

中である。本研究で C₆₀pro が示した抑制作用と、上記報告で示された抑制作用とが、共通するメカニズムを有する可能性や、Th2 型免疫応答全体に効果を発揮する可能性も考えられる。C₆₀ フラーレンは、炎症性疾患治療において、IBD だけでなく、アレルギー疾患においても、非常に優れた治療効果を発揮する素材となり得ると期待している。

現在我々は C₆₀pro の医薬品応用に向けて、その安全性確保、および作用メカニズムの解明に向け、C₆₀pro の体内・細胞内動態を評価している。C₆₀pro は炭素化合物であることから、生体組織内での定量的解析が非常に困難であったが、既に高速液体クロマトグラフィーを用いた方法により、生体組織中での定量が可能となってきた。本検討においても、C₆₀pro の分散性がその免疫抑制作用に大きく関わっている可能性を示唆したが、今後、体内での分散状態をも加味した体内動態を検証していくことで、より有効、かつ安全なフラーレン誘導体の開発が可能になると考えられる。また、C₆₀pro の細胞・分子レベルでの作用点に関しては、細胞内動態の検証を進める中で情報を収集していく予定である。前述の C₆₀ フラーレン誘導体によるマスト細胞の脱顆粒抑制に関する報告においては、C₆₀ フラーレン誘導体がマスト細胞の細胞質へ移行し、細胞内シグナル伝達分子のリン酸化を阻害していることが示唆されている。一方で、本検討における C₆₀pro においては、細胞内外のどちらで作用を示しているのか、その点も含めて解析する必要があり、細胞内移行量と薬効との関連を解析していくことが重要になるであろう。これら検討を推し進めることで、自然免疫のみならず、獲得免疫に対する抑制作用をも有する C₆₀pro が、炎症性疾患治療薬として、また本邦初の、主薬がナノ素材であるナノ医薬として大きな存在感を示していくことを期待している。

E. 結論

平成 25 年度の当初計画では、①抗酸化・抗炎症

活性を向上可能な 2 種類の官能基修飾誘導体や、糖修飾などによる腸管上皮細胞・腸管内炎症性細胞への標的指向能の付与など、2 種類の DDS 化 C₆₀ フラーレン誘導体の合成、②それら C₆₀ フラーレン誘導体の物性・品質を含めた、抗酸化・抗炎症活性の評価、③C₆₀ フラーレンの体内動態を定量的に解析し得る評価法の確立、④2 種類の炎症性腸疾患モデルマウスを用いた、各種 C₆₀ フラーレン誘導体の経口投与型ナノ DDS としての有効性評価、⑤C₆₀ フラーレン誘導体の作用メカニズムの解明を目指した。特に、平成 24 年 11 月 6 日(火)に実施された PD/PO による実地調査や平成 25 年度の間・事後評価結果において、「我が国発のナノ医薬（しかも主薬がナノマテリアルそのものという点で世界初）への期待、広範な慢性炎症全般に対する画期的治療法としての期待」を評価頂いた一方で、さらなる研究の発展のために、C₆₀ フラーレンの体内動態評価、抗炎症活性のメカニズム解明、異性体の解析といった物性・品質保証に関する評価が今後の鍵となることをご指導頂いたことから(PDCA サイクルの推進により、アドバイザリーボードからも同様の指摘を受けている)、①の最適化および③⑤に注力した。その結果、①②に関しては、①平成 24 年度に見出した、異性体を分離可能であるプロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) を鋳型として、異性体が存在せず、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な 4 種類の官能基修飾誘導体を創製 (大江の分担報告書を参照) すると共に、腸管吸収性を改善させるためのグルコース修飾 C₆₀ フラーレン (小久保の分担報告書を参照) とプロドラッグ能を有するエチルエステル化 C₆₀ フラーレン (大江の分担報告書を参照) の 2 種類の DDS 化 C₆₀ フラーレン誘導体の新規合成および合成条件の最適化に成功した。②これら C₆₀ フラーレン誘導体について、粒子径・凝集性といった物性を精査したうえで、抗酸化・抗炎症活性を in vitro で評価した結果、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) と同等以上の抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体を見出した。

一方で、③グルコース修飾 C₆₀ フラーレンは、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) に匹敵する抗炎症活性を呈したことから、現在、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) のグルコース修飾体の合成を前倒しで進めている。以上の結果から、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の有用性が実証されたことから、将来的な医薬品化を見据えた検討も開始しており、④プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の大量合成に向けて、物性・品質を保持しつつ、合成系のスケールアップに成功すると共に (青島 の 分 担 報 告 書 を 参 照)、⑤GMP 設備を有し、かつ C₆₀ フラーレン誘導体の製造技術を有する委託先を検討中である。③に関しては、⑥プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の組織からの抽出法を最適化したうえで、平成 24 年度に構築した LC-MS による定量解析系を用い、生体内のプロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) を定量的に解析し得る方法を構築した (吉岡の分担報告書を参照)。現在、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の経口投与による体内吸収性および体内安定性を評価中である。④に関して、⑦オキサゾロン誘導性腸疾患モデル (Th2 型の免疫応答を呈する潰瘍性大腸炎モデル) および TNBS 誘発性腸疾患モデル (Th1 型の免疫応答を呈するクローン病モデル) に対するプロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の治療効果を検討したところ、TNBS 誘発性腸疾患モデルでは治療効果が認められない一方で、オキサゾロン誘導性腸疾患モデルにおいて治療効果が認められた (吉岡の分担報告書を参照)。現在、群数を増やすと共に、投与量依存性や他の治療薬との比較も検討中であるものの、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) は、Th2 型の免疫応答を抑制することで、潰瘍性大腸炎に対する治療薬になり得る可能性が示された。⑤に関して、上記⑦の結果を受けて、⑧プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) の T 細胞に対する作用を検討したところ、シクロスポリンなどの免疫抑制剤と比較すると数十分の一程度であるものの、T 細胞の活性化抑制作用を有すると共に、Th2 型の免疫応答を抑

制し得る可能性が示された。さらに、⑨C₆₀ フラーレンの抗酸化活性に依存しない抗炎症活性メカニズムを検討したところ、プロリン型 C₆₀ フラーレン (C₆₀pro) は、炎症刺激に伴う MAPK や NFκB の活性化には影響しないことから、mRNA の安定性などに影響している可能性が考えられた。以上、平成 25 年度には、当初予定していた誘導体よりも多くの誘導体を新規合成・特性評価すると共に、重点課題として挙げた項目についても有益な結果を得るなど、当初の予定以上に進捗した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

東阪和馬, 堤 康央: 安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス-ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後., 応用が広がる DDS 人体環境から農業・家電まで, NTS 出版, pp. 140-5, 2013.

② 学会発表

【シンポジウム等: 合計 9 件】

1. 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノ粒子の安全使用に向けた検討: 免疫毒性学の観点から., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
2. 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの物性-動態-生体影響の連関評価., 第 40 回日本毒性学会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
3. Yoshioka Y., Tsutsumi Y.: The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of nanomaterials., The XIII International Congress of Toxicology, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
4. 堤 康央: ナノとバイオを融合した創薬基盤技術~安全かつ有用な最先端医薬の開発を

目指して～., シオノギ講演会., 大阪., 2013年7月.

5. 堤 康央: ナノマテリアルの ADMET 研究の現状と創薬への展開., 創薬動態フォーラム 2013., 金沢 (石川) ,2013年7月.
6. 堤 康央: 薬学への招待., 大阪府立三国丘高等学校., 大阪., 2013年8月.
7. 堤 康央: 医薬品・化粧品・食品素材の毒性・安全性評価～ナノマテリアルを一例に～., 株式会社林原., 2013年9月.
8. Yoshioka Y., Hirose A. : Recent developments in risk assessment of nanomaterials and nano safety science., 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Interlaken (Switzerland), 1-4 September, 2013.
9. 堤 康央: 薬学への招待状～創薬の最前線と阪大薬学の挑戦～., 三丘セミナー., 大阪., 2013年12月.

【国内学会発表 : 合計 4 件】

1. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤康央: 新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C₆₀ フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都(京都), 2013年7月.
2. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 佐上公一, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規ナノ医薬の開発に向けた C60 フラーレンの T 細胞への影響評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本) , 2014年3月.
3. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 佐上公一, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: エンドトキシンショックモデルマウスに

おける水酸化 C60 フラーレンの抗炎症効果., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本) , 2014年3月.

4. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 中村友治, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: グルコース修飾 C60 フラーレンの in vitro における抗炎症作用の解析., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本) , 2014年3月.

【国際学会発表 : 合計 4 件】

1. Udaka A., Yoshioka Y., Hirai T., Tsunoda S., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The effect of fullerene C60 derivatives on acquired immune system., The XIII International Congress of Toxicology 2013, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
2. Nagano T., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Fullerenol C60 for developing nanomedicine Part 2 -Assessment of therapeutic effect of fullerenol C60 for inflammatory bowel disease-. , 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
3. Aoyama M., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Nagano T., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: Fullerenol C60 for developing nanomedicine Part. 1 -Assessment of anti-inflammatory effect of fullerenol C60 -, 40th Annual Meeting & Exposition of

the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.

4. Higashisaka K., Nagano T., Taira M., Yamashita K., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Fullerenol C60 as a new therapeutic nanomedicine for inflammatory bowel disease., International Conference and Exhibition on Personalized Medicine and Molecular Diagnostics, Chicago (USA), 5-7 August, 2013.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得（出願）

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ン誘導体

出願日：平成 26 年 2 月 19 日

国際特許出願番号：PCT/JP2014/053950

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

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

② 実用新案登録

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員5名・大学院生/学生25名）：東阪和馬助教、紀平哲也研究員、三浦直樹研究員、橋野修代、長橋里佐子、畑

勝友、平井敏郎、森下裕貴、今井峻司、小椋健正、高橋秀樹、永野貴士、三里一貴、青山道彦、市橋宏一、宇高麻子、國枝章義、野尻奈央、森 宣瑛、岩原有希、植村瑛一郎、佐上公一、瀧村優也、田中康太、西島伸郎、山口真奈美、石本里緒、難波佑貴、西川雄樹、半田貴之

独立行政法人医薬基盤研究所（職員6名・大学院生1名）：角田慎一プロジェクトリーダー、鎌田春彦サブプロジェクトリーダー、向 洋平研究員、長野一也研究員、井上雅己研究員、國丸亜記、瀧慎太郎

日立ハイテクノロジーズ（職員1名）：

中澤英子統括主管技師

<オブザーバー>

高島重和（三菱商事株式会社ナノテクチーム・リーダー）、河野 裕（大阪府商工労働部成長産業振興室バイオ振興課・参事）、富永俊義（大阪市立大学大学院医学研究科・教授）、榎本博雄（神戸大学医学部附属病院薬剤部・副薬剤部長）

<産官学アドバイザーボード（外部評価）>

眞弓忠範先生（大阪大学元副学長・神戸学院大学元学長）、川西 徹先生（国立医薬品食品衛生研究所副所長）、萬年成泰先生（日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社元所長）

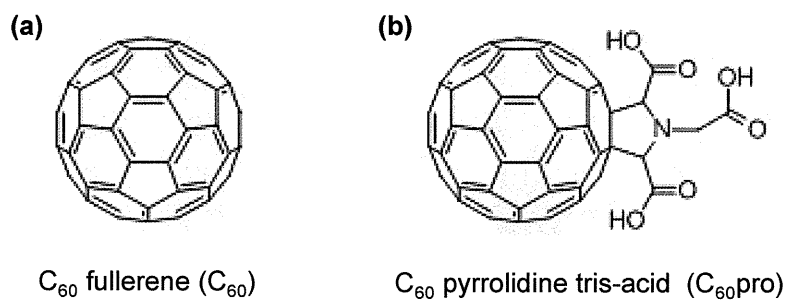


Figure 1. The chemical structure formula of fullerene C_{60} derivatives. (a) C_{60} fullerene; C_{60} , (b) C_{60} pyrrolidine tris-acid; $C_{60}pro$.

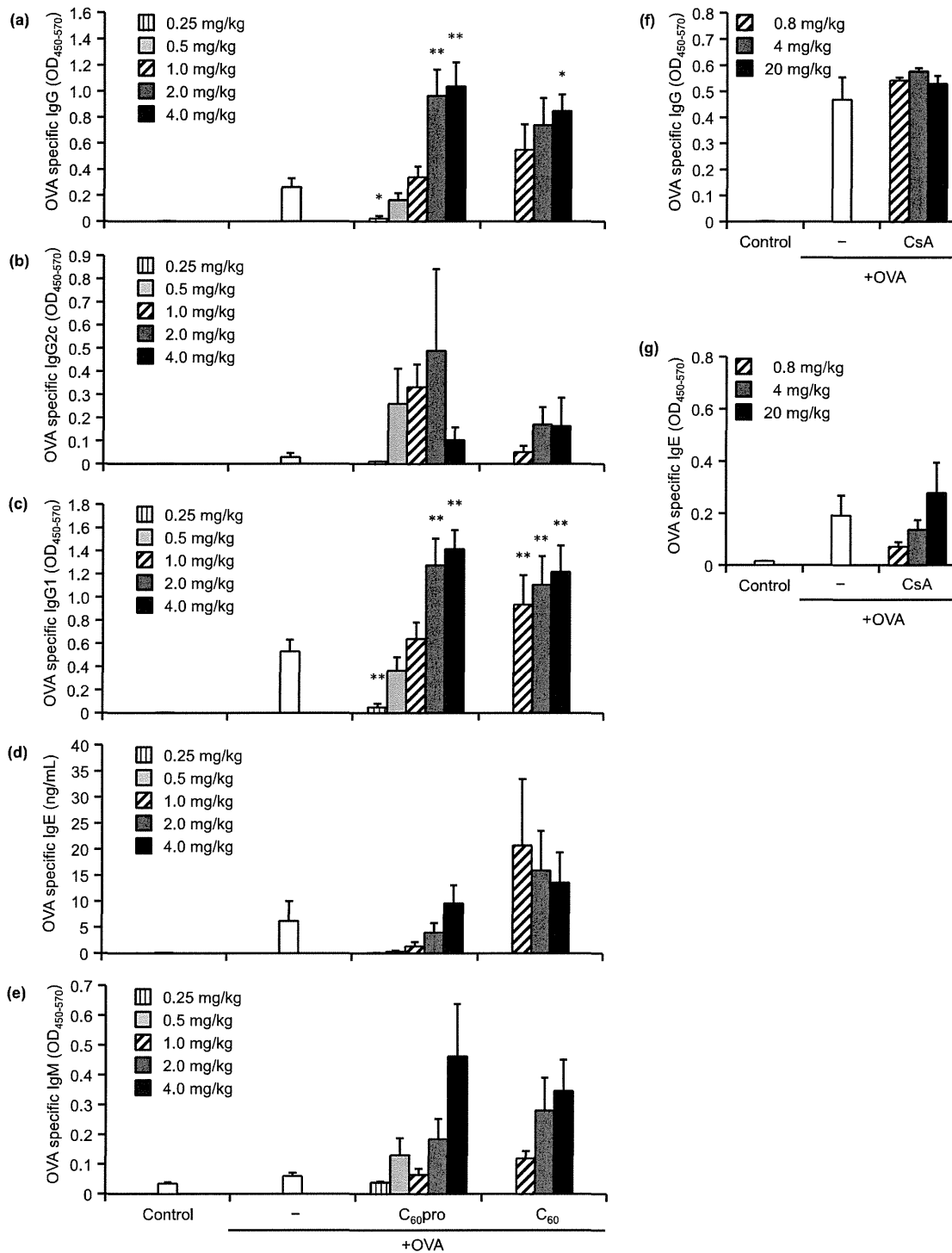


Figure 2. The effects of intraperitoneal injection of C₆₀ fullerene derivatives on OVA specific antibody production. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA alone or OVA plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1, 8, and 15. OVA-specific IgG (a), IgG1 (b), IgG2c (c), IgE (d) and IgM (e) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 22. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5). The symbols, * and **, represent significant difference from the OVA alone group by Dunnett's test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

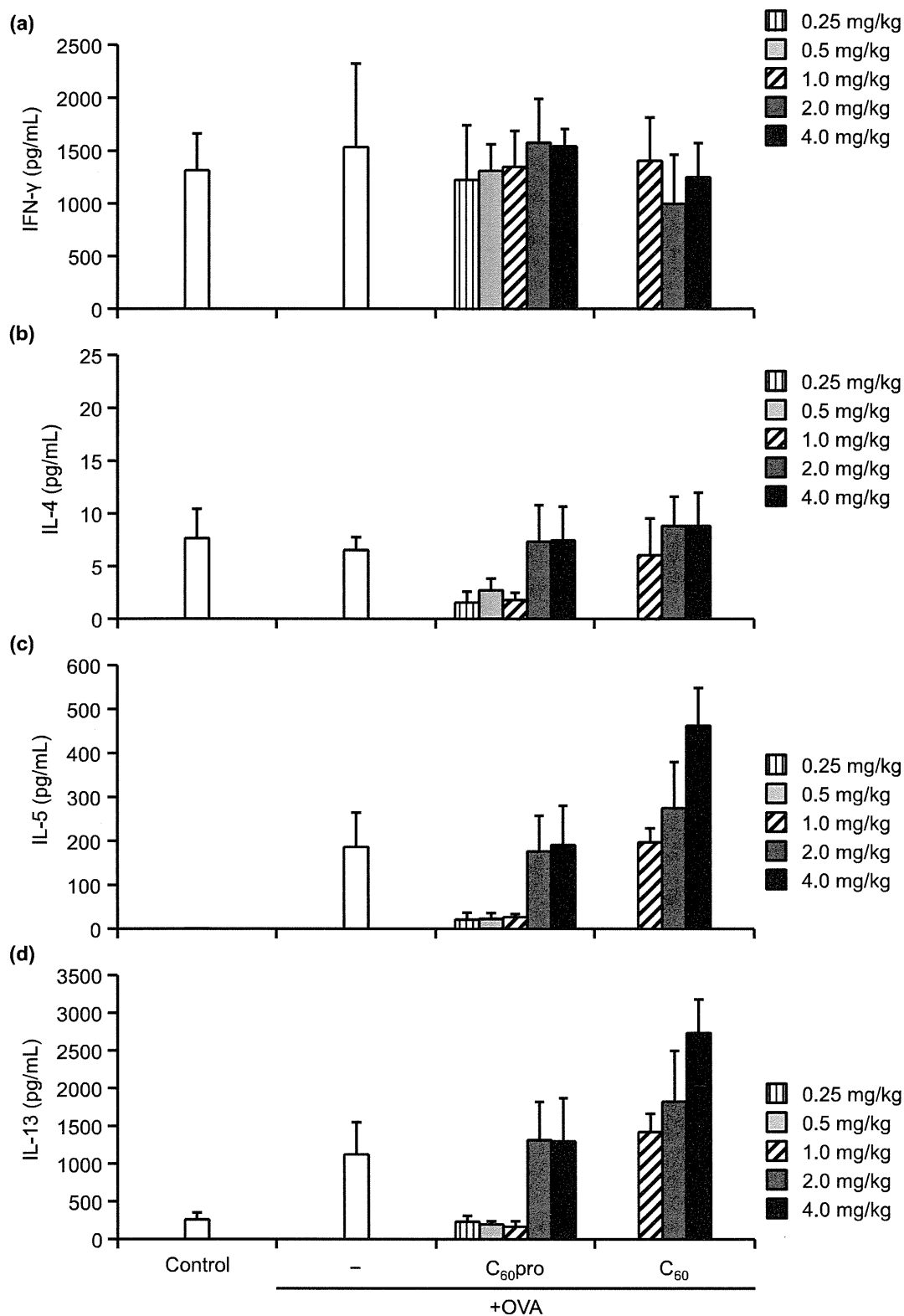


Figure 3. Cytokine production of IFN- γ (a), IL-4 (b), IL-5 (c) and IL-13 (d) by spleen cells stimulated *in vitro* with OVA. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA alone or OVA plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1, 8, and 15. Seven days after the last intraperitoneal injection, splenocytes were collected from each group and cultured for 3 days with 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ OVA. Cytokine levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean \pm SEMs (n = 5).

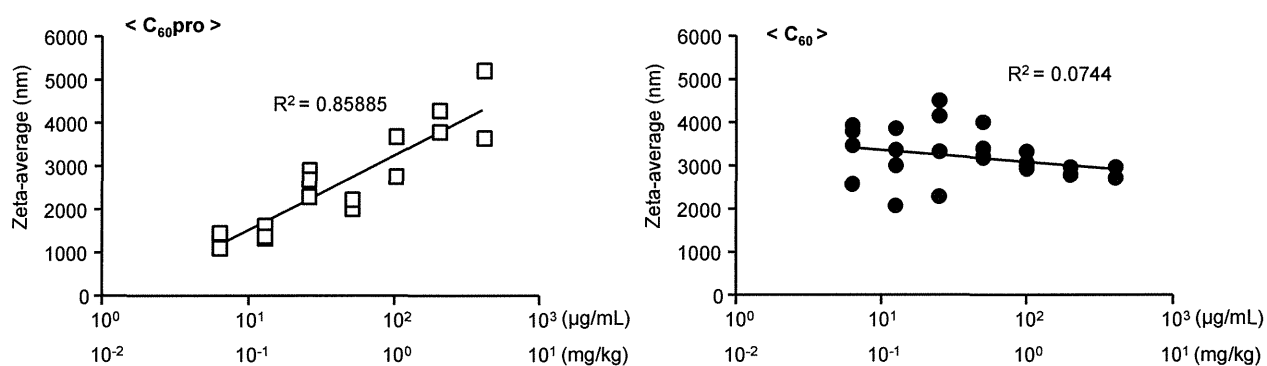


Figure 4. Particle size of C₆₀ fullerene derivatives. C₆₀ fullerene and C₆₀pro were suspended in DMSO and then suspended in phosphate buffer saline (PBS). Particle size distributions of these samples were measured by a dynamic light scattering method. The graph shows the relation between the concentration of C₆₀ fullerene derivatives and their diameter. The numbers in upper line can be converted as the numbers in lower line, the given dose to mice.

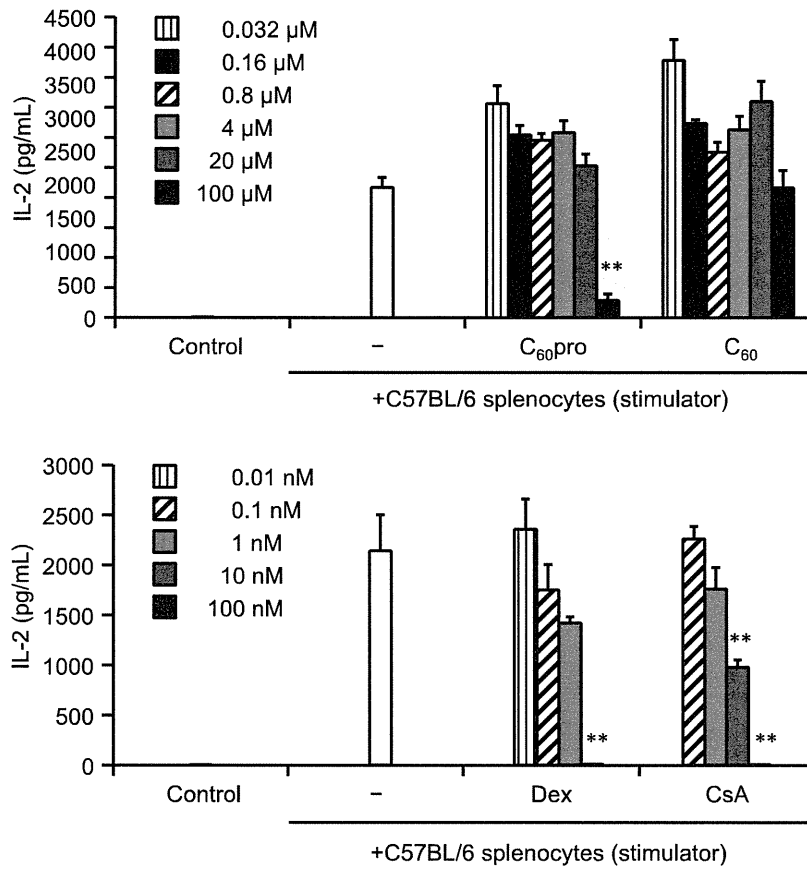


Figure 5. The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production in primary, one-way MLR. BALB/c splenocytes were stimulated with mitomycin C-treated C57BL/6 splenocytes and incubated with C₆₀ fullerene derivatives for 3 days. IL-2 levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean ± SEMs (n = 3). The symbol, ** represents significant difference from the stimulator alone group by Dunnett's test ($p < 0.01$).

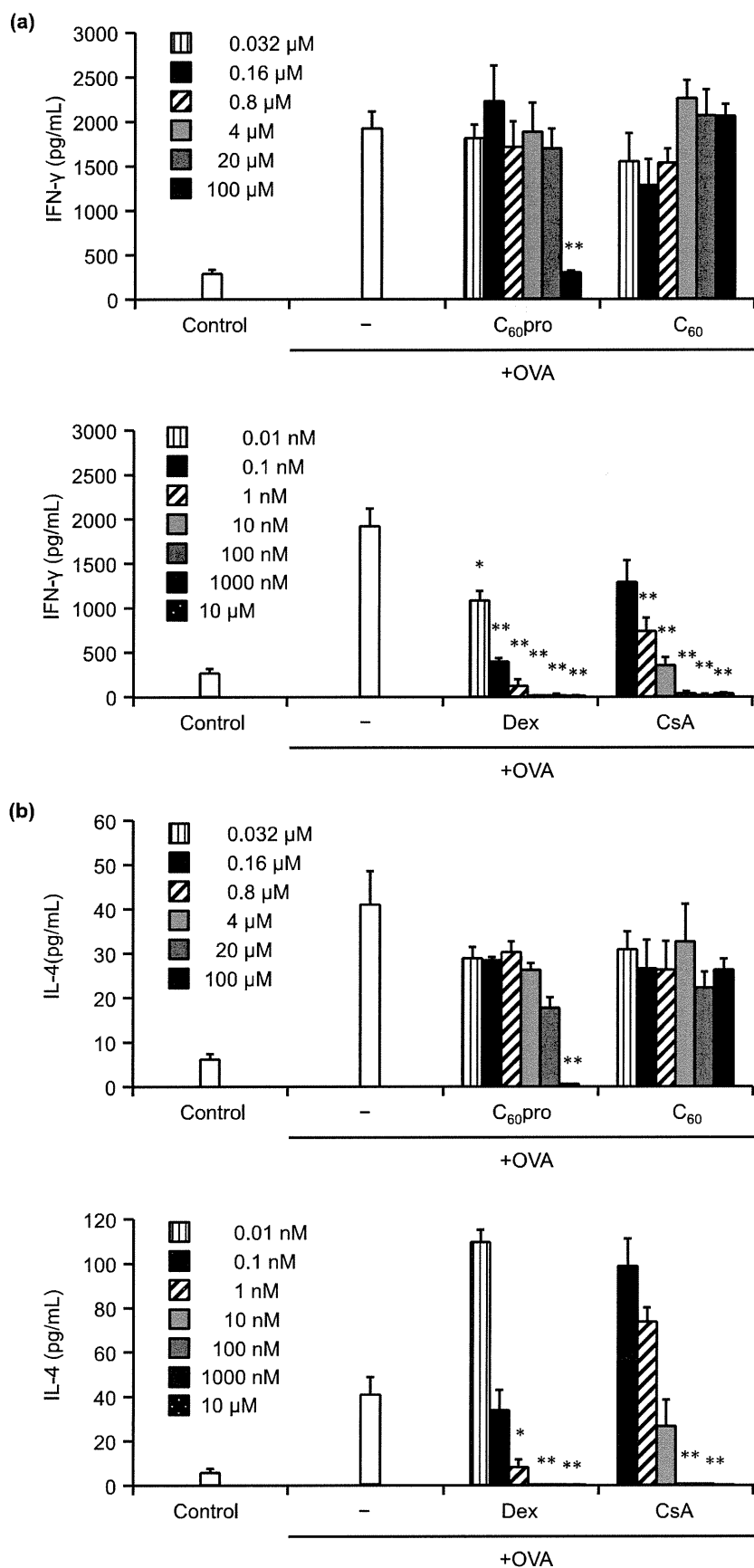


Figure 6. The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production by splenocytes stimulated *in vitro* with OVA. C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with OVA plus alum on days 1, 8, and 15. Seven days after the last intraperitoneal injection, splenocytes were collected. Splenocytes were co-cultured with C₆₀ fullerene derivatives and 100 μg mL⁻¹ OVA. Three days after IFN-γ (a) and IL-4 (b) levels in the culture supernatants were determined by ELISA. Data are presented as mean ± SEMs (n = 3). The symbols, * and **, represent significant difference from the OVA alone group by Dunnett's test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

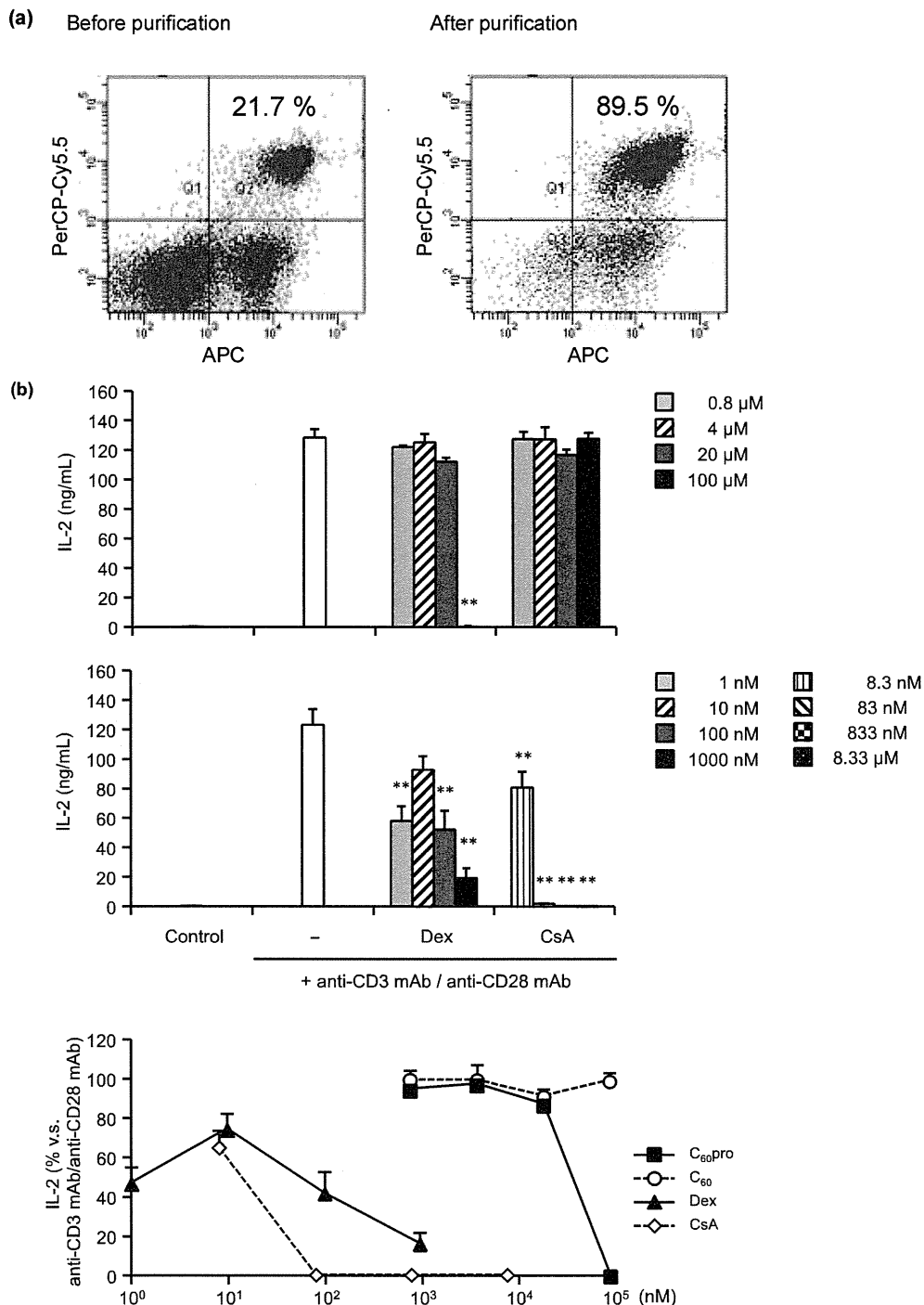


Figure 7. The effects of C₆₀ fullerene derivatives on cytokine production by splenic CD4⁺ T cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28. CD4⁺ T cell-enriched splenocytes were purified with MACS CD4⁺ T cell isolation kit. CD4⁺ T cells were stained with APC-conjugated anti-CD3 and PerCP-Cy5.5-conjugated anti-CD4. FACS histogram shows the result of CD4⁺ T cell enrichment (a). CD4⁺ T cell-enriched splenocytes were co-cultured with C₆₀ fullerene derivatives under stimulation with anti-CD3 and anti-CD28. Three days after incubation IL-2 levels in the culture supernatants were determined by ELISA (b). Data are presented as mean ± SEMs (n= 3). The symbol, **, represents significant difference from the anti-CD3 mAb plus anti-CD28 mAb alone group by Dunnett's test (*p* < 0.01).

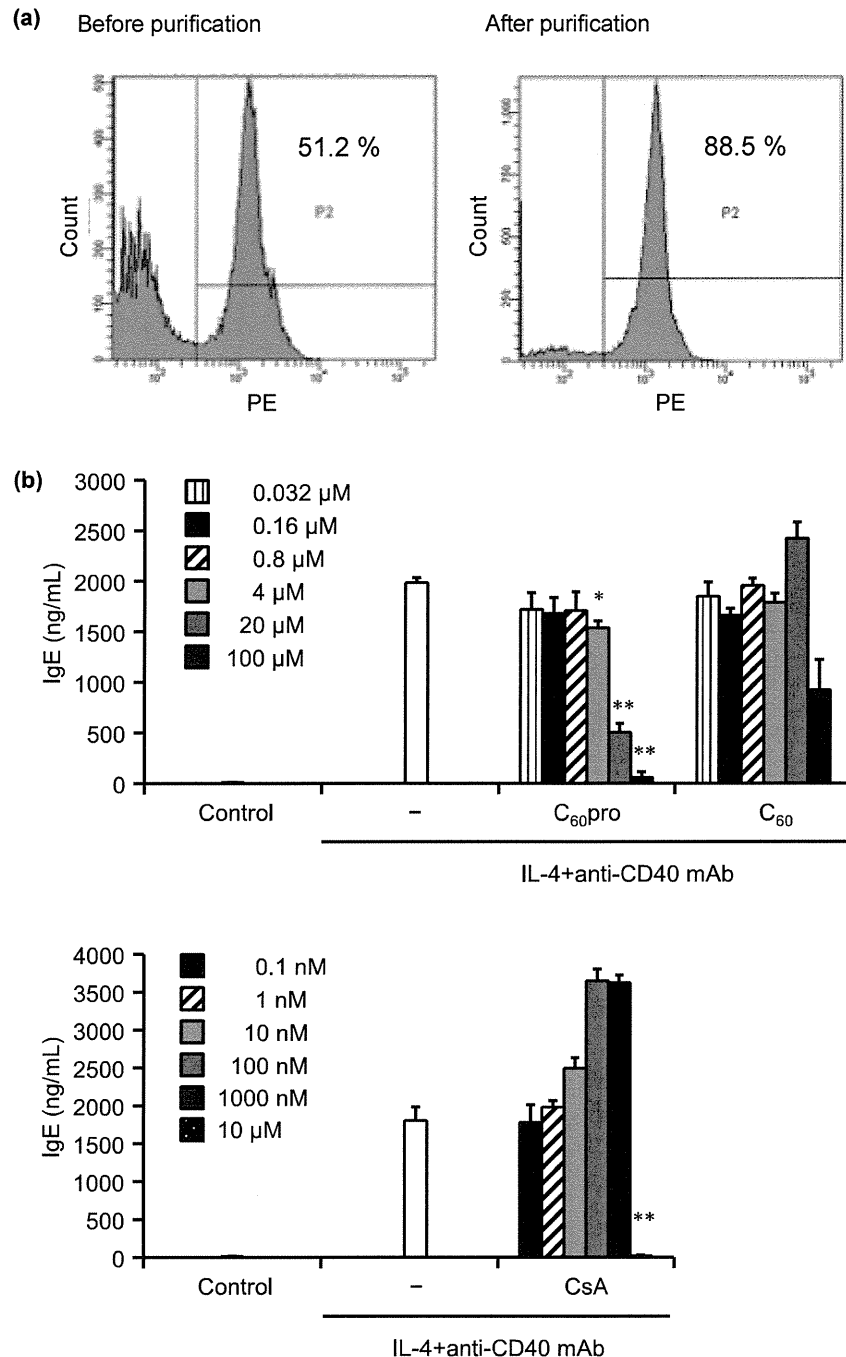


Figure 8. The effects of C_{60} fullerene derivatives on IgE production by splenic B cells stimulated with anti-CD40 and IL-4.

B cell-enriched splenocytes were purified with MACS B cell isolation kit. B cells were stained with PE-conjugated anti-B220. FACS histogram shows the result of B cell enrichment (a). B cell-enriched splenocytes were co-cultured with C_{60} fullerene derivatives under stimulation with anti-CD40 and IL-4. Total IgE levels in the culture supernatants on day 10 were determined by ELISA (b). Data are presented as mean \pm SEMs ($n = 3$). The symbols, * and **, represent significant difference from the IL-4 plus anti-CD40 mAb alone group by Dunnett's test ($p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively).

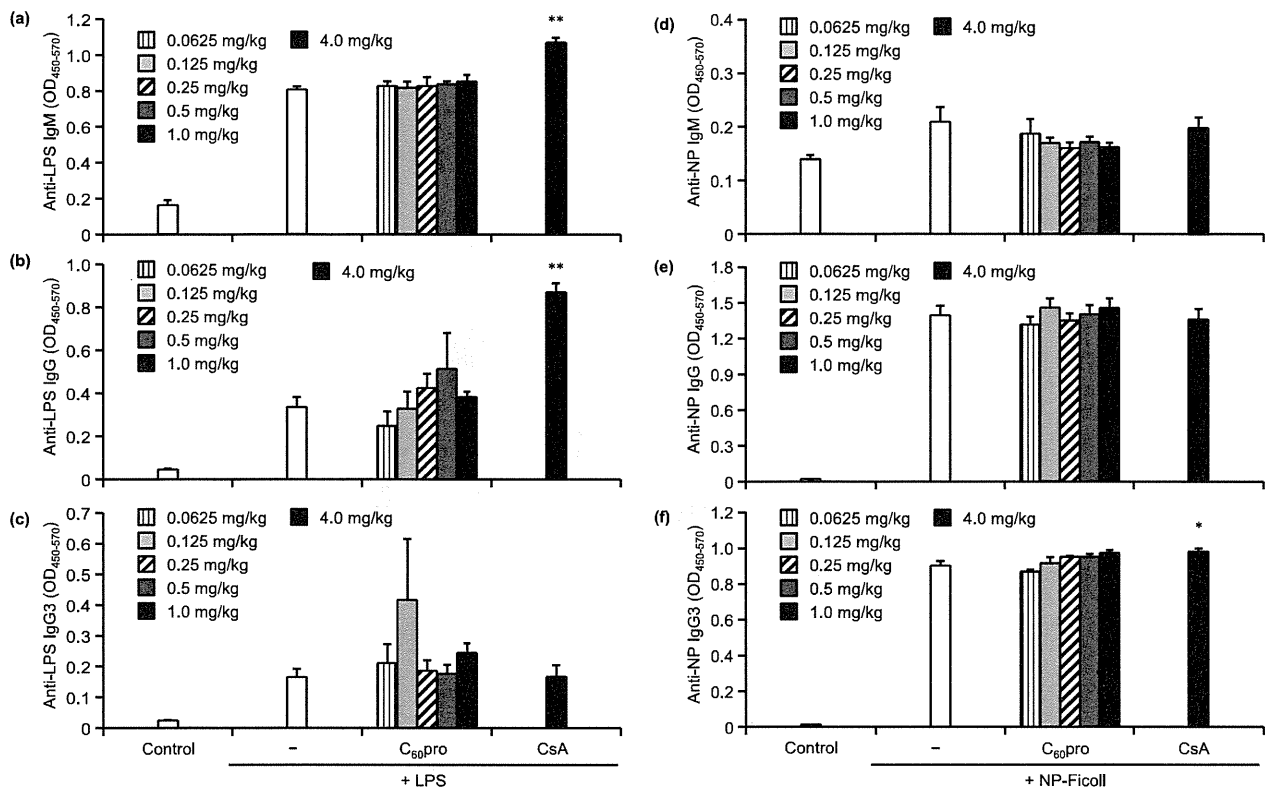


Figure 9. The effects of intraperitoneal injection of C₆₀ fullerene derivatives on LPS or NP specific antibody production. C57BL/6 mice were intraperitoneally (i.p.) injected with LPS alone or LPS plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1 and 8. LPS-specific IgM (a), IgG (b) and IgG3 (c) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 15. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5). C57BL/6 mice were intraperitoneally injected with NP-Ficoll alone or NP-Ficoll plus C₆₀ fullerene derivatives in PBS on days 1 and 8. NP-specific IgM (d), IgG (e) and IgG3 (f) antibodies in the plasma were measured by ELISA on day 15. Data are presented as mean ± SEMs (n = 5).

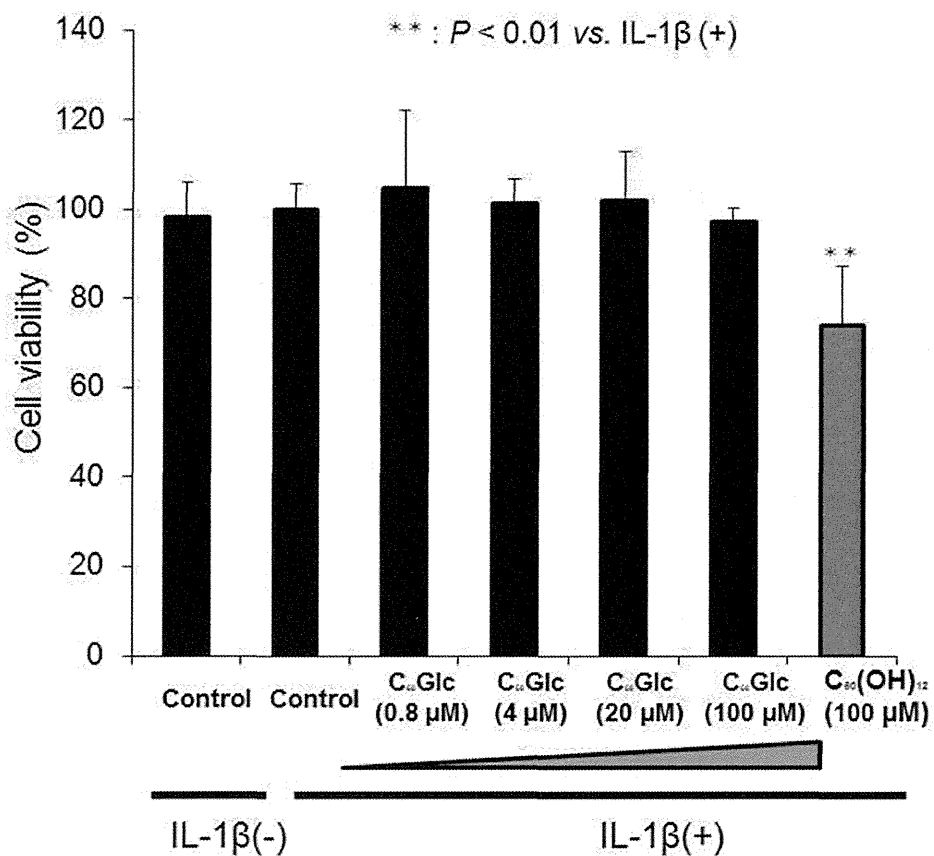


Figure 10. Cytotoxicity of fullerene C₆₀ derivatives in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with fullerene derivatives for 24 h. Cell viabilities were assessed by LDH Assay kit. Data are expressed as the mean \pm S.D.

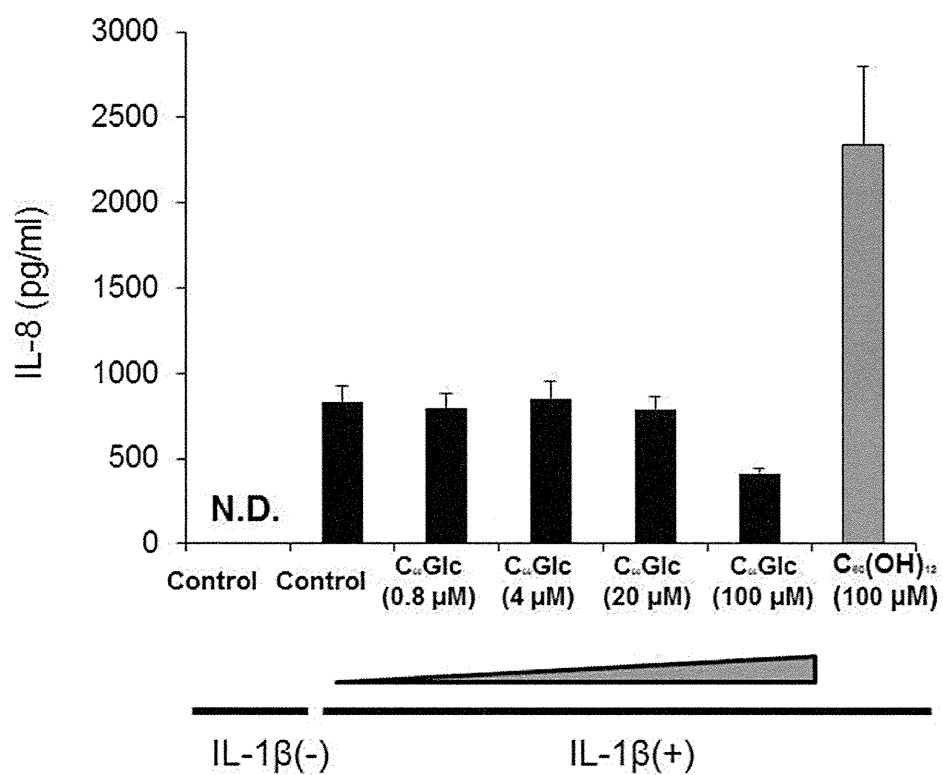


Figure 11. Inhibitory effects of fullerene C₆₀ derivatives on IL-1 β -induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with fullerene C₆₀ derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1 β (125 ng/ml) for 24 h. Secreted IL-8 protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit.

	A	B	C	D	E	F
Structure						

Figure 12. The chemical structure formula of proline-modified fullerene C₆₀ derivatives.

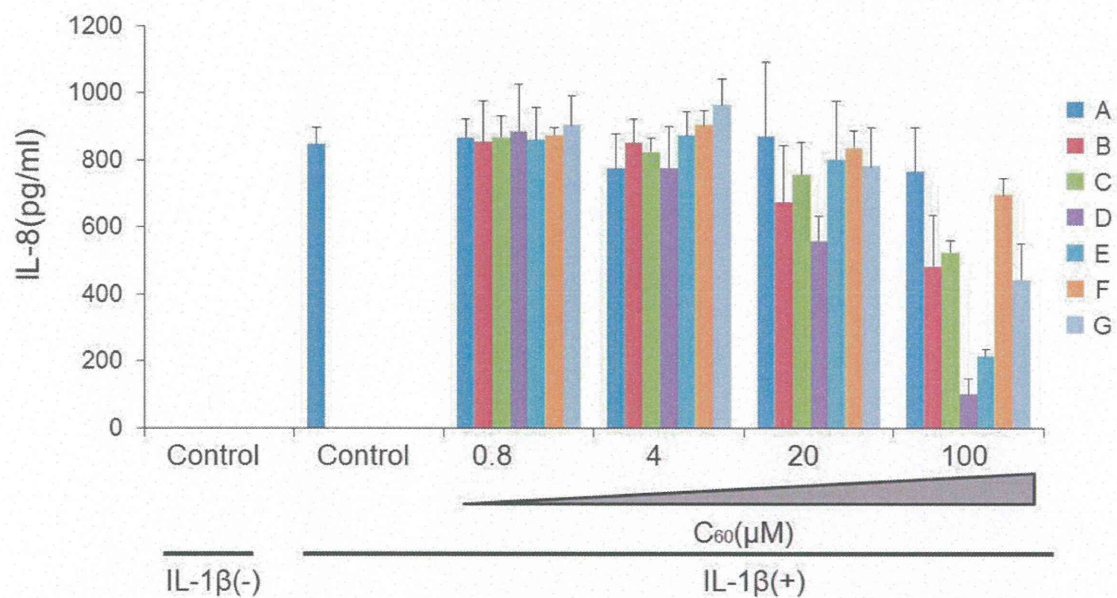


Figure 13. Inhibitory effects of fullerene C₆₀ derivatives on IL-1β-induced IL-8 secretion in the Caco-2 cells. Caco-2 cells were treated with fullerene C₆₀ or fullerene C₆₀ derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1β (125 ng/ml) for 24 h. Secreted IL-8 protein level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit.

経口投与型ナノ DDS 化 C₆₀ フラーレンの体内動態評価及び腸疾患等に対する有効性評価

研究分担者 吉岡靖雄 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

60 個の炭素原子から成るサッカーボール型の分子である C₆₀ フラーレンは、多数のπ電子に起因する強力な活性酸素消去作用を有し、活性酸素による DNA 傷害や細胞障害などを回避できるとして、医療分野への応用が期待されている。さらに、抗ウイルス作用・抗がん作用などの新たな効果が見出され、C₆₀ フラーレンの未だ知られざる有用機能への期待が高まっている。研究代表者はこれまでに、C₆₀ フラーレン誘導体を用い、その強力な抗酸化作用に基づく抗炎症効果を利用した、炎症性疾患治療薬としての可能性を検討してきた。その中で、C₆₀ フラーレン誘導体が、抗酸化作用とは異なるメカニズムによっても自然免疫性の炎症に対して高い抑制効果を示すことなどを見出してきた。本検討では、これまで解析した C₆₀ フラーレン誘導体の中で、最も強い抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体 (C₆₀pro) を用いて、炎症性腸疾患モデルマウスにおける治療効果を検討した。オキサゾロン誘発性腸疾患モデル (Th2 型の免疫応答を呈する潰瘍性大腸炎モデル) および TNBS 誘発性腸疾患モデル (Th1 型の免疫応答を呈するクローン病モデル) に対するプロリン型 C₆₀ フラーレンの治療効果を検討したところ、TNBS 誘発性腸疾患モデルでは治療効果が認められない一方で、オキサゾロン誘発性腸疾患モデルにおいて強い治療効果が認められた。平成 26 年度に、群数を増やすと共に、投与量依存性や他の治療薬との比較も検討する必要があるものの、プロリン型 C₆₀ フラーレンは、Th2 型の免疫応答を抑制することで、潰瘍性大腸炎に対する治療薬になり得る可能性が示された。さらに、生体内のプロリン型 C₆₀ フラーレンを定量的に解析し得る方法の構築に成功した。

A. 研究目的

サッカーボールの形で知られる C₆₀ フラーレンは、1985 年、炭素蒸気から選択的に凝縮して得られる、非常に安定なクラスターとして発見された。現在では、安定で芳香族系溶媒に溶解性を持つ、全て炭素でできた（水素分子を含まない）分子として知られている。フルーレンは、優れた強度・超伝導性・電気伝導性などの性質を有することが明らかになっており、有機薄膜太陽電池など、電子工学分野での需要形成が期待されている。さらに、医療分野への応用にも注目が集まっており、世界中で精力的に研究が推進されている。

生体内シグナル伝達物質である活性酸素種 (Reactive Oxide Species; ROS) は、生体内酸

化ストレス物質としても知られている。ROS は反応性が極めて高く、非特異的に分子と反応するという特徴から、DNA 傷害や脂質の過酸化、タンパク質の変性など、多くの組織傷害に関与し、がん・アルツハイマー病・心筋梗塞などの悪化にも繋がると考えられている。フルーレンは、分子内の二重結合を形成するπ電子により、ほぼエネルギーロス無しで電子の授受を行うことが可能であり、ROS を除去する作用、つまり抗酸化作用を有することが知られている。C₆₀ フラーレンの抗酸化作用は、臨床応用されている抗酸化剤であるビタミン E よりも数倍強い。ビタミン E では消去できないスーパーオキシドアニオン (O₂⁻) などの幅広い種類の ROS に効果を発揮する。ま

た、ビタミン E やビタミン C などの抗酸化剤は、生体内で鉄や銅といった金属イオンの還元を介して、逆に ROS の生成を誘導してしまう「プロオキシダント作用」を示すことが知られている。一方で C₆₀ フラーレンは、プロオキシダント作用を示さないことも明らかとなっており、従来までの抗酸化剤の欠点を克服し得る新たな抗酸化剤として期待されている。

炎症性疾患とは、炎症応答によって正常な組織が傷害されてしまう疾患の総称である。その多くが発熱や痛みを伴うため、患者の QOL の低下にも繋がる。近年問題視されている病態の中でも炎症が関わる疾患は多く、例えば国民の 3 人に 1 人が有すると報告されている気管支喘息・アトピーなどのアレルギー疾患や、近年患者数が増加している歯周病、リウマチ、円形脱毛症なども全て炎症性疾患である。さらに炎症性疾患の中には、慢性化することでがんへの進展リスクが高まる疾患も一部報告されており、炎症性疾患そのものだけでなく、炎症性疾患によって誘発される重篤な疾患があることにも目を向けるべきであろう。また、現代における炎症性疾患の中には、厚生労働省指定の難治性疾患に指定されているものも存在する。難治性の炎症性疾患には、潰瘍性大腸炎やクローン病といった炎症性腸疾患（IBD; Inflammatory Bowel Disease）や、悪性関節リウマチ、全身性エリテマトーデスなどが挙げられる。特に IBD 患者数は、発症年齢の拡大も相俟って近年急増しており、平成 24 年度の特定疾患医療受給者証交付件数は 18 万人にも達した。本疾患の治療薬として 5-アミノサリチル酸（5-ASA）製剤や副腎皮質ステロイド、抗 Tumor Necrosis Factor（TNF）-α抗体などの分子標的医薬が実用化されているものの、治療不応例も多く、高薬価、感染症へのリスクが高まるなど、未だ普遍的な治療薬にはなり得ておらず、新たな治療戦略が待望されている。

研究代表者はこれまでに、C₆₀ フラーレンの有する未知の作用を探索する中で、*in vitro* におい

て C₆₀ フラーレン誘導体が、抗酸化剤である N-Acetyl-L-cysteine（NAC）と比較して、強力な抗炎症作用を示すことを見出してきた。また、C₆₀ フラーレン誘導体（水酸化フルーレン）の炎症性疾患に対する治療効果を、炎症性腸疾患のモデルマウスを用いて検討し、既に C₆₀ フラーレン誘導体（水酸化フルーレン）による顕著な治療効果を確認している。さらに、C₆₀ フラーレン誘導体（水酸化フルーレン）よりも優れた抗炎症活性を有する C₆₀ フラーレン誘導体（C₆₀pro）の同定にも成功している。

本研究では、C₆₀ フラーレン誘導体（C₆₀pro）の炎症性腸疾患に対する治療効果を、2 種類の炎症性腸疾患モデルマウスを用いて検討した。さらに、C₆₀ フラーレン誘導体（C₆₀pro）の体内動態評価を最終目的に、体内動態を解析し得る測定方法の最適化を図った。

A. 研究方法

1. 試薬

本検討ではプロリン類似骨格を持つ、プロリン型 C₆₀ フラーレン【C₆₀ Pyrrolidine tris-acid ; C₆₀pro】および、未修飾 C₆₀ フラーレン【C₆₀】を用いた。C₆₀pro は FLOX 株式会社より購入した。C₆₀ はビタミン C60 バイオリサーチ株式会社より供与して頂いた。C₆₀pro は DMSO に懸濁した後、DMSO の終濃度が 5 % になるように、純水で希釈し、分散液を調製した（投与濃度は 15 mg/kg, 3 mg/kg, 0.6 mg/kg）。C₆₀pro 分散液を 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に用いた。比較対照として未修飾フルーレン（C₆₀）と N-Acetyl-L-cysteine（NAC; Sigma-Aldrich）をそれぞれ同様に調製し（投与濃度は 15 mg/kg）、経口投与した。

2. TNBS モデル

2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid（TNBS; Sigma-Aldrich）を 99.8 % エタノール（nacalai-tesque）によって希釈調製した後、30

秒間ボルテックスした 2.5%、4%、5%TNBS (w/v) 溶液をそれぞれ調製した。BALB/c マウス (8 週齢、日本 SLC) を麻酔処置後、3.5F カテーテルを用いて 100 μ l ずつ各濃度の TNBS 溶液を直腸投与することで、モデルマウスを作製した。直腸投与日を Day 0 とし、毎日各マウスの体重を測定した。直腸投与直前の体重を 100%として 5 日目までの体重推移を病態の指標とした。さらに C₆₀pro 分散液を 10 μ l/g mouse で連日経口投与した (Day 0 の C₆₀pro 経口投与は直腸投与直前に行った)。

3. オキサゾロンモデル

4-Ethoxymethylene-2-phenyl-2-oxazolin-5-one (オキサゾロン; Sigma-Aldrich) を 99.8%エタノールによって希釈調製した後、30 秒間ボルテックスで攪拌、5 分間超音波処理することで、3% (w/v) オキサゾロン溶液を調製した。C57Bl/6N マウス (8 週齢) を麻酔処置後、3.5F カテーテルを用いて 100 μ l ずつ各濃度のオキサゾロン溶液を直腸投与することで、モデルマウスを作製した。直腸投与日を Day 0 とし、毎日各マウスの体重を測定した。直腸投与直前の体重を 100%として 5 日目までの体重推移を病態の指標とした。さらに C₆₀pro 分散液を 10 μ l/g mouse で連日経口投与した (Day 0 の C₆₀pro 経口投与は直腸投与直前)。また、C₆₀pro の腹腔投与についても検討した。C₆₀pro をジメチルスルホキシド (DMSO; nacalai-tesque) に懸濁した後、DMSO の終濃度が 5%になるように、純水 (Wako) で希釈し、分散液を調製した (投与濃度は 15 mg/kg)。C₆₀pro 分散液を ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) で 5 分間超音波処理し、さらに 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に用いた。

4. C₆₀pro 抽出溶媒の検討

水、メタノール、酢酸エチル、アセトン、クロロホルムを用いて、C₆₀pro を 1 mg/mL となるよう

に調整した。これらを超音波処理後、ボルテックスにて攪拌し、それぞれ 100 ng/mL となるまで 10 倍ずつ段階希釈した。各溶媒中のフラーレンを観察し、肉眼にてそれぞれの溶媒でフラーレンの分散性を確認した。また、これらのサンプルを HPLC にて分析した。HPLC の展開溶媒には DMF : メタノール = 8 : 2 (0.1%TFA 含有) を流速 1 mL/min で流し、検出波長は 300 nm、カラムには Buckeyprep カラムを用いた。検出したフラーレンのピーク面積を用いて検量線を作製した。

6. クロロホルムを用いた C₆₀pro の抽出

DMSO にて 100 μ g/mL に調製した C₆₀pro を 1 mL のクロロホルムに 100 μ L 加え、そこに水を 1 mL 加えた。浸透攪拌を行った後、静置し、C₆₀pro の有機層への移行を確認した。

7. THF を用いた C₆₀pro の抽出

DMSO にて 100 μ g/mL に調製した C₆₀pro を 1 mL の THF に 100 μ L 加え、そこに飽和食水を 1 mL 加えた。浸透攪拌を行った後、静置し、C₆₀pro の有機層への移行を確認した。

8. 血液中 THF 溶解画分の分析への干渉の確認

血液 500 μ L に飽和食塩水及び THF を加え 5 分間超音波処理を行った。これに少量のメタノールを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO にて 16.6 μ g/mL に調製したプロリン型フラーレンを加え、さらに THF にて 500 μ L に定容し、HPLC にて分析した。

9. 血液中からのプロリン型フラーレンの抽出

血液 500 μ L に DMSO にて 100 μ g/mL に調製したプロリン型フラーレンを 100 μ L 加え、飽和食塩水、及び THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノールを加えて抽出操作を行い、THF 層を回収した。溶媒を取り除き、DMSO にて 1 mL に定容した後に HPLC にて分析した。