

20140800/B

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

**難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な
非侵襲性経口ナノDDSの開発**

平成 24 年度～26 年度
総合研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

医療機器開発推進研究事業

**難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な
非侵襲性経口ナノDDSの開発**

平成 24 年度～26 年度
総合研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 研究報告	
難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な非侵襲性経口ナノ DDS の開発-----	1
研究代表者 堤 康央	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	153
III. 研究成果の刊行物・別刷-----	155

厚生労働科学研究費補助金 (医療機器開発推進研究事業)

「難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な非侵襲性経口ナノ DDS の開発」

平成 24 年度～26 年度 総合研究報告書

難治性腸疾患等に対する安全かつ有効な 非侵襲性経口ナノ DDS の開発

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

超微細加工技術を活用した疾患の予防・治療戦略/技術の確立は、知財技術立国・健康立国を目指す我が国の最重要課題であり、特に原因不明で、根本的な治療法が確立されていない難治性疾患への応用はライフ/医療イノベーション 5ヶ年戦略の観点からも期待されている。炭素原子 60 個が切頂二十面体構造に結合した C60 フラーレン (直径 1 nm) は、従来薬とは全く異なった作用点での抗ウイルス活性や抗菌活性、さらには圧倒的な抗炎症活性 (抗酸化活性; 活性酸素・ラジカル消去活性) を有するなど、エイズや肝炎、がん、炎症性疾患に対する画期的ナノ医薬として期待されている。しかし、主薬としての C60 フラーレンを実用化するには、分散性・吸収性の改善や標的指向性の付与、さらには薬効メカニズムの解明といった多くの克服課題が残されている。そこで本研究では、医用工学的に C60 フラーレンのプロドラッグ化や糖修飾など、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、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。平成 24 年度には、分散性を改善できる水酸化 C60 フラーレンに加え、抗酸化・抗炎症活性を向上可能な官能基修飾誘導体を創製することで、従来までの「20 倍以上もの抗炎症活性を有する C60 フラーレン誘導体 (プロリン型 C60 フラーレン)」を見出した。また一般毒性試験や遺伝毒性試験などを実施し、安全性にも優れていることを明らかとした。さらに、C60 フラーレンの物性評価系の構築に成功するなど、品質保証・動態解明の足掛かりを掴んだ。平成 25 年度には、平成 24 年度に見出した、強い抗炎症活性を有する C60 フラーレン誘導体を鋳型として、異性体の存在しない 4 種類の官能基修飾誘導体を新規合成し、構造活性相関に資する基盤情報を得た。また、プロリン型 C60 フラーレンの免疫抑制作用・抗炎症活性メカニズムの一端を明らかにすると共に、炎症性腸疾患モデルマウスを用い、C60 フラーレン誘導体が優れた治療効果を発揮可能であることを見出した。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、体内動態解析の足がかりをつかんだ。また、グルコース修飾 C60 フラーレンは、プロリン型 C60 フラーレンに匹敵する抗炎症活性を有していたことから、グルコース修飾の有効性を明らかとした。平成 26 年度には、プロリン型 C60 フラーレンが、炎症性サイトカインの mRNA からタンパク質への翻訳を選択的に阻害する可能性を見出し、従来までの医薬品には全く存在しない抗炎症活性を発揮する可能性を明らかとした。また、保護基を変更した合成経路を開発し、純度の高いプロリン型 C60 フラーレンの合成に成功した。さらに、平成 25 年度に創製した ^{14}C 標識 C60 フラーレンを原料に、 ^{14}C 標識プロリン型 C60 フラーレンの合成に先駆けて成功し、体内動態評価の足がかりを掴んだ。本研究終了後は、これまでの成果をもとに、霊長類での前臨床試験を実施する。本検討では、霊長類を用いた新規治療技術の有効性・安全性評価に関して実績を有する医薬基盤研究所・霊長類医科学研究センターと連携する。また、ヒト臨床研究だけでなく、食品領域、動物・ヒトに対する医薬領域での実用化の準備を進めると共に、DDS 化 C60 フラーレン誘導体の GLP/GMP に準拠した製造・製剤試験システムを構築し、安定的製造と供給体制を整備する。さらに、臨床試験 (実用化試験) に向けた取組をスタートさせる。

なお、上記検討なども含有されている内容で平成 25 年 2 月 19 日 (火) に特許出願したが (特願 2013-030455)、平成 26 年 2 月 19 日 (水) に PCT 出願した。また、平成 24 年 4 月 4 日 (水)、

平成 26 年 2 月 20 日(木)に PMDA への事前面談を実施済みであると共に（今後も随時、事前相談を行う予定）、平成 26 年 3 月 18 日(火)に創薬支援戦略室（医薬基盤研究所）にも相談しており、実用化に向けた取組を着実に推進していることを申し添える。本研究成果は、難治性腸疾患にとどまらず、世界で計 6000 万人以上もの患者が存在する関節リウマチなど、数多くの炎症性難病の克服にも横断的な共通治療基盤を提供可能であり、今後の薬効（抗炎症）メカニズムや動態の解明、そしてその制御（ナノ DDS）が鍵を握るものの、心不全や慢性腎炎などへの広範な展開も期待される。以上、本取組は、新たな方法論・基盤技術・医療体系を提供することで大きな社会効果が期待されると共に、「健康立国」としての国際的地位の向上にも繋がることと期待できる。

研究分担者

吉岡靖雄：大阪大学大学院薬学研究科・准教授
藤尾 慈：大阪大学大学院薬学研究科・教授
小久保 研：大阪大学大学院工学研究科・講師
大江知之：慶應義塾大学薬学部・准教授
青島央江：ビタミン C60 バイオリサーチ株式会社・マネージャー

A. 研究目的

サブナノ素材（10 nm 以下）の一つである C60 フラーレン（直径 0.7 ～1 nm）は、炭素原子 60 個により形成されるサッカーボール型構造を持った同素体である（他にダイヤモンド・グラファイトなど）。C60 フラーレンは、単に美しい形状を持つだけでなく、高強度、超伝導性、光吸収性、低熱・電気伝導性などの性質から、各種触媒、磁性体、電子部品などへの応用が期待されている。現在では、C60 フラーレンの工業的製造法が確立しており、磁性体、光学材料、超電導材料、化粧品、二次電池、潤滑剤など、既に実用化されているものも多く存在する。例えば、既に 1000 種類以上の C60 フラーレン配合化粧品が実用化されており、抗酸化作用、メラニンインデックスの低下、シワ面積率の減少、炎症性皮疹の低下など、様々な作用を発揮することが知られている。さらに C60 フラーレンは、ラジカルスポンジと称されるほどの強い抗酸化活性を始めとして、抗ウイルス活性や抗がん活性も有することから、未だ作用メカニズムは殆ど不明であるにも関わらず、エイズ・肝炎・がんや自己免疫疾患に対する新たな治療薬として、医薬品分野においても期待されている。

潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾

患は、厚生労働省指定の難治性疾患、いわゆる難病に指定されている。近年、患者数は増加の一途を辿り、平成 23 年度特定疾患受給者証交付件数で、潰瘍性大腸炎 13 万人、クローン病 3 万人、合わせて 16 万人にも達しており、社会問題となっている。本疾患は、男性でかつ、30 歳代に多く分布しており、頻繁に再燃と寛解を繰り返す。本疾患の病因は、未だ特定されていないが、遺伝的要因や環境的要因、さらに免疫異常が複雑に絡み合った多因子疾患と考えられている。中でも、粘膜面における免疫系の異常な活性化が炎症性腸疾患の病態に深く関与していることに異論はない。本疾患に対する治療薬として、5-アミノサリチル酸製剤（5-ASA）や副腎皮質ステロイド、さらには抗 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、治療不応例の多さ、高薬価、結核といった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。すなわち、炎症性腸疾患に対する画期的治療法の開発は、緊急性と社会的ニーズ、学術的・経済的メリットの高い取組となっており、他の自己免疫性難病の克服にも横断的な共通基盤を提供するものと期待されている

炎症性腸疾患患者は、腸管内において、好中球による活性酸素種（ROS）産生の亢進、抗酸化機能の低下、酸化 DNA 損傷マーカーの増加が報告されており、酸化ストレスにより炎症病態が修飾されていることが明らかとなっている。炎症性腸疾患における酸化ストレスの関与が明らかになるにつれ、この悪玉の ROS を消去あるいは制御する薬剤が本疾患の治療に応用できるのではないかと考えられるようになり、実際いくつかもの

薬剤が臨床応用に向けて研究開発されてきた。現在、炎症性腸疾患の主要な治療薬となっている5-ASA製剤は、好中球やマクロファージの遊走・活性化因子であるLTB₄の生合成の抑制や、肥満細胞からのヒスタミン遊離抑制作用、血小板活性化因子(PAF)の生合成抑制作用、IL-1βの抑制作用に加え、好中球によるROSの産生を抑制することが報告されている。また、未だ研究段階ではあるものの、N-Acetyl-L-cysteine (NAC) やビタミンEなどの抗酸化剤を用いた検討が、数多くなされており、炎症性腸疾患モデルマウスに対し、有効な治療効果を示すことが数多く報告されている。

本観点から我々は、炎症性腸疾患に対する新規治療薬として、強力な抗酸化活性や抗炎症活性を有するC60フラレンに着目した。C60フラレンは、臨床で応用されている抗酸化剤(ビタミンE)の数倍もの抗酸化活性を有するのみならず、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、幅広い種類のROSに抗酸化活性を発揮する。また、他の抗酸化剤と比較して、ROS消去の持続性も高く、熱・光・pH安定性にも優れている。さらに、我々の共同研究者である増野らの報告によると、C60フラレンは、既存の抗酸化剤の致命的欠点である「プロオキシダント作用」を示さないことが明らかとなっている。プロオキシダント作用とは、抗酸化剤が逆にROSの生成を誘発する現象であり、抗酸化作用の減弱や抗酸化剤による副作用の発生に繋がると考えられている。従って、プロオキシダント作用を示さないC60フラレンは、他の抗酸化剤とは、一線を画す副作用の少ない優れた抗酸化剤となり得ると考えられる。

C60フラレンを、非侵襲性および汎用性の観点で最も優れた経口投与ナノ医薬として開発しようと考えた場合、克服すべき課題は、1) C60フラレンの水溶性や分散性、安定性を改善すること、2) 腸管送達・吸収効率を改善すること、3) 徐放化や標的指向化を含め、有効性と安全性を高

度に担保すること、4) 低価格化等、実用化・事業化への道筋を立てることなどとなる。このうち、1)の難溶性の克服と4)の超高純度フラレンの低価格化(純度>99.9%で数万円/gを実現)・大量生産系に関しては研究分担者などが既に確立している。また我々は、上記観点からは不十分ではあるものの、現状のC60フラレンでさえ、経口投与において炎症性腸疾患モデルマウスで既存薬よりも優れた有効性を発揮し得ることを明らかとし特許出願するなど、当該研究の基盤を既に有している(特願2011-231446)。

そこで本研究では、3年の研究期間内で、①抗ウイルス活性や抗菌活性、抗炎症活性(抗酸化活性)を損なうことなく、医用工学的にC60フラレンをDDS修飾する技術を開発し、その凝集性の改善、胃内安定性[酸抵抗性・加水分解抵抗性]の付与、腸管上皮細胞や腸管内炎症性細胞への送達性(到達性)やその後の吸収性(取り込み性)の向上などを達成すること、②我々の従来研究で未修飾C60フラレンの安全性は高度に担保されているものの、①で創出した新規剤形としてのDDS化C60フラレンの安全性評価(ハザード評価と曝露実態【動態】評価によるリスク評価)を新たに実施し、有効性と共に、安全性をも高度に保証すること、③市場調査や臨床試験の準備を当該研究期間に実施し、期間終了後、速やかに実用化・事業化できるロードマップを具現化することに焦点を絞るものである。

B. 研究方法

水酸化フラレンのDDS化

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのまま水に分散できるフラレン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化フラレンC₆₀(OH)₃₆ならびにC₆₀(OH)₄₄を開発している。これまでの予備的な研究で、これらの水酸化フラレンが潰瘍性大腸炎に対して抗炎症効果があると示唆される実験結果を得ている。そこで、腸管からの吸収を促進するような糖を水酸化フラ

ーレンに結合させた DDS 化水酸化フラーレンの合成を検討する。

β-カロテン退色法による抗酸化能評価

フラーレン誘導体の抗炎症能は、抗酸化能（ラジカル捕捉能）に由来する可能性が高いと考えられる。そこで、水酸化フラーレンの過酸化脂質ラジカルに対する抗酸化能について、これまでに確立している化学的手法を援用したβ-カロテン退色法を用いて評価を行う。水酸基の数、合成 lot の違いによるばらつき、加熱劣化による物性変化の3点に着目し、それぞれのサンプルについて抗酸化能を測定する。

プロリン誘導体の HPLC 分析

フラーレン誘導体の体内動態を追うことは、創薬において必須の課題である。しかしながら、異性体混合物である水酸化フラーレンでは、その分析の信頼性がいささか欠ける。そこで、水酸化フラーレンよりも明確に構造が確定しているプロリン誘導体を用い、定量分析が可能な方法を確立する。まずは最も簡便な HPLC 法による分析条件の確立を検討する。

リチウム内包水酸化フラーレンの合成

上述した、体内動態分析に簡便な HPLC 法は、検出感度にある程度の限界があると懸念される。また、異性体が存在する水酸化フラーレンのような誘導体についても体内動態を追跡できる手段を開発しておくことは重要である。そこで、微量高感度分析が可能な ICR-MS 分析を用い、リチウムイオンを高感度検出することによりこれを達成すべく、リチウムカチオンを内包した水酸化フラーレンの合成を検討する。

新規 58π 系フラーレンの合成

フラーレンの抗炎症能の作用機序を解明し、より効果の高いフラーレン誘導体をスクリーニングするために、修飾置換基の種々異なるフラーレン

誘導体を比較調査する必要がある。予備検討において、水酸化フラーレンとプロリン誘導体については、これら修飾方法の違いをみることはできたが、さらにこれらの検討を拡張する必要がある。まずは、比較的抗炎症効果の高かったプロリン誘導体は、その残されたパイ共役 (58π) の広がりによって由来するためとの仮説に基づき、種々の新規 58π 系フラーレン誘導体の開発について検討する。

グルコース化水酸化フラーレンの凝集挙動

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのまま水に分散できるフラーレン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化フラーレン C₆₀(OH)₃₆ ならびに C₆₀(OH)₄₄ を開発している。これまでの予備的な研究で、これらの水酸化フラーレンが潰瘍性大腸炎に対して抗炎症効果があると示唆される実験結果を得ている。そこで、腸管からの吸収を促進するような糖（グルコース）を水酸化フラーレンに結合させたグルコース化水酸化フラーレンの合成ならびに構造同定を行い、様々な溶媒条件における溶液中の凝集挙動について調べる。

プロリン誘導体の体内動態分析

フラーレン誘導体の体内動態を追うことは、創薬において必須の課題である。しかしながら、フラーレン誘導体は通常の有機化合物と比べ、その分析手段などに様々な制限がある。そこで、最も高い抗炎症効果を示したプロリン誘導体を用い、生体内組織からの定量分析が可能な方法を模索する。まずは生体内組織（肝臓および血液）に添加したプロリン誘導体の抽出方法の検討と昨年度分析条件を確立した HPLC による分析を行う。

位置選択的水酸化フラーレン合成

初期評価に用いて比較的良好な結果を与えた水酸化フラーレンの大きな問題点は、これらが異性体の混合物であるということである。一方、近年、異性体のない水酸化フラーレンの合成が 2 例ほ

ど報告されている。しかし、これらは水酸基数が 8 個または 6 個と少ないため、ナンドラッグとして応用するには水溶性に乏しい。そこで、置換基を改良することで同程度の導入置換基数でも水溶性を改善できるかどうか検討を行う。

新規水溶性ナノ物質創成検討

さらにより多くの水溶性フラレン誘導体候補を創出するため、リチウムイオン内包フラレンラジカルアニオン、ペリ共役トリアゾリウムフラレンについての合成を検討する。また、水酸化フラレンをモデル分子として用い、種々の水アルコール混合溶媒条件下における凝集挙動や、DDS 化への足掛かりとしてカーボンナノホーン内への水酸化フラレンの包摂挙動についても検討を行う。

ヒドロキシアルキルエーテル化フラレンの合成と溶解度測定

高い水溶性を有し、凝集せずに分子サイズのまま水に分散できるフラレン誘導体として、我々のグループではこれまでに水酸化フラレン $C_{60}(OH)_{36}$ を開発している。これまでに、この水溶性水酸化フラレンが潰瘍性大腸炎に対して抗炎症効果を示すという実験結果を得ている。また、昨年度の本研究において、腸管からの吸収を促進するように糖（グルコース）を水酸化フラレンに結合させたグルコース化水酸化フラレンを合成し、未修飾の誘導体よりも高い抗炎症効果が見られることを明らかにしている。

そこで今年度は、グルコースより簡便に導入でき、鎖長や末端官能基により溶解度を制御でき、より系統的な評価が可能なアルキルエーテル化水酸化フラレン、特に水溶性を維持させたヒドロキシアルキルエーテル化水酸化フラレン誘導体を合成し、その構造同定ならびに溶解度や抗炎症効果等の物性評価を行う。

リチウムイオン内包フラレンの反応性定量評

価と簡便水溶化の検討

これまでに我々は、 β -カロテン退色法によって様々なフラレン誘導体のラジカル種に対する反応性の評価を行ってきた。その結果、リノール酸ラジカルもしくはリノール酸過酸化ラジカルに対しては、フラレン誘導体の最低被占分子軌道(LUMO)のエネルギー準位が深くなるほど、反応性が向上することを明らかにしている。一般に、この LUMO 準位を深くする方法として、電子求引基を導入することが知られている。一方、最近開発された、フラレン炭素ケージの内部にリチウムカチオンを有する「リチウムイオン内包フラレン $[Li^+@C_{60}](PF_6^-)$ 」は、カチオンの強い電子求引効果により、さらに高い反応性を示すことが期待される。

そこで、本研究ではこのリチウムイオン内包フラレンの反応性を空の C_{60} と比べるため、同様に LUMO 準位によって反応性が決まるジエンとの Diels-Alder 反応をモデル反応として反応速度を求め、定量的に比較した。また、バイオ応用に強く求められる水溶化についても検討を行った。

金および白金ナノコロイドー水酸化フラレン複合体の創製

フラレンの高い抗酸化能は抗炎症能とも関連していると考えられている。同様な抗酸化剤として、白金ナノコロイドが知られている。これは、白金原子が直径数 nm に集合した金属クラスターであり、ナノサイズに分散させるためにポリビニルピロリドン (PVP) のような水溶性ポリマーなどで保護している。そこで、本研究では保護剤として PVP の代わりに親水性水酸化フラレンを用いて金、白金、銀などの金属ナノ粒子との複合体の形成を試み、ややタイプが異なる抗酸化能どうしの相乗効果が得られることを期待し、新しいナンドラッグ候補を目指す。

その他：新規フラレン誘導体の探索

昨年度までの本研究において、構造がきちんと同

定され、高い抗炎症能を示すフラレン誘導体として、プロリン型フラレンが開発されている。この誘導体の特徴として、水溶化を高めるための3つのカルボキシル基の存在に加え、フラレン骨格に直接結合した含窒素5員環構造が挙げられる。そこで、これまでに最も抗炎症能の高いプロリン型フラレンのより広範な構造類似体スクリーニングを目的に、以下の2つの新規な含窒素環状フラレン誘導体合成の検討を行った。

(1) ジエナミンとフラレンとの熱的電子移動経路[2+3]環化付加反応を行ったところ、従来の1,3-双極子環化付加とは異なる官能基化法で、含窒素5員環を有するプロリン型フラレン類似化合物の合成に成功した。

(2) ベンジル基が置換したアザフレロイドを出発化合物とし、酸触媒存在下、分子内骨格転位反応を行ったところ、含窒素6員環を有する新規プロリン型フラレン類似化合物の合成に成功した。

プロリン型誘導体 7 の合成

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。

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 塩酸を加え反応を止めた。析出した固体を吸引濾過により濾取した。

プロリン型誘導体 8 の合成

Diethyl (*N*-ethoxycarbonylmethyl) aminomalonnate (**8a**) の合成

二頸ナスフラスコにブロモ酢酸エチル 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 μL (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°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。シリカゲルクロマトグラフィー (*n*-ヘキサン : 酢酸エチル = 100 : 1 → 10 : 1 → 3 : 2 → 1 : 1 → 酢酸エチル) により精製した。

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°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°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。

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℃で加熱攪拌を行い、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。

プロリン型誘導体 9 の合成

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-オキソグルタル酸ジエチル (338 μ L, 1.9 mmol, 5.0 当量) を加えて 200 °C で 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、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 → トルエン : 酢酸エチル = 50 : 1) により精製した。

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℃で加熱攪拌を行い、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。

プロリン型誘導体 10 の合成

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 日間攪拌した。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 時間攪拌した。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 → 1 : 1) により精製した。

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℃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。

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 mg, 467 μ mol, 1.6 当量)、**10b** 1.0 g を加え、145℃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。

10 の合成

10c (150 mg, 147 μ mol) 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 mmol, 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℃で 1 時間減圧乾燥した。

プロリン型誘導体 11 の合成

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。

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 mmol, 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。

プロリン型誘導体 12 の合成

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。

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。

プロリン型誘導体 13 の合成

13a の合成

C₆₀ (400 mg, 0.556 mmol) を CS₂ (210 mL) に溶解させ、アミノマロン酸ジエチル塩酸塩 (150 mg, 0.709 mmol, 1.25 当量)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC により反応を追跡し、3 時間後に攪拌を止めた。精製水で 2 回、飽和食塩水で 1 回洗い無水硫酸ナトリウムで乾燥させた後、溶媒を減圧留去した。得られた固体をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン → トルエン : 酢酸エチル = 20 : 1) により精製した。

13 の合成

13a (116 mg, 0.124 mmol) をトルエン (80 mL) に溶解させ、NaH (400 mg, 66 当量) を加えた。室温で攪拌し 1 時間後にメタノール (2 mL) を加えて反応を止めた。1M-塩酸を水層が酸性になるまで加えて、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。精製水 → トルエン → *n*-ヘキサンの順に洗浄した。室温で真空乾燥をした。

プロリン型誘導体 14 の合成

14a の合成

C₆₀ (400 mg, 556 μmol) を CS₂ (50 mL) に

溶解させ、グリシン *tert*-ブチル塩酸塩 (186 mg, 1.11 mmol, 2.0 当量)、トリエチルアミン (5 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC で反応を追跡し、18 時間後に反応を止めた。1M 塩酸→飽和食塩水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、溶媒を減圧留去した。得られた固体をアセトンに懸濁し吸引濾過をすることで副生成物を取り除いた。濾取した茶色固体を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 = 50 : 1) により精製した。

14b の合成

14a (30 mg, 0.034 mmol) を CS₂/THF (25 mL/5 mL) に溶解させ、精製水(5.0 mL)を加えて室温で攪拌し、24 時間後に反応を止めた。シリカゲルカラムクロマトグラフィー(トルエン : 酢酸エチル = 20 : 1)により精製した。

14 の合成

14b (19 mg, 0.022 mmol) をジクロロメタン (10 mL) に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸(33 mg, 0.22 mmol, 10 当量) を加えて 0°C で攪拌した。10 分後に精製水を加えて反応を止め、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。NaHCO₃ 水溶液と精製水とトルエンで洗浄した。室温で真空乾燥をした。

プロリン型誘導体 15 の合成

15b の合成

14a (28.7 mg, 0.0321 mmol) を CS₂ (10 mL) に溶解させ、ブromo酢酸 *tert*-ブチル (25.0 mg, 0.128 mmol, 4.0 当量)、トリエチルアミン (0.2 mL) を加えて室温で攪拌した。TLC で反応を追跡し、20 分後に攪拌を止めて溶媒を減圧留去し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (トルエン) で精製した。

15 の合成

15b (30 mg, 0.030 mmol) を CH₂Cl₂ (3.0

mL) に溶解させ、トリフルオロメタンスルホン酸 (89 mg, 0.60 mmol, 10 当量) を加えた。0°C で攪拌し、10 分後に精製水を加えて反応を止め、生じた茶褐色析出物を吸引濾過により得た。精製水と *n*-ヘキサンで洗った。室温で真空乾燥をした。

高純度プロリン型誘導体 3-*trans* の合成

tert-Butyl glyoxylate の合成

L-(+)-酒石酸ジ-*tert*-ブチル(0.720 mmol, 189 mg) とヨードベンゼンジアセテート (1.04 mmol, 1.4 当量, 223 mg) をジクロロメタン (9.0 mL) に溶解した。室温で 75 分攪拌後、減圧留去することで、酢酸臭を発するオイルを得た。オイルをヘキサンに懸濁、吸引濾過し、白色固体を取り除いた。母液から溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物 320 mg について中圧分取液体クロマトグラムシステム (EPCLC-AI-580S, 山善株式会社, 自動カラム) (ヘキサン:酢酸エチル = 72:28→51:49 <グラジエント>) で精製した。

3a の合成

C₆₀ (0.920 mmol, 665 mg) をトルエン (665 mL) に溶解した。イミノ二酢酸ジ *tert*-ブチル (1.82 mmol, 2.0 当量, 448 mg) と **10-1** で合成したグリオキシル酸 *tert*-ブチル (1.82 mmol, 2.0 当量, 237 mg) を秤量しトルエンで洗いこみながら C₆₀ のトルエン溶液に加え、還流攪拌した。3 時間後、反応液の色が濃紫色から茶褐色に変化し、さらに、19 時間後に反応を停止した。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した。溶媒を減圧留去後、得られた粗生成物についてシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル粒子径 63~200 μm, トルエン 100 %) で *trans* 体と *trans* 体/*cis* 体混合物を得た。さらに、混合物に関しては、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィー(フラッシュクロマトグラフィー用シリカゲル 40~50 μm, トルエン 100 %) で精製した。

3-trans の合成

化合物 **3a-trans** (0.40 mmol, 431.3 mg) を脱水トルエン 76 mL に溶解し、室温で攪拌しながらトリフルオロメタンスルホン酸 126 mL (215 mg, 1.2 当量, 1.43 mmol) を滴下したところ、速やかに茶褐色固体が析出した。塩化カルシウム管を装着してそのまま 10 分攪拌したところで、水 1 mL を加えて反応を停止した。析出した固体を吸引濾過し、水、メタノール、トルエン、メタノール、水の順で洗浄した。

3-trans の純度確認

合成した **3-trans** を 0.1 %TFA-DMF に溶解し HPLC によって分析した。HPLC の測定条件を以下に示す。カラムは Buckyprep-M (4.6 mm f-250 mm)を用いた。Buckyprep-M はフラーレンとその誘導体を効率良く分離するために開発されたカラムであり、充填剤としてフェノチアジール基で修飾されたシリカゲルが使われている。

HPLC : Agilent 1200 シリーズ
カラム : Buckyprep-M (4.6 f-250 mm)
カラム温度 : 40 °C
移動相 :
A = 40 % 0.1%TFA in MeOH
B = 60 % 0.1%TFA in DMF

カラム流量 : 1.0 mL/min
サンプル注入量 : 30 mL
測定サイクル : 30 min
UV 条件 (検出波長) : 310 nm

[¹⁴C]プロリン型誘導体 3-trans の合成

[¹⁴C]3a-trans の合成

[¹⁴C]C₆₀ 10 mg (14 mmol) を MS 4A で脱水したトルエン 7.5 mL に溶解し、イミノニ酢酸ジ tert-ブチル 7 mg (30 mmol, 2.1 当量)、グリオキシル酸 tert-ブチル 5 mg (37 mmol, 2.7 当量)の各トルエン溶液 1.4 mL を加え (溶液量 10.3 mL)、高温 (>110°C) の油浴上で還流攪拌を始めた。反応液の色は反応開始から 5 分程度で濃紫色から茶褐色に変化した。10 分経過後、TLC (トルエン : 酢酸エチル = 10:1) にて [¹⁴C]3a-trans の生成を確認した後、溶媒を減圧

留去した。得られた粗生成物 20 mg について、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (エアープンプ, 30-40 mm, 15 g, トルエン 100%) にて精製し、[¹⁴C]C₆₀、[¹⁴C]3a-trans 4 mg、[¹⁴C]3a-cis を得た。

[¹⁴C]3-trans の合成

[¹⁴C]3a-trans 4 mg (3.2 mmol) を脱水トルエン約 2 mL に溶解して試験管に移し、攪拌しながらトリフルオロメタンスルホン酸 10 mL (13 mg, 89 mmol, 9.1 当量) を滴下した。速やかに茶褐色固体が析出したが攪拌を続けた。10 分後、遠心分離 (2000 rpm, 3 min) して上清を除いた。次にトルエンを 2 mL 加えて超音波照射して懸濁した後、再度遠心分離して上清を除いた。次いで水 2 mL を加えたところ水 2 mL を加えて超音波照射し、遠心分離後に上清を除く操作を 3 回繰り返した。最後に得られた茶褐色沈殿について、濃縮装置で水を留去した。

プロリン型誘導体 3-trans の薬物代謝研究

プロリン型誘導体 3-trans のシトクロム P450 化学モデル系による反応

3-trans の DMF 溶液 (1.0 mM)、tetrakis(2,6-difluorophenyl)porphyratoiron (触媒 : Fe(III)TDFPPCI)の CH₂Cl₂ 溶液 (0.01 mM)、mCPBA(酸化剤)の CH₂Cl₂ 溶液 (2.0 mM) を加え、室温で 1 時間攪拌した。N₂ フラッシュで乾固した後、0.1 %TFA-DMF を 0.1 mL 加え LC-MS 測定(negative モード、SCAN および SIM)を行った。SIM 測定においては、未変化体 *m/z* 908 ([M-H]⁻)およびエポキシ体、ジエポキシ体を予想し、それぞれ *m/z* 924 ([908+O]⁻)、940 ([908+2O]⁻) をイオンとして選択した。HPLC 条件は **10-4** と同様に行った。Complete サンプルの他に、control サンプルとして、触媒 (-)および酸化剤 (-)の LC-MS 測定も行った。

プロリン型誘導体 3-trans の肝ミクロソームに

よる反応

ラット、マウス及びヒト肝ミクロソーム (XENOTECH, 1.0 mg protein/mL) にそれぞれ **3-trans** の DMSO 溶液 (0.1 mM)、G6P (10 mM)、G6PDH (1.0 unit/ mL)、MgCl₂ (3.0 mM)、NADP (1.0 mM) を含む 0.1 M K-Pi buffer (pH 7.4) 0.5 mL を加え 37 °C で 3 時間インキュベーションした。その後、酢酸エチル 2.0 mL、1 M 塩酸を 100 mL 加え 1 分間振盪し、遠心分離 (4°C、10000 rpm、10 min) し、上清を回収した。酢酸エチルでの抽出操作を 3 回行った後、N₂ フラッシュで乾固させ、0.1 % TFA-DMF を 0.1 mL 加え、LC-MS 測定を行った。LC-MS 条件は **12-1** と同様に行った。

C60-P の合成および分析

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、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) 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/CH₃CN=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 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。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。

エステル体(1)→C60-P 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 C60-P を得た¹⁾。

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

C60-P 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

C60-P の高純度合成

tert-Butyl glyoxylate の合成

100mL 3 つ口フラスコに Di-tert-butyl tartrate (1.0 g)、Iodobenzene diacetate (1.5g)、ジクロロメタン (50 mL) を入れ、室温で 2 時間攪拌した。反応後、エバポレーターにより溶媒を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィ(展開溶媒:ヘキサン/酢酸エチル=2/1)によって分離精製を行った。展開溶媒を除去し、目的物 tert-Butyl glyoxylate を収量 0.66g、収率 66% で得た。

ブチル体の合成

500mL 三つ口フラスコに Fullerene C₆₀ SUH (600 mg)、tert-Butyl glyoxylate (324 mg)、Di-tert-Butyl imminodiacetate (270 mg)、クロロベンゼン (300 mL) を入れ、90°C 3 時間の条件で加熱攪拌した。反応後、エバポレーターにより溶媒を除去し、シリカゲルフラッシュカラムクロマトグラフィ(展開溶媒:ヘキサン/トルエン=10/1)によって分離精製を行った。展開溶媒を除去後、真空乾燥し、目的物ブチル体(1)を収量 449mg、収率 50% で得た。

ブチル体(1)→C60-P の合成

100mL 3 つ口フラスコにブチル体(1) (215mg)、Trifluoromethanesulfoonic acid (300 mg)、クロロベンゼン 40mL を入れ、室温で 5 時間攪拌した。沈殿が生成したことを確認し反応を止め、沈殿物をろ別した。ろ別した沈殿物をトルエン、エーテルで洗浄した後、真空乾燥し、目的物 C60-P を収量 160mg、収率 88% で得た。

C60-P の分析

C60-P の LC-MS 分析は 1-1-2 に記載した分析方法に従って行った。

フラレーン誘導体の抗酸化能評価

DPPH ラジカル消去作用

【溶液調製】

ES Buf. (pH5.5) : MES (5g) に、水を約 200mL 加え、KOH を用いて pH5.5 に調整後、水で 250 mL にメスアップした。

0.5mM DPPH in EtOH : DPPH (4mg) を EtOH (20 mL) に溶解した。

MES Buf. (pH5.5):EtOH:DPPH = 1:1:0.5 で混合し、DPPH working Sol. とした。

【反応液調製・測定】

96 穴マイクロプレートに、測定サンプル(10 μL) および DPPH Working Sol. (190 μL) を添加し、30 分後に 524 nm における吸光度を測定した。

DPPH・消去作用は、以下の式を用いて算出した。

$$\text{DPPH} \cdot \text{除去率}(\%) = \frac{A_{0\text{DPPH}} - A_{\text{sample}}}{A_{0\text{DPPH}}} \times 100$$

50% 阻害濃度を挟む 2 点を用いた回帰式から、DPPH・を 50% 消去する濃度(IC₅₀)を算出した。

O₂⁻ラジカル消去作用

【溶液調製】

WST working Sol. : WST solution (1 ml) を Buffer solution (19 ml) で希釈した。

Enzyme working Sol. : Enzyme solution をピペティング操作で、均一な懸濁液とした後、15 μL を取り、Dilution buffer (2.5 ml) を用いて希釈した。

Sample Sol. : サンプル溶液を Dilution buffer あるいは DMSO で希釈した (DMSO は、妨害物質となりうるため、5% 以下になるように調整)。

【反応液調製・測定】 (表 1 参照)

- 1) 96 穴マイクロプレートにサンプル溶液 (sample, blank 2) もしくは純水 (blank 1, blank 3) を 20 μL ずつ添加した。
- 2) 各ウェルに WST working Sol. を 200 μL ずつ加え、プレートミキサーでよく混合した。
- 3) blank 2 と blank 3 のウェルに Dilution buffer を 20 μL ずつ添加した。

- 4) サンプル溶液を入れたウェルと blank 1 のウェルに Enzyme working Sol. を 20 μL ずつ加えた(Enzyme working Sol.を加えるとすぐにスーパーオキシドの発生開始)。
- 5) 37°Cで 20 分間インキュベートした。
- 6) プレートリーダーを用いて、450 nm における吸光度を測定した。
- 7) SOD 活性値(阻害率%) は、下記の計算式により求め、IC₅₀を算出した。

$$\text{SOD 活性値(Formazan 生成阻害率 \%)} = \frac{[(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}}) - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank2}})]}{(A_{\text{blank1}} - A_{\text{blank3}})} \times 100$$

ESR による OH ラジカル消去作用

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²⁾。

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、ポ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⁺} : MnO 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-・OH 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、機能的化粧品素材開発のための実験プロトコル集

ESR による LOO ラジカル消去作用

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。

溶液調製：①Methemoglobin (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：①MetHb (45 μL)、②DTPA (45 μL)、DMSO/精製水※ (25 μL)、測定試料 (25 μL)、④DMPO (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 μ L)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 μ L)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 \cdot 消去作用は、DMPO-LOO \cdot アダクト生成の競合阻害率 (Inh%) として、以下の式を用いて算出した。

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

($S.I_{\text{sample}}$: カップル添加時のシグナル強度, $S.I_{\text{ref}}$: カップル無添加時のシグナル強度, $S.I_{\text{Mn}^{2+}}$: マンガー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 \cdot アダクトの生成を 50%阻害する濃度(IC₅₀)を算出した。

全合成法による¹⁴C₆₀合成方法の検討

アーク放電チャンバーを用いた¹⁴C₆₀の合成³⁾は、以下のような問題点があるため、継続的に管理区域で合成することが難しい。

- ・¹⁴C₆₀の生成効率が低い(約 1%)
- ・比放射能の制御は困難
- ・副生成物の放射性煤による汚染の危険性

上記問題点を解決するため、Otero らの C₆₀ 合成法⁴⁾に着目し、全合成により¹⁴C₆₀の合成を試みることとした。この方法により¹⁴C₆₀を合成することができれば、以下のような利点がある。

- ・比放射能を従来法の約 10 倍に向上 (C₆₀ 1 分子に対して、3 個の ¹⁴C を導入)
- ・比放射能の制御が可能
- ・放射能汚染や被爆の危険性が少ない

参考文献で記載されていた出発物質である

Truxene (C₆₀H₃₀) の RI 原料が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¹⁴C₃¹²C₅₇を合成することとした(図 1)。
Truxene 合成 : Truxene の生成収率を向上させるため、反応温度および加熱時間を検討した。その結果、160°C で 3h 加熱することにより、最も高い収率であったことから、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°C, 30min → 160°C, 3h)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 カルボキシ基の脱水反応)。

中間体 I (C₆₀H₃₉Br₃) 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°C → -10°C, 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°C, 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行った。

中間体 II (C₆₀H₃₀) 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°C, 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、ろ過した後固体を水+アセトンで洗浄し、カラムを用いて精製した。

[¹⁴C₃]¹²C₅₇ (= [¹⁴C]C₆₀) 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し (図 1 下)、高真空下で加熱 (10⁻⁴ mBar, 427°C, 20min) した後冷却した。

分析：先行文献⁴⁾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の生成を確認することとした。また収量・収率は、放射活性の値から算出した。

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

⁴⁾ Otero G. et al., Nature, 454: 865-869, 2008.

試薬

未修飾 C60 フラーレンはビタミン C60 バイオリサーチ株式会社より供与して頂いた。また、本検討では水酸基数の異なる 4 種の水酸化 C60 フラーレン (C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄) を用いた。C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄ は FLOX 株式会社 (Kanagawa, Japan) から供与して頂いた。C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄ は大阪大学大学院工学研究科の大島巧先生、小久保研先生より供与して頂いた。プロリン類似骨格を持つ、プロリン型 C60 フラーレン (C60-P) は FLOX 株式会社より購入した。プロリン類似の骨格を持つ、4 種類の置換様式の異なる C60-P は、慶應義塾大学薬学部の増野匡彦先生および、FLOX 株式会社

より供与して頂いた。本検討では、各 C60 フラーレンの DMSO 分散液を使用直前に ULTRASONIC 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。なお、以下の全ての操作において、C60 フラーレンを溶媒で希釈する際には、一度に希釈すると凝集するため、徐々に希釈した。具体的には、溶媒に C60 フラーレン DMSO 懸濁液を 1:1 の液量で加えたのちに、30 秒以上の超音波処理または 5 秒間 3 回ボルテックスミキサーにて攪拌する希釈操作を 3 回以上行い、段階的に希釈を行った。

粒径分布およびゼータ電位の測定

各水酸化 C60 フラーレン粒子を超純水で 0.25 mg/mL に調整した。C60 フラーレンおよび C60-P の DMSO 分散液を再度 5 分間超音波処理し、1 分間攪拌した後に生理食塩水で徐々に希釈し、in vivo における投与試薬濃度帯を含む 6.8 ~440 μM に調製した。Size & Zeta キャピラリーセル (Malvern Instruments, UK) に 1 mL 注入し、Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments) を用いて粒径分布ならびにゼータ電位を測定した。

細胞

ヒト腸管上皮細胞株である Caco-2 細胞、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞、ヒト肺胞基底上皮がん細胞株である A549 細胞は、American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) より購入した。Caco-2 細胞は 10%ウシ胎仔血清 (FBS)、1%非必須アミノ酸 (NEAA) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (D-MEM、和光純薬工業株式会社; Osaka, Japan)を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。

活性酸素種 (ROS) 消去活性評価

細胞内 ROS 量は蛍光プローブである 2', 7'

-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA; Cell Biolabs In, USA) を用いて測定した。DCFH-DA は、細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し、非蛍光型 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)に変化する。さらに ROS により素早く酸化され、強く蛍光する 2', 7'-Dichlorodihydrofluorescein (DCF)に変化する。1.5×10⁴ cells となるように 96 穴プレートに予め播種しておいた Caco-2 細胞に対して、培地を除去し、DCFH-DA (20 μM) を含有した phenol red free の D-MEM を添加し、37°C で 30 分間培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回洗浄し、各濃度に希釈した各種水酸化フラレーン (C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄) 及び NAC (Sigma-Aldrich; MO, USA) を 50 μL/well 加えた。30 分後、D-MEM で 125 ng/mL に調整した IL-1β を 50 μL/well 加えた。24 時間後、励起波長 485 nm、蛍光波長 530 nm の蛍光量を測定した。

ELISA による IL-8 産生量の測定

96 穴プレートに 1.5×10⁴ cells/100 μL/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、各種 C60 フラレーンを 10% FBS、1% NEAA 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、50 μL/well ずつ加えた。30 分後、D-MEM で 10 ng/mL に調整した TNF-α、または、125 ng/mL に調整した IL-1β を 50 μL/well 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-8 量を BD OptEIA ELISA kit のプロトコールに準じて測定した。

ELISA による IL-6 産生量の測定

96 穴プレートに 1.5×10⁴ cells/100 μL/well で RAW264.7 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、各種 C60 フラレーンを 10% FBS 含有 D-MEM で各濃度に希釈し、50 μL/well ずつ加えた。30 分後、D-MEM

で 1 μg/ml に調製した LPS を 50 μL/well 加えた。24 時間後、培養上清中の IL-6 量を BD OptEIA ELISA kit のプロトコールに準じて測定した。

ウェスタンブロットによる MAPK 及び IκB における C60-P の影響評価

6 well プレートに 4.5×10⁵ cells/3 ml/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、終濃度 100 μmol/L となるように培地で希釈した C60-P を 1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調製した IL-1β を 1.5 ml で添加した。0、5、10、20、30、60、120 分後の細胞を cold phosphate buffered saline (PBS) で洗浄し、1 well あたり 200 μL の HaltTM Protease Inhibitor Cocktail Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) を添加した M-PER[®] Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific K.K.) で可溶化し、タンパク質を回収した。試料は BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific K.K.) のプロトコールに従い、タンパク量を測定した。総タンパク量が 2 μg になるように各試料を取り、5% 2-mercaptoethanol (2-ME; GIBCO) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) した。電気泳動後のゲルを PolyVinylidene DiFluoride (PVDF 膜) (GE Healthcare) に転写し、1% Bovine Serum Albumin (BSA)/PBST (0.05% Tween 20 を含む Phosphate buffered saline) を添加してブロッキングした。1% BSA/PBST で 1,000 倍希釈した一次抗体 (anti-β-actin のみ 10,000 倍希釈) を添加し、緩やかに振とうさせながら 4°C で一晩反応させた。PBST で洗浄後、1% BSA/PBST で 2,000 倍希釈した HRP/anti-rabbit IgG、50,000 倍希釈した HRP/anti-mouse IgG を添

加し、振とうさせながら室温で1時間反応させた。PBSTで洗浄後、PVDF膜をSuperSignal West Femto Maximum Sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific K.K.)で処理し、発光像をLAS-3000(富士フィルム)により撮影した。

リアルタイム PCR による C60-P が IL-8 の mRNA 産生に与える影響評価

6 well プレートに 4.5×10^5 cells/3 ml/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5 %CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、終濃度 100 μ mol/L となるように C60-P を培地で希釈し、1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調整した IL-1 β を 1.5 ml で添加した。2、6、12、24 時間後、RNeasy min Plus kit(QIAGEN)のプロトコールに準じて total RNA を抽出し、High Capacity RNA-to-cDNA kit (Life technologies)により cDNA に逆転写した。得られた cDNA をテンプレートに TaqMan Probe (Human IL-8: Hs00174103_m1、Human GAPDH:Hs03929097_g1) と TaqMan Fast Advanced Master Mix (Life technologies)により反応溶液を調整し、StepOne Plus real-time PCR system (Life technologies)を用いてリアルタイム PCR を行った。各試薬添加群の IL-8 発現量の比較は、各時間の IL-8 発現量を各時間の GAPDH 量で補正した後、コントロールとして用いた IL-1 β 非添加群で除すことで解析した。また、eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って各時間の培養上清中の IL-8 を測定した。

C60-P による IL-8 の細胞内蓄積性への影響評価

96well プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5 %CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、終濃度 100 μ mol/L となる C60-P と終濃度 1mg/ml となる Brefelzin A (Sigma-Aldrich)を培地で希釈

し、50 μ L/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml になるように培地で調整した IL-1 β を 50 μ L/well で添加した。24 時間後、培養上清を回収、M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagen で細胞を可溶化し、細胞内タンパク質を回収した。それぞれ回収した試料を eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って培養上清中と細胞内中の IL-8 を測定した。

C60-P による MCP-1、COX-2、BD-2 産生の影響評価

< Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)>

96 well プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ l/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5 %CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、終濃度 25、50、100 μ mol/L となる C60-P を培地で希釈し、50 μ L/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125ng/ml になるように培地で調整した IL-1 β を 50 μ L/well で添加した。24 時間後、培養上清を回収し、eBioscience ELISA Kit のプロトコールに従って培養上清中の MCP-1 を測定した。

<Cyclooxygenase-2(COX-2)>

6 well プレートに 4.5×10^5 cells/3 ml/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5 %CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、終濃度 100 μ mol/L となる C60-P を培地で希釈し、1.5 mL/well で添加した。その 30 分後、D-MEM で終濃度 125 ng/ml に調整した IL-1 β を 1.5 ml で添加した。24 時間後、M-PER® Mammalian Protein Extraction Reagen で細胞を可溶化し、細胞内タンパク質を回収し、R&D systems ELISA Kit のプロトコールに細胞内溶解液中 COX-2 従って測定した。

<Beta-defensin-2(BD-2)>

6 well プレートに 4.5×10^5 cells/3 ml/well で Caco-2 細胞を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した後、終濃度 25、