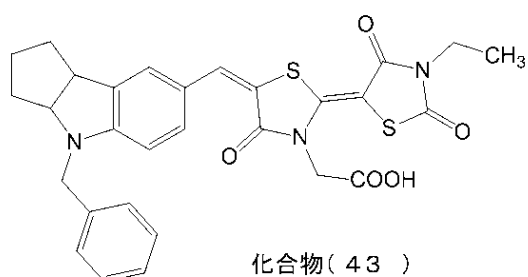
【化 4】



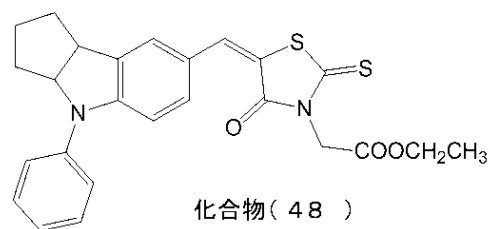
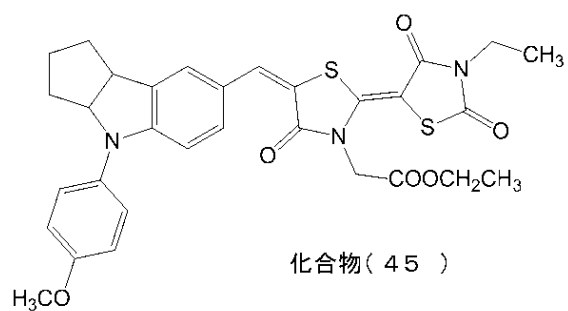
10



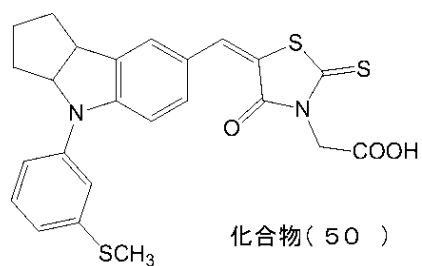
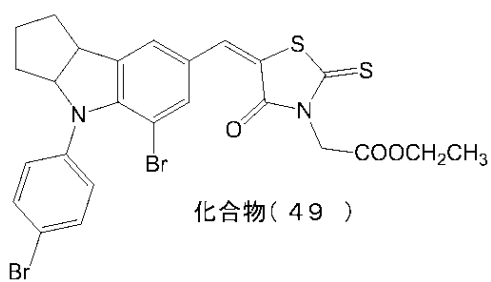
20



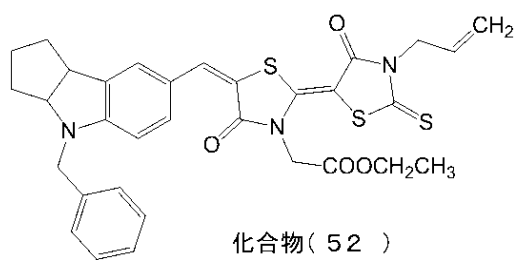
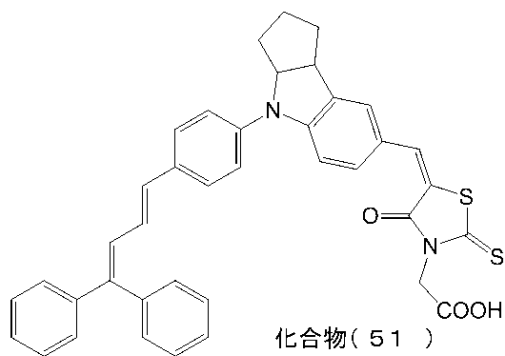
30



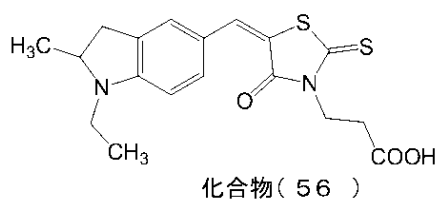
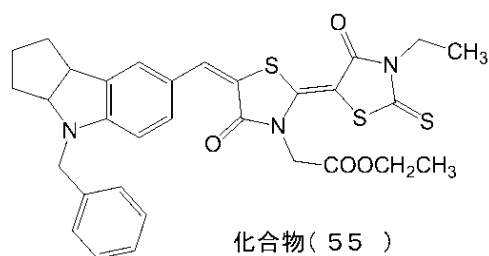
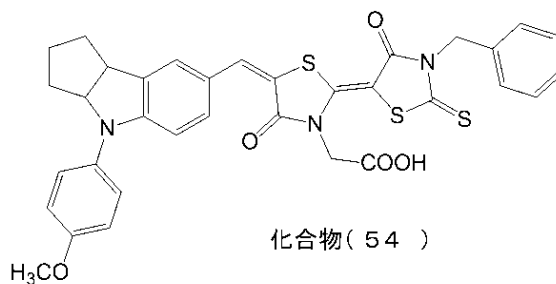
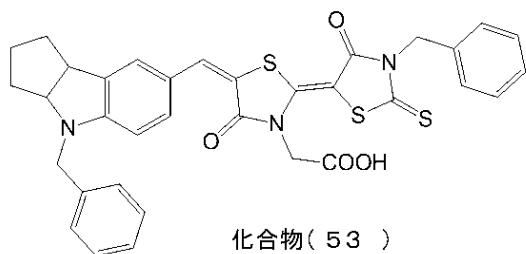
40



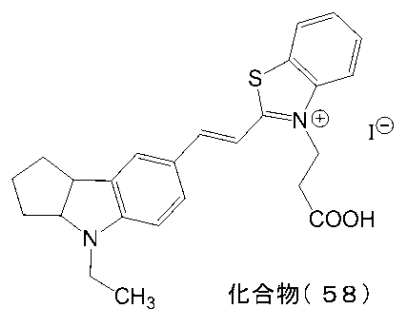
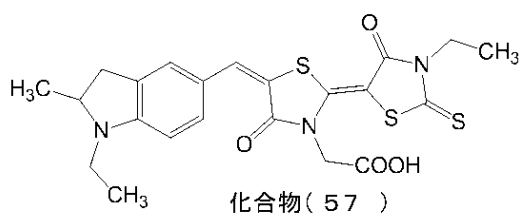
【化 5】



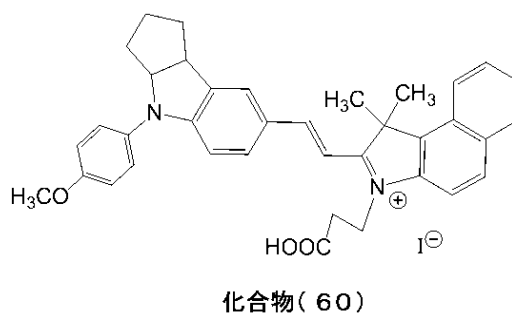
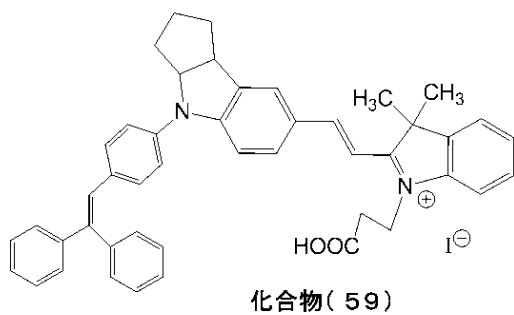
10



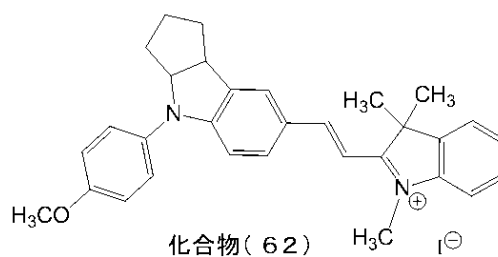
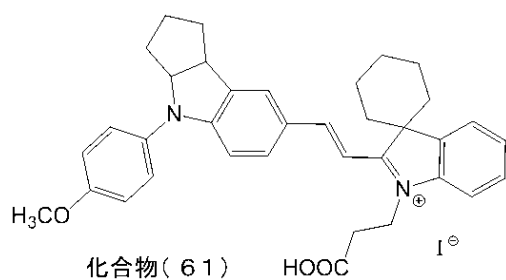
20



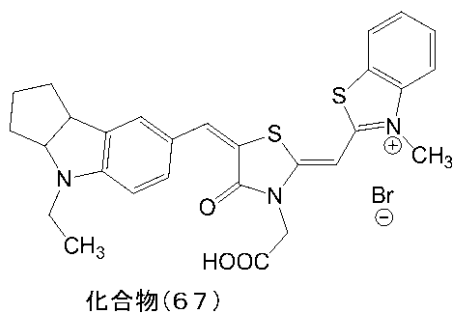
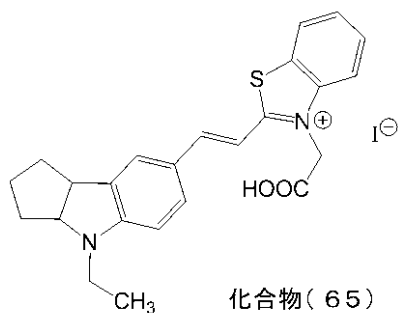
30



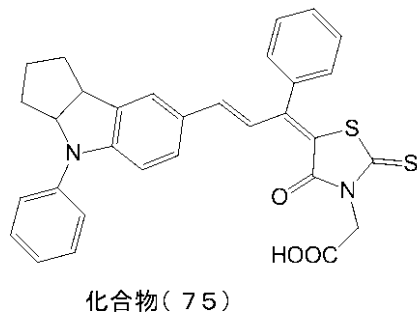
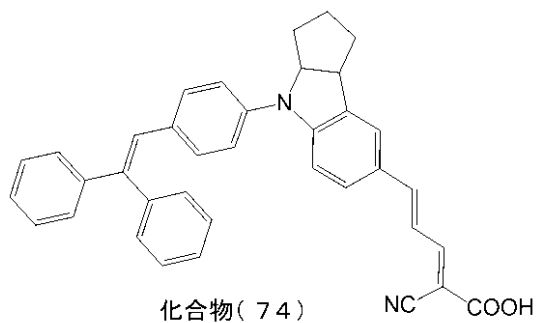
40



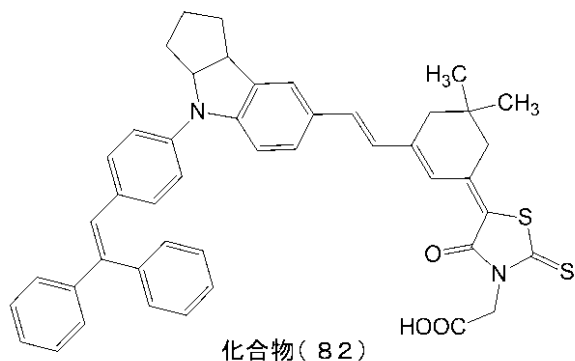
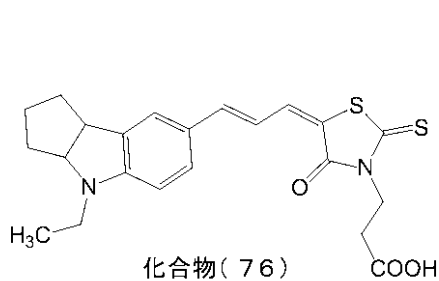
【化 6】



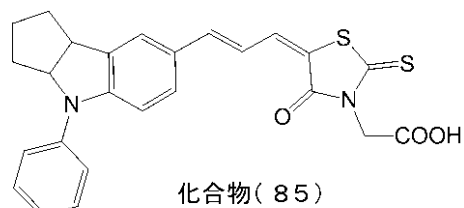
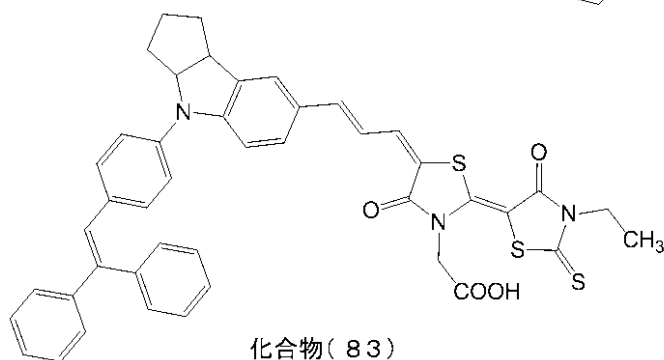
10



20



30



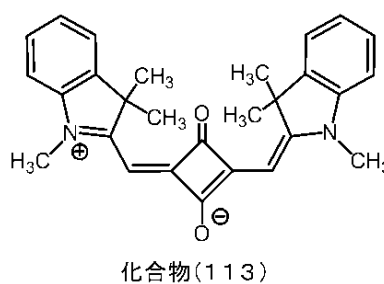
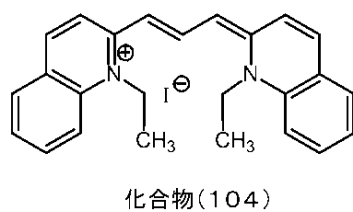
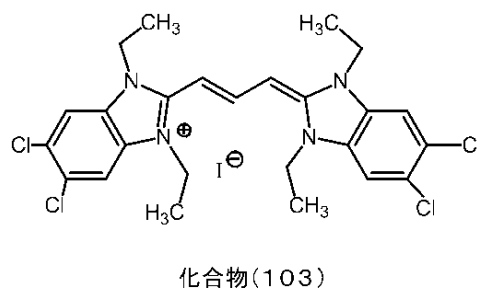
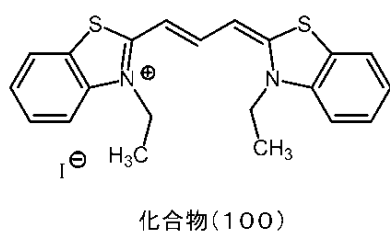
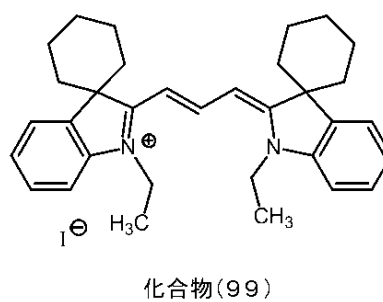
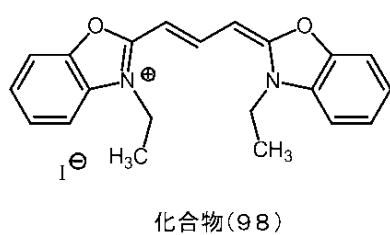
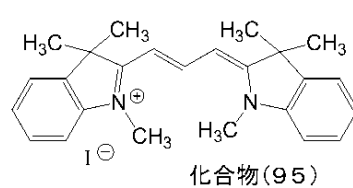
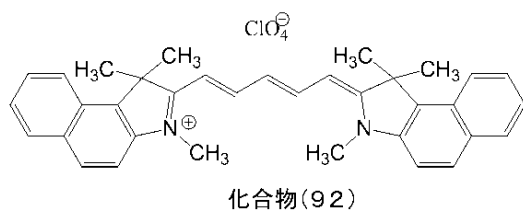
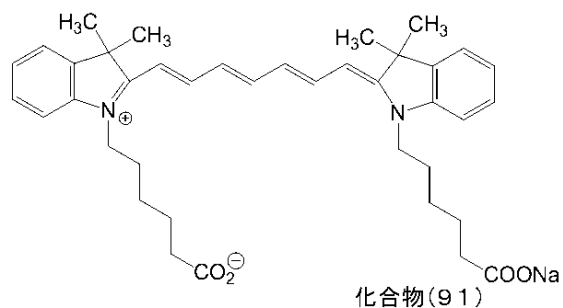
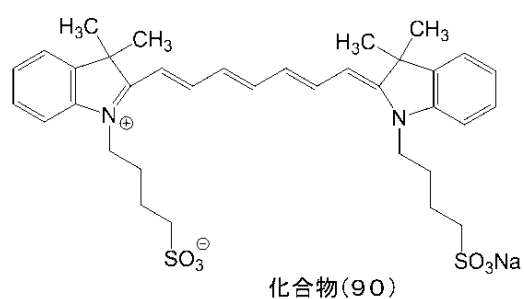
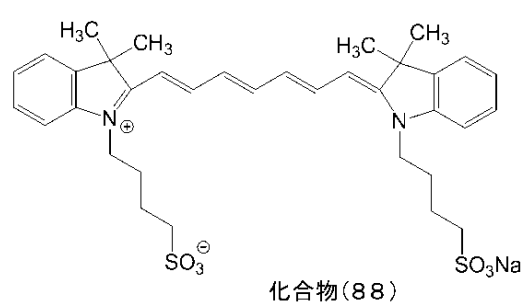
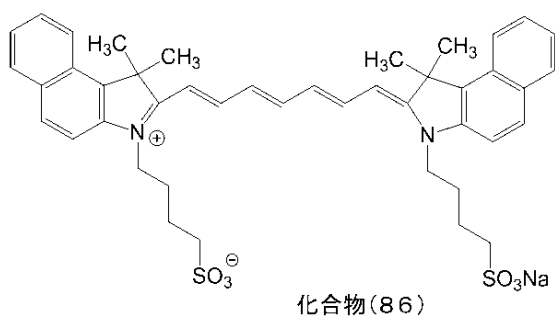
【請求項 2】

40

マクロファージのサブタイプM1とサブタイプM2とを識別する方法であって、有機化合物を付与して得られた分光特性に基づいて前記サブタイプM1と前記サブタイプM2とを識別し、

前記有機化合物が、下記化合物(86)、(88)、(90)、(91)、(92)、(95)、(98)、(99)、(100)、(103)、(104)、及び(113)からなる群より選ばれるいずれか1つの化合物で表されることを特徴とする方法。

【化 7】



【請求項 3】

10

20

30

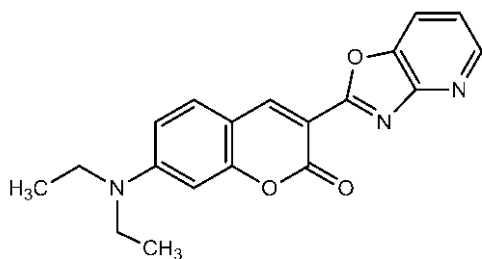
40

50

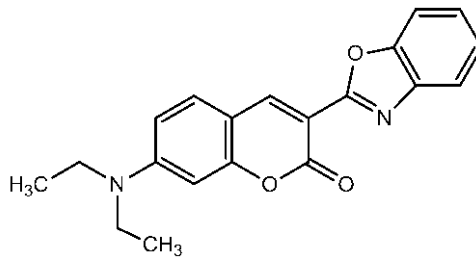
マクロファージのサブタイプ M 1 とサブタイプ M 2 とを識別する方法であって、有機化合物を付与して得られた分光特性に基づいて前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 とを識別し、

前記有機化合物が、下記化合物 (1 1 6)、(1 1 7)、(1 1 9)、(1 2 0)、(1 2 2)、(1 2 7)、(1 2 9)、(1 3 1)、(1 3 2)、及び (1 3 8) からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とする方法。

【化 8】

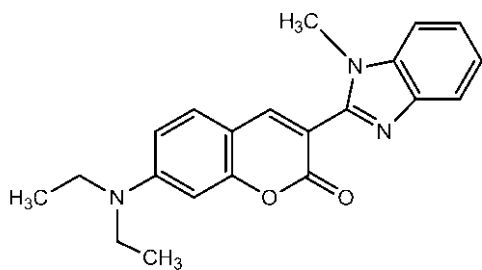


化合物(116)

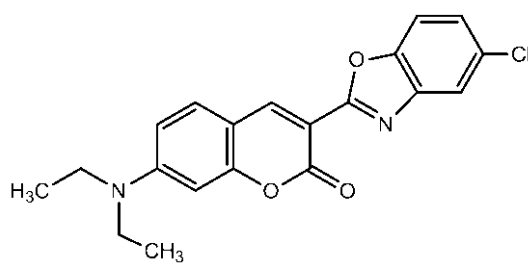


化合物(117)

10

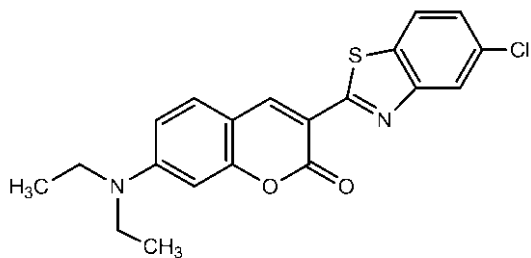


化合物(119)

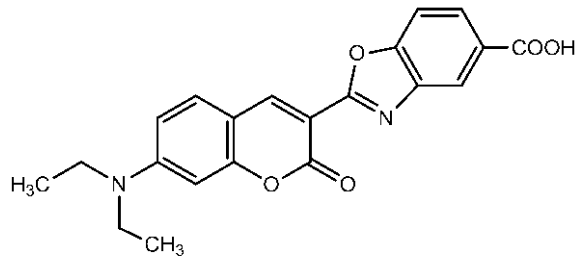


化合物(120)

20

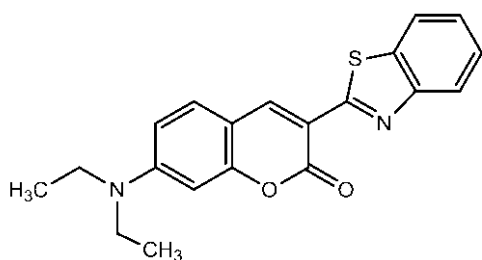


化合物(122)

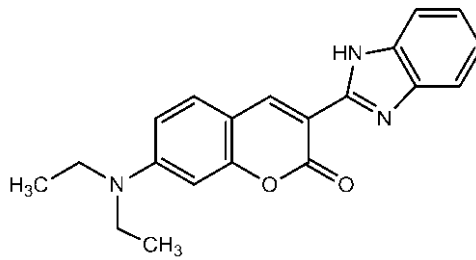


化合物(127)

30

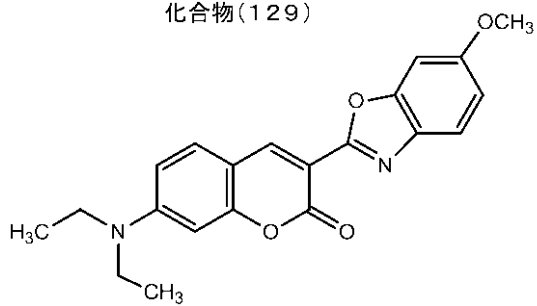


化合物(129)

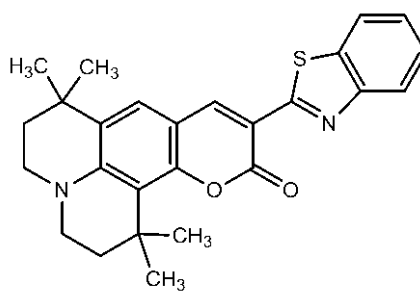


化合物(131)

40



化合物(132)



化合物(138)

【請求項 4】

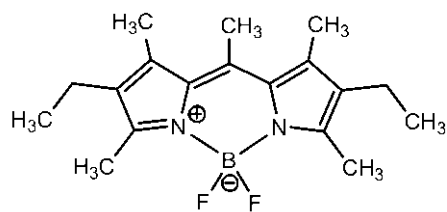
マクロフェージのサブタイプM1とサブタイプM2とを識別する方法であって、有機化

50

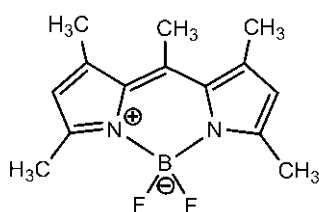
合物を付与して得られた分光特性に基づいて前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 とを識別し、

前記有機化合物が、下記化合物 (1 3 9)、(1 4 1)、(1 4 8)、(1 5 4)、(1 5 7)、(1 6 1)、(1 6 5)、(1 6 6)、(1 6 7)、及び (1 6 9) からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とする方法。

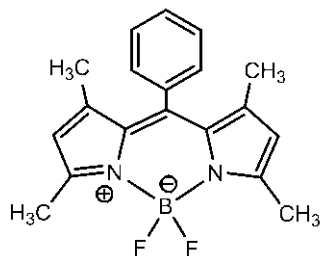
【化 9】



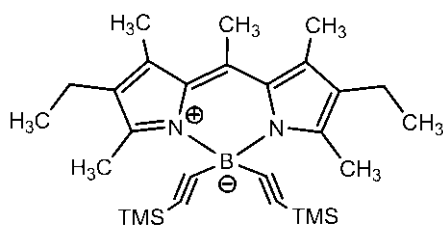
化合物(139)



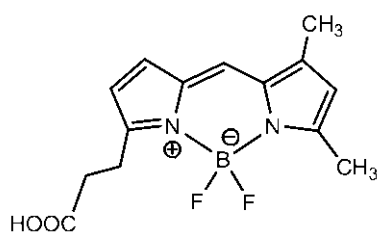
化合物(141)



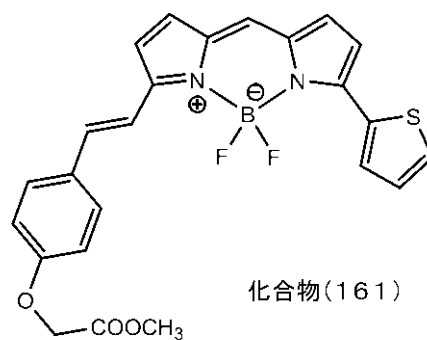
化合物(148)



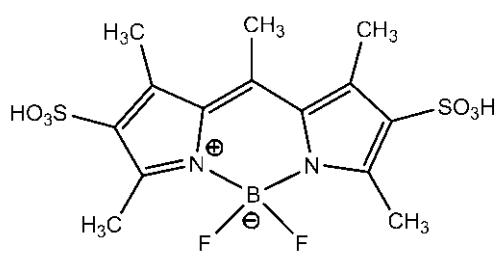
化合物(154)



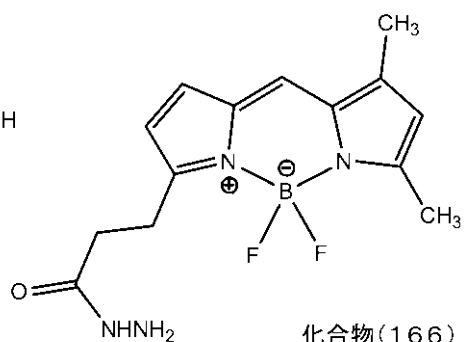
化合物(157)



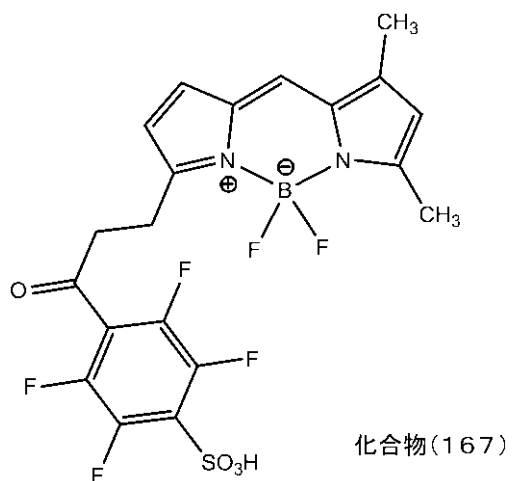
化合物(161)



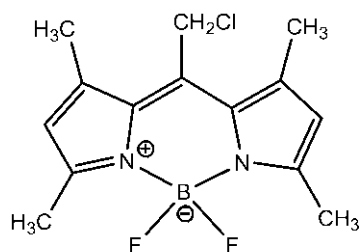
化合物(165)



化合物(166)



化合物(167)



化合物(169)

【請求項 5】

M 1 マクロファージの染色性が M 2 マクロファージと異なることを利用して、生物試料

10

20

30

40

50

中の M 1 マクロファージを識別する請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

M 1 マクロファージの染色性が M 2 マクロファージと異なることを利用して、生物試料中の M 2 マクロファージを識別する請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

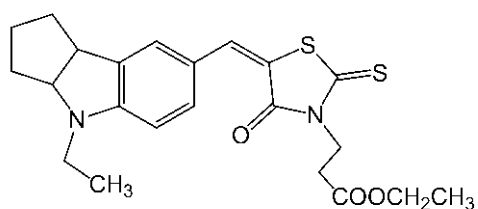
M 1 マクロファージの染色性が M 2 マクロファージと異なることを利用して、生物試料中の M 1 マクロファージと M 2 マクロファージをそれぞれ識別する請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

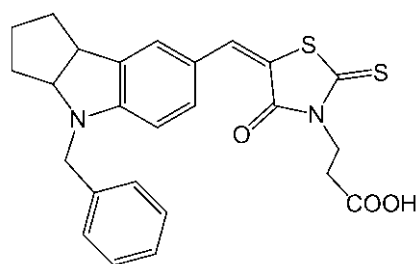
マクロファージのサブタイプ M 1 とサブタイプ M 2 とを識別するためのマクロファージ識別剤であって、有機化合物を 1 種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 で異なり、

前記有機化合物が、下記化合物 (1)、(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(1 1)、(1 2)、(1 3)、(1 5)、(1 7)、(1 9) ~ (2 6)、(2 8)、(3 0) ~ (3 3)、(3 5)、(3 6)、(3 8)、(4 2) ~ (4 5)、(4 8) ~ (6 2)、(6 5)、(6 7)、(7 4) ~ (7 6)、(8 2)、(8 3)、及び (8 5) からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とするマクロファージ識別剤。

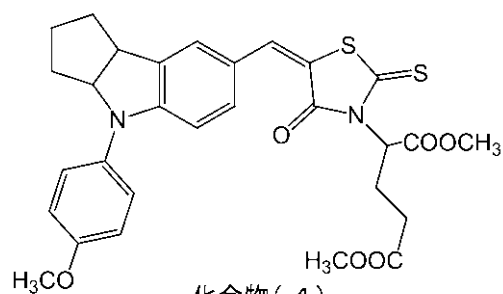
【化 10】



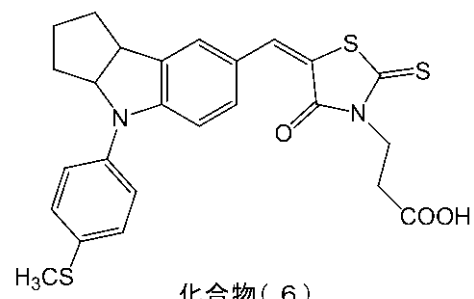
化合物(1)



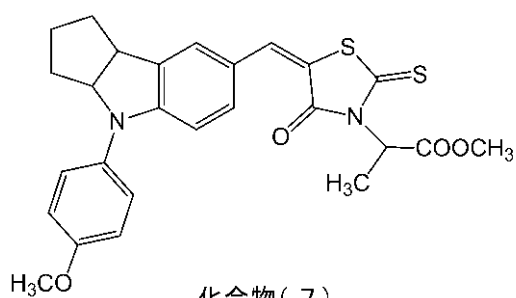
化合物(3)



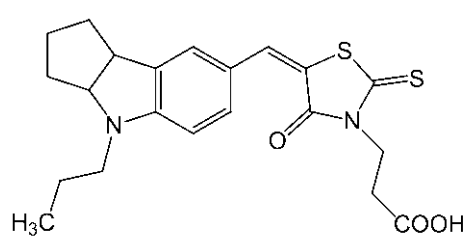
化合物(4)



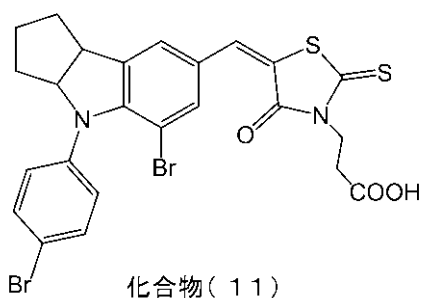
化合物(6)



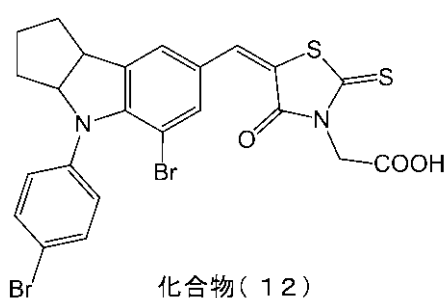
化合物(7)



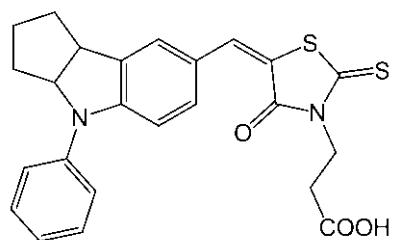
化合物(9)



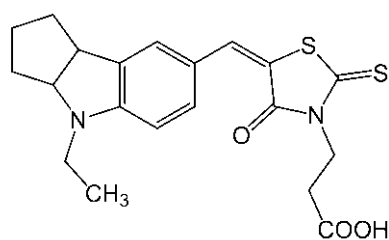
化合物(11)



化合物(12)



化合物(13)



化合物(15)

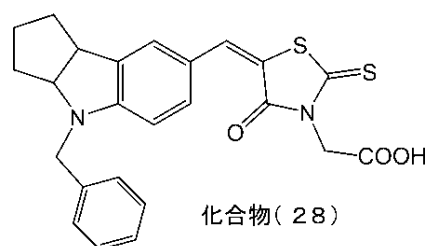
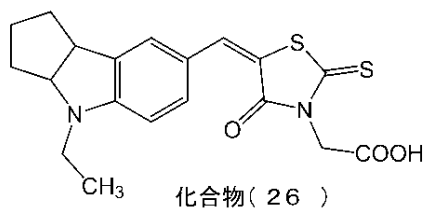
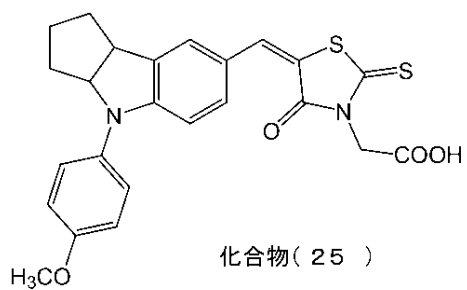
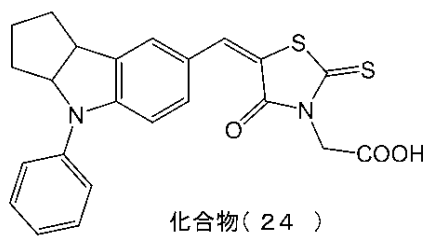
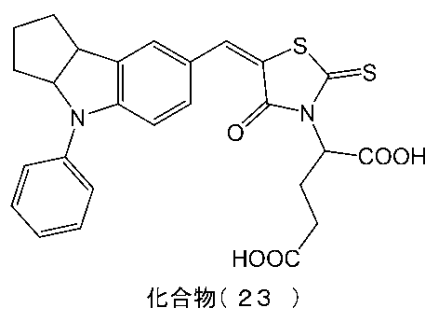
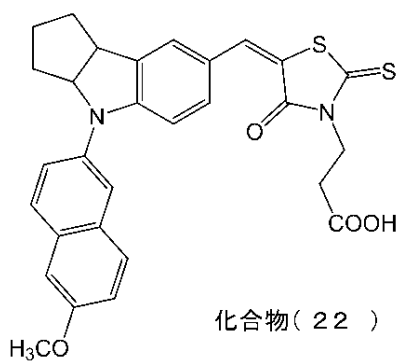
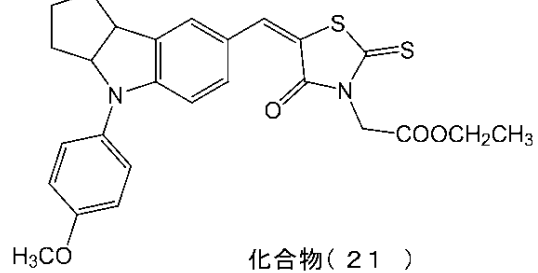
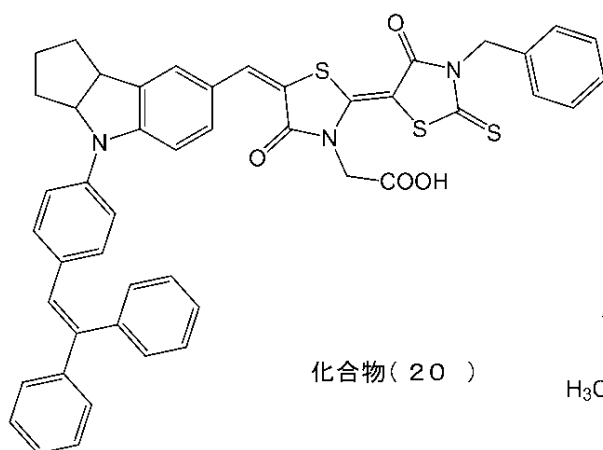
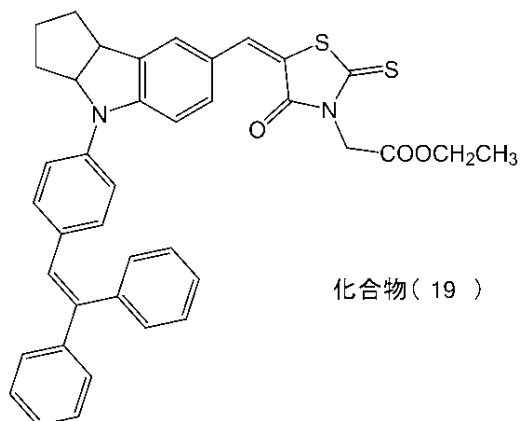
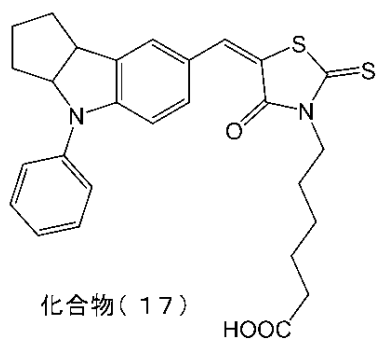
10

20

30

40

【化 1 1】



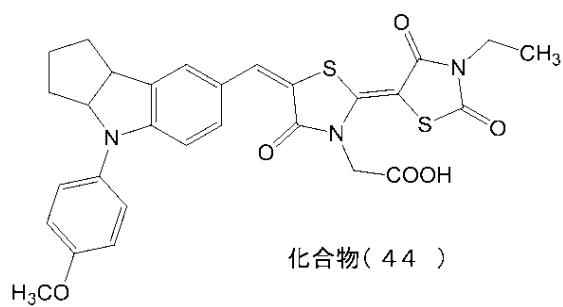
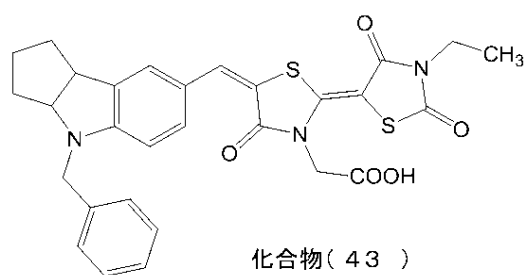
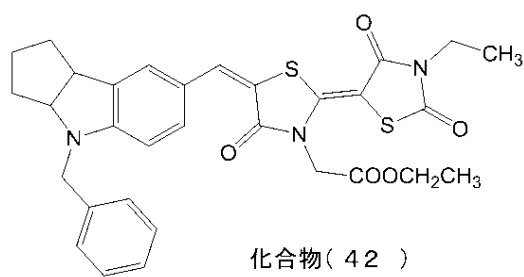
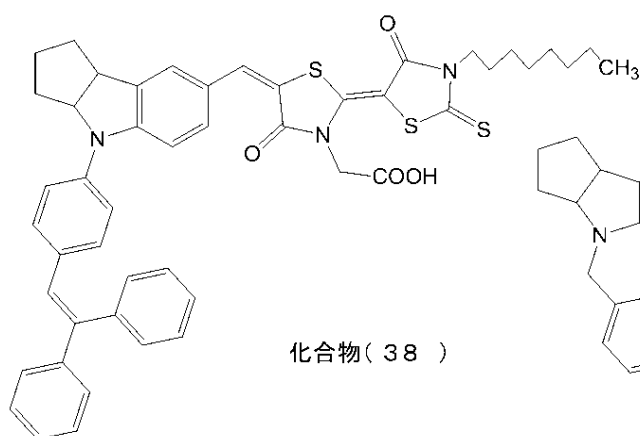
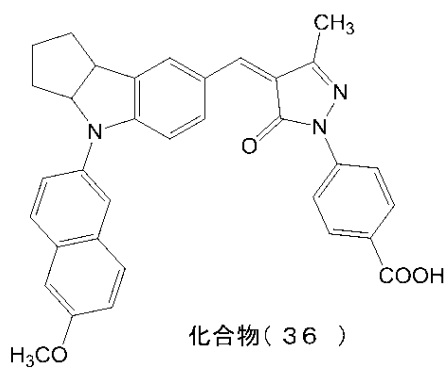
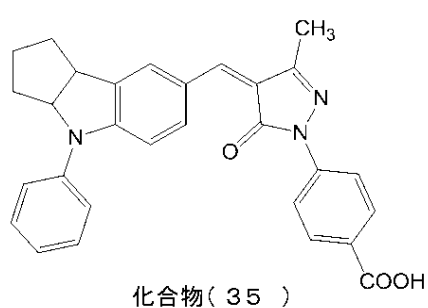
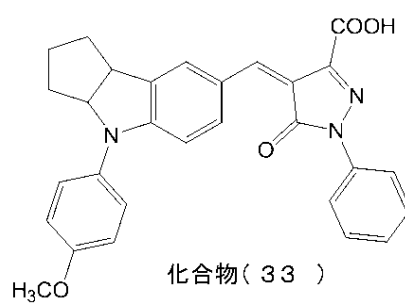
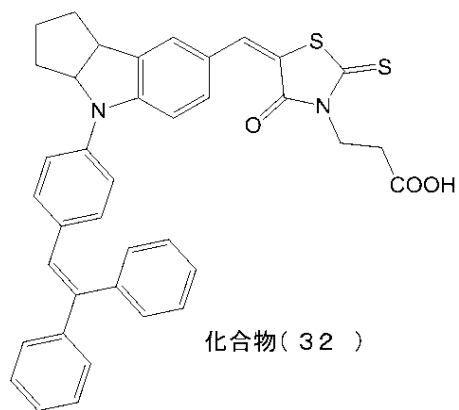
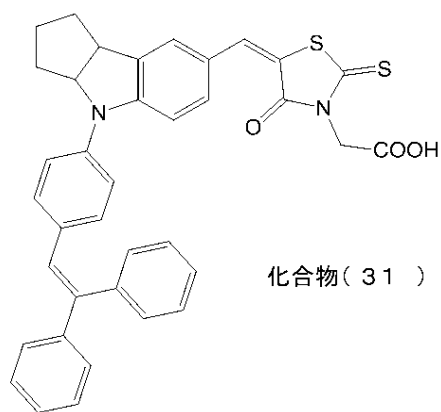
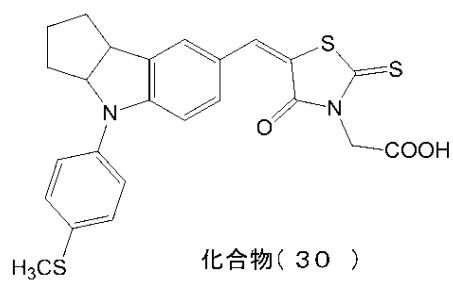
10

20

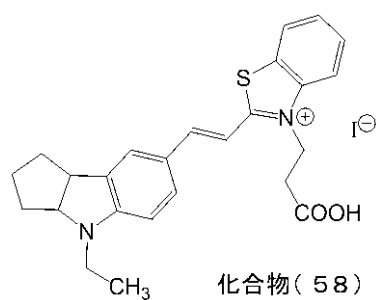
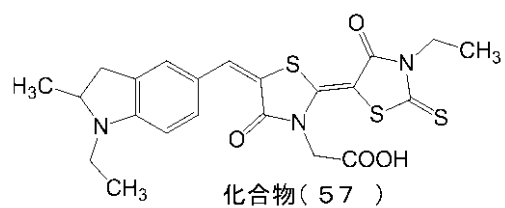
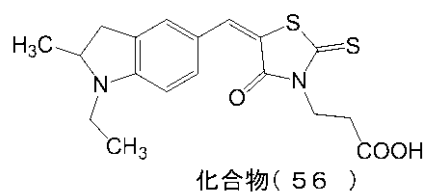
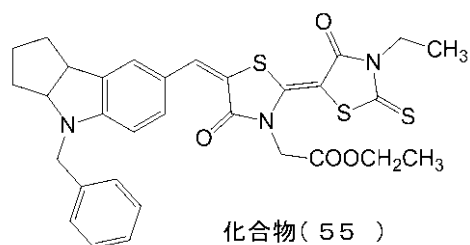
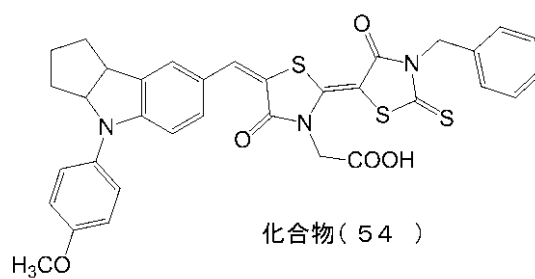
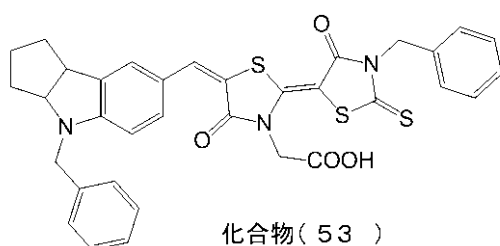
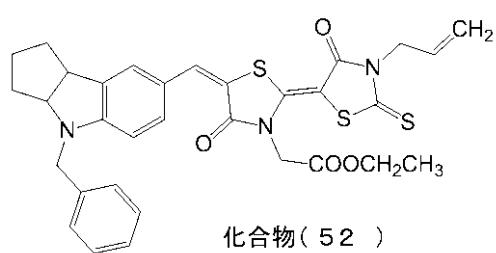
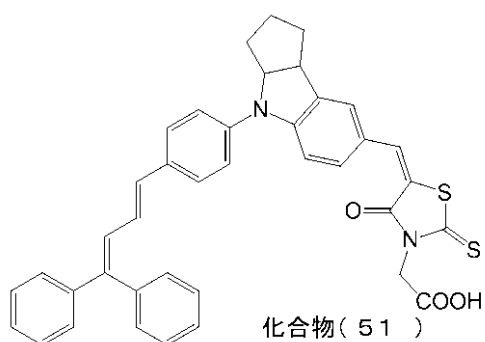
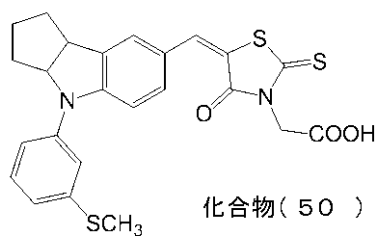
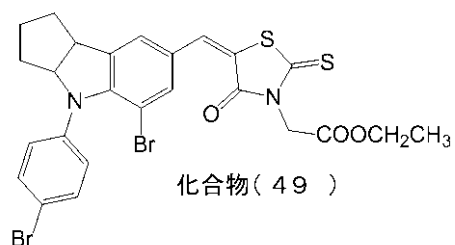
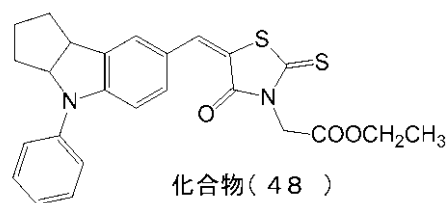
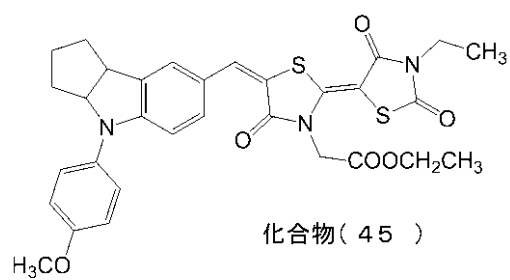
30

40

【化 1 2】



【化 1 3】



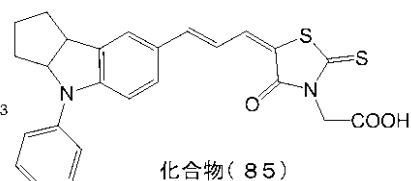
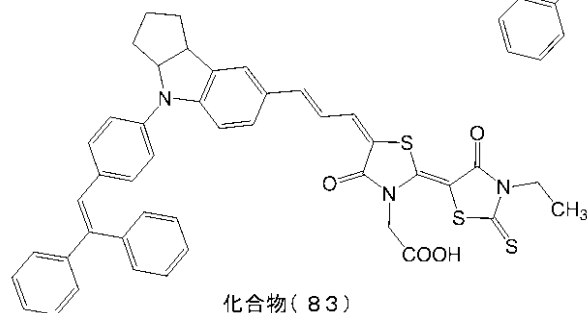
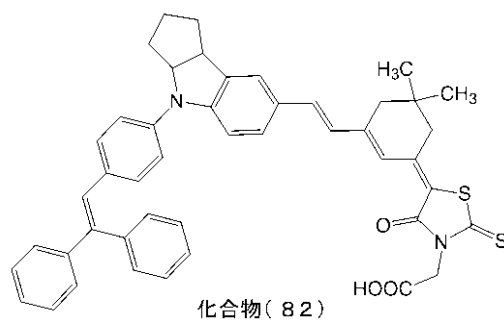
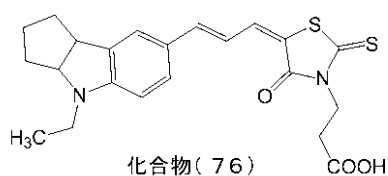
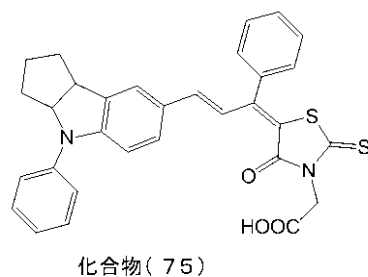
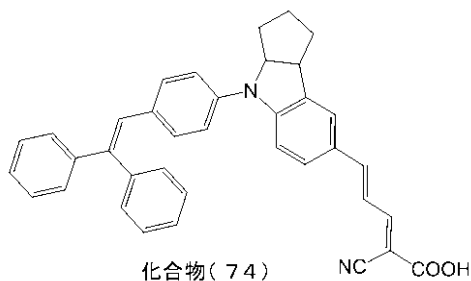
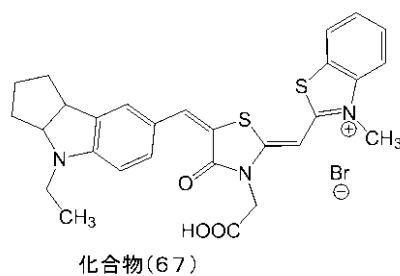
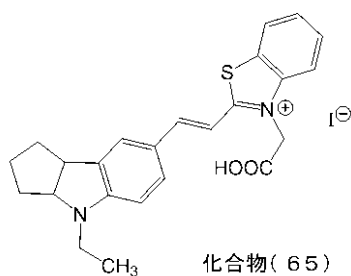
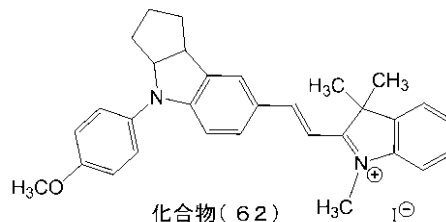
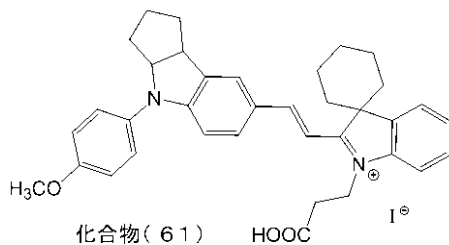
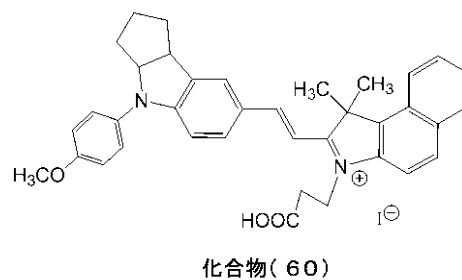
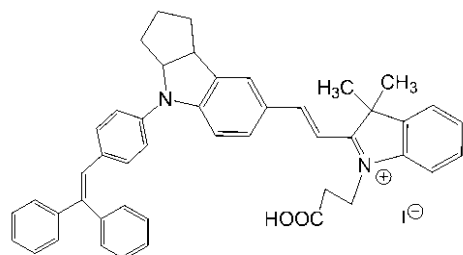
10

20

30

40

【化 1 4】



【請求項 9】

マクロファージのサブタイプ M 1 とサブタイプ M 2 とを識別するためのマクロファージ識別剤であって、有機化合物を 1 種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 で異なり、

前記有機化合物が、下記化合物 (8 6)、(8 8)、(9 0)、(9 1)、(9 2)、

10

20

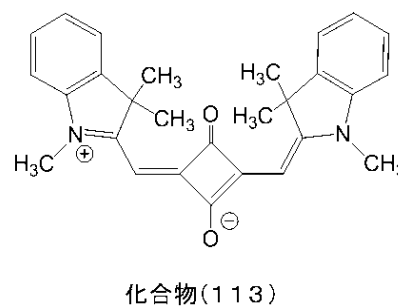
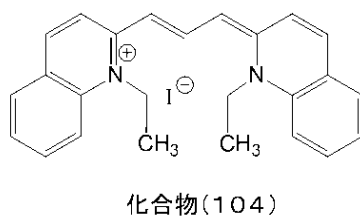
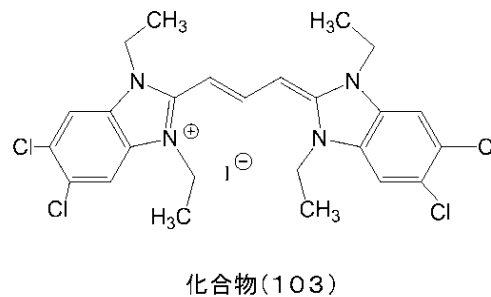
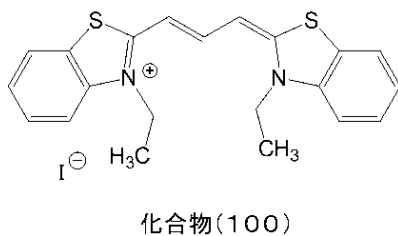
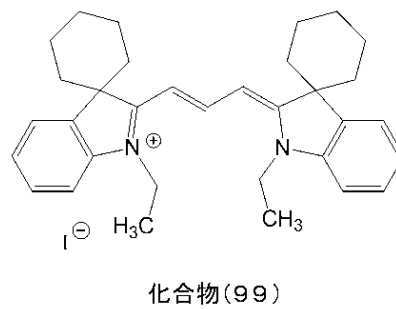
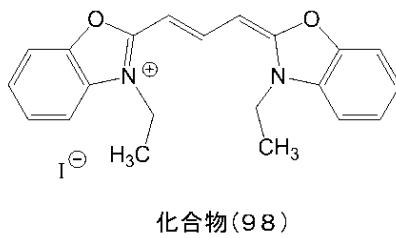
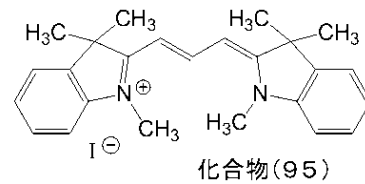
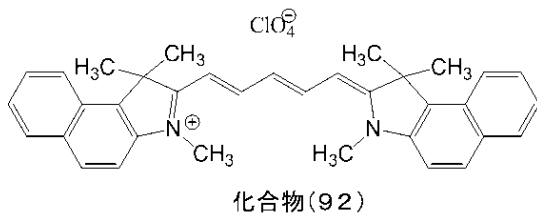
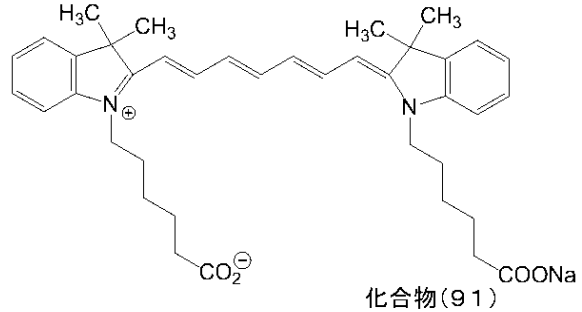
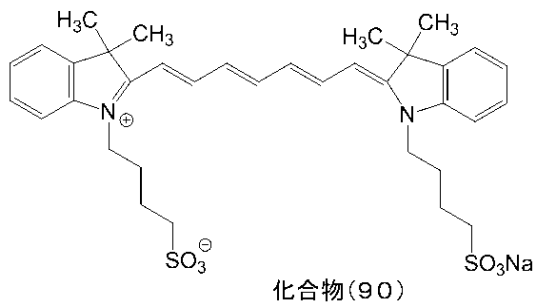
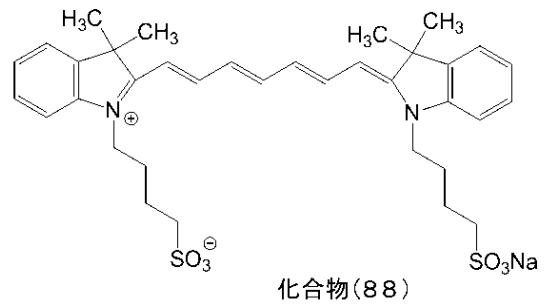
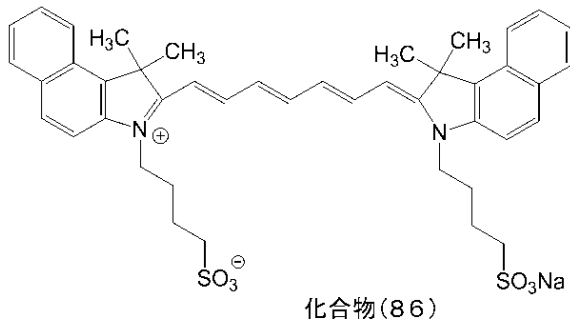
30

40

50

(9 5)、(9 8)、(9 9)、(1 0 0)、(1 0 3)、(1 0 4)、及び(1 1 3)
からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とするマクロファ-
ージ識別剤。

【化 15】



【請求項 10】

10

20

30

40

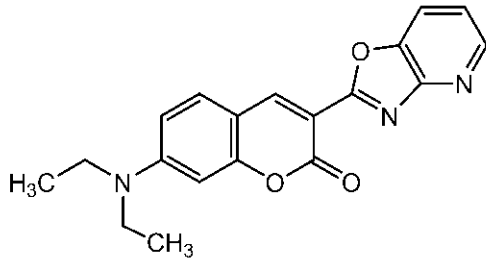
50

マクロファージのサブタイプ M 1 とサブタイプ M 2 とを識別するためのマクロファージ識別剤であって、有機化合物を 1 種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 で異なり、

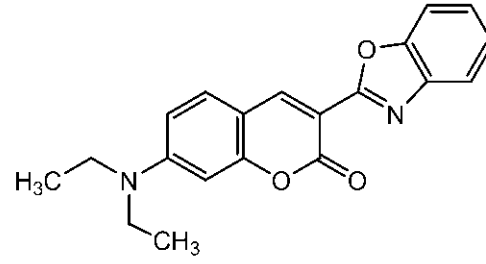
前記有機化合物が、下記化合物 (1 1 6)、(1 1 7)、(1 1 9)、(1 2 0)、(1 2 2)、(1 2 7)、(1 2 9)、(1 3 1)、(1 3 2)、及び (1 3 8) からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とするマクロファージ識別剤

。

【化 16】

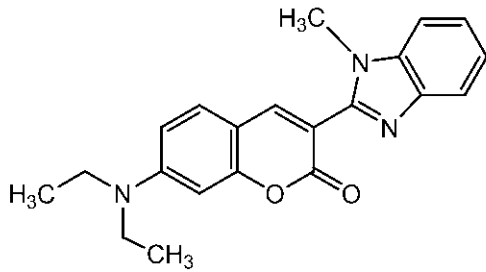


化合物(116)

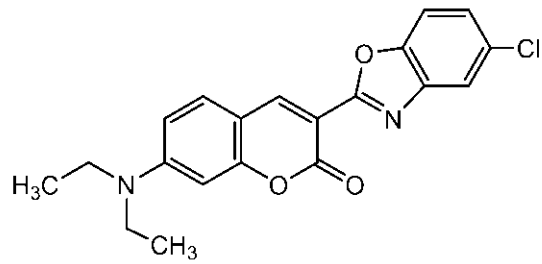


化合物(117)

10

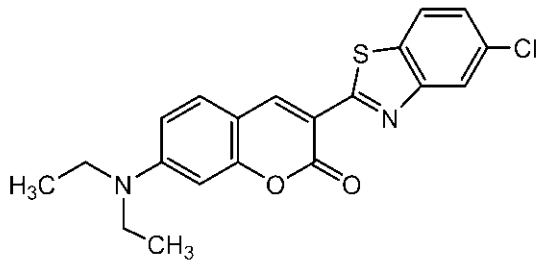


化合物(119)

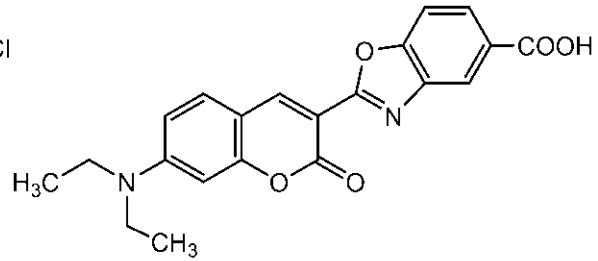


化合物(120)

20

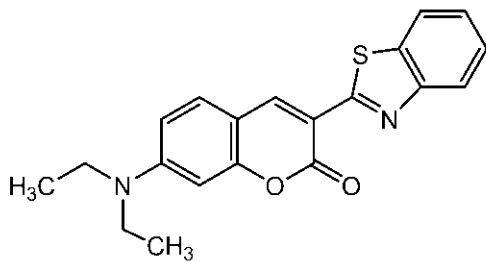


化合物(122)

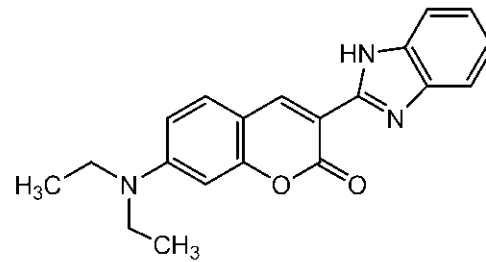


化合物(127)

30

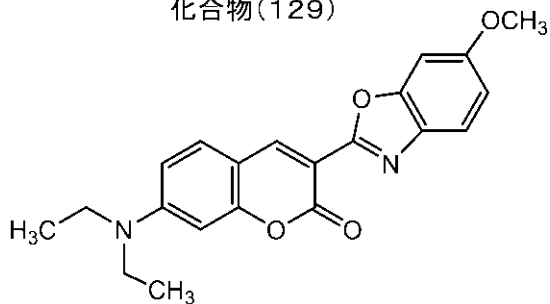


化合物(129)

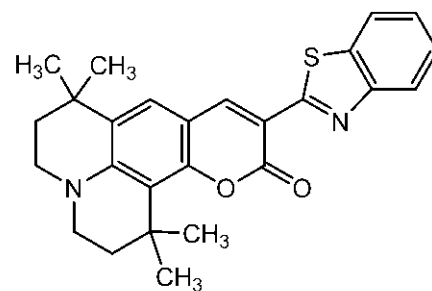


化合物(131)

40



化合物(132)



化合物(138)

【請求項 11】

マクロファージのサブタイプM1とサブタイプM2とを識別するためのマクロファージ

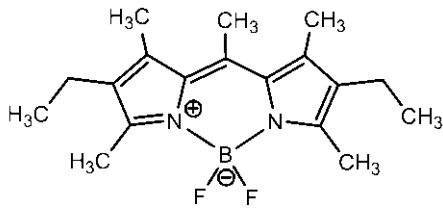
50

識別剤であって、有機化合物を 1 種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記サブタイプ M 1 と前記サブタイプ M 2 で異なり、

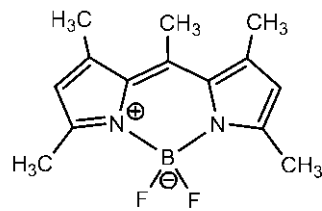
前記有機化合物が、下記化合物 (1 3 9)、(1 4 1)、(1 4 8)、(1 5 4)、(1 5 7)、(1 6 1)、(1 6 5)、(1 6 6)、(1 6 7)、及び (1 6 9) からなる群より選ばれるいずれか 1 つの化合物で表されることを特徴とするマクロファージ識別剤

。

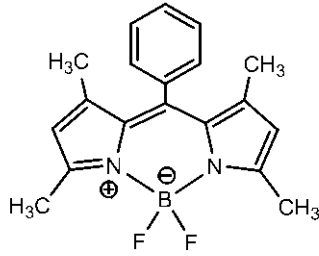
【化 1 7】



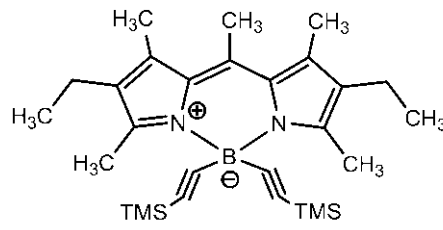
化合物(139)



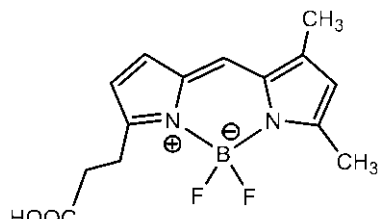
化合物(141)



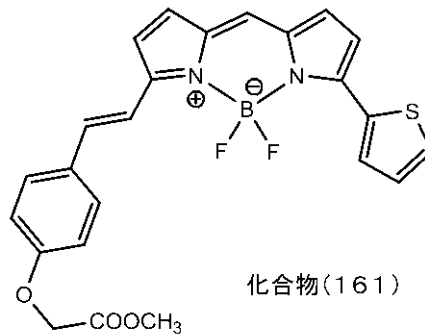
化合物(148)



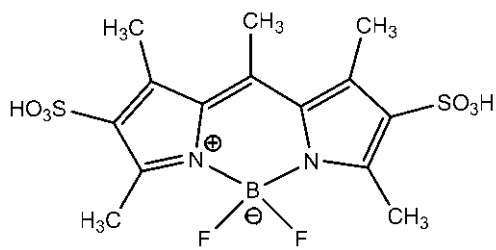
化合物(154)



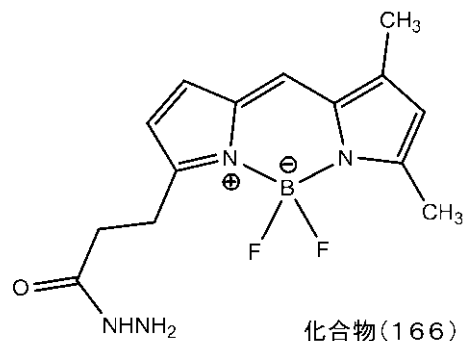
化合物(157)



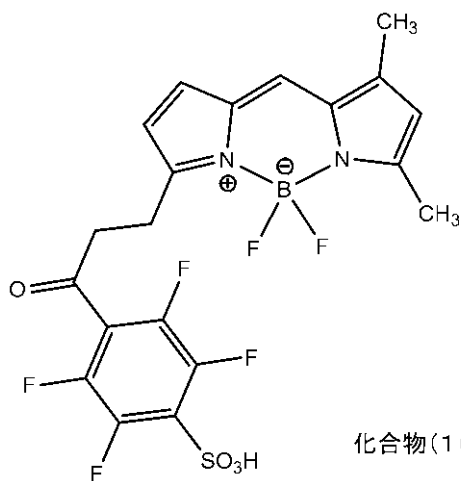
化合物(161)



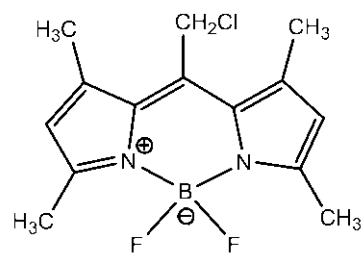
化合物(165)



化合物(166)



化合物(167)



化合物(169)

【請求項 1 2】

10

20

30

40

50

生物試料に前記有機化合物を曝露することを特徴とする請求項 1 から 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の識別方法に基づいて識別した、マクロファージのサブタイプを分取する方法。

【請求項 1 4】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の識別方法に基づいて識別した、マクロファージのサブタイプの種類、数、割合、または光学特性を検出する工程を少なくとも含むことを特徴とするマクロファージのサブタイプの評価方法。

【請求項 1 5】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤と被験物質とを生物試料の一部または全部に作用させる工程を含むことを特徴とする、マクロファージのサブタイプの評価方法。

【請求項 1 6】

請求項 1 5 に記載のマクロファージのサブタイプの評価方法に基づいて、マクロファージのサブタイプと被験物質との相関を分析する分析方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 4 に記載のマクロファージのサブタイプの評価方法に基づいて、マクロファージのサブタイプと被験物質との相関を分析する分析方法であって、前記被験物質に由来する光学特性を検出する工程を含むことを特徴とする分析方法。

【請求項 1 8】

請求項 1 6 または 1 7 に記載の分析方法を用いて、マクロファージのサブタイプと被験物質との相関を調べるスクリーニング方法。

【請求項 1 9】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を少なくとも含むことを特徴とする、マクロファージのサブタイプの識別用キット。

【請求項 2 0】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を 2 種類以上用いることを特徴とする、マクロファージの分取方法。

【請求項 2 1】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を 2 種類以上用いることを特徴とする、マクロファージの評価方法。

【請求項 2 2】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を 2 種類以上用いることを特徴とする、マクロファージの分析方法。

【請求項 2 3】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を 2 種類以上用いることを特徴とする、マクロファージのスクリーニング方法。

【請求項 2 4】

請求項 8 から 1 1 のいずれか 1 項に記載のマクロファージ識別剤を 2 種類以上含むことを特徴とする、マクロファージのサブタイプの識別用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、マクロファージのサブタイプの種類によって染色性が異なるマクロファージ識別剤、該マクロファージ識別剤を用いたマクロファージのサブタイプの識別方法、分取方法、評価方法、スクリーニング方法、およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

近年、高齢化社会が進むにつれて、がんや生活習慣病、循環器系疾患などの炎症性疾患

10

20

30

40

50

の患者数が増加し、その結果、医療費が増加するなど、社会的な問題となっている。この問題を解決させるために、炎症性疾患を早期に発見できる診断法や重症化する前に治癒させる有効な治療法が求められている。炎症性疾患は、炎症が慢性化することにより惹起および重症化すると考えられている。しかし、炎症の慢性化は未知の部分が多く、そのメカニズムについてはいまだに解明されていない。そのため、炎症が慢性化するメカニズムの解明に向けた研究が国内外で精力的に進められている。

【0003】

炎症の慢性化に重要な役割を果たす細胞種の1つとして、近年、白血球の1種であるマクロファージが注目されている。現在、マクロファージには、炎症を促進する機能を有するもの（M1マクロファージ）と炎症を抑制する機能を有するもの（M2マクロファージ）の少なくとも2種類のサブタイプが存在することが知られている。

10

【0004】

マクロファージのサブタイプ（以下、サブタイプと略す。以降、本明細書中、サブタイプと表記する場合は、マクロファージのサブタイプを指す）は、がんや肥満に関連する2型糖尿病、動脈硬化、腎炎などの炎症性疾患において、病態の変化に重大な関連があることが明らかになった。サブタイプと病態の関連については、多くの報告例がある。例えば、サブタイプの数、密度、または、バランス等が、病態を反映することが知られる。したがって、サブタイプの識別は、診断や治療に応用されると期待されている。

【0005】

サブタイプを識別する方法として、蛍光色素を結合させた抗体を用いて、各サブタイプの細胞表面に特異的に発現しているタンパク質マーカーを認識する方法（以下、蛍光抗体法）が知られている（非特許文献1）。

20

【0006】

一方、ボルフィリン系化合物を用いて、脾島の炎症部位に浸潤するマクロファージに特異的に取り込まれる例が開示されている（特許文献1）。

【0007】

サブタイプの識別や評価、また物質がサブタイプに及ぼす影響の評価、分析、スクリーニングが簡便に行えるようになれば、炎症性疾患におけるサブタイプの役割のより詳細な理解につながる。サブタイプの識別や評価に基づいた、炎症性疾患の有効な診断法の開発が期待される。また、サブタイプの識別、評価、分析、およびスクリーニングに基づいて、疾患部位におけるサブタイプのコントロールや、生体外で調整した特定のサブタイプの投与などを行うことで、炎症性疾患の早期治療法の開発も可能となる。

30

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Angelo A Manfredi et al., Journal of Leukocyte Biology p.p. 779 - 787 (2009)

【非特許文献2】Yakugaku Zasshi, Vol. 69, p.p. 237 - 239, 1949

【非特許文献3】Heterocyclic Communications, 15 (4), 2009, p.p. 245 - 250

40

【非特許文献4】Heteroatom Chemistry, Volume 1, Number 5, 1990, p.p. 389 - 399

【非特許文献5】Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 2005, 44, p.p. 3694 - 3698

【非特許文献6】Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 1997, 36, p.p. 1333 - 1335

【非特許文献7】J. Neuroinflam., vol. 8, 2011, 58 (URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3123187>)

50

【非特許文献 8】Indian Journal of Chemistry, Vol. 6, p. p. 136 - 139, 1968

【非特許文献 9】J. Thorac. Oncol., Vol. 7, p. p. 1091 - 1100, 2012

【非特許文献 10】Mol. Cancer Res., Vol. 10, p. p. 727 - 738, 2012

【特許文献】

【0009】

【特許文献 1】特開 2003 - 12547 号公報

【特許文献 2】WO 201007432 号公報

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0010】

非特許文献 1 が開示する蛍光抗体法は、生体組織サンプルに蛍光抗体が非特異的に結合するのを防ぐための処理工程数が多く、染色時間がかかる。また、抗体の保存安定性が悪く、ロット差の影響が大きいことから高価になってしまう等の課題があった。

【0011】

一方、特許文献 1 に開示されているようなポルフィリン系色素化合物を用いた場合、M1 マクロファージと M2 マクロファージが識別できないという課題があった。

【課題を解決するための手段】

20

【0012】

発明者らは、前記した課題を解決すべく鋭意検討の結果、有機化合物を用いてマクロファージのサブタイプ M1 と M2 とを識別する方法を見出した。

【0013】

すなわち、本発明は、マクロファージのサブタイプ M1 と M2 とを識別する方法であって、有機化合物を付与して得られた分光特性から前記 M1 と前記 M2 とを識別することを特徴とする。

【0014】

また、本発明に係るマクロファージ識別剤は、マクロファージのサブタイプ M1 と M2 とを識別するためのマクロファージ識別剤であって、有機化合物を 1 種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記 M1 と前記 M2 で異なることを特徴とする。

30

【0015】

また、本発明者らは、該マクロファージ識別剤を用いてサブタイプの分取方法、サブタイプと物質の相関の分析方法、スクリーニング方法、およびキットを開発し、本発明を完成するに至った。

【発明の効果】

【0016】

本発明により、簡便、かつ廉価な方法で、サブタイプを識別することが可能となる。これにより、サブタイプの効率的な識別や分離、サブタイプの数や密度やバランスなどの評価、およびサブタイプに影響を及ぼす物質の評価やスクリーニングなどが可能になる。

40

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図 1】マウス骨髄細胞から分化誘導させた M1 マクロファージと M2 マクロファージの遺伝子発現解析の結果を示す。

【図 2】実施例 1 で観測されたヒストグラムを示す。

【図 3】比較例 1 で観測されたヒストグラムを示す。

【図 4】比較例 2 で観測されたヒストグラムを示す。

【図 5】実施例 5 で観測されたヒストグラム (a)、(b) およびサイトグラム (c)、(d)、(e) を示す。(c) は化合物 (1) および化合物 (33) で染色した M1 マクロファージで得られたサイトグラムである。(d) は化合物 (1) および化合物 (33)

50

）で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラムである。(e)は、(c)と(d)を重ね合わせたサイトグラムである。

【図6】実施例56で観測されたサイトグラムを示す。(a)は化合物(1)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラム、(b)は化合物(1)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラム、(c)は、化合物(1)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージを混合したサンプルで得られたサイトグラムである。

【図7】実施例57および比較例3で観測されたヒストグラムを示す。(a)は化合物(1)で染色したM1マクロファージで得られたヒストグラム、(b)は化合物(1)で染色したM2マクロファージで得られたヒストグラムである。

【図8】RAW264.7から分化誘導させたM1マクロファージとM2マクロファージの遺伝子発現解析の結果を示す。

【図9】実施例59で観測されたヒストグラムを示す。

【図10】THP-1から分化誘導させたM1マクロファージとM2マクロファージの遺伝子発現解析の結果を示す。

【図11】実施例65で観測されたヒストグラムを示す。

【図12】比較例6で観測されたヒストグラムを示す。

【図13】実施例78で観測されたサイトグラムを示す。(a)は化合物(86)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラム、(b)は化合物(86)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラム、(c)は、化合物(86)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージを混合したサンプルで得られたサイトグラムである。

【図14】実施例79および比較例5で観測されたヒストグラムを示す。(a)は化合物(113)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラム、(b)は化合物(113)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラムである。

【図15】実施例81で観測されたヒストグラムを示す。

【図16】比較例8で観測されたヒストグラムを示す。

【図17】実施例91で観測されたヒストグラム(a)、(b)およびサイトグラム(c)、(d)、(e)を示す。(c)は化合物(116)および化合物(120)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラムである。(d)は化合物(116)および化合物(120)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラムである。(e)は、(c)と(d)を重ね合わせたサイトグラムである。

【図18】実施例92で観測されたサイトグラムを示す。(a)は化合物(120)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラム、(b)は化合物(120)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラム、(c)は、化合物(120)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージを混合したサンプルで得られたサイトグラムである。

【図19】実施例93および比較例9で観測されたヒストグラムを示す。(a)は化合物(120)で染色したM1マクロファージで得られたヒストグラム、(b)は化合物(120)で染色したM2マクロファージで得られたヒストグラムである。

【図20】実施例95で観測されたヒストグラムを示す。

【図21】実施例96で観測されたヒストグラムを示す。

【図22】実施例97で観測されたヒストグラムを示す。

【図23】実施例98で観測されたヒストグラムを示す。

【図24】実施例108で観測されたヒストグラム(a)、(b)およびサイトグラム(c)、(d)、(e)を示す。(c)は化合物(139)および化合物(161)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラムである。(d)は化合物(139)および化合物(161)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラムである。(e)は、(c)と(d)を重ね合わせたサイトグラムである。

【図25】実施例109で観測されたサイトグラムを示す。(a)は化合物(139)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラム、(b)は化合物(139)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラム、(c)は、化合物(139)で染色し

10

20

30

40

50

たM1マクロファージとM2マクロファージを混合したサンプルで得られたサイトグラムである。

【図26】実施例110および比較例10で観測されたヒストグラムを示す。(a)は化合物(139)で染色したM1マクロファージで得られたヒストグラム、(b)は化合物(139)で染色したM2マクロファージで得られたヒストグラムである。

【図27】実施例112で観測されたヒストグラムを示す。

【図28】実施例113で観測されたヒストグラムを示す。

【図29】実施例114で観測されたヒストグラムを示す。

【図30】実施例115で観測されたヒストグラム(a)、(b)およびサイトグラム(c)、(d)、(e)を示す。(c)は化合物(1)および化合物(113)で染色したM1マクロファージで得られたサイトグラムである。(d)は化合物(1)および化合物(113)で染色したM2マクロファージで得られたサイトグラムである。(e)は、(c)と(d)を重ね合わせたサイトグラムである。

10

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明は、マクロファージのサブタイプM1とM2とを識別するためのマクロファージ識別剤であって、有機化合物を1種類以上含み、付与したときに得られる分光特性が前記M1と前記M2で異なることを特徴とするマクロファージ識別剤を提供する。

【0019】

以下、本発明の実施形態について説明する。なお、個々に開示する実施形態は、本発明の新規なマクロファージサブタイプの識別方法、マクロファージ識別剤、分取方法、評価方法、サブタイプと物質の相関の分析方法、スクリーニング方法、およびキットを例示するものであり、本発明はこれらに限定されるものではない。

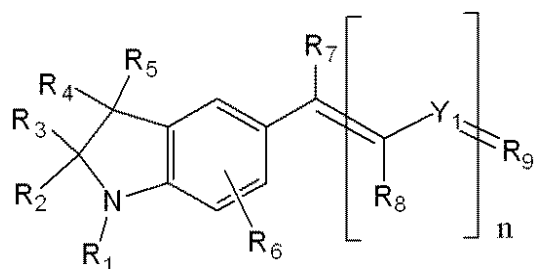
20

【0020】

(第一実施形態)

本発明の第一実施形態であるマクロファージ識別剤は、一般式(1)で表される化合物を1種類以上含むことを特徴とする。

【化1】



30

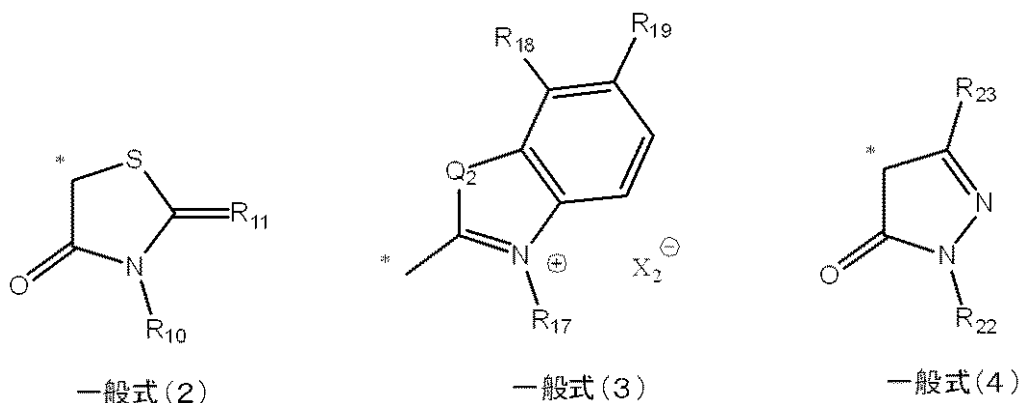
一般式(1)

【0021】

一般式(1)中、R₁は水素原子、アルキル基、アラルキル基、アルケニル基、またはアリール基を表し、R₂～R₅は各々独立して水素原子、アルキル基、アリール基、カルボキシル基、カルボキシルアルキル基、または、アルキルカルボニル基を表し、R₂とR₄が互いに結合して脂肪族環を形成しても良い。R₆は水素原子、アルキル基、アルコキシ基、またはハロゲン原子を表し、R₇～R₈は各々独立して水素原子、アルキル基、またはアリール基を表し、R₉は、ジシアノメチレン基、シアノカルボキシメチレン基、または下記一般式(2)～(4)を表し、Y₁は、アリール基置換炭素原子、シクロペンテン環、シクロヘキセン環、または炭素原子(-C=)を表し、nは0～1の整数を表す。

40

【化 2】

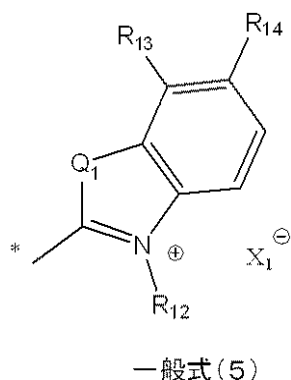


10

【0022】

一般式(2)中、R₁₀は、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、またはアルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、R₁₁は、硫黄原子、2-チオキソチアゾリジン-4-オン基、チアゾリン-2,4-ジオン基、または下記一般式(5)を表す。「*」は連結部を表す。

【化 3】



20

【0023】

一般式(5)中、R₁₂は、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、またはアルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、R₁₃~R₁₄は、水素原子を表し、R₁₃とR₁₄が互いに結合してベンゼン環を形成しても良い。Q₁は、酸素原子、硫黄原子、N-アルキル窒素原子、または、-C(R₁₅)(R₁₆)-を表し、R₁₅~R₁₆は、各々独立して、アルキル基を表し、R₁₅とR₁₆は互いに結合して、環を形成しても良く、X₁[⊖]は、陰イオン性基を表す。「*」は連結部を表す。

30

【0024】

一般式(3)中、R₁₇は、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、またはアルキルカルボニルオキシアルキル基を表し、R₁₈~R₁₉は、水素原子を表し、R₁₈とR₁₉が互いに結合してベンゼン環を形成しても良い。Q₂は、酸素原子、硫黄原子、N-アルキル窒素原子、または、-C(R₂₀)(R₂₁)-を表し、R₂₀~R₂₁は、各々独立して、アルキル基を表し、R₂₀とR₂₁は互いに結合して、環を形成しても良く、X₂[⊖]は、陰イオン性基を表す。「*」は連結部を表す。

40

一般式(4)中、R₂₂は、アルキル基、またはアリール基を表し、R₂₃は、アルキル基、またはカルボキシル基を表す。「*」は連結部を表す。

【0025】

前記一般式(1)中、R₁におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、またはシクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1~20個のアルキル基が挙げ

50

られる。

【0026】

前記一般式(1)中、 R_1 におけるアラルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ベンジル基、またはフェネチル基等が挙げられる。

【0027】

前記一般式(1)中、 R_1 におけるアルケニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ビニル基、2,2-ジフェニルビニル基、3-ブテニル基、またはシクロヘキセニル基等の炭素数2~20個のアルケニル基が挙げられる。

【0028】

前記一般式(1)中、 R_1 におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、ナフチル基、フェナントリル基、またはアントラセニル基等の6~14員環の単環式または多環式アリール基が挙げられる。

10

【0029】

前記一般式(1)中、 R_1 は、更に置換基を有していてもよく、色素化合物の保存安定性を著しく阻害するものでなければ特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、または*tert*-ブチル基等のアルキル基；フェニル基、または、ナフチル基等のアリール基；メトキシ基、エトキシ基、または、ブトキシ基等のアルコキシ基；フェノキシ基、または、ナフチルオキシ基等のアリールオキシ基；チオメチル基、チオエチル基、チオプロピル基、チオブチル基、または、チオフェニル基等のアルキルスルファニル基；ジメチルアミノ基、*N*-エチル-*N*-フェニルアミノ基、または、ジフェニルアミノ基等のジ置換アミノ基；アセチル基、または、ベンゾイル基等のアシル基；スルホニル基；カルボキシル基；カルボキシルアルキル基；カルバモイル基；スルファモイル基；ピリジル基、トリアジニル基、または、ベンズチアゾリル基等のヘテロ環基；ニトロ基；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、または、ヨウ素原子等のハロゲン原子が挙げられる。

20

【0030】

前記一般式(1)中、 R_1 は、上記に列挙した置換基から、それぞれ独立に且つ任意に選択できるが、好ましい形態としてはアルキル基、または、アリール基等の場合がサブタイプの種類の識別がしやすいため好ましく、具体的には、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、フェニル基、プロモフェニル基、ベンジル基、プロモベンジル基、メチルチオフェニル基、メトキシフェニル基、メトキシナフチル基、ベンジルフェニル基、2,2-ジフェニルビニル基、または、2,2-ジフェニルビニルフェニル基等が好ましい。更に好ましくは、フェニル基、プロモフェニル基、ベンジル基、メチルチオフェニル基、メトキシフェニル基、またはメトキシナフチル基が好ましく、特に、メチルチオフェニル基の場合はストークスシフトが大きく、サブタイプの種類の識別がしやすいため好ましい。

30

【0031】

前記一般式(1)中、 $R_2 \sim R_5$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、または、ブチル基等の炭素数1~4個のアルキル基等が挙げられる。

40

【0032】

前記一般式(1)中、 $R_2 \sim R_5$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、または、ナフチル基が挙げられる。

【0033】

前記一般式(1)中、 $R_2 \sim R_5$ におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボン酸メチル基、カルボン酸エチル基、カルボン酸プロピル基、または、カルボン酸ブチル基等が挙げられる。

【0034】

前記一般式(1)中、 $R_2 \sim R_5$ におけるアルキルカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルカルボニル基、エチルカルボニル基、プロピルカル

50

ボニル基、ブチルカルボニル基、フェニルカルボニル基、ナフチルカルボニル基、または、フェナントリルカルボニル基等が挙げられる。

【0035】

前記一般式(1)中、 R_2 と R_4 が互いに結合して形成する脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、例えば、シクロオクタン環、シクロヘプタン環、シクロヘキサン環、シクロペンタン環、またはシクロブタン環等の飽和脂肪族環、シクロペンテン環、またはシクロヘキセン環等の部分飽和脂肪族環等が挙げられる。更に該環には、置換基を有していてもよく、サブタイプの種類の識別を著しく阻害するものでなければ特に限定されるものではない。例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、または、ブチル基などのアルキル基；フェニル基などのアリール基；メトキシ基、エトキシ基、または、ブトキシ基等のアルコキシ基；フェノキシ基などのアリールオキシ基；ジメチルアミノ基、*N*-エチル-*N*-フェニルアミノ基、または、ジフェニルアミノ基等のジ置換アミノ基；アセチル基、またはベンゾイル基等のアシル基；スルホニル基；カルボキシル基；カルボキシルアルキル基；カルバモイル基；スルファモイル基；ピリジル基、トリアジニル基、またはベンズチアゾリル基等のヘテロ環基；ニトロ基；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、または、ヨウ素原子等のハロゲン原子、カルボキシル基、スルホ基等が挙げられる。

10

【0036】

前記一般式(1)中、 $R_2 \sim R_5$ として、好ましくは、各々独立して水素原子、アルキル基、または、アリール基、 R_2 と R_4 が互いに結合して脂肪族環を形成する場合であり、より好ましくは、 R_2 と R_4 が互いに結合して脂肪族環を形成する場合がサブタイプの種類の識別がしやすいため好ましい。具体的には、シクロオクタン環、シクロヘプタン環、シクロヘキサン環、シクロペンタン環、またはシクロブタン環が挙げられる。より好ましくはシクロペンタン環の場合である。

20

【0037】

前記一般式(1)中、 R_6 におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、または、ブチル基等が挙げられる。

【0038】

前記一般式(1)中、 R_6 におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、または、ブトキシ基等が挙げられる。

30

【0039】

前記一般式(1)中、 R_6 におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、または、ヨウ素原子等が挙げられる。

【0040】

前記一般式(1)中、 R_6 として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、または、アルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、または、臭素原子の場合である。

【0041】

前記一般式(1)中、 $R_7 \sim R_8$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、または、ブチル基等の炭素数1~4個のアルキル基等が挙げられる。

40

【0042】

前記一般式(1)中、 $R_7 \sim R_8$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、または、メチルフェニル基等が挙げられる。

【0043】

前記一般式(1)中、 Y_1 における、アリール基置換炭素原子としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基置換炭素、メチルフェニル基置換炭素、メトキシフェニル基置換炭素、または、クロロフェニル基置換炭素等が挙げられる。

【0044】

前記一般式(1)中 R_9 は、ジシアノメチレン基、シアノカルボキシメチレン基、また

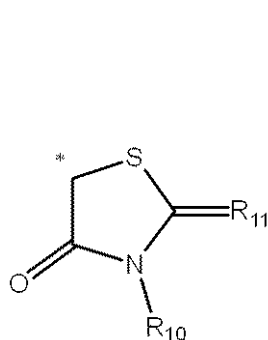
50

は、下記一般式(2)～(4)を表し、「*」は連結部位を表す。

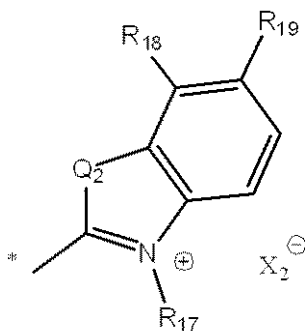
【0045】

好ましくは、一般式(2)～(4)であり、特に、一般式(2)がサブタイプの種類の識別がしやすいため好ましい。

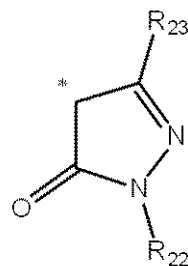
【化4】



一般式(2)



一般式(3)



一般式(4)

10

【0046】

前記一般式(2)中、R₁₀におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1～20個のアルキル基が挙げられる。

20

【0047】

前記一般式(2)中、R₁₀におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、カルボキシプロピル基、カルボキシブチル基、カルボキシペンチル基、カルボキシヘキシル基、カルボキシヘプチル基、またはカルボキシオクチル基等が挙げられる。

【0048】

前記一般式(2)中、R₁₀におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、メトキシカルボニルプロピル基、またはメトキシカルボニルヘキシル基等が挙げられる。

30

【0049】

前記一般式(2)中、R₁₀におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルオキシブチル、またはプロキシカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

【0050】

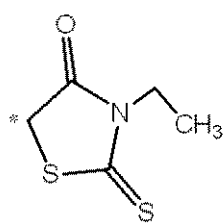
前記一般式(2)中、R₁₁における2-チオキソチアゾリン-4-オン基としては、特に限定されるものではないが、次のような化合物が挙げられる。

「*」は連結部位を表す。

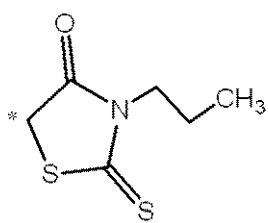
40

【0051】

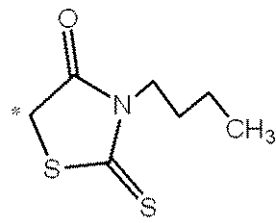
【化 5】



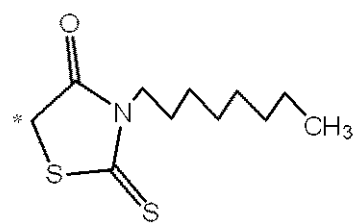
A1



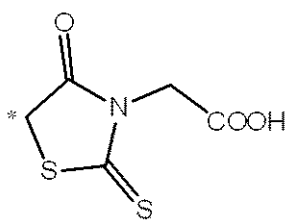
A2



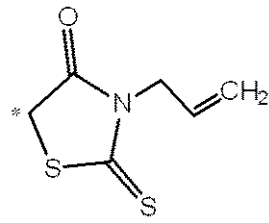
A3



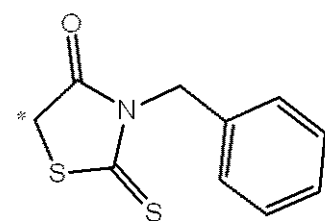
A4



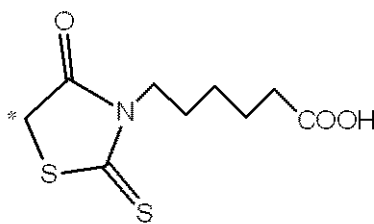
A5



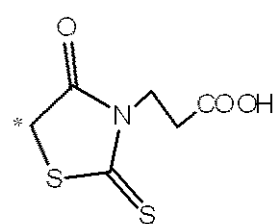
A6



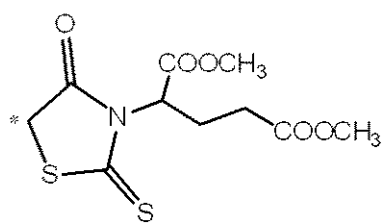
A7



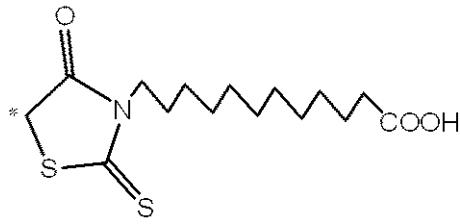
A8



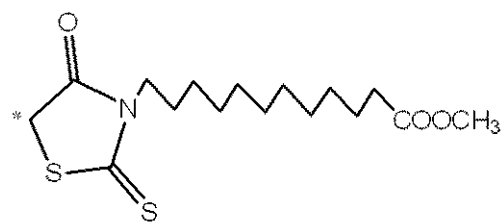
A9



A10



A11



A12

【 0 0 5 2 】

前記一般式(2)中、 R_{11} におけるチアゾリン-2,4-ジオン基としては、特に限定されるものではないが、次のような化合物が挙げられる。

「*」は連結部位を表す。

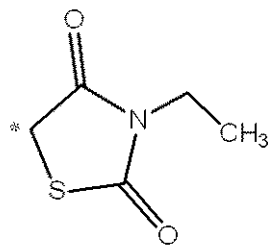
10

20

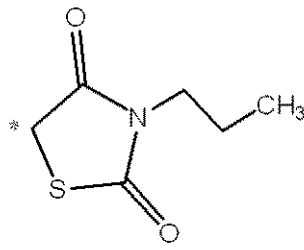
30

40

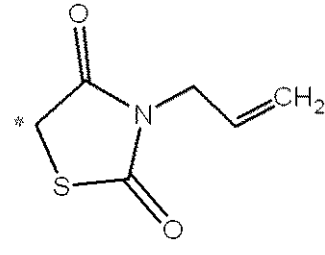
【化 6】



B1

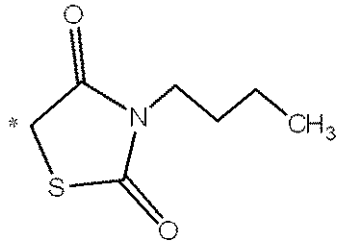


B2

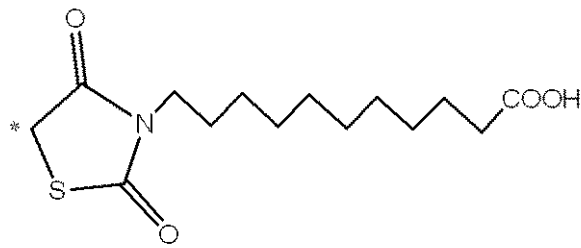


B3

10

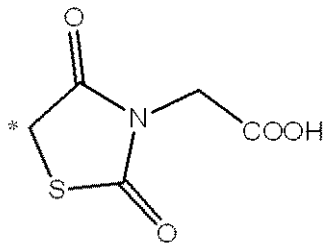


B4

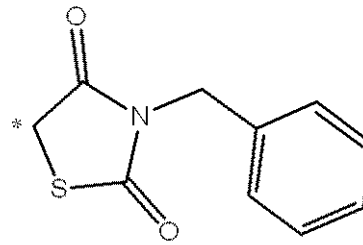


B5

20



B6



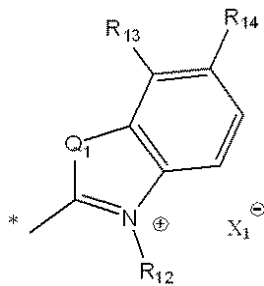
B7

【 0 0 5 3 】

30

前記一般式(2)中、 R_{11} は一般式(5)で表わすことが出来る。

【化 7】



一般式(5)

40

【 0 0 5 4 】

前記一般式(5)中、 R_{12} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1~20個のアルキル基が挙げられる。

【 0 0 5 5 】

前記一般式(5)中、 R_{12} におけるカルボキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、カルボキシプロピル基、カルボキシブチル基、カルボキシペンチル基、カルボキシヘキシル基、カルボキ

50

シヘプチル基、またはカルボキシオクチル基等が挙げられる。

【0056】

前記一般式(5)中、 R_{12} におけるアルコシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトシカルボニルメチル基、メトシカルボニルエチル基、エトシカルボニルエチル基、ブトシカルボニルエチル基、メトシカルボニルプロピル基、またはメトシカルボニルヘキシル基等が挙げられる。

【0057】

前記一般式(5)中、 R_{12} におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルブチル、またはプロキシカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

10

【0058】

前記一般式(5)中、 R_{13} と R_{14} が互いに結合してベンゼン環を形成するが、更に置換基を有していても良い。

【0059】

前記一般式(5)中、 Q_1 におけるN-アルキル窒素原子としては、特に限定されるものではないが、N-メチル窒素原子、N-エチル窒素原子、N-プロピル窒素原子、またはN-ブチル窒素原子等が挙げられる。

【0060】

前記一般式(5)中、 Q_1 における $R_{15} \sim R_{16}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、または、ブチル基等の炭素数1~4個のアルキル基等が挙げられる。

20

【0061】

前記一般式(5)中、 R_{15} と R_{16} が互いに結合して形成する環としては、特に限定されるものではないが、シクロペンタン環、またはシクロヘキサン環等が挙げられる。

【0062】

前記一般式(5)中、 X_1^- で表わされる陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン、p-トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、またはヘキサフルオロリン酸イオン等が挙げられる。

30

【0063】

前記一般式(3)中、 R_{17} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1~20個のアルキル基が挙げられる。

【0064】

前記一般式(3)中、 R_{17} におけるカルボキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシメチル基、カルボキシエチル基、またはカルボキシプロピル基等が挙げられる。

【0065】

前記一般式(3)中、 R_{17} におけるアルコシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトシカルボニルメチル基、メトシカルボニルエチル基、エトシカルボニルエチル基、ブトシカルボニルエチル基、またはメトシカルボニルプロピル基等が挙げられる。

40

【0066】

前記一般式(3)中、 R_{17} におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルブチル、またはプロキシカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

【0067】

50

前記一般式(3)中、 R_{18} と R_{19} が互いに結合してベンゼン環を形成するが、更に置換基を有していても良い。

【0068】

前記一般式(3)中、 Q_2 におけるN-アルキル窒素原子としては、特に限定されるものではないが、N-メチル窒素原子、N-エチル窒素原子、N-プロピル窒素原子、またはN-ブチル窒素原子等が挙げられる。

【0069】

前記一般式(3)中、 Q_2 における $R_{20} \sim R_{21}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、または、ブチル基等の炭素数1~4個のアルキル基等が挙げられる。

10

【0070】

前記一般式(3)中、 R_{20} と R_{21} が互いに結合して形成する環としては、特に限定されるものではないが、シクロペンタン環、またはシクロヘキサン環等が挙げられる。

【0071】

前記一般式(3)中、 X_2^- で表わされる陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン、p-トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、またはヘキサフルオロリン酸イオン等が挙げられる。

【0072】

前記一般式(4)中、 R_{22} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1~20個のアルキル基が挙げられる。

20

【0073】

前記一般式(4)中、 R_{22} におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、ナフチル基、フェナントリル基、または、アントラセニル基等の6~14員環の単環式または多環式アリール基が挙げられる。

【0074】

前記一般式(4)中、 R_{22} におけるアリール基は、更に置換基を有していてもよく、サブタイプの種類の識別を著しく阻害するものでなければ特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、イソブチル基、sec-ブチル基、または、tert-ブチル基等のアルキル基；フェニル基、または、ナフチル基等のアリール基；メトキシ基、エトキシ基、または、ブトキシ基等のアルコキシ基；フェノキシ基、または、ナフチルオキシ基等のアリールオキシ基；チオメチル基、チオエチル基、チオプロピル基、チオブチル基、または、チオフェニル基等のアルキルスルファニル基；ジメチルアミノ基、N-エチル-N-フェニルアミノ基、または、ジフェニルアミノ基等のジ置換アミノ基；アセチル基、または、ベンゾイル基等のアシル基；スルホニル基；カルボキシ基；カルボキシアルキル基；カルバモイル基；スルファモイル基；ピリジル基、トリアジニル基、または、ベンズチアゾリル基等のヘテロ環基；ニトロ基；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、または、ヨウ素原子等のハロゲン原子が挙げられる。

30

40

【0075】

前記一般式(4)中、 R_{23} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、エチルヘキシル基、シクロヘキシル基などの直鎖、分岐、または、環状の炭素数1~20個のアルキル基が挙げられる。

【0076】

<化合物について>

本実施形態における一般式(1)で表わされる化合物は、公知の方法(特許文献2等)

50

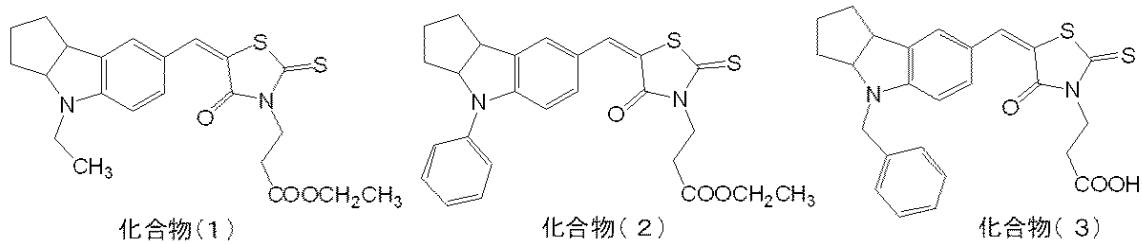
により同様の方法で容易に合成することができる。

【 0 0 7 7 】

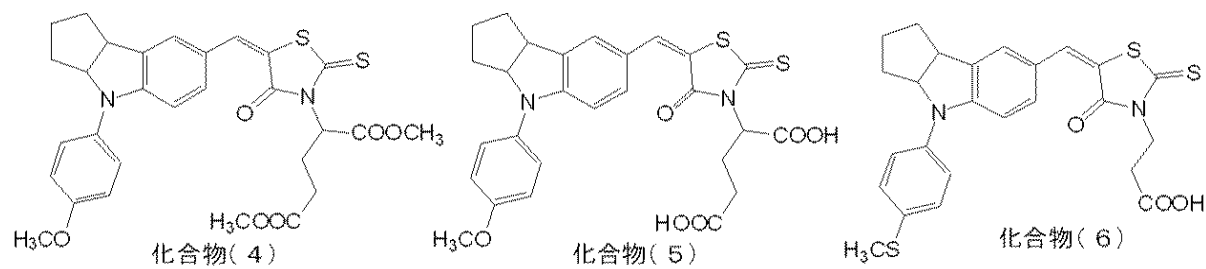
以下に、本発明の一般式(1)で表わされる化合物の好ましい具体例(1)～(85)を示すが、下記の例に限定されるものではない。

【 0 0 7 8 】

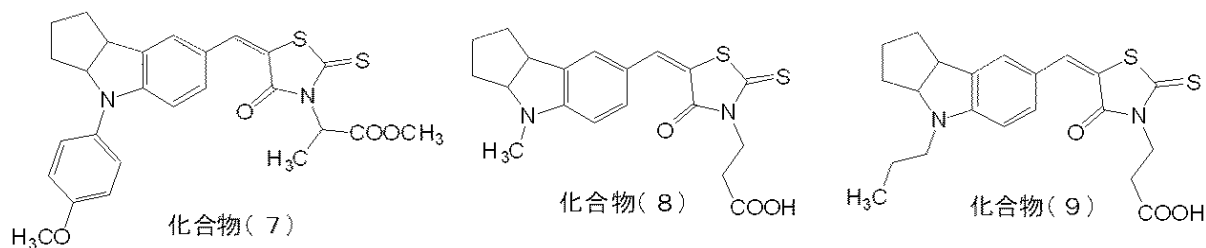
【化 8】



10



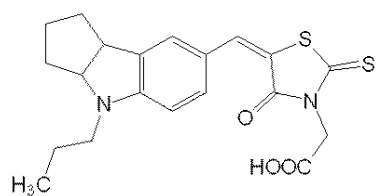
20



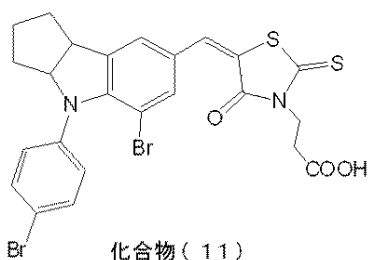
30

【 0 0 7 9 】

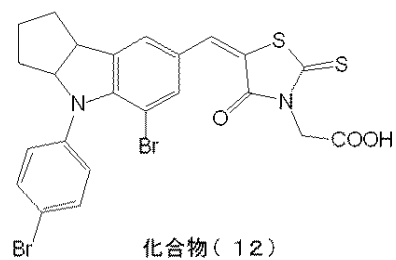
【化 9】



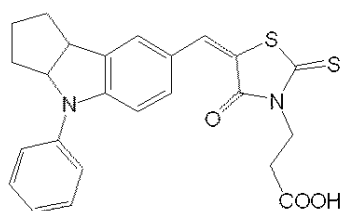
化合物 (10)



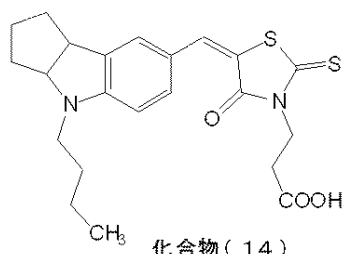
化合物 (11)



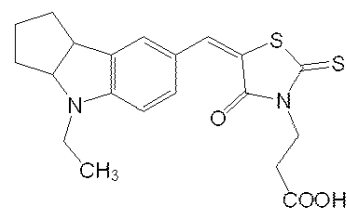
化合物 (12)



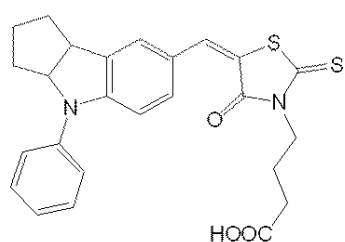
化合物 (13)



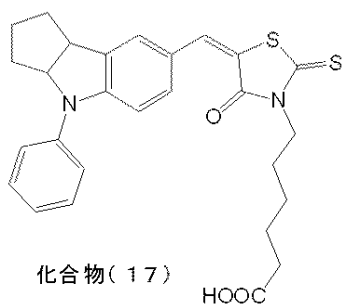
化合物 (14)



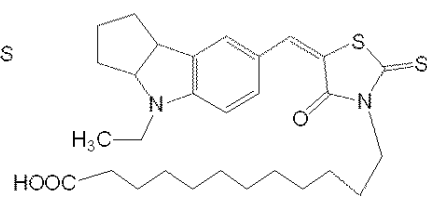
化合物 (15)



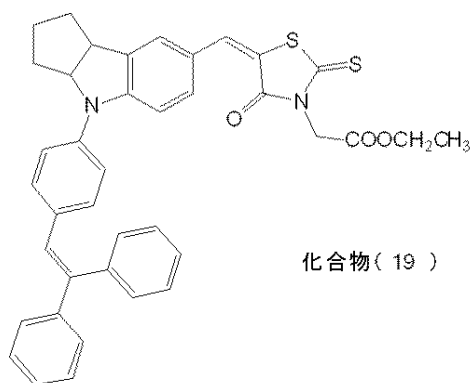
化合物 (16)



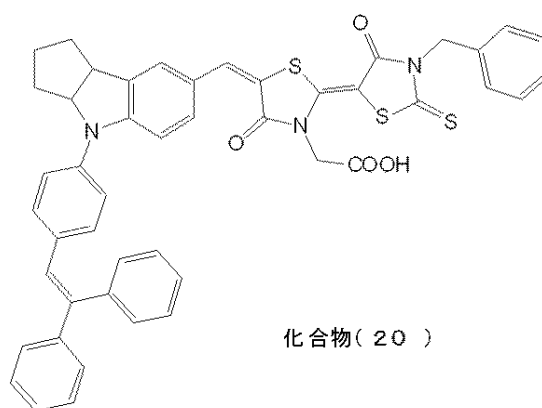
化合物 (17)



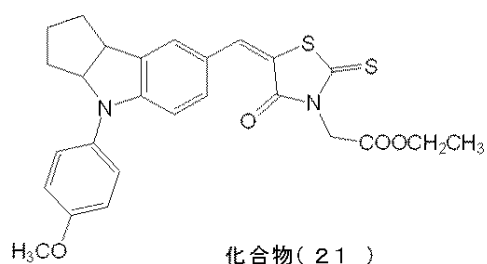
化合物 (18)



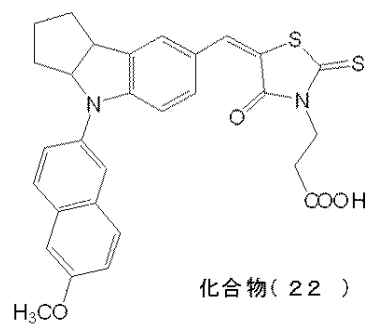
化合物 (19)



化合物 (20)

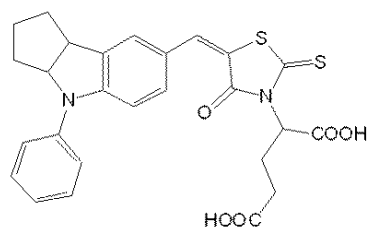


化合物 (21)

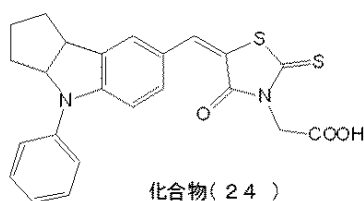


化合物 (22)

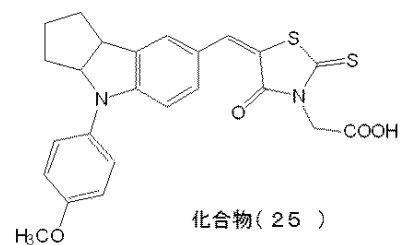
【化 10】



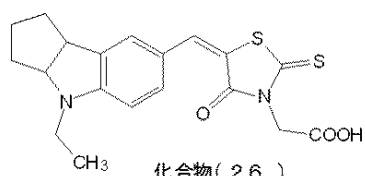
化合物(23)



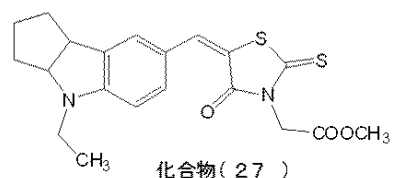
化合物(24)



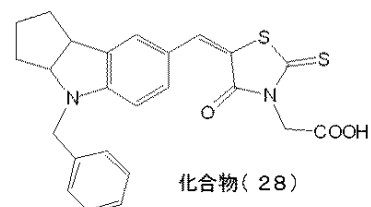
化合物(25)



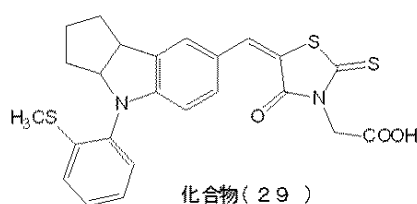
化合物(26)



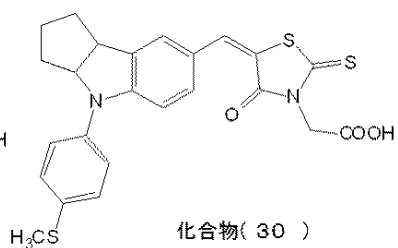
化合物(27)



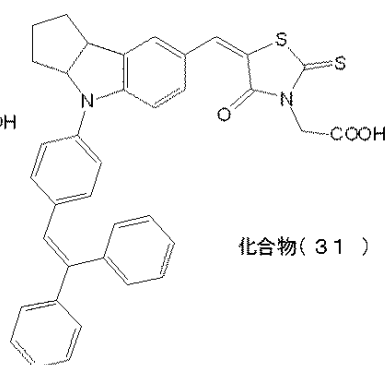
化合物(28)



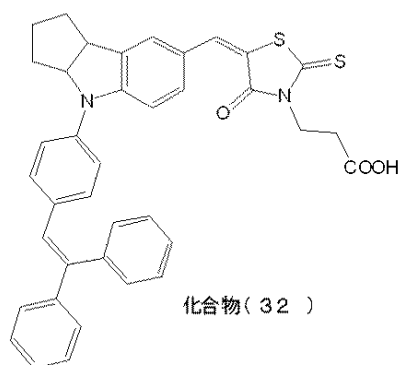
化合物(29)



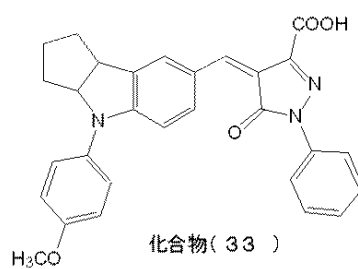
化合物(30)



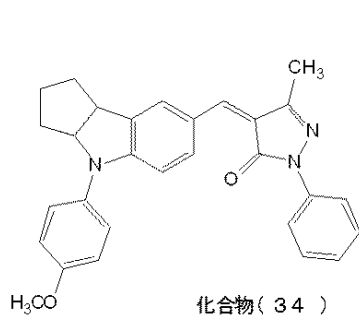
化合物(31)



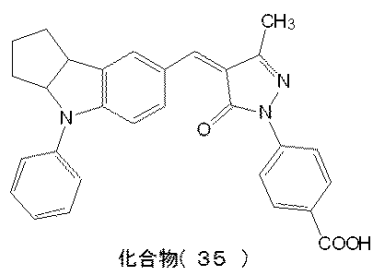
化合物(32)



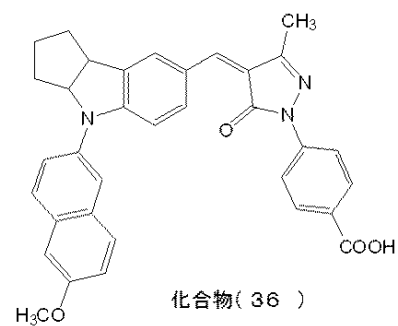
化合物(33)



化合物(34)



化合物(35)



化合物(36)

【 0 0 8 1 】

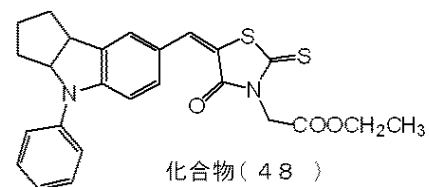
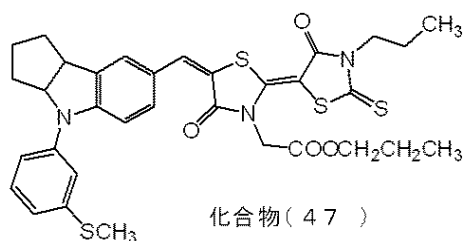
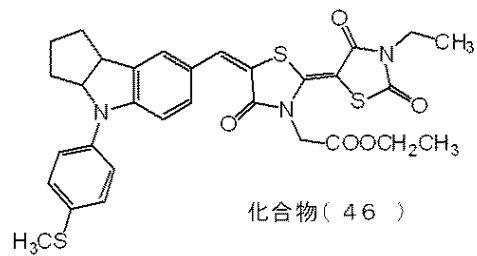
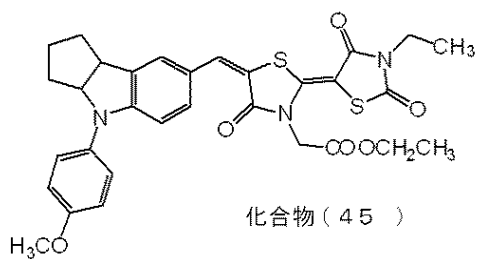
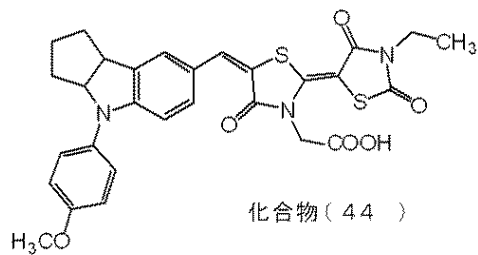
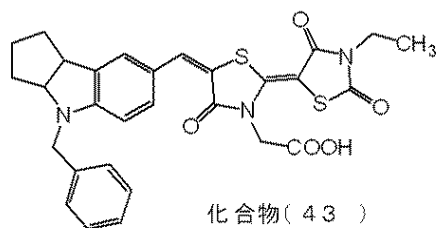
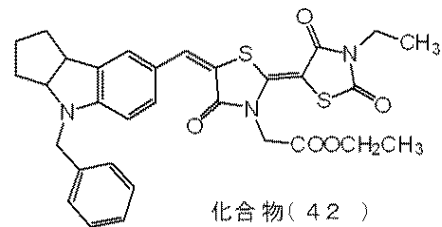
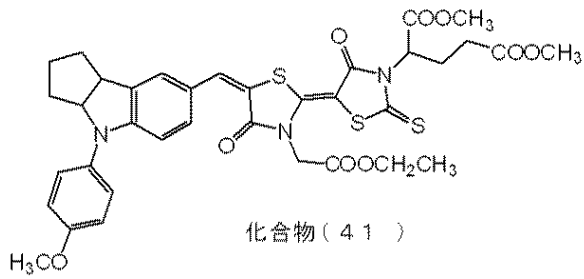
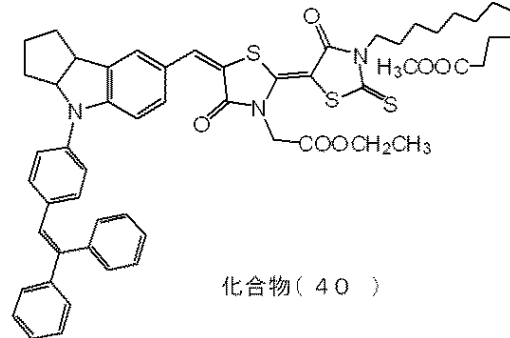
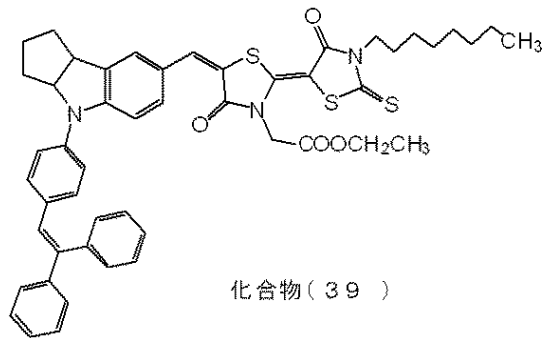
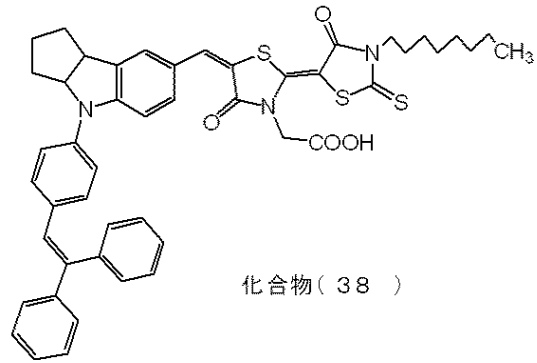
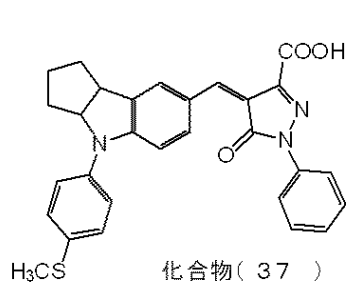
10

20

30

40

【化 1 1】



【 0 0 8 2 】

10

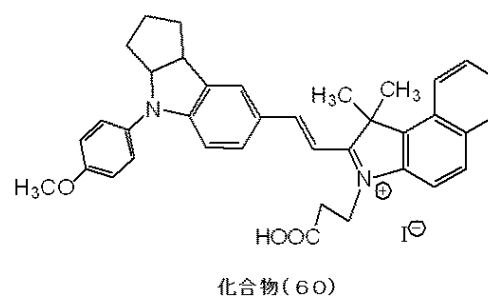
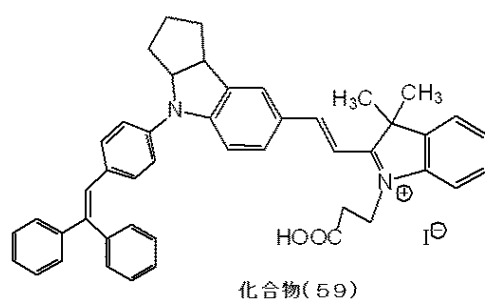
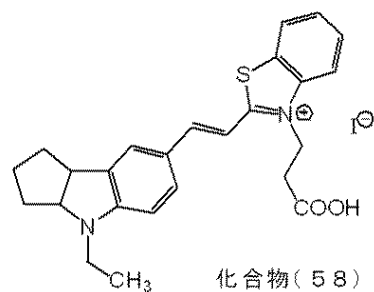
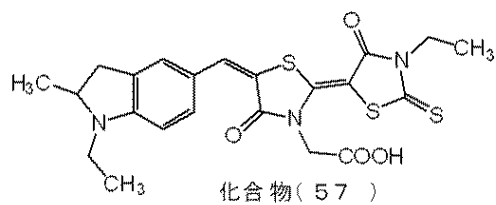
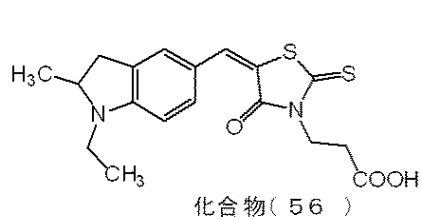
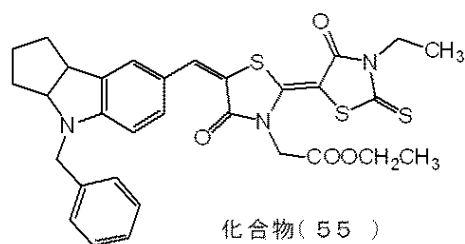
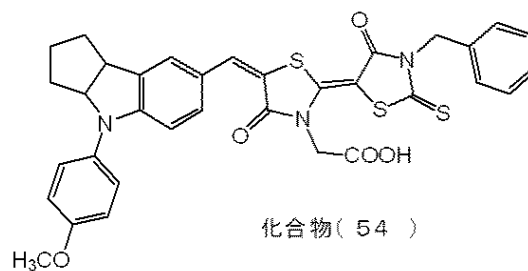
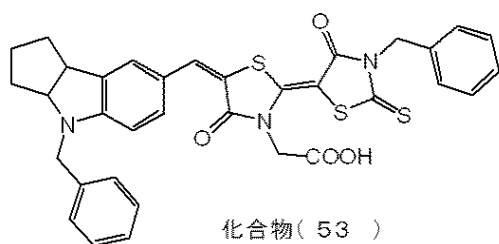
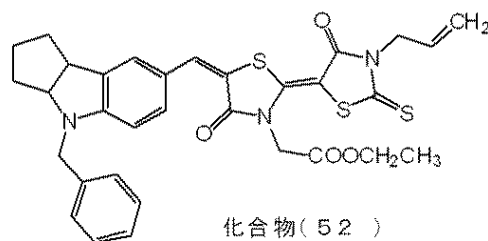
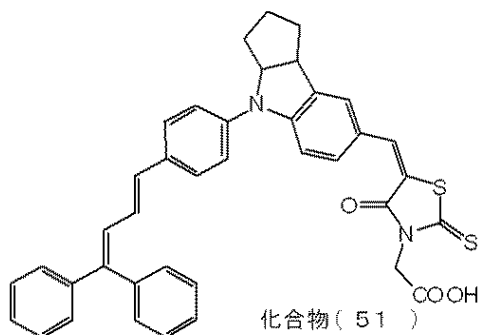
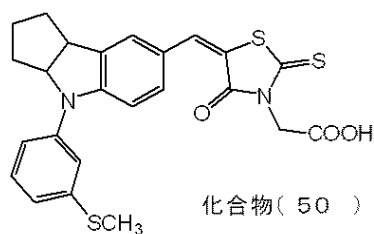
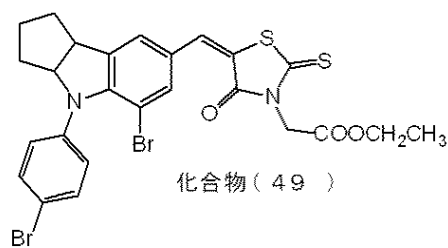
20

30

40

50

【化 1 2】



【 0 0 8 3 】

10

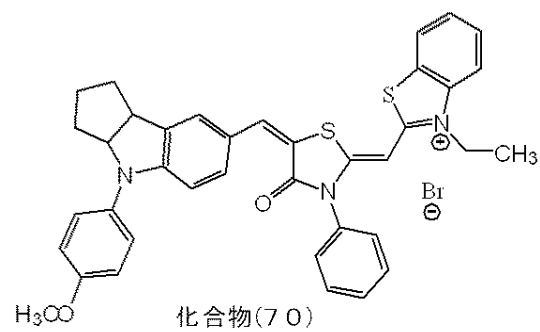
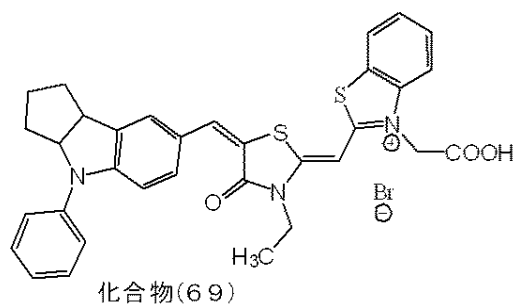
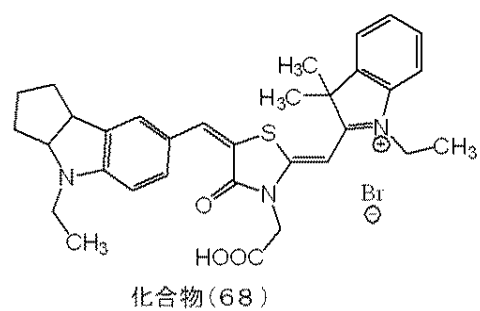
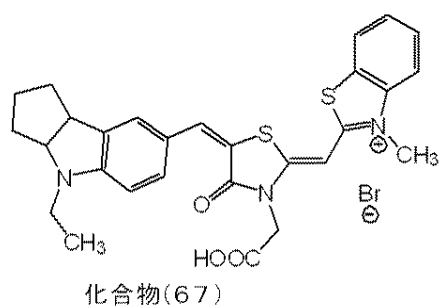
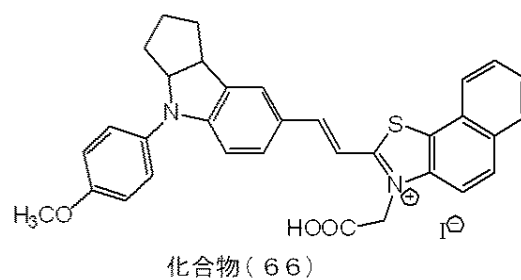
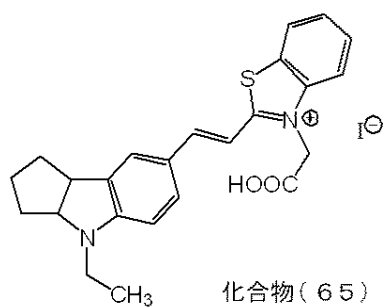
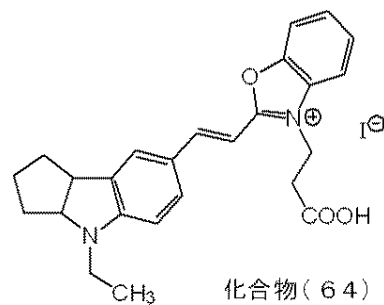
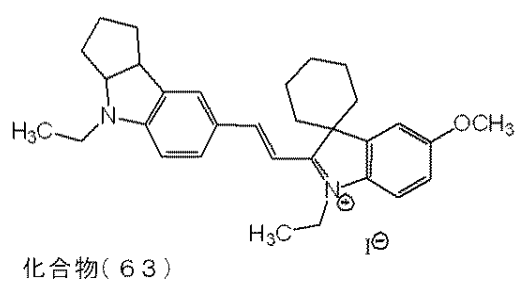
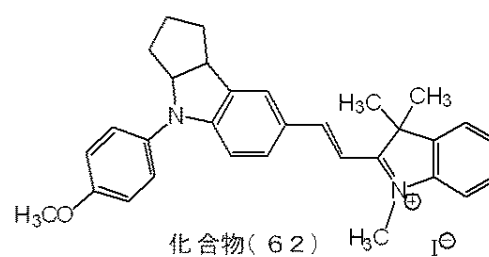
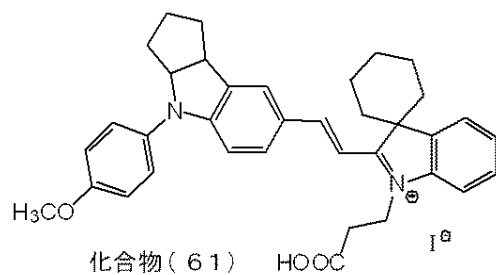
20

30

40

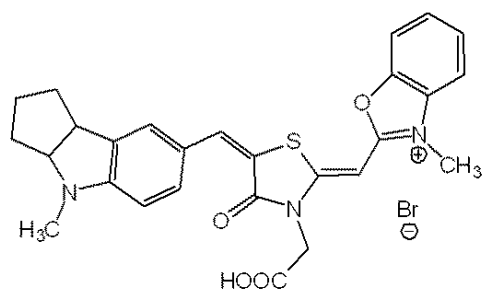
50

【化 1 3】

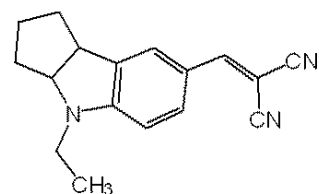


【0084】

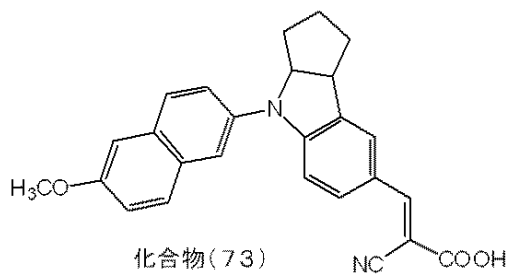
【化 1 4】



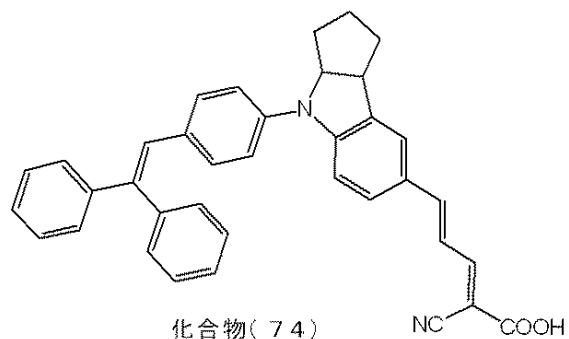
化合物(71)



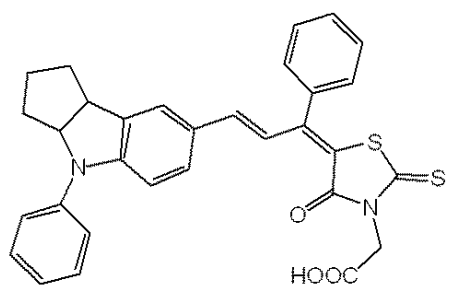
化合物(72)



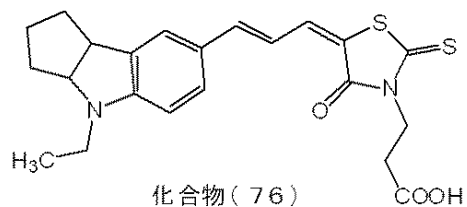
化合物(73)



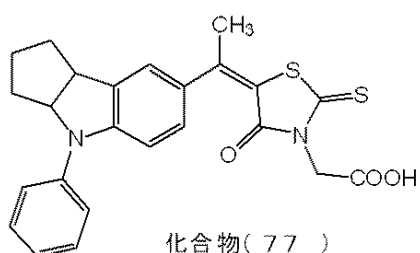
化合物(74)



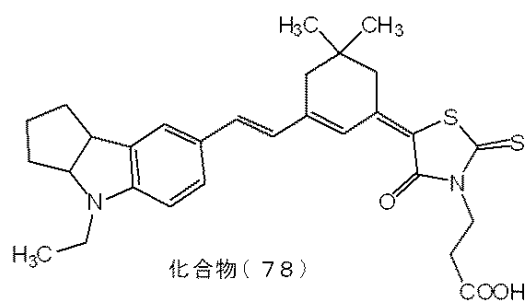
化合物(75)



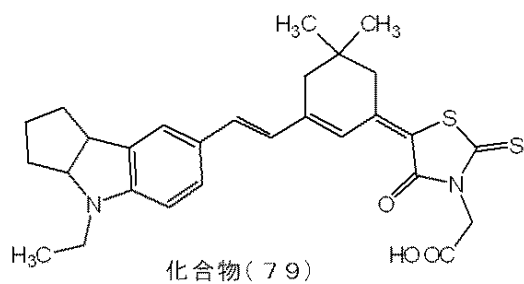
化合物(76)



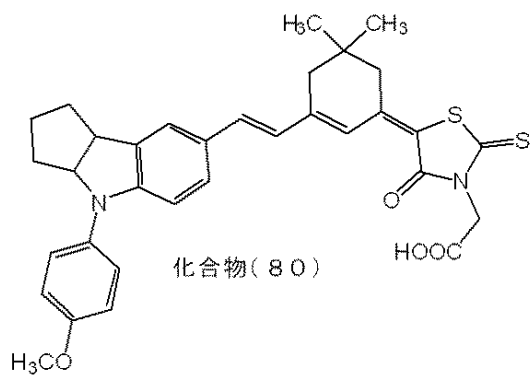
化合物(77)



化合物(78)



化合物(79)



化合物(80)

【0085】

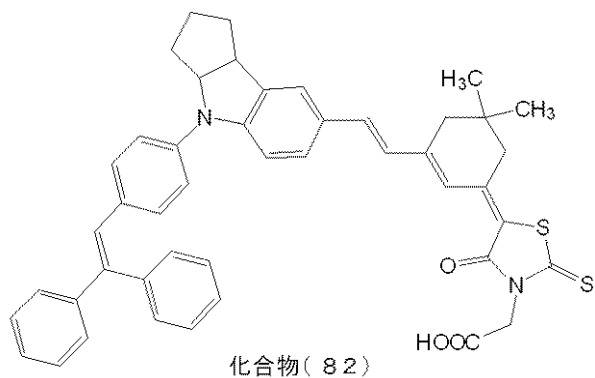
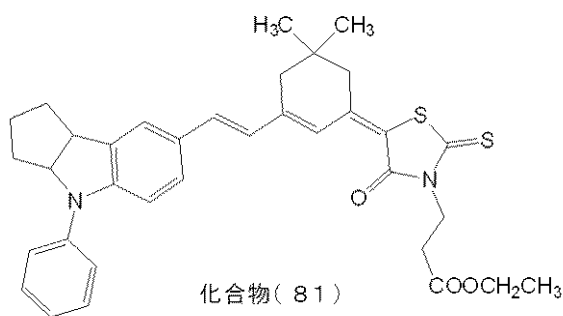
10

20

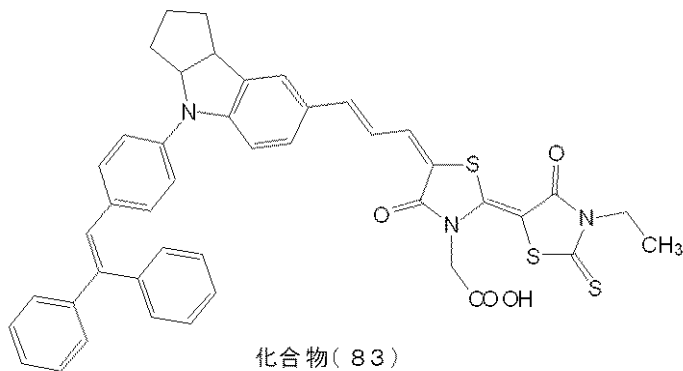
30

40

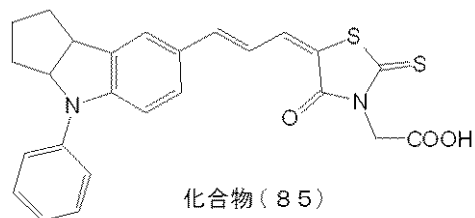
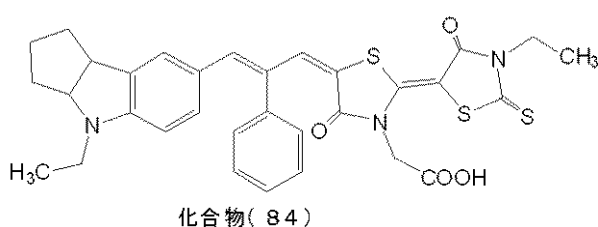
【化 15】



10



20



化合物 (1) から化合物 (85) の一般式 (1) 中の置換基を表 1 に示す。

30

【 0 0 8 6 】

【表 1 - 1】

化合物	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Y1	n	R9
(1)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(2)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(3)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(4)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(5)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(6)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(7)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(8)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(9)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(10)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(11)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(12)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(13)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(14)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(15)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)

40

【 0 0 8 7 】

50

【表 1 - 2】

表1(つぎ)

化合物	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Y1	n	R9
(16)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(17)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(18)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(19)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(20)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(21)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(22)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(23)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(24)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(25)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(26)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(27)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(28)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(29)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(30)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(31)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(32)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(33)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(4)
(34)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(4)
(35)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(4)
(36)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(4)
(37)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(4)
(38)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(39)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(40)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(41)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(42)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(43)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(44)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(45)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(46)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(47)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(48)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(49)	アリール基	脂肪族環				ハロゲン原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(50)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(51)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(52)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(53)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(54)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(55)	アラルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(56)	アルキル基	アルキル基	水素原子			水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(57)	アルキル基	アルキル基	水素原子			水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(58)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(59)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(60)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)

【表 1 - 3】

表1(つぎ)

化合物	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	Y1	n	R9
(61)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(62)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(63)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(64)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(65)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(66)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(3)
(67)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(68)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(69)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(70)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(71)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	一般式(2)
(72)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	ジシアノベンゼン基
(73)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	—	—	0	シアロキベンゼン基
(74)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	—CH=	1	シアロキベンゼン基
(75)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(76)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	—CH=	1	一般式(2)
(77)	アリール基	脂肪族環				水素原子	アルキル基	—	—	0	一般式(2)
(78)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(79)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(80)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(81)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(82)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	シクロヘキゼン環	1	一般式(2)
(83)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	—CH=	1	一般式(2)
(84)	アルキル基	脂肪族環				水素原子	水素原子	アリール基	—CH=	1	一般式(2)
(85)	アリール基	脂肪族環				水素原子	水素原子	水素原子	—CH=	1	一般式(2)

10

20

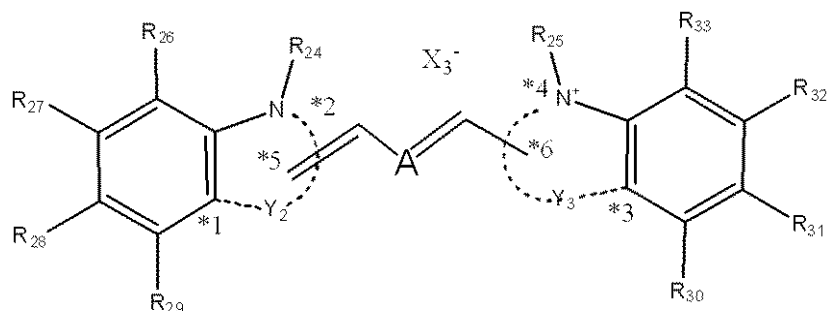
30

【0089】

(第二実施形態)

本発明の第二実施形態であるマクロファージ識別剤は、下記一般式(6)で表わされる化合物を1種類以上含むことを特徴とする。

【化16】



一般式(6)

40

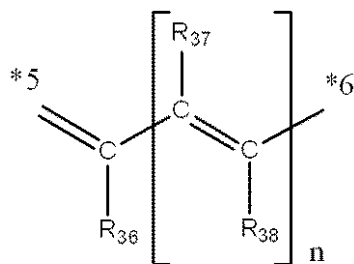
【0090】

一般式(6)中、 $R_{24} \sim R_{25}$ は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルコキシカルボニルアルキル基、またはアルキルカルボニルオキシルアルキル基を表し、 $R_{26} \sim R_{33}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキ

50

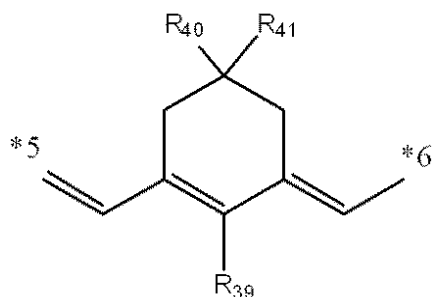
ルオキシカルボニル基、カルバモイル基、またはN - アルキルカルバモイル基を表し、 R_{26} と R_{27} 、 R_{28} と R_{29} 、 R_{30} と R_{31} 及び R_{32} と R_{33} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、 X_1^- は陰イオン性基を表し、 Y_2 は *1 、 *2 、 *5 を含む基で、酸素原子、硫黄原子、N - アルキル窒素原子、または、 $-C(R_{34})(R_{35})-$ を含むか、あるいは、 *1 、 *2 、 *5 を含んで、 $^*1-C^*5-CH=CH-^*2$ 、または、 $^*1-CH=CH-^*5-^*2$ を表し、 Y_3 は *3 、 *4 、 *6 を含む基で、 $-$ 酸素原子、硫黄原子、N - アルキル窒素原子、または、 $-C(R_{34})(R_{35})-$ を含むか、あるいは、 *3 、 *4 、 *6 を含んで、 $^*3-Y_3-^*6-^*4$ 、 $^*3-C^*6-CH=CH-^*4$ 、または、 $^*3-CH=CH-^*6-^*4$ を表し、
ただし、 $R_{34} \sim R_{35}$ は各々独立して、アルキル基を表し、 R_{34} と R_{35} は互いに結合して、環を形成してもよく、
Aは、3 - オキシシクロブテノレート環、一般式(7)または、(8)で示される。

【化17】



一般式(7)

【化18】



一般式(8)

(一般式(7)中、 $R_{36} \sim R_{38}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、またはアリール基を表し、 n は0～2の数字を表し、
一般式(8)中、 R_{39} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、またはハロゲン原子を表し、
 $R_{40} \sim R_{41}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、またはアルキルオキシカルボニル基を表す。)

【0091】

<化合物について>

本実施形態における一般式(6)で表わされる化合物に関して説明する。

【0092】

一般式(6)中の $R_{24} \sim R_{25}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0093】

一般式(6)中の $R_{24} \sim R_{25}$ におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、またはカルボキシルプロピル基等が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0094】

一般式(6)中の $R_{24} \sim R_{25}$ におけるアルコシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトシカルボニルメチル基、メトシカルボニルエチル基、エトシカルボニルエチル基、プトシカルボニルエチル基、またはメトシカルボニルプロピル基等が挙げられ、

$R_{24} \sim R_{25}$ におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルブチル、またはプロキシカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

【0095】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0096】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-チオメチルフェニル基、3-チオメチルフェニル基、4-チオメチルフェニル基、またはナフチル基等が挙げられる。

【0097】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるアルコシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

【0098】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0099】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるアルコシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトシスルホニル基、またはエトシスルホニル基等が挙げられる。

【0100】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるN-アルキルスルファモイルとしては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルスルファモイル基、N-エチルスルファモイル基、N,N-ジメチルスルファモイル基、またはN,N-エチルスルファモイル基等が挙げられる。

【0101】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、またはブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0102】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ におけるN-アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルカルバモイル基、N-エチルカルバモイル基、N,N-ジメチルカルバモイル基、またはN,N-ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

【0103】

一般式(6)中の $R_{26} \sim R_{33}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【0104】

一般式(6)中の X_3^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではない

10

20

30

40

50

が、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン、p - トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン、またはアンモニウムイオン等が挙げられる。

【0105】

一般式(6)中の $Y_2 \sim Y_3$ におけるアルキレン基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、またはブチレン基等が挙げられる。

【0106】

一般式(6)中の Y_2 、 Y_3 の R_{34} 、 R_{35} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、または2 - エチルヘキシル基等が挙げられる。 R_{34} と R_{35} は同じである事が好ましいが、異なってもよい。

10

【0107】

一般式(6)中の R_{34} と R_{35} は互いに結合して脂肪族環を形成してもよく、その例として、シクロヘキサン環、またはシクロペンタン環を挙げる事ができる。

【0108】

一般式(7)中の $R_{36} \sim R_{38}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0109】

20

一般式(7)中の $R_{36} \sim R_{38}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2 - ブロモフェニル基、3 - ブロモフェニル基、4 - ブロモフェニル基、2 - メトキシフェニル基、3 - メトキシフェニル基、4 - メトキシフェニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、または4 - チオメチルフェニル基等が挙げられる。

【0110】

一般式(8)中の R_{39} におけるチオール基としては、例えば、メルカプトメチル基、メルカプトブチル基、またはメルカプトフェニル基等が挙げられる。

【0111】

一般式(8)中の R_{39} におけるアルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

30

【0112】

一般式(8)中の R_{39} におけるアリールオキシ基としては、例えば、フェノキシ基、または置換基を有していても良いフェノキシ基が挙げられる。

【0113】

一般式(8)中の R_{39} におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0114】

一般式(8)中の $R_{40} \sim R_{41}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

40

【0115】

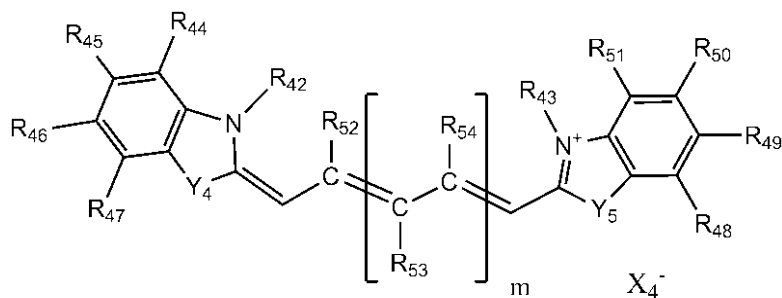
一般式(8)中の $R_{40} \sim R_{41}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、またはブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0116】

<一般式(9)で表される化合物について>

本実施形態の化合物の好ましい一例として、一般式(9)で表わされる化合物をあげることができる。

【化 19】



一般式(9)

10

【0117】

一般式(9)中、 $R_{42} \sim R_{43}$ は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、アルキルカルボニルオキシアルキル基、またはアルコキシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{44} \sim R_{51}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N-アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、またはN-アルキルカルバモイル基を表す。 R_{44} と R_{45} 、 R_{46} と R_{47} 、 R_{48} と R_{49} 及び R_{50} と R_{51} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良く、

$R_{52} \sim R_{54}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、またはアリール基を表し、 m は0~2の数字を表す。 X_2^- は陰イオン性基を表し、 Y_4 、 Y_5 は酸素原子、硫黄原子、またはアルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基どうしが結合して、脂肪族環を形成してもよい。

20

【0118】

一般式(9)中の $R_{42} \sim R_{43}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【0119】

一般式(9)中の $R_{42} \sim R_{43}$ におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボキシルメチル基、カルボキシルエチル基、またはカルボキシルプロピル等が挙げられる。

30

【0120】

一般式(9)中の $R_{42} \sim R_{43}$ におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエチル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、またはメトキシカルボニルプロピル基などが挙げられる。

【0121】

一般式(9)中の $R_{42} \sim R_{43}$ におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシメチル基、エチルカルボニルオキシエチル基、エチルカルボニルブチル、またはプロキシカルボニルオキシメチル基等が挙げられる。

40

【0122】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0123】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェ

50

ニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、4 - チオメチルフェニル基、またはナフチル基等が挙げられる。

【0124】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

【0125】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0126】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるアルコシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトシスルホニル基、またはエトシスルホニル基等が挙げられる。

【0127】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるN - アルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N - メチルスルファモイル基、N - エチルスルファモイル基、N, N - ジメチルスルファモイル基、またはN, N - エチルスルファモイル基等が挙げられる。

【0128】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、またはブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

【0129】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ におけるN - アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N - メチルカルバモイル基、N - エチルカルバモイル基、N, N - ジメチルカルバモイル基、またはN, N - ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

【0130】

一般式(9)中の $R_{44} \sim R_{51}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

【0131】

一般式(9)中の $R_{52} \sim R_{54}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0132】

一般式(9)中の $R_{52} \sim R_{54}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2 - プロモフェニル基、3 - プロモフェニル基、4 - プロモフェニル基、2 - メトキシフェニル基、3 - メトキシフェニル基、4 - メトキシフェニル基、2 - チオメチルフェニル基、3 - チオメチルフェニル基、または4 - チオメチルフェニル基等が挙げられる。

【0133】

一般式(9)中の X_4^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン、p - トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン、またはアンモニウムイオン等が挙げられる。

【0134】

一般式(9)中の Y_4 、 Y_5 は酸素原子、硫黄原子、またはアルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基同士が結合して、脂肪族環を形成してもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 3 5 】

ここでのアルキレン基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、または2 - エチルヘキシレン基等が挙げられる。形成される脂肪族環としては、特に限定されるものではないが、シクロヘキサン環、またはシクロペンタン環を挙げる事ができる。

【 0 1 3 6 】

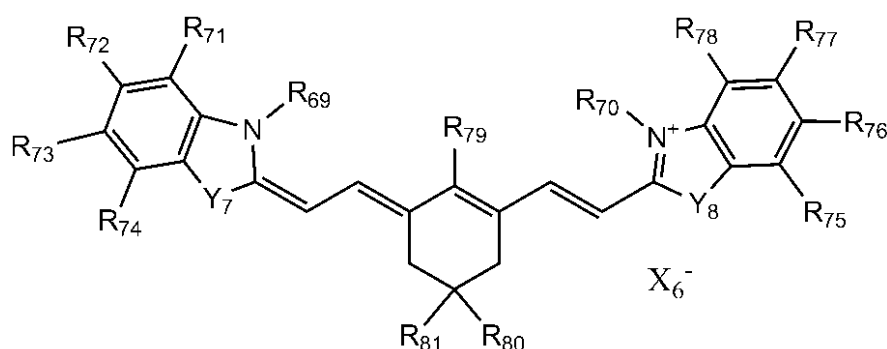
本実施形態における一般式(9)で表わされる化合物は、多くが市販されており、入手可能である。また、公知の方法(非特許文献2等)と同様の方法で合成することができる。

【 0 1 3 7 】

<一般式(12)で表される化合物について>

本実施形態の化合物の好ましい一例として、一般式(12)で表わされる化合物をあげることができる。

【化20】



一般式(12)

【 0 1 3 8 】

一般式(12)中、 $R_{69} \sim R_{70}$ は、各々独立して、アルキル基、カルボキシルアルキル基、またはアルコキシカルボニルアルキル基を表し、 $R_{71} \sim R_{78}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、ハロゲン原子、アルコキシスルホニル基、N - アルキルスルファモイル基、アルキルオキシカルボニル基、またはN - アルキルカルバモイル基を表す。 R_{71} と R_{72} 、 R_{73} と R_{74} 、 R_{75} と R_{76} 及び R_{77} と R_{78} はそれぞれ独立に環化してベンゼン環を形成しても良い。

【 0 1 3 9 】

R_{79} は、水素原子、フェニル基、チオール基、アルコキシ基、アリールオキシ基、またはハロゲン原子を表し、 $R_{80} \sim R_{81}$ は、各々独立して、水素原子、アルキル基、またはアルキルカルボニルオキシ基を表す。 X_6^- は陰イオン性基を表し、 Y_7 、 Y_8 は酸素原子、硫黄原子、またはアルキレン基を表し、アルキレン基は置換基を有してよく、その場合の置換基はアルキル基であり、置換基同士が結合して、脂肪族環を形成してもよい。

【 0 1 4 0 】

一般式(12)中の $R_{69} \sim R_{70}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【 0 1 4 1 】

一般式(12)中の $R_{69} \sim R_{70}$ におけるカルボキシルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、酢酸基、プロピオン酸基、またはブタン酸基等が挙げられる。

【 0 1 4 2 】

一般式(12)中の $R_{69} \sim R_{70}$ におけるアルコキシカルボニルアルキル基としては、特に限定されるものではないが、メトキシカルボニルメチル基、メトキシカルボニルエ

10

20

30

40

50

チル基、エトキシカルボニルエチル基、ブトキシカルボニルエチル基、またはメトキシカルボニルプロピル基などが挙げられ、

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またはヘキシル基等が挙げられる。

【0143】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、2-プロモフェニル基、3-プロモフェニル基、4-プロモフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2-チオメチルフェニル基、3-チオメチルフェニル基、4-チオメチルフェニル基、またはナフチル基等が挙げられる。

10

【0144】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

【0145】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0146】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアルコキシスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、スルホン酸メチルエステル基、またはスルホン酸エチルエステル基等が挙げられる。

20

【0147】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアルキルスルファモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、スルホン酸モノメチアミド基、スルホン酸モノエチルアミド基、スルホン酸ジメチルアミド基、またはスルホン酸ジエチルアミド基等が挙げられる。

【0148】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるアルキルカルボニルオキシアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、カルボン酸メチルエステル基、カルボン酸エチルエステル基、カルボン酸プロピルエステル基、またはカルボン酸ブチルエステル基等が挙げられる。

30

【0149】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ におけるN-アルキルカルバモイル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、N-メチルカルバモイル基、N-エチルカルバモイル基、N,N-ジメチルカルバモイル基、またはN,N-ジエチルカルバモイル基等が挙げられる。

【0150】

一般式(12)中の $R_{71} \sim R_{78}$ として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、フェニル基、またはアルコキシ基の場合であり、より好ましくは水素原子、またはフェニル基の場合である。

40

【0151】

一般式(12)中の R_{79} におけるチオール基としては、例えば、メルカプトメチル基、メルカプトブチル基、またはメルカプトフェニル基等が挙げられる。

【0152】

一般式(12)中の R_{79} におけるアルコキシ基としては、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、またはブトキシ基等が挙げられる。

【0153】

一般式(12)中の R_{79} におけるアリールオキシ基としては、例えば、フェノキシ基、または置換基を有していても良いフェノキシ基が挙げられる。

50

【0154】

一般式(12)中の R_{79} におけるハロゲン原子としては、例えば、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、またはヨウ素原子等が挙げられる。

【0155】

一般式(12)中の $R_{80} \sim R_{81}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、またヘキシル基等のアルキル基が挙げられる。

【0156】

一般式(12)中の $R_{80} \sim R_{81}$ におけるアルキルオキシカルボニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチルオキシカルボニル基、エチルオキシカルボニル基、プロピルオキシカルボニル基、またはブチルオキシカルボニル基等が挙げられる。

10

【0157】

一般式(12)中の X_6^- における陰イオン性基としては、特に限定されるものではないが、例えば、塩化物イオン、臭化物イオン、ヨウ化物イオン、硫酸イオン、硝酸イオン、メタンスルホン酸イオン、p-トルエンスルホン酸イオン、テトラフルオロホウ酸イオン、ヘキサフルオロリン酸イオン、またはアンモニウムイオン等が挙げられる。

【0158】

一般式(12)中の Y_7 、 Y_8 のアルキレン基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチレン基、エチレン基、プロピレン基、ブチレン基、ペンチレン基、ヘキシレン基、または2-エチレンヘキシル基等が挙げられる。アルキレン基の置換基としてのアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、またはブチル基等が挙げられる。

20

【0159】

本発明における一般式(12)で表わされる化合物は、多くが市販されており、容易に入手可能である。また、公知の方法(例えば、非特許文献8)により同様の方法で容易に合成することができる。

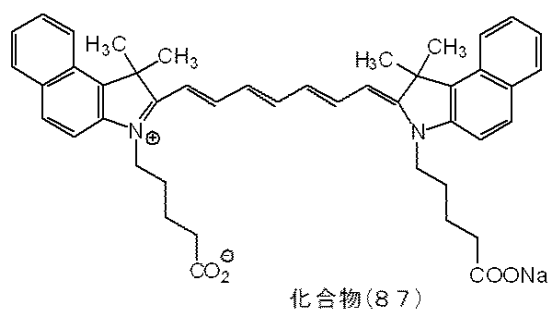
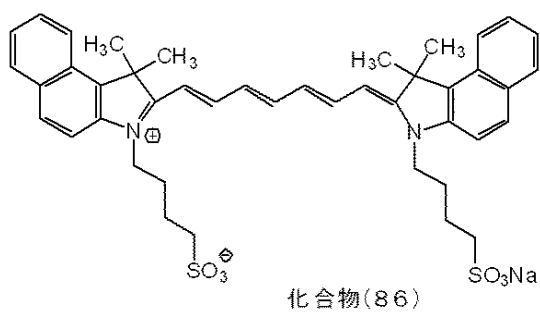
【0160】

以下に、本実施形態の化合物の好ましい具体例として化合物(86)~(115)を示す。しかし、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

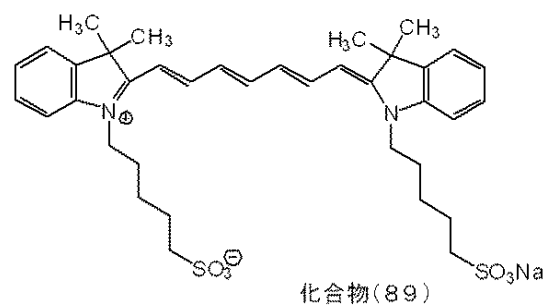
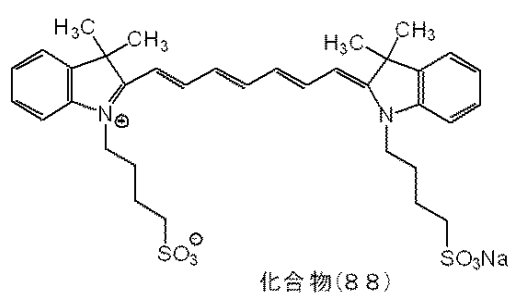
30

【0161】

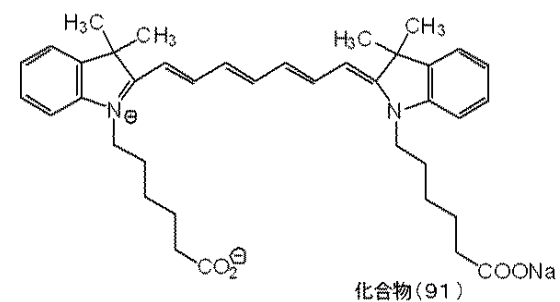
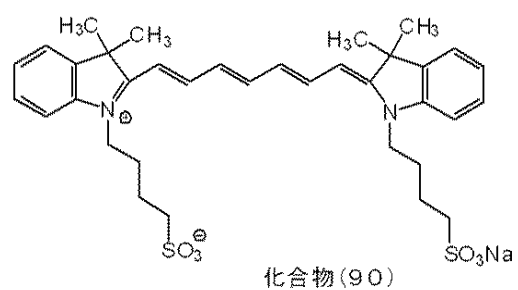
【化 2 1】



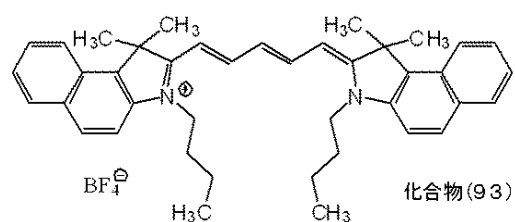
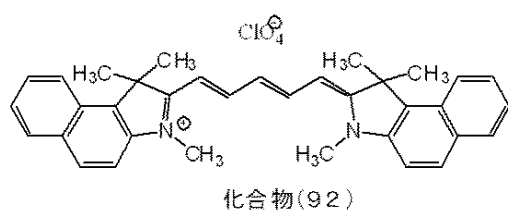
10



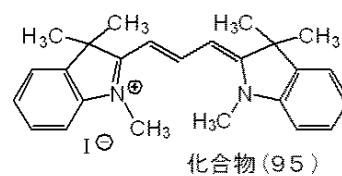
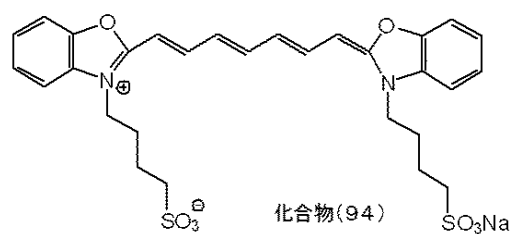
20



30

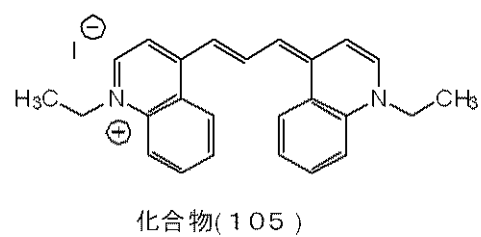
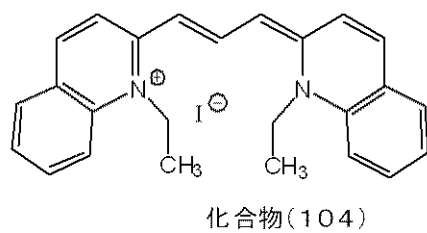
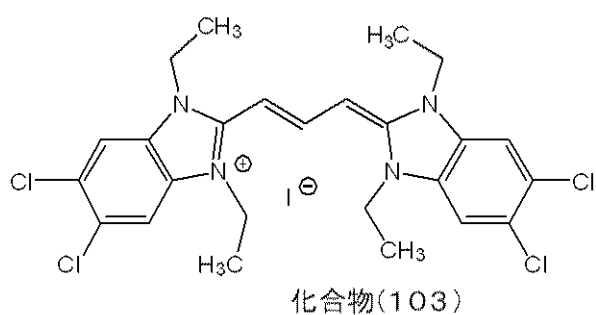
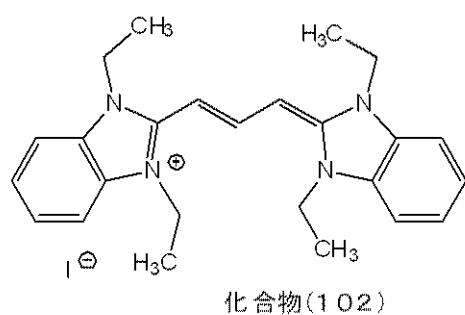
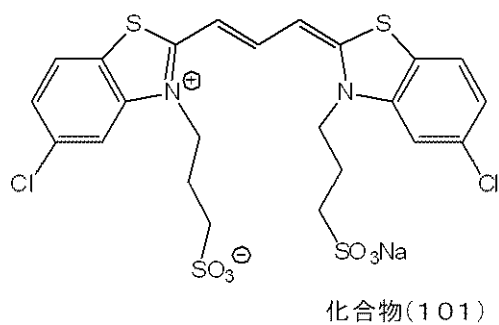
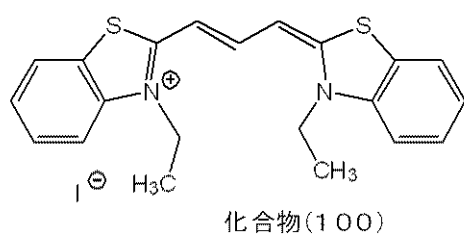
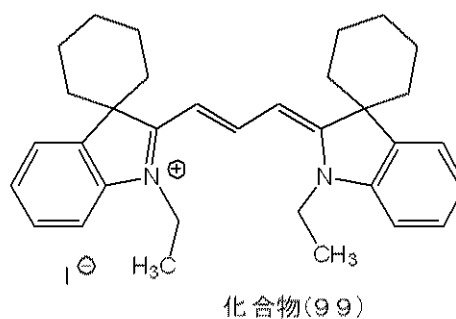
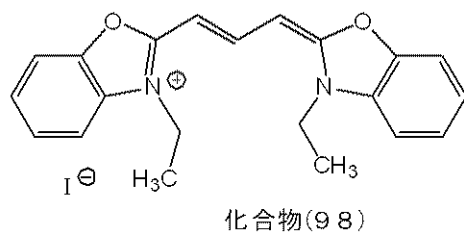
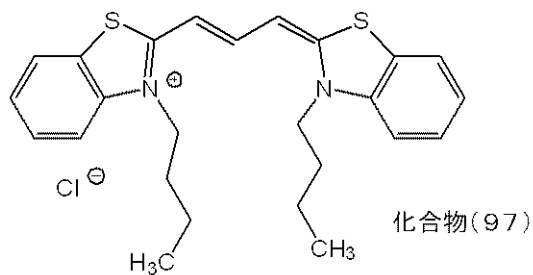
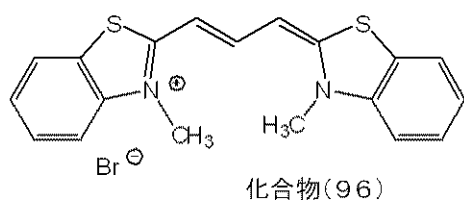


40



【 0 1 6 2 】

【化 2 2】



【 0 1 6 3 】

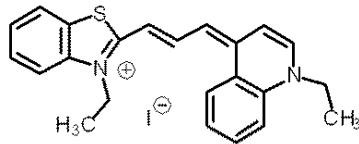
10

20

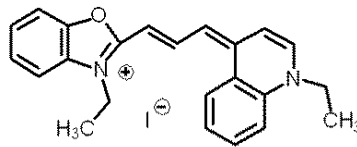
30

40

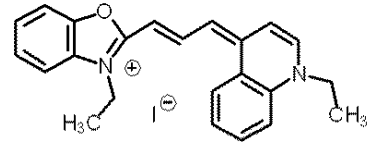
【化 2 3】



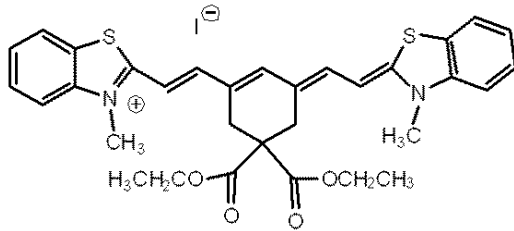
化合物(106)



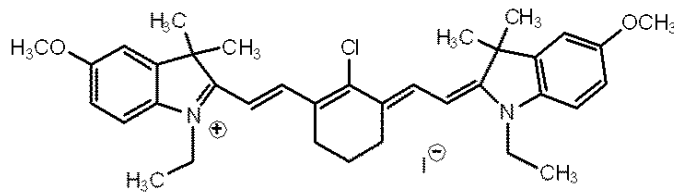
化合物(107)



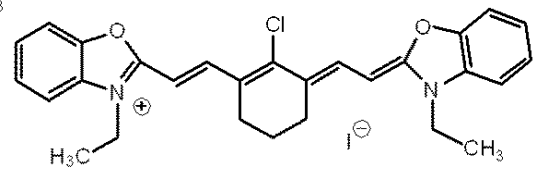
化合物(108)



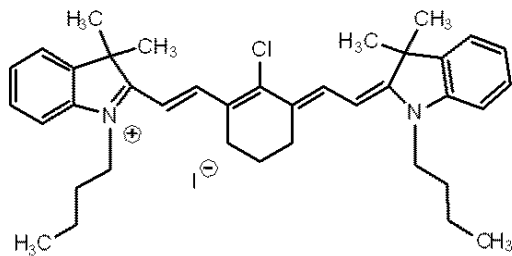
化合物(109)



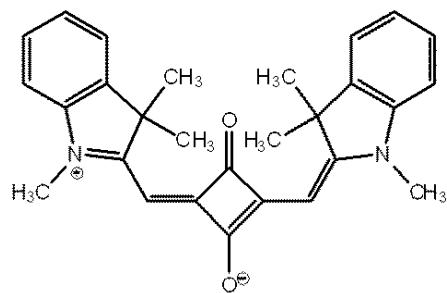
化合物(110)



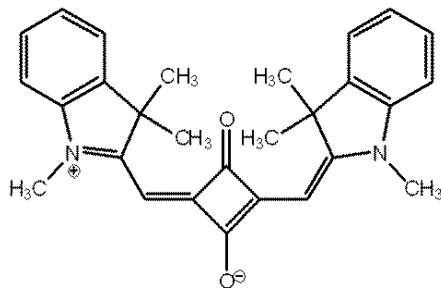
化合物(111)



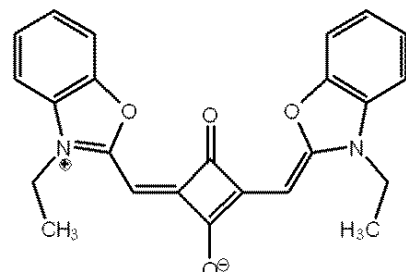
化合物(112)



化合物(113)



化合物(114)



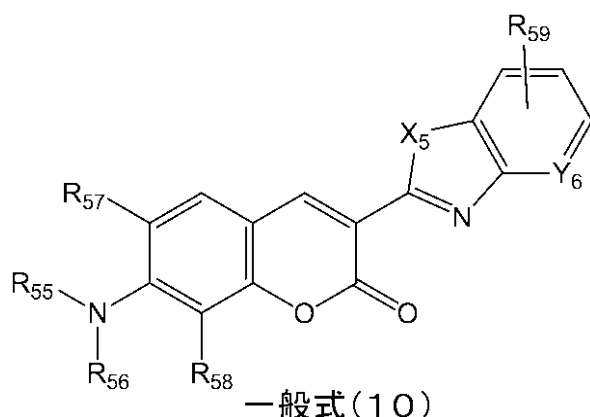
化合物(115)

【0164】

(第三実施形態)

本発明の第三実施形態であるマクロファージ識別剤は、一般式(10)で表される化合物を1種類以上含むことを特徴とする。

【化 2 4】



10

【0165】

一般式(10)中、 R_{55} 、 R_{56} は、各々独立してアルキル基を表し、 R_{57} 、 R_{58} は、各々独立して水素原子、またはアルキル基を表し、 R_{55} と R_{57} 、 R_{56} と R_{58} は、各々独立してお互いに結合して環を形成しても良く、 R_{58} は、水素原子、アルキル基、アリール基、アルコキシ基、またはハロゲン原子を表し、 X_5 は、硫黄原子、酸素原子、または $-NR_6-$ を表し、 Y_6 は炭素原子、または窒素原子を表す。

【0166】

<化合物に関して>

20

一般式(10)で表わされる化合物に関して説明する。

一般式(10)中、 R_{55} 及び R_{56} のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、または、エチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のアルキル基が挙げられる。好ましくは、メチル基、エチル基の場合である。

【0167】

一般式(10)中、 R_{57} 及び R_{58} のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、または、エチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のアルキル基が挙げられる。

【0168】

30

一般式(10)中、 R_{55} と R_{57} 、 R_{56} と R_{58} が結合して形成する環としては、特に限定されるわけではないが、例えば、テトラヒドロピリジン環、またはピペリジン環等が挙げられる。

【0169】

一般式(10)中、 R_{59} のアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、または、エチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のアルキル基が挙げられる。

【0170】

一般式(10)中、 R_{59} のアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、メチルフェニル基、プロモフェニル基、または、メトキシフェニル基等が挙げられる。

40

【0171】

一般式(10)中、 R_{59} のアルコキシ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、または、ブトキシ基等が挙げられる。

【0172】

一般式(10)中、 R_{59} のハロゲン原子としては、特に限定されるものではないが、例えば、フッ素原子、クロロ原子、プロモ原子、または、ヨウ素原子等が挙げられる。

【0173】

一般式(10)中、 X_5 が硫黄原子、酸素原子の場合が、よりサブタイプを識別しやすくなるため好ましい。

50

【 0 1 7 4 】

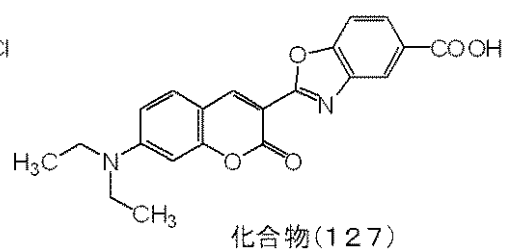
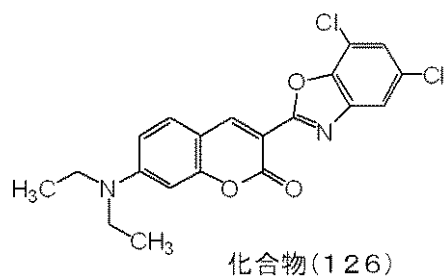
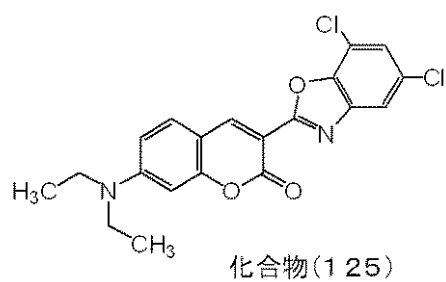
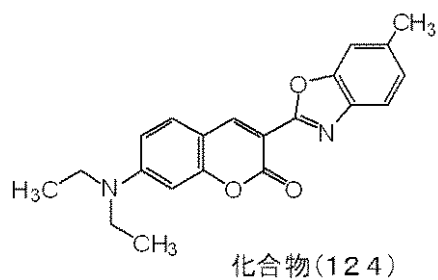
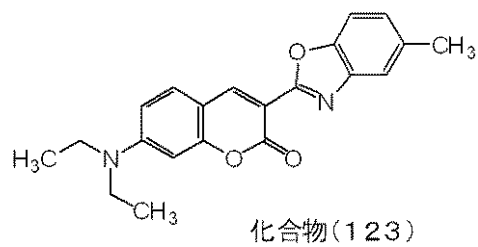
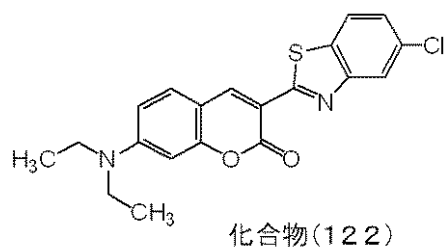
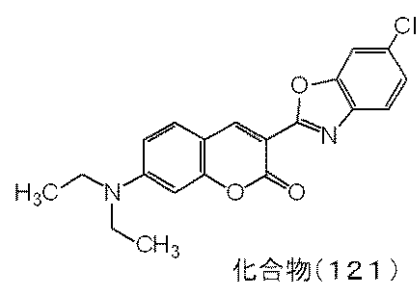
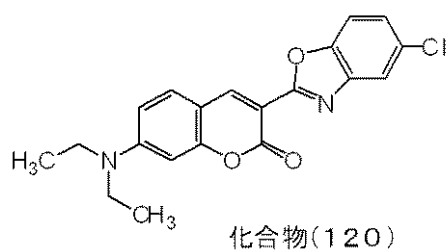
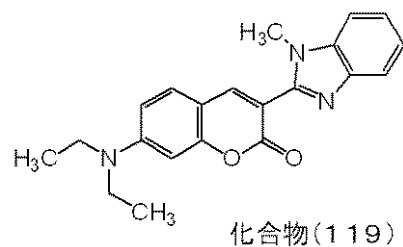
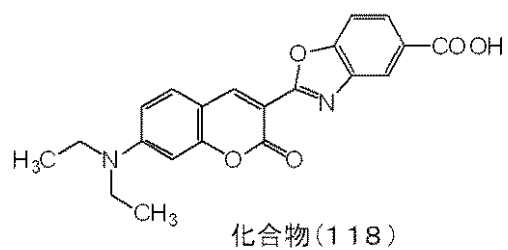
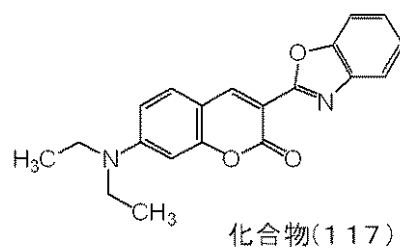
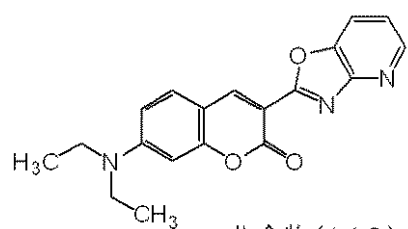
本実施形態における一般式 (1 0) で表わされる化合物は、公知の方法 (非特許文献 3 等) により同様の方法で容易に合成することができる。

【 0 1 7 5 】

以下に、本実施形態の一般式 (1 0) で表わされる化合物の好ましい具体例 (1 1 6) ~ (1 3 8) を示すが、下記の例に限定されるものではない。

【 0 1 7 6 】

【化 2 5】



【 0 1 7 7 】

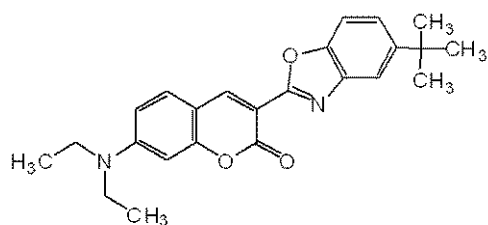
10

20

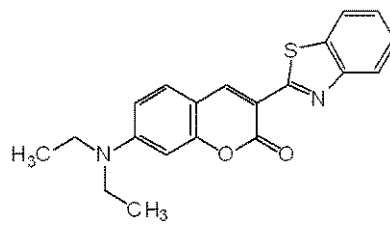
30

40

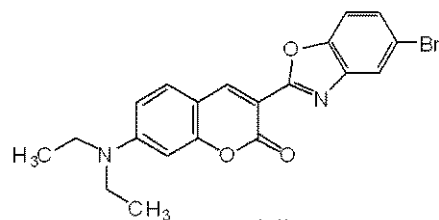
【化 2 6】



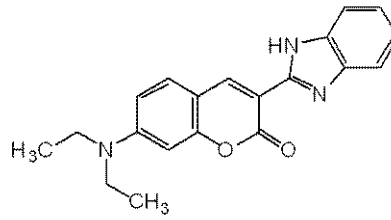
化合物(128)



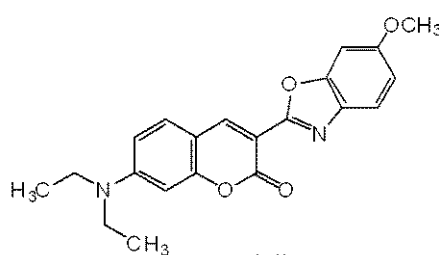
化合物(129)



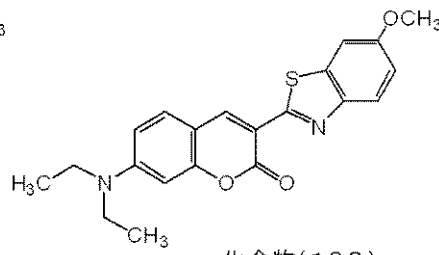
化合物(130)



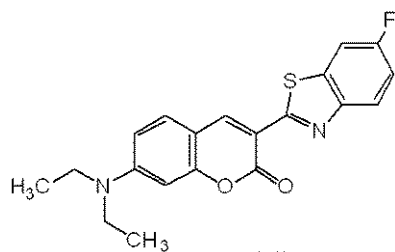
化合物(131)



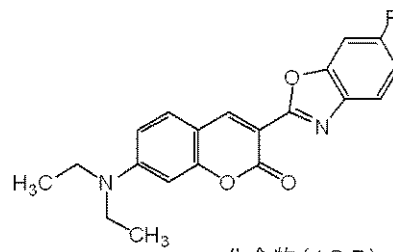
化合物(132)



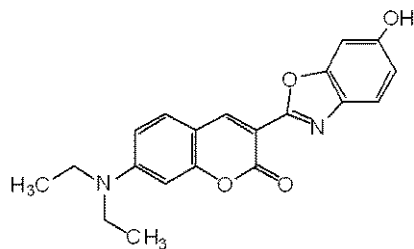
化合物(133)



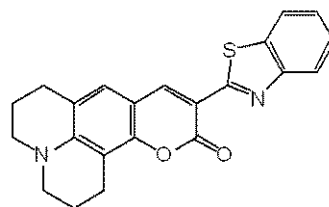
化合物(134)



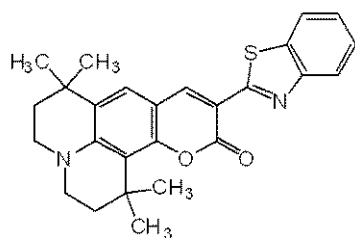
化合物(135)



化合物(136)



化合物(137)



化合物(138)

【0178】

(第四実施形態)

本発明の第四実施形態であるマクロファージ識別剤は、一般式(11)で表される化合物を1種類以上含むことを特徴とする。

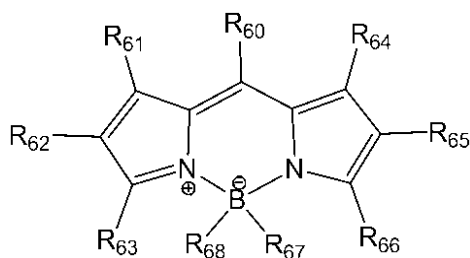
10

20

30

40

【化 27】



一般式(11)

10

【0179】

一般式(11)中、 R_{60} は水素原子、アルキル基、アリール基、チオアルキル基、アミノ基、ヘテロ環基、アルケニル基、ヒドロキシル基、ハロゲン原子、またはアルコキシ基を表し、 $R_{61} \sim R_{66}$ は各々独立して水素原子、アルキル基、アリール基、ヘテロ環基、アラルキル基、またはスルホニル基を表し、 R_{62} と R_{63} 、 R_{65} と R_{66} が互いに結合してヘテロ環を形成しても良く、 $R_{67} \sim R_{68}$ は各々独立してフッ素原子、またはアルキニル基を表す。

【0180】

<化合物に関して>

一般式(11)で表わされる化合物に関して説明する。

20

一般式(11)中、 R_{60} におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、または、エチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のアルキル基、トリフルオロメチル等のハロゲン化アルキル基が挙げられる。

【0181】

一般式(11)中、 R_{60} におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、メチルフェニル基、メトキシフェニル基、チオメチルフェニル基、クロロフェニル基、プロモフェニル基、フルオロフェニル基、ブチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、または、ナフチル基などが挙げられる。

【0182】

30

一般式(11)中、 R_{60} におけるチオアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、チオメチル基、チオエチル基、チオプロピル基、チオブチル基、または、チオエチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のチオアルキル基が挙げられる。

【0183】

一般式(11)中、 R_{60} におけるアミノ基としては、特に限定されるものではないが、例えば、アミノ基、メチルアミノ基、ジメチルアミノ基、ブチルアミノ基、ジブチルアミノ基、または、フェニルアミノ基等が挙げられる。

【0184】

一般式(11)中、 R_{60} におけるヘテロ環基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ピリジン環、チオフェン環、または、フラン環等が挙げられる。

40

【0185】

一般式(11)中、 R_{60} におけるアルケニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ビニル基、または、3-ブテニル基等があげられる。

【0186】

一般式(11)中、 R_{60} におけるハロゲン原子としては、特に限定されるものではないが、例えば、フッ素原子、クロロ原子、プロモ原子、または、ヨウ素原子等があげられる。

【0187】

一般式(11)中、 R_{60} におけるアルコキシ基としては、特に限定されるものではな

50

いが、例えば、メトキシ基、エトキシ基、プロポキシ基、または、ブトキシ基等が挙げられる。

【0188】

一般式(11)中、 R_{60} において、アルキル基、アリール基の場合が好ましく、特に、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、またはフェニル基の場合が、サブタイプを識別しやすくなるため好ましい。

【0189】

一般式(11)中、 $R_{61} \sim R_{66}$ におけるアルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、ブチル基、または、エチルヘキシル基等の直鎖、分岐状の炭素数1～12個のアルキル基が挙げられる。

10

【0190】

一般式(11)中、 $R_{61} \sim R_{66}$ におけるアリール基としては、特に限定されるものではないが、例えば、フェニル基、メチルフェニル基、メトキシフェニル基、チオメチルフェニル基、クロロフェニル基、プロモフェニル基、フルオロフェニル基、ブチルフェニル基、ジメチルフェニル基、トリメチルフェニル基、または、ナフチル基などが挙げられる。

【0191】

一般式(11)中、 $R_{61} \sim R_{66}$ におけるヘテロ環基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ピリジン環、チオフエン環、または、フラン環等が挙げられる。

【0192】

一般式(11)中、 $R_{61} \sim R_{66}$ におけるアラルキル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ベンジル基、または、フェネチル基等が挙げられる。

20

【0193】

一般式(11)中、 $R_{61} \sim R_{66}$ におけるスルホニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、スルホ基、または、スルホン酸ナトリウム等の塩が挙げられる。

【0194】

一般式(11)中、 R_{62} と R_{63} 、 R_{65} と R_{66} が互いに結合して形成されるヘテロ環としては、特に限定されるものではないが、例えば、フラン環等が挙げられる。

【0195】

一般式(11)中の $R_{60} \sim R_{66}$ は更に置換基を有しても良く、サブタイプの種類の識別を著しく阻害するものでなければ特に限定されるものではないが、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*sec*-ブチル基、または、*tert*-ブチル基等のアルキル基；フェニル基、または、ナフチル基等のアリール基；メトキシ基、エトキシ基、または、ブトキシ基等のアルコキシ基；フェノキシ基、またはナフチルオキシ基等のアリールオキシ基；ジメチルアミノ基、*N*-エチル-*N*-フェニルアミノ基、または、ジフェニルアミノ基等のジ置換アミノ基；アセチル基、または、ベンゾイル基等のアシル基；スルホニル基；カルバモイル基；スルファモイル基；ビリジル基、トリアジニル基、または、ベンゾチアゾリル基等のヘテロ環基；ニトロ基；フッ素原子、塩素原子、臭素原子、または、ヨウ素原子等のハロゲン原子等が挙げられる。

30

【0196】

一般式(11)中、 $R_{67} \sim R_{68}$ におけるアルキニル基としては、特に限定されるものではないが、例えば、ビニル基、または、3-ブテニル基等があげられる。

【0197】

本実施形態における一般式(11)で表わされる化合物は、公知の方法(例えば、非特許文献4、非特許文献5、非特許文献6)により同様の方法で容易に合成することができる。

【0198】

以下に、本発明の一般式(11)で表わされる化合物の好ましい具体例(139)～(169)を示すが、下記例に限定されるものではない。下記式中、TMSはトリメチルシ

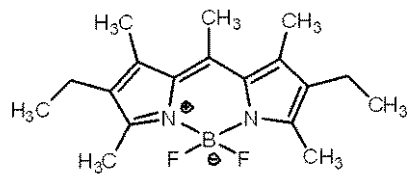
40

50

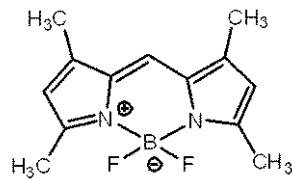
リル基 (- Si (CH₃)₃) を表す。

【 0 1 9 9 】

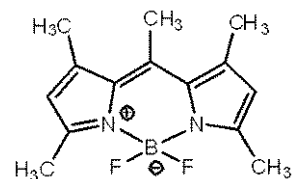
【 化 2 8 】



化合物(139)

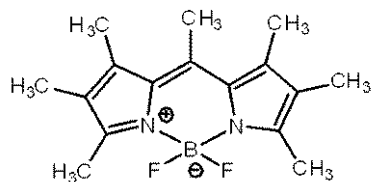


化合物(140)

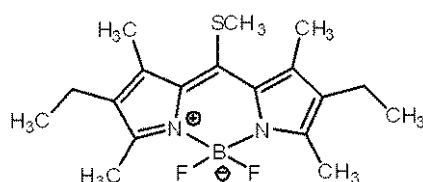


化合物(141)

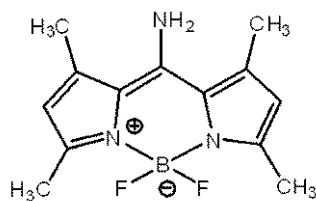
10



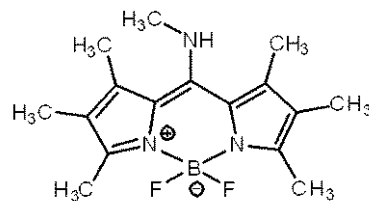
化合物(142)



化合物(143)

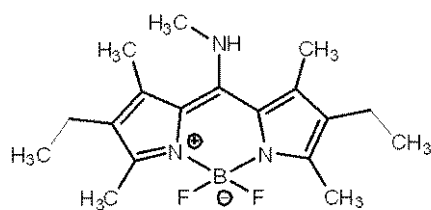


化合物(144)

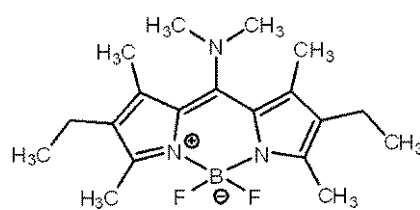


化合物(145)

20

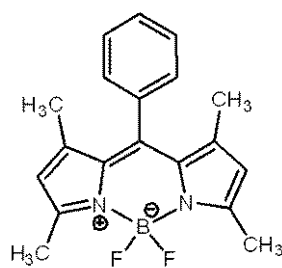


化合物(146)

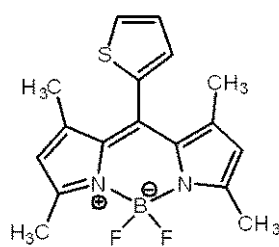


化合物(147)

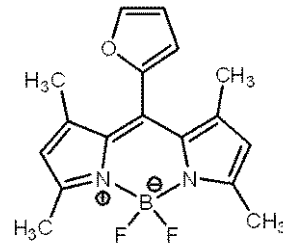
30



化合物(148)

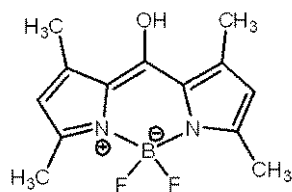


化合物(149)

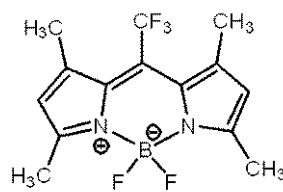


化合物(150)

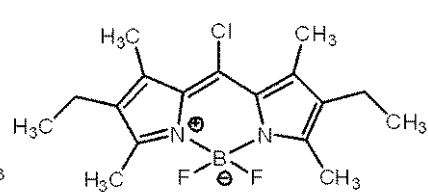
40



化合物(151)



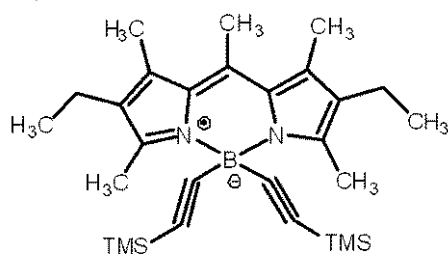
化合物(152)



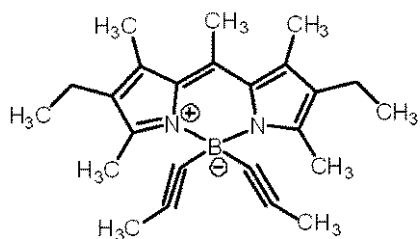
化合物(153)

【 0 2 0 0 】

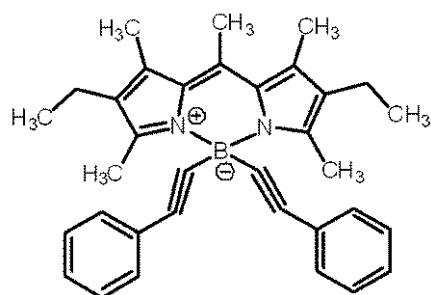
【化 2 9】



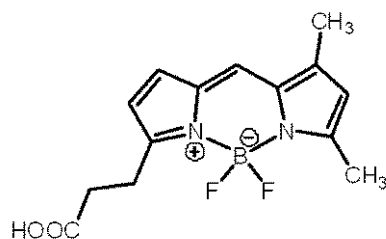
化合物(154)



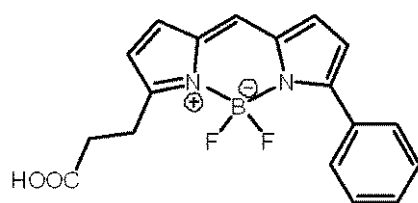
化合物(155)



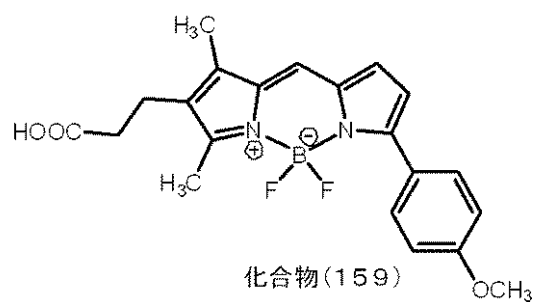
化合物(156)



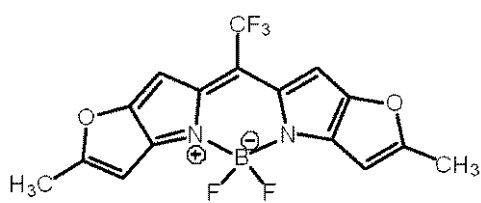
化合物(157)



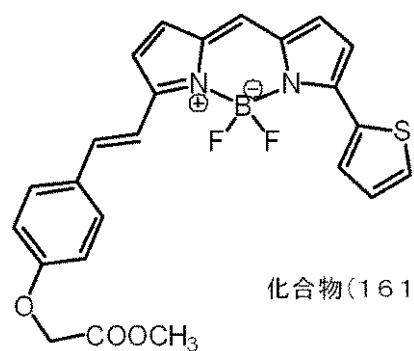
化合物(158)



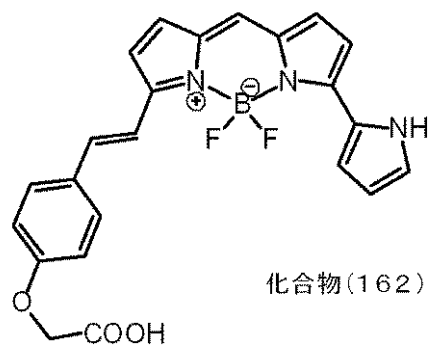
化合物(159)



化合物(160)



化合物(161)



化合物(162)

【 0 2 0 1】

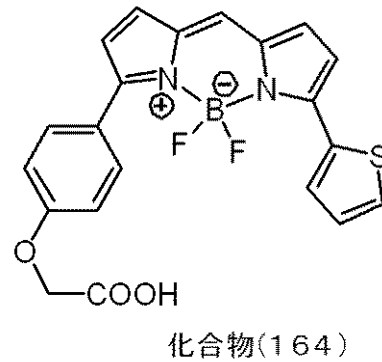
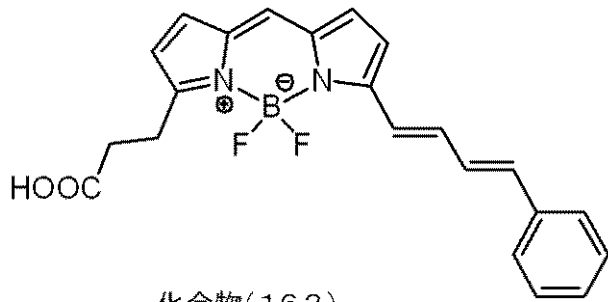
10

20

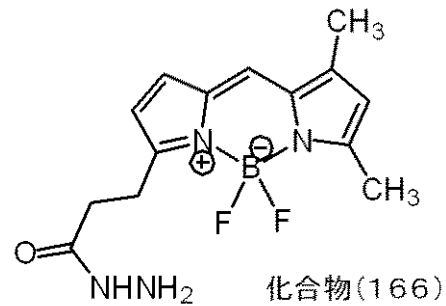
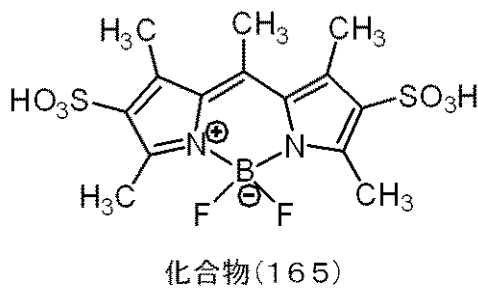
30

40

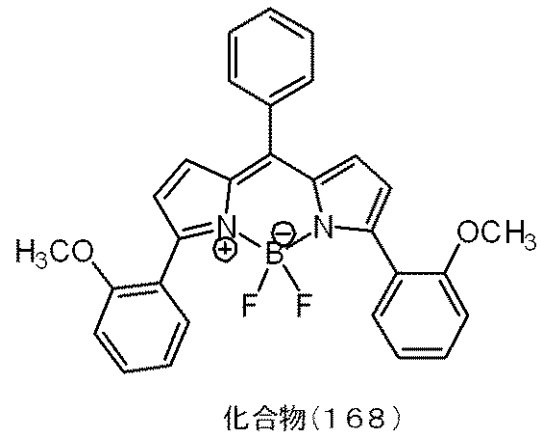
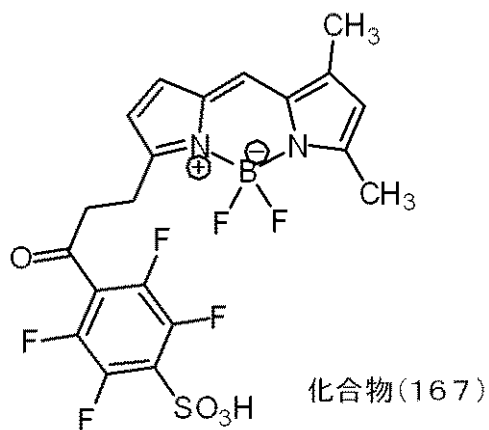
【化 3 0】



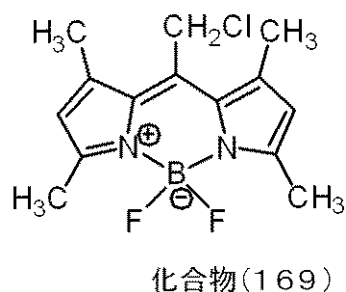
10



20



30



40

【 0 2 0 2】

本発明の有機化合物は分子量が10,000未満、好ましくは5,000以下、より好ましくは2,000以下の有機化合物であることが望ましい。また本発明の有機化合物は、好ましくは色素化合物であり、さらには、蛍光特性を有する蛍光性化合物であることが好ましい。蛍光性の化合物であれば感度が高いため、低濃度で染色することができ、必要とする化合物の量を相対的に減らすことができる。

【 0 2 0 3】

本発明の一般式(1)、(6)、(10)、および(11)で表わされる有機化合物を

50

励起させる波長は、特に限定されないが、通常、励起光を発するレーザーの波長の限界と、生体を通過しやすい波長には範囲がある点から200～1400nmが用いられる。好ましくは、蛍光を検出する装置が多種類ある波長範囲の340～800nmが良く、特に、一般式(1)、(6)、(10)、および(11)で表わされる化合物を1種類用いる場合には、励起波長が455～530nm付近である化合物を用いると、488nmレーザーが搭載されている汎用性の高い廉価な装置を用いる事が出来るので好ましい。

【0204】

炎症性疾患においてはマクロファージのサブタイプが病態の変化に重大な影響を及ぼすことが明らかとなってきたが、詳細なメカニズムはまだ解明されていない。本発明の識別剤を用いることでマクロファージのサブタイプを識別して可視化することができるため、本発明の識別剤は炎症性疾患の病態の変化とサブタイプとの関連性を解明するための研究試薬として用いることができる。またサブタイプが炎症性疾患の病態変化を反映するという報告も多く成されていることから、研究あるいは臨床の分野において、炎症性疾患の病態を判断あるいは診断するためのサブタイプの標識剤として本発明の識別剤を用いることもできる。本発明の識別剤は、*in vitro*あるいは*ex vivo*で病理診断を行うための標識剤や、*in vivo*で内視鏡等を用いた診断を行うための標識剤として用いることができる。

【0205】

<マクロファージについて>

本発明でいうサブタイプとは、機能、発現遺伝子、発現タンパク質、タンパク質、または低分子物質等の細胞産生物質等に違いのあるサブタイプであれば特に限定されないが、M1マクロファージとM2マクロファージを指す。

【0206】

本発明でいうM1マクロファージとは、免疫の活性化や炎症の促進、殺菌、抗腫瘍性等の機能を有していれば、特に限定されるものではないが、例えば、細胞表面にcluster of differentiation(以下、CD)16、CD32、CD64、CD80、CD169、lymphocyte antigen 6C等のタンパク質が多く発現しているもの、腫瘍壊死因子(Tumor necrosis Factor)-(以下、TNF-)、インターロイキン-6(以下、IL-6)、インターロイキン-12、インターロイキン-23、またはインターロイキン-1等の炎症性タンパク質の産生量が多いもの、インターロイキン-10(以下、IL-10)等の抗炎症性タンパク質の産生量が少ないもの、CCケモカインリガンド2、CCケモカインリガンド3、CCケモカインリガンド4、CCケモカインリガンド5、CCケモカインリガンド9、CCケモカインリガンド10、CCケモカインリガンド11、CXCKケモカインリガンド9、CXCKケモカインリガンド10、またはCXCKケモカインリガンド11等のタンパク質の産生量が多いもの、一酸化窒素などの活性窒素種や活性酸素種の産生量が多いもの、または、上述のタンパク質または誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric monoxide synthase(以下、iNOS)等の遺伝子発現量が多いもの等が挙げられる。

【0207】

また本発明でいうM2マクロファージとは、免疫や炎症の抑制や創傷治癒、組織リモデリング、血管新生、腫瘍成長促進等の機能を有していれば、特に限定されるものではないが、例えば、細胞表面にCD163、CD206、CD204、CD209、CD301、Dectin-1、またはGalectin-3等のタンパク質が多く発現しているもの、IL-10、インターロイキン-1RA、またはインターロイキン-1のデコイレセプター等の抗炎症性タンパク質の産生量が多いもの、インターロイキン-12等の炎症性タンパク質の産生量が少ないもの、CCケモカインリガンド1、CCケモカイン16、CCケモカインリガンド17、CCケモカインリガンド18、CCケモカインリガンド22、CCケモカインリガンド24、CXCKケモカインリガンド3、CXCKケモカインリガンド4、CXCKケモカインリガンド23、あるいはトランスホーミング増殖因子(以下、

T G F -) 等のタンパク質の産生量が多いもの、またはポリアミンの産生量が多いもの、上述のタンパク質、アルギナーゼ - 1 (以下、A r g 1)、Y m 1、あるいは F I Z Z 1 等の遺伝子発現量が多いもの等が挙げられる。

【0208】

<生物試料について>

本発明で用いられる生物試料は、特に限定されるものではないが、生物個体、生物組織、生物組織切片、生物組織ブロック、ヒト細胞、動物細胞、ヒト培養細胞、または動物培養細胞等が挙げられる。生物試料はあらかじめホルマリンなどで固定して用いても良い。

【0209】

生物試料の生物種として脊椎動物であれば、例えば、トラフグ、クサフグ、ミドリフグ、メダカ、またはゼブラフィッシュ等の硬骨魚類、アフリカツメガエル等の両生類、ニワトリ、またはウズラ等の鳥類、ラット、マウス、またはハムスター等の小動物、ヤギ、ブタ、イヌ、ネコ、ウサギ、ウシ、またはウマ等の大動物、サル、チンパンジー、またはヒト等の霊長類等が挙げられる。

10

【0210】

生物試料の生物種として無脊椎動物であれば、例えば、ショウジョウバエ、または線虫等が挙げられる。

【0211】

生物試料の培養細胞としては、前記生物種由来の正常組織、または各種疾患組織由来の培養細胞等が挙げられる。

20

【0212】

また、スクリーニング等に用いるために特定のサブタイプの細胞を培養により作製する場合がある。

【0213】

培養により作製する方法としては、単球等のマクロファージの前駆細胞に特定のサイトカイン等の刺激を与えて目的のサブタイプに分化誘導する方法であれば特に限定されない。

【0214】

M 1 マクロファージであれば、例えば、骨髓、脾臓、組織、または血液等から回収したマクロファージの前駆細胞に、マクロファージコロニー刺激因子 (以下、M - C S F)、顆粒球マクロファージ刺激因子、あるいは p h o r b o l m y r i s t a t e a c e t a t e (以下、P M A) をマクロファージの前駆細胞を培養する培地に添加することで作製できる。あるいは、M - C S F、顆粒球マクロファージ刺激因子、または P M A の投与に加えて、インターフェロン - とリポポリサッカライド、インターフェロン - と腫瘍壊死因子のうちのいずれかのタンパク質の組み合わせを添加して作製しても良い。

30

【0215】

また、M 2 マクロファージであれば、例えば、骨髓や脾臓、組織、または血液等から回収したマクロファージの前駆細胞に、M - C S F、顆粒球マクロファージ刺激因子、あるいは P M A をマクロファージの前駆細胞を培養する培地に添加することで作製できる。または、M - C S F、顆粒球マクロファージ刺激因子、あるいは P M A の投与に加えて、インターロイキン - 4 (以下、I L - 4)、インターロイキン - 13 (以下、I L - 13)、I L - 4 と I L - 13、I L - 10、免疫複合体とインターロイキン - 1、免疫複合体とリポポリサッカライド、免疫複合体と t o l l 様受容体、免疫複合体とインターロイキン - 1 レセプターリガンドのうちのいずれかのタンパク質あるいはタンパク質の組み合わせを添加して作製しても良い。

40

【0216】

一方、治療法の開発を目的として、生物試料中や生体内のサブタイプを別のサブタイプに変化させる、または生体外でサブタイプを変化させたマクロファージを生体内に投与してその効果を見る等を行う場合にも、上記と同様の方法でサブタイプを変化させることができる。

【0217】

50

(識別方法)

本発明の第五の実施形態は、マクロファージのサブタイプ M 1 と M 2 とを識別する方法であって、有機化合物を付与して得られた分光特性から前記 M 1 と前記 M 2 とを識別する方法を提供する。有機化合物は、特に限定されないが、好ましくは、分子量 2 0 0 0 以下の色素化合物である。

【 0 2 1 8 】

また、本実施形態の識別方法は、好ましくは、M 1 マクロファージの染色性が前記 M 2 マクロファージと異なることを利用して、生物試料中の M 1 マクロファージ、あるいは M 2 マクロファージを識別する。

【 0 2 1 9 】

本実施形態において、有機化合物は、好ましくは、本発明のマクロファージ識別剤である。

【 0 2 2 0 】

本実施形態の識別方法は、本発明のマクロファージ識別剤を生物試料に曝露して染色した後、フローサイトメトリー法や、fluorescence activated cell sorting (以下、FACS) などの識別用装置を用いて行う事ができる。これらの装置を用いて、サブタイプの種類によって染色性が異なる事を利用して識別する事が出来る。

【 0 2 2 1 】

染色性が異なるとは、特に限定されるものではないが、例えば、マクロファージ識別剤が細胞内へ取り込まれる量や速度の相違、細胞内へ取り込まれたマクロファージ識別剤が細胞外へ排出される量や速度の相違、マクロファージ識別剤がサブタイプの細胞表面での相互作用の相違、サブタイプの種類によるマクロファージ識別剤の蛍光強度の差異等をあげる事が出来る。

【 0 2 2 2 】

また、染色した生物試料を蛍光顕微鏡下で観察を行い、サブタイプの種類による細胞内あるいは細胞表面におけるマクロファージ識別剤の存在量の違いによる蛍光強度の差から画像的に識別しても良い。

【 0 2 2 3 】

また、複数の励起光の照射および、複数の蛍光を検出することにより、マクロファージ識別剤由来の蛍光を複数の励起光・蛍光波長の組み合わせで検出してもよい。複数の励起光・蛍光波長を組み合わせる事により、サブタイプの種類の識別に有用な情報となる。

【 0 2 2 4 】

前記、フローサイトメトリー法や、FACSなどの識別用装置を用いて識別を行う際には、前方散乱や側方散乱などの光学特性を同時に用いて、識別用装置に検出されたシグナルのうち、細胞以外の粒子由来のシグナルなどを除外することが好ましい。また、死細胞を死細胞検出試薬によって染色することで、生細胞のみを対象にして行うことが好ましい。死細胞検出試薬は、市販の試薬が好適に用いられる。

【 0 2 2 5 】

また、蛍光顕微鏡下で観察を行う場合は、生物試料に励起光を照射することにより、細胞内あるいは細胞表面においてマクロファージ識別剤の化合物を発光させた状態で生物試料を撮像すれば発光部位と、非発光部位を容易に検出することができる。また、可視光を照射して得られた明視野画像と励起光を照射して得られた蛍光画像を画像処理手段で組み合わせることで、より詳細に生物試料におけるサブタイプの分布を観察することもできる。また、共焦点顕微鏡を用いれば、光学的な切片画像を取得することができるため、好ましい。さらに、多光子励起蛍光顕微鏡は、高い深部到達性と空間解像力を持つため、生物試料内部の観察に好ましく用いられる。

【 0 2 2 6 】

本発明の識別方法を用いることでマクロファージのサブタイプを識別することができるため、本発明の識別方法は、炎症性疾患の病態の変化とサブタイプとの関連性の解明に活

10

20

30

40

50

用できる。また研究あるいは臨床の分野において、炎症性疾患の病態を判断あるいは診断するために本発明の識別方法を用いることもできる。

【0227】

<染色>

本発明のマクロファージ識別剤の前記生物試料への曝露による細胞の染色は、一般式(1)で表される化合物をそのまま用いても良いし、適当な溶媒に溶解させて行うこともできる。

【0228】

本発明に用いられる溶媒としては、特に限定されるものではないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液(以下、PBS)あるいはTris等の緩衝液、Dulbecco's Modified Eagle Medium(以下、D-MEM)、Iscoe's Modified Dulbecco's Medium(以下、IMDM)、Hanks' Balanced Salt Solutions(以下、HBSS)、Minimun Essential Medium-Eagle, Earle's Salts Base, with Non-Essential Amino Acid(以下、MEM-NEAA)、あるいはRPMI(Roswell Park Memorial Institute Medium)1640等の細胞培養用培地、市販のFACS解析用バッファー等、または乳酸リンゲル液等の輸液が挙げられる。これらの溶媒には、特に水が50%以上含まれていることが好ましい。また、これらの溶媒を2種以上混合して用いることもできる。

【0229】

一方、これらの溶媒には、ウシ胎児血清(以下、FBS)、またはウマ血清等の血清や、アジ化ナトリウムまたはペニシリン-ストレプトマイシン(以下、P/S)等の抗菌剤等を添加して使用することもできる。特に、生理食塩水、PBSあるいはTris等の緩衝液、D-MEM、IMDM、あるいはHBSS等の細胞培養用培地、市販のFACS解析用バッファー等、または乳酸リンゲル液等の輸液などが、細胞に適した塩濃度やpH等を制御する上で好ましく用いられる。

【0230】

また、有機溶媒が生物試料に影響を与えない濃度範囲であれば、一般式(1)で表される化合物をジメチルスルホキシド、またはエタノール等の有機溶媒に溶解させた後に、上記の溶媒と混合して用いてもよい。

【0231】

必要であれば添加剤をさらに添加することができる。本発明に用いられる添加剤としては、マクロファージの染色に影響がなければ特に限定されるものではないが、例えば、保湿剤、表面張力調整剤、増粘剤、または塩化ナトリウムのような塩類、各種pH調整剤、pH緩衝剤、防腐剤、抗菌剤、甘味剤、または香料等が挙げられる。これらの添加剤を1種類、または、それ以上組み合わせることもできる。

【0232】

本発明の一般式(1)で表されるマクロファージ識別剤の化合物の濃度は、サブタイプを識別できる量であれば特に限定されるものではないが、標的とするサブタイプが存在する試料の状態によって適宜増減できる。通常、0.001nM以上1000μM以下の濃度で用いられ、より好ましくは0.01nM以上100μM以下の濃度で用いられる。特にin vivoで用いる場合には、可能な限り少量が望ましい。

【0233】

本発明の一般式(1)で表されるマクロファージ識別剤の化合物は、単独で用いても、2種類以上の化合物を組み合わせることもよい。また、公知の蛍光染料と本発明の一般式(1)で表されるマクロファージ識別剤とを2種類以上組み合わせることもよい。

【0234】

本発明のマクロファージ識別剤の前記生物試料への曝露による細胞の染色は、in vitroあるいはex vivoで用いる場合には、適当な容器内で生物試料とマクロフ

10

20

30

40

50

ァージ識別剤とを混合したり、スライドガラス等の上で生物試料にマクロファージ識別剤を滴下や噴霧等で接触させたりすることで行うことができる。

【0235】

In vivo で用いる場合には、マクロファージ識別剤を経口投与、静脈または動脈等の血管内、経口内、舌下、直腸内、腹腔内、皮膚、皮下、膀胱内、気管（気管支）、目、鼻、または耳内等への注射、噴霧、または塗布等の手段により生体内に投与すればよい。またカテーテルなどの内視鏡等のプローブと共に用いることもできる。

【0236】

染色するときの温度は、特に限定されるものではないが、4～42 の温度で、更に好ましくは、4～38 、更に好ましくは、31～38 、最も好ましくは37 でマクロ

10

【0237】

染色する時間は、特に限定されるものではないが、好ましくは、1分以上、24時間以下、より好ましくは、1分以上、4時間以下、さらに好ましくは、1分以上、1時間以下でマクロファージ識別剤を前記生物試料に曝露することが好ましい。通常1時間以内で染色することができる。

【0238】

< 染色メカニズム >

本発明のマクロファージ識別剤は、サブタイプの種類によってマクロファージ識別剤の細胞内への取り込み量や取り込み速度が違ふことや、細胞内へ取り込まれたマクロファージ識別剤の細胞外への排出量や排出速度が違ふことや、サブタイプの種類によって細胞内へ取り込まれたマクロファージ識別剤の細胞内に存在する高分子物質や低分子物質、ガス状分子、イオン等の成分との相互作用が異なること、あるいはサブタイプの種類によってマクロファージ識別剤の細胞表面との相互作用が異なること等に基づいて、サブタイプの種類によってマクロファージ識別剤由来の蛍光強度の差異が生じることに基づいて、サブタイプを識別することができる。

20

【0239】

本発明のマクロファージ識別剤は、サブタイプの細胞表面に発現している少なくとも1種類以上のトランスポーターの基質となるために、サブタイプの種類によってマクロファージ識別剤の細胞内への取り込み量や取り込み速度が異なったり、細胞内へ取り込まれた

30

【0240】

本明細書において、「トランスポーターの基質となる」とは、流入トランスポーター阻害剤の非存在下では流入トランスポーターによって選択的に輸送されることができなが流入トランスポーター阻害剤の存在下では輸送されることができないか、または流入トランスポーター阻害剤の存在下でそのトランスポーターを介しての移行性が変化することを意味する。あるいは、排出トランスポーターにより選択的に輸送されるか、排出トランスポーター阻害剤の非存在下ではそのトランスポーターにより輸送されるが阻害剤の存在下では輸送されないか、または排出トランスポーター阻害剤の存在下でそのトランスポーターを介しての移行性が変化することを意味する。

40

【0241】

トランスポーターとしては、特に限定されるものではないが、ABCトランスポーター、SLCトランスポーター、グルコーストランスポーター、またはドーパミントランスポーターなどがあげられる。これらのトランスポーターの中でも好ましくは、排出トランスポーターであり、より好ましくは、ABCトランスポーターであり、さらに好ましくは、Pgp (P - 糖タンパク質)、BCRP (Breast Cancer Resistance Protein)、MRP (Multidrug resistance - associated Protein)、またはMDR (Multidrug resistance) の基質となるものである。

【0242】

50

また本発明のマクロファージ識別剤は、サブタイプの種類によってエンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれる量や速度が異なる。本発明のマクロファージ識別剤をリボソームによって修飾することによって、エンドサイトーシスによって細胞内へ取り込まれやすくすることもできる。

【0243】

また本発明のマクロファージ識別剤は、サブタイプの種類によって細胞内に存在するタンパク質や酵素等の高分子物質や、脂質等の低分子物質や、活性酸素種や活性窒素種等のガス状分子や、水素イオン等のイオン種との相互作用が異なる。

【0244】

また本発明のマクロファージ識別剤は、サブタイプの種類によって細胞表面との相互作用が異なる。マクロファージ識別剤と細胞表面との相互作用は、サブタイプの細胞表面に発現している少なくとも1種類以上のタンパク質や、タンパク質を構成しているアミノ酸あるいは官能基、細胞膜、細胞膜を形成している脂質、細胞表面に存在する電荷、細胞表面に存在する親水領域、細胞表面に存在する疎水領域などと形成される。

【0245】

<洗淨>

本発明のマクロファージ識別剤の前記生物試料への曝露後は、必要に応じて洗淨操作を加えてもよい。洗淨操作について説明する。

【0246】

まず、抽出あるいは培養により得た細胞試料を染色した場合であれば、適当な容器内で遠心により細胞試料を沈降させたうえで染色液を除去する。次に、本発明のマクロファージ識別剤等の色素化合物を含まない溶液（洗淨溶液）を加え、洗淨する。

【0247】

また、組織あるいは組織切片を染色した場合であれば、適当な容器内あるいはスライドガラス等の上で、本発明のマクロファージ識別剤等の色素化合物を含まない溶液（洗淨溶液）にさらすことで洗淨する。

【0248】

洗淨操作は、必要に応じて1回以上繰り返してもよい。また、洗淨溶液に一定時間生物試料を浸した状態で放置してもよい。さらに、必要に応じて振とうや加温などを行ってもよい。

【0249】

洗淨された生物試料が特に細胞の場合、細胞が凝集しないように攪拌したり、フィルターを通したりする操作を加えてもよい。

【0250】

（分取方法）

本発明の第六の実施形態であるサブタイプの分取方法について説明する。

【0251】

前記、サブタイプの識別方法で識別し、選択的に収集（ソーティング）することによって、目的とするサブタイプを分取することができる。

【0252】

細胞のソーティングは、市販のFACS装置が好適に用いられる。また、画像的に識別を行う場合には、目的とするサブタイプ、あるいは、目的とするサブタイプ以外の細胞を選択的に収集あるいは除去することによっても行うことができる。選択的な収集または除去には、アスピレータなどを用いることができる。

【0253】

炎症性疾患においては、特定の種類のマクロファージが疾患の治癒に重要な役割を果たすということが明らかになってきている。例えば、がんにおいてはM1マクロファージががん細胞の除去に重要な役割を果たし、腎炎においてはM2マクロファージが治癒に重要な役割を果たすという研究報告例がある。本発明のマクロファージのサブタイプの分取方法により任意の種類のサブタイプを分取することができるため、本発明の分取方法は、炎

10

20

30

40

50

症性疾患において疾患部位に任意の種類のサブタイプを移植する治療に活用することができる。

【0254】

(評価方法)

本発明の第七の実施形態であるサブタイプの評価方法は、本発明のマクロファージ識別剤を生物試料に曝露する工程を含む。

【0255】

また、本発明の評価方法では、マクロファージ識別剤を生物試料に曝露した後、あるいは、同時に、被検物質を生物試料の一部、または全部に作用させてもよい。

【0256】

本発明の評価方法は、さらに、マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性を検出する工程を含む。これにより、生物試料に含まれるサブタイプの種類、数、割合、または光学特性等の評価することができる。

【0257】

被検物質を作用させている場合には、被検物質がサブタイプの種類、数、割合、または光学特性等に対して及ぼす効果を評価することができる。この際、被検物質を作用させる生物試料と、被検物質を作用させない生物試料を別々に評価することにより、被検物質の有無によるサブタイプの種類、数、または割合等の変化から、被検物質のサブタイプにおよぼす作用を評価することができる。被検物質は二種類以上用いて、被検物質間の作用の違いの評価を行うこともできる。

【0258】

本発明の評価方法を用いることで、マクロファージのサブタイプの種類や数や割合や光学特性を検出することができるため、本発明の評価方法は、炎症性疾患の病態の変化とサブタイプとの関連性の解明に活用できる。また研究あるいは臨床の分野において、炎症性疾患の病態を判断あるいは診断するために本発明の評価方法を用いることもできる。さらに、サブタイプのバランスが炎症性疾患の予後や再発に相関があるという報告も多く成されていることから、本発明の評価方法は炎症性疾患の予後や再発の予測に活用することもできる。加えて、薬剤を投与した後のサブタイプの変化を本発明の評価方法を用いて調べること、治療薬の開発や、最適な治療薬の選択や、選択した治療薬の効果の評価を行うことができる。

【0259】

(分析方法)

本発明は第八の実施形態として、被験物質を生物試料に暴露し、同時に、あるいはその前後に、その生物試料にマクロファージ識別剤を暴露し、サブタイプの染色性を分析することを特徴とする分析方法を提供する。被験物質は、マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性に影響を与えるものでもよいし、影響を与えないものでもよい。また被検物質は二種類以上用いて、被検物質間の作用の違いを分析することもできる。

【0260】

マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性に影響を与える被験物質であれば、被験物質を作用させる生物試料と、被験物質を作用させない生物試料を別々に評価することにより、被験物質による染色性への影響を評価することができ、マクロファージ識別剤が基質となる細胞表面に発現しているトランスポーター、またはマクロファージ識別剤が相互作用する細胞表面に発現しているタンパク質や官能基等と被験物質との相関を分析することができる。

【0261】

マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性に影響を与えない被験物質の場合には、マクロファージ識別剤による染色性に基づいて識別されたサブタイプと被検物質の相関を分析することができる。マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性に影響を与えない被験物質であれば、サブタイプに影響を与えるものでもよいし、影響を与えないものでもよい。

【0262】

マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性には影響を与えないが、サブタイプに影響を与える被験物質であれば、被験物質を作用させる生物試料と、被験物質を作用させない生物試料を別々に評価することにより、被検物質の有無によるサブタイプの種類、数、割合などの変化から、被検物質のサブタイプに及ぼす作用を分析することができる。

【0263】

マクロファージ識別剤によるサブタイプの染色性、およびサブタイプのいずれにも影響を与えない被験物質であれば、被験物質とサブタイプとの相互作用の検出には、被験物質由来の光学特性を測定しても良い。被検物質、または被験物質に標識した材料が蛍光を有する場合は、蛍光測定により被験物質とサブタイプとの相互作用の検出を行うことができる。分析を正確に行うために、本発明のマクロファージ識別剤とは異なる励起波長、あるいは、異なる蛍光波長を有するように、被検物質、または被験物質に標識した材料を選択することが好ましい。励起波長、あるいは、蛍光波長が異なれば、マクロファージ識別剤由来の蛍光シグナルと、被検物質、または被験物質に標識した材料由来の蛍光シグナルをそれぞれ検出することにより、サブタイプに対する被検物質の結合、取り込みなどを分析することができる。蛍光を有する被検物質としては、特に限定されるものではないが、蛍光性の表面抗原マーカーでもよいし、蛍光を有する有機分子や無機分子などが挙げられる。

10

【0264】

サブタイプと薬剤との相関（薬剤投与後のサブタイプの変化）を本発明の分析方法を用いて調べることで、治療薬の開発や、最適な治療薬の選択や、選択した治療薬の効果の分析を行うことができる。

20

【0265】

（スクリーニング方法）

本発明は第九の実施形態として、物質を生物試料に曝露し、同時に、あるいはその前後に、その生物試料にマクロファージ識別剤を暴露し、サブタイプの染色性に基づいて物質をスクリーニングすることを特徴とするスクリーニング方法を提供する。スクリーニングにおいては本発明の上記の評価方法または分析方法を用いて、複数の被検物質のサブタイプに対する効果や相互作用を評価、分析することができる。

【0266】

例えば、サブタイプに発現している化合物の流入及び排出トランスポーターの働きに作用する生理活性物質を評価することができる。特に排出トランスポーターの働きを好適に評価することができる。より好ましくは、ABCトランスポーターを評価することができる。本発明のマクロファージ識別剤を用いた場合、生理活性物質の影響によって排出トランスポーターの働きが阻害されることで、サブタイプの分離が悪くなる、あるいは、分離が良くなる、あるいは、他の細胞との差がなくなる場合に、その生理活性物質が排出トランスポーターに対する作用を有していることを評価することができる。

30

【0267】

または、マクロファージ識別剤によって識別されたサブタイプに発現している表面抗原を調べるために、被検物質として蛍光標識された抗表面抗原抗体を用いれば、サブタイプに結合性の高い抗体の種類をスクリーニングすることができる。

40

【0268】

また、被検物質としてサブタイプによる取り込みや相互作用が不明な蛍光物質を使用すれば、マクロファージ識別剤によって識別されたサブタイプに対する被検物質の作用を、蛍光強度で評価することができる。

【0269】

炎症性疾患においてはサブタイプが炎症性疾患の病態変化を反映するという報告に加えて特定の種類のマクロファージが疾患の治療に重要な役割を果たすという報告が多く成されていることから、サブタイプと薬剤との相関（薬剤投与後のサブタイプの変化）を本発明のスクリーニング方法を用いて調べ得ることで、治療薬の開発や、最適な治療薬の選択

50

や、選択した治療薬の効果のスクリーニングを行うことができる。

【0270】

(キット)

本発明の第十の実施形態である識別用キットは、本発明のマクロファージ識別剤を少なくとも1種類以上含む事を特徴とする。また、特に限定されるものではないが、識別用キットには、マクロファージ識別剤を生物試料に曝露する際に必要となる容器、試薬などを含むことができる。

【0271】

本発明の識別用キットを用いることで、家庭や健康診断の会場や救急の現場において、炎症性疾患のその場での簡易的な診断ができる。

10

【0272】

以下に実施例を挙げて、本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は、本発明のより一層の深い理解のために示される具体例であって、本発明は、これらの具体例に何ら限定されるものではない。

【実施例】

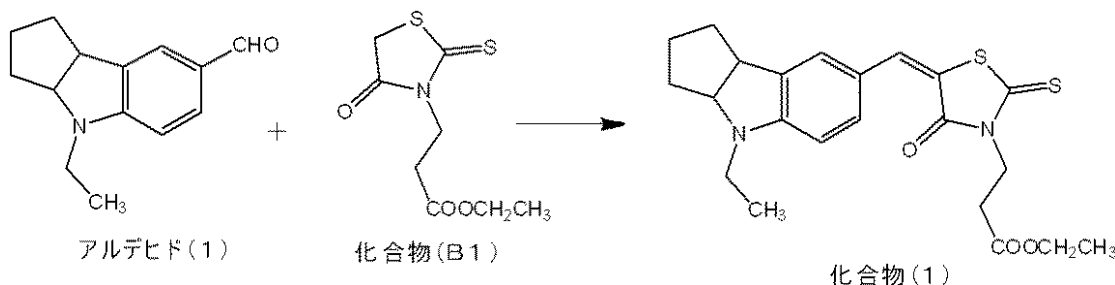
【0273】

<合成例1>

本発明の一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(1)の合成例を示す。

【化31】

20



【0274】

アルデヒド(1) 2.5 g (11.4 mmol)の酢酸20 mL溶液に化合物(B1) 2.7 g (11.5 mmol)、酢酸アンモニウム1.6 gを添加して、還流下2時間攪拌させた。反応終了後、冷却させながら、ゆっくり水50 mLを滴下して室温まで冷却した。析出した固体をろ過して、水100 mLで2回洗浄し、更に、2-プロパノール50 mLで洗浄して、目的の化合物(1) 3.0 g (収率60.1%)を得た。

30

【0275】

目的の化合物(1)である事は、 ^1H 核磁気共鳴分光分析(ECA-400、日本電子(株)製)、LC/TOF MS(LC/MSD TOF、Agilent Technologies社製)によって確認した。

【0276】

<一般式(1)で表わされるその他の化合物>

40

合成例1と同様にして、表4で示す化合物をそれぞれ合成し、目的物である事を同定した。

【0277】

[一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの識別]
(実施例1)

【0278】

<サブタイプの培養>

サブタイプの培養は、非特許文献7のプロトコルに従って行った。即ち、8~10週齢のBalb/cマウスの大腿骨から採取した骨髓細胞を 1×10^6 個/mLになるように20% FBSおよび1% P/Sを含むIMDMに分散させた後、100 mmディッシュに

50

1 × 10⁷ 個ずつ播種した。更に 50 ng/mL となるように M-CSF (ペプロテック社製) を加えて 3 ~ 4 日間、5 % CO₂ 存在下で 37 °C でインキュベーションすることでマクロファージ前駆細胞をマクロファージに分化させた。培地を交換した後、50 ng/mL となるように M-CSF (ペプロテック社製) を加えてさらに 3 ~ 4 日間、5 % CO₂ 存在下で 37 °C でインキュベーションした後にサブタイプへの分化誘導を行った。5 % FBS および 1 % P/S を含む IMDM 中に 200 ng のインターフェロン-γ および 1 μg のポリリボサッカライド (いずれもペプロテック社製) を加えることで、サブタイプを M1 に分化誘導させた。また、5 % FBS および 1 % P/S を含む IMDM 中に 100 ng の IL-4 を加えることで、サブタイプを M2 に分化誘導させた。さらに 3 日間、5 % CO₂ 存在下で 37 °C でインキュベーションした後、PBS でリンス後、0.25 % のトリプシンと 1 mM EDTA (エチレンジアミン四酢酸) を含む PBS を用いて、M1 および M2 にそれぞれ分化誘導されたマクロファージをシャーレから回収した。

【0279】

< サブタイプの確認 >

回収した M1 マクロファージおよび M2 マクロファージは遺伝子発現解析を行うことで、各サブタイプに分化誘導されていることを確認した。回収した M1 マクロファージおよび M2 マクロファージの一部 (およそ 0.5 ~ 5 × 10⁶ 個) から、キアゲン社製の RNeasy mini kit に添付されたプロトコルに準拠し、total RNA を抽出した。その後、SuperScript (登録商標) VILOTM cDNA Synthesis Kit (Invitrogen 社製) のプロトコルに準拠し、逆転写反応により cDNA を合成した。M1 マクロファージのマーカー遺伝子 (iNOS および TNF) の cDNA および、M2 マクロファージのマーカー遺伝子 (Arg1 および CD206) の cDNA に対するプライマーを合成した。合成したプライマーの配列を表 2 に示す。Applied Biosystems 7500 リアルタイム PCR システムを用いて、Power SYBR (登録商標) Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社製) のプロトコルに準拠してポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase chain reaction) を行い、各マーカー遺伝子の発現量を定量した。M1 マクロファージおよび M2 マクロファージに分化誘導した細胞で得られた各マーカー遺伝子の発現量の比較した結果を図 1 に示す。縦軸の RQ (Relative Quantification) は、M1 マクロファージに分化誘導した細胞における各マーカー遺伝子の発現量を 1 としたときの、M2 マクロファージに分化誘導した細胞における各マーカー遺伝子の発現量を相対値で示したものである。図 1 から明らかなように、M1 マクロファージに分化誘導した細胞では、M2 マクロファージに分化誘導した細胞に比べて iNOS および TNF の発現量が高かった。一方、M2 マクロファージに分化誘導した細胞では、M1 マクロファージに分化誘導した細胞に比べて Arg1 および CD206 の発現量が高かった。この結果から、分化誘導により M1 マクロファージおよび M2 マクロファージを調整できたことを確認した。

【0280】

【表 2】

ターゲット遺伝子	プライマーの配列		備考
	Forward	Reverse	
GAPDH	TGAAGCAGGCATCTGAGGG	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAG	内在性コントロール遺伝子
iNOS	AGACCTCAACAGAGCCCTCA	TCGAAGGTGAGCTGAACGAG	M1 マクロファージマーカー
TNFα	ACGGCATGGATCTCAAAGAC	AGATAGCAAATCGGCTGACG	M1 マクロファージマーカー
Arg1	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCTTAGGGACATC	M2 マクロファージマーカー
CD206	CGGTGAACCAAATAATTACCAAAAT	GTGGAGCAGGTGTGGGCT	M2 マクロファージマーカー

【0281】

< サブタイプの染色 >

回収したサブタイプ、M1 および M2 をそれぞれ 2 × 10⁵ 個ずつ 1.5 mL チューブに分注し、そこに 1 μM となるように化合物 (1) を加え、37 °C で 30 分インキュベ

ションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清を除いた後、死細胞を識別するための色素(aqua fluorescent reactive dye, Invitrogen社製、以下aquaと省略することがある)を添加し、4で10分インキュベーションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清を除いた後、FACSバッファーに細胞を懸濁し、BD社製FACSCanto(商標)IIフローサイトメトリー装置にて解析を行った。

【0282】

<サブタイプの識別>

解析は、aquaのシグナルが低い細胞集団を対象とすることで、死細胞を除去した細胞集団に対して行った。

化合物(1)由来の蛍光シグナルを、FITCのチャンネル(488nmで励起、530/30nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図2に示した。

【0283】

(実施例2~54)

実施例1で使用した化合物(1)を化合物(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(11)~(13)、(15)、(17)、(19)~(26)、(28)、(30)~(33)、(35)、(36)、(38)、(42)~(45)、(48)~(62)、(65)、(67)、(74)~(76)、(82)、(83)、(85)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で、化合物(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(11)~(13)、(15)、(17)、(19)~(26)、(28)、(30)~(33)、(35)、(36)、(38)、(42)~(45)、(48)~(62)、(65)、(67)、(74)~(76)、(82)、(83)、(85)由来の蛍光シグナルを解析した。

【0284】

(比較例1)

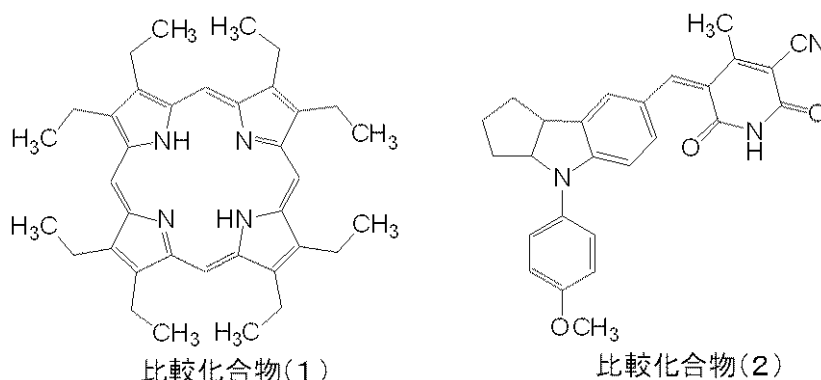
実施例1で使用した化合物(1)を比較化合物(1)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で、比較化合物(1)由来の蛍光シグナルを解析した。ただし、比較化合物(1)由来の蛍光シグナルは、PE-Cy7のチャンネル(488nmで励起、780/60nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にPE-Cy7のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図3に示した。

【0285】

(比較例2)

実施例1で使用した化合物(1)を比較化合物(2)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で、比較化合物(2)由来の蛍光シグナルを解析した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図4に示した。

【化32】



10

20

30

40

50

【 0 2 8 6 】

以上の実施例 1 ～ 5 4、比較例 1 ～ 2 の結果を表 4 に示す。

【 0 2 8 7 】

＜一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法＞

化合物 (3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(1 1) ～ (1 3)、(1 5)、(1 7)、(1 9) ～ (2 6)、(2 8)、(3 0) ～ (3 3)、(3 5)、(3 6)、(3 8)、(4 2) ～ (4 5)、(4 8) ～ (6 2)、(6 5)、(6 7)、(7 4) ～ (7 6)、(8 2)、(8 3)、(8 5) および比較化合物 (1) ～ (2) 由来の蛍光シグナルを、各化合物に適したチャンネルで測定した。横軸に各チャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製した。M 1 マクロファージで得られたヒストグラムのピークトップにおける蛍光強度 (F_{M1}) と M 2 マクロファージで得られたヒストグラムのピークトップにおける蛍光強度 (F_{M2}) の差分を、M 1 マクロファージで得られたヒストグラムのピーク幅 (W_{M1}) と M 2 マクロファージで得られたヒストグラムのピーク幅 (W_{M2}) との和で除したものを分離度 R として、サブタイプの識別能の指標とした ((1) 式参照)。

$$\text{分離度 } R = |F_{M1} - F_{M2}| / (W_{M1} + W_{M2}) \cdots (1) \text{ 式}$$

【 0 2 8 8 】

得られた分離度 R の値から、化合物 (3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(1 1) ～ (1 3)、(1 5)、(1 7)、(1 9) ～ (2 6)、(2 8)、(3 0) ～ (3 3)、(3 5)、(3 6)、(3 8)、(4 2) ～ (4 5)、(4 8) ～ (6 2)、(6 5)、(6 7)、(7 4) ～ (7 6)、(8 2)、(8 3)、(8 5) および比較化合物 (1) ～ (2) のサブタイプの識別能を下記の基準により、A ～ C として評価し、分離度 R が 0 . 1 5 以上であれば、サブタイプの識別が良いと判断した。

A : サブタイプの識別が非常に良い (分離度 R が 0 . 5 以上)

B : サブタイプの識別が良い (分離度 R が 0 . 1 5 以上、0 . 5 未満)

C : サブタイプの識別ができない (分離度 R が 0 . 1 5 未満)

【 0 2 8 9 】

また、化合物 (3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(1 1) ～ (1 3)、(1 5)、(1 7)、(1 9) ～ (2 6)、(2 8)、(3 0) ～ (3 3)、(3 5)、(3 6)、(3 8)、(4 2) ～ (4 5)、(4 8) ～ (6 2)、(6 5)、(6 7)、(7 4) ～ (7 6)、(8 2)、(8 3)、(8 5) および比較化合物 (1) ～ (2) のうち、識別能が A または B のものについては、M 1 マクロファージ (M 1) と M 2 マクロファージ (M 2) のうち強く染色するサブタイプを、「選択性」として表 4 中に記載した。

【 0 2 9 0 】

表 3 中において、「チャンネル」とは各化合物由来の蛍光シグナル測定時に用いたチャンネルである。各チャンネルの詳細を表 3 に示す。

【 0 2 9 1 】

【表 3】

チャンネル	励起波長(nm)	中心波長(nm)	波長幅(nm)
FITC	488	530	30
PE	488	585	42
PerCP-Qy5. 5	488	670～735*1	
PE-Qy7	488	780	60
APC	633	660	20
APC-Qy7	633	780	60
Pacific Blue	405	450	50
AmCyan	405	510	50

*1 蛍光波長測定領域

【 0 2 9 2 】

【表 4 - 1】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージ のピーク位置	M2マクロファージ のピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例1	(1)	FITC	85.8	12.4	1.150	A	M1
実施例2	(3)	PE	11.2	25.0	0.622	A	M2
実施例3	(4)	FITC	158	45.4	1.125	A	M1
実施例4	(6)	PE-Cy7	26.5	50.4	0.504	A	M2
実施例5	(7)	FITC	65.4	23.6	0.567	A	M1
実施例6	(9)	FITC	2.63	6.69	0.828	A	M2
実施例7	(11)	PE	30.5	16.2	0.544	A	M1
実施例8	(12)	PE	50.7	97.7	0.594	A	M2
実施例9	(13)	PE	7.74	20.4	0.714	A	M2
実施例10	(15)	PE	7.52	10.5	0.700	A	M2
実施例11	(17)	FITC	7.74	16.5	0.577	A	M2
実施例12	(19)	Pacific Blue	0.90	0.64	0.319	B	M1
実施例13	(20)	PE-Cy7	4.47	2.10	0.290	B	M1
実施例14	(21)	FITC	40.0	20.3	0.351	B	M1
実施例15	(22)	PE-Cy7	199	313	0.389	B	M2
実施例16	(23)	PE	1.10	1.48	0.185	B	M2
実施例17	(24)	PE	18.1	27.6	0.347	B	M2
実施例18	(25)	PE	27.4	18.2	0.346	B	M1
実施例19	(26)	PE	3.51	4.49	0.202	B	M2
実施例20	(28)	PE	9.54	15.8	0.431	B	M2

【 0 2 9 3 】

10

20

30

40

【表 4 - 2】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージ のピーク位置	M2マクロファージ のピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例21	(30)	PE-Cy7	55.1	73.9	0.257	B	M2
実施例22	(31)	PE-Cy7	65.1	89.0	0.248	B	M2
実施例23	(32)	PE-Cy7	88.7	155	0.476	B	M2
実施例24	(33)	AmCyan	5.00	9.05	0.522	A	M2
実施例25	(35)	Pacific Blue	1.15	1.29	0.192	B	M2
実施例26	(36)	Pacific Blue	5.70	3.82	0.344	B	M1
実施例27	(38)	FITC	3.74	1.63	0.724	A	M1
実施例28	(42)	FITC	4.19	1.79	0.616	A	M1
実施例29	(43)	PE	7.14	13.0	0.411	B	M2
実施例30	(44)	PE	24.5	12.9	0.330	B	M1
実施例31	(45)	FITC	18.2	4.84	0.822	A	M1
実施例32	(48)	FITC	65.4	9.74	0.621	A	M1
実施例33	(49)	PE	3.26	5.02	0.486	B	M2
実施例34	(50)	FITC	3.24	0.99	1.025	A	M1
実施例35	(51)	PE-Cy7	87.5	23.3	0.684	A	M1
実施例36	(52)	PE	3.90	1.68	0.756	A	M1
実施例37	(53)	PerCP-Cy5.5	128	180	0.650	A	M2
実施例38	(54)	PerCP-Cy5.5	154	211	0.531	A	M2
実施例39	(55)	PE	2.34	1.86	0.206	B	M1
実施例40	(56)	PE	4.90	6.36	0.207	B	M2

【 0 2 9 4 】

10

20

30

40

【表 4 - 3】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージ のピーク位置	M2マクロファージ のピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例41	(57)	PE-Cy7	420	359	0.167	B	M1
実施例42	(58)	PE	1.67	620	0.698	A	M2
実施例43	(59)	APC-Cy7	198	325	0.733	A	M2
実施例44	(60)	PE	455	765	0.621	A	M2
実施例45	(61)	PE	239	315	0.219	B	M2
実施例46	(62)	PerCP-Cy5.5	193	333	0.561	A	M2
実施例47	(65)	PE	296	467	0.236	B	M2
実施例48	(67)	PE	828	276	0.800	A	M2
実施例49	(74)	Pacific Blue	252	125	0.538	A	M1
実施例50	(75)	PE-Cy7	96.1	235	0.665	A	M2
実施例51	(76)	PerCP-Cy5.5	7.77	105	0.283	B	M2
実施例52	(82)	Pacific Blue	3.18	1.42	0.783	A	M1
実施例53	(83)	PE-Cy7	203	106	0.516	A	M1
実施例54	(85)	PE-Cy7	225	285	0.179	B	M2
比較例1	比較化合物(1)	PE-Cy7	1.70	1.86	0.006	C	識別できない
比較例2	比較化合物(2)	FITC	0.86	1.05	0.007	C	識別できない

【0295】

表4、図2～4から明らかなように、比較化合物(1)や(2)を用いて染色したM1マクロファージとM2マクロファージとは染色強度に差がなく、識別ができないが、本発明の一般式(1)で表わされる色素化合物を含有したマクロファージ識別剤を用いるとM1マクロファージとM2マクロファージは、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0296】

(実施例55)

実施例1と同様の方法で培養したM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(1)と化合物(33)をそれぞれ1 μ Mとなるように加えた。死細胞は、TO-PRO-3(Invitrogen社製)を用いて識別した。

【0297】

化合物(1)由来の蛍光シグナルを、FITCのチャンネル(励起波長: 488nm、

10

20

30

40

50

中心波長：530 nm、波長幅：30 nm)で、化合物(33)由来の蛍光シグナルを、AmCyan(励起波長：405 nm、中心波長：510 nm、波長幅：50 nm)で測定した。縦軸に化合物(1)由来のFITCのチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度を、横軸に化合物(33)由来のAmCyanのチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度をとって展開したサイトグラムを作成した。

【0298】

TO-PRO-3のシグナルが低い細胞集団を対象とすることで、死細胞を除去した細胞集団に対して解析を行った。

【0299】

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

10

【0300】

その結果、図5から明らかなように、化合物(1)を用いた場合、M2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色する。これに対して化合物(33)を用いた場合は、M1マクロファージに比べてM2マクロファージがより強く染色する特徴を持つことがわかる。そのため、化合物(1)および化合物(33)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージは、各化合物由来の蛍光シグナルの強度で展開したサイトグラム上で、異なる蛍光特性を持った細胞集団としてプロットされるため、容易に識別できることがわかった。

【0301】

本実施例から、本発明の一般式(1)で表されるマクロファージ識別剤の化合物を2種類以上組み合わせて用いた場合でも、サブタイプを識別できることが示された。

20

【0302】

[一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分取]

(実施例56)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージとM2マクロファージをそれぞれ 1×10^5 個ずつ1.5 mLチューブに混合し、化合物(1)を1 μ Mとなるように加えた。

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0303】

その結果、図6から明らかなように、化合物(1)で染色したM1マクロファージおよびM2マクロファージは、細胞の大きさを反映する前方散乱光の強度と化合物(1)由来の蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光強度分布を持った細胞集団としてプロットされた。

30

【0304】

化合物(1)は、M2マクロファージに比べてM1マクロファージをより強く染色される特徴を有するため、M1マクロファージは化合物(1)由来の蛍光強度が高い細胞集団として識別でき、一方のM2マクロファージは化合物(1)由来の蛍光強度が低い細胞集団として識別できることがわかった。

【0305】

また、化合物(1)で識別されたM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ、FACS装置を用いてソーティングして分取することができた。分取したサブタイプは蛍光抗体法および遺伝子発現解析により確認した。

40

【0306】

上記の実施例1～56により、本発明の一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、および分取が可能である。

【0307】

[一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分析およびスクリーニング]

(実施例57)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそ

50

れぞれ 2×10^5 個ずつ 1.5 mL チューブに分注し、そこに化合物 (1) を $1 \mu\text{M}$ となるように加えた。

また、細胞に取り込まれた化合物 (1) の吐き出しを阻害する物質としてフミトレモルギン C (Sigma-Aldrich 社製、以下 FTC) を $10 \mu\text{M}$ となるように加え、 37°C で 30 分インキュベーションした。その後、チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、 $10 \mu\text{M}$ となるように FTC を加えた HBSS バッファーを 1 mL 加えて細胞を懸濁し、さらに 37°C で 30 分インキュベーションした。

【0308】

さらに、各チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、死細胞を識別するための色素 aqua を添加して細胞を懸濁し、 4°C で 10 分インキュベーションした。その後、チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、FACS バッファーに細胞を懸濁し、BD 社製 FACS Canto (商標) II フローサイトメトリー装置にて解析を行った。

解析は、aqua のシグナルが低い細胞集団を対象とすることで、死細胞を除去した細胞集団に対して行った。

【0309】

(比較例 3)

実施例 57 において、FTC を加えずに、実施例 57 と同様の操作を行い、解析を行った。

その結果、図 7 から明らかなように、横軸に化合物 (1) 由来の蛍光シグナルを測定した FITC のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムをプロットすると細胞からの化合物 (1) の排出の FTC による阻害に基づく蛍光強度の増強が、M2 マクロファージだけで観察され、FTC による排出の阻害の影響がサブタイプの種類によって異なることがわかった。

【0310】

(実施例 58)

実施例 1 と同様の方法で培養した、M1 マクロファージおよび M2 マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ 1.5 mL チューブに分注し、そこに化合物 (1) を $1 \mu\text{M}$ となるように加え、 37°C で 30 分インキュベーションした。その後、チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、 $2.4 \text{ G}2$ (抗マウス CD16/32 抗体、Biolegend 社製) で細胞表面のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理を行った細胞に、 $0.2 \mu\text{g}$ の Pacific Blue 標識 - 抗 CD40 抗体および $0.1 \mu\text{g}$ の Alexa Fluor 647 標識 - 抗 Dectin-1 抗体を含む FACS バッファーを添加して、蛍光免疫染色を行った。各抗体による蛍光標識は、それぞれの蛍光波長がお互いに重ならないように、また化合物 (1) の蛍光波長、および aqua の蛍光波長に重ならないように選択した。

【0311】

その後、各チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、死細胞を識別するための色素 aqua を添加して細胞を懸濁し、 4°C で 10 分インキュベーションした。その後、チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、FACS バッファーに細胞を懸濁し、BD 社製 FACS Canto (商標) II フローサイトメトリー装置にて解析を行った。

解析は、aqua のシグナルが低い細胞集団を対象とすることで、死細胞を除去した細胞集団に対して行った。

【0312】

その結果、化合物 (1) によって強く染色されることで識別された M1 マクロファージでは Pacific Blue 標識 - 抗 CD40 抗体由来の蛍光シグナルが、Pacific Blue のチャンネル (405 nm で励起、 $450/50 \text{ nm}$; 中心波長/波長幅) において観測された。これに対し、化合物 (1) によって弱く染色されることで識別された M2 マクロファージでは Alexa Fluor 647 標識 - 抗 Dectin-1 抗

体由来の蛍光シグナルが、APCのチャンネル(633nmで励起、660/20nm; 中心波長/波長幅)において観測された。これらの結果から、抗CD40抗体はM1マクロファージに、抗Decctin-1抗体はM2マクロファージに特異的に結合する抗体であることが分かった。

【0313】

[一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたマウス細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0314】

(実施例59)

マウスの骨髄細胞から分化誘導したマクロファージサブタイプを、マウス単球性白血病から樹立された細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプに変更し、実施例1と同様の方法で、化合物(1)を用いたサブタイプの識別を行った。

<サブタイプの培養>

サブタイプの培養は、非特許文献9を参考にして行った。即ち、American Type Culture Collectionより購入したマウス単球性白血病から樹立された細胞株であるRAW264.7を数回の継代培養を行った後に、 3.3×10^4 個/mLになるように、10%FBS、1%P/S、および1%MEM-NEAAを含むD-MEM中に分散させた後、100mmディッシュに 3.3×10^5 個ずつ播種した。5%CO₂存在下で37℃でインキュベーションすることで細胞を増殖させた。2~4日後にディッシュ底面の~70%程度を細胞が覆った状態になったことを確認し、培地を交換した後、200ngのインターフェロン- γ および1 μ gのポリリボサッカライド(いずれもペプロテック社製)を加えることで、サブタイプをM1に分化誘導させた。また、100ngのIL-4を加えることで、サブタイプをM2に分化誘導させた。5%CO₂存在下で37℃で24時間インキュベーションした後、PBSでリンス後、0.25%のトリプシンと1mM EDTAを含むPBSを用いて、M1およびM2にそれぞれ分化誘導されたマクロファージをシャーレから回収した。

【0315】

<サブタイプの確認>

回収したM1マクロファージおよびM2マクロファージは実施例1と同様の方法で遺伝子発現解析を行うことで、各サブタイプに分化誘導されていることを確認した。結果を図8に示す。図8から明らかなように、M1マクロファージに分化誘導した細胞では、M2マクロファージに分化誘導した細胞に比べてiNOSおよびTNFの発現量が高かった。一方、M2マクロファージに分化誘導した細胞では、M1マクロファージに分化誘導した細胞に比べてArg1およびCD206の発現量が高かった。この結果から、分化誘導によりM1マクロファージおよびM2マクロファージを調整できたことを確認した。

【0316】

RAW264.7から分化誘導したM1マクロファージおよびM2マクロファージを、実施例1と同様の方法で化合物(1)で染色した後、死細胞をTO-PRO-3を用いて識別した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(1)由来の蛍光シグナルを解析した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図9に示した。

【0317】

その結果、図9から明らかなように、化合物(1)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0318】

[一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたヒト細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0319】

(実施例60~64)

10

20

30

40

50

マウスの骨髄細胞から分化誘導したマクロファージサブタイプを、ヒト急性単球性白血病から樹立された細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプに変更し、実施例 1 と同様の方法で、化合物 (1) を用いたサブタイプの識別を行った。

< サブタイプの培養 >

サブタイプの培養は、非特許文献 10 を参考にして行った。即ち、独立行政法人医薬基盤研究所 J C R B 細胞バンクより購入したヒト急性単球性白血病から樹立された細胞株である T H P - 1 を数回の継代培養を行った後に、 5.0×10^5 個 / mL になるように、10 % F B S および 1 % P / S を含む R P M I 1 6 4 0 中に分散させた後、100 mm ディッシュに 5.0×10^6 個ずつ播種した。500 ng の P M A を添加し、5 % C O ₂ 存在下で 37 °C で 2 日間インキュベーションすることで単球をマクロファージに分化させた。培地を交換した後、200 ng のインターフェロン - γ および 1 μ g のポリリポサッカライド (いずれもペプロテック社製) を加えることで、サブタイプを M 1 に分化誘導させた。また、200 ng の I L - 4 および I L - 13 を加えることで、サブタイプを M 2 に分化誘導させた。5 % C O ₂ 存在下で 37 °C で 24 時間インキュベーションした後、P B S でリンス後、0.25 % のトリプシンと 1 mM E D T A (エチレンジアミン四酢酸) を含む P B S を用いて、M 1 および M 2 にそれぞれ分化誘導されたマクロファージをシャーレから回収した。

【 0 3 2 0 】

回収した M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージは、表 5 に示すプライマーを用いて、実施例 1 と同様の方法で遺伝子発現解析を行うことで、各サブタイプに分化誘導されていることを確認した。結果を図 10 に示す。図 10 から明らかなように、M 1 マクロファージに分化誘導した細胞では、M 2 マクロファージに分化誘導した細胞に比べて T N F α および I L - 6 の発現量が高かった。一方、M 2 マクロファージに分化誘導した細胞では、M 1 マクロファージに分化誘導した細胞に比べて C D 206 の発現量が高かった。この結果から、分化誘導により M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージを調整できたことを確認した。

【 0 3 2 1 】

【表 5】

ターゲット遺伝子	プライマーの配列		備考
	Forward	Reverse	
GAPDH	CAACAGCGACACCCACTCCT	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA	内在性コントロール遺伝子
TNF α	TGCACCTTTGGAGTGATCGGC	CTCAGCTTGAGGGTTTGCTAC	M1マクロファージマーカー
IL-6	AGCCACTCACCTCTTCAGAAC	GCCTCTTTGCTGCTTTCACAC	M1マクロファージマーカー
CD206	CCCTCAGAAAGTGATGTGCCTA	TACTTGTGAGGTCACCGCCT	M2マクロファージマーカー

【 0 3 2 2 】

T H P - 1 から分化誘導した M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージを、実施例 1 と同様の方法で化合物 (1)、(3)、(4)、(12)、(15) で染色した後、死細胞を T O - P R O - 3 を用いて識別し、実施例 1 と同様の方法で化合物 (1)、(3)、(4)、(12)、(15) 由来の蛍光シグナルを、各化合物に適したチャンネルで測定し、分離度 R を指標としてサブタイプの識別能を評価した。

【 0 3 2 3 】

(比較例 4)

T H P - 1 から分化誘導した M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージを、実施例 1 と同様の方法で比較化合物 (1) で染色した後、死細胞を T O - P R O - 3 を用いて識別し、実施例 (1) と同様の方法で比較化合物 (1) 由来の蛍光シグナルを解析した。ただし、比較化合物 (1) 由来の蛍光シグナルは、P E - C y 7 のチャンネル (488 nm で励起、780 / 60 nm ; 中心波長 / 波長幅) で測定した。分離度 R を指標としてサブタイプの識別能を評価した。

【 0 3 2 4 】

(比較例 5)

T H P - 1 から分化誘導した M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージを、実施例 1 と同様の方法で比較化合物 (2) で染色した後、死細胞を T O - P R O - 3 を用いて識別し、実施例 (1) と同様の方法で比較化合物 (2) 由来の蛍光シグナルを解析した。分離度 R を指標としてサブタイプの識別能を評価した。

【 0 3 2 5 】

以上の実施例 6 0 ~ 6 4、比較例 4 ~ 5 の結果を表 6 に示す。各チャンネルの詳細は表 3 に示す。

【 0 3 2 6 】

【表 6】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージ のピーク位置	M2マクロファージ のピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例60	(1)	FITC	58.1	33.4	0.409	B	M1
実施例61	(3)	PE	9.63	12.3	0.257	B	M2
実施例62	(4)	FITC	26.5	17.9	0.372	B	M1
実施例63	(12)	PE	37.4	46.5	0.276	B	M2
実施例64	(15)	PE	5.62	7.4	0.216	B	M2
比較例4	比較化合物(1)	PE-Cy7	0.24	0.21	0.021	C	識別できない
比較例5	比較化合物(2)	FITC	0.25	0.21	0.061	C	識別できない

【 0 3 2 7 】

表 6 から明らかなように、比較化合物 (1) や (2) を用いて染色した、T H P - 1 から分化誘導した M 1 マクロファージと M 2 マクロファージとは染色強度に差がなく、識別できないが、本発明の一般式 (1) で表わされる色素化合物を含有したマクロファージ識別剤を用いると M 1 マクロファージと M 2 マクロファージは、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【 0 3 2 8 】

実施例 5 7 および 5 8 から、本発明の一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプと物質の相関の分析が可能である。

【 0 3 2 9 】

上記の実施例 1 ~ 5 8 および比較例 1 ~ 2 により、本発明の一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、分取、評価、および分析が可能である。

【 0 3 3 0 】

また、実施例 5 7 および 5 8 と同様の操作を複数の物質に対して行うことにより、本発明の一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプと物質との相関についてのスクリーニングを行うことが可能である。

【 0 3 3 1 】

また、実施例 5 9 から、本発明の一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髄細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、マウス細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

本結果は、細胞種が異なる場合でも、本発明の一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートしている。

【 0 3 3 2 】

また、実施例 60～64 および比較例 4～5 により、本発明の一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髓細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、ヒト細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

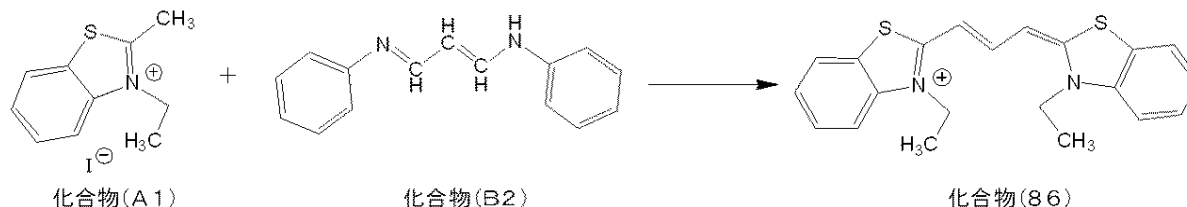
本結果は、更に、ヒト由来の細胞を用いた場合においても、本発明の一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートするものであり、ヒト組織のような病理組織、あるいはヒト個体でも適用可能であることを示唆していると考えている。

【0333】

<合成例 2>

本発明の一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(86)の合成例を示す。

【化33】



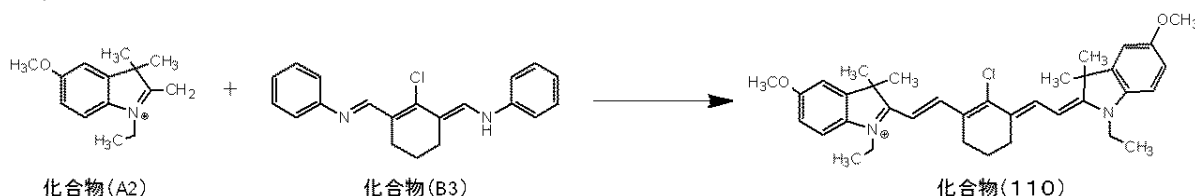
窒素雰囲気下、化合物(A1) 0.61 g (2.0 mmol) の無水酢酸 10 mL の溶液に化合物(B2) 0.22 g (1.0 mmol)、無水酢酸ナトリウム 0.16 g (2.0 mmol) を添加して、100℃で1時間撹拌した。反応終了後、冷却させながら、ゆっくり飽和食塩水 100 mL を滴下して室温まで冷却した。さらに、ジクロロメタン 50 mL で2回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、有機層を減圧下で濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジエチルエーテルから再結晶して、化合物(86) 0.29 g (収率 59%) を得た。目的の化合物である事は、¹H 核磁気共鳴分光分析(ECA-400、日本電子(株)製)、LC/TOF MS(LC/MSD TOF、Agilent Technologies 社製)によって確認した。

【0334】

<合成例 3>

本発明の一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(110)の合成例を示す。

【化34】



窒素雰囲気下、化合物(A2) 0.48 g (2.2 mmol) の無水酢酸 10 mL の溶液に化合物(B3) 0.32 g (1.0 mmol)、無水酢酸ナトリウム 0.25 g (3.0 mmol) を添加して、100℃で1時間撹拌した。反応終了後、冷却しながら、ゆっくり飽和食塩水 100 mL を滴下して室温まで冷却した。さらに、ジクロロメタン 50 mL で2回抽出した。無水硫酸ナトリウムで乾燥した後、有機層を減圧下で濃縮した。残さをシリカゲルクロマトグラフィーで精製し、ジエチルエーテルから再結晶して、化合物(110) 0.38 g (収率 54%) を得た。目的の化合物(110)である事は、¹H 核磁気共鳴分光分析(ECA-400、日本電子(株)製)、LC/TOF MS(LC/MSD TOF、Agilent Technologies 社製)によって確認した。

【0335】

<一般式(6)で表わされるその他の化合物>

合成例 2 および 3 と同様にして、表 7 で表わす化合物をそれぞれ合成し、目的物である

10

20

30

40

50

ことを同定した。

【0336】

[一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの識別]

(実施例65)

実施例1で使用した化合物(1)を化合物(86)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(86)由来の蛍光シグナルを解析した。ただし、化合物(86)のシグナルは、APC-Cy7のチャンネル(633nmで励起し、780/60nm;中心波長/波長幅の蛍光波長測定領域)で測定した。横軸にAPC-Cy7のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図11に示した。

10

【0337】

(実施例66~76)

実施例1で使用した化合物(1)を化合物(88)、(90)、(91)、(92)、(95)、(98)、(99)、(100)、(103)、(104)、(113)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で、化合物化合物(88)、(90)、(91)、(92)、(95)、(98)、(99)、(100)、(103)、(104)、(113)由来の蛍光シグナルを解析した。

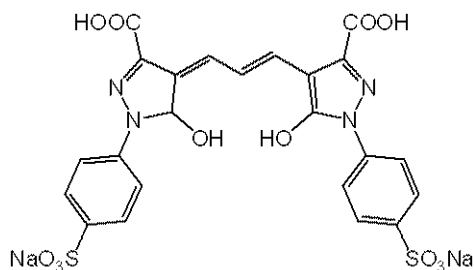
【0338】

(比較例6)

実施例1で使用した化合物(1)を比較化合物(3)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で、比較化合物(3)由来の蛍光シグナルを解析した。ただし、比較化合物(3)由来の蛍光シグナルは、FITCのチャンネル(488nmで励起し、530/30nm;中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図12に示した。

20

【化35】



比較化合物(3)

30

【0339】

以上の実施例65~76、比較例1および6の結果を表7に示す。

【0340】

<一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法>

一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法で使用した化合物(3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(11)~(13)、(15)、(17)、(19)~(26)、(28)、(30)~(33)、(35)、(36)、(38)、(42)~(45)、(48)~(62)、(65)、(67)、(74)~(76)、(82)、(83)、(85)および比較化合物(1)~(2)を化合物(88)、(90)、(91)、(92)、(95)、(98)、(99)、(100)、(103)、(104)、(113)および比較化合物(3)に変更した以外は、一般式(1)で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法と同様の方法で、化合物(88)、(90)、(91)、(92)、(95)、(98)、(99)、(100)、(103)、(104)、(113)および比較化合物(3)由来の蛍光シグナルを、各化合物に適したチャンネルで測定し、分離度Rを指標としてサブタイプの識別能を評価した。

40

【0341】

評価結果を表7に示す。表7中における、各チャンネルの詳細は表3に示す。

50

【 0 3 4 2 】

【表 7】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージ のピーク位置	M2マクロファージの ピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例65	(86)	APC-Cy7	2.27	6.37	0.602	A	M2
実施例66	(88)	APC-Cy7	0.95	1.48	0.241	B	M2
実施例67	(90)	APC-Cy7	0.86	1.31	0.321	B	M2
実施例68	(91)	APC-Cy7	2.96	13.89	0.476	B	M2
実施例69	(92)	PE-Cy7	2.27	3.9	0.534	A	M2
実施例70	(95)	PE	71.57	133.45	0.421	B	M2
実施例71	(96)	FITC	21.95	61.58	0.507	A	M2
実施例72	(99)	PE	191.14	331.51	0.673	A	M2
実施例73	(100)	PE	16.41	32.87	0.372	B	M2
実施例74	(103)	PE-Cy7	2.97	8.23	0.597	A	M2
実施例75	(104)	PE-Cy7	95.26	197.19	0.698	A	M2
実施例76	(113)	APC-Cy7	9.05	21.39	0.857	A	M2
比較例1	比較化合物(1)	PE-Cy7	1.70	1.86	0.006	C	選択性なし
比較例6	比較化合物(3)	FITC	0.86	0.97	0.079	C	選択性なし

【 0 3 4 3 】

表 7、図 1、および図 1 1 ~ 1 2 から明らかなように、比較化合物 (1) や (3) を用いて染色した M 1 マクロファージと M 2 マクロファージとは染色強度に差がなく、識別ができないが、本発明の一般式 (6) で表わされる色素化合物を含有したマクロファージ識別剤を用いると M 1 マクロファージと M 2 マクロファージは、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【 0 3 4 4 】

(実施例 7 7)

実施例 1 と同様の方法で培養した M 1 マクロファージおよび M 2 マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ 1 . 5 m L チューブに分注し、そこに化合物 (1 0 3) と化合物 (1 1 3) をそれぞれ 1 μ M となるように加えた。

【 0 3 4 5 】

化合物 (1 0 3) 由来の蛍光シグナルを、P E - C y 7 のチャンネル (4 8 8 n m で励起し、7 8 0 / 6 0 n m ; 中心波長 / 波長幅) で、化合物 (1 1 3) 由来の蛍光シグナルを、A P C - C y 7 (6 3 3 n m で励起し、7 8 0 / 6 0 n m ; 中心波長 / 波長幅) で測定した。縦軸に化合物 (1 0 3) 由来の P E - C y 7 のチャンネルで得られた蛍光シグナ

ルの強度を、横軸に化合物(113)由来のAPC-Cy7のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度をとって展開したサイトグラムを作成した。

【0346】

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0347】

その結果、化合物(103)で染色した場合にM1マクロファージに比べてM2マクロファージはPE-Cy7のチャンネルでの蛍光強度が高く、これに対して化合物(113)で染色した場合にはM1マクロファージに比べてM2マクロファージはAPC-Cy7のチャンネルでの蛍光強度が高いという特徴を持つため、化合物(103)および化合物(113)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージとは、PE-Cy7のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度とAPC-Cy7のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光特性を持った細胞集団としてプロットされ、識別できることがわかった。

10

【0348】

本実施例から、本発明の一般式(6)で表されるマクロファージ識別剤の化合物を2種類以上組み合わせて用いた場合でも、サブタイプを識別できることが示された。

【0349】

上記の実施例65~77および比較例1および6により、一般式(6)で表わされる本発明のマクロファージ識別剤を1種類以上用いることで、生物試料中におけるサブタイプの識別が可能であることが示された。

20

【0350】

[一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分取]

(実施例78)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージとM2マクロファージとをそれぞれ 1×10^5 個ずつ1.5mLチューブに混合し、そこに化合物(86)を1 μ Mとなるように加えた。

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0351】

その結果、図13に示すように化合物(86)で染色したM1マクロファージおよびM2マクロファージは、細胞の大きさを反映する前方散乱光の強度と化合物(86)由来の蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光強度分布を持った細胞集団としてプロットされた。M1マクロファージに比べてM2マクロファージをより強く染色する化合物(86)を用いて染色したため、M2マクロファージは化合物(86)由来の蛍光強度が高い細胞集団として、一方のM1マクロファージは化合物(86)由来の蛍光強度が低い細胞集団として識別できることがわかった。また、化合物(86)で識別されたM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ、FACS装置を用いてソーティングして分取することができた。分取したサブタイプは蛍光抗体法および遺伝子発現解析により確認した。

30

【0352】

上記の実施例65~78により、本発明の一般式(6)で表されるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、および分取が可能であることが示された。

40

【0353】

[一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分析およびスクリーニング]

(実施例79)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(113)を1 μ Mとなるように、また細胞に取り込まれた化合物(113)の吐き出しを阻害する物質としてMK-571(Sigma-Aldrich社製)を10 μ Mとなるように加え、37で30分インキュベーションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清

50

を除いた後、 $10\ \mu\text{M}$ となるようにMK-571を加えたHBSSバッファを $1\ \text{mL}$ 加えて細胞を懸濁し、さらに37℃で30分インキュベーションした。

上記以外の操作は実施例57と同様の方法で行った。

【0354】

(比較例7)

実施例79において、MK-571を加えずに、実施例79と同様の操作を行い、解析を行った。

その結果、図14から明らかなように、横軸に化合物(113)由来の蛍光シグナルを測定したFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムにおいて、細胞からの化合物(113)の排出のMK-571による阻害に基づく蛍光強度の増強が、M1マクロファージおよびM2マクロファージの両方で観察された。MK-571添加によるピーク強度の増強度合いを、MK-571添加した場合と添加しない場合で得られたヒストグラムのピーク強度を用いて、前記分離度Rを算出して評価したところ、M1マクロファージでは0.406、M2マクロファージでは0.438という値が得られ、MK-571による排出の阻害の影響がサブタイプの種類によってわずかに異なることがわかった。

【0355】

(実施例80)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ $1.5\ \text{mL}$ チューブに分注し、そこに化合物(86)を $1\ \mu\text{M}$ となるように加え、37℃で30分インキュベーションした。その後、チューブを $180\ \text{G}$ で10分遠心して上清を除いた後、2.4G2(抗マウスCD16/32抗体、Biolegend社製)で細胞表面のブロック処理を行った。ブロック処理を行った細胞に、Alexa Fluor 647標識-抗CD40抗体およびPE標識-抗Dectin-1抗体をそれぞれ $0.2\ \mu\text{g}$ ずつ含むFACSバッファを添加して、蛍光免疫染色を行った。各抗体による蛍光標識は、それぞれの蛍光波長がお互いに重ならないように、また化合物(86)の蛍光波長、およびaquaの蛍光波長に重ならないように選択した。

上記以外の操作は実施例58と同様の方法で行った。

【0356】

その結果、化合物(86)によって強く染色されることで識別されたM2マクロファージではPE標識-抗Dectin-1抗体由来の蛍光シグナルが、PEのチャンネル($488\ \text{nm}$ で励起し、 $585/42\ \text{nm}$; 中心波長/波長幅)において観測された。これに対し、化合物(86)によって弱く染色されることで識別されたM1マクロファージではAlexa Fluor 647標識-抗CD40抗体由来の蛍光シグナルが、APCのチャンネル($633\ \text{nm}$ で励起し、 $660/20\ \text{nm}$; 中心波長/波長幅)において観測された。これらの結果から、抗Dectin-1抗体はM2マクロファージに、抗CD40抗体はM1マクロファージに特異的に結合する抗体であることが分かった。

【0357】

実施例79および80から、本発明の一般式(6)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプと物質の相関の分析が可能である。

【0358】

上記の実施例65~80および比較例1および6により、本発明のマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、分取、評価、および分析が可能である。

【0359】

また、実施例79および80と同様の操作を複数の物質に対して行うことにより、本発明のマクロファージ識別剤を用いたサブタイプと物質との相関についてのスクリーニングを行うことが可能である。

【0360】

<合成例4>

10

20

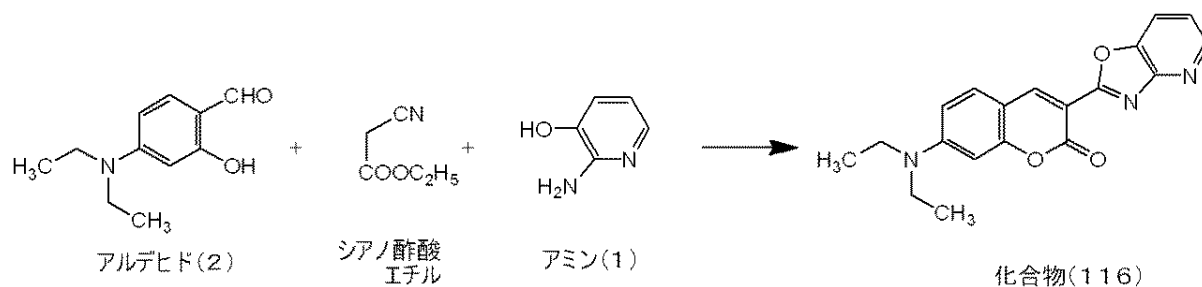
30

40

50

本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(116)の合成例を示す。

【化36】



10

アミン(1) 5.5 g (50 mmol) の *n*-ブチルアルコール 200 mL の溶液に、アルデヒド(2) 12.1 g (62.5 mmol)、シアノ酢酸エチル 6.7 mL (62.5 mmol)、安息香酸 1.4 g (12.5 mmol) を加え、150 で 11 時間加熱還流させた。反応終了後、室温に冷却し、減圧下、溶媒を留去した。残さにイソプロピルアルコール 100 mL、1 mol/L の水酸化ナトリウム水溶液 15 mL を加え撹拌した。得られた固体をろ過し、イソプロピルアルコール 100 mL、DMSO 66 mL で洗浄し目的の化合物(116)を 7.8 g (23 mmol、収率 47%) 得た。

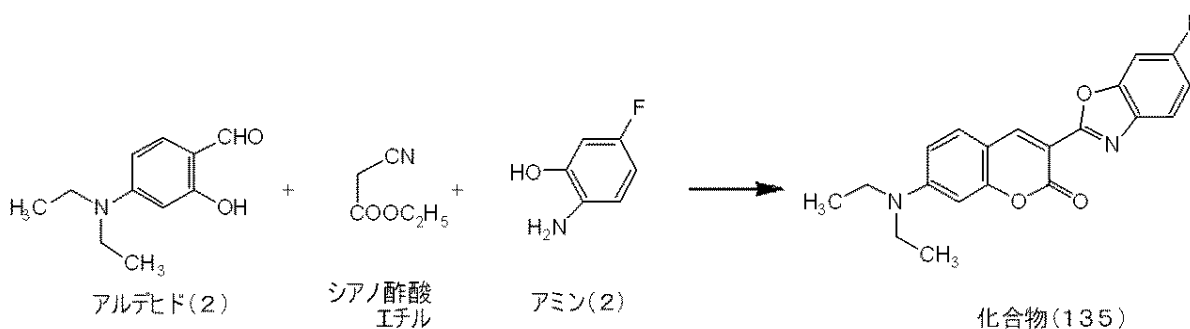
【0361】

< 合成例 5 >

20

本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(135)の合成例を示す。

【化37】



30

合成例 5 において、アミン(1)を用いる代わりにアミン(2)に変更した以外は、合成例 4 と同様の操作を行い、目的の化合物(135)を 8.46 g (24 mmol、収率 48%) 得た。

【0362】

[一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの識別]

(実施例 81)

実施例 1 で使用した化合物(1)を化合物(116)に変更し、死細胞を TO-PRO-3 を用いて識別した以外は、実施例 1 と同様の方法で化合物(116)由来の蛍光シグナルを解析した。横軸に FITC のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図 15 に示した。

40

【0363】

(実施例 82 ~ 90)

実施例 1 で使用した化合物(1)を化合物(117)、(119)、(120)、(122)、(127)、(129)、(131)、(132)、(138)に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法で、化合物(117)、(119)、(120)、(122)、(127)、(129)、(131)、(132)、(138)由来の蛍光シグナルを解析した。

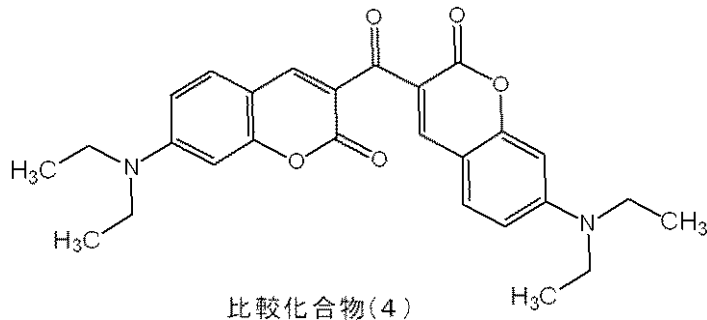
50

【 0 3 6 4 】

(比較例 8)

実施例 1 で使用した化合物 (1) を比較化合物 (4) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法で、比較化合物 (4) 由来の蛍光シグナルを解析した。横軸に P a c i f i c B l u e のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図 1 6 に示した。

【 化 3 8 】



10

【 0 3 6 5 】

以上の実施例 8 1 ~ 9 0、比較例 1 および 8 の結果を表 8 に示す。

【 0 3 6 6 】

< 一般式 (1 0) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法 >

20

一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法で使用した化合物 (3)、(4)、(6)、(7)、(9)、(1 1) ~ (1 3)、(1 5)、(1 7)、(1 9) ~ (2 6)、(2 8)、(3 0) ~ (3 3)、(3 5)、(3 6)、(3 8)、(4 2) ~ (4 5)、(4 8) ~ (6 2)、(6 5)、(6 7)、(7 4) ~ (7 6)、(8 2)、(8 3)、(8 5) および比較化合物 (1) ~ (2) を化合物 (1 1 7)、(1 1 9)、(1 2 0)、(1 2 2)、(1 2 7)、(1 2 9)、(1 3 1)、(1 3 2)、(1 3 8) および比較化合物 (4) に変更した以外は、一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法と同様の方法で、化合物 (1 1 7)、(1 1 9)、(1 2 0)、(1 2 2)、(1 2 7)、(1 2 9)、(1 3 1)、(1 3 2)、(1 3 8) および比較化合物 (4) 由来の蛍光シグナルを、各化合物に適したチャンネルで測定し、分離度 R を指標としてサブタイプの識別能を評価した。

30

評価結果を表 8 に示す。表 8 中における、各チャンネルの詳細は表 3 に示す。

【 0 3 6 7 】

【表 8】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージの ピーク位置	M2マクロファージの ピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別 評価	選択性
実施例81	(116)	FITC	4.91	12.1	0.772	A	M2
実施例82	(117)	FITC	7.35	9.73	0.318	B	M2
実施例83	(119)	AmCyan	2.60	3.94	0.273	B	M2
実施例84	(120)	Pacific Blue	10.1	5.60	0.676	A	M1
実施例85	(122)	FITC	142	211	0.377	B	M2
実施例86	(127)	FITC	3.99	6.00	0.381	B	M2
実施例87	(129)	Pacific Blue	31.0	13.0	0.709	A	M1
実施例88	(131)	FITC	8.06	13.5	0.480	B	M2
実施例89	(132)	FITC	30.3	53.8	0.624	A	M2
実施例90	(138)	AmCyan	20.6	28.0	0.312	B	M2
比較例1	比較化合物(1)	PE-Cy7	1.70	1.86	0.006	C	選択性なし
比較例8	比較化合物(4)	Pacific Blue	0.88	1.05	0.053	C	選択性なし

【0368】

表 8、図 1 および図 15 ~ 16 から明らかなように、比較化合物 (1) や (4) を用いて染色した M1 マクロファージと M2 マクロファージとは染色強度に差がなく、識別ができないが、本発明の一般式 (10) で表わされる色素化合物を含有したマクロファージ識別剤を用いると M1 マクロファージと M2 マクロファージは、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0369】

(実施例 91)

実施例 1 と同様の方法で培養した M1 マクロファージおよび M2 マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ 1.5 mL チューブに分注し、そこに化合物 (116) と化合物 (120) をそれぞれ 1 μ M となるように加えた。

【0370】

化合物 (116) 由来の蛍光シグナルを、F I T C のチャンネル (488 nm で励起、530 / 30 nm ; 中心波長 / 波長幅) で、化合物 (120) 由来の蛍光シグナルを、P a c i f i c B l u e (405 nm で励起、450 / 50 nm ; 中心波長 / 波長幅) で測定した。縦軸に化合物 (1) 由来の F I T C のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度を、横軸に化合物 (5) 由来の P a c i f i c B l u e のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度をとって展開したサイトグラムを作成した。

上記以外の操作は実施例 1 と同様の方法で行った。

【0371】

その結果、図 17 から明らかなように、化合物 (116) は M1 マクロファージに比べて M2 マクロファージをより強く染色し、これに対して化合物 (120) は M2 マクロフ

ァージに比べてM 1 マクロファージをより強く染色する特徴を持つため、化合物(1 1 6) および化合物(1 2 0) で染色したM 1 マクロファージとM 2 マクロファージとは、化合物(1 1 6) 由来の蛍光シグナルの強度と化合物(1 2 0) 由来の蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光特性を持った細胞集団としてプロットされ、識別できることがわかった。

【 0 3 7 2 】

本実施例から、本発明の一般式(1 0) で表されるマクロファージ識別剤の化合物を2種類以上組み合わせ用いた場合でも、サブタイプを識別できることが示された。

【 0 3 7 3 】

上記の実施例 8 1 ~ 9 1 および比較例 1 および 8 により、一般式(1 0) で表わされる本発明のマクロファージ識別剤を1種類以上用いることで、生物試料中におけるサブタイプの識別が可能であることが示された。

【 0 3 7 4 】

[一般式(1 0) で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分取]
(実施例 9 2)

実施例 1 と同様の方法で培養した、M 1 マクロファージとM 2 マクロファージとをそれぞれ 1×10^5 個ずつ 1 . 5 mL チューブに混合し、そこに化合物(1 2 0) を 1 μ M とするように加えた。

上記以外の操作は実施例 1 と同様の方法で行った。

【 0 3 7 5 】

その結果、図 1 8 から明らかなように、化合物(1 2 0) で染色したM 1 マクロファージおよびM 2 マクロファージは、細胞の大きさを反映する前方散乱光の強度と化合物(1 2 0) 由来の蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光強度分布を持った細胞集団としてプロットされた。M 2 マクロファージに比べてM 1 マクロファージをより強く染色する化合物(1 2 0) を用いて染色したため、M 1 マクロファージは化合物(1 2 0) 由来の蛍光強度が高い細胞集団として、一方のM 2 マクロファージは化合物(1 2 0) 由来の蛍光強度が低い細胞集団として識別できることがわかった。また、化合物(1 2 0) で識別されたM 1 マクロファージおよびM 2 マクロファージをそれぞれ、FACS 装置を用いてソーティングして分取することができた。分取したサブタイプは蛍光抗体法および遺伝子発現解析により確認した。

【 0 3 7 6 】

上記の実施例 8 1 ~ 9 2 により、本発明の一般式(1 0) で表されるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、および分取が可能である。

【 0 3 7 7 】

[マクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分析およびスクリーニング]
(実施例 9 3)

実施例 1 と同様の方法で培養した、M 1 マクロファージおよびM 2 マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ 1 . 5 mL チューブに分注し、そこに化合物(1 2 0) を 1 μ M とするよう、また細胞に取り込まれた化合物(1 2 0) の吐き出しを阻害する物質としてMK - 5 7 1 (Sigma - Aldrich 社製、) を 10 μ M とするように加え、37 で 30 分インキュベーションした。その後、チューブを 180 G で 10 分遠心して上清を除いた後、10 μ M とするようMK - 5 7 1 を加えたHBSS バッファを 1 mL 加えて細胞を懸濁し、さらに 37 で 30 分インキュベーションした。

上記以外の操作は実施例 5 8 と同様の方法で行った。

【 0 3 7 8 】

(比較例 9)

実施例 9 3 において、MK - 5 7 1 を加えずに、実施例 9 3 と同様の操作を行い、解析を行った。

その結果、図 1 9 から明らかなように、横軸に化合物(1 2 0) 由来の蛍光シグナルを測定したFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数

10

20

30

40

50

をとったヒストグラムにおいて、細胞からの化合物(120)の排出のMK-571による阻害に基づく蛍光強度の増強が、M1マクロファージおよびM2マクロファージの両方で観察された。MK-571添加によるピーク強度の増強度合いを、MK-571添加した場合と添加しない場合で得られたヒストグラムのピーク強度を用いて、前記分離度Rを算出して評価したところ、M1マクロファージでは0.739、M2マクロファージでは0.730というほぼ等しい値が得られ、MK-571による排出の阻害の影響がサブタイプの種類によらないことがわかった。

【0379】

(実施例94)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(116)を $1 \mu\text{M}$ となるように加え、37℃で30分インキュベーションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清を除いた後、2.4G2(抗マウスCD16/32抗体、Biolegend社製)で細胞表面のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理を行った細胞に、 $0.2 \mu\text{g}$ のPacif Blue標識-抗CD40抗体および $0.05 \mu\text{g}$ のPerCP標識-抗Dectin-1抗体を含むFACSバッファーを添加して、蛍光免疫染色を行った。各抗体による蛍光標識は、それぞれの蛍光波長がお互いに重ならないように、また化合物(116)の蛍光波長、およびTO-PRO-3の蛍光波長に重ならないように選択した。

上記以外の操作は実施例58と同様の方法で行った。

【0380】

その結果、化合物(116)によって強く染色されることで識別されたM1マクロファージではPacif Blue標識-抗CD40抗体由来の蛍光シグナルが、Pacif Blueのチャンネル(405nmで励起、450/50nm; 中心波長/波長幅)において観測された。これに対し、化合物(116)によって弱く染色されることで識別されたM2マクロファージではPerCP標識-抗Dectin-1抗体由来の蛍光シグナルが、PerCPのチャンネル(488nmで励起、670~735nmの蛍光波長測定領域)において観測された。これらの結果から、抗CD40抗体はM1マクロファージに、抗Dectin-1抗体はM2マクロファージに特異的に結合する抗体であることが分かった。

【0381】

[一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたマウス細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0382】

(実施例95)

実施例59で使用した化合物(1)を化合物(129)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(129)由来の蛍光シグナルをPacif blueのチャンネル(405nmで励起、450/50nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図20に示した。

【0383】

その結果、図20から明らかなように、化合物(129)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0384】

[一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたヒト細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0385】

(実施例96)

実施例60で使用した化合物(1)を化合物(120)に変更した以外は、実施例1と

同様の方法で化合物(120)由来の蛍光シグナルをPacific blueのチャンネル(405nmで励起、450/50nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図21に示した。

【0386】

その結果、図21から明らかなように、化合物(120)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0387】

(実施例97)

実施例60で使用した化合物(1)を化合物(129)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(129)由来の蛍光シグナルをPacific blueのチャンネル(405nmで励起、450/50nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図22に示した。

【0388】

その結果、図22から明らかなように、化合物(129)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0389】

実施例93および94から、本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプと物質の相関の分析が可能である。

【0390】

上記の実施例81~94および比較例1および8により、本発明のマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、分取、評価、および分析が可能である。

【0391】

また、実施例93および94と同様の操作を複数の物質に対して行うことにより、本発明のマクロファージ識別剤を用いたサブタイプと物質との相関についてのスクリーニングを行うことが可能である。

【0392】

また、実施例95から、本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髄細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、マウス細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

本結果は、細胞種が異なる場合でも、本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートしている。

【0393】

また、実施例96および97から、本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髄細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、ヒト細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

本結果は、更に、ヒト由来の細胞を用いた場合においても、本発明の一般式(10)で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートするものであり、ヒト組織のような病理組織、あるいはヒト個体でも適用可能であることを示唆しているものと考えている。

【0394】

<合成例6>

本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(139)の合成例を示す。

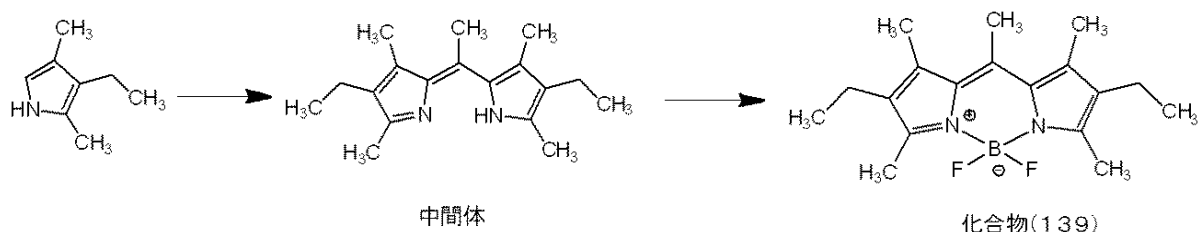
10

20

30

40

【化 3 9】



窒素雰囲気下、3-エチル-2,4-ジメチルピロール10g(81mmol)のジクロロメタン50mL溶液を0℃に冷却し、塩化アセチル13.3mLをゆっくり滴下した。滴下終了後、ゆっくり室温に昇温し、石油エーテル200mLで希釈後、減圧下溶媒を留去した。残さに酢酸エチル5mL及びヘキサン70mLを加え、得られた固体をろ過した。更に、ヘキサン28mL及び酢酸エチル2mLで洗浄して、中間体11.1gを得た。

10

【0395】

窒素雰囲気下、中間体のジクロロメタン溶液500mL懸濁液に、トリエチルアミン45mLをゆっくり滴下後、続いて、ボラントリフルオロエチルエーテルコンプレックス61mLを30分以上かけて滴下した。25℃で2時間攪拌した後、5℃以下に冷却し、水300mL、ジエチルエーテル1000mLを加え抽出した。分液後、有機層を水300mLで2回洗浄し、更に、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液300mLで洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥の後、ろ過し、減圧下、溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製の後、メタノールで洗浄して、目的物である化合物(139)9.3g(29.2mmol、収率36%)を得た。

20

【0396】

目的の化合物(139)である事は、¹H核磁気共鳴分光分析(ECA-400、日本電子(株)製)、LC/TOFMS(LC/MSD TOF、Agilent Technologies社製)で確認した。

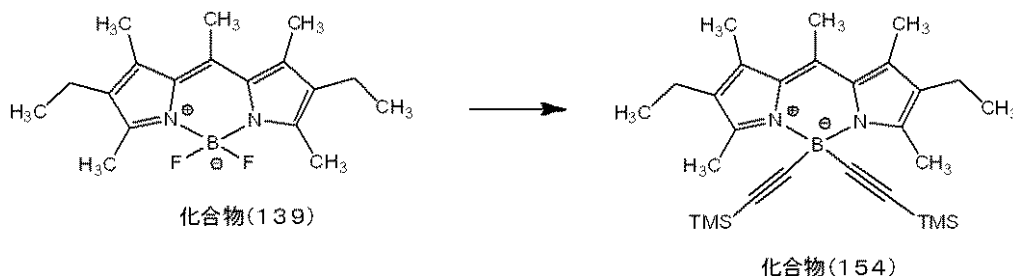
【0397】

<合成例7>

本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤の例として化合物(154)の合成例を示す。

30

【化 4 0】



窒素雰囲気下、トリメチルシリルアセチレン6.9mL(50mmol)の脱水テトラヒドロフラン250mLの溶液を-78℃に冷却し、1.65mol/Lのn-ブチリチウムヘキサン溶液30mL(50mmol)を8分かけて滴下した。-78℃で1時間攪拌の後、ゆっくり室温に昇温し、30分攪拌しトリメチルシリルアセチレンリチウムを調整した。

40

【0398】

窒素雰囲気下、化合物(139)6.4g(20mmol)の脱水テトラヒドロフラン750mLの溶液を0℃以下に冷却し、前記調整したトリメチルシリルアセチレンリチウムを20分以上かけて滴下した。0℃で20分攪拌の後、水500mLで希釈し、反応を停止させた。酢酸エチル250mLで3回抽出し、合わせた有機層を飽和食塩水250mLで洗浄した。無水硫酸ナトリウムで乾燥の後、ろ過し、減圧下、溶媒を留去した。シリ

50

カゲルカラムクロマトグラフィーで精製の後、ヘキサンで洗浄して、目的物である化合物 (1 5 4) 6 . 6 g (1 3 . 9 m m o l 、収率 7 0 %) を得た。

【 0 3 9 9 】

目的の化合物 (1 5 4) である事は、前記、 ^1H 核磁気共鳴分光分析、LC / TOF MS で確認した。

【 0 4 0 0 】

< 合成例 8 ~ 9 >

合成例 6 において、3 - エチル - 2 , 4 - ジメチルピロールを用いる代わりに対応するピロール誘導体を用いた以外は合成例 6 と同様な操作で化合物 (1 4 1) 、(1 4 8) を得た。目的の化合物 (1 4 1) および (1 4 8) である事は、前記、 ^1H 核磁気共鳴分光分析、LC / TOF MS で確認した。

また、化合物 (1 5 7) 、(1 6 1) 、(1 6 5) 、(1 6 6) 、(1 6 7) 、(1 6 9) は市販品を用いた。

【 0 4 0 1 】

[一般式 (1 1) で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの識別]
(実施例 9 8)

実施例 1 で使用した化合物 (1) を化合物 (1 3 9) に変更し、死細胞を TO - PRO - 3 を用いて識別した以外は、実施例 1 と同様の方法で化合物 (1 3 9) 由来の蛍光シグナルを解析した。横軸に FITC のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図 2 3 に示した。

【 0 4 0 2 】

(実施例 9 9 ~ 1 0 7)

実施例 1 で使用した化合物 (1) を化合物 (1 4 1) 、(1 4 8) 、(1 5 4) 、(1 5 7) 、(1 6 1) 、(1 6 5) 、(1 6 6) 、(1 6 7) 、(1 6 9) に変更した以外は、実施例 1 と同様の方法で、化合物 (1 4 1) 、(1 4 8) 、(1 5 4) 、(1 5 7) 、(1 6 1) 、(1 6 5) 、(1 6 6) 、(1 6 7) 、(1 6 9) 由来の蛍光シグナルを解析した。

【 0 4 0 3 】

以上の実施例 9 8 ~ 1 0 7 の結果を表 9 に示す。

【 0 4 0 4 】

< 一般式 (1 1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法 >

一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法で使用した化合物 (3) 、(4) 、(6) 、(7) 、(9) 、(1 1) ~ (1 3) 、(1 5) 、(1 7) 、(1 9) ~ (2 6) 、(2 8) 、(3 0) ~ (3 3) 、(3 5) 、(3 6) 、(3 8) 、(4 2) ~ (4 5) 、(4 8) ~ (6 2) 、(6 5) 、(6 7) 、(7 4) ~ (7 6) 、(8 2) 、(8 3) 、(8 5) および比較化合物 (1) ~ (2) を化合物 (1 4 1) 、(1 4 8) 、(1 5 4) 、(1 5 7) 、(1 6 1) 、(1 6 5) 、(1 6 6) 、(1 6 7) 、(1 6 9) に変更した以外は、一般式 (1) で表わされるマクロファージ識別剤の識別能の評価法と同様の方法で、化合物 (1 4 1) 、(1 4 8) 、(1 5 4) 、(1 5 7) 、(1 6 1) 、(1 6 5) 、(1 6 6) 、(1 6 7) 、(1 6 9) 由来の蛍光シグナルを、各化合物に適したチャンネルで測定し、分離度 R を指標としてサブタイプの識別能を評価した。

評価結果を表 9 に示す。表 9 中における、各チャンネルの詳細は表 3 に示す。

【 0 4 0 5 】

【表 9】

実施例	化合物	チャンネル	M1マクロファージの ピーク位置	M2マクロファージの ピーク位置	分離度 R	マクロファージ サブタイプの識別評価	選択性
実施例98	(139)	FITC	220	47.9	1.023	A	M1
実施例99	(141)	FITC	16.6	9.77	0.650	A	M1
実施例100	(148)	FITC	109	151	0.193	B	M2
実施例101	(154)	FITC	1.25	1.63	0.160	B	M2
実施例102	(157)	FITC	2.57	5.62	0.637	A	M2
実施例103	(161)	APC	38.4	9.02	0.582	A	M1
実施例104	(165)	FITC	1.25	2.00	0.183	B	M2
実施例105	(166)	FITC	127	56.3	0.722	A	M1
実施例106	(167)	FITC	14.5	7.82	0.525	A	M1
実施例107	(169)	FITC	10.1	6.35	0.247	B	M1
比較例1	比較化合物(1)	PE-Cy7	1.70	1.86	0.006	C	—

【0406】

表9、図1および23から明らかなように、比較化合物(1)を用いて染色したM1マクロファージとM2マクロファージとは染色強度に差がなく、識別ができないが、本発明の一般式(11)で表わされる色素化合物を含有したマクロファージ識別剤を用いるとM1マクロファージとM2マクロファージは、蛍光強度の差に基づいて識別できることが

【0407】

(実施例108)

実施例1と同様の方法で培養したM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(139)と化合物(161)をそれぞれ1 μ Mとなるように加えた。

【0408】

化合物(139)由来の蛍光シグナルを、FITCのチャンネル(励起波長: 488nm、中心波長: 530nm、波長幅30nm)で、化合物(161)由来の蛍光シグナルを、APC(励起波長: 633nm、中心波長: 660nm、波長幅20nm)で測定した。横軸に化合物(139)由来のFITCのチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度を、縦軸に化合物(161)由来のAPCのチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度をとって展開したサイトグラムを作成した。

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0409】

その結果、化合物(139)で染色した場合、M2マクロファージに比べてM1マクロファージはFITCのチャンネルで蛍光強度が高く、これに対して化合物(161)で染色した場合には、M2マクロファージに比べてM1マクロファージはAPCのチャンネルでの蛍光強度が高いという特徴をもつ。そのため、図24から明らかなように、化合物(139)および化合物(161)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージと

は、F I T C のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度とA P C のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光特性を持った細胞集団としてプロットされ、識別できることがわかった。

【0410】

本実施例から、本発明の一般式(11)で表されるマクロファージ識別剤の化合物を2種類以上組み合わせて用いた場合でも、サブタイプを識別できる。

【0411】

上記の実施例98～108および比較例1により、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を1種類以上用いることで、生物試料中におけるサブタイプの識別が可能である。

【0412】

[一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分取]

(実施例109)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージとM2マクロファージとをそれぞれ 1×10^5 個ずつ1.5mLチューブに混合し、そこに化合物(139)を $1 \mu\text{M}$ となるように加えた。

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0413】

その結果、図25から明らかなように、化合物(139)で染色したM1マクロファージおよびM2マクロファージは、細胞の大きさを反映する前方散乱光の強度と化合物(139)由来の蛍光シグナルの強度とで展開したサイトグラム上で、異なる蛍光強度分布を持った細胞集団としてプロットされた。M2マクロファージに比べてM1マクロファージをより強く染色する化合物(139)を用いて染色したため、M1マクロファージは化合物(139)由来の蛍光強度が高い細胞集団として、一方のM2マクロファージは化合物(139)由来の蛍光強度が低い細胞集団として識別できることがわかった。また、化合物(139)で識別されたM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ、FACS装置を用いてソーティングして分取することができた。分取したサブタイプは蛍光抗体法および遺伝子発現解析により確認した。

【0414】

上記の実施例98～109により、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、および分取が可能であることが示された。

【0415】

[一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたサブタイプの分析およびスクリーニング]

(実施例110)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(139)を $1 \mu\text{M}$ となるように、また細胞に取り込まれた化合物(139)の吐き出しを阻害する物質として4,4'-ジイソチオシアネートスチルベン-2,2'-ジスルホン酸(Sigma-Aldrich社製、以下DIDS)を $10 \mu\text{M}$ となるように加え、37℃で30分インキュベーションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清を除いた後、 $10 \mu\text{M}$ となるようにDIDSを加えたHBSSバッファーを1mL加えて細胞を懸濁し、さらに37℃で30分インキュベーションした。

上記以外の操作は実施例57と同様の方法で行った。

【0416】

(比較例10)

実施例110において、DIDSを加えずに、実施例110と同様の操作を行い、解析を行った。

その結果、図26に示すように、横軸に化合物(139)由来の蛍光シグナルを測定したF I T C のチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとつ

10

20

30

40

50

たヒストグラムにおいて、細胞からの化合物(139)の排出のDIDSによる阻害に基づく蛍光強度の増強が、M1マクロファージだけで観察され、DIDSによる排出の阻害の影響がサブタイプの種類によって異なることがわかった。

【0417】

(実施例111)

実施例1と同様の方法で培養した、M1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(161)を $1 \mu\text{M}$ となるように加え、37℃で30分インキュベーションした。その後、チューブを180Gで10分遠心して上清を除いた後、2.4G2(抗マウスCD16/32抗体、Biolegend社製)で細胞表面のブロッキング処理を行った。ブロッキング処理を行った細胞に、 $0.2 \mu\text{g}$ のPaciflic Blue標識-抗CD40抗体および $0.1 \mu\text{g}$ のAlexa Fluor 647標識-抗Dectin-1抗体を含むFACSバッファを添加して、蛍光免疫染色を行った。各抗体による蛍光標識は、それぞれの蛍光波長がお互いに重ならないように、また化合物(161)の蛍光波長、およびaquaの蛍光波長に重ならないように選択した。

上記以外の操作は実施例59と同様の方法で行った。

【0418】

その結果、化合物(161)によって強く染色されることで識別されたM1マクロファージではPaciflic Blue標識-抗CD40抗体由来の蛍光シグナルが、Paciflic Blueのチャンネル(405nmで励起、450/50nm; 中心波長/波長幅)において観測された。これに対し、化合物(161)によって弱く染色されることで識別されたM2マクロファージではAlexa Fluor 647標識-抗Dectin-1抗体由来の蛍光シグナルが、APCのチャンネル(633nmで励起、660/20nm; 中心波長/波長幅)において観測された。これらの結果から、抗CD40抗体はM1マクロファージに、抗Dectin-1抗体はM2マクロファージに特異的に結合する抗体であることが分かった。

【0419】

[一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたマウス細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0420】

(実施例112)

実施例59で使用した化合物(1)を化合物(141)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(141)由来の蛍光シグナルをFITCのチャンネル(488nmで励起、530/30nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図27に示した。

【0421】

その結果、図27から明らかなように、化合物(141)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0422】

[一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いたヒト細胞株から分化誘導したマクロファージサブタイプの識別]

【0423】

(実施例113)

実施例60で使用した化合物(1)を化合物(139)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(139)由来の蛍光シグナルをFITCのチャンネル(488nmで励起、530/30nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にFITCのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図28に示した。

【0424】

その結果、図28から明らかなように、化合物(139)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0425】

(実施例114)

実施例60で使用した化合物(1)を化合物(141)に変更した以外は、実施例1と同様の方法で化合物(141)由来の蛍光シグナルをF I T Cのチャンネル(488nmで励起、530/30nm; 中心波長/波長幅)で測定した。横軸にF I T Cのチャンネルで得られた蛍光強度を、縦軸に各蛍光強度における細胞数をとったヒストグラムを作製し、図29に示した。

10

【0426】

その結果、図29から明らかなように、化合物(141)によりM2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色され、蛍光強度の差に基づいて識別できることがわかった。

【0427】

実施例110および111から、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプと物質の相関の分析が可能である。

【0428】

上記の実施例98~111および比較例1により、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、サブタイプの識別、分取、評価、および分析が可能である。

20

【0429】

また、実施例110および111と同様の操作を複数の物質に対して行うことにより、本発明の一般式(11)マクロファージ識別剤を用いたサブタイプと物質との相関についてのスクリーニングを行うことが可能である。

【0430】

また、実施例112から、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髄細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、マウス細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

30

本結果は、細胞種が異なる場合でも、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートしている。

【0431】

また、実施例113および114から、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤を用いることで、骨髄細胞から分化誘導したサブタイプだけでなく、ヒト細胞株から分化誘導したサブタイプを識別できることが示された。

本結果は、更に、ヒト由来の細胞を用いた場合においても、本発明の一般式(11)で表わされるマクロファージ識別剤によってサブタイプの識別が可能であることをサポートするものであり、ヒト組織のような病理組織、あるいはヒト個体でも適用可能であることを示唆しているものと考えている。

40

【0432】

(実施例115)

実施例1と同様の方法で培養したM1マクロファージおよびM2マクロファージをそれぞれ 2×10^5 個ずつ1.5mLチューブに分注し、そこに化合物(1)と化合物(113)をそれぞれ1 μ Mとなるように加えた。死細胞は、T O - P R O - 3を用いて識別した。

【0433】

化合物(1)由来の蛍光シグナルを、F I T Cのチャンネル(励起波長: 488nm、中心波長: 530nm、波長幅: 30nm)で、化合物(113)由来の蛍光シグナルを、A P C - C y 7(励起波長: 633nm、中心波長: 780nm、波長幅: 60nm)

50

で測定した。縦軸に化合物(1)由来のFITCのチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度を、横軸に化合物(113)由来のAPC-Cy7のチャンネルで得られた蛍光シグナルの強度をとって展開したサイトグラムを作成した。

【0434】

TO-PRO-3のシグナルが低い細胞集団を対象とすることで、死細胞を除去した細胞集団に対して解析を行った。

上記以外の操作は実施例1と同様の方法で行った。

【0435】

その結果、図30から明らかなように、化合物(1)を用いた場合、M2マクロファージに比べてM1マクロファージがより強く染色する。これに対して化合物(113)を用いた場合は、M1マクロファージに比べてM2マクロファージがより強く染色する特徴を持つことがわかる。そのため、化合物(1)および化合物(113)で染色したM1マクロファージとM2マクロファージは、各化合物由来の蛍光シグナルの強度で展開したサイトグラム上で、異なる蛍光特性を持った細胞集団としてプロットされるため、容易に識別できることがわかった。

10

【0436】

本実施例から、本発明の一般式(1)、(6)、(10)、(11)で表されるマクロファージ識別剤の化合物を2種類以上組み合わせる用いた場合でも、サブタイプを識別できることが示された。

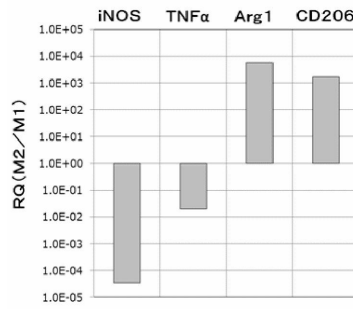
【産業上の利用可能性】

20

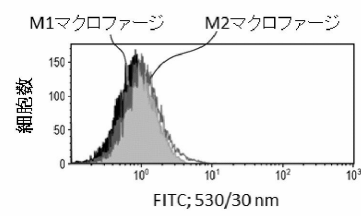
【0437】

本発明により提供される一般式(1)、(6)、(10)、および(11)で表わされる有機化合物を含むマクロファージ識別剤は、簡便、且つ安全性が高く、廉価なサブタイプの識別を可能にするための、有用な材料となる。また、サブタイプに影響を及ぼす物質の評価においても、本発明のマクロファージ識別剤を用いることで、ハイスループットなスクリーニングを低コストで行うことができる。本発明のマクロファージ識別剤を用いれば、サブタイプの炎症性疾患における役割の解明に関する研究を飛躍的に発展させ、炎症性疾患の有効な診断法や治療法の開発に貢献し、産業上および実用化の上でもきわめて有効な基盤技術となる。

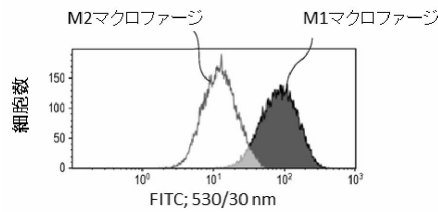
【図 1】



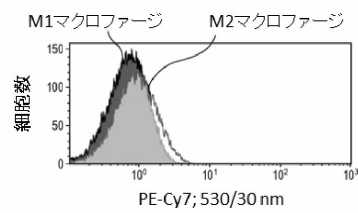
【図 4】



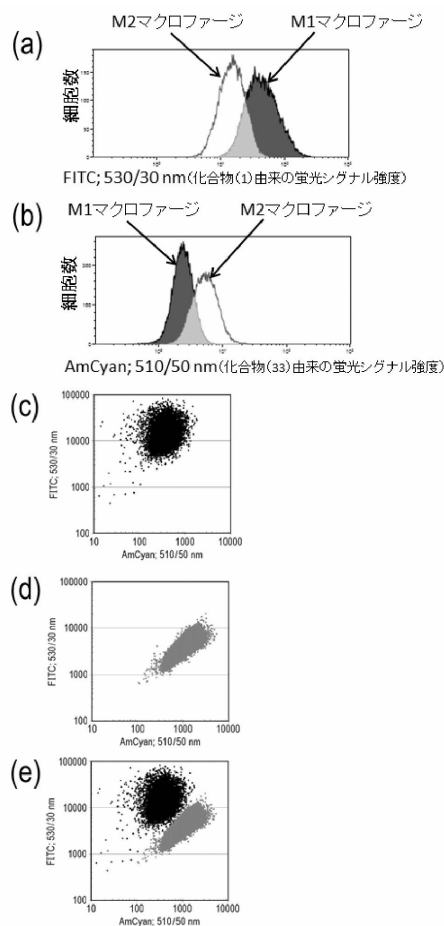
【図 2】



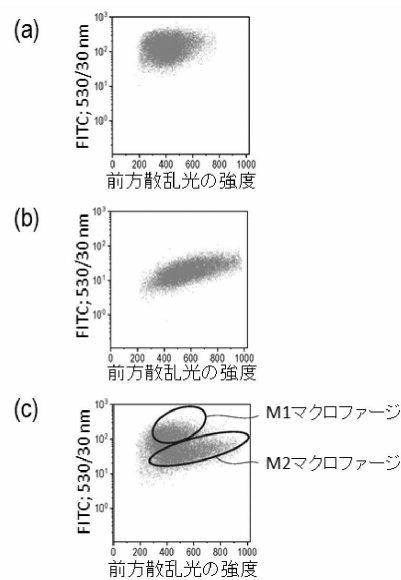
【図 3】



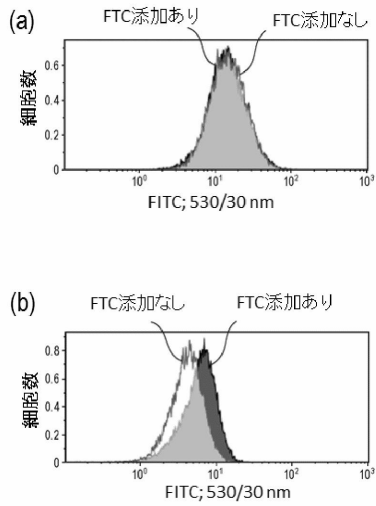
【図 5】



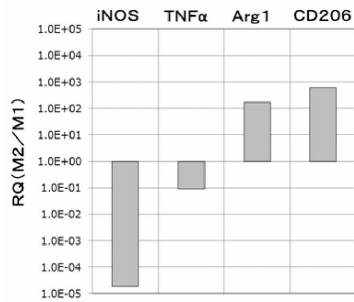
【図 6】



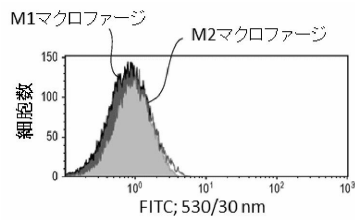
【図 7】



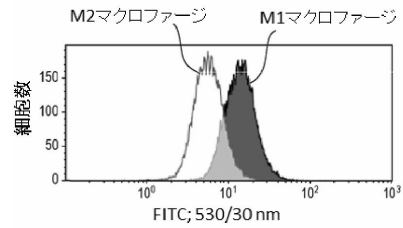
【図 8】



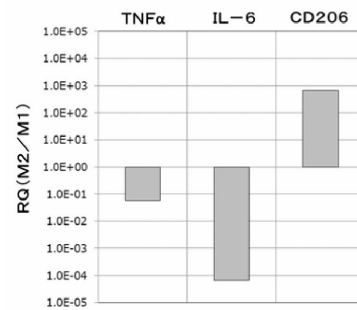
【図 12】



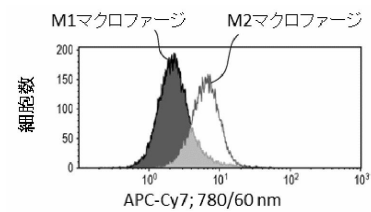
【図 9】



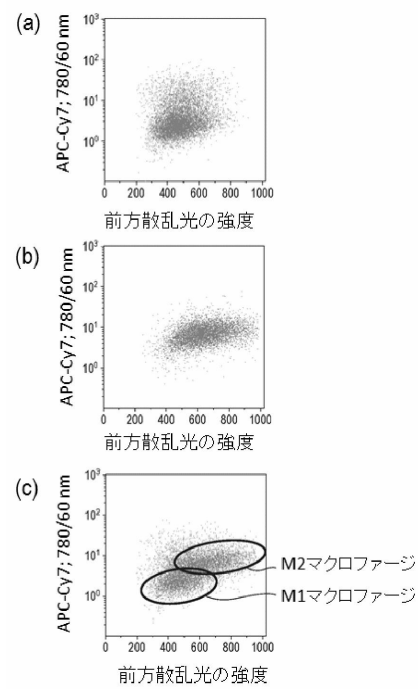
【図 10】



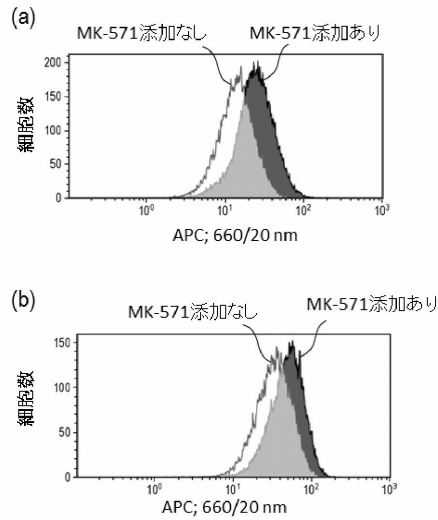
【図 11】



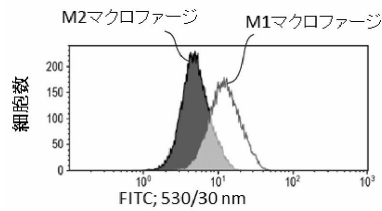
【図 13】



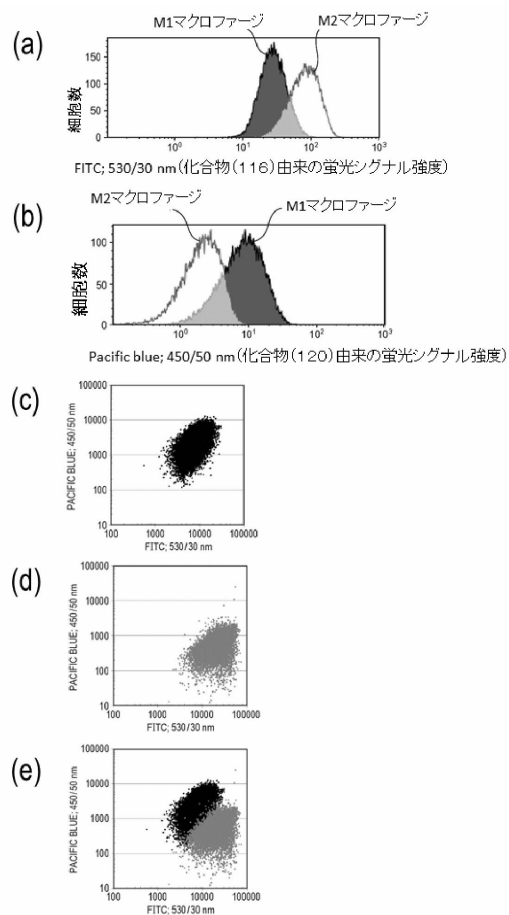
【図 14】



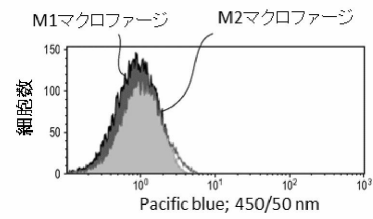
【図 15】



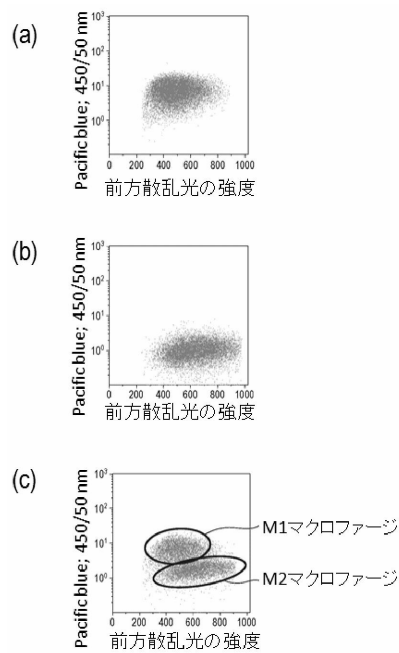
【図 17】



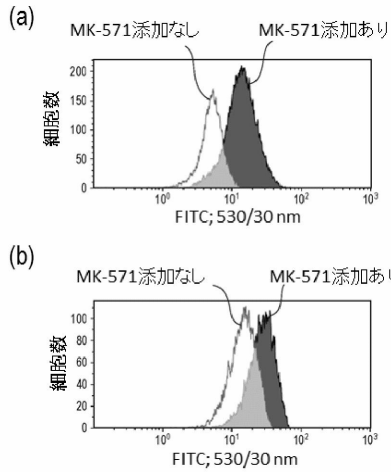
【図 16】



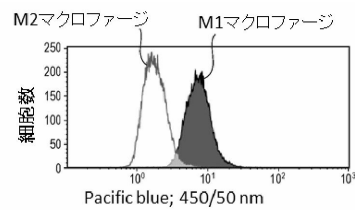
【図 18】



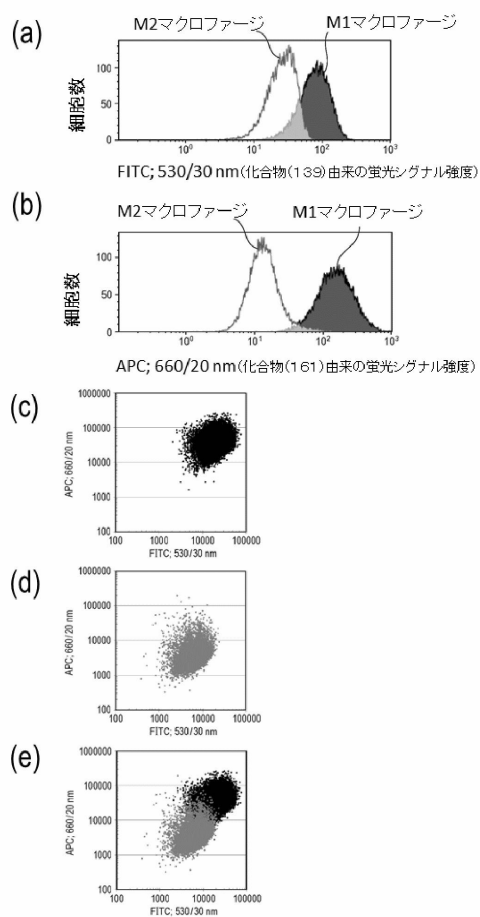
【図 19】



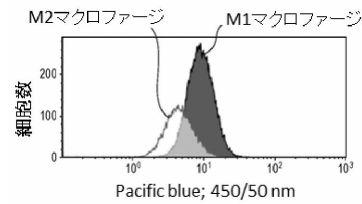
【図 20】



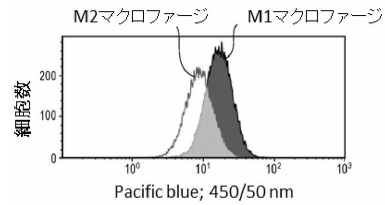
【図 24】



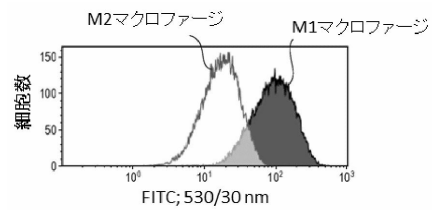
【図 21】



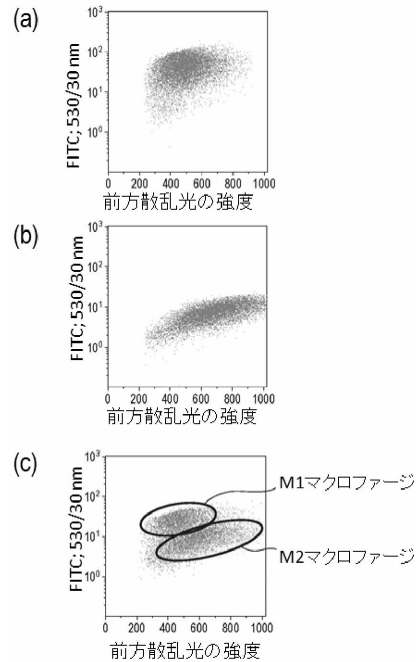
【図 22】



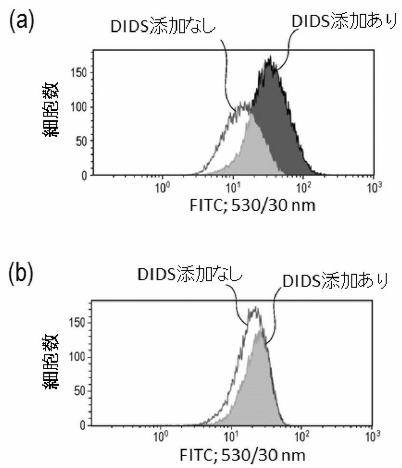
【図 23】



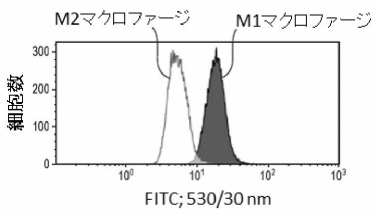
【図 25】



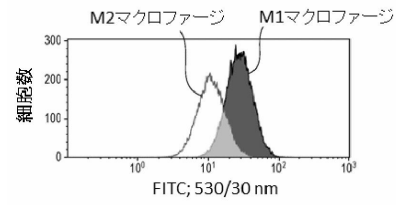
【図 26】



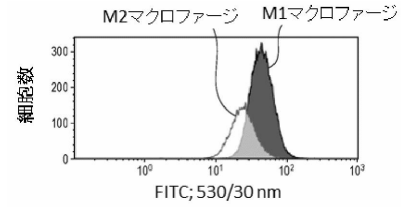
【図 27】



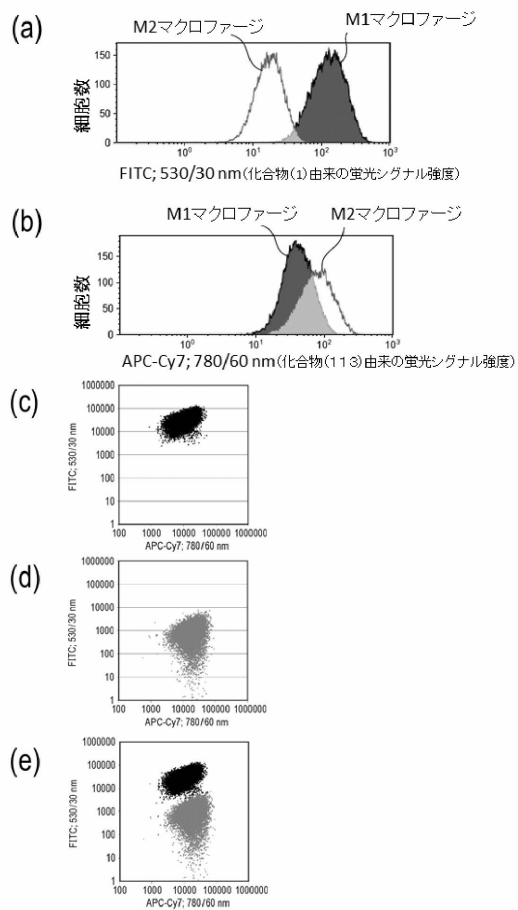
【図 28】



【図 29】



【図 30】



【配列表】

0006463005000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/64 F

- (72)発明者 野本 毅
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 山内 幸子
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 渡邊 耕平
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 新藤 太一
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 宮 崎 健
東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内
- (72)発明者 田畑 泰彦
京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内
- (72)発明者 三田 恵理
京都府京都市左京区吉田本町36番地1 国立大学法人京都大学内

審査官 布川 莉奈

- (56)参考文献 Journal of Leukocyte Biology, 2009年, Vol. 85, pp. 779-787
The Journal of Neuroscience, 2009年, Vol. 29, No. 43, pp. 13435-13444

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00-3/00
C12M 1/00-3/10
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS(STN)