

正電荷が非局在化しており、フラーレン骨格上のパイ共役構造にも分子軌道が広がったベリ共役を有する初めてのフラーレン誘導体である。そのため窒素上の正電荷はフラーレン骨格上にまで広がっており（図6 静電ポテンシャルマップ）、ソフトな両親媒性を有すると思われる。実際、様々な有機溶媒中で凝集挙動を観察したところ、条件によりベシクル構造や結晶構造が生成することがわかった。水酸化フラーレンでは二段階の凝集挙動を示すことや、生体内ではプロリン誘導体も凝集挙動を示すであろうことが示唆されており、水酸化フラーレンやグルコース化水酸化フラーレンと合わせ、今後さらなる凝集挙動の系統的な観察を行う。

さらに、DDS 化への足掛かりとして、中空状の三角錐型炭素繊維であるカーボンナノホーン内への水酸化フラーレンの内包挙動についても透過型電子顕微鏡 TEM を用いて観察を行った（図7）。極性の低い C_{60} や $C_{60}(OH)_{10}$ ではカーボンナノホーンとの親和性が高く、たくさん内包が観察されたが、親水性の高い $C_{60}(OH)_{36}$ や $C_{60}(OH)_{44}$ では、わずかな数のみしか内包されないことがわかった。この結果から、様々な極性のフラーレン誘導体のチューブ状炭素による内包が可能であることがわかったが、そのホストゲスト間の親和性を考慮することが重要であるという知見を得た。

E. 結論

異なる4タイプの新規フラーレン誘導体（グルコース化水酸化フラーレン、ヒドロキシエトキシ化フラーレン、リチウム内包フラーレンラジカルアニオン、トリアゾリウムフラーレン）を合成することができた。グルコース化水酸化フラーレンの水溶性はもう少し改善の余地があるが、グルコース部位が生理活性や生体適合性にどのように影響するのか興味深い。ヒドロキシエトキシ化フラーレンは、エタノールと水の両方に溶解するという理想的な溶解度を有しており、水溶性のみ、

極性有機溶媒 DMSO のみに溶解するフラーレン誘導体との比較が今後注目される。リチウム内包フラーレンラジカルアニオンは高い還元力が期待され、水溶化が達成されればその生理活性に興味もたれる。トリアゾリウムフラーレンはソフトな両親媒性を有しており、凝集挙動や物性において違いが出て来ると期待される。

体内動態解析においては生体組織との強い親和性が分析上の課題になることもわかった。DDS 化として中空のナノカーボンを用いた場合、フラーレン誘導体との親和力が内包率に大きく影響するという知見も得た。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Kokubo K., Masuda H., Ikuma N., Mikie T., Oshima T.: Synthesis and characterization of new acetalized [60]fullerenes, *Tetrahedron Lett.*, 54:3510-3513, 2013.
2. Nakamura Y., Ueno H., Kokubo K., Ikuma N., Oshima T.: Magic number effect on cluster formation of polyhydroxylated fullerenes in water-alcohol binary solution, *J. Nanopart. Res.*, 15:1755-1762, 2013.
3. Ueno H., Kokubo K., Nakamura Y., Ohkubo K., Ikuma N., Moriyama H., Fukuzumi S., Oshima T.: Ionic conductivity of $[Li^+@C_{60}](PF_6^-)$ in organic solvents and its electrochemical reduction to $Li^+@C_{60}^{\bullet-}$, *Chem. Commun.*, 49:7376-7378, 2013.
4. Kokubo K., Yamakura S., Nakamura Y., Ueno H., Oshima T.: Radical-scavenging ability of hydrophilic carbon nanoparticles: from fullerene to its soot,

Fuller. Nanotub. Carbon Nanostr.,
22:250-261, 2014.

5. Ikuma N., Inaba S., Kokubo K., Oshima T.: First synthesis and aggregation behavior of periconjugated triazoliumfullerene, Chem. Commun., 50:581-583, 2014.
6. Kobayashi K., Ueno H., Kokubo K., Yudasaka M., Yasuda H.: Effect of functional group polarity on the encapsulation of C₆₀ derivatives in the inner space of carbon nanohorns, Carbon, 68:346-351, 2014.

【総説・Proceedings】

1. 小久保 研: 分子軌道論を援用した高溶解性フラーレン多付加体の開発, 生産と技術, 65:76-80, 2013.

② 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

大島 巧 (大阪大学名誉教授)

伊熊 直彦 (大阪大学大学院工学研究科)

上野 裕 (大阪大学大学院工学研究科)

中村 友治 (大阪大学大学院工学研究科)

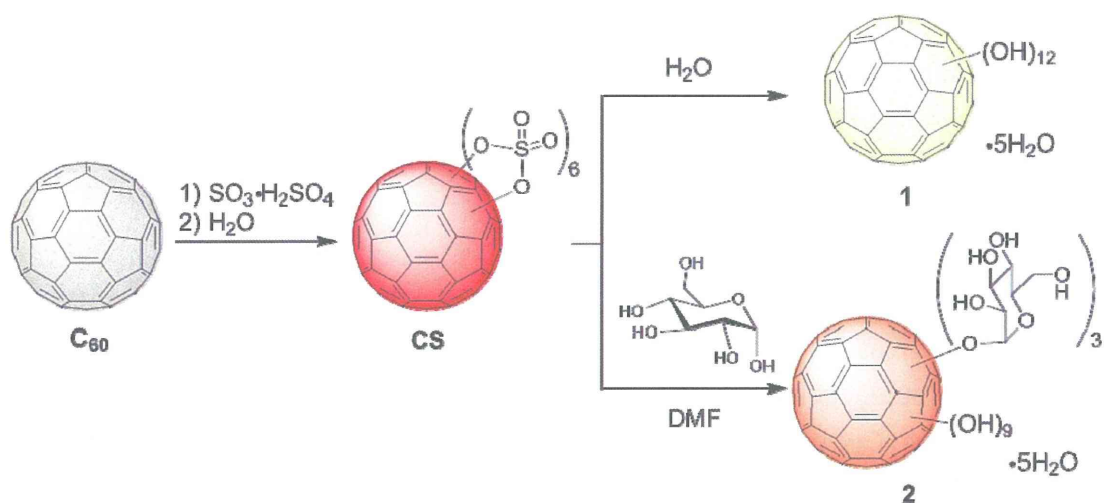


図1. グルコース化水酸化フラーレンの合成. 水酸化フラーレンC₆₀(OH)₁₂ · 5H₂O (1) の合成中間体であるシクロ硫酸化フラーレン (CS) にα-D-グルコースをDMF中で作用させ、グルコース化水酸化フラーレンC₆₀(OH)₉(Glc)₃ · 5H₂O (2) を得た。

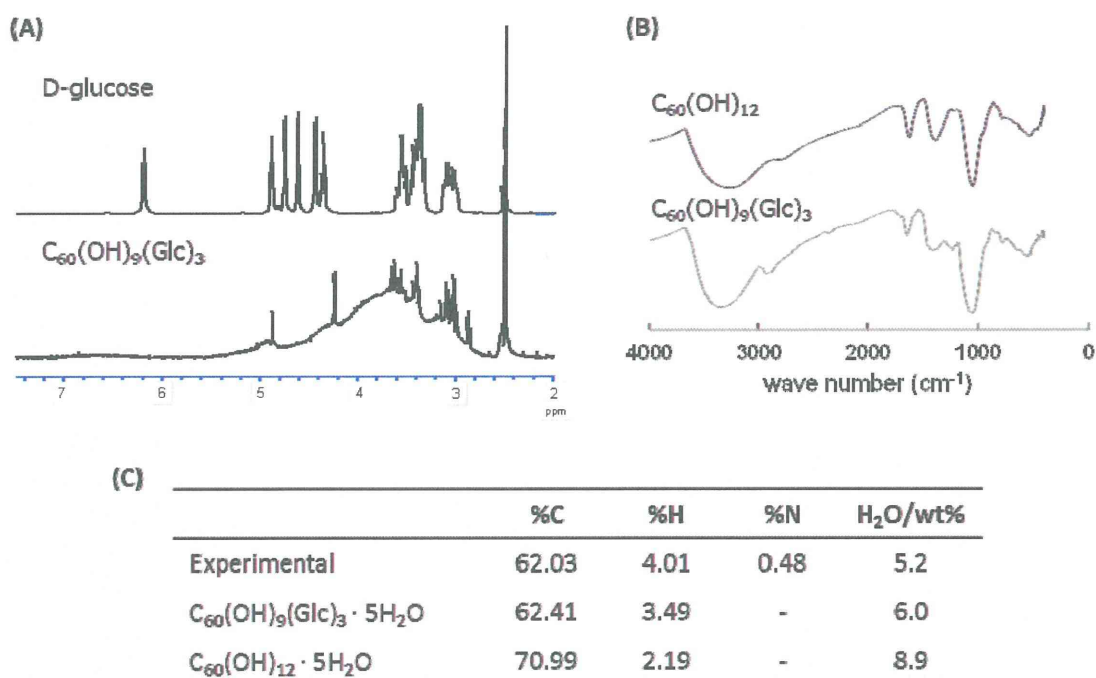


図2. グルコース化水酸化フラーレンの同定. (A) ¹H NMR: グルコース由来ピークの存在を確認し、6 ppm付近の1位のプロトンが消失したことから、1位で結合していると推定された。(B) IR: 水酸化フラーレンに特徴的な4つのピークを確認し、それ以外のグルコース由来ピークも存在することが確認された。(C) 元素分析: 組成比から、グルコース部位が平均3つ導入されることが示唆され、水分測定の結果と合わせ、推定平均構造をC₆₀(OH)₉(Glc)₃ · 5H₂Oと決定した。

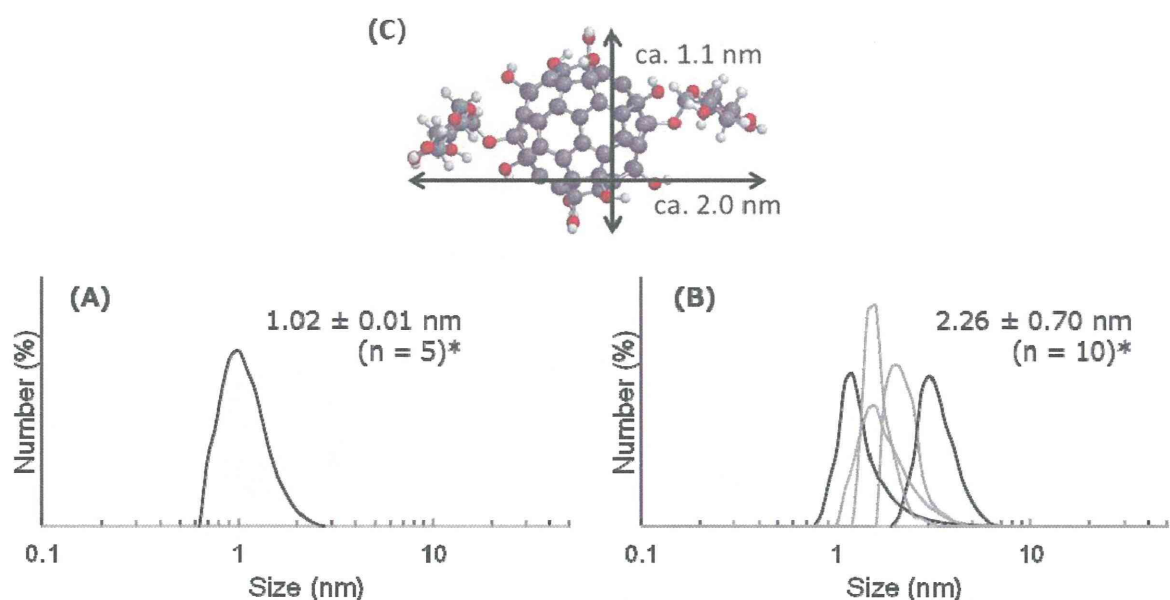


図3. IG法による粒径分布測定。(A)水酸化フラーレン：DMSO溶液（1 mg/mL）を用いて測定した。平均粒径、標準偏差、測定回数（重ね合わせ）を図中に示す。(B)グルコース化水酸化フラーレン：DMSO溶液（20 mg/mL）を用いて測定した。(C)グルコース化水酸化フラーレンの分子モデル：水酸化部位（縦方向）ならびにグルコース化部位（横方向）の直径はそれぞれ約1.1および2.0 nmと計算され、粒径分布測定の結果とよく一致した。

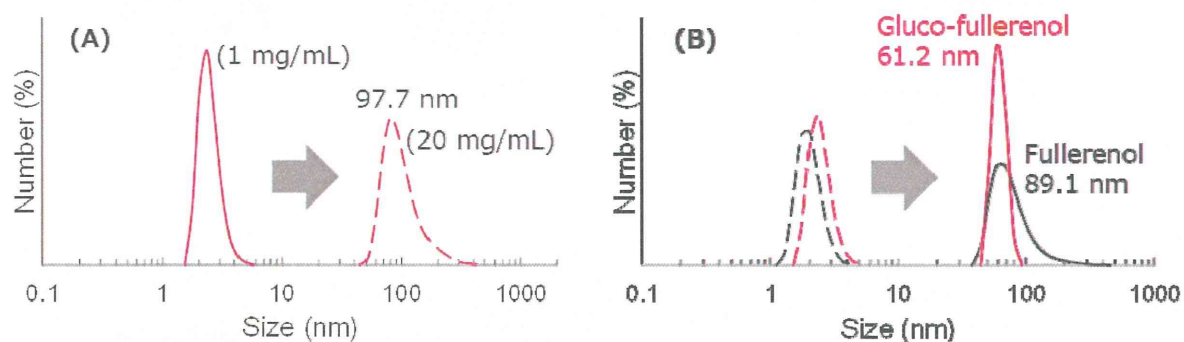


図4. グルコース化水酸化フラーレンのDLS法による粒径分布測定。(A)DMSO溶液：高濃度溶液（20 mg/mL）においては約100 nm程度まで凝集している様子が観察された。(B)DMSO/H₂O=1/9溶液：DMSO溶液に水を加えて90%水溶液とした場合も約60 nm程度まで凝集する様子が観察された。

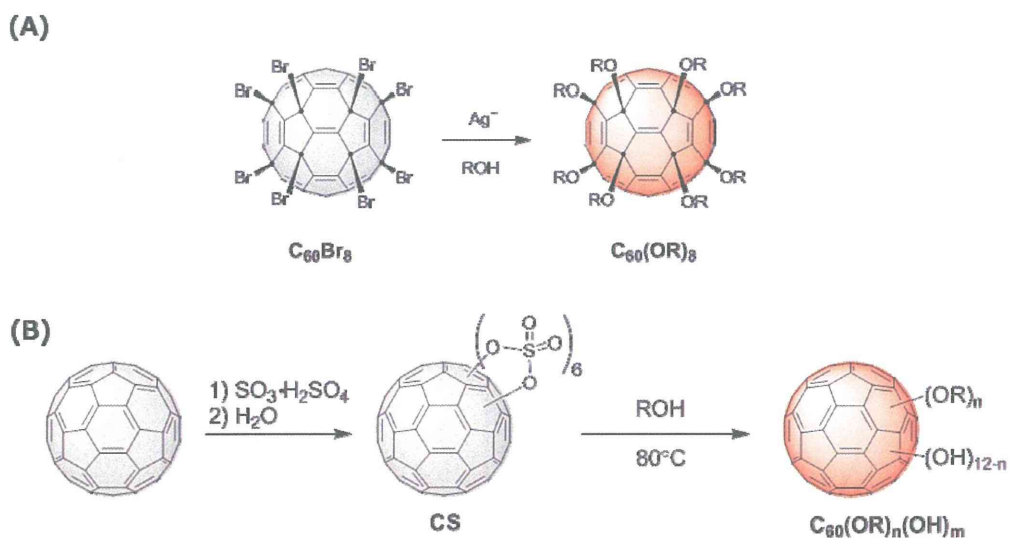


図5. アルコキシ化フラーレンの合成スキーム。(A)臭素化フラーレン(C_{60}Br_8)の求核置換反応： $\text{S}_{\text{N}}1$ メカニズムにより位置選択的に進行する。(B)シクロ硫酸エステル化フラーレン(CS)の求核置換反応： $\text{S}_{\text{N}}2$ メカニズムにより位置ランダム的に進行する ($\text{R} = -\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)。

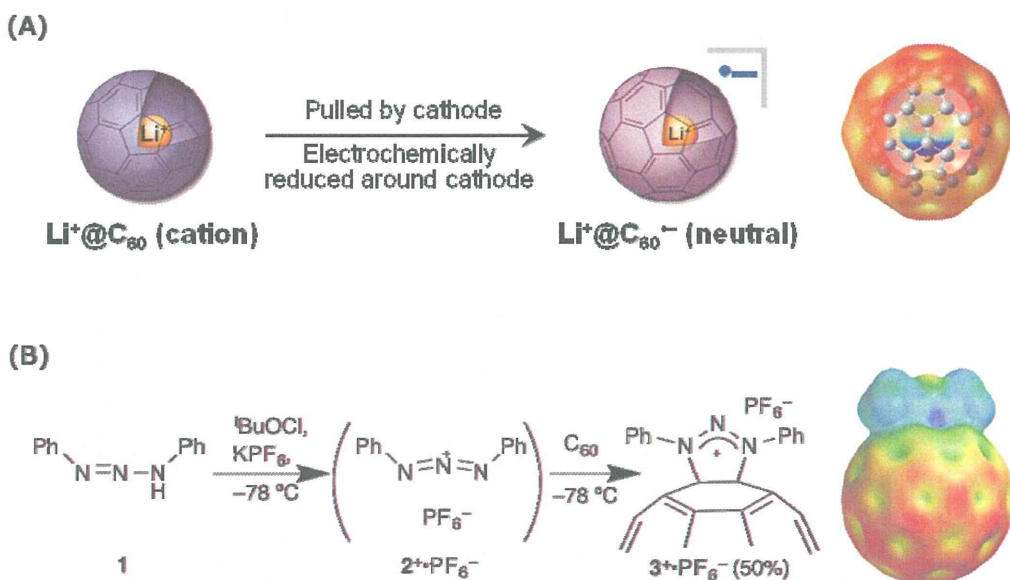


図6. 新規フラーレン誘導体の合成スキームおよび静電ポテンシャルマップ。(A) リチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオン：電解還元法により合成した。静電ポテンシャルマップの赤色部は負の、青色部は正の部分電荷を有する。(B) ペリ共役トリアゾリウムフラーレン：1,3-ジアザ-2-アゼニアレンとの[3+2]環化付加により合成した。

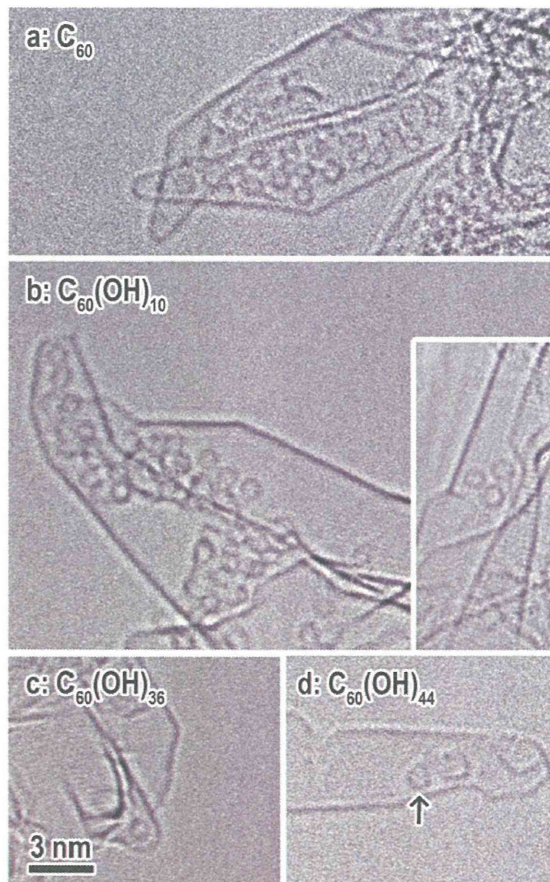


図7. カーボンナノホーンに内包された種々水酸化フラーレンのTEMイメージ。(a) C₆₀ および (b) C₆₀(OH)₁₂ : 多数内包されえていることが観察された。(c) C₆₀(OH)₃₆ および (d) C₆₀(OH)₄₄ : あまり内包されていなかった。

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

研究分担者 大江 知之 慶應義塾大学 薬学部 医薬品化学講座

研究要旨

医薬品原体候補のフラーレン誘導体を創製するため、これまで最も抗炎症効果の強かったプロリン型誘導体 **3** を基盤として、6 種類の新規フラーレン誘導体 **7 - 12** の合成を行った。誘導体 **7**、**8**、**9** 及び **12** は不斉炭素を持たず立体異性体の可能性がない構造としてデザインされた。また、誘導体 **10** 及び **11** は、誘導体 **3** の 3 つのカルボキシル基の一部をエステルで保護した構造であり、細胞内移行性の調節を目的としてデザインされた。いずれの化合物も複数のステップを経て合成に成功し、各種機器分析により構造が同定された。以上の化合物は抗酸化作用や抗炎症作用の評価のために提供された。

A. 研究目的

これまでの研究により、プロリン型フラーレン誘導体 **1 - 3** は抗炎症作用を示し、中でも誘導体 **3** は特に優れた効果を示すことが明らかにされている (図 1)。しかしながら、誘導体 **3** には複数の立体異性体が存在し、将来的に医薬品を目指す上でその分離精製が問題になる可能性がある。そこで、誘導体 **3** とは異なり構造上不斉炭素を持たない誘導体を複数デザインした。また、誘導体 **3** は 3 つのカルボキシル基を有し、生体内環境では全ての基がイオン化し細胞内移行性が悪い可能性が考えられる。そこで、脂溶性を上げるためにカルボキシル基の 1 つあるいは 2 つをエステルで保護した化合物の合成を試みた。これらエステルは細胞内に取り込まれた後、細胞内エステラーゼにより加水分解され、細胞内に効率良く留まらせることも可能なので、いわゆる“プロドラッグ”としての効果も期待した。

B. 研究方法

1. プロリン型誘導体 **7** の合成

1-1. **7a** の合成

C₆₀ (155 mg, 0.21 mmol) を脱水トルエン

100 mL に溶解した。これに アミノマロン酸ジエチル (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 3 時間加熱攪拌を行った。反応の進行を TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10 : 1) によって追跡し、目的化合物と思われるスポットを確認し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) によって精製した。

1-2. **7** の合成

秤量した水素化ナトリウム (79 mg, 3.3 mmol, 50 当量) をナスフラスコに入れ、*n*-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 **7a** (60 mg, 0.066 mmol) を加え、45°C で 4 時間加熱攪拌を行った。熱いうちにメタノール、続いて 2 M 塩酸を加え反応を止めた。析出した固体を吸引濾過により濾取した。

2. プロリン型誘導体 **8** の合成

2-1. Diethyl (*N*-ethoxycarbonylmethyl) aminomalonate (**8a**) の合成

二頸ナスフラスコにプロモ酢酸エチル 526 μL

(4.7 mmol, 1.0 当量) を加え、窒素置換を行った。三角フラスコにアミノマロン酸ジエチル 1.0 g (4.7 mmol) を量り取り、ジメチルホルムアミド 15 mL に溶解した。そこにトリエチルアミン 990 μ L (7.1 mmol, 1.5 当量) を加えると白色の沈殿が生じたため、一度ろ過し、ろ液を二頸ナスフラスコにシリンジで少量ずつ滴下しながら 60 $^{\circ}$ C で加熱撹拌した。16 時間後、ニンヒドリン試薬を使用して TLC (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 1:1) にて反応の進行を確認したところ、目的物と思われるスポットを確認したため、撹拌を止め、反応液をろ過し、減圧下で溶媒を留去した。シリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 1 \rightarrow 10 : 1 \rightarrow 3 : 2 \rightarrow 1 : 1 \rightarrow 酢酸エチル) により精製した。

2-2. 8b の合成

C₆₀ (120 mg, 0.17 mmol) を脱水トルエン 80 mL に溶解した。これに **8a** (160 mg, 0.61 mmol, 3.6 当量) とパラホルムアルデヒド(100 mg, 3.3 mmol, 20 当量)を加えて 80 $^{\circ}$ C で加熱撹拌を行った。1 時間後に反応液の色が茶色になったため、TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10 : 1) によって反応の進行を観察し、目的物と思われる茶色スポットを確認した。その後、反応温度を 90 $^{\circ}$ C にし、3 時間加熱撹拌を続けた。TLC により、目的物と思われるスポットを確認したため、撹拌を止めた。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、溶媒を留去した。

2-3. 8 の合成

秤量した 水素化ナトリウム (47 mg, 2.0 mmol, 66 当量) をナスフラスコに入れ、脱水した *n*-ヘキサンで洗浄を行った。その後、合成した **8b** (29 mg, 0.03 mmol) を加え、50 $^{\circ}$ C で加熱撹拌を行い、1 時間後、メタノールで未反応の水素化ナトリウムを失活させた。1 M 塩酸を加えて反応液を酸性にした後、析出した固体を吸引濾過し、トルエン, *n*-ヘキサン, 1 M 塩酸により洗いこみ、真空乾燥を行った。

3. プロリン型誘導体 9 の合成

3-1. 9a の合成

C₆₀ (268 mg, 0.37 mmol) を脱水*o*-ジクロロベンゼン 150 mL に溶かし、これにグリシン (84 mg, 1.1 mmol, 3.0 当量) と 3-オキシグルタル酸ジエチル (338 μ L, 1.9 mmol, 5.0 当量) を加えて 200 $^{\circ}$ C で 還流撹拌した。反応の進行を TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10 : 1) によって追跡し、目的物と思われるスポットを確認した。17 時間後に多置換体と思われるスポットが見られたため反応を停止した。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した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン \rightarrow トルエン : 酢酸エチル = 50 : 1) により精製した。

3-2. 9 の合成

秤量した 水素化ナトリウム (64 mg, 1.6 mmol, 66 当量) をナスフラスコに入れ、脱水した *n*-ヘキサンで洗浄を行った。その後、**9a** (23 mg, 0.024 mmol) を加え、50 $^{\circ}$ C で加熱撹拌を行い、1 時間後、メタノールを加えた。さらに 1 M 塩酸を加えて反応液を酸性にした後、析出した固体を吸引濾過し、トルエン, *n*-ヘキサン, 1 M 塩酸により洗いこみ、真空乾燥を行った。

4. プロリン型誘導体 10 の合成

4-1. Di-*tert*-butyl tartrate (10a) の合成

N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (10 g, 49 mmol, 3.0 当量)、塩化銅 (I) (200 mg, 2.0 mmol, 0.14 当量) を *tert*-ブタノール (4.4 g, 58.0 mmol, 3.6 当量) に溶解させ、室温で 5 日間撹拌した。その後ジクロロメタン 70 mL、L-酒石酸 (2.4 g, 16 mmol) を加え室温でさらに 28 時間撹拌した。反応液をセライトで濾過し、水、飽和食塩水で洗浄した。有機層を無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下にて留去した。得られた黄色液体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 10 : 1 \rightarrow 1 : 1) により精製した。

4-2. *tert*-Butyl glyoxylate (10b) の合成

10a (2.0 g, 7.6 mmol) をメタノール 10 mL に、過ヨウ素酸ナトリウム (1.5 g, 7.0 mmol, 0.9 当量) を精製水 5 mL にそれぞれ溶解させ、それらを混合し 0°C で 1 時間攪拌した。反応液をジクロロメタンで 3 回抽出し無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下にて留去した。

4-3. 10c の合成

C₆₀ (200 mg, 0.28 mmol) をトルエンに溶解し、イミノ二酢酸ジエチル (86 · g, 467 μmol, 1.6 当量)、**10b** 1.0 g を加え、145°C で 35 分間還流した。有機層を水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗浄し、無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下で留去した。その後、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 100 : 15) により精製した。

4-4. 10 の合成

10c (150 mg, 147 μmol) をトルエン 150 mL に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸 (211 mg, 1.4 · mol, 9.5 当量)を加えた。すぐに茶褐色固体が生じ 5 分後に反応を止めた 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液、水、1 M 塩酸の順に洗い吸引濾過し、70°C で 1 時間減圧乾燥した。

5. プロリン型誘導体 11 の合成

5-1. 11a の合成

C₆₀ (300 mg, 0.42 mmol) をトルエン 500 mL に溶解し、イミノ二酢酸ジ tert-ブチル (200 mg, 815 μmol, 2 当量)、グリオキシル酸ジエチル (500 μL, 842 μmol, 47% トルエン溶液, 2.0 当量)を加え、30 分間還流した。反応液を水、飽和食塩水で洗浄し無水硫酸マグネシウムで乾燥後、溶媒を減圧下にて留去した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出溶媒 n-ヘキサン : トルエン = 1 : 1 → トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 100 : 5) により精製した。

5-2. 11 の合成

11a (150 mg, 0.14 mmol) をトルエン 150 mL に溶解し、トリフルオロメタンスルホン酸 (215 mg, 1.4 · mol, 10 当量)を加えた。すぐに

茶褐色固体が生じ、5 分後に反応を止めた。生成した茶褐色固体を吸引濾過し、残った酸の除去を目的に 1 M 炭酸水素ナトリウム水溶液、水、1 M 塩酸の順に洗浄した。

6. プロリン型誘導体 12 の合成

6-1. 12a の合成

C₆₀ (160 mg, 0.22 mmol) を o-ジクロロベンゼン 70 mL に溶解した。これに 3-アミノグルタル酸ジエチル(179.4 mg, 0.88 mmol, 4.0 当量) とパラホルムアルデヒド (131 mg, 4.4 mmol, 20 当量) を加えて 200°C で 20 時間還流攪拌した。反応の進行を TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10 : 1) によって追跡し、**12a** と思われるスポットが確認出来た。原料の C₆₀ は残っていたが、TLC でのスポットの濃さに変化が見られず、多置換体のスポットが現れたため、反応を止めた。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した。溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 10 : 1) により精製した。

6-2. 12 の合成

秤量した水素化ナトリウム 81 mg (2.0 mmol, 66 当量) をナスフラスコに入れ、n-ヘキサンで洗浄を行った。その後、脱水トルエン 50 mL に溶かした **12a** (30 mg, 0.031 mmol)を加え、60°C で加熱攪拌を行った。1 時間後、反応液が熱いうちにメタノールを加えると、茶色の沈殿が析出し、反応液は無色透明になった。反応液が冷めた後、1 M 塩酸 を加えた後、得られた沈殿を吸引濾過し、トルエン、n-ヘキサン、1 M 塩酸で洗い、真空乾燥を行った。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. プロリン型誘導体 7 の合成

1-1. 7a の合成

茶褐色固体 70 mg (収率 38%) を得た。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS により、得られ

た固体を目的物 **7a** 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 -)
MS	<i>m/z</i>	907 [M] ⁺

1-2. **7**の合成

茶色固体 32 mg (収率 58%)を得た。¹H-NMR 及び MALDI-TOF-MS により、得られた固体を目的物 **7** と同定した。

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 -),
MS	<i>m/z</i>	851 [M] ⁺

2. プロリン型誘導体 **8** の合成

2-1. **8b** の合成

茶色固体 80 mg (収率 48%) を得た。¹H-NMR, MALDI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **8b** と同定した。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.33-1.41 (<i>m</i> , 9H, -CH ₂ CH ₃) 4.13 (<i>s</i> , 2H, -N-CH ₂ -COOEt) 4.33-4.51 (<i>m</i> , 6H, -CH ₂ CH ₃) 4.96 (<i>s</i> , 2H, C ₆₀ -CH ₂ -)
MS	<i>m/z</i>	993 [M] ⁺

2-2. **8**の合成

茶色固体 32 mg (収率 94%) を得た。¹H-NMR, ESI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **8** と同定した。

¹ H-NMR (D ₂ O)	δ (ppm)	3.21 (<i>s</i> , 2H, -CH ₂ -COOH)
MS	<i>m/z</i>	calculated for C ₆₆ H ₆ NO ₆ : 908.01951 found: 908.01755

3. プロリン型誘導体 **9** の合成

3-1. **9a** の合成

茶色固体 29 mg (収率 8.2%) を得た。¹H-NMR, MALDI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **9a** と同定した。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.30 (<i>t</i> , 6H, <i>J</i> =7.2 Hz, -CH ₂ CH ₃) 3.70 (<i>d</i> , 2H, <i>J</i> =16.0 Hz, -CH ₂ COOEt) 3.82 (<i>d</i> , 2H, <i>J</i> =16.0 Hz, -CH ₂ COOEt) 4.22 (<i>q</i> , 4H, <i>J</i> =7.2 Hz, -O-CH ₂ -CH ₃) 4.95 (<i>s</i> , 2H, C ₆₀ -CH ₂ -)
MS	<i>m/z</i>	935 [M] ⁺

3-2. **9**の合成

茶色固体 26 mg (収率 99%) を得た。¹H-NMR, MALDI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **9** と同定した。

¹ H-NMR (D ₂ O)	δ (ppm)	2.49 (<i>d</i> , 4H, -CH ₂ COOH) 3.86 (<i>s</i> , 2H, C ₆₀ -CH ₂ -)
MS	<i>m/z</i>	879 [M] ⁺

4. プロリン型誘導体 **10** の合成

4-1. **10c** の合成

茶褐色固体 137 mg (収率 49%) を得た。¹H-NMR, FAB-MS により得られた固体を目的物 **10c** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.24 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz, 3H,
--------------------	---------	---

(CDCl ₃)	CH ₂ CH ₃)
	1.41 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)
	1.49 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> Bu)
	4.14 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
	4.26 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
	4.33-4.37 (<i>m</i> , 4H, CH ₂ CH ₃)
	6.01 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
	6.14 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i> calculated for C ₇₄ H ₂₄ O ₆ N : 1022.1604 found: 1022.1536

4-2. 10 の合成

茶褐色固体 116 mg (収率 82%) を得た。
¹H-NMR, FAB-MS により得られた固体を目的物 **10** と同定した。

¹ H-NMR (C ₅ D ₅ N)	δ (ppm)	1.19 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.3 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)
		1.21 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.3 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)
		4.2-4.30 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃)
		4.3-4.46 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃)
		4.65 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
		4.26 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
		4.86 (<i>d</i> , <i>J</i> =17.1 Hz, 1H, N-CH ₂)
		6.72 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
		6.76 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i> calculated for C ₇₀ H ₁₆ O ₆ N : 966.0978 found: 966.1007	

5. プロリン型誘導体 11 の合成

5-1. 11a の合成

茶褐色固体 186 mg (収率 43%) を得た。
¹¹H-NMR, FAB-MS により得られた固体を目的物 **11a** と同定した。

¹ H-NMR (CDCl ₃)	δ (ppm)	1.25 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.0 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)
		1.50 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> Bu)
		1.61 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> Bu)
		4.02 (<i>d</i> , <i>J</i> =17.1 Hz, 1H, N-CH ₂)
		4.21 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
		4.2-4.39 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃)
		4.26 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
		6.04 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
		6.01 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
		6.14 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i> calculated for C ₇₆ H ₂₈ O ₆ N : 1050.1917 found: 1050.1863	

5-2. 11 の合成

茶褐色固体 203 mg (収率 151%) を得た。
¹H-NMR, FAB-MS により得られた固体を目的物 **11** と同定した。

¹ H-NMR (C ₅ D ₅ N)	δ (ppm)	1.19 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.3 Hz, 3H, CH ₂ CH ₃)
		4.3-4.49 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃)
		4.46 (<i>d</i> , <i>J</i> =16.5 Hz, 1H, N-CH ₂)
		5.04 (<i>d</i> , <i>J</i> =17.1 Hz, 1H, N-CH ₂)
		6.89 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
		6.90 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
		6.76 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i> calculated for C ₆₈ H ₁₂ O ₆ N :	

938.0665

found: 938.0677

6. プロリン型誘導体 12 の合成

6-1. 12a の合成

茶色固体 41 mg (収率 20%) を得た。
 $^1\text{H-NMR}$, MALDI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **12a** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3)	δ (ppm)	1.34 (<i>t</i> , 6H, $J=7.2$ Hz, $-\text{CH}_2\text{CH}_3$)
		2.87 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 8.5$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COOEt}$)
		3.06 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 9.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COOEt}$)
		4.26-4.30 (<i>m</i> , 5H, $-\text{O-CH}_2\text{-CH}_3$, $-\text{N-CH-}$)
		4.53 (<i>s</i> , 4H, $\text{C}_{60}\text{-CH}_2\text{-}$)
MS	m/z	949 [M] ⁺

6-2. 12 の合成

茶色固体 8.3 mg (収率 30%) を得た。
 $^1\text{H-NMR}$, ESI-TOF-MS により得られた固体を目的物 **12** と同定した。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$)	δ (ppm)	2.74 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 9.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COOH}$)
		3.01 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 9.0$ Hz, $-\text{CH}_2\text{COOH}$)
		4.13 (<i>m</i> , 1H, $-\text{N-CH-}$)
		4.56 (<i>s</i> , 4H, $\text{C}_{60}\text{-CH}_2\text{-}$)
MS	m/z	calculated for $\text{C}_{67}\text{H}_{10}\text{NO}_4$: 892.0698 found: 892.0626

E. 結論

これまで最も抗炎症作用が強かったプロリン型誘導体 **3** を基盤として、6 種類の新規フラレン誘導体 **7** - **12** の合成を行った。いずれの化合

物も複数のステップを経て合成に成功し、各種機器分析により構造が同定された。以上の化合物は抗酸化作用や抗炎症作用の評価のために提供された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

- Funakoshi-Tago M, Tsukada M, Watanabe T, Mameda Y, Tago K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T.: Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant., *Int Immunopharmacol*, 20(1):258-263, 2014.
- Yasuda D, Takahashi K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T: Antioxidant activities of 5-hydroxyoxindole and its 3-hydroxy-3-phenacyl derivatives: the suppression of lipid peroxidation and intracellular oxidative stress., *Bioorg Med Chem*, 21(24):7709-7714, 2013.

② 学会発表

【国内学会発表：合計 10 件】

- 片岡裕樹, 黒須寛貴, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: 抗 HCV 薬を目標した立体異性体のないフラレン誘導体のデザインと合成, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月.
- 安野拓実, 高橋恭子, 大江知之, 中村成夫, 増野匡彦: 抗 HIV 及び抗がん活性を有する新規二置換型フラレン誘導体の創製, 第 57 回日本薬学会関東支部大会, 東京, 2013 年 10 月.
- 安野拓実, 高橋恭子, 大江知之, 中村成

夫，増野匡彦：抗 HIV 薬を目指したピリジン側鎖を有するプロリン型フラレン誘導体の創製，第31回メディシナルケミストリーシンポジウム，広島，2013年11月。

4. 大江知之，北川原弓奈，中村文子，橘久美子，高橋恭子，中村成夫，増野匡彦：肝毒性を示す医薬品の代謝的活性化を回避した創薬アプローチ，第31回メディシナルケミストリーシンポジウム，広島，2013年11月。
5. 安野拓実，高橋恭子，大江知之，中村成夫，増野匡彦：抗 HIV 及び抗がん活性を有する新規ピリジニウム型フラレン誘導体の創製，日本薬学会第134年会，熊本，2014年3月。
6. 安野拓実，高橋恭子，大江知之，中村成夫，増野匡彦：抗 HIV 及び抗がん活性を有する新規ピリジニウム型フラレン誘導体の創製，日本薬学会第134年会，熊本，2014年3月。
7. 渡部匡史，中村成夫，大江知之，増野匡彦，賀川裕貴，藤室雅弘：カポジ肉腫関連ヘルペスウイルス誘導性リンパ腫を標的とした化学療法の探索，日本薬学会第134年会，熊本，2014年3月。
8. 亀山実佳子，小川香菜子，丸山しおり，安田大輔，高橋恭子，大江知之，中村成夫，増野匡彦：蛍光標識化フラレン誘導体の創製，日本薬学会第134年会，熊本，2014年3月。
9. 片岡裕樹，秋葉智紘，高橋恭子，大江知之，中村成夫，増野匡彦：HCV RNA ポリメラーゼ阻害活性と抗酸化活性を有するフラレン誘導体の創製，日本薬学会第134年会，熊本，2014年3月。
10. 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，2014年3月。

【国際学会発表：合計1件】

1. Ryosuke Fujita, Kazuki Maruyama, Kyoko Takahashi, Tomoyuki Ohe, Shigeo Nakamura, Tadahiko Mashino : Radical scavenging and lipid peroxidation suppressive activity of 3-pyridinylinden-2-ols, 17th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research International (SFRI 2014), Kyoto, 23-26 March, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

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

なし

その他

特記事項なし。

研究協力者

慶應義塾大学薬学部 医薬品化学講座 増野匡彦 教授、高橋恭子 助教

日本医科大学 中村成夫 教授

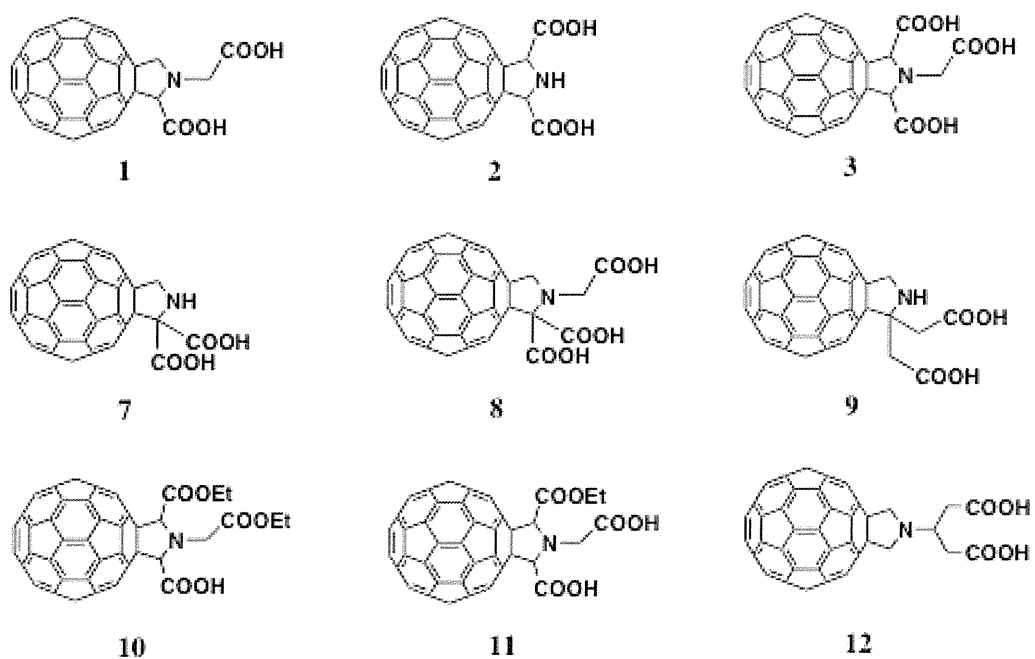


図1. 様々なプロリン型フラーレン誘導体の構造

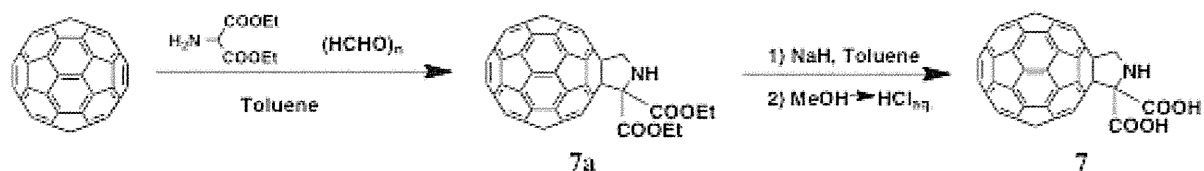


図2. プロリン型誘導体 7 の合成スキーム

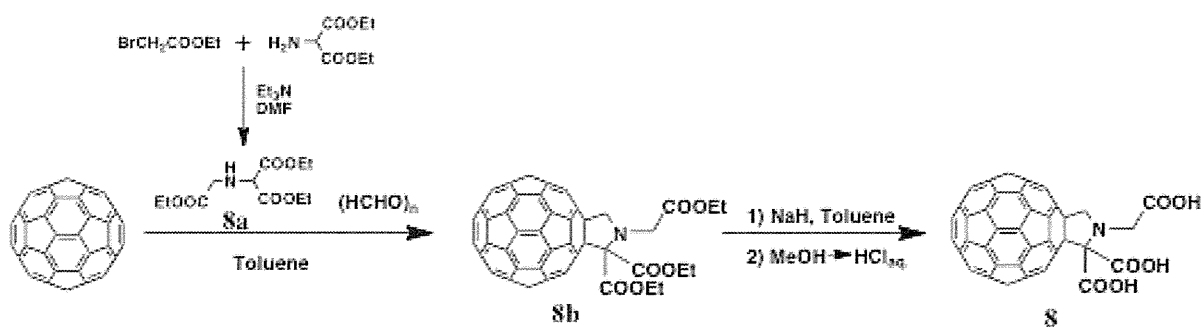


図3. プロリン型誘導体 8 の合成スキーム

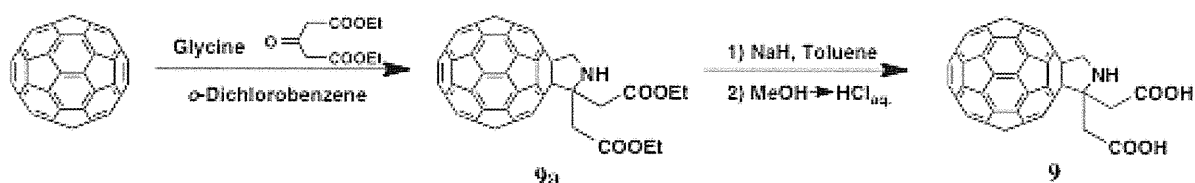


図4. プロリン型誘導体 9 の合成スキーム

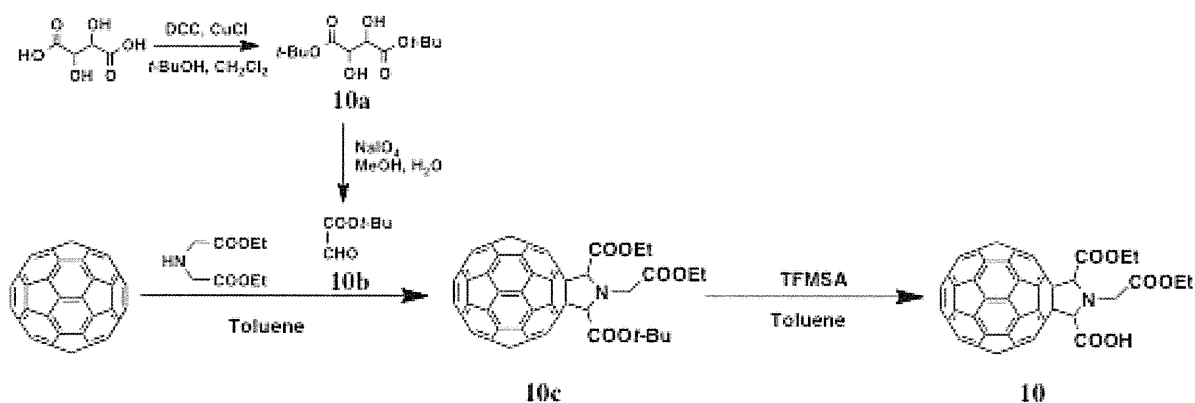


図5. プロリン型誘導体 10 の合成スキーム

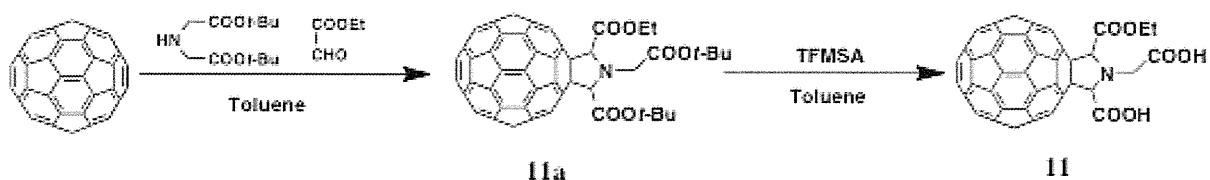


図6. プロリン型誘導体 11 の合成スキーム

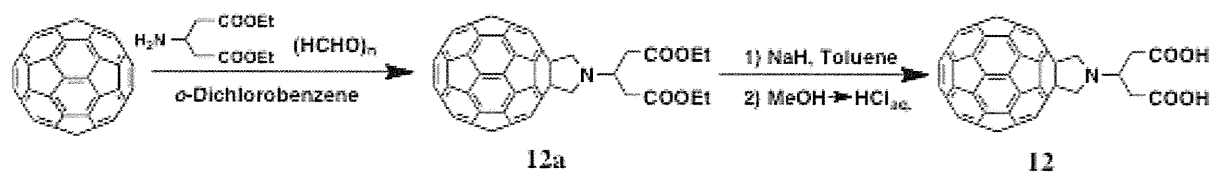


図7. プロリン型誘導体 12 の合成スキーム

ナノDDS化C60フラレーンの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

医薬品原体候補のフラレーン誘導体を創製：平成 24 年度の研究において合成した 5 種類のフラレーン誘導体のうち、細胞障害性、抗酸化・抗炎症作用等の観点から、最も優れていたプロリン型誘導体(3)に着目した。プロリン型誘導体(3)を 2 回合成し、IR、¹H-NMR、LC/MS 等の分析を行うことにより、ロット間の違いを解析するとともに、市販品 (C₆₀ Pyrrolidine tris-acid) の品質と比較した。その結果、本研究で合成したプロリン型誘導体(3)は、市販品と比較すると総体的に純度も高く、目的構造を有する化合物が多く合成できていると判断された。しかしながら、いずれのロットにおいても不純物が 30~40%含まれるため、医薬品原体としての物性を正確に評価するためには、不純物の除去・目的物の高純度化が今後の課題である。

フラレーン誘導体の医薬品としての基礎的効果検証：平成 24 年度は、ESR を用いて、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) に対する消去作用を評価した。本年度は、脂質ペルオキシラジカル (LOO \cdot) に対する消去作用を測定し、昨年度の結果と比較することにより、ラジカル種と消去作用の関係を考察することを目的とした。測定に用いたサンプルは、いずれも LOO \cdot よりも $\cdot\text{OH}$ に対する消去作用の方が優れていた。水酸化フラレーン誘導体による $\cdot\text{OH}$ 消去作用と水酸基数の間に相関性は認められなかったが、LOO \cdot の場合には、水酸基の増加に伴って、IC₅₀ の増加が認められた。即ち、水酸基が増加することによりラジカル消去作用が低下することから、LOO \cdot の消去作用は、フラレーン骨格の共役結合数に依存することが示唆された。プロリン型誘導体による LOO \cdot 消去作用を比較すると、プロリン型(1)の IC₅₀ は、プロリン型(3)よりも 3 倍程度高かった。プロリン型誘導体(1)の官能基に存在するカルボン酸は 2 個、プロリン型誘導体(3)のカルボン酸は 3 個であることから、LOO \cdot 消去作用の違いは、フラレーン骨格の共有結合に加えてフラレーン誘導体の官能基に含まれるカルボン酸の数も LOO \cdot 消去作用に影響を与えたと考えられた。

フラレーン誘導体の体内動態解明：将来的な薬事申請を想定し、高い検出感度を有する方法でフラレーン誘導体の体内動態を解明するため、平成 24~25 年度にかけて、フラレーン骨格に [¹⁴C] を導入した [¹⁴C]C₆₀ の合成方法の確立を試みた。2 つの先行文献よりも効率的にかつ高い放射能を有する [¹⁴C]C₆₀ の合成を目指すため、合成ステップ毎に最適化を行った。その結果、先行文献よりも約 20 倍効率よく、¹⁴C を C₆₀ へ導入することに成功した。当初、比放射能=7 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ を目標としていたが、最終的に得られた [¹⁴C]C₆₀ の比放射能=18.6 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (Total Activity : 198.6 μCi) であり、収量=11.8 mg であった。本研究では、Ba[¹⁴C]O₃ を出発原料として、アーク放電法を用いて [¹⁴C]C₆₀ を合成したが、本方法では、アーク放電チャンバー内で生成した [¹⁴C]C₆₀ を含む煤を二硫化炭素で溶解・回収する過程で [¹⁴C]汚染が生じるため、今後上記手法を用いて [¹⁴C]C₆₀ 合成を継続することは汚染の拡大を招く恐れがあり、アーク放電法で [¹⁴C]C₆₀ を合成する場合の課題が判明した。そのため、¹⁴C 汚染を引き起こすことなく [¹⁴C]C₆₀ を合成するための全合成法を検討すべく、¹⁴C]-3-フェニルプロピオン酸を出発原料とした [¹⁴C]C₆₀ の合成方法の検討に着手した。

A. 研究目的

本研究は、抗酸化・抗炎症作用に優れるフラ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、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。

平成 24 年度は、創薬開発に進めるべきフラレン誘導体を選出するため、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フラレン誘導体を合成した。合成したフラレン誘導体は、医薬品原体としての基礎的効果を検証するため、ESR を用いてヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の消去活性を評価した。また、フラレン誘導体の体内動態解明を目指し、 ^{14}C の合成方法を確立するため、RI 合成方法の最適化を行った。

本年度は、平成 24 年度の研究から、優れた薬効が期待されると考えられたプロリン型誘導体 (3) に注力して研究を行うこととし、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) プロリン型誘導体 (3) を複数回合成し、ロット間の品質を比較すること、および市販品と品質を比較することにより、品質規格を確定するための予備情報を収集する。
- (2) フラ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、合成したフラレン誘導体の脂質ペルオキシラジカル ($\text{LOO}\cdot$) に対する消去作用を評価する。
- (3) 先行文献に準じて、アーク放電法を用いた方法で ^{14}C の合成を完了すること、及び体内動態を解明するために十分なフラレン誘導体 RI を確保するため、全合成による ^{14}C の合成方法を検討する。

B. 研究方法

1. プロリン型誘導体 (3) の合成および分析

1-1. エステル体 (1) の合成

反応式 1 のエステル体 (1) を合成するため、 C_{60} (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。 C_{60} -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) させた。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/ CH_3CN =66/34
- ・流速 : 1ml/min

2 種類の異性体を含むエステル体 (1) の生成が最大になる時点 (7.5 h、エステル体 (1) の LC 面積比が 51.5%) 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°C/25-20 mmHg) し、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, 700 mg) 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を用いて精製した (FC 40 165 g)。n-ヘキサン展開液で未反応 C_{60} 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。トルエン展開液から得られたエステル体 (1) 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。

1-2. エステル体 (1) → 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 三口フラスコに、300 ml の乾燥トルエンに溶解したエステル体 (1) 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 (6.21mmol) 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 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誘導体(3)を得た¹⁾。

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

プロリン誘導体(3)の LC-MS 分析は、以下の条件で実施した。

カラム : Buckyprep, 4.6 x 250 mm, 40 °C
移動相 : DMF/Methanol/TFA=80/20/0.1 (v/v)
流速 : 0.5 ml/min
注入量 : 5 μl
検出波長 : 335 nm
MS : APPI MS, Negative

2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価 : ESR

LOO・は、他のラジカル種と比較すると、反応性は弱い寿命が長く、DNA 損傷や発癌促進作用を有することが知られているラジカルである。

tert-Butylhydroperoxide (*t*-BuOOH) とヘモグロビン (Hb³⁺) は、緩衝液中で反応させることにより、*t*-BuOO・と Hb⁴⁺ が生成される。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 *t*-BuOO・と DMPO が反応し、DMPO-LOO・アダクトのシグナル強度減少を指標として、LOO・消去作用を評

価した²⁾。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。測定試料は、結果とともに表 1 に示した (図 1)。

溶液調製 : ① Methemoglobin (MetHb, 2.5 mg) を 5 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 10 ml) に溶解 ② Diethylenetriamine -N,N,N',N'',N''-pentaacetic acid (DTPA, 1.7 mg) を 5 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 10 ml) に溶解 ③ *t*-BuOOH (1 ml) を EtOH (3.4 ml) に溶解した後、5 mM リン酸緩衝液 (pH7.4, 3.4 ml) を混合し、さらに 5 mM リン酸緩衝液 (pH7.4) で 10 倍希釈 ④ DMPO を精製水で 4 倍希釈

反応液調製 : ① MetHb (45 μL)、② DTPA (45 μL)、DMSO/精製水※ (25 μL)、測定試料 (25 μL)、④ 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、③ *t*-BuOOH (45 μL) を添加した。

※測定試料が水溶解の場合には DMSO で希釈し、測定試料が DMSO 溶解の場合には水希釈

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、*t*-BuOOH 添加 1 分後のシグナルを測定した。

t-BuOO・消去作用は、DMPO-LOO・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⁺} : マーカーのシグナル強度)

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

- 2) 正木仁 監修、機能性化粧品素材開発のための
実験プロトコール集

3. 新規な¹⁴C]C₆₀ 合成方法の検討

本年度は、上記課題を解決するため、C₆₀H₃₀を前駆体として C₆₀ を全合成する論文³⁾を参照し、¹⁴C]C₆₀ の合成を試みることにした。

C₆₀H₃₀ の RI 原料は市販されていないため、¹⁴C]-3-phenyl propionic acid (3-PPA)を出発原料とし、Truxene、中間体 I、中間体 II を経て¹⁴C₃]C₅₇を合成する手法を採用した(図 2)。

Truxene 合成 : 3-PPA (3.3 mmol, 0.5g)およびポリリン酸 (5.0 g)を三口フラスコに入れ、N₂ 雰囲気下で加熱攪拌 (65℃, 30min→140℃, 120min)した後、室温まで冷却した。その後、脱イオン水 (5.5 ml)を加えて攪拌 (室温, 60min)し、吸引ろ過により得られた沈殿物をアセトンで洗浄した。洗浄後、ジメチルホルムアミドで再結晶することにより、Truxene を得た (3-PPA カルボキシル基の脱水反応)。

中間体 I 合成 : 上記プロセスで生成した Truxene (1.0 mmol, 340 mg)、脱水 THF (50 ml)、n-BuLi/ヘキサン溶液 (1.6 mol/l, 3.2 mmol, 2 ml)を三口フラスコに入れ、N₂ 雰囲気下で温度を上げながら攪拌 (-78℃→-10℃, 4h)した後、1-bromo-2- bromomethyl naphthalene (3.5 mmol, 10.5 mg)を加えて攪拌した (室温, 30min)。酢酸エチルで反応を停止させた後、飽和 NaCl 溶液で洗浄し、無水硫酸マグネシウムを用いて乾燥し、エバポレーターで濃縮することにより中間体 I を得た。

中間体 I 合成過程において、anti-化合物 : syn-化合物 = 3:1 の割合で生成するため、中間体 II の合成プロセスの前に、syn-化合物のみを得るためのステップを設けた (反応式 2)。中間体 I (0.5 mmol)、tert-butyl alcohol (30 ml)、potassium tert-butoxide (1 equivalent)を三口フラスコに入れ、N₂ 雰囲気下で還流 (80℃, 12h)し、冷却

後に濃縮・ろ過した。残渣は水で洗浄し、エタノールまたはトルエンで再結晶を試みた。

(以降のプロセスは、検討中/検討予定)

中間体 II 合成 : dimethyl acetamide (8 ml)、中間体 I (0.15 mmol, 150 mg)、酢酸 Paradium (0.15 mmol, 34 mg)、BnMe₃N⁺Br⁻ (0.3 mmol, 69 mg)、cesium carbonate (1.5 mmol, 207 mg)を三口フラスコに入れて還流 (140℃, 36h)した後、室温まで冷却する。ろ過し、固体をジクロロメタン+アセトンで洗浄した後、シアン化ナトリウム水溶液中で攪拌 (1h)し、ろ過した後に固体を水+アセトンで洗浄し、カラムを用いて精製する。

¹⁴C₃]C₅₇ 合成 : 中間体 II をクロロホルムに溶解し、白金粉末を滴下した後、クロロホルムを揮発させて乾燥する (図 2 下)。高真空下で加熱 (10⁻⁴ mBar, 427℃, 20min) した後に冷却する。

分析 : 先行文献では、C₆₀ のケージが形成されているかどうか、STM(Scanning Tunneling Microscope)と呼ばれる顕微鏡で確認しているが、本研究においては、LC、NMR、MS、UV/VIS 吸収スペクトルの測定結果等を総合して、C₆₀ の生成を確認する。また収率は、重量及び放射能測定結果から算出する予定である。

- 3) Otero G et al., Nature, 454: 865-869, 2008.

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考 察

1. プロリン型誘導体 (3) の合成および分析

プロリン型誘導体(3)の情報を以下に記載した。

組成式 : C₆₆H₇NO₆

分子量 : 909.76

ロット : 1 回目 130711-1

2 回目 130711-2

市販品 20096APV (Aldrich 社製)

IR スペクトル: 本研究で合成したプロリン型

誘導体 (Lot. 130711-1, 130711-2) および市販品 (Aldrich 社製)の IR スペクトルを図 3 に示した。いずれの試料においても、スペクトル形状に大きな違いは認められないものの、Aldrich 製の誘導体は、 $1,000\sim 1,100\text{ cm}^{-1}$ の波長域に吸収帯が認められなかったことが、本研究で合成した誘導体との相違点であった。

カルボン酸の OH 基に由来する偏角振動である $1,000\sim 1,100\text{ cm}^{-1}$ の吸収は、Aldrich 社製誘導体には認められなかったことから、官能基の末端が「カルボン酸」に変換していない可能性が示唆された。C=O 二重結合の振動は、「カルボニル」の場合、一般的に $1,700\sim 1,725\text{ cm}^{-1}$ であり、「エステル」の場合、 $1,735\sim 1,750\text{ cm}^{-1}$ である。Lot. 130711-2 および Aldrich 製誘導体の場合、数字が大きい方に若干シフトしていることから、カルボニル以外にエステルも存在する可能性が考えられた。

LC-MS: 3 種類のプロリン型誘導体(3)の LC チャートは、図 4 に示した。いずれの試料もメインピークのリテンションタイムはほぼ一致しており、相対純度は 60~70%であった。30~40%存在する不純物は、試料により若干化合物プロファイルが異なる傾向が認められた。医薬品原体としての物性を正確に評価するためにも、来年度は、不純物除去・精製方法の検討を進める必要がある。

3 種類のプロリン型誘導体(3)の MS スペクトルを図 5 に示した。Lot.130711-1 のスペクトルは $m/z=909$ の化合物がメインであった。一方、Lot.130711-2、および Aldrich 社製誘導体スペクトルのメインピークは、 $m/z=921$ がメインであり、Lot.130711-2 及び Aldrich 社製誘導体の $m/z=908$ のピークは、Lot.130711-1 に比べて小さく、特に Aldrich 社製誘導体のピークは非常に小さかった。

¹H-NMR: Aldrich 製の誘導体は、試料濃度を複数回調製し、複数回測定を行ったが、いずれもノ

イズが大きく、正確なピークを観測することができなかった。詳しい原因は不明ではあるが、不純物に起因すると推察される。Lot. 130711-2 に観測された $\delta 3.823$, 4.317 及び 5.545 の吸収は、それぞれメチルエステル基のメチル(COOCH_3)、メチレン(NCH_2) 及び 2 個のメチン(CH) プロトンの吸収と考えられた。

IR スペクトルや MS の結果と合わせて考察すると、Lot.130711-2 及び Aldrich 社製誘導体は、メチルエステル化された成分が含まれる可能性が考えられた。今後は、合成の過程で、メチルエステル化を防ぐ方策を検討する必要がある。

2. フラーレン誘導体の抗酸化能評価 : ESR

各種フラーレン誘導体および比較対照物質における脂質ペルオキシラジカルに対する消去作用を測定し、 IC_{50} を算出した結果をまとめて表 1 に示した。比較対照物質に関しては、エダラボン以外の化合物では、 $\text{LOO}\cdot$ 消去作用は認められなかった。5-aminosalicylic acid (5-ASA)、N-acetylcysteine (NAC)、Ascorbic acid (AsA) の場合、 $\text{LOO}\cdot$ 消去作用を示さないだけでなく、Blank よりも高いシグナルが検出された。特に、NAC の場合は、 $\cdot\text{OH}$ に類似したシグナルの出現も認められた。AsA も同様に Blank よりも高いシグナルの出現に加えて、AsA ラジカルと思われるシグナルが検出された。抗酸化物質でありながら Blank よりも高いシグナルが検出された理由については不明である。

プロリン型誘導体 : Aldrich 社製プロリン型湯誘導体 (3) と本事業で合成した誘導体 (Lot.130711-2) の IC_{50} を比較した結果、本事業で合成した誘導体の IC_{50} は 1/2 程度であり、優れた $\text{LOO}\cdot$ 消去作用を有することが明らかになった。この結果は、前述したように、Aldrich 社製プロリン型誘導体の場合、本来カルボン酸に変換しているはずの官能基の一部が、メチルエステル化しているためと思われる。プロリン型(1)と