

図5. プロリン誘導体のHPLCチャート。(A)(B) プロリン誘導体1 : lot 1-aおよび1-bについてHPLC分析を行った。いずれのlotにおいてもよくピーク分離されており、主生成物の保持時間はほぼ同じであった。(C)(D) プロリン誘導体3 : lot 3-aおよび3-bについてHPLC分析を行った。lot 3-aについては、主生成物の後ろに異性体と考えられるピークが大きく観察されたことから、エステル誘導体の加水分解処理時に異性化が起こったと考えられる(カラム: Buckyprep-M (4.6 φ - 250 mm); 移動相: 0.1%TFA-DMF/Methanol=1/1; 流速: 1.0 ml/min; 温度: 40°C; 検出器: UV310 nm; サンプル溶液: 0.1%TFA-DMF; 濃度: 0.1 wt%.)。

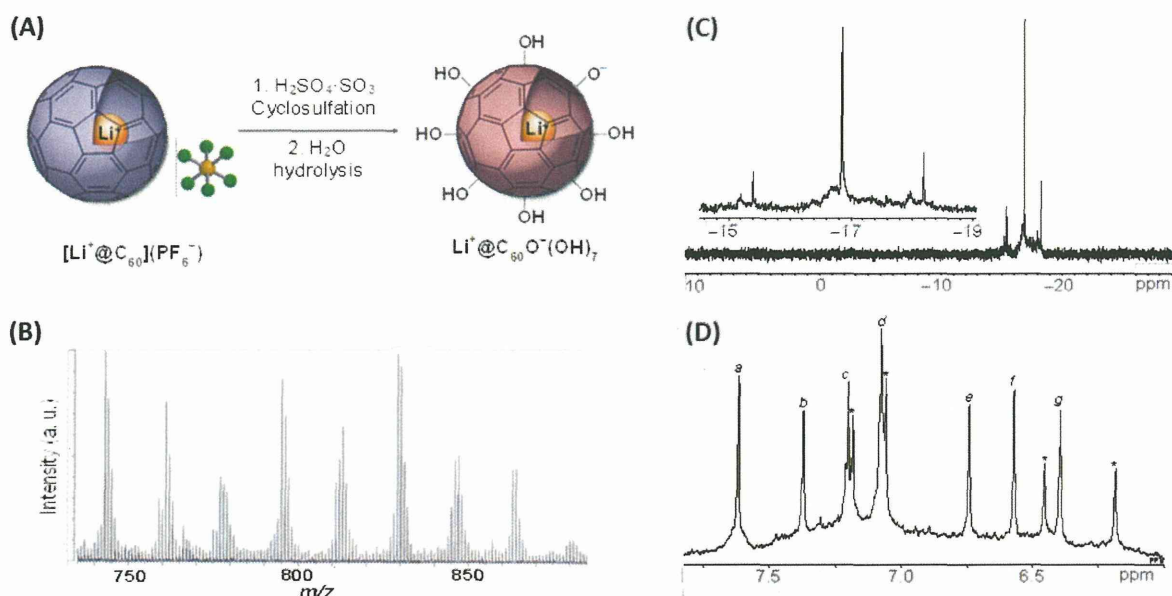


図6. リチウム内包水酸化フラーレン $\text{Li}^+\text{@C}_{60}\text{O}^-(\text{OH})_7$ の合成と同定。(A) 合成スキーム : 発煙硫酸法により合成を行った。(B) MALDI-TOF-MS: (C) ^7Li NMR : 内包リチウムのシグナルを低磁場側に観測した。(D) ^1H NMR : シャープなピークを高磁場側に7本(a~g)観測した。

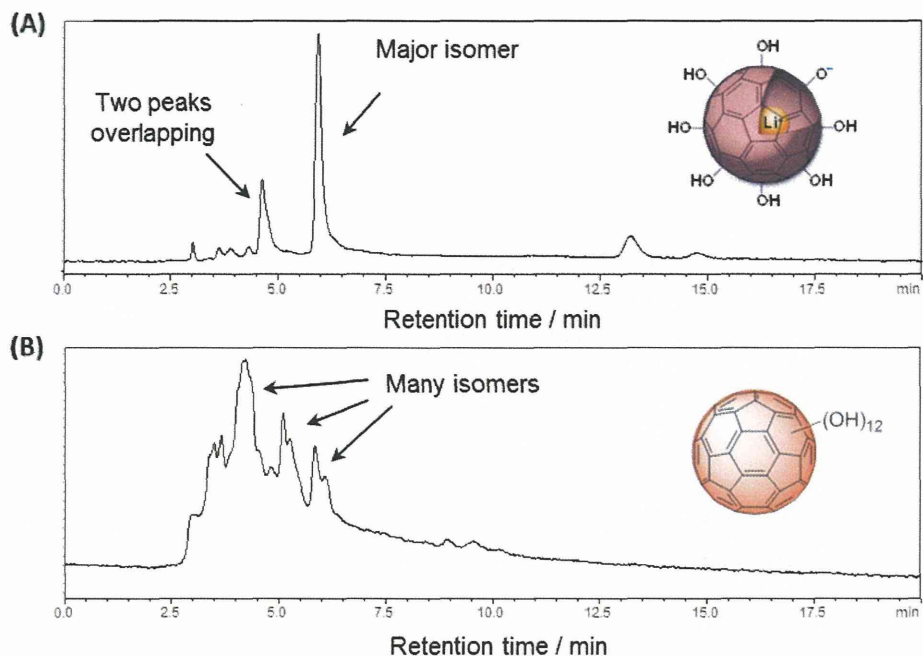


図7. リチウム内包ならびに非内包水酸化フラーレンのHPLCチャート. (A) $\text{Li}^+@C_{60}O^-(\text{OH})_7$: 水酸基の付加位置選択性が比較的高い. (B) $C_{60}(\text{OH})_{12}$: 水酸基の付加位置選択性が非常に低い. これらの結果は、水酸化の反応機構が異なることを示唆する.

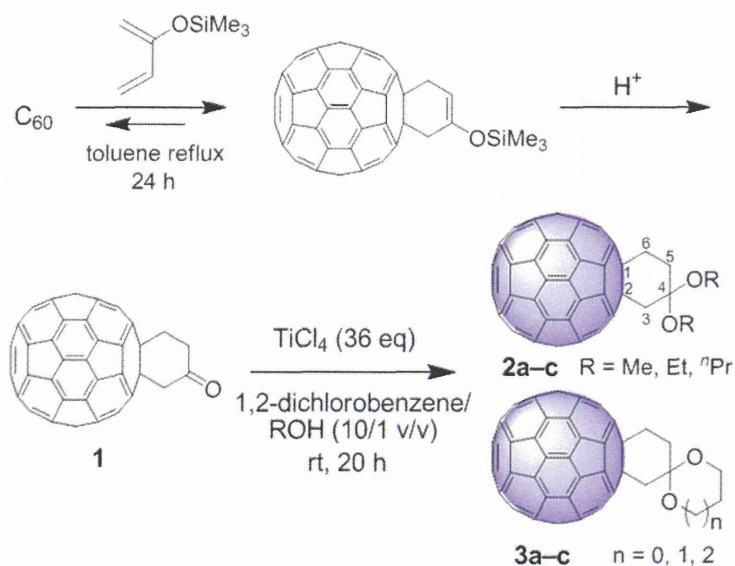


図8. 新規アセタール化58π系フラーレンの合成スキーム. Diels-Alder反応によりシクロヘキサノン誘導体 1 を合成中間体として合成し、さらに四塩化チタンを用いて非環状ならびに環状アセタール誘導体を合成した.

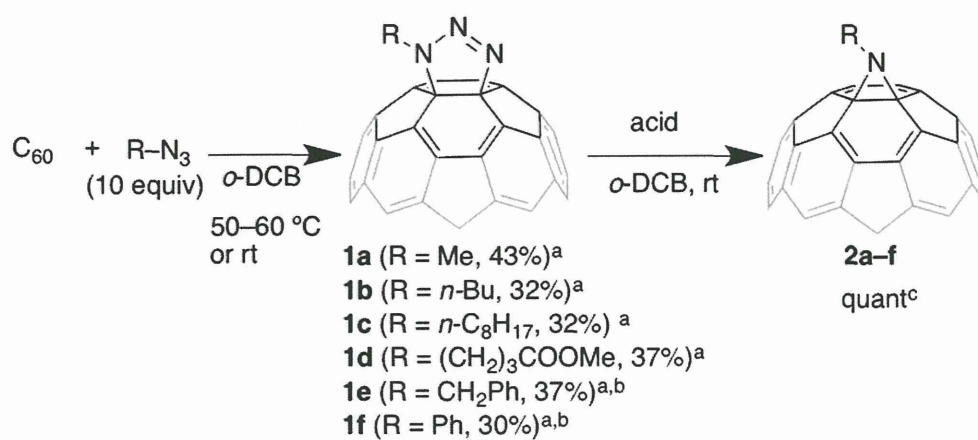


図9. 新規アジリジノ化58π系フラーレンの合成スキーム. 1,3-双極子付加反応によりトリアゾリノ誘導体**1a-f**を合成中間体として合成し、さらに酸触媒を用いてアジリジノ化誘導体**2a-f**へと定量的に変換した。

薬学的 DDS 機能を付与した C₆₀ フラーレン誘導体（ナノ DDS 化 C₆₀ フラーレン）の創製と、安定的製造と供給体制の整備

研究分担者 青島 央江 ビタミン C₆₀ バイオリサーチ株式会社 事業本部

研究要旨

本研究は、医用工学的に C₆₀ フラーレンの腸内放出型プロドラック化や糖・アミノ酸修飾など、腸管デリバリーの最適化に叶う「ナノ薬物送達システム（ナノ DDS）」を新規開発し、これを難治性炎症性腸疾患（潰瘍性大腸炎・クローン病）を標的とした、非侵襲的（経口投与）で、しかも安全かつ有効な予防・治療戦略/技術の確立へと展開するものである。特に我々は、C₆₀ フラーレン誘導体の大量生産・安定供給を可能とするシステムの開発、種々 C₆₀ フラーレン誘導体の抗酸化能の体系的比較、体内動態評価を可能とする RI 標識 C₆₀ フラーレン誘導体の合成を図った。

5 種類のフルラーレン誘導体合成を試みた結果、プロリン型誘導体 (1) 及び (3) は、1g スケールアップ合成に成功した。プロリン型 (1) ~ (3) は、細胞毒性が無く、抗酸化作用や抗炎症作用に優れた誘導体であるものの、いずれも鏡像あるいは幾何異性体が存在する。創薬分野においては、単一の異性体であることが望ましい。そこで、単一異性体のフルラーレン誘導体を創製するため、ジカルボン酸およびテトラカルボン酸誘導体の合成方法を検討した結果、ジカルボン酸誘導体は小スケール合成に成功し、構造が同定された。一方で、テトラカルボン酸誘導体に関しては、現在も構造を同定すべく、検討を進めている。

プロリン型誘導体 (1) 及び (3) は、HPLC を用いた分離分析方法を検討した結果、Buckyprep-M カラムを使用し、0.1%TFA を含む DMF/Methanol=1/1 を移動相として流出させることにより、目的化合物と不純物を明確に分離できることが見出された。

フルラーレン誘導体の医薬品としての基礎的効果を検証するため、ESR を用いて、合成したフルラーレン誘導体、抗酸化物質、および炎症性腸疾患治療剤の・OH に対する消去作用を検証した結果、プロリン型誘導体群が最も高く、次いで水酸化 C₆₀ フラーレン誘導体群、PVP 包接未修飾 C₆₀、エダラボン、アスコルビン酸であった。抗酸化剤である NAC は、DMPO-・OH アダクトと同じ位置に強いシグナルが出現するため、NAC の・OH 消去作用を評価することは困難であった。また、炎症性腸疾患の治療薬として用いられている 5-ASA の・OH 消去作用は非常に低く、最高溶解濃度であっても、IC₅₀ に達しなかった。プロリン型誘導体の IC₅₀ を比較した結果、(1) と (3) の IC₅₀ は同程度であり、ジカルボン酸は、(1) と (3) に比べると 2 倍程度であった。水酸化 C₆₀ フラーレン誘導体においては、水酸基の不可数が少なく共役結合が多いほど、若干・OH 消去作用が高い傾向が認められた。

フルラーレン誘導体の体内動態を解明するため、本年度は [¹⁴C]C₆₀ 合成方法の最適化を図った。既存の文献情報に基づき、[¹⁴C]C₆₀ の比放射能は、7・Ci/mg 以上を目標値とした。出発原料である Ba[¹⁴C]O₃ の熱分解により生成する [¹⁴C]O₂ を循環導入することにより、フランカルボン酸の収率は 90%以上に向上した。またフルアルアルコール重合体合成条件を制御することにより、炭素棒への吸着効率も飛躍的に向上した。さらに、従来よりもかさ密度が低く、結晶型ではなく多孔質型の炭素棒を用いることにより、重合体吸着効率の向上に加え、炭素棒内部にまで重合体を保持できるようになった。その後のプロセスである焼結およびアーク放電に関しても条件検討を行い、[¹⁴C]C₆₀ 合

成に最適な条件を見出した。上記の結果、先行文献(100 mCi の BaCO₃ から 15.3 · Ci/mg の C₆₀ を合成)と比較すると、放射エネルギーが 1/20 (5 mCi) の出発物質から、約 1.2 倍 (平均 18.6 · Ci/mg) の比放射能を有した [¹⁴C]C₆₀ を合成できたことから、本研究では、先行文献よりも約 20 倍以上効率よく、¹⁴C を C₆₀ へ導入することに成功した。

A. 研究目的

本研究は、抗酸化・抗炎症作用に優れる C₆₀ フラーレン誘導体を用いて、プロドラック化などの医用工学的アプローチにより、薬物治療の最適化に叶う「ナノ薬物送達システム (ナノ DDS)」を新規に合成・開発し、難治性炎症性腸疾患 (潰瘍性大腸炎・クローン病) を標的とした、非侵襲的 (経口投与) で、安全かつ有効な予防・治療戦略/技術の確立へと展開することを目指している。

本年度は、難治性炎症性腸疾患に対する有効性が期待される複数の C₆₀ フラーレン誘導体を合成し、その有効性を評価することで、創薬開発に進めるべき C₆₀ フラーレン誘導体を選出することを目標とした。また、C₆₀ フラーレンの体内動態を明らかにするため、 [¹⁴C]C₆₀ の合成方法を確立することを目標とし、具体的には、以下の研究項目を実施することを目的とした。

- (1) 医薬品原体候補の C₆₀ フラーレン誘導体を創製するため、複数種類の C₆₀ フラーレン誘導体を合成し、異性体の分離・分析技術を検討する。
- (2) C₆₀ フラーレン誘導体の医薬品としての基礎的効果を検証するため、電子スピン共鳴法 (Electron Spin Resonance; ESR) を用いて、合成した C₆₀ フラーレン誘導体のヒドロキシルラジカル (·OH) に対する消去作用を評価する。
- (3) 体内動態を解明するため、 [¹⁴C]C₆₀ の合成方法を確立する。

B. 研究方法

1. C₆₀ フラーレン誘導体の合成

1-1. プロリン型誘導体 (1) の合成(反応式 1)

1-1-1. エステル体 (4) の合成

図 1 の反応式 1 に示すエステル体(4)を合成するため、C₆₀ (SUH, 純度 99.9% <) を、500 mg (0.694 mmol) 量りとり、500 ml 三角マイヤー

中で、クロロベンゼン 250 ml に溶解し、2-3 時間攪拌した。C₆₀ クロロベンゼン溶液は、ジムロート冷却管及び温度計を取付けた 500 ml 三口フラスコに移し、Iminodiacetic acid diethyl ester 197 mg (1.042 mmol) と Paraformaldehyde 62.5 mg (2.084 mmol) を加え、オイルバスで加熱し、105-106℃で反応した。1 h 毎に反応液をサンプリングし LC-MS を用いて反応を追跡した。

- ・カラム : RPFULLERENE Column,
- ・移動相 : Toluene/CH₃CN=66/34
- ・流速 : 1ml/min

エステル体 (4) の生成が最大になる時点 (反応時間 4~5 時間、エステル体 (4) の LC 面積比が 50%前後 (図 1) で反応を止め、黒茶色の透明反応溶液を得た。エバポレーターを用いて、反応溶液からクロロベンゼンを留去 (50℃/25-20 mmHg) した。この残渣に MeOH 90 ml を加えて得られる固体を遠心分離し、MeOH 40ml で洗浄して粗生成物 (黒色粉末) を得た。

粗生成物は、トルエン 50 ml に溶解しフラッシュカラム精製した (FC 40 165 g)。n-ヘキサン展開液で未反応 C₆₀ を回収したのち、トルエン展開液によりエステル体 (4) を得た。

1-1-2. エステル体(4)→プロリン型(1)の合成

反応式 1 のプロリン型誘導体(1)を合成するため、ジムロート冷却管及び温度計を取付けた 300 ml 三口フラスコに、200 ml の乾燥トルエンに溶解したエステル体 (4) 200 mg (217µmol) を加え、10~15 分間窒素置換した。窒素気流中で、NaH (95%) 113 mg (4.47 mmol) を添加し、オイルバス中で加熱攪拌 (70℃、2h) することにより反応させ、黒褐色透明反応溶液を得た。反応溶液を 42℃まで下げた後、MeOH 2.12 ml、

2N 塩酸 2.12 ml をパスツールピペットを用いて添加し、20 min 攪拌していると黒茶色沈殿が析出した。1 晩静置した結果、沈殿がフラスコ底に沈降したため、トルエン上清をデカンテーションで除去し、得られた固体を 50 ml のトルエン、MeOH (2 回洗浄)、1N HCl、水 (pH が中性付近になるまで) の順で洗浄し、最後に 40 ml の MeOH で洗浄した。得られた粉末は、減圧下 40°C で 15 h 乾燥し、茶色粉末のプロリン型誘導体 (1) を得た。

1-2. プロリン型誘導体 (2) の合成 (反応式 2)

1-2-1.

2,5-Di-tert-butoxycarbonylpyrrolidino [60]fullerene (5) の合成

C₆₀ (SUH) を 200 mg (0.28 μmol) を脱水トルエン (150 ml) に溶解し、グリシン *t*-ブチルエステル塩酸塩 (2.12 g, 13 mmol, 45 当量)、ピリジン (1.0 mL, 13 mmol, 45 当量) をメタノール (10 ml) に溶解し、それぞれ混合した。12 days、室温下、光 (USHIO Optical Modulex, 250 W, 超高圧水銀ランプ; ファイバー, 900 mW/cm²) を照射した。TLC を用いて分析を行ったところ、C₆₀ の残存が確認されたものの、目的物、および多置換体の生成が確認されたことから反応を停止した。反応液は、水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下で溶媒を留去した。得られた固体は、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン 100% → トルエン/酢酸エチル (9:1)) を用いて精製し、1 種類の茶褐色バンドを分取し、溶媒を減圧留去した後、*n*-ヘキサンを用いて懸濁状態とし、吸引ろ過により、茶褐色固体 (1) を得た。

1-2-2. プロリン型 (2) の合成

茶褐色固体 (5) (40 mg, 0.042 mmol) を *o*-dichlorobenzene (DCB, 40 mL) に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸 (63 mg, 0.42 mmol, 10 当量) を加えて、室温で 23 h 攪拌した。

析出した固体を吸引濾取し、*o*-DCB、トルエン、1 M 炭酸水素ナトリウム、水、1 M 塩酸で洗浄し、茶褐色固体を得た。

1-3. プロリン型誘導体 (3) の合成 (反応式 3)

1-3-1. エステル体 (6) の合成

反応式 3 のエステル体 (6) を合成するため、C₆₀ (SUH) 500 mg (0.694 mmol) を量り、500 ml 三角マイヤー中で、クロロベンゼン 250 ml に溶解し、2-3 時間攪拌した。C₆₀ クロロベンゼン溶液をジムロート冷却管及び温度計を取付けた 500 ml 三口フラスコに移し、Iminodiacetic acid diethyl ester 197 mg (1.042 mmol) と Ethyl glyoxylate (polymer form, 47% toluene solution) 452 mg (2.084 mmol) を加え、オイルバスで加熱反応 (85-86°C) 反応した。1-1-1 と同様の条件で LC-MS により反応を追跡し、2 種類の異性体を含むエステル体 (6) の生成が最大になる時点 (7.5 h、エステル体 (6) の LC 面積比が 51.5%) で反応を止めた。1-1-1 と同様の反応後処理を行い、700 mg の粗生成物を得た。1-1-1 と同条件のフラッシュカラム精製により、トルエン展開液から得られたエステル体 (6) を Major Isomer と Minor Isomer に分離し、以降の工程においては、Major Isomer のみを使用することとした。

1-3-2. エステル体 (6) → プロリン型 (3) の合成

ジムロート冷却管及び温度計を取付けた 300 ml 3 口フラスコに、300 ml の乾燥トルエンに溶解したエステル体 (6) の Major Isomer 200 mg (201 μmol) を添加し、10~15 分間窒素置換した。窒素気流中で、NaH (95%) 157 mg (6.21 mmol) を添加し、オイルバスで加熱攪拌 (69-70°C, 2h) を行うことにより、黒褐色透明反応溶液を得た。反応溶液を 42.5°C まで下げた後、MeOH 3ml を加え、続いて 2N 塩酸 3ml を加え、20min 攪拌することにより黒茶色沈殿が析出した。1-1-2 と同様の処理により、黒茶色粉

末のプロリン誘導体(3)を得た。

¹⁾ T. Mashino et al., Fullerene Sci. & Technol., 8, 89-104 (2000).

1-4. ジカルボン酸誘導体の合成 (反応式 4)

1-4-1. 2,2-Diethoxycarbonylpyrrolidino [60]fullerene (7)の合成

C₆₀ (SUH)を 155 mg (0.21 mmol) を脱水トルエン 100 ml に溶解した。これにジエチルアミノマロン酸塩酸塩 (89 mg, 0.42 mmol, 2 当量) とパラホルムアルデヒド(31 mg, 1.0 mmol, 5 当量)を加えて 80°Cで 3h 加熱撹拌を行った。反応の進行を TLC (トルエン・酢酸エチル = 10 : 1)によって観察し、R_f = 0.66 付近に、目的化合物と思われるスポットを確認した後、反応を止めた。反応液を水で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下において溶媒を留去した。シリカゲルクロマトグラフィー(トルエン/酢酸エチル (10 : 1))によって精製し、茶褐色固体 (7) を得た。

1-4-2.ジカルボン酸誘導体(8)の合成

秤量した NaH (79 mg, 3.3 mmol, 50 当量) をナスフラスコに入れ、ヘキサンで 3 回洗浄を行った。そこに、脱水トルエン 20 ml に溶解させた前駆体 (7) (60 mg, 0.066 mmol)を加え、45°Cで 4h 加熱撹拌を行った。熱いうちに メタノール、続いて 2 M 塩酸を加えて反応を止めた。析出した固体を吸引濾過により濾取し、茶色固体 (8) を得た。

1-5. テトラカルボン酸誘導体の合成 (反応式 5)

1-5-1.

2,2,5,5-Tetraethoxycarbonylpyrrolidino [60]fullerene (9)の合成

C₆₀ (SUH)を 314 mg (0.44 mmol)量りとり、脱水トルエン 250 ml に溶解した。これにジエチ

ルアミノマロン酸塩酸塩 (184 mg, 0.91 mmol, 2 当量) とメソシゅう酸ジエチル(380 mg, 2.2 mmol, 5 当量) を加えて 95°C で 1h 加熱撹拌した。反応の進行を TLC (トルエン/酢酸エチル (10 : 1))によって観察し、R_f = 0.53 に目的化合物と思われるスポットを確認し、高極性側に多置換体と思われるスポットが現れたので反応を止めた。反応液を水で 2 回、飽和食塩水で 2 回洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、減圧下において溶媒を留去した。シリカゲルクロマトグラフィー (トルエン→ トルエン/酢酸エチル (10 : 1))によって精製し、茶褐色固体 (9) が得られた。

1-5-2.テトラカルボン酸誘導体 (10)の合成

秤量した NaH (93 mg, 3.8 mmol, 66 当量) をナスフラスコに入れ、ヘキサンで 3 回洗浄を行った。そこに、脱水トルエン 20 mL に溶解させた誘導体 (9) を 61 mg (0.058 mmol)加え、65°Cで 40min 加熱撹拌を行った。熱いうちに メタノール、続いて 2 M 塩酸を加えて反応を止めた。溶媒除去後、ペースト状の固体を真空乾燥し、茶色固体 (10) を 42 mg (収率 78%)得た。¹H-NMR によってエチル基の消失を確認したが、MALDI-TOF-MS では分子イオンピークを確認できなかった。

2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価 : ESR

H₂O₂ と Fe₂⁺を混合し、フェントン反応により・OH を発生させた。スピントラップ剤として、5,5-Dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)を用い、生成した・OH と DMPO が反応し、DMPO-・OH アダクトとして、電子スピン共鳴 (ESR; Electron Spin Resonance) を用いて検出した。測定試料の OH・消去作用は、試料添加による DMPO-・OH アダクトのシグナル強度減少を指標とした。シグナル強度の外部標準は、MnO の 3 番目のシグナルを使用することとした。

分類	分子式
水酸化フラーレン	C ₆₀ (OH) ₄₄
	C ₆₀ (OH) ₄₀
	C ₆₀ (OH) _{~24}
	C ₆₀ (OH) ₂₄
	C ₆₀ (OH) ₁₂
プロリン型	誘導体(1)S : 100mg合成
	誘導体(1)L : 1g合成
	誘導体(3)S : 100mg合成
	誘導体(3)L : 1g合成
	ジカルボン酸
比較対照	エダラボン
	アスコルビン酸 (AsA)
	N-アセチルシステイン (NAC)
	5-アミノサリチル酸 (5-ASA)
	ポリビニルピロリドン (PVP)
	PVP包接フラーレン

測定試料は以下に示した。

反応液調製: 0.1 mM FeSO₄ (45 μL)、DMSO (2 μL)、試料 (98 μL)、4 倍希釈した DMPO (10 μL) をマイクロチューブに添加し、ボルテックスミキサーで混合した後、0.1 mM H₂O₂ (45 μL) を添加した。

マイクロピペッターを用いて、反応液 (100 μL) をガラス製キャピラリーに吸上げ、パテでふたをした。石英管にガラス製キャピラリーを入れて ESR 装置 (日本電子製 JES-RE1X) にセットし、H₂O₂ 添加 1 分後のシグナルを測定した。

・OH 消去作用は、DMPO-・OH アダクトアダクト産生の競合阻害率 (Inh%) として、以下の式を用いて算出した。

$$\% \text{ Inh} = 100 - [(S.I_{\text{sample}} / S.I_{\text{Mn}^{2+}}) / (S.I_{\text{lef}} / S.I_{\text{Mn}^{2+}})] \times 100$$

(S.I_{sample} : サンプル添加時のシグナル強度, S.I_{lef} : サンプル無添加時のシグナル強度, S.I_{Mn²⁺} : マンガンマーカのシグナル強度)

50% 阻害濃度を挟む 2 点を用いた回帰式から、DMPO-・OH アダクトの生成を 50% 阻害する濃度 (IC₅₀) を算出した。

3. [¹⁴C]C₆₀ の合成方法確立

フラーレン誘導体の体内動態を解明するため、本年度は、¹⁴C 標識された C₆₀ (以降、[¹⁴C]C₆₀) を合成することを目的とした。

[¹⁴C]C₆₀ の合成は、Scrivens らにより 1994 年に報告されているが²⁾、多量の ¹⁴C を用いて合成していること、また [¹⁴C]C₆₀ 合成の過程で、大半の ¹⁴C をロスしている等の課題が挙げられる。2010 年、Sumner らにより報告された論文³⁾においても効率的 [¹⁴C]C₆₀ 合成方法は検討されていない。そこで、本研究においては、より効率的に [¹⁴C]C₆₀ を合成することを目的として研究を行うこととした。

[¹⁴C]C₆₀ は、図 3 に従い、出発原料の Ba[¹⁴C]O₃ を He 気流下で AgCl/PbCl₂ と共に 450 °C で熱分解させ、発生した [¹⁴C]O² ガスを 2-リチオフランの Et₂O 溶液に複数回循環導入してフランカルボン酸を合成した。フランカルボン酸は、LiAlH₄ を用いて還元しフルフリルアルコールとした後、酸触媒を作用させてフラン樹脂に重合化した。フラン樹脂は、多孔質炭素棒 (東海カーボン製 PC5060G、ρ = 0.58 g/cm³) に吸着させて 250 °C で加熱乾燥した。多孔質炭素棒吸着炭素棒を用いて、アーク放電 (He 雰囲気下、圧力 40 kPa、DC40 A) を行い、生成した C₆₀ を含む煤は、二硫化炭素を用いてアーク放電装置内を洗浄し、濾過することにより、濾液としてフラーレン抽出物を回収した。

フラーレン抽出物は、HPLC を用いて分離し、C₆₀ を精製した。UV/Vis 吸収スペクトル測定及び液体シンチレーションカウンター (LSC) 測定により、C₆₀ 濃度および比放射能を決定した。

²⁾ W. A. Scrivens et al., J. Am. Chem. Soc., 116, 4517-4518 (1994).

³⁾ S. Sumner et al., J. Appl. Toxicol., 30(4), 354-360 (2010).

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考 察

1. フラーレン誘導体の合成

1-1. プロリン型誘導体 (1) の合成

エステル体 (4) : C₆₀ (SUH) 500 mg から、343 mg (単離収率 53.7%) が得られた。合成されたエステル体の NMR 分析結果を以下に示した。

¹ H-NMR (500MHz, CDCl ₃)	δ (ppm)	1.248 (3H, t, <i>J</i> =7.0 Hz, CO ₂ CH ₂ CH ₃), 1.420 (3H, t, <i>J</i> =7.0 Hz, CO ₂ CH ₂ CH ₃), 4.213 (2H, ABd, <i>J</i> =17.5 Hz, CH ₂ CO ₂ Et), 4.352 (2H, q, <i>J</i> =7.0 Hz, CO ₂ CH ₂ CH ₃), 4.372 (2H, q, <i>J</i> =7.0 Hz, CO ₂ CH ₂ CH ₃), 4.787 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, CH ₂ -C ₆₀), 5.093 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, CH ₂ -C ₆₀), 5.569 (1H, s, CH(CO ₂ Et)-C ₆₀)
---	---------	---

プロリン型 (1) : エステル体(4)から合成した茶色粉末のプロリン誘導体 (1)は、140 mg 得られ、合成収率は、74.8%であった。¹H-NMR 分析の結果、参考文献¹⁾と一致するスペクトルが得られた。しかしながら、参考文献¹⁾と一致するスペクトル以外にも吸収が認められたことから、脱炭酸反応やそれに伴う分解反応といった副反応により生成した少量の不純物も含有されている可能性が示唆された。プロリン型誘導体の分離・精製法を確立し、高純度な誘導体を創製することが今後の課題である。プロリン型誘導体(1)の NMR 分析結果を以下に示した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	3.975, 4.174 (2H, ABd,
--------------------	---------	------------------------

(500MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	<i>J</i> =17 Hz, CH ₂ COOH), 4.616 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, CH ₂ -C ₆₀), 5.102 (1H, d, <i>J</i> =9.5 Hz, CH ₂ -C ₆₀), 5.395 (1H, s, CH(COOH)-C ₆₀), 12.877 (bs, COOH), 13.651 ((bs, COOH)
--	--

上記以外に、δ 3.809, 4.015, 4.360, 4.419, 4.90~4.95 付近にも微小吸収が認められた。

プロリン型誘導体(1)の分離分析方法を検討した結果、以下の条件で HPLC を行うことにより、リテンションタイム約 28 分に目的化合物のピークが検出され、不純物と分離することに成功した (図 1)。

- ・溶解 : 0.1%TFA-DMF
- ・カラム : Buckyprep-M
- ・移動相 : 0.1%TFA-DMF/MeOH (1 : 1)
- ・流速 : 1ml/min

100mg スケール合成と 1g スケール合成の誘導体の HPLC チャートを比較した結果、目的化合物ピークのリテンションタイムは良く一致していた。一方、不純物のピークパターンは異なっていた。

1-2. プロリン型誘導体 (2) の合成

シリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて精製して得られた茶褐色固体は、94 mg 得られ、収率は 35% であった。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS 分析の結果から、得られた固体は目的物(5)であると同定した。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.49 (s, 18H, - <i>t</i> -Bu) 4.36 (t, 1H, <i>J</i> =14 Hz, NH) 5.40 (d, 8/5H, <i>J</i> =13.5 Hz, -CH <i>trans</i>)
---	---------	--

	5.89 (<i>d</i> , 2/5H, <i>J</i> =9.0 Hz, -CH <i>cis</i>)
MALDI-TOF-MS	<i>m/z</i> = 963 [M] ⁺

前駆体 (5) の反応から得られた茶褐色固体は 17 mg であり、収率は 47 %であった。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS の結果から、得られた固体を目的物(2)であると同定された。

¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm)	5.75 (<i>s</i> , 8/5H, -CH <i>trans</i>), 5.92 (<i>s</i> , 2/5H, -CH <i>cis</i>)
MALDI-TOF MS		<i>m/z</i> = 851 [M] ⁺

1-3. プロリン型誘導体 (3) の合成

エステル体 (6) : C₆₀ (SUH) 500 mg から、エステル体(6) (329 mg: Major Isomer 300 mg, Minor Isomer 29mg)(単離収率 48%) を得た。

¹ H-NMR (500MHz, CDCl ₃)	δ (ppm)	1.252 (6H, <i>t</i> , 2 x CO ₂ CH ₂ CH ₃), 1.402 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz, CO ₂ CH ₂ CH ₃), 4.127 (1H, ABd, <i>J</i> =17 Hz, CH ₂ CO ₂ Et), 4.283 (1H, ABd, <i>J</i> =17 Hz, CH ₂ CO ₂ Et), 4.345 (6H, <i>q</i> , <i>J</i> =7.0 Hz, 3 x CO ₂ CH ₂ CH ₃), 6.149 (2H, <i>s</i> , 2 x CH(CO ₂ Et)-C ₆₀)
---	---------	--

プロリン型 (3) : 1-3 で得られたエステル体 (6) のうち、Major Isomer のみを使用し、プロリン型 (3) を合成した。Major Isomer 20 mg から、黒茶色粉末のプロリン誘導体(3) 118 mg (収率 64.6%)が得られた。¹H-NMR は、参考文献¹⁾の

スペクトルと一致した吸収が確認された。しかし、プロリン誘導体(1)と同様に、不純物に由来する微小吸収が認められた。

¹ H-NMR (500MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm)	4.260 (2H, <i>s</i> , CH ₂ COOH), 5.663 (2H, <i>s</i> , 2 x C ₆₀ -CH(COOH)), 13.086 ((<i>bs</i> , COOH), 13.841 ((<i>bs</i> , COOH)
---	---------	--

上記以外に、δ3.67~4.4 付近、5.206, 5.56~5.6 に微小吸収がみられた。

プロリン型誘導体(3)の分離分析方法を検討した結果、プロリン型誘導体(1)の分析と同様の条件で HPLC を行うことにより、リテンションタイム約 21 分に目的化合物のピークが検出され、不純物と分離することに成功した (図 2)。プロリン型誘導体(1)と同様に、100mg スケール合成と 1g スケール合成誘導体の HPLC チャートを比較した結果、目的化合物ピークのリテンションタイムは一致していた。一方、不純物のピークパターンは異なっていた。

合成に使用した C₆₀ (SUH, 99.9% <)は、高純度であり、原料価格が高い。創薬が実現した場合、誘導体化のコストもかかるため、合成にかかるコストが高くなることが懸念される。そのため、原料価格の安い C₆₀ (純度 99%)を原料として利用できる可能性を検討するため、C₆₀ (純度 99%)を出発原料として、プロリン型誘導体 (3) の合成を行った。得られた誘導体を用いて、NMR および HPLC 分析を行った結果、C₆₀ (純度 99%)を出発原料とした場合の分析結果とほぼ一致していた。原料の変更は、慎重に判断する必要があると思われるが、出発原料を C₆₀ (純度 99%)に変更できた場合には、原料コストは、C₆₀ (SUH) を用いる場合の約 1/10 になる。

1-4. ジカルボン酸誘導体の合成

シリカゲルクロマトグラフィーにより精製した茶褐色固体は 70 mg (収率 38 %)であった。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS より、得られた固体を目的物(7)と同定した。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.37 (<i>t</i> , 6H, -CH ₂ CH ₃)
		4.36-4.53 (<i>m</i> , 5H, -NH-, -CH ₂ CH ₃)
		4.99 (<i>d</i> , 2H, <i>J</i> =3.6 Hz, -NHCH ₂ -)
MALDI-TOF-MS		<i>m/z</i> = 907 [M] ⁺

析出した固体を吸引濾過により濾取して得られた茶褐色固体は 32 mg (収率 58%)であった。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS より、得られた固体は目的物(8)と同定された。

¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm)	4.51-4.58 (<i>m</i> , 1H, -NH-)
		4.76 (<i>d</i> , 2H, <i>J</i> =5.0 Hz, -NHCH ₂ -),
MALDI-TOF MS		<i>m/z</i> = 851 [M] ⁺

1-5. テトラカルボン酸誘導体の合成

シリカゲルクロマトグラフィーにより精製して得られた茶褐色固体は、194 mg (収率 42%)であった。茶褐色固体の化合物は、¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS により、目的物 (9) と同定された。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.33 (<i>t</i> , 12H, <i>J</i> = 7.0 Hz, -CH ₂ CH ₃)
		4.34-4.45 (<i>m</i> , 8H, -CH ₂ CH ₃)
		5.93 (<i>s</i> , 1H, -NH-)
MALDI-TOF-MS		<i>m/z</i> = 1051 [M] ⁺

溶媒除去後、ペースト状の固体を真空乾燥し、42 mg (収率 78%)の茶褐色固体が得られた。¹H-NMR によってエチル基の消失が確認されたが、MALDI-TOF-MS を用いた分析からは、分子

イオンピークは確認されなかった。誘導体(10)が生成されているかどうかを検証するため、現在、さらなる誘導体化を行った後に、MALDI-TOF-MS を行う等、誘導体(10)の構造決定を行うため、引き続き検討を行っている。

2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価

フルーレン誘導体の比較対照試料として、NAC についても ESR 測定を行ったが、DMPO- \cdot OH アダクトと同じ位置に強いシグナルが出現するため、%Inh を算出することはできなかった。5-ASA の場合、溶解可能な最高濃度であっても IC₅₀ に達しないことが明らかになり、さらに低濃度では、Blank よりも DMPO- \cdot OH アダクトのシグナルが高いことから、IC₅₀ の算出は困難であった。5-ASA の潰瘍性大腸炎に対する薬効は、抗酸化力も関わっているといわれているが、ESR の測定結果から、5-ASA は \cdot OH 消去能を有していないと考えられた。

各試料濃度における%Inh から IC₅₀ を算出した (表 1)。AsA の IC₅₀ が最も高く、476.9±1.79 μM であった。AsA は、本来フェントン反応で生成した DMPO- \cdot OH アダクトさえも還元するほど高い \cdot OH 消去作用が知られていることから、今回の実験結果は活性が低いように思われた。その理由として、反応系に鉄が存在することから、AsA のプロオキシダント効果により、ラジカルを生成する効果が亢進したために、DMPO- \cdot OH アダクト還元作用が低かったのではないかと考えられた。IC₅₀=10 μM オーダーの試料は、水酸化 C₆₀ フラーレン、PVP 包接 C₆₀、エダラボンであった。PVP と PVP 包接 C₆₀ の結果を比較すると、PVP の寄与が大きく、また C₆₀ 表面は PVP に覆われていることから、C₆₀ そのものの効果を明確にすることは困難であった。

水酸化 C₆₀ フラーレンの測定結果を比較すると、水酸基が少ない、即ち、二重結合が多い方が、若干 \cdot OH 消去作用が高いと考えられた。プロリン型誘導体の OH \cdot 消去作用は、水酸化フルーレ

ン誘導体や PVP/C₆₀ に比べて高く、いずれも IC₅₀=0.1 μM オーダーであった。プロリン型(1)と(3)の IC₅₀ は、ほぼ同程度であった。Large スケール合成品は、HPLC 分析から、(1)(3)ともに、合成スケールの違いにより、不純物プロファイルの違い、あるいは異性化が認められたが、small および large スケール合成品の IC₅₀ は、いずれも同程度であった。この結果から、異性化が OH・消去能に影響を及ぼすことはない、即ち、異性体も・OH 消去作用を有すると考えられた。ジカルボン酸誘導体の IC₅₀ は、(1)(3)と比較すると、約 2 倍であった。ジカルボン酸誘導体は、分離・精製を行っていないため、不純物による影響等により、IC₅₀ が高い傾向を示したのかもしれない。

総体的に、・OH 消去能は、プロリン型誘導体が高く、ついで、水酸化フラーレン、未修飾フラーレンという結果であった。この結果は、研究代表者である堤先生の研究グループにおける細胞レベルの研究結果と同様の傾向であった。

本年度は、・OH 消去作用に焦点をあてて評価を行った。生体内においては、・OH とともに生体障害を引き起こす活性酸素種として、ペルオキシラジカルが挙げられることから、来年度は、ESR を用いて、各フラーレン誘導体によるペルオキシラジカル消去作用について検証する予定である。

3. [¹⁴C]C₆₀ の合成方法確立

参考文献では、生成した [¹⁴C]O₂ ガスからフランカルボン酸を合成するまでの過程における収率は約 50 %であった。本研究では、発生した [¹⁴C]O₂ ガスを 2-リチオフランに循環導入させることにより、 [¹⁴C]O₂ ガスを 99 %以上リサイクルすることに成功した。

フラン樹脂吸着後の多孔質炭素棒は、参考文献記載の条件に従って、He 気流下、1000 °C で焼結を行った。しかし、1000 °C で焼結を行うことにより、吸着させたフラン樹脂に加えて、骨格である多孔質炭素棒も燃焼して減少してしまうこ

とが明らかになった。このことから、焼結条件を検討し最適化した結果、焼結後の残存放射量は、約 6 %から約 60 %まで改善した。

最適化した条件において、 [¹⁴C]C₆₀ の合成を行った (合計 4 回)。得られた [¹⁴C]C₆₀ の収量および比放射能を表 2 に示した。各 batch の [¹⁴C]C₆₀ トルエン溶液を図 4 に示した。また、 [¹⁴C]C₆₀ の吸収スペクトルおよび HPLC 分析結果は、各々図 5(A)および (B) に示した。比放射能の値は、当初目標としていた 7 μCi/mg を大きく上回り、最高値は 25.9 μCi/mg (Batch2)であった。収量は、当初の見込みでは、約 40 mg 合成できると推定していた。しかしながら、4batch の合計で 11.7mg と少なく、推定していた量の約 30%であった。この原因は、①「金属内包フラーレン」を合成する目的で作られたアーク放電用チャンバーを用いたため、C₆₀ の合成効率が低かったため、②¹⁴C を導入するために用いるポリマーによりフラーレン合成が阻害されたためである、と考えられた。

E. 結論

C60 フラーレン誘導体の合成においては、5 種類のプロリン型誘導体の合成を行った。そのうち、プロリン型誘導体(1)および(3)は、1g スケール合成を成功させた。一般的に、水溶性を持たせた C60 フラーレン誘導体は、HPLC 分析による分離分析が困難といわれているが、検討の結果、プロリン型誘導体(1)および(3)を HPLC により単離できる条件が見出された。

C60 フラーレン誘導体による抗酸化作用特性を明確にするため、ESR を用いて、・OH 消去作用を検証した結果、プロリン型誘導体による・OH 消去作用が最も優れており、ついで水酸化 C60 フラーレン誘導体の順であった。ESR 測定の結果は、堤先生グループにおける *in vitro* 実験結果と類似した傾向を示した。

フラーレンの体内動態を明らかにするため、 [¹⁴C]C₆₀ の合成を試みた結果、比放射能の目標値

を上回る放射活性を有する $[^{14}\text{C}]\text{C}_{60}$ を合成することに成功した。

133 年会, 横浜 2013 年 3 月.

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. K. Yamashita, Y. Yoshioka, H. Pan, M. Taira, T. Ogura, T Nagano, M Aoyama, K Nagano, Y Abe, H Kamada, S Tsunoda, H Aoshima, H Nabeshi, T Yoshikawa, Y Tsutsumi, Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C_{60} after oral administration, Pharmazie, inpress

【総説・その他】

なし

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

なし

【国内学会発表 : 合計 2 件】

1. 山下浩平、吉岡靖雄、潘 慧燕、小椋健正、平 菜由、青山道彦、角田慎一、中山博之、藤尾 慈、青島央江、小久保 研、大島 巧、鍋師裕美、吉川友章、堤 康央 : 水酸化フラーレンの安全性確保に向けた経口投与時の生体影響評価, 第 39 回日本毒性学会学術年会, 仙台, 2012 年 7 月.
2. 永野黄土、吉岡靖雄、山下浩平、平 菜由、青山道彦、吉田徳幸、角田慎一、中山博之、藤尾慈、青島央江、小久保研、大島 巧、鍋師裕美、吉川友章、東阪和馬、堤康央 : 炎症性腸疾患に対する新規ナノ医薬の開発に向けて～水酸化フラーレンの構造－活性相関に関する基礎情報の収集～、日本薬学会 第

【国際学会発表 : 合計 3 件】

1. Michihiko AOYAMA, Yasuo YOSHIOKA, Huiyan PAN, Kohei YAMASHITA, Toshinobu OGURA, Mayu TAIRA, Shin-ichi TSUNODA, Hiroyuki NAKAYAMA, Yasushi FUJIO, Hisae AOSHIMA, Ken KOKUBO, Takumi OSHIMA, Hiromi NABESHI, Tomoaki YOSHIKAWA, Yasuo TSUTSUMI. : Safety science of fullereneol C_{60} for developing nanomedicine 2 -safety and efficacy assessment of fullereneol C_{60} in oral exposure-, 6 th International Conference on Nanotoxicology, Beijing , 4-7 September, 2012.
2. Mayu TAIRA, Yasuo YOSHIOKA, Huiyan PAN, Kohei YAMASHITA, Toshinobu OGURA, Michihiko AOYAMA, Shin-ichi TSUNODA, Hiroyuki NAKAYAMA, Yasushi FUJIO, Hisae AOSHIMA, Ken KOKUBO, Takumi OSHIMA, Hiromi NABESHI, Tomoaki YOSHIKAWA, Yasuo TSUTSUMI.: Safety science of fullereneol C_{60} for developing nanomedicine 1 -anti-inflammatory effect of fullereneol C_{60} in vitro-, 6 th International Conference on Nanotoxicology, Beijing , 4-7 September, 2012.
3. Kohei YAMASHITA, Yasuo YOSHIOKA, Huiyan PAN, Toshinobu OGURA, Mayu TAIRA, Michihiko AOYAMA, Shin-ichi TSUNODA, Hiroyuki NAKAYAMA, Yasushi FUJIO, Hisae AOSHIMA, Ken KOKUBO, Takumi OSHIMA, Hiromi NABESHI, Tomoaki YOSHIKAWA, Yasuo TSUTSUMI., The basic safety assessment of fullereneol C_{60} after oral exposure, SETAC

Asia-Pacific Meeting 24-27 September,
Kumamoto, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得（出願中）

特許出願番号：特願2013-030455

発明の名称：潰瘍性大腸炎の予防または治療剤と
新規フラレーン誘導体

出願国：日本

特許出願人：ビタミンC60 バイオリサーチ株式会
社、国立大学法人大阪大学、増野匡彦、大江知
之

発明者：堤 康央、吉岡靖雄、東阪和馬、増野匡
彦、大江知之、山名修一、青島央江

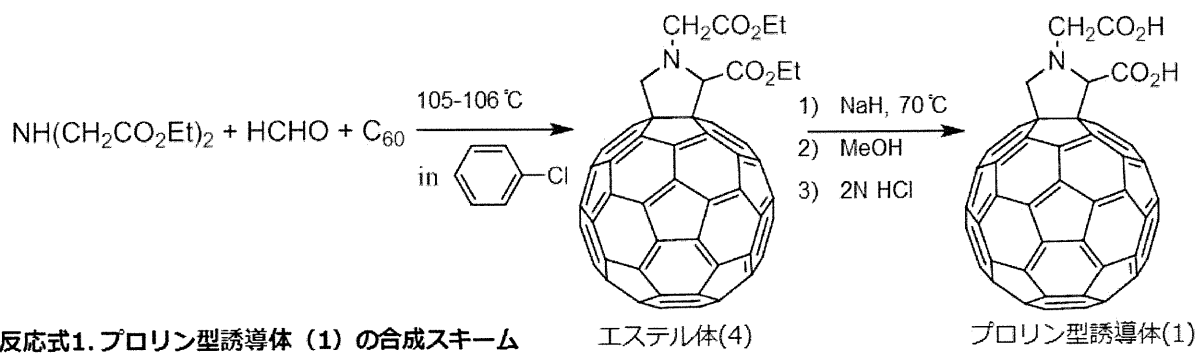
出願年月日：2013 年 2 月 19 日

② 実用新案登録

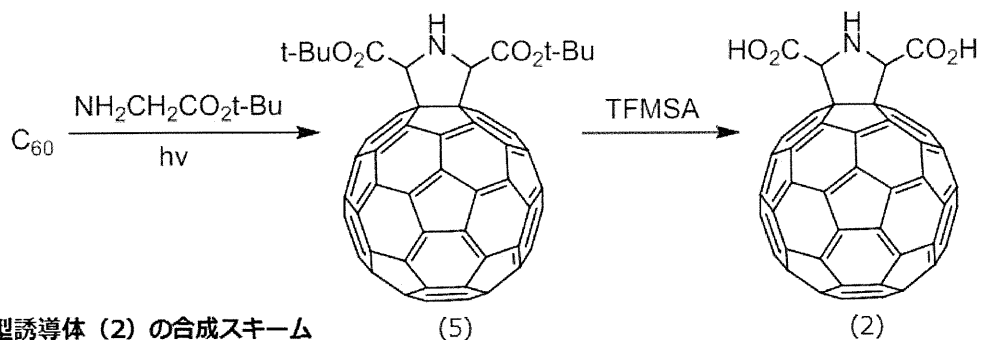
なし

その他

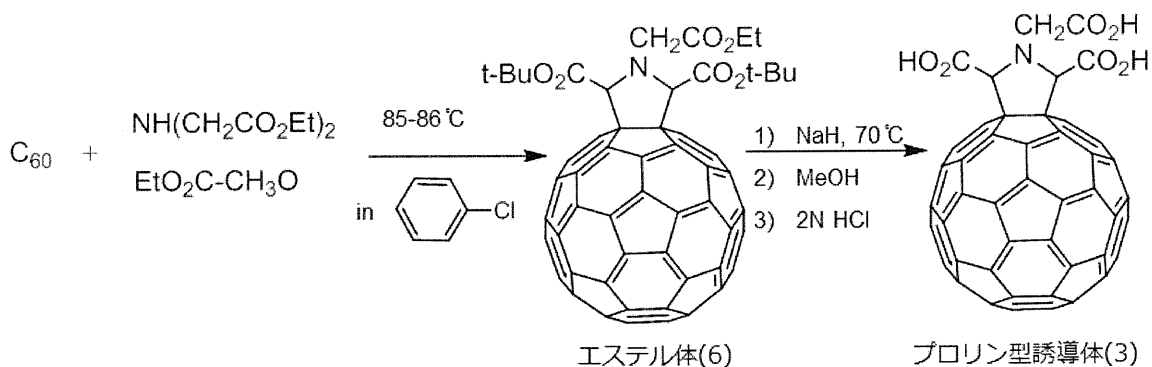
特記事項なし。



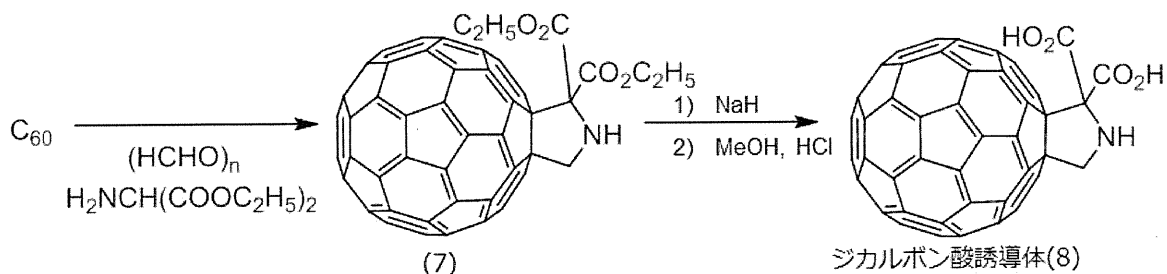
反応式1. プロリン型誘導体 (1) の合成スキーム



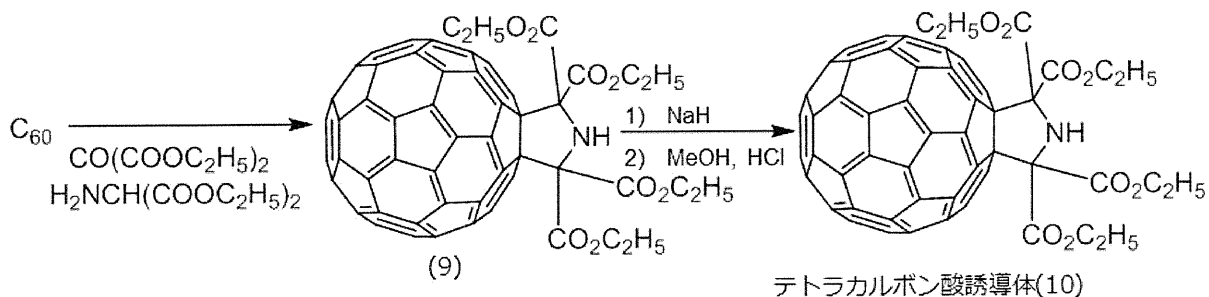
反応式2. プロリン型誘導体 (2) の合成スキーム



反応式3. プロリン型誘導体 (3) の合成スキーム



反応式4. プロリン型ジカルボン酸誘導体の合成スキーム



反応式5. プロリン型テトラカルボン酸誘導体の合成スキーム

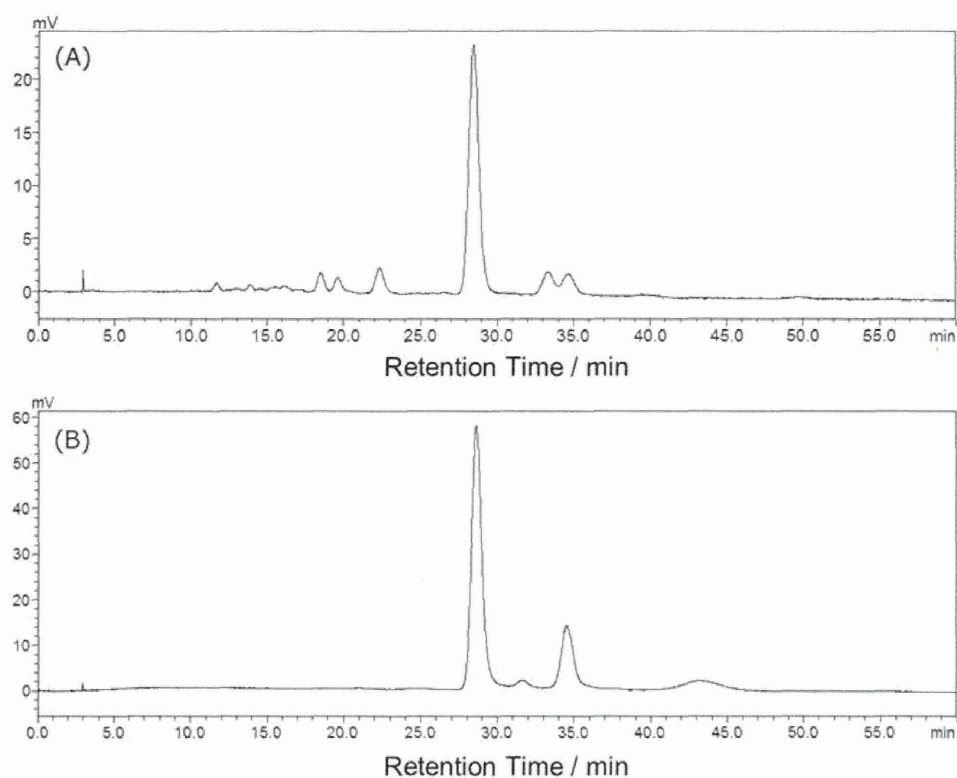


図1.プロリン型誘導体 (1) のHPLC分析チャート 0.1%TFA-DMFに0.1 wt%で化合物を溶解し、Buckyprep-Mカラムを用いて分析した。移動相：0.1%TFA-DMF/Methanol (1:1)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40℃、検出：UV310 nm (A) 100 mgスケール合成 (B) 1gスケール合成

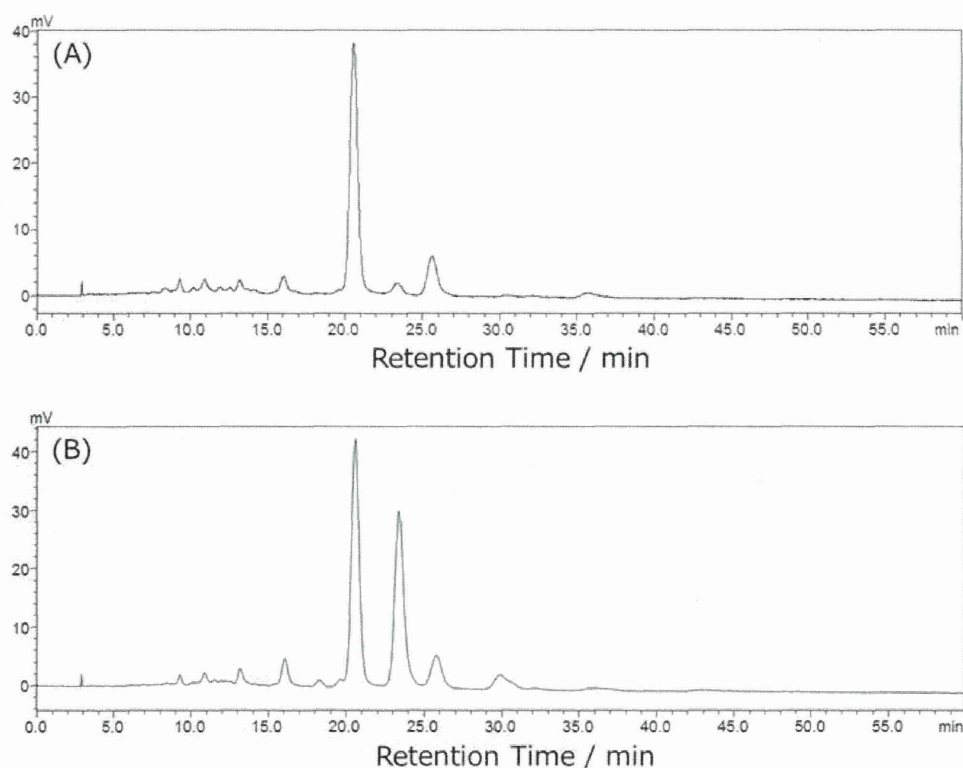


図2.プロリン型誘導体 (3) のHPLC分析チャート 0.1%TFA-DMFに0.1 wt%で化合物を溶解し、Buckyprep-Mカラムを用いて分析した。移動相：0.1%TFA-DMF/Methanol (1:1)、流速：1.0 ml/min、カラム温度：40℃、検出：UV310 nm (A) 100 mgスケール合成 (B) 1gスケール合成

表1. ESR測定結果から算出したIC50

分類	化合物	IC50 (μM) \pm 標準誤差
水酸化フラーレン	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{44}$	33.73 ± 1.83
	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{40}$	85.9 ± 1.32
	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$	9.80 ± 0.12
	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{\sim 24}$	38.66 ± 0.58
	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$	1.01 ± 0.01
	$\text{C}_{60}(\text{OH})_{12}$	7.83 ± 0.16
プロリン型誘導体	プロリン型(1)Small合成	0.19 ± 0.004
	プロリン型(1)Large合成	0.18 ± 0.01
	プロリン型(3)Small合成	0.10 ± 0.006
	プロリン型(3)Large合成	0.14 ± 0.004
比較対照	ジカルボン酸	0.24 ± 0.001
	エダラボン	31.06 ± 0.02
	ASA	210.8 ± 24.4
	PVP包接C60	7.80 ± 0.46
	PVP	31.24 ± 1.26

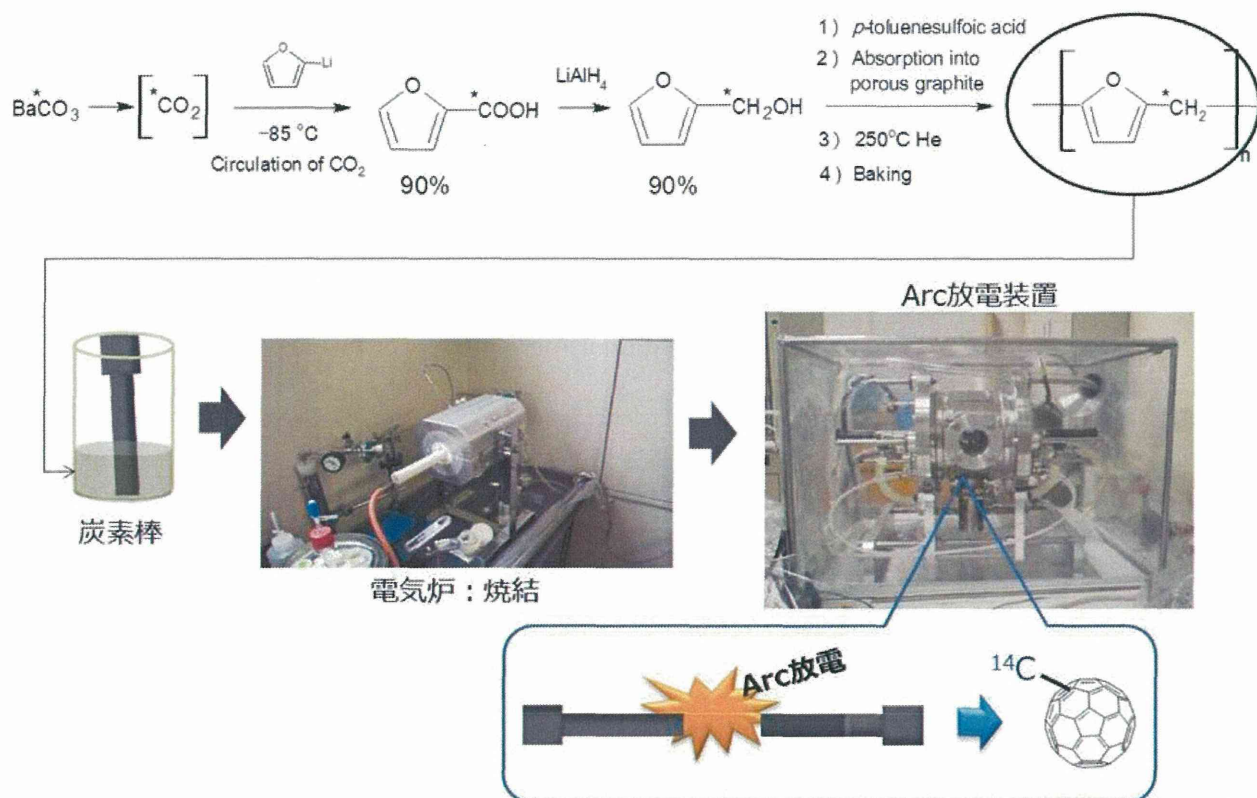


図3. BaCO_3 から ^{14}C C₆₀合成までの反応概略図

*C= ^{14}C

表2. 合成した ^{14}C C₆₀の収量および比放射能

	収量	$\mu\text{Ci}/\text{mmol}$	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$
Batch1	2.7 mg	8.82	12.3
Batch2	1.6 mg	18.7	25.9
Batch3	2.9 mg	18.5	25.7
Batch4	4.5 mg	7.59	10.6

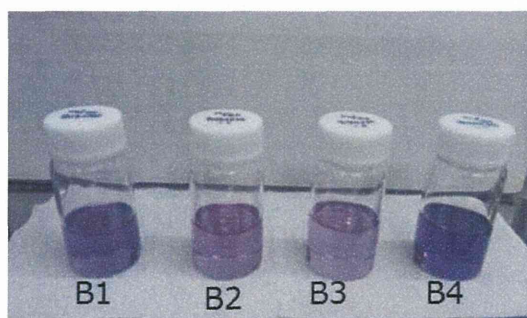


図4. ^{14}C C₆₀トルエン溶解液

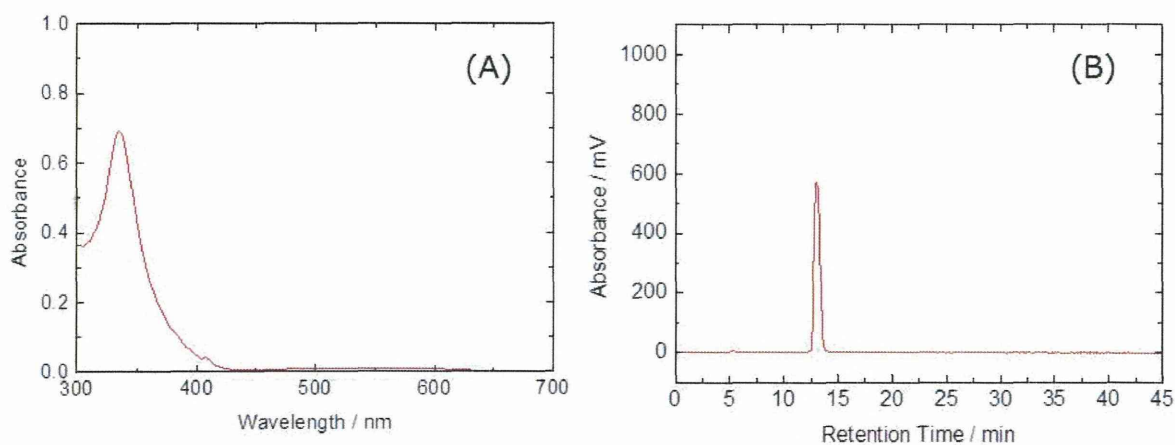


図5. ^{14}C C₆₀-Batch3分析結果 (A) 紫外線/可視光吸収スペクトル (B) 純度確認のためのHPLC分析
 カラム: Buckyprep、移動相: トルエン、流速: 3.2 ml/min、カラム温度: 室温、検出: UV340 nm

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y.	Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone- wrapped fullerene C60 after oral administration.	Pharmazie	68	54-57	2013
Ikuma N, Mikie T, Doi Y, Nakagawa K, Kokubo K, Oshima T.	Facile and exclusive formation of aziridinofullerenes by acid-catalyzed denitrogenation of triazolinofullerenes.	Org Lett	14	6040-6043	2012
Ueno H, Kokubo K, Kwon E, Nakamura Y, Ikuma N, Oshima T.	Synthesis of a new class of fullerene derivative Li ⁺ @C ₆₀ O ⁻ (OH) ₇ as a " cation-encapsulated anion nanoparticle" .	Nanoscale	5	2317-2321	2013

Laboratory of Toxicology and Safety Science¹, Graduate School of Pharmaceutical Sciences; Laboratory of Biopharmaceutical Research², National Institute of Biomedical Innovation, Osaka, Japan; Cancer Biology Research Center³, Sanford Research/USD, Sioux Falls, SD, USA; The Center for Advanced Medical Engineering and Informatics⁴, Osaka University; Vitamin C60 BioResearch Corporation⁵; Division of Foods⁶, National Institute of Health Sciences, Tokyo, Japan

Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C₆₀ after oral administration

K. YAMASHITA¹, Y. YOSHIOKA¹, H. PAN¹, M. TAIRA¹, T. OGURA¹, T. NAGANO¹, M. AOYAMA¹, K. NAGANO², Y. ABE³, H. KAMADA^{2,4}, S.-I. TSUNODA^{2,4}, H. AOSHIMA⁵, H. NABESHI⁶, T. YOSHIKAWA¹, Y. TSUTSUMI^{1,2,4}

Received July 12, 2012, accepted August 10, 2012

Yasuo Yoshioka, PhD and Yasuo Tsutsumi, Ph.D, Laboratory of Toxicology and Safety Science, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Osaka University, 1-6 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan
yasuo@phs.osaka-u.ac.jp; ytsutsumi@phs.osaka-u.ac.jp

Pharmazie 68: 54–57 (2013)

doi: 10.1691/ph.2013.2708

The fullerene C₆₀ is used in consumer products such as cosmetics owing to its antioxidative effects and is being developed for nanomedical applications. However, knowledge regarding the safety of fullerene C₆₀, especially after oral administration, is sparse. Here, we examined the safety of fullerene C₆₀ in mice after 7 d of exposure to orally administered polyvinylpyrrolidone (PVP)-wrapped fullerene C₆₀ (PVP-fullerene C₆₀). Mice treated with PVP-fullerene C₆₀ showed few changes in the plasma levels of various markers of kidney and liver injury and experienced no significant hematologic effects. Furthermore, the histology of the colon of PVP-fullerene C₆₀-treated mice was indistinguishable from that of control mice. These results suggest that PVP-fullerene C₆₀ lacks toxicity after high-dose oral administration and indicate that PVP-fullerene C₆₀ can be considered safe for oral medication. These data provide basic information that likely will facilitate the production of safe and effective forms of fullerene C₆₀.

1. Introduction

Advances in nanotechnology have led to the recent development of many nanomaterials, including nanoscale silica particles, titanium dioxide nanoparticles, and carbon nanomaterials (Augustin and Sanguansri 2009; Bowman et al. 2010; Konstantatos and Sargent 2010; Petros and DeSimone 2010). Nanomaterials typically are defined as materials that are 1 to 100 nm in length or diameter. Compared with micro-sized particles, nanomaterials have a high surface area, with increased structural integrity and unique mechanical, chemical, electrical, and magnetic properties. These properties have led to the use of nanomaterials in electronics, foods, and cosmetics and as drug delivery vehicles (Augustin and Sanguansri 2009; Bowman et al. 2010; Konstantatos and Sargent 2010; Petros and DeSimone 2010).

The fullerene C₆₀ is one of the most promising nanomaterials because of its unique chemical and physical properties (Chen et al. 2012). Fullerene C₆₀ is a remarkably stable compound consisting of 60 carbon atoms, with a diameter of approximately 0.7 nm. Thirty carbon double bonds are present in the structure, to which free radicals easily bond, leading to fullerene C₆₀'s characterization as a "radical sponge" (Krusic et al. 1991). Because of this strong antioxidative feature, fullerene C₆₀ is used in cosmetics to reduce oxidative stress in the skin (Benn et al. 2011; Kato et al. 2010). In addition, various water-soluble fullerene C₆₀ derivatives have been synthesized for use in a wide range of biologic applications (Aoshima et al. 2009; Kokubo et al. 2008; Lin and Lu 2012; Yin et al. 2009).

For example, water-soluble fullerene C₆₀ has stronger anti-melanogenic potential than do naturally occurring whitening agents (Kato et al. 2009; Xiao et al. 2007). Furthermore, water-soluble fullerene C₆₀ derivatives show promise for the treatment of various inflammatory diseases including rheumatoid arthritis (Hu et al. 2007; Yudo et al. 2009a,b). Because of these potential biologic applications, several studies have assessed the safety of fullerene C₆₀ and its water-soluble derivatives (Aoshima et al. 2010; Kato et al. 2009).

One water-soluble derivative, polyvinylpyrrolidone (PVP)-wrapped fullerene C₆₀ (PVP-fullerene C₆₀), is used as a very stable, strongly antioxidative ingredient of cosmetics (Aoshima et al. 2010; Xiao et al. 2007). When applied to the skin, PVP-fullerene C₆₀ exhibits protective activity against the apoptosis of keratinocytes that is caused by reactive oxygen species (Xiao et al. 2007). Furthermore, *in vitro* chromosomal aberration assays were conducted using mammalian cells and negative results were reported for PVP-fullerene C₆₀ (Aoshima et al. 2010). However, only a few studies have addressed the safety of orally administered PVP-fullerene C₆₀ *in vivo*. Therefore assessment of the safety of PVP-fullerene C₆₀ after oral administration is a key area in the development of nanomedicines using PVP-fullerene C₆₀.

Here, we examined the safety of PVP-fullerene C₆₀ after oral administration to mice. Our data show that oral administration of PVP-fullerene C₆₀ induced negligible changes in various biochemical and hematologic parameters. These data provide useful basic safety information that likely will facilitate the development of safe and effective forms of fullerene C₆₀.