

セレノマルトールを配位子とした亜鉛錯体の抗糖尿病効果
及び臓器分布解析に関する研究

2018 年度
西口 貴之

本論文の基礎となる報文を以下に示す。

1) Takayuki Nishiguchi, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui. Investigating the target organs of novel anti-diabetic zinc complexes with organo-selenium ligands. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112. [第 1, 3 章]

2) Takayuki Nishiguchi, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui. Anti-diabetic effect of organo-chalcogen (sulfur and selenium) zinc complexes with hydroxy-pyrone derivatives on leptin-deficient type 2 diabetes model mouse (ob/ob mice). *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647. [第 2 章]

目次

序論（研究の背景及び目的）	1
第1章 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O, S, Se)-Zn 錯体の合成と <i>in vitro</i> インスリン様活性の評価	5
1-1 緒言	5
1-2 実験材料及び実験方法	6
1-3 結果	15
1-4 考察	19
第2章 チオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体の ob/ob マウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析	23
2-1 緒言	23
2-2 実験材料及び実験方法	25
2-3 結果	30
2-4 考察	39
第3章 マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体の KKA ^y マウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析	42
3-1 緒言	42
3-2 実験材料及び実験方法	42
3-3 結果	45
3-4 考察	54
総括及び将来への展望	57
参考文献	59
Appendices	65
謝辞	89

本論文で使した略語一覧

ALP:	alkaline phosphatase
ALT:	alanine aminotransferase
AST:	aspartate aminotransferase
BSA:	bovine serum albumin
BSRC:	bioscience research center
BUN:	blood urea nitrogen
DMSO:	dimethyl sulfoxide
DPP-4:	dipeptidyl peptidase-4
EC ₅₀ :	50% glucose uptake concentration
ELISA:	enzyme-linked immunosorbent assay
FFA:	free fatty acid
GLP-1:	glucagon like peptide-1
GLUT:	glucose transporter
HbA1c:	hemoglobin A1c
IDDM:	insulin dependent diabetes mellitus
IDF:	international diabetes federation
IC ₅₀ :	50% inhibitory concentration
IR:	infrared spectrometry
IRS:	insulin receptor substrate
KPU:	kyoto pharmaceutical university
KRB:	krebs-ringer bicarbonate
MS:	mass spectrometry
NEFA:	non-esterified fatty acid
NIDDM:	non-insulin-dependent diabetes mellitus
NMR:	nuclear magnetic resonance
PDX-1:	pancreatic and duodenal homeobox-1
PEG:	polyethylene glycol
PIP3:	phosphatidylinositol trisphosphate
PPAR γ :	peroxisomal proliferator-activated receptor
PTP1B:	protein tyrosine phosphatase 1B
PTEN:	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
RI:	radio isotope
SU:	sulfonylurea
TG:	triglyceride
T-CHO:	total cholesterol

ZnCl_2 : zinc chloride

ZnSO_4 : zinc sulfate

序論（研究の背景及び目的）

世界糖尿病連合（IDF）の報告によると、2017年において、世界の糖尿病人口は4億2,500万人であり、2045年には約7億人に到達すると言われている [1]。日本においては、2014年（平成26年）の患者調査によると、生活習慣病患者の内、糖尿病の患者数は、高血圧の1,010万8,000人に続く第2位の316万6,000人であった [2]。さらに、2016年（平成28年）の国民健康・栄養調査によると、「糖尿病が強く疑われる者（糖尿病有病者）」（HbA1c値：6.5%以上、または、「糖尿病治療の有無」に「有り」と回答した者）及び「糖尿病の可能性を否定できない者（糖尿病予備軍）」（HbA1c値：6.0～6.5%、かつ、「糖尿病が強く疑われる者」以外の者）は、それぞれ約1,000万人と推計された。糖尿病予備軍は1997年（平成9年）以降増加し続けていたが、2007年（平成19年）以降は減少している。また、糖尿病有病者のうち現在治療を受けている者の割合は76.6%であり、男女別に見ると男性で78.7%、そして女性で74.1%であり、男女共に前回の調査より有意に増加している。糖尿病有病者及び糖尿病予備軍の推計人数の年齢構成として、60歳以上の高齢者が約62%を占めており、今後さらに高齢化が進む日本においては、治療を受ける人口の増加が見込まれている [3]。

糖尿病は、その病態から大きく1型糖尿病（IDDM）及び2型糖尿病（NIDDM）に分類される [4]。IDDMは、インスリン分泌の絶対的な不足により起こり、T細胞などの免疫細胞によって引き起こされる自己免疫的機序により、膵臓ランゲルハンス氏島（膵ラ氏島）の β 細胞が障害を受けることや、近年ではウイルス感染により、膵ラ氏島が障害を受けることなどが原因と提唱されている [5]。一方で、NIDDMは、過食や運動不足などの環境因子に遺伝的因子が加わって、肝臓や筋肉におけるインスリン抵抗性及び膵ラ氏島の β 細胞の脱落などが生じ発症すると考えられており、糖尿病の約90-95%を占めている [4, 6]。糖尿病の治療薬としては、インスリン作用不足を補うためのインスリン注射に加え、その他には合成血糖降下薬などが使用されている。その例として、①膵 β 細胞のSU受容体に結合し、インスリン分泌を促進させ血糖降下作用を示すSU薬（グリメピリドやグリクラジドなど）及び②インスリン分泌促進薬（グリニド薬）、③主として転写因子であるPPAR γ を活性化させ、インスリン抵抗性を改善させるチアゾリジンジオン誘導体（ピオグリタゾン）、④肝臓においてインスリンとは異なる機序で糖新生を抑制し、抗糖尿病効果を示すビグアナイド誘導体（メトホルミン、ブホルミン）、⑤小腸粘膜で2糖類と競合することにより、2糖類分解酵素（ α グルコシダーゼ）の働きを阻害し食後高血糖を抑制する α グルコシダーゼ阻害薬（アカルボース、ボグリボース、ミグリトールなど）、⑥SU薬とは異なる機序によって、グルコース応答性のインスリン分泌促進機構により血糖降下作用を示すグルカゴン様ペプチド製剤であるGLP-1製剤（エキセナチド、リラグルチドなど）、または⑦GLP-1の分解を司るジペプチジルペプチダーゼ-4の阻害薬であるDPP-4阻害薬（アログリプチン、シタグリプチン、オマリグリプチンなど）、⑧腎臓におけるグルコースの再吸収を抑制することにより、その排泄を促し血糖降下作用を示すSGLT-2阻害薬などが臨床で使用されている。これらの薬剤はそれぞれ副作用も存在し、根治が困難な糖尿病の治療薬開発は継続されている [7]。

一方、我々が健康的な生活を送っていくためには、毎日バランスの良い種類と量の食事をする必要がある。その食事は、三大栄養素（タンパク質、脂質、炭水化物）及び微量栄養素から主に構成され

る [8]。微量栄養素の中には、体内に数 mg から数 g 程度しか含まれていない必須微量元素とよばれる栄養素が存在する。必須微量元素は、1. ある元素が不足すると欠乏症が起こる、2. その不足した元素を補給すれば欠乏症が改善する、3. 生体にとって重要な物質の構成成分であることが証明されること、と定義されている [9]。現在、必須微量元素と報告されている元素は、鉄 (Fe)、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu)、セレン (Se)、ヨウ素 (I)、コバルト (Co)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、モリブデン (Mo) の 9 元素であり [10]、9 元素中 7 元素が、金属元素であることは特に注目すべき点である (Se は半金属元素である)。

金属元素を含んだ治療薬 (金属含有医薬品) は、古くは 1910 年にエールリッヒと秦佐八郎が開発した、梅毒治療薬のアルスフェナミン (ヒ素 : As) にまで遡る。その後、関節リウマチ治療薬のオーラノフィン (金 : Au)、末梢神経障害の治療薬であるビタミン B₁₂ 製剤のシアノコバラミン (Co)、抗がん剤のシスプラチン (プラチナ : Pt)、胃潰瘍治療薬であるスクラルファート (アルミニウム : Al) 及びポラプレジンク (Zn) などが臨床で金属含有医薬品として使用されてきた (Fig. 1)。さらに、2017 年 3 月に、ウィルソン病治療薬である酢酸 Zn (商品名 : ノベルジン) が、低 Zn 血症治療薬として適応が追加され、Zn 欠乏症の治療に用いられている [11] (Fig. 1)。そのため、金属元素による疾病の治療は身近なこととなっている。現在も金属元素を治療薬として応用するための開発研究は続いており、金属含有医薬品はこれからも増えていくことが予想される [12-14]。

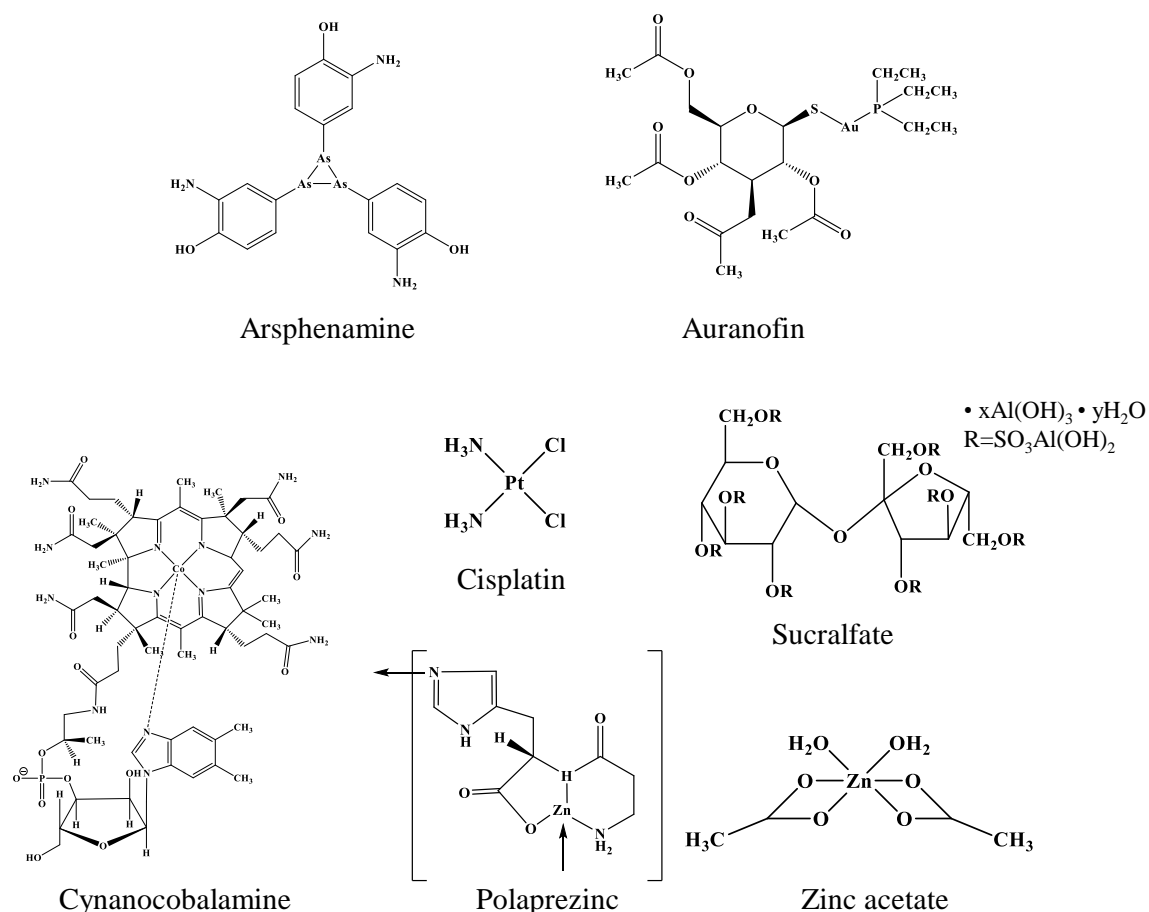


Fig. 1. Clinically used metallo-pharmaceutical agents

糖尿病と金属元素との関係性については様々な報告がある。生体内における糖代謝に関連する金属元素として、Cr は歴史的背景が古く、Cr の欠乏症に糖代謝異常が含まれている。また Cu も欠乏すると糖代謝異常となることが報告されており [15]、Cu 錯体は抗糖尿病効果を示すことも報告されている [16]。著者の所属する研究室の過去の報告で、Yasumatsu らは、ビス(ピコリナト)Cu(II) ($[\text{Cu}(\text{pic})_2]$) を単回腹腔内投与することで、1型糖尿病モデル動物において高い血糖降下作用を示すことを報告した [17]。さらに、Se に関しては、セレネート (SeO_4^{2-}) が PPAR γ の発現量を増加させること及びその還元体の セレナイト (SeO_3^{2-}) がインスリンシグナルを負に調節する ホスファターゼである PTP-1B を阻害することにより、インスリン感受性を増加させ、2型糖尿病モデル db/db マウスにおいて空腹時血糖値の上昇を抑制させることが報告されている [18]。

そして、バナジウム (V) の糖尿病治療薬としての開発の歴史は非常に古く、1899 年にフランス人医師の Lyonnet らは、5 価 V イオンである、バナジン酸ナトリウム (NaVO_3) を 2 型糖尿病患者に投与し、糖尿病を治療したとの報告が存在する [19]。著者の所属する研究室でも長年 V 錯体を用いた、糖尿病治療の可能性について研究してきた。その中で、1990 年に 4 価 V イオンの錯体である、バナジル (VO^{2+}) システインメチルエステル錯体を、1 型糖尿病モデルラットである STZ ラットに 1 日 1 回経口投与すると、血糖値正常化作用を示すことを見出している [20]。また、1992 年に、McNeill らはビス(マルトラト)オキソ V (IV) がインスリン様活性を持つことを報告し [21]、STZ ラットの血糖値を低下させたとの報告も存在する [22]。このように、V は、現在インスリン療法しか治療法が存在しない、1 型糖尿病に対する治療薬としての可能性が見出されているが、その高い毒性 [23] のため未だ臨床応用には至っていない。一般的に、金属元素の医薬品への応用は毒性や副作用を軽減させる側面で難しいことが現実問題として存在する。

著者の所属する研究室で、V に続く新規糖尿病治療薬として、ヒトにおける必須微量元素で、Fe に次いで生体内に多く存在する Zn が考えられた。その含有量は、体重 70kg のヒトにおいては約 2g と言われている [10]。Zn は様々なタンパク質や酵素に含まれており、生体内で非常に重要な働きを担っている。例えば、アルコールデヒドロゲナーゼやスーパーオキシドジスムターゼなどの酸化還元酵素、RNA ポリメラーゼやアスパラギン酸カルボモイラーゼなどの転移酵素、カルボキシペプチダーゼ A やマトリックスメタロプロテアーゼなどの加水分解酵素などである。さらに、Zn イオンは、タンパク質の触媒作用や、構造的役割を果たしているのみならず、遺伝子情報の転写や翻訳の制御に重要な Zn 必須の核酸認識タンパク質も多数存在する [24]。

Zn と糖尿病に関しての報告は、1980 年に Coulston と Dandona らが、 ZnCl_2 (Zn イオン) がラット脂肪細胞において、インスリンと同様に脂質合成を促進させたことに端を発する [25]。さらに 1982 年 James らは、ラット脂肪細胞において Zn イオン処置により、3-O-メチルグルコースの取り込み促進及びリトドリンのアドレナリン β 受容体刺激による脂肪分解の抑制作用を報告した [26]。Zn イオンの示したこれらインスリンと同様の活性は、インスリン様活性と呼ばれ、この発見以来、様々なグループが、Zn イオンによる糖尿病モデル動物における抗糖尿病効果を報告してきた [27,28]。著者の所属する研究室で、 VO^{2+} を錯体化することにより、高活性な VO^{2+} 錯体を開発できた例を参考にして、ルイス酸である Zn イオンに、非共有電子対を持つルイス塩基である酸素 (O)、窒素 (N)、硫黄 (S) など

の配位原子をもつ低分子有機化合物（配位子）を結合させた Zn 錯体を合成し、ラット脂肪細胞を使用したインスリン様活性の評価実験系 [29] を用いて、候補化合物の検討を行ってきた。2000 年に、ビス（マルトラト）Zn（II）（ $[\text{Zn}(\text{mal})_2]$ ）（配位様式： O_4 ）を合成し、インスリン様活性を評価したところ、対照群である ZnSO_4 （Zn イオン）よりも高いインスリン様活性を示すことを世界で初めて報告した [30]。そして、 $[\text{Zn}(\text{mal})_2]$ を 2 型糖尿病モデルマウスである KKA^y マウスに、 $2.0\text{--}4.5\text{ mg Zn/kg}$ 体重の投与量で 14 日間連日腹腔内投与することにより、血糖降下作用、耐糖能異常改善効果及びインスリン抵抗性を改善させ、糖尿病治療薬としての可能性を見出した [31]。その後、天然物、アミノ酸及びビタミン類などを配位子に用いて O_4 、 N_2O_2 及び N_4 など、様々な配位様式の Zn 錯体を合成し、その *in vitro* 及び *in vivo* 抗糖尿病効果を評価してきたが、低用量かつ経口投与で血糖降下作用を示す Zn 錯体を見出すことは出来なかった [32-34]。その様な状況の中、2006 から 2007 年には、 S_2O_2 型や S_4 型の配位様式の Zn 錯体が、非常に高い *in vitro* インスリン様活性を示し、2 型糖尿病モデル動物における *in vivo* 抗糖尿病効果の検討で、低用量かつ経口投与により血糖降下作用を示すのみならず、糖尿病状態では減少しているインスリン抵抗性解除因子の 1 つであるアディポネクチンの分泌促進作用や、摂食にかかわるホルモンであるレプチンの異常分泌（レプチン抵抗性）を改善することを報告した [35, 36]。そして、2013 年には、 Se_2O_2 型の Zn 錯体が合成され、今までの投与量の中で最低用量（ $1.25\text{--}2.5\text{ mg Zn/kg}$ 体重）で、2 型糖尿病モデルである KKA^y マウスの血糖値を下げることを報告した [37]。このように、S や Se のような配位原子を持つ Zn 錯体は、*in vitro* 及び *in vivo* における抗糖尿病活性が大変高く、将来、糖尿病治療薬としての可能性が期待された。

一方、Zn 錯体は強力な抗糖尿病効果を示すにもかかわらず、その *in vivo* における作用臓器については、様々な議論はされているものの未だ結論は出ていない。さらに、Zn イオンまたは Zn 錯体のどちらの化学種で作用しているかなども長年の懸念事項であり、Zn 錯体の生体内臓器分布を簡易に測定できる方法論の開発が必要である。そのため、高活性で生体内臓器分布を解析できる Zn 錯体の創製を目指して、以上の事項をカバーし得る、Se を配位原子に持つ Zn 錯体を合成し、Zn 錯体の抗糖尿病効果と生体内臓器分布を同時に評価し、抗糖尿病作用を示している臓器の特定を試みた。

第1章 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O, S, Se)-Zn 錯体の合成と *in vitro* インスリン様活性の評価

1-1 緒言

著者の所属する研究室で、金属元素である Zn を、配位子と呼ばれる低分子量の有機化合物と結合させた Zn 錯体を合成し、ラット脂肪細胞を用いた評価系で *in vitro* インスリン様活性（遊離脂肪酸放出抑制活性またはグルコース取り込み促進活性）を評価すると、Zn イオンと比べて非常に強力な活性を示したことは序論において述べたが、今までに以下のような特徴を見出した。

1. アミノ酸やアミン関連錯体は、錯体生成反応の平衡定数（全安定度定数）が 10.5 以下では、Zn イオンよりも高いインスリン様活性を示す一方で、11 以上のほとんどの Zn 錯体では、インスリン様活性を示さない [38, 39]。
2. ポルフィリン関連 Zn 錯体は、その全安定度定数が非常に大きいことが知られているが [40]、[メソ-テトラキス (4-スルホナトフェニル) ポルフィリナト] Zn (II) ([Zn(tpps)₂]) の遊離脂肪酸放出を 50%抑制する試料濃度 (IC₅₀) は 70 μM と比較的低濃度であり、そのインスリン様活性は例外的に高い。[41]。
3. 一部の Zn 錯体の分配係数 (Log*P*) と、インスリン様活性には良好な相関関係がある [36]。
4. 配位様式が S₂O₂、S₄ 及び Se₂O₂ 型の Zn 錯体はインスリン様活性が高いものが多い [35-37, 42, 43]。

この中で、4. に関連して、S や Se を配位原子に持つ様々な Zn 錯体 {ビス (ピロリジン *N*-ジチオカルバマト) Zn (II) ([Zn(pdc)₂])、ビス (1,6-ジメチル-3-ヒドロキシ-5-メトキシ-2-ペンチル-1,4-ジヒドロピリジン-4-チオナト) Zn (II) ([Zn(tanm)₂])、ビス (1-オキシ-2-ピリジンチオラト) Zn (II) ([Zn(opt)₂])、ビス (2-メルカプトトロポロナト) Zn (II) ([Zn(mtrr)₂])、ビス (2-セレノピリジン-*N*-オキシダト) Zn (II) ([Zn(spno)₂])} の IC₅₀ はすべて 1~10 数 μM の範囲であり、非常に高い *in vitro* インスリン様活性を示すことは特に注目すべき点である。その中で、Se を配位原子に持つ Zn 錯体の活性を調べた例は [Zn(spno)₂] の 1 例であり、さらなる調査が必要であると考えられた。

そのため、Zn イオンよりもインスリン様活性が高いことが最初に示され、2 型糖尿病モデル KKA^y マウスにおいて抗糖尿病効果を示した Zn 錯体である [Zn(mal)₂] の配位子のマルトールに注目した。マルトールはヒドロキシピロン誘導体であり、ほとんど生理活性を示さないことが知られている。また、マルトールは他のヒドロキシピロン誘導体であるエチルマルトールとともに食品添加物として使用されており、安全性も高い化合物である [44]。そのため、ヒドロキシピロン誘導体（ヒドロキシピロン、マルトール、エチルマルトール）をそれぞれ、チオ及びセレノカルボニル化し、O₄、S₂O₂ 及び Se₂O₂ 型の Zn 錯体を合成し、その *in vitro* インスリン様活性を調べ、高活性な Zn 錯体の探索を行った。

1-2 実験材料及び実験方法

1-2-1 試薬

ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O, S, Se) -Zn 錯体の合成及び分配係数測定

硫酸亜鉛七水和物 ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 及び水酸化リチウム一水和物 ($\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$) は、和光純薬工業株式会社 (大阪、日本) より購入した。3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-オン (マルトール、*hmpo*) は、東京化成工業 (東京、日本) より購入した。2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-オン (エチルマルトール、*ehpo*)、ローソン試薬及びウーリンス試薬はシグマアルドリッチ社 (セントルイス、アメリカ合衆国) より購入した。メタノール、エタノール、アセトン及び酢酸エチルは純正化学 (東京、日本) より購入した。脱水トルエン及びジクロロメタンはナカライテスク株式会社 (京都、日本) より購入した。

In vitro インスリン様活性の評価

ジエチルエーテル、D(+)-グルコース、塩化ナトリウム (NaCl)、塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、硫酸マグネシウム (MgSO_4)、塩化カリウム (KCl)、リン酸二水素カリウム (KH_2PO_4)、炭酸水素ナトリウム (NaHCO_3) は和光純薬工業株式会社より購入した。ジメチルスルホキシド (DMSO) は純正化学より購入した。(±)-アドレナリン塩酸塩及び牛血清アルブミン (BSA: fraction V) はシグマアルドリッチ社より購入した。

上記すべての有機溶媒、酸塩基試薬及び無機試薬は一級ないし特級品を用いた。すべての水溶液は、ミリ-Q 超純水装置システム (日本ミリポア、東京、日本) により調製した超純水 (比抵抗値 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) を用いて作成した。

1-2-2 測定機器

合成した化合物は元素分析、赤外吸収スペクトル (IR)、質量分析 (MS) 及び ^1H -, ^{13}C -NMR により分析した。IR は、島津 FTIR-8100A (島津製作所株式会社、京都、日本) を用いて KBr 錠剤法により測定した。 ^1H -, ^{13}C -NMR は、Varian^{Unity} Inova spectrometer (バリアン株式会社、カリフォルニア、アメリカ合衆国) により測定した。元素分析は Perkin-Elmer 240 CHN elemental analyzer (日本パーキンエルマー株式会社、東京、日本)、質量分析は、JEOL JMS-SX 102 AQQ mass spectrometer (日本電子株式会社、東京、日本) を用いて、KPU 共同利用機器センターに依頼測定した。

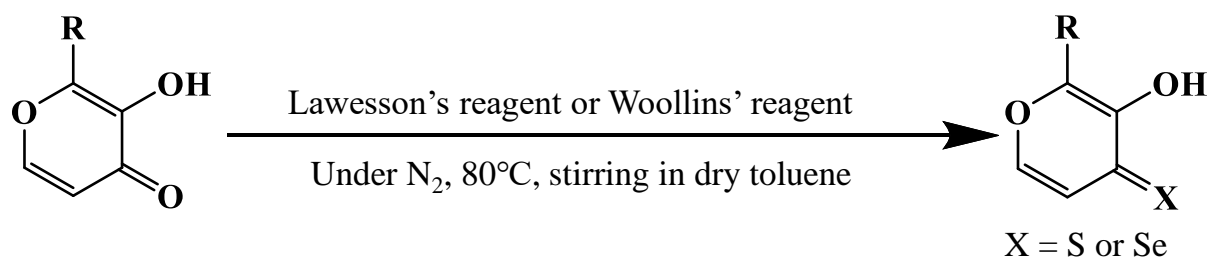
1-2-3 動物

8 週齢の雄性ウィスター/ST ラットは、清水実験材料株式会社 (京都、日本) より購入した。動物は、実験開始まで、KPU-BSRC で、12 時間周期の照明調節、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 及び湿度 $60 \pm 10\%$ の飼育条件下において、固形飼料 MF (オリエンタル酵母株式会社、東京、日本) 及び BSRC で調製された滅菌水を自由摂取させ飼育した。すべての動物実験は KPU 動物実験委員会により許可され、KPU の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

1-2-4 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O, S, Se)-Zn 錯体の合成

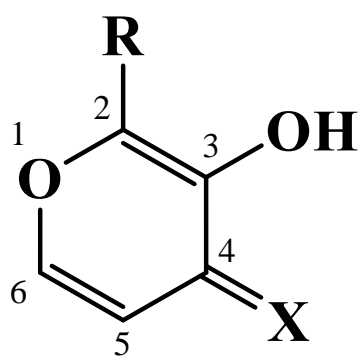
① ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (S, Se) 配位子の合成

チオカルボニルもしくはセレノカルボニル化試薬であるローソン試薬またはウーリンズ試薬 [45] を用いて、ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (S, Se) 配位子の合成を行った (Scheme 1)。



Scheme 1. Syntheses of organo-chalcogen ligands with hydroxy-pyrene derivatives

市販されている配位子を含め、以下のような 9 種類の配位子を準備した (Fig. 1-1)。



Compound	R	X
hpo : 3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-one	H	O
hmpto : 3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-one	-CH ₃	O
ehpo : 2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-one	-CH ₂ CH ₃	O
Compound	R	X
hpt : 3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-thione	H	S
hmpt : 3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-thione	-CH ₃	S
ehpt : 2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-thione	-CH ₂ CH ₃	S
Compound	R	X
hps : 3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-selenone	H	Se
hmpps : 3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-selenone	-CH ₃	Se
ehps : 2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-selenone	-CH ₂ CH ₃	Se

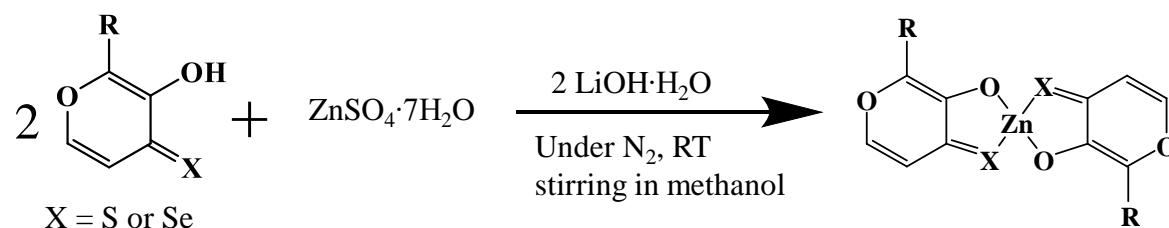
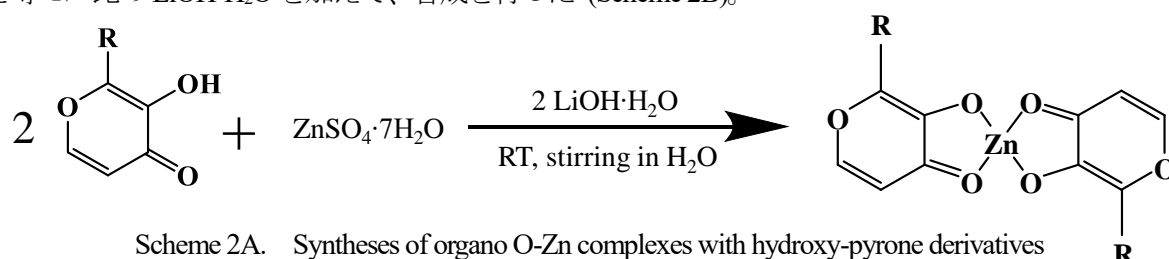
Fig. 1-1. Structures of chalcogen ligands with hydroxy-pyrene derivatives

② ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン (O, S, Se)-Zn 錯体の合成 (Scheme 2A and 2B)

ヒドロキシピロン誘導体有機 O 配位子と $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ を、モル比として 1:1 となるように反応させ、水中でヒドレート基 (O^-) の生成後、その半分のモル比の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を反応させて、合成を行った (Scheme 2A)。

ヒドロキシピロン誘導体有機 S-Zn 錯体に関しては、窒素雰囲気化において、有機 S 配位子と $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ が、モル比として 1:1 となるようにメタノール中で反応させた後、その半分のモル比の $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を反応させて、合成を行った。もしくは、配位子同士が 2 量体を形成するのを防ぐため、先に配位子と $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ をモル比として 1:0.5 となるようにメタノール中で反応させた後、配位子と等モル比の $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ を加えて、合成を行った (Scheme 2B)。

ヒドロキシピロン誘導体有機 Se-Zn 錯体に関しては、配位子同士が 2 量体を形成するのを防ぐため、先に配位子と $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ をモル比として 1:0.5 となるようにメタノール中で反応させた後、配位子と等モル比の $\text{LiOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ を加えて、合成を行った (Scheme 2B)。



合成した 9 種類のヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン Zn 錯体を以下に示す (Fig. 1-2)。

	Compound	R	X
	$[\text{Zn}(\text{hpo})_2]$: bis(3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-ono)Zn	H	O
	$[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$: bis(3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-ono)Zn	-CH ₃	O
	$[\text{Zn}(\text{ehpo})_2]$: bis(2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-ono)Zn	-CH ₂ CH ₃	O
	Compound	R	X
	$[\text{Zn}(\text{hpt})_2]$: bis(3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-thiono)Zn	H	S
	$[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$: bis(3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-thiono)Zn	-CH ₃	S
	$[\text{Zn}(\text{ehpt})_2]$: bis(2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-thiono)Zn	-CH ₂ CH ₃	S
	Compound	R	X
	$[\text{Zn}(\text{hps})_2]$: bis(3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-seleno)Zn	H	Se
	$[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$: bis(3-hydroxy-2-methyl-4 <i>H</i> -pyran-4-seleno)Zn	-CH ₃	Se
	$[\text{Zn}(\text{ehps})_2]$: bis(2-ethyl-3-hydroxy-4 <i>H</i> -pyran-4-seleno)Zn	-CH ₂ CH ₃	Se

Fig. 1-2. Structures of organo-chalcogen Zn complexes with hydroxy-pyran derivatives

合成手順と物性データを以下に示す。

3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-オン (hpo)

hpo は過去の文献 [46, 47] を参考に合成した (収率: 57%)。分子式: $C_5H_4O_3$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 53.41 (53.58); H, 3.37 (3.20). GC-EI(+)-MS (m/z): 112 (M^+). IR (cm^{-1}): 1655 ($\nu_{C=O}$), 3100 (ν_{OH}). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_H 7.88 (d, $J=0.9$ Hz, 1H), 7.79 (dd, $J=0.9, 5.5$ Hz, 1H), 6.50 (d, $J=5.6$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (ppm) (100 MHz, $CDCl_3$): δ_C 173.7, 155.6, 146.7, 138.7, 113.7.

3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-チオン (hpt)

hpo (3.6 mmol) を脱水トルエン (70 mL) 中で、80°Cまで加熱し、ローソン試薬 (1.8 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で3時間反応させた。3時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、黄色の粉末を得た (収率: 61%)。分子式: $C_5H_4O_2S$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 46.56 (46.86); H, 2.85 (3.15). GC-EI(+)-MS (m/z): 128 (M^+). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_H 7.90 (s, 1H), 7.73 (s, 1H), 7.64 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.42 (d, $J=5.0$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $DMSO-d_6$) (ppm): δ_C 189.7, 154.2, 149.8, 136.8, 126.7.

3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-セレノン (hps)

hpo (3.6 mmol) を脱水トルエン中 (70 mL) で、80°Cまで加熱し、ウーリンス試薬 (1.8 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で12時間反応させた。12時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、暗赤色の固体を得た (収率: 52%)。分子式: $C_5H_4O_2Se$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 34.37 (34.31); H, 1.99 (2.30). GC-EI(+)-MS (m/z): 176 (M^+). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_H 8.06 (s, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.79 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.62 (d, $J=4.9$ Hz, 1H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_C 189.1, 156.7, 146.0, 132.8, 130.6.

3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-チオン (hmpt)

hmpt (3.2 mmol) を脱水トルエン中 (70 mL) で、80°Cまで加熱し、ローソン試薬 (1.6 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で1.5時間反応させた。1.5時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、黄色の固体を得た (収率: 53%)。分子式: $C_6H_6O_2S$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 50.70 (50.68); H, 4.02 (4.25). EI(+)-MS (m/z): 142 (M^+). 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_H 7.78 (s, 1H), 7.58 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.32 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 2.45 (s, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$) (ppm): δ_C 185.9, 150.6, 147.0, 145.3, 124.2, 15.0.

3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-セレンオン (hmpos)

hmpos (3.2 mmol) を脱水トルエン中 (70 mL) で、80°Cまで加熱し、ウーリンス試薬 (1.6 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で 12 時間反応させた。12 時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、その残渣を冷却することにより、暗赤色の固体を得た (収率: 57%)。分子式: $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2\text{Se}$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 38.11 (38.11); H, 2.98 (3.20). EI(+)-MS (m/z): 190 (M^+). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) (ppm): δ_{H} 7.83 (s, 1H), 7.68 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.56 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 2.32 (s, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3): δ_{C} 185.8, 154.2, 145.5, 145.0, 129.6, 15.6.

2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-チオン (ehpt)

ehpo (3.2 mmol) を脱水トルエン中 (70 mL) で、80°Cまで加熱し、ローソン試薬 (1.6 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で 1.5 時間反応させた。1.5 時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、その残渣を冷却することにより、黄色の固体を得た (収率: 60%)。分子式: $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2\text{S}$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 54.13 (53.82); H, 4.71 (5.16). EI(+)-MS (m/z): 156 (M^+). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) (ppm): δ_{H} 7.80 (s, 1H), 7.61 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 7.33 (d, $J=5.0$ Hz, 1H), 2.84 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.30 (t, $J=7.6$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) (ppm): δ_{C} 186.0, 149.9, 149.6, 147.1, 124.2, 22.4, 10.7.

2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-セレンオン (ehps)

ehpo (3.2 mmol) を脱水トルエン中 (70 mL) で、80°Cまで加熱し、ウーリンス試薬 (1.6 mmol) を加えて、窒素雰囲気下で 12 時間反応させた。12 時間後、室温まで冷却し、ひだろ紙を用いてろ過した。ろ液をエバポレーターで濃縮し、残渣をジクロロメタンでシリカゲルカラム (4.0-6.3 μm メッシュ) クロマトグラフィーを行い精製し、その残渣を冷却することにより、暗赤色の固体を得た (収率: 60%)。分子式: $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}_2\text{Se}$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 41.49 (41.39); H, 4.04 (3.97). EI(+)-MS (m/z): 204 (M^+). ^1H -NMR (400 MHz, CDCl_3) (ppm): δ_{H} 7.86 (s, 1H), 7.69 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 7.59 (d, $J=4.9$ Hz, 1H), 2.75 (q, $J=7.6$ Hz, 2H), 1.31 (t, $J=7.6$ Hz, 3H). ^{13}C -NMR (100 MHz, CDCl_3) (ppm): δ_{C} 185.9, 153.5, 149.4, 145.6, 129.6, 22.9, 10.2.

ビス (3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-オノ) Zn (II) ([Zn(hpo)₂])

hpo (0.89 mmol) を懸濁させた水溶液 (10 mL) に、 $\text{LiOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ (0.89 mmol) 水溶液 (5 mL) を加え、30 分間室温で攪拌した。30 分後、その水溶液に $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.45 mmol) 水溶液 (5 mL) を加え、5 時間攪拌した。ガラスフィルターで溶媒をろ過し、水で洗浄することで、淡黄色固体を得た (収率: 49%)。分子式: $\text{C}_{10}\text{H}_6\text{O}_6\text{Zn}$ 元素分析: 実測値 (理論値) C, 41.46 (41.77); H, 1.89 (2.10). EI(+)-MS (m/z): 204 (M^+). IR (cm^{-1}): 1578 ($\nu_{\text{C=O}}$), 3049 (ν_{OH}).

ビス (3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-チオノ) Zn (II) ([Zn(hpt)₂])

hpt (0.93 mmol) のメタノール溶液 (10 mL) に ZnSO₄·7H₂O (0.46 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 分間攪拌したのち、LiOH·H₂O (0.93 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、さらに 1 時間攪拌した。ガラスフィルターに沈殿をとり、得られた沈殿をアセトン：酢酸エチル=1:1 に溶解させ、ろ過した。そのろ液を濃縮することで、黄色の粉末を得た (収率 29%)。分子式：C₁₀H₆O₄S₂Zn 元素分析：実測値 (理論値) C, 37.49 (37.57); H, 1.62 (1.89). EI(+)-MS (*m/z*): 318 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 8.07 (s, 1H), 7.84 (d, *J*=4.5 Hz, 1H), 7.72 (d, *J*=4.5 Hz, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): δ_C 182.9, 162.0, 148.9, 140.5, 123.4.

ビス (3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-セレノ) Zn (II) ([Zn(hps)₂])

hps (0.57 mmol) メタノール溶液 (10 mL) に ZnSO₄·7H₂O (0.28 mmol) メタノール溶液 (15 mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 1 分間攪拌した。1 分後、LiOH·H₂O (0.57 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、さらに 1 時間攪拌した。ガラスフィルターに沈殿をとり、得られた沈殿を酢酸エチルに溶かしろ過した。そのろ液を濃縮することで、オレンジ色の粉末を得た (収率 16%)。分子式：C₁₀H₆O₄Se₂Zn 元素分析：実測値 (理論値) C, 28.81 (29.05); H, 1.23 (1.46). EI(+)-MS (*m/z*): 414 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 8.11 (d, *J*=0.6 Hz, 1H), 8.04 (d, *J*=4.4 Hz, 1H), 7.73 (dd, *J*=0.8, 4.5 Hz, 1H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_C 182.0, 164.4, 145.1, 140.6, 126.9.

ビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-オノ) Zn (II) 2.4 水和物 ([Zn(hmpo)₂]·2.4H₂O)

hmpo (3.0 mmol) を懸濁させた水溶液 (20 mL) に、LiOH·H₂O (3.0 mmol) 水溶液 (7 mL) を加え、30 分間室温で攪拌した。30 分後、その水溶液に ZnSO₄·7H₂O (1.5 mmol) 水溶液 (5 mL) を加え、5 時間攪拌した。ガラスフィルターで溶媒をろ過し、水で洗浄することで、白色固体を得た (収率：63%)。分子式：C₁₂H₁₀O₆Zn·2.4H₂O 元素分析：実測値 (理論値) C, 40.26 (40.16); H, 3.88 (4.16). EI(+)-MS (*m/z*): 314 (M⁺). IR (cm⁻¹): 1614 (ν_{C=O}), 3072 (ν_{OH}). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): δ_H 8.12 (d, *J*=5.1 Hz, 1H), 6.55 (d, *J*=5.1 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): δ_C 177.4, 153.4, 151.5, 149.4, 109.5, 14.4.

ビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-チオノ) Zn (II) ([Zn(hmpt)₂])

hmpt (0.70 mmol) のメタノール溶液 (10 mL) に LiOH·H₂O (0.70 mmol) のメタノール溶液 (5 mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 30 分間攪拌した。30 分後、ZnSO₄·7H₂O (0.35 mmol) のメタノール溶液 (5 mL) を加えさらに 2.5 時間攪拌した。その後アセトンで再結晶することで、黄色の沈殿を得た (収率 32%)。分子式：C₁₂H₁₀O₄S₂Zn 元素分析：実測値 (理論値) C, 41.41 (41.44); H, 2.62 (2.90). EI(+)-MS (*m/z*): 346 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 7.72 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 7.59 (d, *J*=4.6 Hz, 1H), 2.62 (s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_C 176.8, 160.0, 154.2, 144.6, 122.5, 16.6.

ビス (3-ヒドロキシ-2-メチル-4*H*-ピラン-4-セレノ) Zn (II) ([Zn(hmps)₂])

hmps (0.23 mmol) メタノール溶液 (10 mL) に ZnSO₄·7H₂O (0.11 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 5 分間攪拌したのち、LiOH·H₂O (0.23 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、さらに 1 時間攪拌した。ガラスフィルターに固体をとり、冷メタノールで洗浄し、オレンジ色の粉末を得た (収率 89%)。分子式: C₁₂H₁₀O₄Se₂Zn 元素分析: 実測値 (理論値) C, 32.72 (32.64); H, 2.15 (2.28). EI(+)-MS (*m/z*): 442 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 7.88 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.63 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 2.57 (s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_C 175.2, 162.4, 154.4, 143.3, 126.2, 17.2.

ビス (2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-オノ) Zn (II) ([Zn(ehpo)₂])

ehpo (3.0 mmol) を懸濁させた水溶液 (20 mL) に、LiOH·H₂O (3.0 mmol) 水溶液 (7 mL) を加え、30 分間室温で攪拌した。30 分後、その水溶液に ZnSO₄·7H₂O (1.5 mmol) 水溶液 (5 mL) を加え、5 時間攪拌した。ガラスフィルターで溶媒をろ過し、水で洗浄し、エタノールで再結晶することで、白色結晶を得た (収率: 77%)。分子式: C₁₄H₁₄O₆Zn 元素分析: 実測値 (理論値) C, 48.99 (48.93); H, 3.88 (4.11). EI(+)-MS (*m/z*): 342 (M⁺). IR (cm⁻¹): 1595 (ν_{C=O}), 2980 (ν_{OH}). ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): δ_H 8.12 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 6.55 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H), 2.34 (s, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) (ppm): δ_C 177.4, 153.4, 151.5, 149.4, 109.5, 14.4.

ビス (2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-チオノ) Zn (II) ([Zn(ehpt)₂])

ehpt (1.6 mmol) メタノール溶液 (10 mL) に、LiOH·H₂O (1.6 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、30 分間室温で攪拌した。30 分後、その溶液に ZnSO₄·7H₂O (0.80 mmol) 水溶液 (5 mL) を加え、1 時間攪拌した。ガラスフィルターで溶媒をろ過し、冷メタノールで洗浄し、エタノールで再結晶することで、黄色の結晶を得た (収率: 59%)。分子式: C₁₄H₁₄O₄S₂Zn 元素分析: 実測値 (理論値) C, 44.73 (44.74); H, 3.52 (3.76). EI(+)-MS (*m/z*): 374 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 7.75 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 7.59 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H), 3.06 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.29 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_C 176.9, 159.5, 158.3, 144.6, 122.5, 23.3, 10.5.

ビス (2-エチル-3-ヒドロキシ-4*H*-ピラン-4-セレノ) Zn (II) ([Zn(ehps)₂])

ehps (1.0 mmol) メタノール溶液 (10 mL) に ZnSO₄·7H₂O (0.50 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、窒素雰囲気下、室温で 5 分間攪拌した。5 分後、LiOH·H₂O (1.0 mmol) メタノール溶液 (5 mL) を加え、さらに 1 時間攪拌した。ガラスフィルターに固体をとり、冷メタノールで洗浄後、エタノールで再結晶することで、オレンジ色の結晶を得た (収率 36%)。分子式: C₁₄H₁₄O₄Se₂Zn 元素分析: 実測値 (理論値) C, 35.75 (35.81); H, 2.74 (3.01). EI(+)-MS (*m/z*): 470 (M⁺). ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_H 7.88 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 4.4 Hz, 1H), 3.02 (q, *J* = 7.5 Hz, 2H), 1.30 (t, *J* = 7.6 Hz, 3H). ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) (ppm): δ_C 175.1, 161.8, 158.4, 143.2, 126.1, 23.7, 10.2.

1-2-5 [Zn(hmps)₂] の X 線結晶データ取得と単結晶構造解析

[Zn(hmps)₂] の黄色板状単結晶は、メタノールとクロロホルムの混合液から再結晶することで得られた。X 線の回折強度測定に関しては、Rigaku R-AXIS RAPID II diffractometer (株式会社リガク、東京、日本) を用いて、単色化したモリブデン (Mo) -K α 線源で測定し取得した。構造解析は直接法により行い、フルマトリックス最小二乗法により精密化を行った。精密化に関しては、SHELXL-97 [48] を用いて行い、それ以外の計算は結晶学ソフトウェアパッケージである CrystalStructure 4.0 (株式会社リガク) を用いて行った。

[Zn(ehpt)₂] の角柱状及び [Zn(ehps)₂] の塊状単結晶は、酢酸エチルで再結晶することで得られた。X 線の回折強度測定に関しては、Rigaku R-AXIS RAPID II diffractometer を用いて、単色化した Cu-K α 線源で測定し取得した。構造解析は直接法により SHELXT Version 2014/5 [49] を用いて行い、フルマトリックス最小二乗法により精密化を行った。精密化に関しては、SHELXL Version 2016/6 [48] を用いて行い、それ以外の計算は結晶学ソフトウェアパッケージである CrystalStructure 4.2.5 (株式会社リガク) を用いて行った。

1-2-6 ヒドロキシピロン誘導体 Zn 錯体の分配係数 ($\log P_{\text{org/water}}$) 測定

Zn 錯体の $\log P_{\text{org/water}}$ はフラスコ振とう法を用いて求めた [50]。1 晩以上 (16 時間) 激しく攪拌し飽和させたクロロホルム及び超純水をそれぞれ、有機相と水相として用い、有機相に Zn 錯体をそれぞれ 50 μM となるように溶解させた (A)。A に対して同容量の超純水を混合させ、1 分間、室温で激しく攪拌し、Zn 錯体を水相と有機相へそれぞれ分配させ、水相及び有機相 (A') を得た。A 及び A' の吸光度を Agilent-8453 spectrometer (アジレントテクノロジー株式会社、カリフォルニア、アメリカ合衆国) を用いて測定し、以下の式から $\log P_{\text{org/water}}$ を算出した。O、S 及び Se 関連誘導体は、それぞれ、315-330、380-395 及び 405-420 nm における吸光度が、ピラン-4-オン、ピラン-4-チオン及びピラン-4-セレンオン環由来の吸光度であると判断した。

$$\log P_{\text{org/water}} = \log[\text{Abs A}' / (\text{Abs A} - \text{Abs A}')]]$$

1-2-7 ヒドロキシピロン誘導体 Zn 錯体の *in vitro* インスリン様活性の評価 [29]

8 週齢の雄性ウィスター/ST ラットを、エーテル麻酔下で放血致死させ、精巣上体周辺の白色脂肪細胞を摘出し、コラゲナーゼ含有 KRB-BSA 緩衝液 (120 mM NaCl, 1.27 mM CaCl₂·2H₂O, 1.20 mM MgSO₄, 4.75 mM KCl, 1.20 mM KH₂PO₄, 24 mM NaHCO₃, 2% BSA, pH 7.4) 中で 37°C、1 時間インキュベートし、脂肪組織を脂肪細胞へ分解させた。脂肪細胞を網目が 30 μm のガーゼに通し、KRB-BSA 緩衝液で洗浄した後、細胞数が 1.0×10^6 個となるように 1.7 mL エッペンドルフチューブに分注した。次にすべての細胞液に最終濃度が 5 mM となるようにグルコースを加えた後、Zn 化合物の溶液を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。対照として用いた ZnSO₄ は生理食塩水で溶解させ、Zn 錯体は水に不溶であったため、DMSO で懸濁させて調製し、DMSO の最終濃度は 2% となるようにした。そして、終濃度が 0.2 mM となるようにアドレナリンを加えて、37°C で 3 時間インキュベートした。その後、650 g、4°C で 10 分間遠心分離し、KRB-BSA 緩衝液中の FFA 及びグルコース濃度をそれぞれ、NEFA-C テス

トワコー及び富士ドライケム（富士フィルム株式会社、東京、日本）により測定した。Zn 錯体のインスリン様活性は IC_{50} 値及び最大グルコース取り込み量に対して 50%の取り込みを促進する試料濃度である EC_{50} 値を算出し、この二つの数値から評価した。

1-2-8 統計処理

すべての実験結果は平均値及び標準偏差として表し、統計学的処理には、エクセル 2013 上で、エクセル統計 2012（株式会社社会情報サービス、東京、日本）を使用し、多群間の比較には分散分析法及びポストホックテストの 1 つであるであるチューキー法を用いて行った。

1-3 結果

1-3-1 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン Zn 錯体の合成

Zn 錯体の合成に関して、各 Zn 錯体の元素分析と EI-MS(+) の結果より、中心金属である Zn イオンと配位子は 1:2 で存在していることが示唆された。有機 O-Zn 錯体に関して、IR の結果から、配位子で認められていたカルボニル基の伸縮振動のピークが低波数側にシフトしていたため、カルボニル基で Zn イオンに配位していることが示唆された {hmpo: 1655 ($\nu_{C=O}$), 3260 (ν_{OH}) 及び ehpo: 1647 ($\nu_{C=O}$), 3084 (ν_{OH})}. また有機 S-Zn 及び Se-Zn 錯体に関しては、 1H -NMR の結果より、配位子 (hpt, hps, hmpo, hmpt, hmpps, ehpo, ehpt 及び ehps) に関しては、3 位のヒドロキシ基のピーク (hpt: 7.73, hps: 7.80, hmpo: 8.85, hmpt: 7.78, hmpps: 7.83, ehpo: 8.66, ehpt: 7.80 及び ehps: 7.86 ppm) が配位子では存在するが、Zn 錯体では消失していた。これらの結果より、3 位のヒドロキシ基 ($-OH$) が塩基により O^- となり、Zn イオンに結合したことが示唆された。また、 ^{13}C -NMR の結果より、O を配位原子にもつ Zn 錯体は、その配位子に比べて O^- 基の根元の C3 及びカルボニル基の C4 が他の炭素よりも大きくシフトした (Table 1-1[A])。そのため、 O^- 基及びカルボニル基で Zn イオンに結合しているものと考えられた。また、S 及び Se を配位原子に持つ Zn 錯体は、その配位子に比べて、C2 及び C3 は低磁場に、そして C4 は高磁場にケミカルシフトが大きく変化した (Table 1-1[B] and [C])。C2 及び C3 の低磁場シフトは、生成した O^- 基が Zn イオンに結合したことにより、フェノール性 OH 基による共鳴安定化が減少すること、もしくは、Zn イオンに電子が吸引されることで、C2 および C3 の電子密度が低下したため生じたと考えられた。C4 の高磁場シフトは、ドナー・アクセプター相互作用により S 及び Se 原子の電子密度が増加したため生じたと考えられた [51]。ドナー・アクセプター相互作用とは、アクセプター原子である Zn とドナー原子である S 及び Se との間に分極した結合が生成したことで、Zn 原子からのスピルオーバー効果により、S 及び Se 原子の電子密度が増加する作用を言う。以上の結果から、配位子の O^- 基とチオカルボニルもしくはセレンカルボニル基が、Zn イオンに結合していることが示唆された。以上の知見より、Zn 錯体の構造を決定した (Fig. 1-2)。

次に、黄色板状単結晶の $[Zn(hmps)_2]$ がクロロホルム/メタノール混合溶液より、並びに角柱及び塊状単結晶の $[Zn(ehpt)_2]$ 及び $[Zn(ehps)_2]$ がそれぞれ酢酸エチル溶液より得られたため、X 線結晶構造解析を行った。その結果、この 3 つの Zn 錯体において、配位子が 2 つの S または Se 及び O 原子により、トランス位で Zn イオンに結合した歪んだ 4 配位四面体構造をしていることを見出した (Fig. 1-3)。この構造は、元素分析、EI-MS(+) 及び NMR で決定した構造を支持する結果であった。すでに報告されている $[Zn(thiomaltol)_2]$ ($= [Zn(hmpt)_2]$) [52] の X 線結晶構造と比較したところ、 $[Zn(thiomaltol)_2]$ では、配位子である thiomaltol が 2 つの S 及び O 原子により、トランス位で Zn イオンに結合した歪んだ 4 配位四面体構造をしており、今回測定できた 3 つの Zn 錯体と同様の構造をしていることが示唆され、構造的類似性が見出された。

Table 1-1. ¹³C-NMR chemical shift data for organo-chalcogen ligands and the corresponding Zn complexes; [A] organo-oxygen (O), [B] organo-sulfur (S), [C] organo-selenium (Se) ligands and the corresponding Zn complexes.

[A]

Compound	Chemical shift (ppm)				
	C2	C3	C4	C5	C6
hmpo	149.2	142.8	172.4	113.4	154.5
[Zn(hmpo) ₂]	149.4	151.5	177.4	109.5	153.4
Δδ	+0.3	+8.7	+4.9	-3.9	-1.2
ehpo	153.3	142.3	172.8	113.5	154.8
[Zn(ehpo) ₂]	154.0	151.0	177.8	109.6	153.6
Δδ	+0.6	+8.7	+5.0	-3.9	-1.2

[B]

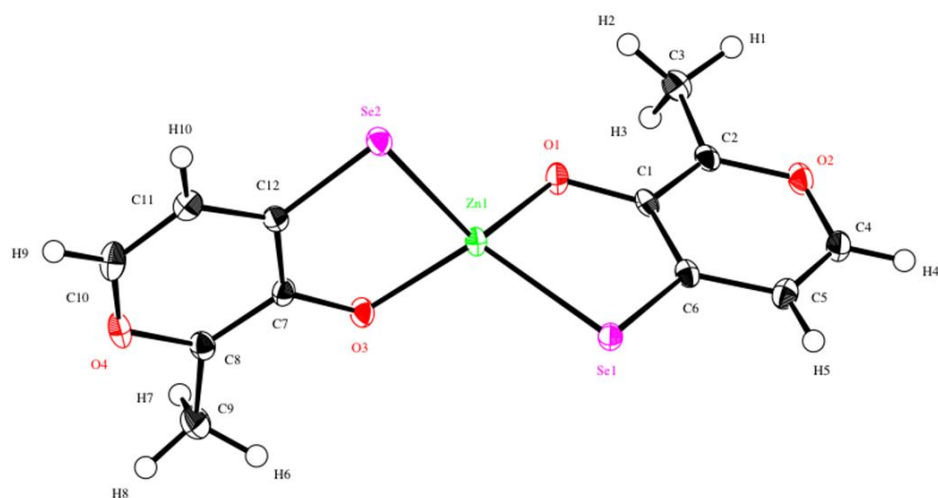
Compound	Chemical shift (ppm)				
	C2	C3	C4	C5	C6
hpt	136.8	154.2	189.7	126.8	149.8
[Zn(hpt) ₂]	140.5	162.0	182.9	123.4	148.9
Δδ	+3.7	+7.8	-6.8	-3.4	-0.9
hmpt	145.3	150.6	185.9	124.2	147.0
[Zn(hmpt) ₂]	154.2	156.0	176.8	122.5	144.6
Δδ	+9.0	+9.4	-9.1	-1.7	-2.4
ehpt	149.6	149.9	186.0	124.2	147.1
[Zn(ehpt) ₂]	158.3	159.5	176.9	122.5	144.6
Δδ	+8.6	+9.5	-9.1	-1.7	-2.5

[C]

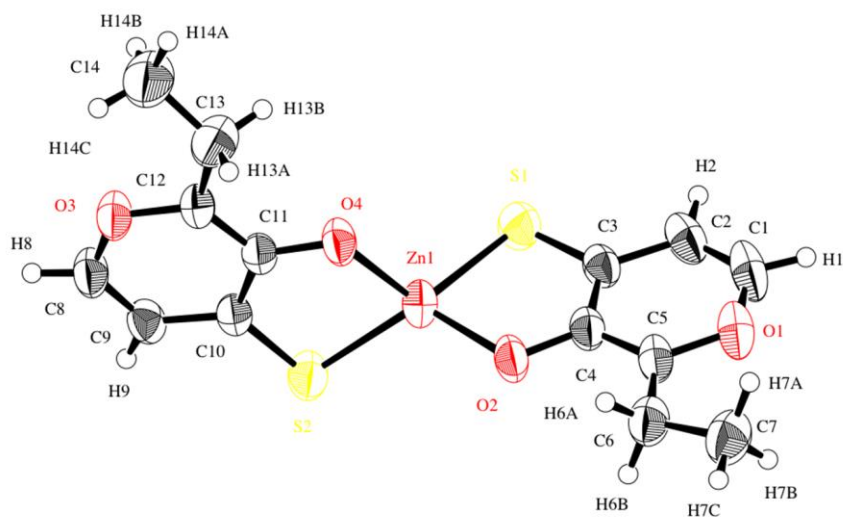
Compound	Chemical shift (ppm)				
	C2	C3	C4	C5	C6
hps	132.8	156.7	189.1	130.6	146.0
[Zn(hps) ₂]	140.6	164.4	182.0	126.9	145.1
Δδ	+7.8	+7.6	-7.1	-3.7	-0.9
hmpps	145.0	154.2	185.8	129.6	145.5
[Zn(hmpps) ₂]	154.4	162.4	175.2	126.2	143.3
Δδ	+9.4	+8.2	-10.7	-3.4	-2.2
ehps	149.4	153.5	185.9	129.6	145.6
[Zn(ehps) ₂]	158.4	161.8	175.1	126.1	143.2
Δδ	+9.0	+8.3	-10.8	-3.5	-2.3

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Supplementary Information より引用し一部追記及び改変した。)

[A]



[B]



[C]

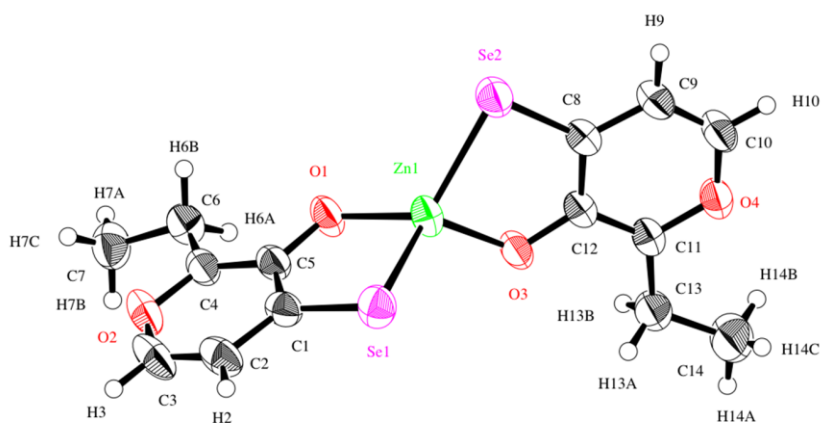


Fig. 1-3. ORTEP (Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program) drawing of [A] $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$, [B] $[\text{Zn}(\text{ehpt})_2]$ and [C] $[\text{Zn}(\text{ehps})_2]$. (Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 2. より引用し一部追記及び改変した。)

1-3-2 ヒドロキシピロン誘導体有機カルコゲン錯体の *in vitro* インスリン様活性の評価

合成したヒドロキシピロン誘導体有機 O-及び Se-Zn 錯体の *in vitro* インスリン様活性を調べるために、著者は溶液中でイオンとなる ZnSO₄ 及び合成した Zn 錯体を用いて、過去に確立した評価系 [29] を用いて、ラット脂肪細胞における FFA 放出抑制活性 (IC₅₀) 及び脂肪細胞へのグルコースの取込活性 (EC₅₀) を測定し評価した。その結果、すべての Zn 錯体において、ZnSO₄ と比べ、高い FFA 放出抑制活性及びグルコース取込活性を示した (Table 1-2)。そして、有機 O-Zn 錯体よりも、有機 S-及び Se-Zn 錯体のほうが非常に高い活性を示した (Table 1-2)。この傾向は、著者の所属する研究室の過去の報告と一致しており [37]、さらに、Zn 錯体の中では、マルトールを基本骨格に持った Zn 錯体が、ヒドロキシピロン及びエチルマルトールを基本骨格に持った Zn 錯体よりも、強力なインスリン様活性を示すことがわかった。

Table 1-2. IC₅₀ values for FFA release, EC₅₀ values for glucose uptake, and Log*P* of Zn complexes.

Zn compound	IC ₅₀ (μM)	EC ₅₀ (μM)	Log <i>P</i> _{org/water}
ZnSO ₄	585 ± 305	N.D.	None
[Zn(hpo) ₂]	166 ± 75	N.D.	None
[Zn(hmpo) ₂]	166 ± 36	233 ± 7	-1.94 ± 0.06 [‡]
[Zn(ehpo) ₂]	189 ± 31	110 ± 48	-1.30 ± 0.02 ^{#‡}
[Zn(hpt) ₂]	12 ± 1	5 ± 1	0.52 ± 0.02
[Zn(hmpt) ₂]	2 ± 1	4 ± 1	0.62 ± 0.13
[Zn(ehpt) ₂]	11 ± 2	3 ± 1	0.56 ± 0.10
[Zn(hps) ₂]	108 ± 57	44 ± 7	1.11 ± 0.07
[Zn(hmps) ₂]	8 ± 1 ^{*#†}	3 ± 0 [†]	1.39 ± 0.13 ^{#†‡}
[Zn(ehps) ₂]	12 ± 1 ^{*#†}	5 ± 1 [†]	1.43 ± 0.08 ^{#†‡}

Data are expressed as mean ± SDs. Statistical analysis was performed by Tukey test. Significance: **p* < 0.01 vs. [Zn(hpo)₂], [#]*p* < 0.01 vs. [Zn(hmpo)₂], [†]*p* < 0.01 vs. [Zn(ehpo)₂], [‡]*p* < 0.01 vs. [Zn(hps)₂].

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Table 1 より引用し一部追記した。)

1-4 考察

先行研究において、 Se_2O_2 型の Zn 錯体が、強力な *in vitro* インスリン様活性及び *in vivo* 抗糖尿病効果を持つことを報告した [37]。しかし、 Se_2O_2 型の Zn 錯体の評価をした例は、 $[\text{Zn}(\text{spno})_2]$ の一例のみであり、更なる高活性な Zn 錯体を求めて、新規有機 Se-Zn 錯体の合成を行った。そこで、*in vitro* インスリン様活性が Zn イオンよりも高いことを著者の所属する研究室で報告した $[\text{Zn}(\text{mal})_2]$ に注目し、その基本骨格であるヒドロキシピロンのカルボニル基をセレノカルボニル化することで、強力な *in vitro* インスリン様活性が予想される Se_2O_2 型の Zn 錯体の合成を試みた。

合成は、セレノカルボニル化試薬であるウーリンズ試薬を用いた。ウーリンズ試薬は、チオカルボニル化試薬であるローソン試薬の Se 化アナログであり、比較的安全に Se 原子をカルボニル基に挿入できる試薬である [45]。今回の実験では、約 50-60% という比較的良好な収率で有機 Se 配位子を合成することが出来た。また、 $[\text{Zn}(\text{spno})_2]$ では困難であった X 線結晶構造の測定が、今回、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ では可能であったため、有機 Se-Zn 錯体の化学構造的な知見を得るために、Se を配位原子にもつ、既報にある Se_2O_2 型の Zn 錯体の X 線結晶構造（ビス (*N,N*-ジエチル-*N'*-ベンゾイル-セレノウレイト) Zn (II) [53]、ビス {*N,N*-ジエチル-*N'*-(2-フルオロ) ベンゾイル-セレノウレイト} Zn (II) (1) 及びビス {*N,N*-ジエチル-*N'*-(2-フルオロ) ベンゾイル-セレノウレイト} Zn (II) (2) [54]）と比較した (Fig. 1-4)。4 つの Zn 錯体の構造は、配位子 2 分子のトランス位に位置した Se 及び O 原子で、Zn イオンに結合した歪んだ 4 配位四面体構造をしていた (Fig. 1-4)。結合距離及び結合角度は 4 つの錯体でほぼ同様の値を示した (Table 1-3)。

Zn 錯体のインスリン様活性に関しては、有機 S 及び Se-Zn 錯体が、 ZnSO_4 や有機 O-Zn 錯体に比べて非常に強力な *in vitro* インスリン様活性を示した。Zn は HSAB 則に基づく、比較的ソフトな酸に分類される。そのため配位原子が O 原子よりもソフトな塩基である S 及び Se に変換されると、その結合力が上昇するために、Zn 錯体の安定性が向上することが予想される。さらに Zn イオンは 2 価のカチオンであり、細胞膜の透過性は一般的には悪い。しかし、錯体化することにより、中性分子の Zn 錯体となるため、Zn 錯体の受動拡散による細胞膜透過性が向上し、今回のように非常に高い *in vitro* インスリン様活性を示すと考えられた。

さらに、著者らの過去の研究結果より、ジチオカルバメート誘導体 Zn 錯体では、Zn 錯体の $\text{Log}P_{\text{org/water}}$ が上昇すると *in vitro* インスリン様活性も上昇し、その相関関係が示唆されている [36]。そのため、今回合成した Zn 錯体の $\text{Log}P_{\text{org/water}}$ と IC_{50} 及びグルコース取込活性に関して、相関関係があるかどうかを調べた。今回の研究においても、 $\text{Log}P_{\text{org/water}}$ と、 IC_{50} や EC_{50} と相関関係があり、特に、 IC_{50} との相関係数の R 値は 0.812 であり、強い負の相関が認められた (Fig. 1-5[A])。加えて、 EC_{50} との R 値は 0.889 であり、こちらも強い負の相関が認められた (Fig. 1-5[B])。

しかしながら、今回合成した Se_2O_2 型の Zn 錯体の IC_{50} は、以前合成した S_2O_2 型の $[\text{Zn}(\text{opt})_2]$ ($\text{IC}_{50} = 12.6 \mu\text{M}$) [41] 及び Se_2O_2 型の $[\text{Zn}(\text{spno})_2]$ ($\text{IC}_{50} = 7.4 \mu\text{M}$) [37] とほぼ同じ値を示した。そのため、配位原子を O から、S または Se に変換することによって、Zn 錯体のインスリン様活性は劇的に上昇するが、S から Se への変換に伴う更なる活性上昇は認められないことが分かった。

Table 1-3. [A] Selected bond distance (Å) and [B] angle (°) for the [Zn(hmps)₂], Bis[*N, N*-diethyl-*N'*-benzoyl-seleno-ureato]Zn(II), Bis[*N, N*-diethyl-*N'*-(2-fluor)benzoyl-seleno-ureato]Zn(II)(1), and Bis[*N, N*-diethyl-*N'*-(2-fluor)benzoyl-seleno-ureato]Zn(II)(2)

[A]

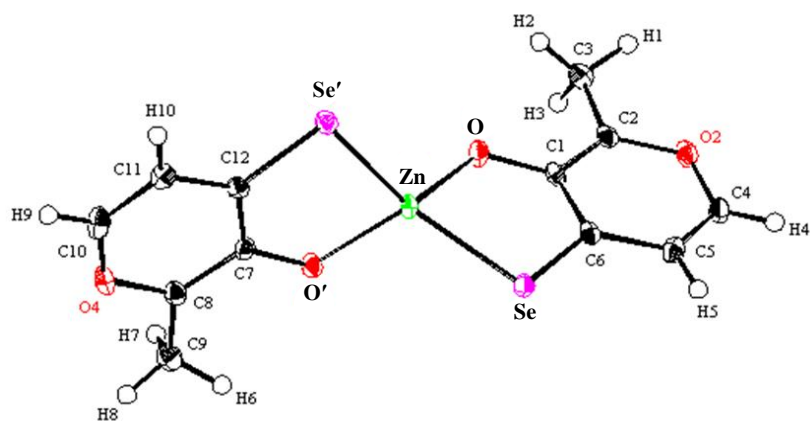
	[Zn(hmps) ₂]	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - benzoyl- seleno-ureato]Zn(II)	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - (2-fluor)benzoyl- seleno-ureato]zinc(II) (1)	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - (2-fluor)benzoyl- seleno-ureato]zinc(II) (2)
Zn-Se	2.426 (5)	2.394 (3)	2.383 (1)	2.381 (1)
Zn-Se'	2.421 (5)	2.369 (4)	2.389 (1)	2.383 (1)
Zn-O	1.961 (2)	1.967 (3)	1.967 (3)	1.950 (3)
Zn-O'	1.974 (3)	1.962 (3)	1.962 (3)	1.959 (3)

[B]

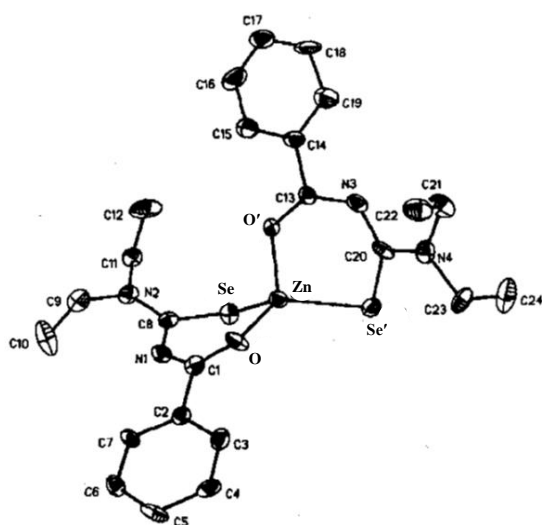
	[Zn(hmps) ₂]	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - benzoyl- seleno-ureato]Zn(II)	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - (2-fluor)benzoyl- seleno-ureato]zinc(II) (1)	Bis[<i>N, N</i> -diethyl- <i>N'</i> - (2-fluor)benzoyl- seleno-ureato]zinc(II) (2)
Se-Zn-Se'	125.6 (2)	127.8 (1)	not shown	not shown
O-Zn-O'	120.2 (10)	106.8 (5)	not shown	not shown
Se-Zn-O'	90.03 (7)	99.0 (3)	99.37 (9)	99.08 (9)
Se'-Zn-O'	90.48 (7)	98.5 (3)	98.67 (5)	99.24 (9)

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Table 4 より引用し一部改変した。)

[A]



[B]



[C]

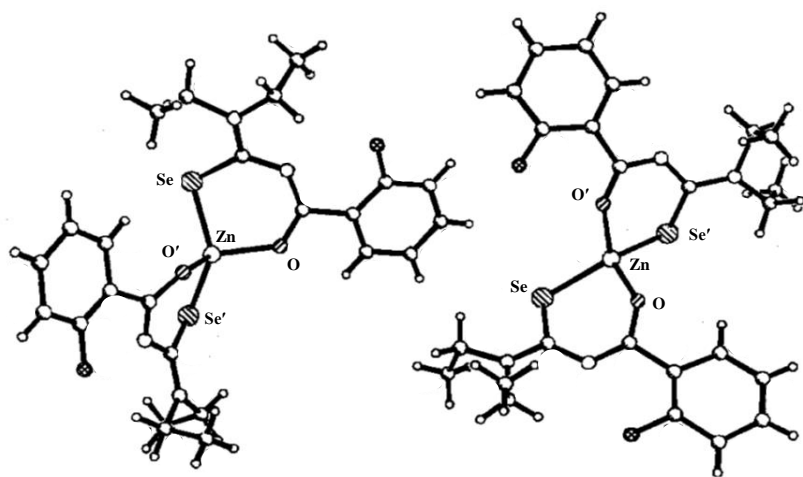
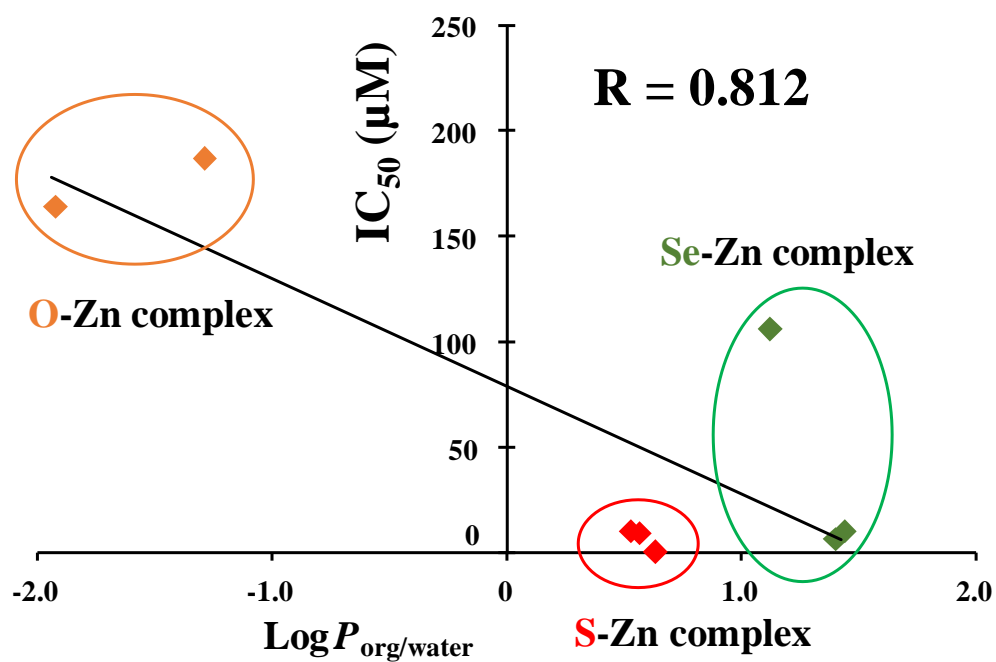


Fig. 1-4. ORTEP drawing of [A] $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$, [B] $\text{bis}[N, N\text{-diethyl-}N'\text{-benzoyl-seleno-ureato}]\text{Zn}(\text{II})$, and (C) $\text{bis}[N, N\text{-diethyl-}N'\text{-(2-fluor)benzoyl-seleno-ureato}]\text{Zn}(\text{II})$ (1) (Left), and $\text{bis}[N, N\text{-diethyl-}N'\text{-(2-fluor)benzoyl-seleno-ureato}]\text{Zn}(\text{II})$ (2) (Right)

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 2. より引用し一部追記及び改変した。)

[A]



[B]

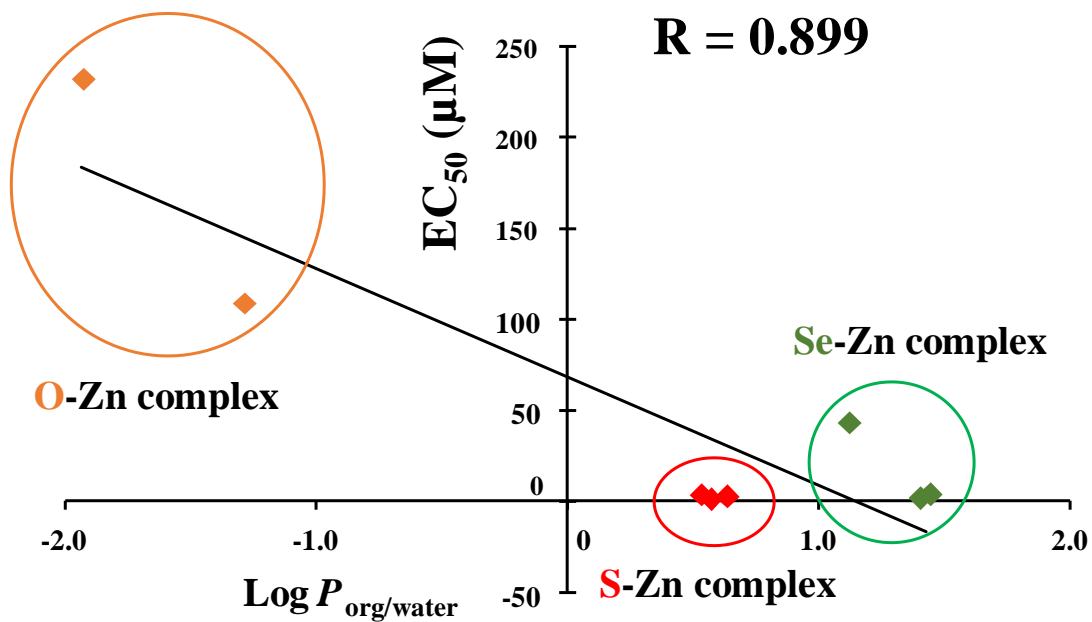


Fig. 1-5. The relationships between [A] the FFA release inhibitory effect (IC_{50}), [B] the glucose uptake effect (EC_{50}) and partition coefficient ($\text{Log } P$).

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 7. より引用し一部追記および改変した。)

第2章 チオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体の ob/ob マウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析

2-1 緒言

筆者の所属する研究室では、以前より、2型糖尿病モデル KKA^{Y} マウスに Zn 錯体を投与して、その抗糖尿病効果を評価してきた [31, 32, 35-37, 39-42]。 KKA^{Y} マウスは糖尿病を自然発症する KK マウスに、致死性、黄色毛色及び肥満などをコードする A^{Y} 遺伝子を導入し、早期より糖尿病を発症させることを目的に作成されたマウスである [55]。そのため、適切な Normal 群が存在しないという欠点がある。また、本研究室で Zn 錯体の抗糖尿病効果を調べる動物実験では、 KKA^{Y} マウスを用いた実験がその大部分を占めており、他の糖尿病モデルマウスにおいて糖尿病治療効果を調べた例はほとんど存在しない。現在臨床で用いられているピオグリタゾン（商品名：アクトス）は、 KKA^{Y} マウスのみならず、他の2型糖尿病モデル動物である WF（Wistar Fatty）ラット及び GK（Goto-Kakizaki）ラットにおいても、血糖降下作用や耐糖能異常改善作用などの糖尿病治療効果が示されており [56]、その広い抗糖尿病効果が期待され、抗糖尿病薬として臨床で使用されている。

レプチン欠損型2型糖尿病モデル ob/ob マウスは、レプチンの産生異常によりその機能が消失しているため、過食、肥満、高血糖、高インスリン血症及びインスリン抵抗性を示し、広く2型糖尿病治療に対する *in vivo* 実験に使用されてきたマウスである [57]。さらに、ob/ob マウスには、 KKA^{Y} マウスにおいて度々問題となる適切な Normal 群が存在する。以上の背景から第2章では、非常に高い *in vitro* インスリン様活性を示したチオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ を、 KKA^{Y} マウスとは異なる糖尿病発症機序をもつ ob/ob マウスに投与して、抗糖尿病効果の評価を行うことを試みた。

また、著者の所属する研究室では、Zn 錯体が抗糖尿病効果を示す標的臓器について、様々な提案を行ってきたが [35, 43, 58]、まだ完全に解明はできていない。加えて、Zn 錯体の中心金属である Zn イオンが抗糖尿病効果を示しているのか、もしくは、Zn 錯体が抗糖尿病効果を示しているのかが不明である。Zn 錯体の臓器分布は、Zn 錯体を投与し、原子吸光光度法や ICP-MS 法を用いて、臓器中の Zn 濃度を定量することから求める方法や、Zn の放射性同位体 (RI) である ^{65}Zn を、中心金属である Zn と置換させた ^{65}Zn 錯体を、動物に投与し、その臓器中における放射活性を調べる手法で解析してきた [43]。しかしながら、前者において定量しているのは中心金属である Zn のみであり、配位子と Zn との関係性が不明である。また後者においては、少量が放射標識された ^{65}Zn の臓器分布を調べていることから、安定同位体である Zn の臓器分布を完全には反映しているとは言えない。その上、RI は取り扱いや操作が煩雑で、特別な施設が必要であり、人体に対する影響も懸念されるため、非 RI 下において臓器分布を解析できることは重要である。そこで筆者は、今回投与した Zn 錯体の中で、ICP-MS 法により測定できる Se を配位原子にもつ $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ に注目した。有機 Se-Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は、その配位子中に Se を含有しており、臓器中 Se 濃度を定量することにより、配位子の臓器分布を推定できると考えた。そして、臓器中 Zn 濃度の定量結果と合わせて考えることで、Zn 錯体の臓器分

布を推定することが可能ではないかと考えた。そのため、今回の実験では、ICP-MS 法により、臓器中の Zn 及び Se 濃度を同時に定量し、Zn 錯体を投与している動物の臓器中 Zn 及び Se 濃度との差である $\Delta[\text{Zn}]$ 及び $\Delta[\text{Se}]$ を算出した上で、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ のモル濃度比を求め、Zn 錯体の臓器分布を調べた。

また、近年、著者の所属する研究室では、KKA^yマウスにおいて、肝臓及び膵ラ氏島に対する V や Zn 錯体の影響の検討を行い、肝臓に対する脂肪蓄積の抑制作用や、糖尿病状態の膵臓において、インスリン抵抗性により生じる膵ラ氏島肥大化の抑制作用を示すことも明らかにしている [59]。そのため、上記に挙げた組織形態学的な改善効果についても同時に調べ、Zn 錯体の臓器分布とともに包括的に評価することで、Zn 錯体が抗糖尿病効果を示す標的臓器を推定できるのではないかと考え実験を行った。

2-2 実験材料及び実験方法

2-2-1 試薬

ob/ob マウスへの投与実験

ポリエチレングリコール 400 (PEG400) 及び生化学用イソフルランは和光純薬工業株式会社より購入した。ヘパリンナトリウム注 N1 単位/10 mL 「AY」はエイワイファーマ株式会社（東京、日本）より購入した。

ICP-MS による臓器中 Zn 及び Se 濃度の定量

有害金属測定用硝酸 (1.38)、イットリウム (Y) 標準液、Zn 標準液、Se 標準液は、和光純薬工業株式会社より購入した。

組織染色

リン酸水素二ナトリウム十二水和物 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)、リン酸二水素ナトリウム二水和物 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、ホルムアルデヒド液及びパラフィン (パソプレップ 546) は和光純薬工業株式会社より購入した。キシレンはナカライテスク株式会社（京都、日本）より購入した。マイヤーヘマトキシリン及びエオジンはサクラファインテックジャパン株式会社（東京、日本）より購入した。エタノールは、純正化学株式会社（東京、日本）より購入した。エンテランニューはメルク株式会社（東京、日本）より購入した。

肝臓中の TG 及びグリコーゲン量の定量

クロロホルム及びメタノールは純正化学より購入した。塩化ナトリウム、水酸化カリウム、硫酸ナトリウム、2-プロパノール、トリグリセライド E テストワコー、塩酸及びグルコース CII テストワコーは和光純薬工業株式会社より購入した。牛肝臓由来グリコーゲンはシグマアルドリッチ社より購入した。

上記、すべての有機溶媒、酸塩基試薬及び無機試薬は、一級ないし特級品を用いた。すべての水溶液は、ミリ-Q 超純水装置システム（日本ミリポア、東京、日本）により調製した超純水（比抵抗値 $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ）を用いて作成した。

2-2-2 動物

Normal 群である 8 週齢の雄性 C57BL/6J +/+ マウス及び糖尿病モデルである 8 週齢の雄性 C57BL/6J ob/ob マウスは、清水実験材料株式会社より購入した。C57BL/6J ob/ob マウス及び C57BL/6J +/+ マウスは実験開始の 10 週齢まで馴化させ、C57BL/6J ob/ob マウスは血糖値が約 400 mg/dL 程度まで上昇し、体重が約 45 g 程度のマウスを集めて実験を行った。動物は実験開始まで、KPU-BSRC で、12 時間周期の照明調節、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 及び湿度 $60 \pm 10\%$ の飼育条件下において、固形飼料 MF 及び BSRC で調

製された滅菌水を自由摂取させ飼育した。すべての動物実験は KPU 動物実験委員会により許可され、KPU の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

2-2-3 チオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体の 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスに対する抗糖尿病効果の検討

10 週齢の ob/ob マウスに、PEG-400 に懸濁させた Zn 錯体を、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ は 2.5-10 mg Zn/kg body weight、そして $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ は 1.0-5.0 mg Zn/kg body weight の投与量で 28 日間の連続経口投与を行った。Normal 群及び Control 群には溶媒である PEG-400 を投与した。随時血糖値、体重、摂餌量及び摂水量を測定し、血糖値は尾静脈血を用いてグルコカード（アークレイ、京都、日本）で測定した。28 日間投与後、OGTT を実施し、HbA1c を測定した。OGTT では、マウスを 12 時間絶食させ、0 分の血糖値を測定し、グルコースを経口投与（1 g グルコース/kg body weight）させた後、血糖値を 15、30、45、60、90 及び 120 分のタイムポイントで測定した。HbA1c は尾静脈血を用いて、DCA2000（バイエルメディカル株式会社、東京、日本）を用いて測定した。

さらに、12 時間絶食させたのち、イソフルラン麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて、下大静脈より採血した。血液試料を、650 g、4°C で 15 分間遠心分離し、上清をとり、遠心分離を上述の条件で再度行い、その上清を血漿試料とした。その後 AST、ALT、BUN、TG、T-CHO 及び ALP を富士ドライケムにより測定し、血漿インスリンは超高感度マウスインスリン測定キット（森永生科学研究所株式会社、神奈川、日本）を用いて測定した。血漿アディポネクチンはアディポネクチン測定キット（R&D Systems Inc.、ミネアポリス、アメリカ合衆国）を用いて、ELISA 法により測定した。採血後、マウスを解剖し、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、骨格筋（大腿筋）、骨（大腿骨）を摘出した。

2-2-4 Zn 錯体の臓器分布の評価ならびに $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ の臓器中化学形態の推定

投与した Zn 錯体の臓器分布を調べるために、ICP-MS を用いて、臓器中の Zn 及び Se 濃度を定量した。Se は揮散しやすい元素であるため、閉鎖系で低温の条件下において灰化を行った。メスフラスコに臓器を適量とり、5% HNO_3 を 5 mL 入れ、ふたをしてホットプレート上で約 110°C、5 時間灰化を行った。その後、得られた溶液を 15 mL の遠沈管へ移し、1,250 g で 15 分間遠心分離を行った。遠心後得られた上清を 5% HNO_3 で適切に希釈して測定溶液とした。検量線試料は濃度が 0、5、10、50、100、500 ppb の溶液を作成し、内標準の 1 ppm Y 溶液を、測定溶液 9 mL に対して、10 μL の液量で、検量線試料と測定溶液にそれぞれ加えた。その後、臓器中の Zn 及び Se 濃度を ICP-MS 7700x（アジレントテクノロジー株式会社）を用いて定量した。

2-2-5 染色

解剖の際、組織切片作成のための試料（肝臓及び膵臓の一部）を 10% 中性緩衝ホルマリン液（Table 2-1）へ入れ、約 1 週間浸漬させた後、染色の前処理として包埋処理を行った。肝臓は右葉の一部の中心を約 3 mm の厚みに剃刀で切り、膵臓に関してはそのままオートプロセッサにかけ包埋処理（Table 2-2）を行い、ティシュー・テック TEC プラス ディスペンシング・コンソール（サクラファインテッ

クジャパン、東京、日本) で、パラフィン包埋ブロックを作成した。

Table 2-1. 10% Formalin neutral buffer

NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	4.52 g
Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O	16.39 g
Formaldehyde	100 mL
H ₂ O	900 mL

Table 2-2. The condition of auto-processor

	Processing time (hr)	Set temperature	Pressurization or depressurization	Stir
70 v/v% Ethanol	3:00	—	ON	ON
80 v/v% Ethanol	2:00	—	ON	ON
90 v/v% Ethanol	1:00	—	ON	ON
95 v/v% Ethanol	1:00	—	ON	ON
100 v/v% Ethanol	1:30	—	ON	ON
100 v/v% Ethanol	1:30	—	ON	ON
Xylene	0:30	—	ON	ON
Xylene	0:30	—	ON	ON
Paraffine	2:00	60°C	ON	ON
Paraffine	2:00	60°C	ON	ON
Paraffine	2:00	60°C	ON	ON
Paraffine	2:00	60°C	ON	ON

ブロック作成後、ミクロトーム（ライカバイオシステムズ株式会社、東京、日本）を用いて、3 μm に薄切し、スライドガラス上にとり、37°Cの板の上で一晩伸展させたのち、染色専用かごに入れ、HE染色を行った。以下に染色の手順を示す。

HE 染色手順

脱パラフィン

キシレン→キシレン→キシレン→100%エタノール→100%エタノール→95%エタノール→90%エタノールの順番に、30 回染色専用かごを溶媒中で振り、脱パラフィンを行った。

染色

ヘマトキシリン液につけ、3 分間染色させたのち、流水で余分なヘマトキシリン液を約 1 分間洗い流した。ペーパータオルで軽く水気を切った後、エオジン液で 2 分間染色した。流水で余分なエオジン液を約 1 分洗い流したのち、先ほどと同じく水気を切った。

脱水

80%エタノール→90%エタノール→95%エタノール→100%エタノール→100%エタノール→キシレン→キシレンの順番で、染色専用かごを 10 回程度振り、脱水を行った（100%エタノール及びキシレンについては 15 回振った）。

封入

スライドガラスのキシレンを軽くふき取り、封入剤であるエンテランニューを載せたスライドガラスを組織の上にかぶせ、キムワイプでカバーガラスを上から押し付け、封入した。約 1 時間以上経過したのち、顕微鏡で観察を行った。

HE 染色された組織切片は、Moticam T2（島津製作所、京都、日本）を用いてデジタル画像化を行った。画像解析には、WinROOF2015（三谷商事株式会社、東京、日本）を用いて、肝臓 1 切片中のグリコーゲン及び脂肪の割合を求めグラフ化した。また、膵臓切片において、膵臓 1 切片の面積、膵ラ氏島の面積及び個数を測定し、膵臓 1 切片当たりの膵ラ氏島の面積割合、膵ラ氏島の平均サイズ及び単位面積当たりの膵ラ氏島の個数を測定し、Zn 錯体投与による、膵ラ氏島への影響を調べた。

2-2-6 肝臓中の TG 及びグリコーゲン量の定量

肝臓中の TG は Folch 法 [60]を参考にして抽出を行った。肝臓 1 片をガラス製ホモジナイザーにいれ、クロロホルム：メタノール = 2:1 溶液を 4 mL 加えて、3,000 rpm で、50 回、ホモジナイザー用攪拌機（アズワン株式会社、大阪、日本）を用いてホモジナイズを行った。15 mL 遠沈管へ移し、クロロホルム：メタノール = 2:1 溶液 4 mL で共洗いし、0.5% 塩化ナトリウム水溶液 2 mL を加え、ボルテックスで激しく攪拌し、室温、600 g で 20 分間遠心分離を行った。下層のクロロホルム層をガラス製の試験管にとり、固相インキュベーターで 40°C に加熱しながら、窒素ガスを吹き付けて、クロロホルムを蒸発させた。その残差に 2-プロパノール 1 mL を加え、60 分間超音波を当て溶解させ、脂肪抽出液とした。抽出液の TG 量はトリグリセリド E-テストワコーを用いて定量した。

肝臓中グリコーゲンは、肝臓 1 片を 30% KOH aq 3.0 mL 中で、沸騰水浴中で 25 分加熱し、肝臓を溶

解させた。氷中で試験管を 5 分間冷却させ、飽和硫酸ナトリウム溶液 0.3 mL を加え、よく混和させた。95% エタノール 5.0 mL を加え、グリコーゲンを沈殿させ、遠沈管へ移し 1,250 g で 5 分間遠心分離した。上清を捨て、超純水 5 mL を加えよく混和させて沈殿を溶かし、7.5 mL までメスアップをした。これをグリコーゲン抽出液とした。グリコーゲン抽出液を 1.2 M HCl により、グリコーゲンを加水分解し、生成したグルコース CII テストワコーを用いて定量することにより、グリコーゲン量を求めた。

2-2-7 統計処理

すべての実験結果は平均値及び標準偏差として表し、統計学的処理には、エクセル 2016 上で、エクセル統計（株式会社社会情報サービス、東京、日本）を使用し、外れ値検定であるスミルノフ・グラブス検定及び多群間の比較には分散分析法に加えてチューキー・クレーマー法、またはノンパラメトリック検定であるスティール・ドゥワス法を用いて行った。

2-3 結果

2-3-1 チオマルトール及びセレノマルトールによる有機 S-及び Se-Zn 錯体の 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスに対する抗糖尿病効果の検討

1-3-2 に示す *in vitro* 実験の結果より、ob/ob マウスにおいて Zn 錯体による抗糖尿病効果が期待されたため、[Zn(hmpt)₂] 及び [Zn(hmps)₂] による 28 日間連続経口投与実験を行った。Zn 錯体投与群において、投与実験終了時には、約 200 mg/dL 付近まで血糖値を低下させた。さらに、[Zn(hmps)₂] 投与群では、[Zn(hmpt)₂] 投与群よりも低用量で血糖降下作用を示した (Fig. 2-1)。また、HbA1c 値は Control 群と比べ、[Zn(hmpt)₂] 及び [Zn(hmps)₂] 投与群においてそれぞれ 1.4%、および 1.2% 分有意に低下させ、長期間の血糖コントロールの改善作用が認められた (Table 2-3)。

Control 群及び [Zn(hmps)₂] 投与群においては、徐々に体重が増加したが、[Zn(hmpt)₂] 投与群に関しては、体重の減少が 22~25 日目に認められた。しかし、投与量を減量することで、体重は増加に転じた (Fig. 2-2 [A])。これは、下痢などの消化器系の不調により、摂餌量が減少したことにより起ると考えられた (Fig. 2-2 [B])。加えて、Normal 群と比べて Control 群において有意に増加していた摂水量は、Zn 錯体投与群で Control 群と比べて有意に減少しており (最終日 ; Control 群 : 12.6 ± 1.6 g, [Zn(hmpt)₂] 群 : 7.5 ± 2.5 g 及び [Zn(hmps)₂] 群 : 6.9 ± 0.5 g, $p < 0.01$ vs. control)、糖尿病の主徴の 1 つである多飲が改善したことが示唆された (Fig. 2-2 [C])。

投与実験終了後に行った OGTT の結果より、空腹時血糖値は、Control 群と比較して、Zn 錯体投与群において減少していた (Control 群 : 237 ± 52 mg/dL, [Zn(hmpt)₂] 群 : 143 ± 75 mg/dL ($p < 0.05$ vs. control) 及び [Zn(hmps)₂] 群 : 172 ± 38 mg/dL) (Fig. 2-3 [A])。また、OGTT における AUC は、Zn 錯体投与群において Control 群と比べ有意に減少していた (Fig. 2-3 [B])。これらの結果から、[Zn(hmpt)₂] 及び [Zn(hmps)₂] 群では、耐糖能異常改善効果が認められた。さらに、Normal 群と比べ Control 群で有意に増加していた空腹時血漿インスリン濃度は、Zn 錯体投与群において減少していた (Table 2-3)。

血漿アディポネクチン濃度は、Normal 群に比べ Control 群で有意に減少しており、Zn 錯体投与群では、上昇傾向であったが、有意な差は認められなかった (Table 2-3)。肝障害マーカーである、血漿中 AST 及び ALT は、Normal 群に比べ、Control 群で増加していた (Table 2-3)。これは、Control 群では、Normal 群に比べて脂肪肝であり、その影響であると考えられた [61]。[Zn(hmps)₂] 投与群において、Control 群に比べて、AST 及び ALT の有意な活性上昇が認められた (Table 2-3)。この結果より、[Zn(hmps)₂] 投与群では、肝機能低下が生じていることが示唆された。また、血漿 BUN が Normal 群及び Control 群と比べて、Zn 錯体投与群で有意に上昇していた (Table 2-3)。この結果より、Zn 錯体投与群では腎機能低下が生じていることが示唆された。血漿 TG 及び T-CHO は、Zn 錯体投与群と Control 群に有意な差は認められなかったため、Zn 錯体投与による脂質代謝改善効果は認められなかった (Table 2-3)。また、Normal 群に比べ、Control 群で有意に活性が上昇していた血漿 ALP は、Zn 錯体投与群において有意に低下していた (Table 2-3)。

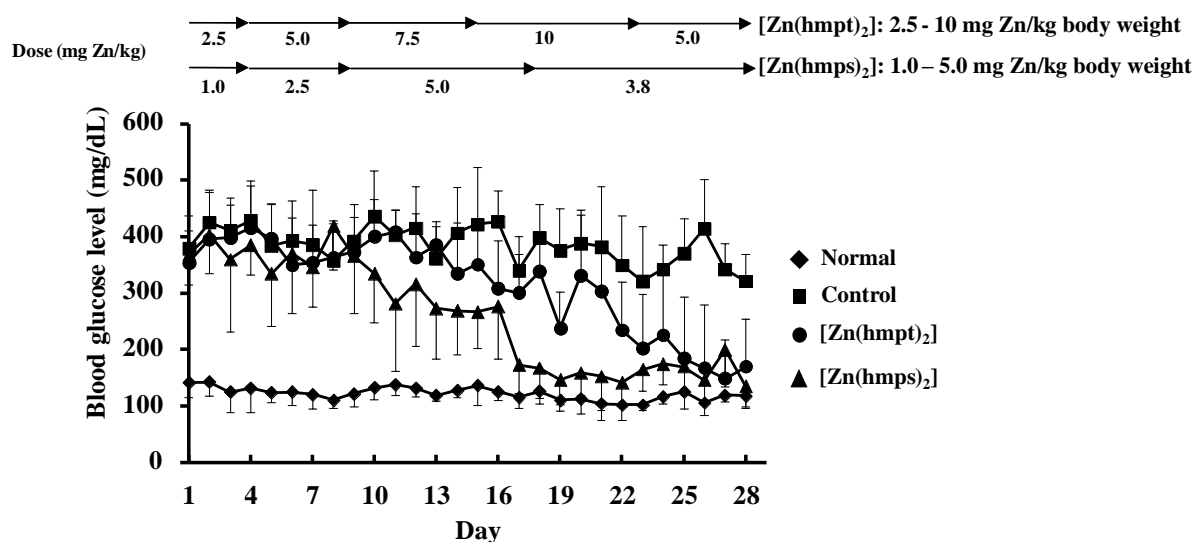


Fig. 2-1. Changes in the daily blood glucose levels over 28 days in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpt)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice; doses of both [Zn(hmpt)₂] and [Zn(hmps)₂] are shown in the top part of the figure. Data are expressed as the means \pm SDs for 6–8 mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Fig. 2. より引用し一部改変した。)

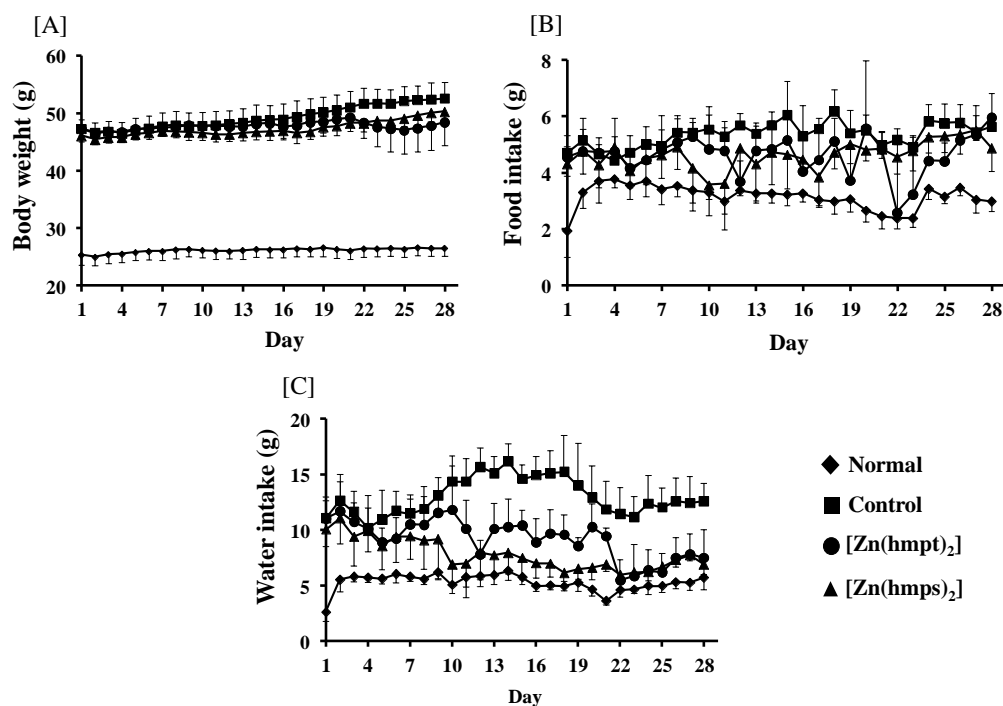
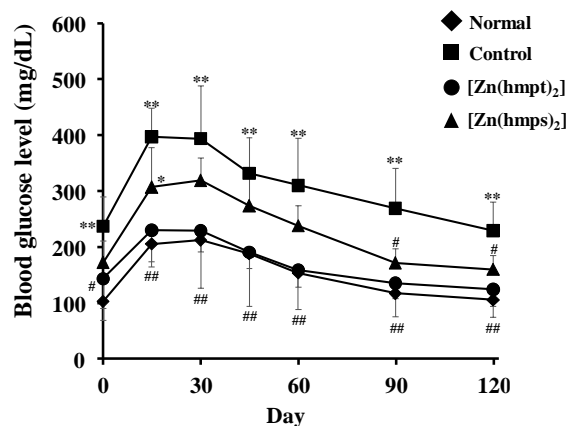


Fig. 2-2. Changes in [A] body weight; [B] food intake; and [C] water intake over 28 days in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpt)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice; data are expressed as the means \pm SDs for 6–8 mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Fig. 3. より引用し一部改変した。)

[A]



[B]

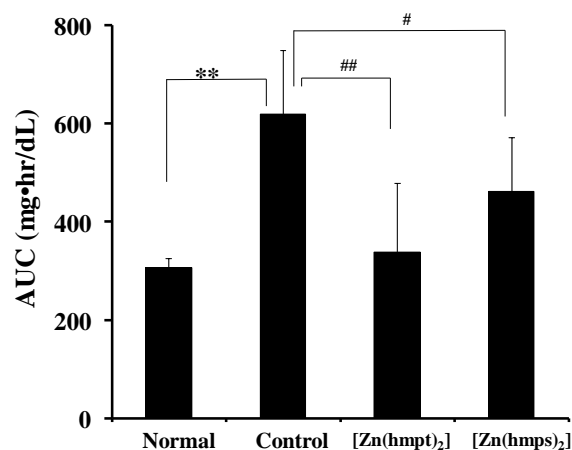


Fig. 2-3. Oral glucose tolerance test (OGTT) after 28 days in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpt)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice. [A] Changes in blood glucose levels after gastric gavage of 1 g glucose/kg body weight and [B] Area under the blood glucose concentration-time curve (AUC) in OGTT; data are expressed as the means \pm SDs for 6–8 mice. Statistical analysis was performed using the Tukey–Kramer test; significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. normal mice, # $p < 0.05$ and ### $p < 0.01$ vs. control mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Fig. 4. より引用し一部改変した。)

Table 2-3. HbA1c levels and plasma parameters in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpt)₂]-treated and [Zn(hmps)₂]-treated mice.

	Normal	Control	[Zn(hmpt) ₂]	[Zn(hmps) ₂]
HbA1c (%)	4.1 ± 0.3	7.9 ± 0.8 ^{**}	6.5 ± 0.7 ^{**, ##}	6.7 ± 0.4 ^{**, ##}
Insulin (ng/mL)	0.3 ± 0.0	2.2 ± 1.0 ^{**}	0.9 ± 0.3 ^{##}	1.4 ± 0.6 ^{**}
Adiponectin (μg/mL)	12.8 ± 2.7	8.2 ± 1.1 ^{**}	9.4 ± 0.8 ^{**}	9.0 ± 0.8 ^{**}
AST (U/L)	34 ± 6	93 ± 19 [*]	103 ± 25 ^{**}	200 ± 55 ^{**, ##, ††}
ALT (U/L)	13 ± 2	164 ± 64 [*]	118 ± 68	355 ± 138 ^{**, ##, ††}
BUN (mg/dL)	16 ± 1	17 ± 4	23 ± 2 ^{**, ##}	24 ± 3 ^{**, ##}
TG (mg/dL)	30 ± 3	83 ± 16 ^{**}	76 ± 25 ^{**}	87 ± 11 ^{**}
T-CHO (mg/dL)	76 ± 12	195 ± 16 ^{**}	189 ± 42 ^{**}	186 ± 16 ^{**}
ALP (U/L)	257 ± 28	723 ± 126 ^{**}	360 ± 88 ^{##}	550 ± 89 ^{**, ##, ††}

Data are expressed as the means ± SDs for 6–8 mice; statistical analysis was performed using a Tukey-Kramer test; significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. normal mice, ^{##} $p < 0.01$ vs. control mice, ^{††} $p < 0.01$ vs. [Zn(hmpt)₂]-treated mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Table 2. より引用し一部改変した。)

2-3-2 Zn 錯体の臓器分布の評価ならびに $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の臓器中化学形態の推定

Zn 錯体の生体内臓器分布を調べるために、ICP-MS を用いて臓器中の Zn 及び Se 濃度を定量した。その結果、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 群では、肝臓において有意に Zn が増加し、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 群では、血漿において Zn の有意な増加が認められた (Table 2-4)。

続いて、Control 群と $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 群との Zn 及び Se のモル濃度差 ($\Delta[\text{Zn}]$ 及び $\Delta[\text{Se}]$) を求め、さらに $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ 比を求めた (Table 2-5)。活性本体とされる Zn に関して、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 群では、肝臓及び膵臓において (Table 2-5 [A])、また、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 群では、膵臓において (Table 2-5 [B]) $\Delta[\text{Zn}]$ の大きな増加が認められたため、前者は肝臓及び膵臓で、そして後者は膵臓で抗糖尿病効果を示していることが示唆された。

そして、動物へ投与する前に $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は、Zn イオンと配位子がモル比として 1:2 の構造であるため、臓器中で $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.5$ であれば、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の化学形態で臓器中に、また、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 1$ であれば、 $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ の化学形態で臓器中に存在していると推定される。今回の結果では、血漿において $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 1$ 、そして、肝臓において、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.61$ であった (Table 2-5 [B])。そのため、血漿においては $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ で、そして肝臓においては、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ の化学形態の混合物として存在していることが示唆された。また、腎臓においては、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.25$ であり、腎臓においては Zn 錯体より解離した配位子の化学形態で存在していることが示唆された (Table 2-5 [B])。そして、骨及び膵臓はそれぞれ、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 6.7$ 及び 27 であった (Table 2-5 [B])。そのため、骨及び膵臓には、Zn 錯体より解離した Zn イオンの化学形態で存在していることが示唆された。

Table 2-5. Increased [A] $\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g), in organs of $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ -treated mice, and [B] $\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g) and $\Delta[\text{Se}]$ (nmol/g), and $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ molar ratios, in organs of $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ -treated mice, compared with control mice.

[A]

	Plasma	Liver	Kidney	Bone	Pancreas
$\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g)	3	453	86	517	302

[B]

	Plasma	Liver	Kidney	Bone	Pancreas
$\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g)	6	23	20	124	375
$\Delta[\text{Se}]$ (nmol/g)	6	38	81	18	14
$\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$	1.0	0.61	0.25	6.9	27

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Table 4. より引用し一部改変した。)

2-3-3 Zn 錯体投与による膵ラ氏島に対する作用及び肝臓の脂肪蓄積に対する影響

ob/ob マウスにおける、膵ラ氏島の画像解析結果より、Normal 群と比較して、Control 群において膵ラ氏島は平均サイズが有意に増加しており、かつ膵臓 1 切片あたりの膵ラ氏島が占める割合も有意に増加したため、膵ラ氏島が肥大化していることが示唆された (Fig. 2-4 [A], [C] and [D])。Zn 錯体投与群において、膵ラ氏島の平均サイズ及び膵臓 1 切片に占める割合は、Control 群に比べて増加傾向であった (Fig. 2-4 [A], [C] and [D])。さらに、膵臓 1 切片あたりの膵ラ氏島の個数が、Control 群に比べて、Zn 錯体投与群で増加傾向であった (Fig. 2-4 [B])。以上の結果から、Zn 錯体投与により膵ラ氏島の個数を増加させ、さらに肥大化させる傾向にあることが分かった。

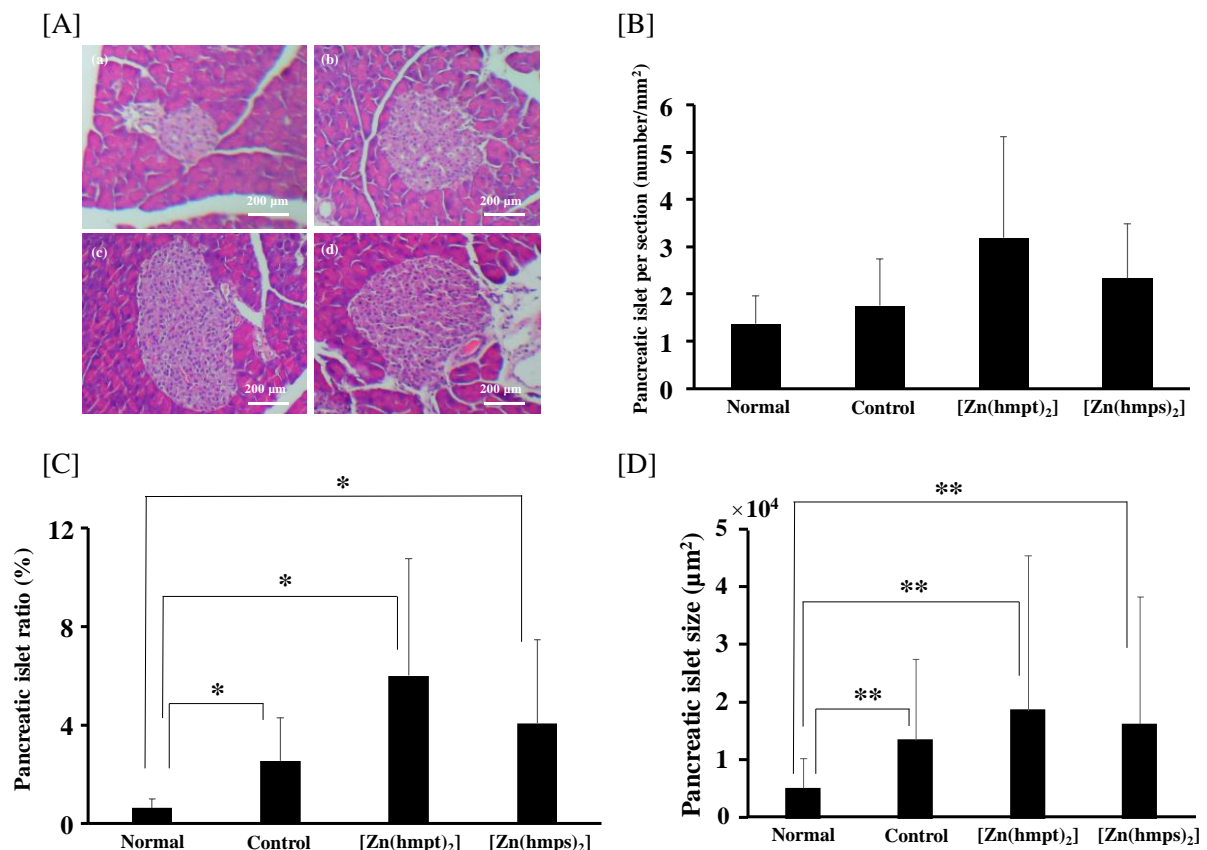


Fig. 2-4. [A] Pancreatic morphology in 14-week-old (a) normal; (b) control (PEG-400 administered); (c) [Zn(hmpt)₂]-treated; and (d) [Zn(hmps)₂]-treated mice. Hematoxylin and eosin staining, ×100 (scale bar = 200 μm); [B] Pancreatic islet per section (number/mm²) (normal mice: $n = 57$, control mice: $n = 72$, [Zn(hmpt)₂]-treated mice: $n = 92$, [Zn(hmps)₂]-treated mice: $n = 183$ pancreatic islets); [C] Pancreatic islet area ratio (%); [D] Pancreatic islet size (μm²). Data are expressed as the means ± SDs for 6–8 mice. Statistical analysis was performed using the Steel-Dwass test; significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. normal mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Fig. 5. より引用し一部改変した。)

ob/ob マウスは、脂肪肝になることが報告されており [61]、血漿 AST 及び ALT の結果からもその病態が予想された。そこで、HE 染色により、肝臓を組織染色し、Zn 錯体投与による脂肪肝に対する作用を調べた。肝臓組織切片画像より、画像上のグリコーゲン及び脂肪の蓄積面積を、WINROOF で計算し、蓄積面積の肝臓 1 切片あたりに占める割合を求めた (Fig. 2-5 [A] and [B])。その結果、Normal 群と比べ、Control 群及び Zn 錯体投与群において、有意にその割合が増加していた (Control 群 \approx [Zn(hmps)₂] 群 > [Zn(hmpt)₂] 群) (Fig. 2-5 [B])。Control 群と Zn 錯体投与群の間にはその割合に有意な変化は認められなかったが、[Zn(hmpt)₂] 群では減少傾向であった。

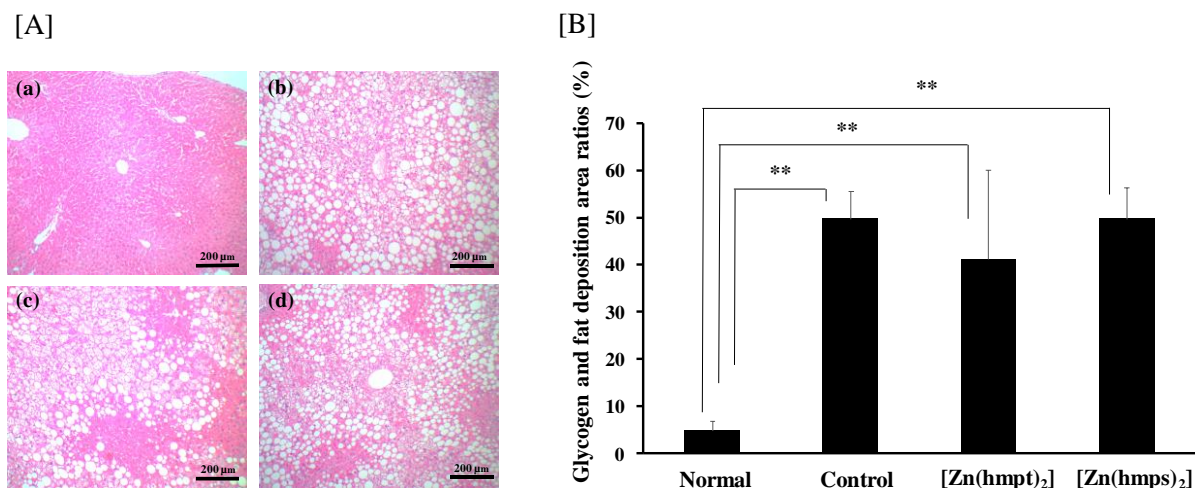


Fig. 2-5. [A] Hepatic morphology in 14-week-old normal (a); control (PEG-400 administered) (b); [Zn(hmpt)₂]-treated (c); and [Zn(hmps)₂]-treated mice (d). Hematoxylin and eosin staining, $\times 100$ (scale bar = 200 μm); [B] Glycogen and fat deposition area ratios in the hepatic sectioned tissue of normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpt)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice. Data are expressed as the means \pm SDs for 6–8 mice. Statistical analysis was performed using the Steel-Dwass test; significance: ** $p < 0.01$ vs. normal mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Fig. 6. より引用し一部改変した。)

続いて、生化学的な評価として、肝臓中の TG 及びグリコーゲン量を定量した。Normal 群と比べ、Control 及び Zn 錯体投与群で大量の TG が肝臓中に蓄積しており、その傾向は画像解析による結果と同じ傾向であった (Control 群 \approx [Zn(hmps)₂] 群 > [Zn(hmpt)₂] 群) (Table 2-6)。これらの結果より、先ほどの画像のほとんどが、TG を含めた脂肪であることが示唆された。

Table 2-6. TG and glycogen contents in the liver of ob/ob mice treated with Zn complexes.

	Normal	Control	[Zn(hmpt) ₂]	[Zn(hmps) ₂]
TG (mg/g liver)	16 \pm 11	437 \pm 139	309 \pm 134	443 \pm 42
Glycogen (mg/g liver)	—	0.08 \pm 0.04	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01

Data are expressed as mean \pm SDs for 6–8 mice. “—” means “unmeasured”.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. Int. J. Mol. Sci.* **2017**, 18, 2647., Supplementary Information より引用し一部改変した。)

2-4 考察

ZnCl₂ や ZnCl₂ と cyclo(His-pro) 混合物などの Zn 化合物を ob/ob マウスに投与して、その抗糖尿病効果が報告された論文は過去に存在する [28, 62]。しかし、著者の知る限りでは、高純度で単離した Zn 錯体を ob/ob マウスに投与して、その抗糖尿病効果を調べた報告は存在せず、今回が最初の報告である。

予備実験の結果から、[Zn(hmpt)₂] 及び [Zn(hmps)₂] の投与量を 2.5-10 mg Zn/kg body weight 及び 1.0-5.0 mg Zn/kg body weight と設定し実験を行った。どちらの Zn 錯体群においても強力な血糖降下作用を示し、耐糖能異常改善効果及び空腹時高インスリン血症を改善させた。また、Zn 錯体投与群では、Control 群と比べて有意に血漿 ALP を低下させた。レプチンは脳の視床下部に作用することにより、交感神経を活性化し、それに続いて骨芽細胞の β_2 アドレナリン受容体を介して、骨芽細胞による骨形成を抑制する作用が知られている [63]。また、ob/ob マウスはレプチン産生異常マウスであるため、正常なレプチンの機能が消失しており、それに伴い全身の骨量が多いことが報告されている [63]。以上の報告から考えると、Control 群における高 ALP 血症は骨形成異常の結果を反映している可能性があると考えられた。Zn 錯体投与群において高 ALP 血症は改善されているため、Zn 錯体は骨形成異常を改善していることが示唆された。以上の結果から、ob/ob マウスに対してこれら 2 種の Zn 錯体は抗糖尿病効果を示し、またレプチン作用不足に伴う骨形成異常に対する改善効果が示唆された。

しかしながら、今回の Zn 錯体の投与により副作用も認められた。まずは、[Zn(hmpt)₂] 群における 22~25 日目に認められた体重減少である。Zn は比較的安全な必須微量元素であるが、過剰な Zn の摂取によって下痢などの消化器系の不調が起こることはよく知られている [64]。そのため、今回の [Zn(hmpt)₂] 群における体重の減少は、過剰な Zn の摂取による消化器系の不調が、摂餌量を減少させ、体重減少に繋がったものと考えられた。そのため、高活性な Zn 錯体を投与する際には、その投与量に十分注意する必要があると考えられる。もう一つの副作用としては、[Zn(hmps)₂] 群における、Control 群と比べて血漿 AST 及び ALT の有意な活性上昇から予想される肝障害である。肝臓中の Zn 及び Se 濃度の定量結果から、Zn 濃度の増加は、[Zn(hmps)₂] 群においてほとんど認められないが、Se 濃度に関しては、Control 群の約 2.5 倍の有意な増加が認められた (Table 2-4)。過去の報告では、無機セレン化合物である、亜セレン酸ナトリウム (Na₂SeO₃) を含んだ餌 (10 µg/selenite/kg/day, 4.6 µg Se/kg/day) を 3 ヶ月、ウィスター系雄性ラットに与えた実験で、肝臓切片の評価から、肝臓組織の壊死が認められたとの報告がある [65]。また別の実験において、有機セレン化合物である D, L -セレノシスチンを、ICR マウスに週に 6 回、30 日間強制経口投与 (30 mg D, L -セレノシスチン/kg/day, 13.9 mg Se/kg/day) したところ、全例が死亡し、肝臓小葉周辺性空胞化が認められたことを報告している [66]。以上の結果と報告から、配位子である hmps が肝障害を起こしていると考えることが妥当である。

[Zn(hmpt)₂] 及び [Zn(hmps)₂] 群における臓器中 Zn 濃度の定量結果より、[Zn(hmpt)₂] 群では肝臓及び脾臓で、そして、[Zn(hmps)₂] 群では膵臓において抗糖尿病効果を示していると 2-3-2 で述べた。その作用機序について考察すると、ob/ob マウスでは、肝臓においてインスリン抵抗性が原因となり、グリコーゲン合成の低下及び糖新生亢進の両方が生じているとの報告がある [67]。また、Zn イオンは、PTP-1B や PTEN といった、インスリンシグナル経路を負に調節するホスファターゼを阻害すること

により、抗糖尿病効果を示すことが報告されている [68]。加えて、Naito らは、 $[Zn(hkt)_2]$ (hkt: hinokitiol) が、PTP-1B や PTEN を阻害することで、インスリン感受性を改善させ、KKA^y マウスにおいて、抗糖尿病効果を示している可能性を報告した [58, 69]。さらに、ヒト肝がん細胞の HepG2 細胞において、Zn イオンがインスリンシグナル経路である PI3-Akt 経路を活性化して、糖新生に関与する転写因子である FoxO1a のリン酸化を促進させ、FoxO1a を核内から、細胞質へ放出させ、FoxO1a を不活性化させたとの報告が存在する [70]。以上の報告から、 $[Zn(hmpt)_2]$ は ob/ob マウスの肝臓において、同様の機序で糖新生を抑制し、抗糖尿病効果を示しているのではないかと考えられた。今後は、糖新生関連遺伝子やそれに関わる酵素活性（例えば、PEPCK や G6Pase など）に対する、Zn 錯体の影響を調べていくことが Zn 錯体のさらなる抗糖尿病効果作用機序の解明につながると考えられた。また、膵臓における抗糖尿病作用機序について、近年、「インスリンと同時に放出される Zn イオンが、インスリンの肝細胞への取り込みを阻害して、インスリンの分解を抑制する」との報告が存在する [71]。そのため、 $[Zn(hmpt)_2]$ 及び $[Zn(hmps)_2]$ は、膵臓へ Zn イオンを供給することにより、肝臓におけるインスリン分解の抑制を介して、末梢におけるインスリンの利用効率を向上させることで、抗糖尿病効果を示すという間接的な作用機序が考えられた。

以前、著者の所属する研究室では、 $[Zn(opt)_2]$ が KKA^y マウスにおいて膵ラ氏島の肥大化を抑制させることを見出していたため [59]、著者は、ob/ob マウスにおいても、Zn 錯体投与群で膵ラ氏島の肥大化は抑制されると予想していた。しかし、Zn 錯体投与群では Control 群に比べて、肥大化する傾向が認められた。ob/ob マウスは、インスリン抵抗性に基づき末梢組織でのインスリン作用不足となり、膵臓からのインスリン分泌を増加させるため、対照群である C57BL/6J +/+ マウスと比べて、高インスリン血症を呈する。そのインスリン分泌が増加する機序としては、膵ラ氏島の過形成から生じる β 細胞数の増加によると考えられている [72]。今回、Control 群においては、Normal 群に比べ有意に膵ラ氏島が肥大化しており、その報告と合致していた。Tanabe や Kitamura らは、膵 β 細胞におけるインスリンシグナルが、膵ラ氏島の過形成において、重要な役割を示していることを報告しており [73, 74]、そのインスリンシグナルは、Zn イオン及び Zn 錯体により活性化される [58, 69]。さらに、本実験における Zn 濃度の定量結果より、Zn 錯体投与群で、膵臓中 Zn 濃度が増加する傾向にあった。以上から、Zn 錯体投与により、膵臓へ運ばれた Zn イオンの一部はインスリンシグナル経路を活性化し、膵 β 細胞を増殖させ、膵ラ氏島の肥大化傾向につながったのではないかと考察した。また、著者の所属する研究室において、 $[Zn(hkt)_2]$ が、ラット由来インスリノーマ β 細胞である RIN-5F 細胞において、核に移行しインスリン、グルコキナーゼ及びグルコーストランスポーター2 (GLUT 2) など様々な遺伝子の転写を誘導する転写因子である PDX-1 [75] の mRNA の発現量を増加させたことを報告しており [69]、Taniguchi らはまた、アデノウイルスベクターを用いて PDX-1 遺伝子を膵臓に導入し PDX-1 を過剰発現させることにより、 β 細胞が新しく形成されることを報告している [76]。上記の報告に基づき本結果について考えると、膵臓における PDX-1 の発現増加による膵 β 細胞の増加作用による影響も膵ラ氏島の肥大化傾向に影響を与えている可能性も考えられた。また、 $[Zn(hmpt)_2]$ 及び $[Zn(hmps)_2]$ 群における空腹時血漿インスリン濃度は、Control 群に比べて減少しており、膵ラ氏島の肥大化傾向とは逆の結果が認められた。血糖降下作用、HbA1c 値及び耐糖能異常改善作用に代表される抗糖尿病効果が認

められたことから考えると、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ 投与により、腓ラ氏島の肥大化傾向は認められているが、正常なインスリン分泌に近づけているために、空腹時高インスリン血症は呈していないと考察した。

以上より、*in vitro* において、高いインスリン様活性を示した有機 S-及び Se-Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ はレプチン欠損型 2 型糖尿病モデル ob/ob マウスにおいて抗糖尿病効果を示すことが分かった。

そして今回有機 Se-Zn 錯体である、 $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ を投与して、臓器中の $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ 比を求め、臓器中の化学形態の推定も行った。その結果、血漿では $[\text{Zn}(\text{hmmps})^+]$ 、そして肝臓では $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmmps})^+]$ 、腎臓では主に配位子、また骨及び膵臓では Zn イオンの化学形態で存在していることが示唆された (Table 2-5 and Fig. 2-6)。活性本体である Zn 濃度の増加は膵臓で大きく、肝臓においては少なかった。そのため、 $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ は膵臓において、主に Zn イオンの化学形態で抗糖尿病効果を示すことが示唆された。さらに、Zn 錯体の臓器分布と組織形態学的な改善効果について、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ は肝臓及び膵臓において分布し、また、 $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ については、膵臓において Zn イオンで分布していることが示唆されていた。しかし、連日経口投与の終了後に解析した Zn 錯体の臓器分布から推定された作用臓器と、組織切片画像による肝臓の脂肪蓄積抑制効果や腓ラ氏島肥大化抑制効果といった組織形態学的な改善効果との間に直接的な関連性は認められず、抗糖尿病作用臓器の特定までは至らなかった。

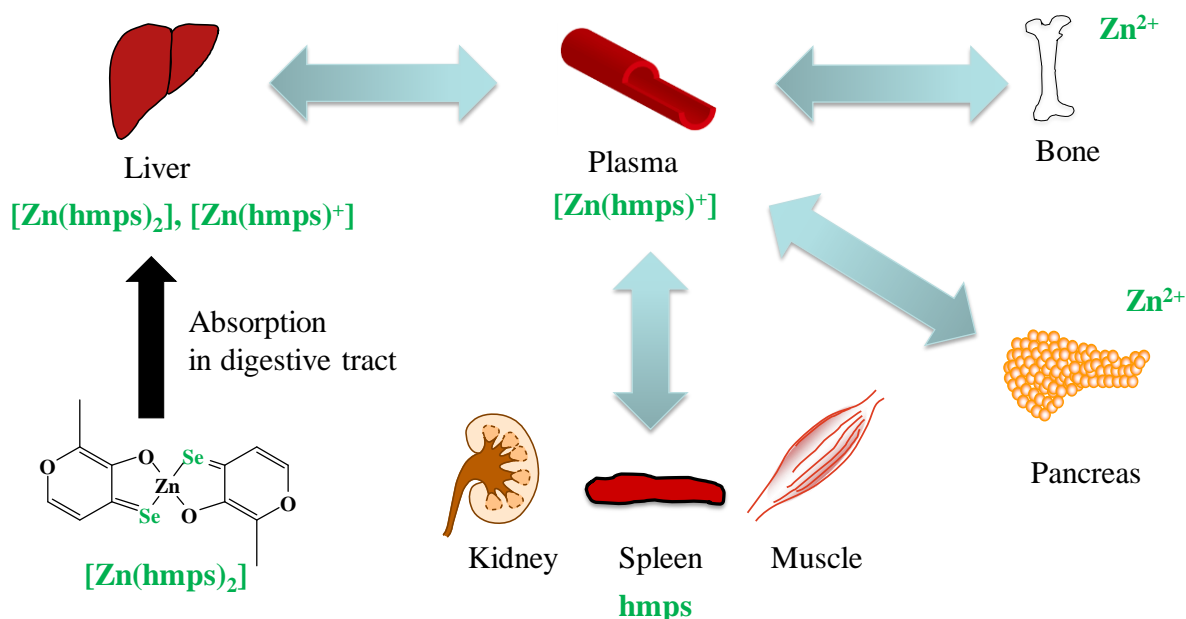


Fig. 2-6. Biodistribution of $[\text{Zn}(\text{hmmps})_2]$ after oral administration for 28 days to ob/ob mice.

第3章 マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体の KKA^yマウスにおける抗糖尿病効果の評価と Zn 錯体の臓器分布解析

3-1 緒言

著者の所属する研究室では、過去に、2型糖尿病モデル KKA^yマウスに Zn 錯体を投与して、その抗糖尿病効果の評価してきた [31-33, 35-39, 41-43]。そのため、第2章において ob/ob マウスで抗糖尿病効果を示したマルトール誘導体の Zn 錯体を KKA^yマウスにも投与し、糖尿病発症機序の異なるモデル動物においても Zn 錯体の抗糖尿病効果が認められるかどうかを調べた。また、ob/ob マウスにおける実験と同様に、有機 Se-Zn 錯体である [Zn(hmps)₂] の生体臓器分布と組織形態学的な改善効果の関連性についても評価することとし、Zn 錯体の標的臓器の特定と、異なるモデル動物間における Zn 錯体の生体臓器分布や組織形態学的な改善効果に違いがあるかどうかを調べた。

3-2 実験材料及び実験方法

3-2-1 試薬

KKA^yマウスへの投与実験

2-2-1 と同じ試薬を用いた。

ICP-MS による臓器中 Zn 及び Se 濃度の定量

インジウム (In) 標準液は和光純薬工業株式会社より購入し、その他試薬は 2-2-1 と同じ試薬を用いた。

組織染色

2-2-1 と同じ試薬を用いた。

上記、すべての有機溶媒、酸塩基試薬及び無機試薬は、一級ないし特級品を用いた。すべての水溶液は、ミリ-Q 超純水装置システム (日本ミリポア、東京、日本) により調製した超純水 (比抵抗値 18.2 MΩ·cm) を用いて作成した。

3-2-2 動物

Normal 群である 8 週齢の雄性 C57BL/6J マウスは、清水実験材料株式会社より購入した。糖尿病モデルである 4 週齢の KKA^yマウスは、日本クレア (東京、日本) より購入した。C57BL/6J マウス及び KKA^yマウスは実験開始の 9 週齢まで BSRC で飼育させ、KKA^yマウスは血糖値が上昇し、高血糖状態が持続して発症しているマウスを用いて実験を行った。動物は実験開始まで、KPU-BSRC で、12 時間

周期の照明調節の下、温度 $23 \pm 1^\circ\text{C}$ 及び湿度 $60 \pm 10\%$ の飼育条件下において、固形飼料 MF 及び BSRC で調製された滅菌水を自由摂取させ飼育した。すべての動物実験は KPU 動物実験委員会により許可され、KPU の動物実験ガイドラインに基づいて行った。

3-2-3 マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体の 2 型糖尿病モデル KKA^y マウスに対する抗糖尿病効果の検討

9 週齢の KKA^y マウスに、PEG-400 に懸濁させた $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ は $10\text{--}15 \text{ mg Zn/kg body weight}$ の投与量で、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は $2.0\text{--}10 \text{ mg Zn/kg body weight}$ の投与量で 28 日間連続経口投与を行った。Normal 群及び糖尿病 Control 群 (Control 群) には溶媒である PEG-400 を投与した。随時血糖値、体重、摂餌量及び摂水量を毎日測定し、血糖値は尾静脈血を用いてグルコカードで測定した。28 日間投与後、HbA1c を測定した。HbA1c は尾静脈血で、DCA2000 を用いて測定した。さらに、12 時間絶食させたのち、イソフルラン麻酔下で、ヘパリン処理したシリンジを用いて下大静脈より採血した。血液試料を、 650 g 、 4°C で 15 分間遠心分離し、上清をとり、遠心分離を前述の条件で再度行い、その上清を血漿試料とした。AST、ALT、BUN、TG、T-CHO 及び ALP は富士ドライケムにより測定した。血漿インスリンは超高感度マウスインスリン測定キットを用いて測定した。血漿レプチン及びアディポネクチンはレプチン及びアディポネクチン測定キット (R&D Systems Inc.、ミネアポリス、アメリカ合衆国) を用いて、ELISA 法により測定した。採血後、マウスを解剖し、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、骨格筋 (大腿筋)、骨 (大腿骨) 及び副睾丸周辺の脂肪組織を摘出した。

3-2-4 Zn 錯体の臓器分布の評価ならびに $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の臓器中化学形態の推定

測定試料の灰化に関しては、2-2-4 と同様の方法で行い、検量線試料は濃度が 0、5、10、50、100 及び 500 ppb の溶液を作成し、内標準の 1 ppm In 溶液を、測定溶液 9 mL に対して $10 \mu\text{L}$ の液量で、検量線試料と測定試料にそれぞれ加えた。その後、臓器中の Zn 及び Se 濃度を ICP-MS 7700x を用いて定量した。

3-2-5 染色

解剖の際、組織切片作成のための試料 (肝臓及び膵臓の一部) を 2-2-5 と同じ組成の 10% 中性緩衝ホルマリン液へ入れた。1 週間浸漬後、70% エタノール溶液にさらに 1 週間浸漬させたのち、染色の前処理として包埋処理を行った。肝臓は右葉の一部の中心を約 3 mm の厚みに剃刀で切り、膵臓に関してはそのままオートプロセッサにかけ、2-2-5 と同様に包埋処理を行い、ティッシュ・テック TEC プラス ディスペンシング・コンソールで、パラフィン包埋ブロックを作成した。その後 2-2-5 と同様に HE 染色を行った。HE 染色された組織切片は、Moticam T2 を用いてデジタル画像化を行った。肝臓に関しては、肝臓切片をランダムに 10 か所 400 倍の倍率で撮影し、以下のような基準を用いて、肝臓における脂質沈着における影響を評価した。

- 0: 肝臓切片に占める脂質の割合が 10%以下
- +1: 肝臓切片に占める脂質の割合が 10~30%
- +2: 肝臓切片に占める脂質の割合が 30~50%
- +3: 肝臓切片に占める脂質の割合が 50%以上

脾臓に関しては、Moticam T2 上の機能を用いて、脾ラ氏島の面積を求め、肥大化に対する影響を調べた。

3-2-6 統計処理

すべての実験結果は平均値及び標準偏差として表し、統計学的処理には、エクセル 2010 上で、エクセル統計 2008（株式会社社会情報サービス、東京、日本）を使用した。さらに、外れ値検定であるスミルノフ・グラブス検定を行い、エクセル 2013 上で、エクセル統計 2012 を使用し、多群間の比較では分散分析法に加えてチューキー・クレーマー法または、ノンパラメトリック検定であるスティール・ドゥワース法を用いて行った。

3-3 結果

3-3-1 マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体の KKA^y マウスに対する抗糖尿病効果の検討

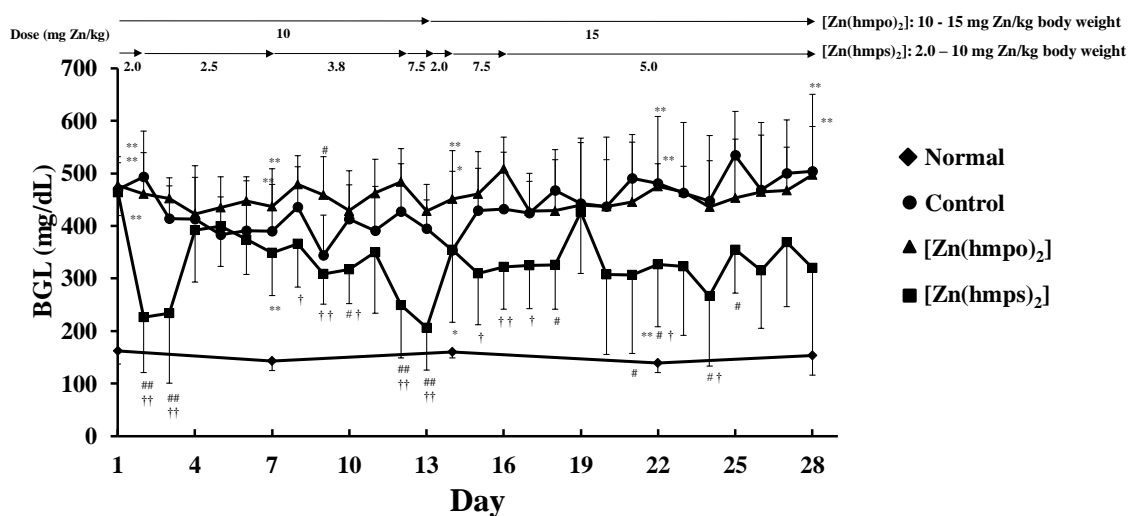
マルトール及びセレノマルトールによる有機 O-及び Se-Zn 錯体 ($[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$) の 2 型糖尿病モデル KKA^y マウスにおいて抗糖尿病効果を評価した。投与後 2 日目に $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群において、急激な血糖降下作用が認められた (Fig. 3-1 [A])。しかし、投与量を減量することで、4 日目には Control 群と同様まで上昇した。その後 28 日間で、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群では、Control 群と比べて、約 100-150 mg/dL 程度血糖値を減少させた。長期間の血糖コントロールの指標である HbA1c 値は、Control 群と比べて有意に 3.4%分減少させた。一方、 $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ 群においては、血糖降下作用や HbA1c 値の低下作用は認められなかった (Fig. 3-1 [A] and [B])。

空腹時の血漿インスリン濃度及びレプチン濃度は Control 群で、Normal 群と比べて有意に上昇しており、インスリン抵抗性とレプチン抵抗性の状態であると考えられた (Table 3-1)。 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群では、血漿インスリン及びレプチン濃度はそれぞれ Control 群の 60%及び 38%まで有意な減少が認められた。これらの結果から、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群で、インスリン抵抗性及びレプチン抵抗性が改善したことが示唆された。しかし、Control 群で Normal 群と比べて低下していたアディポネクチン濃度を、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群において改善させる効果は認められなかった。

肝障害マーカーである AST、ALT 及び腎障害マーカーである BUN の結果から、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 投与群では、Control 群と比べて、これらの血漿パラメータに有意な上昇は認められなかったため、肝障害及び腎障害は起きていないことが示唆された (Table 3-1)。また、脂質代謝のマーカーである TG 及び T-CHO の結果から、 $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ 群では、Control 群と比べて有意な変化は認められなかった。

これらの結果をまとめると、*in vivo* において、有機 Se-Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{hmpps})_2]$ は、非常に強力な抗糖尿病効果を示し、*in vitro* インスリン様活性の結果と同様に、 $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ よりも高い抗糖尿病効果を示すことが分かった。

[A]



[B]

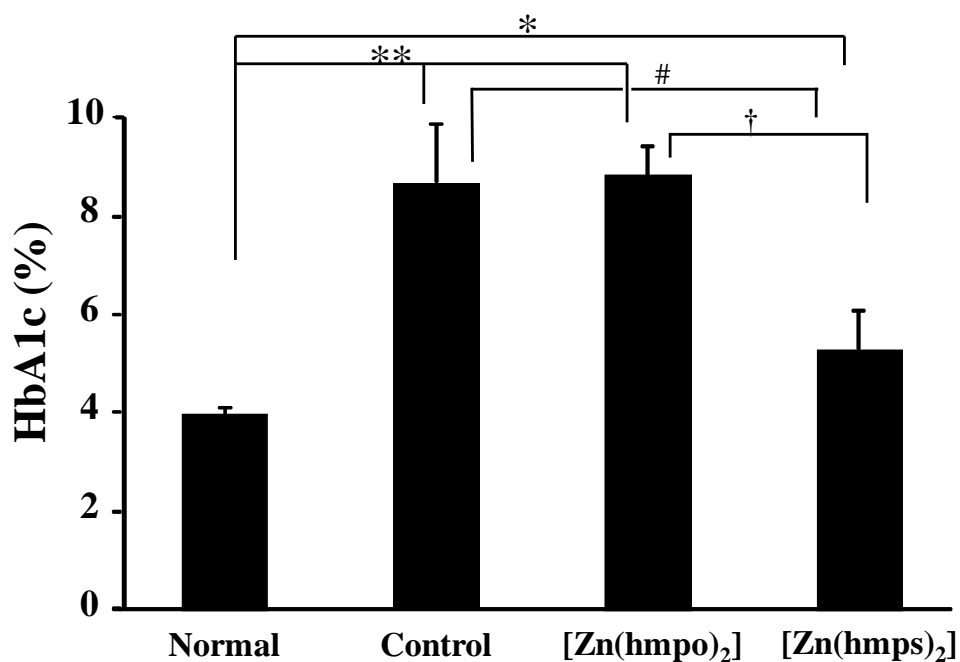


Fig. 3-1. [A] Changes in blood glucose levels over 28 days and [B] HbA1c levels in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpo)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice. Data are expressed as mean \pm SDs for 4-8 mice. Statistical analysis was performed by Tukey-Kramer test. Significance: * p < 0.05 and ** p < 0.01 vs. normal mice, # p < 0.05 and ## p < 0.01 vs. control mice, † p < 0.05 and †† p < 0.01 vs. [Zn(hmpo)₂]-treated mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 3. より引用し一部改変した。)

Table 3-1. Plasma parameters in normal, control (PEG-400 administered), [Zn(hmpo)₂]-treated, and [Zn(hmps)₂]-treated mice

	Normal	Control	[Zn(hmpo) ₂]	[Zn(hmps) ₂]
AST (U/L)	33 ± 2	43 ± 11	53 ± 17	63 ± 21 [*]
ALT (U/L)	14 ± 1	25 ± 5 ^{**}	28 ± 7 ^{**}	17 ± 3 ^{#††}
BUN (mg/dL)	24 ± 3	23 ± 5	24 ± 3	26 ± 2
TG (mg/dL)	38 ± 9	202 ± 32 ^{**}	129 ± 36 ^{**##}	199 ± 39 ^{**††}
T-CHO (mg/dL)	87 ± 6	164 ± 11 ^{**}	165 ± 17 ^{**}	168 ± 20 ^{**}
ALP (U/L)	330 ± 50	409 ± 28	415 ± 127	283 ± 33 [†]
Insulin (ng/mL)	0.3 ± 0.1	1.5 ± 0.5 ^{**}	0.9 ± 0.3 ^{**##}	0.6 ± 0.1 ^{##}
Leptin (ng/mL)	1.0 ± 0.4	48 ± 5 ^{**}	42 ± 4 ^{**##}	30 ± 5 ^{**##††}
Adiponectin (μg/mL)	9.3 ± 0.9	4.6 ± 0.4 ^{**}	4.4 ± 0.5 ^{**}	4.8 ± 0.4 ^{**}

Data are expressed as mean ± SDs for 4-8 mice. Statistical analysis was performed by Tukey–Kramer test. Significance: ^{*}*p* < 0.05 and ^{**}*p* < 0.01 vs. normal, [#]*p* < 0.05 and ^{##}*p* < 0.01 vs. control, [†]*p* < 0.05 and ^{††}*p* < 0.01 vs. [Zn(hmpo)₂]-treated mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Table 2 より引用し一部追記した。)

3-3-2 Zn 錯体の臓器分布及び $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の臓器中化学形態の推定

第2章の ob/ob マウスにおける実験と同様に、Zn 錯体の臓器分布を調べるために、ICP-MS を用いて、臓器中の Zn 及び Se 濃度を定量した (Table 3-2)。その結果、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 群では、血漿において Control 群に比べて有意に Zn 濃度が増加しており、消化管より吸収され、体内循環に到達したことが示唆された。そして、肝臓において有意に Zn 濃度の増加が認められたため、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は肝臓において抗糖尿病効果を示していることが示唆された。

続いて、2-3-2 と同様の考え方で、 $\Delta[\text{Zn}]$ 、 $\Delta[\text{Se}]$ 及び $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ 比を計算した (Table 3-3)。今回の結果から、血漿において $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.6$ 、そして、肝臓及び筋肉でそれぞれ、 $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.9$ 及び 1.1 であった (Table 3-3 [B])。そのため、血漿においては $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ と $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ の形態の混合物で、そして、肝臓及び筋肉では主に、 $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ の形態で存在していることが示唆された。また、脾臓では $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 0.20$ であったことから、脾臓においては、ほとんどが錯体より解離した配位子の形態で存在していることが示唆された (Table 3-3 [B])。そして、骨においては $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}] = 16.4$ であったため、錯体より解離した Zn イオンの形態で存在していることが示唆された (Table 3-3 [B])。

Table 3-2. Zn and Se concentrations in dry tissues ($\mu\text{g/g}$) and plasma ($\mu\text{g/mL}$) of normal, control (PEG-400 administered) and $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ -treated and $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ -treated mice.

Organ	Zn			Se				
	Normal	Control	[Zn(hmpo) ₂]	[Zn(hmps) ₂]	Normal	Control	[Zn(hmpo) ₂]	[Zn(hmps) ₂]
Plasma	1.3 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.1 *	2.2 ± 0.5 **##	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	1.8 ± 0.5 **## ††
Liver	104 ± 6.5	69 ± 2.1 **	86 ± 13.7 *	93 ± 9.6 ##	5.7 ± 0.3	4.9 ± 0.9	4.6 ± 0.5	35.9 ± 13.5 **## ††
Kidney	73 ± 4.6	59 ± 1.0 **	66 ± 4.8	59 ± 7.1 **	5.5 ± 0.5	5.4 ± 0.7	5.5 ± 0.3	22.2 ± 8.7 **## ††
Muscle	35 ± 3.2	26 ± 3.3 **	29 ± 3.4 *	29 ± 3.5 *	1.0 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.1 ± 0.2	4.8 ± 1.9 **## ††
Adipose	3.6 ± 1.4	1.9 ± 0.3 **	1.5 ± 0.2 **	1.4 ± 0.3 **	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.24 ± 0.1 ** ††
Pancreas	117 ± 8.2	107 ± 7.0	154 ± 12.1 **##	81 ± 24.2 ** # ††	1.4 ± 0.4	2.4 ± 0.5	1.9 ± 0.6	3.6 ± 1.3 ** # ††
Spleen	80 ± 2.6	68 ± 2.4 **	70 ± 3.5 **	71 ± 4.5 **	1.7 ± 0.3	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.4	15.1 ± 5.6 **## ††
Bone	185 ± 5.4	124 ± 12.6 **	241 ± 34.0 **##	166 ± 31.0 # ††	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	0.4 ± 0.2	3.5 ± 1.3 **## ††

Data are expressed as mean \pm SDs for 5-8 mice. Statistical analysis was performed by Tukey-Kramer test. Significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. normal, # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ vs. control, †† $p < 0.01$ vs. [Zn(hmpo)₂]-treated mice.

(Takayuki Nishiguchi, et al. *J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Table 3 より引用し一部追記した。)

Table 3-3. Increased [A] $\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g), in organs of $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ -treated, and [B] $\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g) and $\Delta[\text{Se}]$ (nmol/g), and $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ molar ratios, in organs of $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ -treated mice, compared with control mice.

[A]

	Plasma	Liver	Kidney	Muscle	Pancreas	Spleen	Bone
$\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g)	3	256	105	43	719	30	1795

[B]

	Plasma	Liver	Muscle	Spleen	Bone
$\Delta[\text{Zn}]$ (nmol/g)	9	361	49	32	641
$\Delta[\text{Se}]$ (nmol/g)	15	393	45	161	39
$\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$	0.6	0.92	1.1	0.20	16.4

3-3-3 Zn 錯体による肝臓への脂質沈着及び腓ラ氏島の肥大化抑制効果の検討

肝臓及び腓ラ氏島の組織学的な変化を観察するために、HE 染色を行い、肝臓における脂質の蓄積及び腓ラ氏島肥大化に対する Zn 錯体の影響を調べた。Control 群と比べて、Zn 錯体投与群では、有意に脂質の蓄積の程度を減少させた (Fig. 3-2 and Table 3-4)。また、腓ラ氏島の肥大化が、Normal 群と比べて Control 群において認められた {Fig. 3-3 (a) and (b)}。Zn 錯体投与群では有意な差は認められなかったが、腓ラ氏島の肥大化を抑制する傾向にあった {Fig. 3-3 (c), (d) and Fig. 3-4}。加えて、各群の腓ラ氏島の面積の分布を求め評価したところ、腓ラ氏島の面積が $30,000 \mu\text{m}^2$ 以上の割合は、Control 群に比べて、Zn 錯体投与群では減少しており、さらに、 $2,000\text{-}10,000 \mu\text{m}^2$ の範囲の腓ラ氏島面積の割合が増加していた (Fig. 3-5)。これらの結果から、Zn 錯体投与により、腓ラ氏島の肥大化抑制効果が認められた。

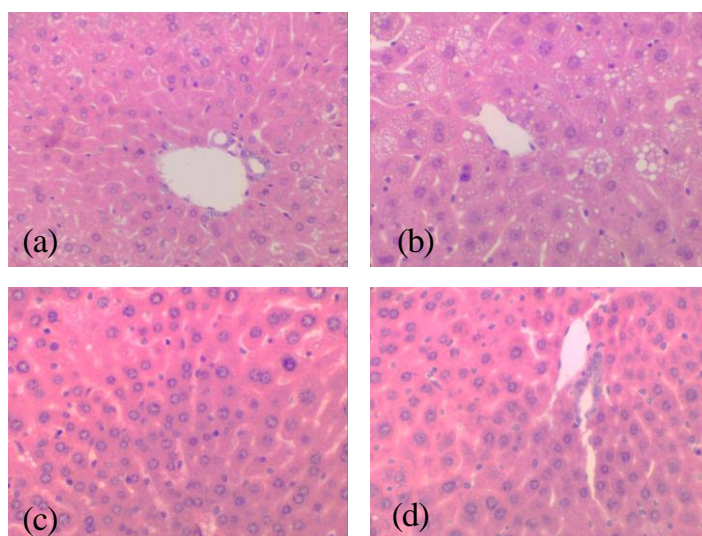


Fig. 3-2. Hepatic morphology in (a) normal, (b) control (PEG-400 administered), (c) $[\text{Zn}(\text{hmpo})_2]$ -treated, and (d) $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ -treated mice. HE staining, (x100).

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Supplementary Information より引用し一部追記した。)

Table 3-4. Percentage of lipid in the liver section

	Normal	Control **	[Zn(hmpo) ₂] **,###	[Zn(hmps) ₂] *,###
0	70	25	60	54
+1	0	15	16	5
+2	0	10	3	1
+3	0	10	1	0
Sum	70	60	80	60

0 : Under 10% lipid in the liver section.

+1 : 10~30% lipid in the liver section

+2 : 30~50% lipid in the liver section

+3 : Over than 50% lipid in the liver section

Statistical analysis was performed by Steel-Dwass test. Significance: * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ vs. normal mice, and ### $p < 0.01$ vs. control mice.

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Supplementary Information より引用し一部改変した。)

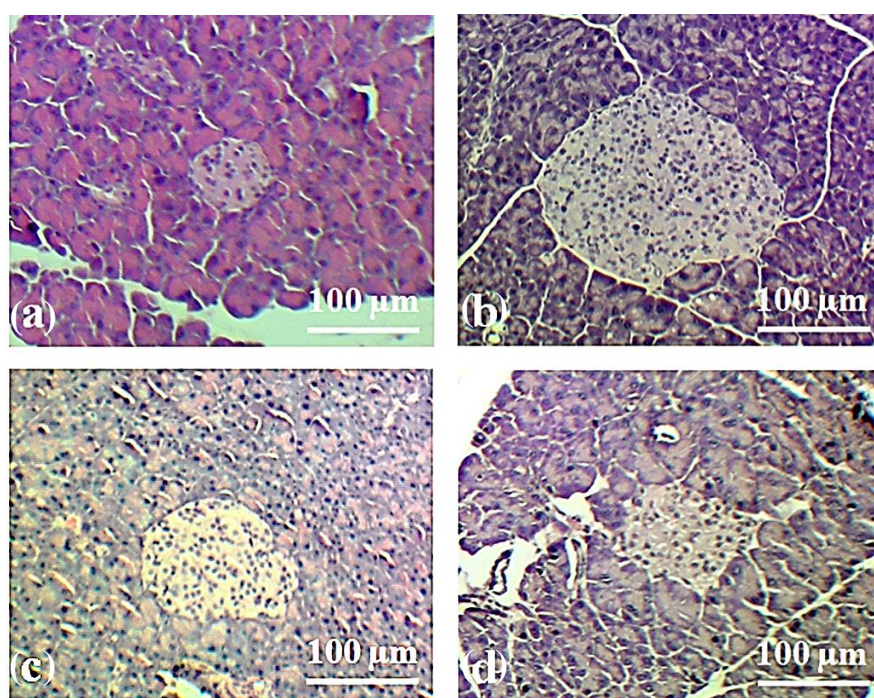


Fig. 3-3. Pancreatic islets in (a) normal, (b) control (PEG-400 administered), (c) [Zn(hmpo)₂]-treated, and (d) [Zn(hmps)₂]-treated mice. HE staining, (x100).

(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 4. より引用し一部改変した。)

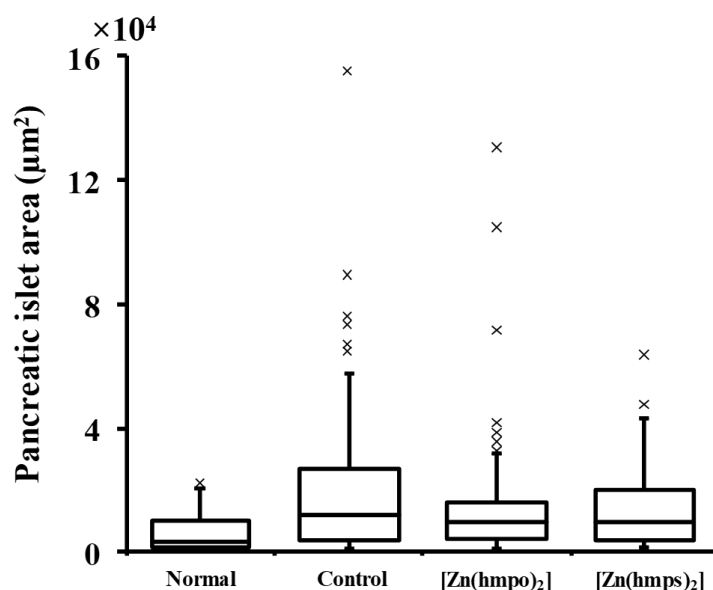


Fig. 3-4. Box-and whisker plot of the pancreatic islet in normal (n = 63), control (administered with PEG-400) (n = 77), [Zn(hmpo)₂]-treated (n = 84) and [Zn(hmps)₂]-treated KKA^y mice (n = 63).
(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 5. より引用し一部追記した。)

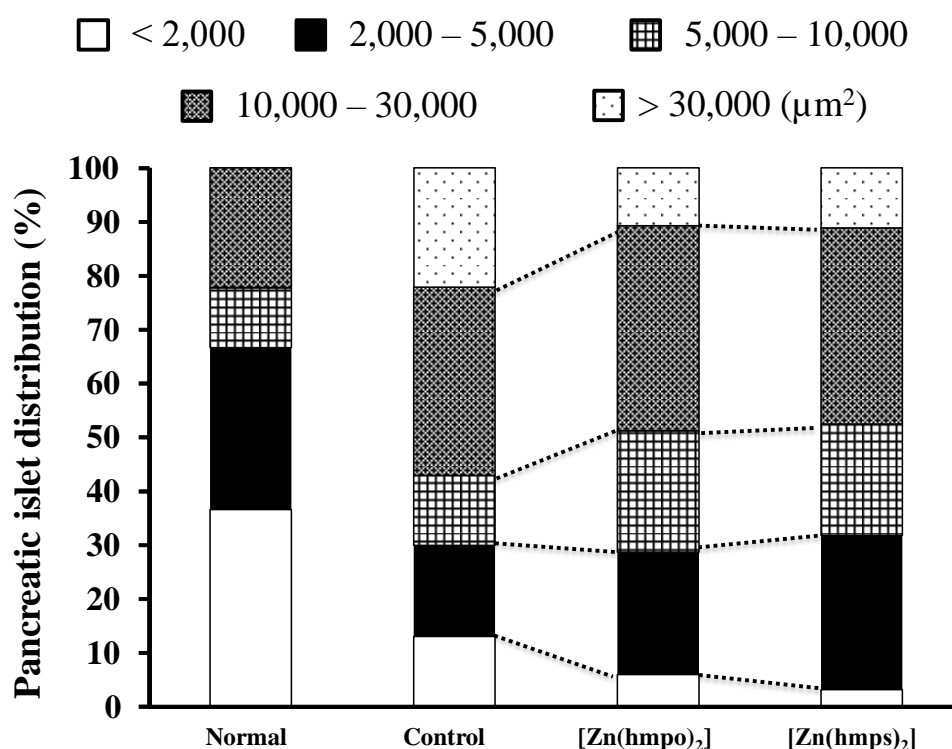


Fig. 3-5. Distribution of pancreatic islet area in normal (n = 63), control (PEG-400 administered) (n = 77), [Zn(hmpo)₂]-treated (n = 84), and [Zn(hmps)₂]-treated mice (n = 63).
(Takayuki Nishiguchi, *et al. J. Inorg. Biochem.* **2018**, 185, 103-112., Fig. 6. より引用し一部改変した。)

3-4 考察

血糖降下作用及び HbA1c 値改善作用などの抗糖尿病効果は、[Zn(hmpo)₂] 投与群では認められなかった。しかしながら、[Zn(hmps)₂] 投与群においては、毎日の血糖降下作用、HbA1c 値の改善、そして、空腹時血漿インスリン及びレプチン濃度の改善作用が認められ、抗糖尿病効果が示された。(Fig. 3-1 and Table 3-1)。

[Zn(hmps)₂] はその強い抗糖尿病効果のために、投与 2 日目に過剰な血糖降下作用が認められたため (Fig. 3-1 [A])、投与量を 2.0 mg Zn/kg body weight に減らし様子を観察したところ、投与 4 日目までには徐々に血糖値が回復した。その後は、投与量を調整しながら投与実験を続け、投与期間中の投与量としては、2.0-10 mg Zn/kg body weight の範囲であった。著者の所属する研究室の過去の報告では、[Zn(spno)₂] は投与量が 1.25-2.5 mg Zn/kg の範囲で KKA^y マウスに対する実験が行われていた。その際は、低用量であったため、過度な血糖降下作用は認められなかった [37]。今回は、その際の投与量の約 1.64 倍の投与量で実験が行われたため、過度な血糖降下作用が認められたと考えられた。そのため、[Zn(hmps)₂] を臨床応用するためには、投与量の最適化が必要であり、今後検討する必要があると考えられた。

ob/ob マウスにおける実験とは異なり、KKA^y マウスにおいては、[Zn(hmps)₂] 投与群に関して肝障害マーカーである AST や ALT に関して Control 群と比べて変化はほとんど認められなかった。ob/ob マウスにおいて、投与終了後に測定した Control 群の AST は KKA^y マウスの約 2 倍、ALT は約 7 倍であり、ob/ob マウスにおける投与開始時には、すでに脂肪肝により肝臓は障害を受けていることが推察された。そのため、ob/ob マウスにおいては、肝臓に対する障害がすでに生じていたため、[Zn(hmps)₂] 投与による AST や ALT の上昇が顕著になった可能性が考えられた。一方で、KKA^y マウスにおいては [Zn(hmps)₂] による肝機能低下は認められなかったと考えられる。そのため、発症機序の異なる実験モデル動物を用いた投与実験の重要性が示唆された。

著者の所属する研究室において、過去の報告には、[Zn(opt)₂] は KKA^y マウスに投与することにより、肝臓への脂肪の蓄積を抑制し、膵臓における膵ラ氏島の肥大化を抑制することを報告していた [59]。今回の Zn 錯体においても、肝臓における脂質の蓄積を抑制し (Fig. 3-2 and Table 3-4)、膵臓における膵ラ氏島の肥大化を抑制する傾向が認められた (Fig. 3-3, 3-4 and 3-5)。また、Zn 錯体の投与による膵ラ氏島肥大化抑制効果は、血漿中インスリン濃度の減少と関連があると考えられた。[Zn(hmps)₂] 投与群における血漿インスリン濃度は、[Zn(hmpo)₂] 投与群よりも低下しており、かつ平均的な膵ラ氏島の大きさも低下していた。これらの結果より、[Zn(hmps)₂] 投与による膵ラ氏島保護効果は、[Zn(hmpo)₂] 投与による効果よりも高いことが示唆された。そして、その保護作用機序も異なることが予想された。そこで今回、Zn 錯体による膵ラ氏島に対する 2 つの保護作用機序を考えた。1 つ目として [Zn(hmps)₂] 投与群では、膵臓の Zn 濃度の増加がほとんど認められず、血糖降下作用や HbA1c 値の改善効果から考えられる全身性の抗糖尿病効果により、間接的に膵ラ氏島を保護している作用機序が示唆された。2 つ目として、[Zn(hmpo)₂] においては、全身性の抗糖尿病効果は低いが、膵臓における Zn の高い蓄積が認められた。そのため、膵ラ氏島に対して Zn イオンもしくは [Zn(hmpo)₂] が、直接的に作用して、膵ラ氏島を保護している作用機序が示唆された。

他方において、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ を含めた、Zn 錯体の包括的な抗糖尿病作用機序は詳細には解明されておらず、著者の所属する研究室において現在研究中である。近年 Naito らは、 $[\text{Zn}(\text{hkt})_2]$ が、インスリン受容体基質 (IRS) を脱リン酸化する PTP1B や、セカンドメッセンジャーのホスホイノシトール 3 リン酸 (PIP3) を脱リン酸化する PTEN を直接的に阻害することによって、脂肪細胞である 3T3-L1 細胞におけるインスリンシグナル経路を活性化し、インスリン様活性を示していることを報告した [69]。おそらく、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ も類似した作用機序で、抗糖尿病効果を示している可能性が考えられた。今後、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の抗糖尿病作用機序を明らかにするために、*in vitro* において脂肪細胞、肝細胞及び筋細胞などの標的細胞における分子作用機序を解明していく必要があると考えられる。

今回の投与実験の結果より、セレノマルトールによる有機 Se-Zn 錯体である $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は、ob/ob マウスと同様に、2 型糖尿病モデル KKA^y マウスにおいても、血糖降下作用や HbA1c 値の改善効果、そして、インスリン抵抗性及びレプチン抵抗性を改善させ、抗糖尿病効果を示すことがわかった。そのため、第 2 章の結果と合わせて考えると、今回の Zn 錯体は、肥満及びインスリン抵抗性を示す 2 型糖尿病モデルマウスには抗糖尿病効果を示すことが示唆された。

また、KKA^y マウスにおいても ob/ob マウスの実験と同様に、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ を投与して、臓器中の $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ 比を求め、臓器中の化学形態を推定した。その結果、血漿においては $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ 及び $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ 、そして肝臓及び筋肉においては $[\text{Zn}(\text{hmps})^+]$ 、脾臓においては主に配位子、また骨においては Zn イオンの形で存在していることが示唆された (Table 3-3 and Fig. 3-6)。活性本体である Zn 濃度の増加は肝臓において特に大きなこと、そして、肝臓の組織切片における Zn 錯体の脂質蓄積抑制効果が認められたことから、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は肝臓において、Zn 錯体の化学形態で抗糖尿病効果を示していることが示唆された。一方で、膵臓への Zn の蓄積が認められないにもかかわらず、膵ラ氏島の肥大化は抑制傾向にあることが示唆された。この結果より、膵臓においては、他の末梢臓器におけるインスリン抵抗性が、Zn 錯体の抗糖尿病効果によって改善されたため、膵ラ氏島の肥大化抑制効果につながったことが示唆された。

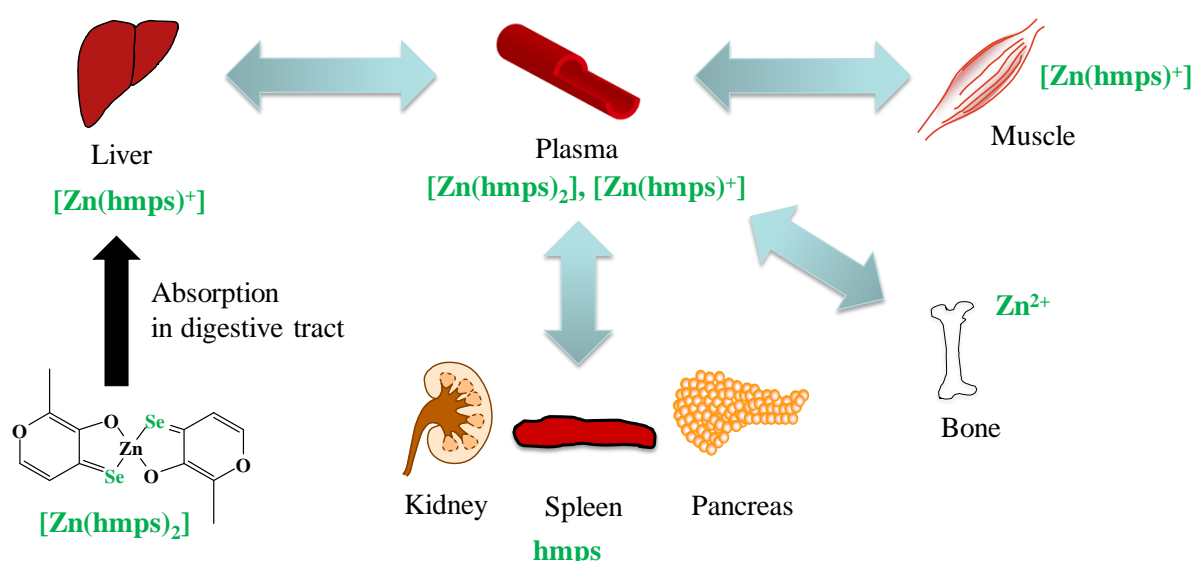


Fig. 3-6. Biodistribution of $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ after oral administration for 28 days to KKA^y mice.

KKAYマウスと ob/ob マウスとの臓器分布の違いに関して、KKAY マウスでは、肝臓において Zn 錯体の化学形態で抗糖尿病効果を、ob/ob マウスでは、膵臓において Zn イオンの化学形態で抗糖尿病効果を示す結果であり、Zn 錯体の作用臓器が異なることが示唆された。しかし [Zn(hmps)₂] の臓器分布と組織形態学的な改善効果は、KKAY マウスにおける肝臓では相関が認められたが、ob/ob マウスにおける膵臓においては、Zn イオンの蓄積にもかかわらず、膵ラ氏島の保護という組織形態学的改善効果は認められなかった。したがって、連続経口投与後の臓器分布解析の結果からは、明確な作用臓器の特定には至らなかった。ゆえに、連続投与実験中の経時的かつ経日的な臓器移行性を調べる必要があると考えられた。また、*in vivo* における Zn 錯体の抗糖尿病作用臓器について今後解明する際には、臓器中の Zn 濃度を原子吸光光度法や ICP-MS 法により定量し、Zn 錯体の標的臓器を特定する方法に加え、その他の作用点を考える必要もあると考えられた。そのため著者は、生体レベルにおける抗糖尿病効果を多面的な視点から考えることが、Zn 錯体の抗糖尿病効果を理解するうえで重要だと考えた。今回の KKAY マウスにおける結果では、空腹時血漿レプチン濃度を低下させ、レプチン抵抗性軽減作用を示した。過去の研究においても同様の結果が得られている [35,36]。また、レプチンは摂食促進及び、インスリン分泌抑制作用や抗インスリンホルモン刺激作用をもつグレリン [77] に拮抗する作用を持つため、グレリンの作用についても間接的に阻害し、抗糖尿病効果を示している可能性も考えられる。このように、過去の報告から推定し得る Zn 錯体の末梢臓器（肝臓、筋肉、脂肪）におけるインスリン抵抗性の改善効果に加え、上記の作用などの未だに解明されていない機序が、多くの臓器において協調的に働き、抗糖尿病効果を示している可能性が考えられるため、Zn 錯体は複合的な作用を持つ、という観点からの検討が必要であると考えられる。

総括及び将来への展望

本論文では、ヒドロキシピロン誘導体配位子をリード化合物として、有機カルコゲン Zn 錯体を合成し、高活性な Zn 錯体の探索、糖尿病発症機序の異なるモデルマウスにおける Zn 錯体の抗糖尿病効果の評価、Zn 錯体の生体内臓器分布の推定及び Zn 錯体の生体内臓器分布と組織形態学的な改善効果の関連性に基づいて、Zn 錯体が抗糖尿病効果を示す作用臓器の特定を目的に実験を行い、以下のような結果を得た。

第1章の結果より、S や Se といった HSAB 則によるソフトな配位原子を持つ Zn 錯体が、ハードな O を配位原子とした Zn 錯体と比べて高い *in vitro* インスリン様活性を示し、Zn 錯体の分配係数と *in vitro* インスリン様活性には相関関係が認められた。また、Se を配位原子に持つ $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の X 線結晶構造は歪んだ 4 配位四面体構造をしており、S を配位原子に持つ $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ に関しても同様の構造をしていることが報告されているため、歪んだ 4 配位四面体構造の Zn 錯体が非常に高いインスリン様活性を示すことも示唆された。

第2章の結果より、世界で初めて Zn 錯体投与により、ob/ob マウスに対して抗糖尿病効果を示すことが分かった。 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ に関して、ob/ob マウスに投与するには、投与量過多のため、Zn の過剰症と思われる消化器症状の副作用が認められた。また、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ に関しては、血漿 AST 及び ALT の Control 群と比べた有意な活性上昇の結果から、肝障害が示唆された。Zn 錯体によるこれらの副作用は、今後 Zn 錯体を用いた治療薬開発のために克服すべき課題であると考えられた。また、ob/ob マウスにおいては、Zn 錯体投与により、膵ラ氏島の肥大化傾向が示された。Zn 濃度が膵臓において増加傾向にあり、Zn イオン、もしくは Zn 錯体がインスリンシグナルの活性化及び PDX-1 の mRNA の発現量を増加させることが報告されているため、それらの影響で肥大化している可能性が考察された。しかしながら、KKA^y マウスでは逆の結果であった（第3章で後述）。これらの副作用及び膵ラ氏島の肥大化傾向は、いままでの KKA^y マウスに対する研究では認められたことは少なく、ob/ob マウスで Zn 錯体の投与実験を行うことにより判明した事実である。今回の結果から、糖尿病治療薬としての有用性や安全性を示すために、今まで KKA^y マウスを用いて糖尿病治療薬として有用であると報告してきた高活性な Zn 錯体に関しても、ob/ob マウスや、その他の糖尿病モデルマウスを用いた *in vivo* 投与実験による検討を行っていく必要があると考えられた。

第3章の結果より、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ は、著者の所属する研究室で使用されてきた 2 型糖尿病モデル KKA^y マウスにおいても、血糖降下作用、HbA1c 改善作用、インスリン及びレプチン抵抗性改善効果を有し、 $[\text{Zn}(\text{hmpt})_2]$ よりも非常に高い抗糖尿病効果を示した。さらに、Zn 錯体投与により、膵ラ氏島の肥大化抑制傾向を示し、糖尿病による高血糖状態から膵ラ氏島を保護する効果が示された。また、Zn 錯体投与群において、肝臓における脂質蓄積の抑制効果が認められた。そのため、Zn 錯体は、2 型糖尿病の病態の 1 つである膵ラ氏島の疲弊を抑制し、脂肪肝への進展を抑制できる可能性があることが分かった。

続いて、Zn 錯体の臓器分布と組織形態学的な改善効果を同時に評価し、抗糖尿病作用臓器を推定することを *in vivo* 実験において試みた。その結果、ICP-MS 法により、臓器中の Zn 及び Se 濃度を定量し、各臓器における $\Delta[\text{Zn}]$ 、 $\Delta[\text{Se}]$ 及び $\Delta[\text{Zn}]/\Delta[\text{Se}]$ 比を求めることで、 $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$ の臓器中におけ

る化学形態を推定し、Zn 錯体の臓器分布を推定できることが示唆された。今回は、2つの異なる発症機序の糖尿病モデル動物間で Zn 錯体の臓器分布と組織形態学的な改善効果を評価したが、これら2つのタイプの異なるモデル動物間で相関関係は認められなかった。ゆえに、連続投与実験中の経時的かつ経日的な臓器移行性を精査する必要があると考えられた。また、従来のように臓器中の Zn 濃度を定量する方法だけでは、*in vivo* における Zn 錯体の作用臓器解明は難しいことも予想されるため、作用機序解明のためには、新たな視点からのアプローチも必要であると考えられた。

最後に、今回の結果は、今後新規 Zn 錯体を合成する際に参考となり得る重要な知見であり、また、異なる糖尿病発症機序を持つ2型糖尿病モデルマウスに対して、Zn 錯体は抗糖尿病効果を示すことから、今後に克服かつ解明すべき事柄は多いが、新規糖尿病治療薬として Zn 錯体が新たな候補化合物となり得るデータを提供できたとは言えるだろう。今後のさらなる研究に期待したい。

参考文献

1. International Diabetes Federation. IDF Diabetes atlas 8th Edition. **2017**.
2. 厚生労働省. “平成 26 年 患者調査の概況.” :
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/kanja.pdf> , cited 8 May, **2018**.
3. 厚生労働省. “平成 28 年 国民健康・栄養調査報告.” :
<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/dl/kanja.pdf> , cited 8 May, **2018**.
4. American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* **2014**, 37, S81-S90.
5. Ken T. Coppieters, Francesco Dotta, Natalie Amirian, Peter D. Campbell, Thomas W. H. Kay, Mark A. Atkinson, Bart O. Roep, Matthias G. von Herrath. Demonstration of islet-autoreactive CD8 T cells in insulinitic lesions from recent onset and long-term type 1 diabetes patients. *J. Exp. Med.* **2011**, 209, 51-60.
6. Ralph A. Defranzo, Roy Eldor, Muhammad A. Abdul-Ghani. Pathophysiologic approach to therapy in patients with newly diagnosed type 2 diabetes. *Diabetes Care* **2013**, 36, S127-S138
7. Friedrich Mittermayer, Erica Caveney, Claudia De Oliveira, Loukas Gourgiotis, Mala Puri, Li-Jung Tai, John. Rick Turner. Addressing unmet medical needs in type 2 diabetes: a narrative review of drugs under development. *Curr. Diabetes Rev.* **2015**, 11, 17-31.
8. 桜井弘編. “生命元素辞典.” 株式会社オーム社 **2006**.
9. 廣田俊、安井裕之. “生命錯体科学のサブノート.” **2010**. 京都廣川書店
10. 駒井三千夫、神戸大朋. “亜鉛の機能と健康—新たに分かった多彩な機能—.” , 株式会社建帛社, 東京, **2013**.
11. ノーベルファーマ株式会社. ノベルジン添付文書. **2017**.
12. Manja Zec, Tatjana Srdic-Rajic, Tamara Todorovic, Katarina Andjelkovic, Ivana Filipovic-Ljeskovic, Sinisa Radulovic. Anti-metastatic and anti-angiogenic properties of potential new anti-cancer drugs based on metal complexes of selenosemicarbazones. *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* **2012**, 12, 1071-1080.
13. Jared R. Williams, Emiliano Trias, Pamela R. Beilby, Nathan I. Lopez, Edwin M. Labut, Christina Samuel Bradford, Blaine R. Roberts, Erin J. McAllum, Peter John Crouch, Timothy W. Rhoads, Cliff Pereira, Marjatta Son, Jeffrey L. Elliott, Maria Clara Franco, Álvaro G. Estévez, Luis Barbeito, Joseph S. Beckman. Copper delivery to the CNS by CuATSM effectively treats motor neuron disease in SOD^{G93A} mice co-expressing the copper-chaperone-for-SOD. *Neurobiol. Dis.* **2016**, 89, 1-9.
14. Jianguo Jia, Yang Zhang, Min Zheng, Changfu Shan, Huicheng Yan, Wenyu Wu, Xuan Gao, Bo Cheng, Weisheng Liu, Yu Tang. Functionalized Eu(III)-based nanoscale metal-organic framework to achieve near-IR-triggered and -targeted two-photon absorption photodynamic therapy. *Inorg. Chem.* **2018**, 57, 300-310.
15. Edward D. Harris. Basic and clinical aspects of copper. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* **2003**, 40, 547-586.
16. John R. J. Sorenson. Copper complexes offer a physiological approach to treatment of chronic disease. *J. Prog. Med. Chem.* **1989**, 26, 437-468.

17. Naoko Yasumatsu, Yutaka Yoshikawa, Yusuke Adachi, Hiromu Sakurai. Antidiabetic copper (II)-picolinate: impact of the first transition metal in the metallopicolinate complexes. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, 15, 4917-4922.
18. Andreas S. Mueller, Josef Pallauf. Compendium of the antidiabetic effects of supranutritional selenite dose. in vivo and in vitro investigations with type II diabetic db/db mice. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, 17, 548-560.
19. B. Lyonnet, M. Martz, E. Martin. L'emploi thérapeutique des dérivés du vanadium. *La Presse Médicale.* **1899**, 32, 191-192.
20. Hiromu Sakurai, Koichiro Tsuchiya, Mamoru Nukatsuka, Jun Kawada, Shinichiro Ishikawa, Hidehiko Yoshida, Makoto Komatsu. Insulin-mimetic action of vanadyl complexes. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **1990**, 8, 193-200.
21. John H. McNeill, V. G. Yuen, H. R. Hoveyda, Chris Orvig. Bis(maltolato)oxovanadium(IV) is a potent insulin mimic. *J. Med. Chem.* **1992**, 35, 1489-1491.
22. Urmila A. Shinde, Anita A. Mehta, Ramesh K. Goyal. Effect of chronic treatment with bis(maltolato)oxovanadium (IV) in rat model of non-insulin-dependent-diabetes. *Indian J. Exp. Biol.* **2001**, 39, 864-870.
23. Ahlem Soussi, Raed Abdennabi, Fatma Ghorbel, Jean-Claude Murat, Abdel Fettah El Feki. Ameliorated effects of (-)-epigallocatechin gallate against toxicity induced by vanadium in the kidneys of wistar rats. *Biol. Trace Elem. Res.* **2017**, 180, 239-245.
24. Robert R. Crichton 著. 塩谷光彦監訳. クライトン生物無機化学. **2016**. 東京化学同人.
25. L. Coulston, P. Dandona. Insulin-like effect of zinc on adipocytes. *Diabetes* **1980**, 29, 665-667.
26. James M. May, Charles S. Contoreggi. The mechanism of the insulin-like effects of ionic zinc. *J. Biol. Chem.* **1982**, 257, 4362-4368.
27. Assia Shisheva, Dov Gefel, Yoram Shechter. Insulinlike effect of zinc ion in vitro and in vivo: preferential effects on desensitized adipocytes and induction of normoglycemia in streptozocin-induced rats. *Diabetes* **1992**, 41, 982-988.
28. Ming-Der Chen, Shy-Jane Liou, Pi-Yao Lin, Vivian C. Yang, Paul S. Alexander, Wen-Han Lin. Effects of zinc supplementation on the plasma glucose level and insulin activity in genetically obese (ob/ob) mice. *Biol. Trace Elem. Res.* **1998**, 61, 303-311.
29. Masami Nakai, Hiromi Watanabe, Chikako Fujiwara, Hisao Kakegawa, Toshio Satoh, Jitsuya Takada, Rokuji Matsushita, Hiromu Sakurai. Mechanism on insulin-like action of vanadyl sulfate: studies on interaction between rat adipocytes and vanadium compounds. *Biol. Pharm. Bull.* **1995**, 18, 719-725.
30. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Kenji Kawabe, Hiroyuki Miyake, Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. New insulin-mimetic zinc(II) complexes; bis-maltolato zinc (II) and bis-2-hydroxypyridine-*N*-oxido zinc(II) with Zn(O₄) coordination mode. *Chem. Lett.* **2000**, 29, 874-875.

31. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Hiroyuki Miyake, Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. Insulinomimetic bis(maltolato)zinc(II) complex: blood glucose normalizing effect in KK-A^y mice with type 2 diabetes mellitus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, 281, 1190-1193.
32. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Kenji Kawabe, Hiroyuki Miyake, Toshikazu Takino, Hiromu, Sakurai, Yoshitane Kojima. Development of new insulinomimetic zinc(II) picolinate complexes with a Zn(N₂O₂) coordination mode: structure characterization, in vitro, and in vivo studies. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2002**, 7, 68-73.
33. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. Anti-diabetes effect of Zn(II)/carnitine complex by oral administration. *Chem. Pharm. Bull.* **2003**, 51, 230-231.
34. Eriko Ueda, Yutaka Yoshikawa, Noriko Kishimoto, Makoto Tadokoro, Naohisa Yanagihara, Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. New insulinomimetic zinc(II) complexes of nicotinamide and its derivatives: X-ray structure and biochemical activity. *Chem. Lett.* **2001**, 30, 1184-1185.
35. Yusuke Adachi, Jiro Yoshida, Yukihiro Kodera, Tamas Kiss, Tamas Jakusch, Eva A. Enyedy, Yutaka Yoshikawa, Hiromu Sakurai. Oral administration of a zinc complex improves type 2 diabetes and metabolic syndromes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, 351, 165-170.
36. Yutaka Yoshikawa, Yusuke Adachi, Hiromu Sakurai. A new type of orally active anti-diabetic Zn(II)-dithiocarbamate complex. *Life Sci.* **2007**, 80, 759-766.
37. Shigeyuki Fujimoto, Hiroyuki Yasui, Yutaka Yoshikawa. Development of novel antidiabetic zinc complex with an organoselenium ligand at the lowest dosage in KK-A^y mice. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, 121, 10-15.
38. Yutaka Yoshikawa, Eriko Ueda, Yuka Suzuki, Naohisa Yanagihara, Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. New insulinomimetic zinc(II) complexes of α -amino acids and their derivatives with Zn(N₂O₂) coordination mode. *Chem. Pharm. Bull.* **2001**, 49, 652-654.
39. Yutaka Yoshikawa, Mayuko Kondo, Hiromu Sakurai, Yoshitane Kojima. A family of insulinomimetic zinc(II) complexes of amino ligands with Zn(Nn) (n = 3 and 4) coordination modes. *J. Inorg. Biochem.* **2005**, 99, 1497-1503.
40. 五十嵐 叔郎. 超高感度分析試薬としてのポルフィリン. *BUNSEKI KAGAKU* **1997**, 46, 1-23.
41. Tapan K. Saha, Yutaka Yoshikawa, Hiromu Sakurai. A [meso-Tetrakis(4-sulfonatophenyl)porphyrinato]zinc(II) complex as an oral therapeutic for the treatment of type 2 diabetic KKA^y mice. *Chem. Med. Chem.* **2007**, 2, 218-225.
42. Yutaka Yoshikawa, Akito Murayama, Yusuke Adachi, Hiromu Sakurai, Hiroyuki Yasui. Challenge of studies on the development of new Zn complexes (Zn(opt)₂) to treat diabetes mellitus. *Metallomics* **2011**, 3, 686-692.
43. Hiroki Murakami, Hiroyuki Yasui, Yutaka Yoshikawa. Pharmacological and pharmacokinetic studies of anti-diabetic tropolonato-Zn(II) complexes with Zn(S₂O₂) coordination mode. *Chem. Pharm. Bull.* **2011**, 60, 1096-1104.
44. 厚生労働省. “18 類香料リスト.” : 〈<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzentu/0000196569.pdf>〉, cited 7 May, **2018**.

45. Pravat Bhattacharyya, J. Derek Woollins. Selenocarbonyl synthesis using woollins reagent. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 5949-5951.
46. L. E. Hare, M. C. Lu, C. B. Sullivan, P. T. Sullivan, R. E. Counsell, P. A. Weinhold. Aromatic amino acid hydroxylase inhibitors. 3. in vitro inhibition by azadopamine analogs. *J. Med. Chem.* **1974**, 17, 1-5.
47. Beverley L. Ellis, Anne K. Duhme, Robert C. Hider, M. Bilayet Hossain, Safia Rizvi, Dick Van Der Helm. Synthesis, physicochemical properties, and biological evaluation of hydroxypyranones and hydroxypyridinones: novel bidentate ligands for cell-labeling. *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3659-3670.
48. George Michael Sheldrick. A short history of SHELX. *Acta Crystallogr. Sect. A* **2008**, 64, 112-122.
49. George Michael Sheldrick. SHELXT: Integrating space group determination and structure solution. *Acta Crystallogr. Sect. A* **2014**, 70, C1437.
50. Robert C. Hider, Linda Ejim, Paul D. Taylor, Rosemary Gale, Ernst Huehns, John B. Porter. Facilitated uptake of zinc into human erythrocytes. Relevance to the treatment of sickle-cell anaemia. *Biochem. Pharmacol.* **1990**, 39, 1005-1012.
51. Gutmann Viktor. *The donor-acceptor approach to molecular interactions*. Plenum Press. New York, **1978**, ch. 3, 35-56.
52. Jana A. Lewis, Ba L. Tran, David T. Puerta, Evan M. Rumberger, David N. Hendrickson, Seth M. Cohen. Synthesis, structure and spectroscopy of new thiopyrone and hydroxypyridinethione transition-metal complexes. *Dalton Trans.* **2005**, 15, 2588-2596.
53. W. Beasch, M. Schuster. Die kristallstruktur von bis(*N,N*-diethyl-*N'*-benzoylseleno-ureato)zink(II). *Z. Anorg. Allg. Chem.* **1993**, 619, 786-790.
54. M. Kampf, R. Richter, L. Hennig, A. Eidner, J. Baldamus, R. Kirmse. Synthese, strukturen, NMR- und EPR-spektroskopische untersuchungen an übergangsmetallkomplexen monofluorsubstituierter acylselenoharnstoffliganden. *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2004**, 630, 2677-2686.
55. Hisashi Iwatsuka, Akio Shino, Ziro Suzuki. General survey of diabetic features of yellow KK mice. *Endocrinol. Jpn.* **1970**, 17, 23-35.
56. 左右田 隆、川松 豊、藤田 剛、目黒寛司、池田 衡. インスリン抵抗性改善薬ピオグリタゾンの創製. *YAKUGAKU ZASSHI* **2002**, 122, 909-918.
57. Gabriela Fernández-Formoso, Sonia Pérez-Sieira, David González-Touceda, Calos Dieguez, Sulay Tovar. Leptin, 20 years of searching for glucose homeostasis. *Life Sci.* **2015**, 140, 4-9.
58. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Michiko Shintani, Shingo Kamoshida, Naemi Kajiwara, Hiroyuki Yasui. Anti-hyperglycemic effect of long-term bis(hinokitolato)zinc complex ([Zn(hkt)₂]) ingestion on insulin resistance and pancreatic islet cells protection in type 2 diabetic KK-A^y mice. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, 40, 318-326.
59. Takayasu Moroki, Yutaka Yoshikawa, Katsuhiro Yoshizawa, Airo Tsubura, Hiroyuki Yasui. Morphological analysis of the pancreas and liver in diabetic KK-Ay mice treated with zinc and oxovanadium complexes. *Metallomics* **2014**, 6, 1632-1638.

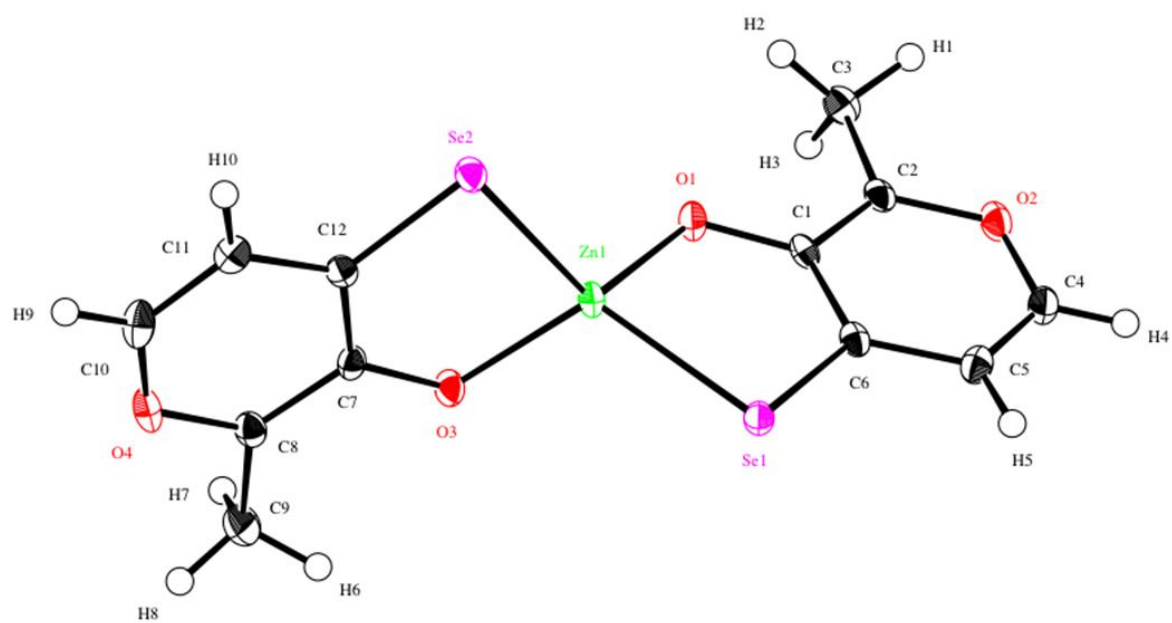
60. J. Folch, I. Ascoli, M. Lees, J. A. Meath, R. N. LeBaroon. Preparation of lipid extracts from brain tissue. *J. Biol. Chem.* **1951**, 191, 833-841.
61. Anstee M. Quentin, Robert D. Goldin. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int. J. Exp. Pathol.* **2006**, 87, 1-16.
62. I. K. Hwang, V. L.W. Go, D. M. Harris, I. Yip, K. W. Kang, M. K. Song. Effects of cyclo (his-pro) plus zinc on glucose metabolism in genetically diabetic obese mice. *Diabetes Obes. Metab.* **2003**, 5, 317-324.
63. Masanobu Kawai, Maureen J. Devlin, Clifford J. Rosen. Fat targets for skeletal health. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2009**, 5, 365-372.
64. World Health Organization Home Page. http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_221/en/ (accessed Nov 1, 2017).
65. L. Kolodziejczyk, A. Put, P. G. Szczecin. Liver morphology and histochemistry in rats resulting from ingestion of sodium selenite and sodium fluoride. *Fluoride* **2000**, 33, 6-16.
66. Yasuyoshi Sayato, Tatsuya Hasegawa, Shinjiro Taniguchi, Hiroshi Maeda, Kiyokazu Ozaki, Isao Narama, Katsuhiko Nakamuro. Acute and subacute oral toxicity of selenocystine in mice. *Eisei Kagaku* **1993**, 39, 289-296.
67. William Kreutner, Suzanne C. Springer, Joseph E. Sherwood. Resistance of gluconeogenic and glycogenic pathways in obese-hyperglycemic mice. *Am. J. Physiol.* **1975**, 228, 663-671.
68. Elisa Bellomo, Kshetrimayum Birla Singh, Alberto Massarotti, Christer Hogstrand, Wolfgang Maret. The metal face of protein tyrosine phosphatase 1B. *Coord. Chem. Rev.* **2016**, 327-328, 70-83.
69. Yuki Naito, Yutaka Yoshikawa, Hiroyuki Yasui. Bis(hinokitiolato)zinc complex ([Zn(hkt)₂]) activates Akt/protein kinase B independent of insulin signal transduction. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2016**, 21, 537-548.
70. Andreas Barthel, Elena A. Ostrakhovitch, Philippe L. Walter, Andreas Kamplötter, Lars-Oliver Klotz. Stimulation of phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling by copper and zinc ions: Mechanisms and consequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **2007**, 463, 175-182.
71. Motoyuki Tamaki, Yoshio Fujitani, Akemi Hara, Toyoyoshi Uchida, Yoshifumi Tamura, Kageumi Takeno, Minako Kawaguchi, Takahiro Watanabe, Takeshi Ogihara, Ayako Fukunaka, Tomoaki Shimizu, Tomoya Mita, Akio Kanazawa, Mica O. Imaizumi, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Shintaro Hojyo, Toshiyuki Hukada, Takeshi Kawauchi, Shinya Nagamatsu, Toshio Hirano, Ryuzo Kawamori, Hirotaka Watada. The diabetes-susceptible gene *SLC 30A8/ZnT8* regulates hepatic insulin clearance. *J. Clin. Invest.* **2013**, 123, 4513-4524.
72. Lieselotte Herberg, Douglas L. Coleman. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. *Metabolism* **1977**, 26, 59-99.
73. Katsuya Tanabe, Zhonghao Liu, Satish Patel, Bradley W. Doble, Lin Li, Corentin Cras-Méneur, Sara C. Martinez, Cris M. Welling, Morris White, Ernesto Bernal-Mizrachi, James R. Woodgett, M. Alan Permutt. Genetic deficiency of glycogen synthase kinase-3b corrects diabetes in mouse models of insulin resistance. *PLoS Biol.* **2008**, 6, e37.

74. Tadahiro Kitamura, Jun Nakae, Yukari Kitamura, Yoshiaki Kido, William H. Biggs III, Christopher V. E. Wright, Morris F. White, Karen C. Arden, Domenico Accili. The forkhead transcription factor foxo1 links insulin signaling to pdx1 regulation of pancreatic β cell growth. *J. Clin. Invest.* **2002**, 110, 1839-1847.
75. Hongxiang Hui, Riccardo Perfetti. Pancreas duodenum homeobox-1 regulates pancreas development during embryogenesis and islet cell function in adulthood. *Eur. J. Endocrinol.* **2002**, 146, 129-141.
76. H. Taniguchi, E. Yamamoto, F. Tashiro, H. Ikegami, T. Ogihara, J. Miyazaki. β -Cell neogenesis induced by adenovirus-mediated gene delivery of transcription factor pdx-1 into mouse pancreas. *Gene Ther.* **2003**, 10, 15-23.
77. Joshua P. Thaler, David E., Cummings. Hormonal and metabolic mechanisms of diabetes remission after gastrointestinal surgery. *Endocrinology* **2009**, 150, 2518-2525.

Appendices

Appendix I

Details of X-ray analysis for $[\text{Zn}(\text{hmps})_2]$



EXPERIMENTAL DETAILS

A. Crystal Data

Empirical Formula	C ₁₂ H ₁₀ O ₄ Se ₂ Zn
Formula Weight	441.51
Crystal Color, Habit	yellow, platelet
Crystal Dimensions	0.270 X 0.270 X 0.030 mm
Crystal System	monoclinic
Lattice Type	Primitive
Lattice Parameters	a = 7.6360(8) Å b = 23.763(3) Å c = 7.4370(6) Å β = 91.807(3)° V = 1348.8(3) Å ³
Space Group	P2 ₁ /c (#14)
Z value	4
D _{calc}	2.174 g/cm ³
F ₀₀₀	848.00
μ(MoKα)	72.240 cm ⁻¹

B. Intensity Measurements

Diffractometer	R-AXIS RAPID
Radiation	MoKα (λ = 0.71075 Å) graphite monochromated
Voltage, Current	50 kV, 100 mA
Temperature	-165.0°C
Detector Aperture	280 x 256 mm
Data Images	44 exposures
ω oscillation Range (χ = 45.0, φ = 30.0)	130.0 - 190.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
ω oscillation Range (χ = 45.0, φ = 210.0)	0.0 - 160.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
Detector Position	127.40 mm
Pixel Size	0.100 mm

2 θ max	54.9°
No. of Reflections Measured	Total: 12602
	Unique: 3082 ($R_{\text{int}} = 0.0967$)
Corrections	Lorentz-polarization
	Absorption
	(trans. factors: 0.456 - 0.805)
C. Structure Solution and Refinement	
Structure Solution	Direct Methods (SHELX97)
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Function Minimized	$\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Least Squares Weights	$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0420 \cdot P)^2 + 0.6524 \cdot P]$
	where $P = (\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2) / 3$
2 θ max cutoff	54.9°
Anomalous Dispersion	All non-hydrogen atoms
No. Observations (All reflections)	3082
No. Variables	172
Reflection/Parameter Ratio	17.92
Residuals: R_1 ($I > 2.00\sigma(I)$)	0.0401
Residuals: R (All reflections)	0.0482
Residuals: wR_2 (All reflections)	0.0907
Goodness of Fit Indicator	1.052
Max Shift/Error in Final Cycle	0.001
Maximum peak in Final Diff. Map	1.21 e ⁻ /Å ³
Minimum peak in Final Diff. Map	-0.85 e ⁻ /Å ³

Table 1. Atomic coordinates and Biso/Beq

atom	x	y	z	Beq
Se1	0.38421(4)	0.44318(2)	0.81805(4)	1.117(9)
Se2	0.01158(4)	0.31249(2)	0.68240(4)	1.227(9)
Zn1	0.24779(5)	0.37593(2)	0.61202(5)	1.13(1)
O1	0.1953(4)	0.43674(8)	0.4404(3)	1.30(4)
O2	0.2407(3)	0.58562(9)	0.4171(3)	1.39(4)
O3	0.3943(4)	0.31168(8)	0.5413(3)	1.24(4)
O4	0.3781(4)	0.16218(9)	0.5820(3)	1.51(4)
C1	0.2397(5)	0.4877(2)	0.4901(4)	1.06(5)
C2	0.2006(5)	0.5322(2)	0.3735(5)	1.12(5)
C3	0.1163(5)	0.5260(2)	0.1923(5)	1.44(6)
C4	0.3249(5)	0.5979(2)	0.5745(5)	1.49(6)
C5	0.3687(5)	0.5575(2)	0.6949(5)	1.33(6)
C6	0.3268(5)	0.5008(2)	0.6573(4)	1.06(5)
C7	0.3310(5)	0.2619(2)	0.5749(4)	1.06(5)
C8	0.4344(5)	0.2147(2)	0.5445(4)	1.19(5)
C9	0.6110(5)	0.2158(2)	0.4671(5)	1.74(6)
C10	0.2190(5)	0.1535(2)	0.6477(4)	1.52(6)
C11	0.1091(5)	0.1967(2)	0.6807(4)	1.31(6)
C12	0.1617(5)	0.2524(2)	0.6444(4)	1.05(5)

$$\text{Beq} = 8/3 \pi^2 (U_{11}(\text{aa}^*)^2 + U_{22}(\text{bb}^*)^2 + U_{33}(\text{cc}^*)^2 + 2U_{12}(\text{aa}^*\text{bb}^*)\cos\gamma + 2U_{13}(\text{aa}^*\text{cc}^*)\cos\beta + 2U_{23}(\text{bb}^*\text{cc}^*)\cos\alpha)$$

Table 2. Anisotropic displacement parameters

atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
Se1	0.0166(2)	0.0123(2)	0.0135(2)	0.0002(1)	-0.0010(2)	-0.0003(1)
Se2	0.0144(2)	0.0134(2)	0.0190(2)	0.0007(1)	0.0032(2)	-0.0003(1)
Zn1	0.0170(3)	0.0093(2)	0.0165(2)	0.0004(2)	0.0006(2)	-0.0006(2)
O1	0.022(2)	0.010(1)	0.017(1)	0.0006(9)	0.000(1)	-0.0014(9)
O2	0.019(2)	0.012(1)	0.023(2)	0.0006(9)	0.003(1)	0.0022(9)
O3	0.016(2)	0.011(1)	0.021(2)	-0.0013(8)	0.004(1)	0.0017(9)
O4	0.027(2)	0.011(1)	0.019(1)	0.004(1)	0.002(1)	-0.0004(9)
C1	0.014(2)	0.012(2)	0.014(2)	0.004(2)	0.004(2)	-0.001(2)
C2	0.011(2)	0.013(2)	0.018(2)	0.002(2)	0.005(2)	-0.000(2)
C3	0.020(2)	0.017(2)	0.017(2)	0.003(2)	0.001(2)	0.002(2)
C4	0.018(2)	0.012(2)	0.026(2)	-0.001(2)	0.001(2)	-0.002(2)
C5	0.018(2)	0.015(2)	0.017(2)	-0.002(2)	0.002(2)	-0.003(2)
C6	0.013(2)	0.012(2)	0.016(2)	0.001(1)	0.006(2)	0.001(2)
C7	0.017(2)	0.011(2)	0.012(2)	-0.001(2)	-0.001(2)	-0.002(2)
C8	0.019(2)	0.013(2)	0.013(2)	0.002(2)	-0.001(2)	0.001(2)
C9	0.021(2)	0.020(2)	0.025(2)	0.004(2)	0.003(2)	-0.004(2)
C10	0.032(2)	0.013(2)	0.013(2)	-0.003(2)	0.003(2)	0.001(2)
C11	0.020(2)	0.017(2)	0.013(2)	-0.003(2)	0.000(2)	0.003(2)
C12	0.016(2)	0.014(2)	0.010(2)	0.002(2)	-0.002(2)	-0.001(2)

The general temperature factor expression: $\exp(-2\pi^2(a^2U_{11}h^2 + b^2U_{22}k^2 + c^2U_{33}l^2 + 2a*b*U_{12}hk + 2a*c*U_{13}hl + 2b*c*U_{23}kl))$

Table 3. Bond lengths (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
Se1	Zn1	2.4262(5)	Se1	C6	1.860(3)
Se2	Zn1	2.4206(5)	Se2	C12	1.859(3)
Zn1	O1	1.961(2)	Zn1	O3	1.974(3)
O1	C1	1.308(4)	O2	C2	1.343(4)
O2	C4	1.349(4)	O3	C7	1.306(4)
O4	C8	1.353(4)	O4	C10	1.339(5)
C1	C2	1.394(5)	C1	C6	1.426(5)
C2	C3	1.482(5)	C4	C5	1.349(5)
C5	C6	1.411(4)	C7	C8	1.392(5)
C7	C12	1.425(5)	C8	C9	1.483(5)
C10	C11	1.354(5)	C11	C12	1.410(5)

Table 4. Bond lengths involving hydrogens (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
C3	H1	0.980	C3	H2	0.980
C3	H3	0.980	C4	H4	0.950
C5	H5	0.950	C9	H6	0.980
C9	H7	0.980	C9	H8	0.980
C10	H9	0.950	C11	H10	0.950

Table 5. Bond angles (°)

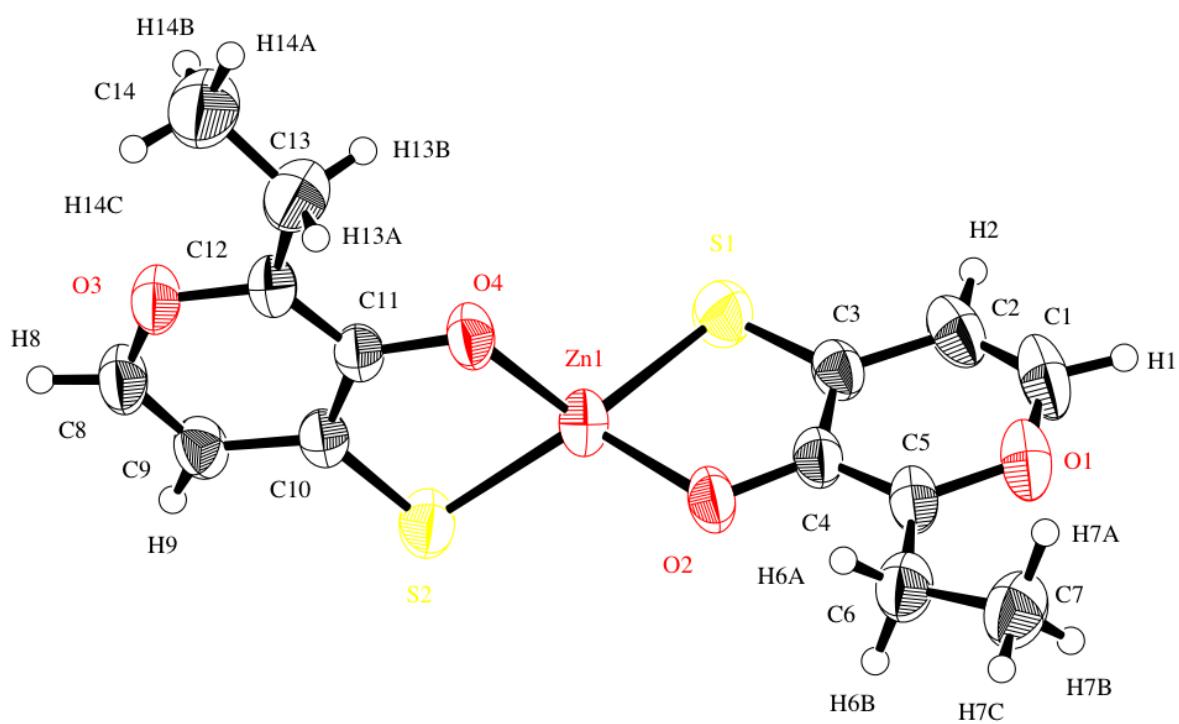
atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
Zn1	Se1	C6	89.48(10)	Zn1	Se2	C12	88.76(10)
Se1	Zn1	Se2	125.57(2)	Se1	Zn1	O1	90.03(7)
Se1	Zn1	O3	116.23(7)	Se2	Zn1	O1	117.47(8)
Se2	Zn1	O3	90.48(7)	O1	Zn1	O3	120.16(10)
Zn1	O1	C1	116.89(19)	C2	O2	C4	120.8(3)
Zn1	O3	C7	115.7(2)	C8	O4	C10	121.1(3)
O1	C1	C2	118.5(3)	O1	C1	C6	123.9(3)
C2	C1	C6	117.6(3)	O2	C2	C1	121.6(3)
O2	C2	C3	113.7(3)	C1	C2	C3	124.7(3)
O2	C4	C5	121.6(3)	C4	C5	C6	119.9(3)
Se1	C6	C1	119.6(3)	Se1	C6	C5	121.9(3)
C1	C6	C5	118.5(3)	O3	C7	C8	118.9(3)
O3	C7	C12	123.9(3)	C8	C7	C12	117.2(3)
O4	C8	C7	121.5(3)	O4	C8	C9	113.2(3)
C7	C8	C9	125.2(3)	O4	C10	C11	121.5(3)
C10	C11	C12	119.7(4)	Se2	C12	C7	120.3(3)
Se2	C12	C11	120.7(3)	C7	C12	C11	119.0(3)

Table 6. Bond angles involving hydrogens (°)

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
C2	C3	H1	109.5	C2	C3	H2	109.5
C2	C3	H3	109.5	H1	C3	H2	109.5
H1	C3	H3	109.5	H2	C3	H3	109.5
O2	C4	H4	119.2	C5	C4	H4	119.2
C4	C5	H5	120.0	C6	C5	H5	120.0
C8	C9	H6	109.5	C8	C9	H7	109.5
C8	C9	H8	109.5	H6	C9	H7	109.5
H6	C9	H8	109.5	H7	C9	H8	109.5
O4	C10	H9	119.3	C11	C10	H9	119.3
C10	C11	H10	120.1	C12	C11	H10	120.1

Appendix II

Details of X-ray analysis for [Zn(ehpt)₂]



EXPERIMENTAL DETAILS

A. Crystal Data

Empirical Formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₄ S ₂ Zn
Formula Weight	375.76
Crystal Color, Habit	yellow, prism
Crystal Dimensions	0.150 X 0.100 X 0.050 mm
Crystal System	monoclinic
Lattice Type	Primitive
Lattice Parameters	a = 7.83400(14) Å b = 8.07462(15) Å c = 24.2969(4) Å β = 97.552(7) ° V = 1523.61(5) Å ³
Space Group	P2 ₁ /n (#14)
Z value	4
D _{calc}	1.638 g/cm ³
F ₀₀₀	768.00
μ (CuK α)	49.118 cm ⁻¹

B. Intensity Measurements

Diffractometer	R-AXIS RAPID
Radiation	CuK α (λ = 1.54187 Å) graphite monochromated
Voltage, Current	40 kV, 100 mA
Temperature	23.0°C
Detector Aperture	460.0 x 256 mm
Data Images	45 exposures
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 0.0)	80 - 260.0°
Exposure Rate	80.0 sec./°
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 90.0)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	80.0 sec./°
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 180.0)	80 - 260.0°
Exposure Rate	80.0 sec./°

ω oscillation Range ($\chi = 54.0$, $\varphi = 270.0$)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	80.0 sec./°
ω oscillation Range ($\chi = 0.0$, $\varphi = 0.0$)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	80.0 sec./°
Detector Position	127.40 mm
Pixel Size	0.100 mm
$2\theta_{\max}$	136.2°
No. of Reflections Measured	Total: 16252 Unique: 2782 ($R_{\text{int}} = 0.0638$)
Corrections	Lorentz-polarization Absorption (trans. factors: 0.498 - 0.782) Secondary Extinction (coefficient: 9.60000e-004)

C. Structure Solution and Refinement

Structure Solution	Direct Methods (SHELXT Version 2014/5)
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Function Minimized	$\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Least Squares Weights	$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0291 \cdot P)^2 + 0.6524 \cdot P]$ where $P = (\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2)/3$
$2\theta_{\max}$ cutoff	136.2°
Anomalous Dispersion	All non-hydrogen atoms
No. Observations (All reflections)	2782
No. Variables	235
Reflection/Parameter Ratio	11.84
Residuals: R_1 ($I > 2.00\sigma(I)$)	0.0397
Residuals: R (All reflections)	0.0559
Residuals: wR_2 (All reflections)	0.0873
Goodness of Fit Indicator	1.049
Max Shift/Error in Final Cycle	0.002
Maximum peak in Final Diff. Map	0.34 e ⁻ /Å ³
Minimum peak in Final Diff. Map	-0.29 e ⁻ /Å ³

Table 1. Atomic coordinates and Biso/Beq

atom	x	y	z	Beq
Zn1	0.70082(6)	0.64927(6)	0.37529(2)	3.985(14)
S1	0.62555(12)	0.81315(12)	0.44669(4)	4.53(2)
S2	0.85668(11)	0.74185(12)	0.30712(3)	4.40(2)
O1	0.7622(3)	0.4160(3)	0.57398(9)	4.68(5)
O2	0.7797(3)	0.4766(3)	0.42890(8)	4.00(5)
O3	0.4224(3)	0.6484(3)	0.17146(8)	4.04(5)
O4	0.5170(3)	0.5760(3)	0.31730(8)	3.84(4)
C1	0.6932(5)	0.5590(6)	0.58762(15)	5.20(9)
C2	0.6513(5)	0.6812(5)	0.55112(15)	4.43(8)
C3	0.6779(4)	0.6614(4)	0.49493(12)	3.54(6)
C4	0.7499(4)	0.5086(4)	0.47995(12)	3.45(6)
C5	0.7887(4)	0.3889(4)	0.52028(12)	3.69(7)
C6	0.8578(6)	0.2238(5)	0.50968(16)	4.56(8)
C7	0.8705(7)	0.1025(7)	0.5571(2)	5.50(9)
C8	0.5664(5)	0.7248(5)	0.16072(14)	4.24(7)
C9	0.6982(5)	0.7540(4)	0.19996(13)	3.72(6)
C10	0.6914(4)	0.7058(4)	0.25553(12)	3.14(6)
C11	0.5375(4)	0.6250(4)	0.26708(12)	3.12(6)
C12	0.4080(4)	0.5996(4)	0.22396(12)	3.39(6)
C13	0.2427(5)	0.5155(7)	0.23018(19)	5.14(9)
C14	0.0987(5)	0.5382(6)	0.18604(16)	6.76(11)

$$Beq = 8/3 \pi^2 (U_{11}(aa^*)^2 + U_{22}(bb^*)^2 + U_{33}(cc^*)^2 + 2U_{12}(aa^*bb^*)\cos\gamma + 2U_{13}(aa^*cc^*)\cos\beta + 2U_{23}(bb^*cc^*)\cos\alpha)$$

Table 2. Anisotropic displacement parameters

atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
Zn1	0.0601(3)	0.0585(3)	0.0323(3)	-0.0006(2)	0.00431(19)	0.0005(2)
S1	0.0664(6)	0.0592(6)	0.0458(5)	0.0080(5)	0.0051(4)	-0.0076(4)
S2	0.0532(5)	0.0714(6)	0.0418(5)	-0.0145(5)	0.0030(4)	0.0031(4)
O1	0.0783(17)	0.0658(17)	0.0341(13)	-0.0211(14)	0.0091(11)	-0.0012(12)
O2	0.0651(14)	0.0581(15)	0.0301(12)	0.0053(12)	0.0108(10)	-0.0011(10)
O3	0.0577(14)	0.0619(16)	0.0331(12)	-0.0090(12)	0.0032(10)	0.0063(11)
O4	0.0552(13)	0.0596(15)	0.0320(11)	-0.0087(11)	0.0097(10)	0.0059(10)
C1	0.083(3)	0.083(3)	0.035(2)	-0.031(2)	0.0187(19)	-0.012(2)
C2	0.062(2)	0.065(3)	0.044(2)	-0.018(2)	0.0180(17)	-0.0151(19)
C3	0.0431(17)	0.057(2)	0.0354(16)	-0.0105(16)	0.0076(13)	-0.0078(15)
C4	0.0419(17)	0.057(2)	0.0319(16)	-0.0106(16)	0.0048(13)	-0.0015(15)
C5	0.0507(19)	0.059(2)	0.0310(16)	-0.0157(16)	0.0056(14)	0.0004(15)
C6	0.063(3)	0.064(3)	0.046(2)	-0.003(2)	0.0048(19)	0.0084(19)
C7	0.076(3)	0.073(3)	0.059(3)	-0.004(3)	0.002(2)	0.017(2)
C8	0.064(2)	0.065(2)	0.0336(18)	-0.0047(19)	0.0092(16)	0.0082(17)
C9	0.051(2)	0.050(2)	0.0422(19)	-0.0054(17)	0.0132(15)	0.0078(16)
C10	0.0486(18)	0.0377(18)	0.0336(16)	0.0012(14)	0.0077(13)	0.0009(13)
C11	0.0476(18)	0.0382(18)	0.0332(16)	0.0021(14)	0.0071(13)	0.0013(13)
C12	0.0517(19)	0.045(2)	0.0330(16)	-0.0017(15)	0.0075(14)	0.0046(14)
C13	0.055(2)	0.075(3)	0.063(3)	-0.017(2)	-0.0016(19)	0.018(2)
C14	0.058(2)	0.126(4)	0.071(3)	-0.025(3)	0.001(2)	0.017(3)

The general temperature factor expression: $\exp(-2\pi^2(a^2U_{11}h^2 + b^2U_{22}k^2 + c^2U_{33}l^2 + 2a*b*U_{12}hk + 2a*c*U_{13}hl + 2b*c*U_{23}kl))$

Table 3. Bond lengths (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
Zn1	S1	2.3189(11)	Zn1	S2	2.3075(10)
Zn1	O2	1.952(2)	Zn1	O4	1.969(2)
S1	C3	1.708(3)	S2	C10	1.705(3)
O1	C1	1.335(5)	O1	C5	1.365(4)
O2	C4	1.317(4)	O3	C8	1.341(4)
O3	C12	1.354(4)	O4	C11	1.312(4)
C1	C2	1.338(6)	C2	C3	1.417(5)
C3	C4	1.424(5)	C4	C5	1.382(4)
C5	C6	1.474(5)	C6	C7	1.507(6)
C8	C9	1.331(5)	C9	C10	1.413(4)
C10	C11	1.431(4)	C11	C12	1.375(4)
C12	C13	1.488(6)	C13	C14	1.462(6)

Table 4. Bond lengths involving hydrogens (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
C1	H1	0.932	C2	H2	0.972
C6	H6A	0.922	C6	H6B	0.964
C7	H7A	1.008	C7	H7B	0.883
C7	H7C	0.974	C8	H8	0.94(3)
C9	H9	0.902	C13	H13A	0.934
C13	H13B	0.930	C14	H14A	0.960
C14	H14B	0.960	C14	H14C	0.960

Table 5. Bond angles (°)

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
S1	Zn1	S2	124.24(4)	S1	Zn1	O2	89.86(7)
S1	Zn1	O4	118.22(7)	S2	Zn1	O2	124.02(7)
S2	Zn1	O4	89.42(7)	O2	Zn1	O4	113.62(9)
Zn1	S1	C3	92.43(12)	Zn1	S2	C10	92.87(11)
C1	O1	C5	119.6(3)	Zn1	O2	C4	114.1(2)
C8	O3	C12	119.5(2)	Zn1	O4	C11	114.05(19)
O1	C1	C2	123.0(3)	C1	C2	C3	120.1(4)
S1	C3	C2	121.9(3)	S1	C3	C4	120.9(2)
C2	C3	C4	117.2(3)	O2	C4	C3	122.4(3)
O2	C4	C5	118.7(3)	C3	C4	C5	118.9(3)
O1	C5	C4	121.2(3)	O1	C5	C6	114.7(3)
C4	C5	C6	124.1(3)	C5	C6	C7	116.3(4)
O3	C8	C9	122.4(3)	C8	C9	C10	120.8(3)
S2	C10	C9	122.4(2)	S2	C10	C11	120.8(2)
C9	C10	C11	116.9(3)	O4	C11	C10	121.9(2)
O4	C11	C12	119.7(3)	C10	C11	C12	118.4(3)
O3	C12	C11	122.0(3)	O3	C12	C13	114.2(3)
C11	C12	C13	123.8(3)	C12	C13	C14	117.8(4)

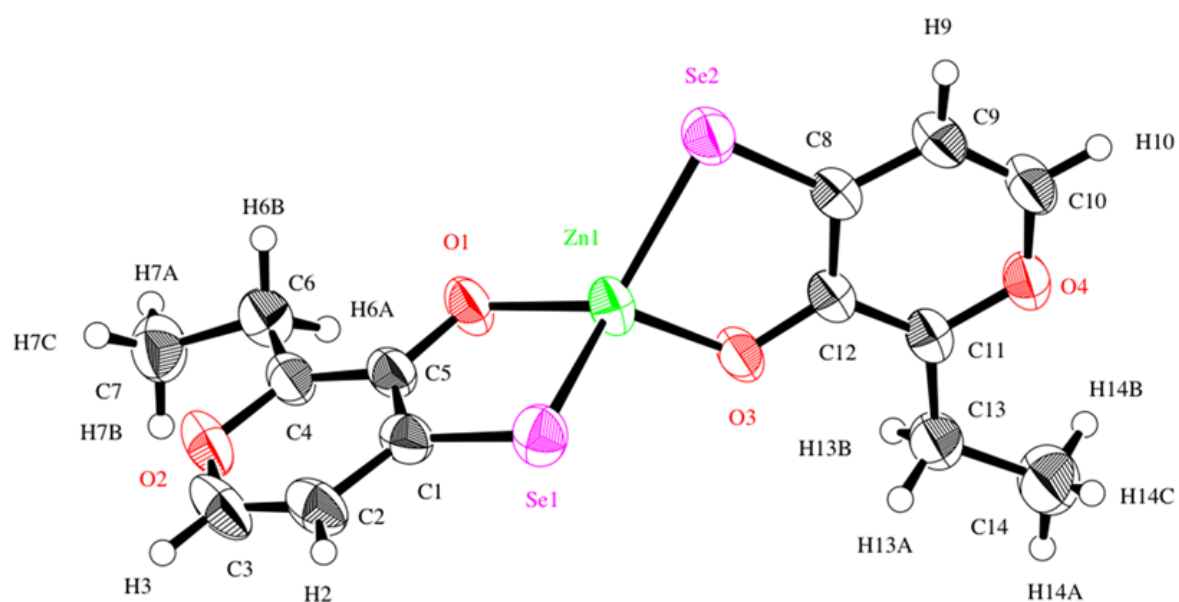
Table 6. Bond angles involving hydrogens (°)

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
O1	C1	H1	111.7	C2	C1	H1	125.3
C1	C2	H2	120.3	C3	C2	H2	119.6
C5	C6	H6A	105.7	C5	C6	H6B	109.5
C7	C6	H6A	111.8	C7	C6	H6B	109.0
H6A	C6	H6B	103.8	C6	C7	H7A	108.9
C6	C7	H7B	109.9	C6	C7	H7C	110.7
H7A	C7	H7B	109.6	H7A	C7	H7C	111.8
H7B	C7	H7C	106.0	O3	C8	H8	111(2)
C9	C8	H8	127(2)	C8	C9	H9	117.6
C10	C9	H9	121.6	C12	C13	H13A	106.1
C12	C13	H13B	110.5	C14	C13	H13A	110.1

C14	C13	H13B	105.0	H13A	C13	H13B	106.9
C13	C14	H14A	109.5	C13	C14	H14B	109.5
C13	C14	H14C	109.5	H14A	C14	H14B	109.5

Appendix III

Details of X-ray analysis for [Zn(ehps)₂]



EXPERIMENTAL DETAILS

A. Crystal Data

Empirical Formula	C ₁₄ H ₁₄ O ₄ Se ₂ Zn
Formula Weight	469.56
Crystal Color, Habit	yellow, chunk
Crystal Dimensions	0.300 X 0.300 X 0.100 mm
Crystal System	monoclinic
Lattice Type	Primitive
Lattice Parameters	a = 7.90795(15) Å b = 8.16676(16) Å c = 24.4229(5) Å β = 97.694(7) ° V = 1563.09(6) Å ³
Space Group	P2 ₁ /n (#14)
Z value	4
D _{calc}	1.995 g/cm ³
F ₀₀₀	912.00
μ (CuK α)	76.139 cm ⁻¹

B. Intensity Measurements

Diffractometer	R-AXIS RAPID
Radiation	CuK α (λ = 1.54187 Å) graphite monochromated
Voltage, Current	50 kV, 100 mA
Temperature	23.0°C
Detector Aperture	460.0 x 256 mm
Data Images	45 exposures
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 0.0)	80 - 260.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 90.0)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
ω oscillation Range (χ = 54.0, φ = 180.0)	80 - 260.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°

ω oscillation Range ($\chi = 54.0$, $\varphi = 270.0$)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
ω oscillation Range ($\chi = 0.0$, $\varphi = 0.0$)	80.0 - 260.0°
Exposure Rate	60.0 sec./°
Detector Position	127.40 mm
Pixel Size	0.100 mm
2 θ max	136.2°
No. of Reflections Measured	Total: 16567 Unique: 2840 ($R_{\text{int}} = 0.1048$)
Corrections	Lorentz-polarization Absorption (trans. factors: 0.259 - 0.467) Secondary Extinction (coefficient: 1.55000e-003)

C. Structure Solution and Refinement

Structure Solution	Direct Methods (SHELXT Version 2014/5)
Refinement	Full-matrix least-squares on F^2
Function Minimized	$\sum w (F_o^2 - F_c^2)^2$
Least Squares Weights	$w = 1 / [\sigma^2(F_o^2) + (0.0456 \cdot P)^2 + 0.6524 \cdot P]$ where $P = (\text{Max}(F_o^2, 0) + 2F_c^2) / 3$
2 θ max cutoff	136.2°
Anomalous Dispersion	All non-hydrogen atoms
No. Observations (All reflections)	2840
No. Variables	191
Reflection/Parameter Ratio	14.87
Residuals: R1 ($I > 2.00\sigma(I)$)	0.0349
Residuals: R (All reflections)	0.0379
Residuals: wR2 (All reflections)	0.0948
Goodness of Fit Indicator	1.046
Max Shift/Error in Final Cycle	0.001
Maximum peak in Final Diff. Map	0.62 e ⁻ /Å ³
Minimum peak in Final Diff. Map	-0.63 e ⁻ /Å ³

Table 1. Atomic coordinates and Biso/Beq

atom	x	y	z	Beq
Se1	0.38178(5)	0.18617(5)	0.55226(2)	4.106(13)
Se2	0.11960(5)	0.27499(5)	0.69142(2)	4.060(13)
Zn1	0.29675(6)	0.36243(5)	0.62360(2)	3.601(13)
O1	0.2235(3)	0.5314(3)	0.56882(8)	3.77(4)
O2	0.2248(3)	0.5936(3)	0.42463(9)	4.27(5)
O3	0.4751(3)	0.4325(3)	0.68324(8)	3.51(4)
O4	0.5770(3)	0.3553(3)	0.82751(9)	3.81(4)
C1	0.3188(4)	0.3506(4)	0.50118(13)	3.36(6)
C2	0.3402(5)	0.3338(5)	0.44499(14)	4.23(7)
C3	0.2929(6)	0.4555(5)	0.40893(15)	4.76(8)
C4	0.2053(4)	0.6186(4)	0.47793(13)	3.41(6)
C5	0.2489(4)	0.5003(4)	0.51775(12)	3.25(5)
C6	0.1368(5)	0.7818(4)	0.48990(15)	4.10(7)
C7	0.1236(5)	0.9046(5)	0.44343(15)	4.78(8)
C8	0.3029(4)	0.3081(4)	0.74616(13)	3.11(5)
C9	0.2984(5)	0.2601(4)	0.80117(14)	3.73(6)
C10	0.4335(5)	0.2843(4)	0.83966(15)	4.14(7)
C11	0.5884(4)	0.4044(4)	0.77539(12)	3.20(5)
C12	0.4554(4)	0.3836(4)	0.73324(12)	2.96(5)
C13	0.7535(4)	0.4835(5)	0.76771(15)	4.04(6)
C14	0.8915(6)	0.4779(8)	0.81496(18)	6.77(12)

$$Beq = 8/3 \pi^2 (U_{11}(aa^*)^2 + U_{22}(bb^*)^2 + U_{33}(cc^*)^2 + 2U_{12}(aa^*bb^*)\cos\gamma + 2U_{13}(aa^*cc^*)\cos\beta + 2U_{23}(bb^*cc^*)\cos\alpha)$$

Table 2. Anisotropic displacement parameters

atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₁₂	U ₁₃	U ₂₃
Se1	0.0599(3)	0.0517(2)	0.0435(3)	0.00821(16)	0.00361(18)	-0.00700(15)
Se2	0.0490(3)	0.0648(3)	0.0400(2)	-0.01307(16)	0.00408(18)	0.00215(16)
Zn1	0.0557(3)	0.0514(3)	0.0293(3)	0.00002(19)	0.0039(2)	-0.00007(17)
O1	0.0650(15)	0.0526(13)	0.0274(11)	0.0089(11)	0.0121(10)	0.0011(9)
O2	0.0721(16)	0.0620(15)	0.0285(12)	-0.0162(13)	0.0084(11)	0.0010(10)
O3	0.0510(13)	0.0543(13)	0.0290(11)	-0.0060(10)	0.0083(10)	0.0046(9)
O4	0.0516(14)	0.0602(14)	0.0322(12)	-0.0034(11)	0.0027(10)	0.0050(10)
C1	0.0408(17)	0.0528(18)	0.0343(16)	-0.0087(13)	0.0062(13)	-0.0096(13)
C2	0.063(2)	0.062(2)	0.0380(19)	-0.0112(17)	0.0164(17)	-0.0162(16)
C3	0.083(3)	0.070(2)	0.0314(18)	-0.024(2)	0.0201(18)	-0.0103(17)
C4	0.0430(17)	0.0555(18)	0.0311(16)	-0.0117(14)	0.0052(13)	0.0020(14)
C5	0.0419(17)	0.0519(18)	0.0304(15)	-0.0064(13)	0.0067(13)	-0.0032(13)
C6	0.057(2)	0.056(2)	0.043(2)	-0.0009(16)	0.0099(16)	0.0051(15)
C7	0.068(3)	0.060(2)	0.052(2)	-0.0016(18)	0.0034(19)	0.0133(18)
C8	0.0477(18)	0.0374(15)	0.0344(16)	-0.0021(12)	0.0104(14)	-0.0010(12)
C9	0.056(2)	0.0502(18)	0.0376(18)	-0.0078(15)	0.0139(16)	0.0034(14)
C10	0.064(2)	0.060(2)	0.0354(18)	-0.0045(17)	0.0127(17)	0.0098(15)
C11	0.0500(18)	0.0413(16)	0.0305(16)	0.0004(13)	0.0066(13)	0.0002(12)
C12	0.0481(17)	0.0347(14)	0.0308(15)	0.0008(12)	0.0092(13)	0.0005(12)
C13	0.052(2)	0.058(2)	0.0435(19)	-0.0047(16)	0.0062(15)	0.0041(16)
C14	0.059(3)	0.138(5)	0.057(3)	-0.033(3)	-0.005(2)	0.007(3)

The general temperature factor expression: $\exp(-2\pi^2(a^2U_{11}h^2 + b^2U_{22}k^2 + c^2U_{33}l^2 + 2a*b*U_{12}hk + 2a*c*U_{13}hl + 2b*c*U_{23}kl))$

Table 3. Bond lengths (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
Se1	Zn1	2.4236(7)	Se1	C1	1.855(3)
Se2	Zn1	2.4161(7)	Se2	C8	1.855(3)
Zn1	O1	1.955(2)	Zn1	O3	1.972(2)
O1	C5	1.314(4)	O2	C3	1.329(5)
O2	C4	1.347(4)	O3	C12	1.314(4)
O4	C10	1.342(5)	O4	C11	1.349(4)
C1	C2	1.412(5)	C1	C5	1.423(5)
C2	C3	1.347(5)	C4	C5	1.381(4)
C4	C6	1.482(5)	C6	C7	1.508(5)
C8	C9	1.405(5)	C8	C12	1.427(5)
C9	C10	1.340(5)	C11	C12	1.380(4)
C11	C13	1.491(5)	C13	C14	1.479(5)

Table 4. Bond lengths involving hydrogens (Å)

atom	atom	distance	atom	atom	distance
C2	H2	0.930	C3	H3	0.930
C6	H6A	0.970	C6	H6B	0.970
C7	H7A	0.960	C7	H7B	0.960
C7	H7C	0.960	C9	H9	0.930
C10	H10	0.930	C13	H13A	0.970
C13	H13B	0.970	C14	H14A	0.960
C14	H14B	0.960	C14	H14C	0.960

Table 5. Bond angles (°)

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
Zn1	Se1	C1	88.76(10)	Zn1	Se2	C8	88.98(11)
Se1	Zn1	Se2	124.02(2)	Se1	Zn1	O1	90.72(7)
Se1	Zn1	O3	117.61(7)	Se2	Zn1	O1	122.14(7)
Se2	Zn1	O3	90.13(7)	O1	Zn1	O3	114.70(9)
Zn1	O1	C5	116.4(2)	C3	O2	C4	120.7(3)
Zn1	O3	C12	115.89(19)	C10	O4	C11	120.2(3)
Se1	C1	C2	121.8(3)	Se1	C1	C5	120.7(2)
C2	C1	C5	117.5(3)	C1	C2	C3	120.4(4)
O2	C3	C2	121.7(3)	O2	C4	C5	121.6(3)
O2	C4	C6	114.8(3)	C5	C4	C6	123.6(3)
O1	C5	C1	123.4(3)	O1	C5	C4	118.5(3)
C1	C5	C4	118.1(3)	C4	C6	C7	116.1(3)
Se2	C8	C9	122.1(3)	Se2	C8	C12	120.4(2)
C9	C8	C12	117.5(3)	C8	C9	C10	120.7(4)
O4	C10	C9	121.8(3)	O4	C11	C12	121.8(3)
O4	C11	C13	114.7(3)	C12	C11	C13	123.5(3)
O3	C12	C8	123.1(3)	O3	C12	C11	118.9(3)
C8	C12	C11	118.1(3)	C11	C13	C14	117.1(3)

Table 6. Bond angles involving hydrogens (°)

atom	atom	atom	angle	atom	atom	atom	angle
C1	C2	H2	119.8	C3	C2	H2	119.8
O2	C3	H3	119.2	C2	C3	H3	119.2
C4	C6	H6A	108.3	C4	C6	H6B	108.3
C7	C6	H6A	108.3	C7	C6	H6B	108.3
H6A	C6	H6B	107.4	C6	C7	H7A	109.5
C6	C7	H7B	109.5	C6	C7	H7C	109.5
H7A	C7	H7B	109.5	H7A	C7	H7C	109.5
H7B	C7	H7C	109.5	C8	C9	H9	119.7
C10	C9	H9	119.7	O4	C10	H10	119.1
C9	C10	H10	119.1	C11	C13	H13A	108.0
C11	C13	H13B	108.0	C14	C13	H13A	108.0

C14	C13	H13B	108.0	H13A	C13	H13B	107.3
C13	C14	H14A	109.5	C13	C14	H14B	109.5
C13	C14	H14C	109.5	H14A	C14	H14B	109.5

謝辞

本研究を行うにあたって終始御指導と御鞭撻を賜りました 京都薬科大学 安井 裕之 教授、及び 神戸女子大学 吉川 豊 教授に謹んで深謝申し上げます。

ご助言及びご協力をいただきました、京都薬科大学 木村 寛之 准教授、有光 健治 助教、内藤 行喜 助教 ならびに 屋木 佑亮 ポストドクターに心から感謝申し上げます。

有機合成及び Zn 錯体の X 線結晶構造解析の際に、御助言及び御指導賜りました 京都薬科大学 薬品製造学分野 山下 正行 教授、ならびに NMR 測定にあたり、御助言及び御指導賜りました 薬品分析学分野 武上 茂彦 准教授に厚く御礼申しあげます。

元素分析を測定していただきました 京都薬科大学 共同利用機器センター 寺田 俊二 助教、質量分析を測定していただきました 織田 佳代子 講師、高尾 郁子 助教、照屋 千香子 技術職員、ならびに X 線結晶構造解析をしていただきました 小川 俊次郎 講師に深く感謝いたします。

本実験に協力していただいた、代謝分析学分野学生諸氏に謝意を表します。

最後に、暖かく見守り続けてくれた両親に心から感謝いたします。