

50、100 $\mu\text{mol/L}$ 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、培養上清を回収した。培養上清中のBD-2はPeprotech ELISA Kitのプロトコールに従って測定した。

LDH アッセイによる細胞傷害性評価

96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μL /wellでCaco-2細胞またはRAW264.7細胞を播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 、飽和蒸気圧、5% CO_2 条件下で24時間培養した後、各種C60-P、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$ 、C60フラレンおよび、NACを10% FBS、1% NEAA含有D-MEMで各濃度に希釈し、100 μl /wellずつ加えた。24時間後、培養上清中のLDH活性を指標として、LDH-Cytotoxic Test (Wako)のプロトコールに準じて、細胞傷害性を評価した。

実験動物

6-8週齢のC57BL/6 NCrマウス(雌性)は、日本エスエルシー(Kyoto, Japan)より購入した。また、本研究における動物実験の飼育および実験は医薬基盤研究所の実験動物施設において行い、医薬基盤研究所・大阪大学動物実験規定に準じた。

水酸化C60フラレンの一週間連続経口投与

$\text{C}_{60}(\text{OH})_{36}$ と $\text{C}_{60}(\text{OH})_{44}$ を超純水で希釈し、分散液を調整した。水酸化C60フラレン分散液を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。C57BL/6マウスに375 μM に調製した水酸化C60フラレン分散液をそれぞれ500 μL ずつ一週間連続で強制経口投与し、最終投与量を187.5 nmol/dayとした。投与期間中、毎日体重を測定した。

血液回収

最終投与から24時間後、マウスに64.8 mg/mL

のペントバルビタール(ソムノペンチル; Schering-plough Animal Health, Netherlands)を50 μL 腹腔内投与することにより麻酔をした後、心臓より採血を行った。採血は、5 IU/mLのヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。この溶液を全血として血球検査に用い、残りを1750 g、15分間、遠心分離して血漿を回収した。

血液生化学試験

血漿中のアラニントランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、血中尿素窒素(BUN)を比色法にて測定した。ALTおよびAST活性は、それぞれの基質であるL-アラニンおよびL-アスパラギン酸と α -ケトグルタル酸のアミノ基転移反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。BUNはウレアーゼの作用により生成したアンモニアとプロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。測定には、生化学分析装置FUJI DRI-CHEM 7000 (FUJIFILM; Tokyo, Japan)を用いた。

血球検査

水酸化C60フラレンを投与したマウスから採取した全血を多項目自動血球計測装置VetScan HM2 (Abaxis, Union City, CA)を用いて、赤血球数、総白血球数、リンパ球数、顆粒球数、単球数、血小板数を電気抵抗法により測定した。

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 C₆₀-P 経口投与は直腸投与直前に行った)。

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)。C₆₀-P 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。

C₆₀-P 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、C₆₀-P 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。各溶媒中のフラレーン

を観察し、肉眼にてそれぞれの溶媒でフラレー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。検出したフラレーンのピーク面積を用いて検量線を作製した。

クロロホルムを用いた C₆₀-P 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、C₆₀-P の有機層への移行を確認した。

THF を用いた C₆₀-P 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、そこに飽和食塩水を 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。

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レーンを加え、さらに THF にて 500 μ L に定容し、HPLC にて分析した。

血液中からのプロリン型フラレーンの抽出

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レーンを 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。

THF・飽和食塩水での抽出条件の検討

血液 500 μ L に DMSO にて 100 μ g/mL に調製し

たプロリン型フラレンを 100 μ L 加え、飽和食塩水、少量の塩酸を加え、pH 試験を用いて溶液が酸性になっていることを確認した。そこへ THF を加え超音波処理を行った。これに少量のメタノール、又はアセトニトリ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 500 μ L に定容した後に HPLC にて分析した。

血中フラレン抽出物を用いた検量線の作製

血液 500 μ L に DMSO にて溶解したプロリン型フラレンを加え、飽和食塩水、少量の塩酸、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。

マウスへの免疫方法

ニワトリ卵白アルブミン (OVA ; Ovalbumin) は Sigma-Aldrich (MO, USA) から購入した。マウスへの腹腔内投与は、週 1 回、3 週間行った。投与溶液はすべて生理食塩水で希釈し、OVA を単独 (10 μ g/mouse)、あるいは OVA と C60 フラレンの混合溶液として 200 μ L を腹腔内投与した。投与には 27G-3/4 注射針 (TERUMO CORP.; Tokyo, Japan) を用いた。マウスへの C60 フラレン経口投与は、1、3、4 週目に週 5 回、計 15 回行った。C60 フラレンは超純水で希釈し、テフロン製フレキシブル経口ゾンデ (夏目製作所; Tokyo, Japan) を用いて 200 μ L 経口投与した。1、3、4 週目の 3 日目には、生理食塩水で希釈した OVA (10 μ g/mouse) 200 μ L を腹腔内投与した。マウスへのコレラトキシン (CT ; Cholera Toxin) アジュバントを用いた OVA 経口投与は、週 1 回、3 回行った。CT は List Biological laboratories (California, USA) から購入した。OVA (1 mg/mouse) と C60 フラレンおよび CT (10 μ g/mouse) の混合液は超純水で希釈し、上述のゾンデを用いて 200 μ L 経口投与した。

マウスからの採血方法

最終免疫から 7 日後、ペントバルビタールによる麻酔下において、マウスの心臓より採血を行った。採血は、終濃度で 15-20 U/mL となるようヘパリンをあらかじめ含ませたシリンジおよび 26G-1/2 注射針 (TERUMO CORP.) を用いて行った。さらに 3000xG、15 分間の遠心分離後、血漿を回収した。得られた血漿は -80°C で凍結して保存し、各実験に供した。

脾細胞の調製方法

最終免疫から 7 日後のマウスから脾臓を無菌的に摘出した後、70 μ m セルストレイナー (BD Biosciences; San Diego, USA) 上で細胞を分散させ、1500 rpm、10 分、4°C の条件で遠心することで、脾細胞を回収した。細胞の回収には、56°C、30 分間の非働化処理を行った 10 % fetal bovine serum (FBS)、1 % antibiotics (Anti-Anti; Invitrogen, Carlsbad, CA)、50 μ M 2-Mercaptoethanol (2-ME; GIBCO, Japan)、1 \times MEM Non-Essential Amino Acids (GIBCO)、0.2 mM L-グルタミンを含む Roswell Park Memorial Institut (RPMI) 1640 培養液 (Wako, Osaka, Japan) を用いた。回収した脾細胞は 155 mM NH₄Cl (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) / 10 mM KHCO₃ (Nacalai Tesque) / 100 μ M EDTA \cdot 2Na \cdot 2H₂O (Nacalai Tesque) 溶液で懸濁することで赤血球を除去した。

脾細胞の抗原再刺激方法

上述の方法で調製した脾細胞は、上述の RPMI 培養液で懸濁し、96 well round bottom assay plate (Nunc.; USA) に 1×10^6 cells/well で播種し、100 μ g/mL の OVA の存在下、37°C、5 % CO₂ 条件下で 3 日間培養した。1500 rpm、5 分間遠心分離して回収した培養上清は、-80°C で凍結し、各実験に供した。

OVA 特異的抗体価・サイトカインの測定方法

<血中 OVA 特異的 IgG、IgG1、IgG2c の測定>

10 µg/mL OVA (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp, eBioscience; San Diego, CA, USA) に添加し、4°Cで一晩静置し固相化した。PBS で 2 %に調製したブロックエース (DS Pharma Biomedical; Osaka, Japan) で室温にて 2 時間反応させることでブロッキングし、その後、ブロックエースにて各濃度に調製したサンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4°Cで一晩反応させた。これらのプレートを 0.05 % Tween 含有 PBS で洗浄後、ブロックエースにて 5000 倍希釈した Horse Radish Peroxidase (HRP) 標識抗マウス IgG 抗体、HRP 標識抗マウス IgG1 抗体、HRP 標識抗マウス IgG2c 抗体 (すべて Southern Biotechnology Associates; Birmingham, AL, USA) を加え、室温にて 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行った後、TMB (TMBE, MOSS, Inc.; Pasadena, MD, USA) 基質液を 100 µL 添加し発色させた。2N H₂SO₄ を 50 µL 添加することにより発色反応を停止させ、測定波長 450 nm、対照波長 620 nm における吸光度を測定した。

<血中 OVA 特異的 IgM の測定>

2 µg/mL mouse IgM (BD Pharmingen; San Diego, CA, USA) (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp)に添加し、4°Cで一晩放置し固相化した。上述の方法でブロッキング・洗浄を行ったのちブロックエースにて各濃度に調製したサンプルを添加し室温で 1 時間反応させた。洗浄操作を行ったのち、ブロックエースにて 5 µg/mL に調製した Biotin 標識 OVA を添加し室温で 2 時間反応させた。再度洗浄を行い、上述の方法で発色させ吸光度を測定した。

<血中 OVA 特異的 IgE の測定>

DS マウス IgE ELISA (OVA) キット (DS pharma biomedical; Osaka, Japan) を用い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

<脾臓細胞培養上清中 IL-4、IL-5、IL-13 の測定>

ELISA Ready-Set-Go![®]キット (affimetrix; San Diego, USA) を用い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

<脾臓細胞培養上清中 IFN-γの測定>

BD OptEIA™ ELISA キット (BD Pharmingen) を用い、キットの使用 방법에準じて測定を行った。

MLR (混合リンパ球反応)

未処置の BALB/c マウスの脾臓細胞 (応答細胞) および、未処置の C57BL/6 マウスの脾臓細胞 (刺激細胞) を用いた。細胞回収方法は前述の脾臓細胞の調製方法に準じた。刺激細胞には、細胞増殖を停止させるためにマイトマイシン C (和光純薬工業、終濃度 250 µg/mL) を添加し、37°Cで 30 分間処理したのち、培養液で 3 回洗浄操作を行ったものを実験に供した。応答細胞は、前節の脾臓細胞回収に用いた RPMI 培養液にて 1×10^7 cell/mL に、刺激細胞は 6×10^7 cells/mL に調整した。応答細胞懸濁液 100 µL を 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に播種し、培養液で各濃度に調整した C60-P、C₆₀、CsA、Dex 懸濁液 50 µL を添加して 37°C、5 % CO₂ 条件下で 30 分間反応させたのち、刺激細胞懸濁液 50 µL を添加した。37°C、5 % CO₂ 条件下で 4 日間培養し、1500 rpm、5 分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は -80°Cで凍結して保存し、各実験に供した。

マウスへの Alum 免疫方法

C57BL/6 マウスに 1 mg/mouse Imject Alum (Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan) および 10 µg/mouse OVA を腹腔内に週 1 回、3 週間投与し、最終投与から 1 週間後に脾臓細胞を回収した。

Alum 免疫したマウスの脾細胞調整・抗原再刺激方法

調整した脾細胞を、前述の培養液で懸濁し、100 µg/mL の OVA および各サンプル懸濁液の存在下、37°C、5 % CO₂条件下で3日間培養した。遠心分離した培養上清は-80°Cで凍結し、各実験に供した。

CD4 陽性 T 細胞の回収・精製方法

C57BL/6 マウスの脾細胞を前述の方法にて回収・調製した。CD4⁺ T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)を用いた磁気ソーティング(magnetic cell sorting; MACS)によりCD4 陽性 T 細胞を精製した。精製は、キットの添付文書に沿って以下の手順で行った。まず、脾細胞を MACS buffer (Miltenyi Biotec) にて懸濁し、10 µL Biotin-antibody cocktail / 1x10⁷ cells を添加して4°C、10分間インキュベートした。これを50 µL MACS buffer / 1x10⁷ cells に懸濁後、20 µL anti-biotin micro beads /1x10⁷ cells を添加して4°C、15分間インキュベートした。MACS buffer 2-3 mL を添加して300×G、10分間遠心分離し、上清を除去したのちに、回収細胞を MACS buffer 500 µL に懸濁した。3-5 mL MACS buffer にて平衡化した MACS LS カラムに上述の細胞懸濁液を供した。目的の精製画分を回収し、先述の培養液に懸濁したものを未刺激 CD4 陽性 T 細胞懸濁液とした。

CD4 陽性 T 細胞の刺激培養方法

抗マウス CD3ε (クローン 145-2C11)、抗マウス CD28(クローン 37.51)は Biolegend (San Diego, USA)から購入した。滅菌 PBS により 2.5 µg/mL に調製した抗マウス CD3 ε を 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に添加したのち4°Cで一晩静置し固相化した。滅菌 PBS で3回洗浄操作を行ったのち、上述の未刺激 CD4 陽性 T 細胞懸濁液を 1 x 10⁶ cells/mL に調整し、

100 µL/well で播種した。培養液で目的濃度に調整した C60-P、C₆₀、CsA、Dex 懸濁液 50 µL を添加して37°C、5 % CO₂条件下で30分間反応させたのち、培養液で1 µg/mL に調製した抗マウス CD28 を50 µL/well で添加した。37°C、5 % CO₂条件下で4日間培養し、1500 rpm、5分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は-80°Cで凍結して保存し、実験に供した。

B 細胞クラススイッチアッセイ

C57BL/6 マウスの脾細胞を前述の方法にて回収した。脾細胞を調製したのち、CD19 micro Beads (Miltenyi Biotec) を用いて MACS により B 細胞を精製した。脾細胞を MACS buffer (Miltenyi Biotec) にて懸濁し、10 µL Biotin-anti-CD19 cocktail / 1 x 10⁷ cells を添加して4°C、15分間インキュベートした。これに1 mL MACS buffer / 1 x 10⁷ cells を添加して300×G、10分間遠心分離し、上清を除去したのちに、回収細胞を MACS buffer 500 µL に懸濁した。3-5 mL MACS buffer にて平衡化した MACS LS カラムに上述の細胞懸濁液を供してB細胞以外の細胞を除去した。カラムに捕捉された B 細胞は、カラムに MACS buffer 5 mL を添加して付属のシリンジを押し込むことにより回収した。MACS buffer を遠心除去したのち培養液に懸濁したものを未刺激 B 細胞懸濁液とした。2 x 10⁶ cells/mL に調製した未刺激 B 細胞懸濁液を 50 µL/well で 96 well flat-bottom assay plate (Nunc.) に播種したのち、各サンプル懸濁液 50 µL を添加して37°C、5 % CO₂条件下で30分間反応させた。培養液で12 µg/mL に調製した anti-CD40 (クローン:HM40-3, Biolegend)、および400 U/mL に調製した recombinant mouse IL-4 (R&D Systems, Minneapolis, USA) を50 µL/well で添加した。37°C、5 % CO₂条件下で10日間培養し、1500 rpm、5分間遠心して培養上清を回収した。培養上清は-80°Cで凍結して保存し、実験に供した。

マウスへの胸腺非依存性抗原 (Thymus-Independent Antigen; TI) 抗原免疫方法

LPS (055 : B5 株由来) は Sigma-Aldrich から購入した。NP⁽⁴⁹⁾-AECM-Ficoll (4-Hydroxy-3-nitrophenylacetic hapten conjugated to AminoEthylCarboxy Methyl-Ficoll) および NP⁽³⁰⁾-BSA は BIOSEARCH Technologies (California, USA) から購入した。C57BL/6 マウスに LPS (30 µg/mouse) もしくは NP⁽⁴⁹⁾-AECM-Ficoll (50 µg/mouse) を週 1 回 200 µL を、2 週間にわたって腹腔内投与した。最終投与から 7 日後に血液を回収し、3000xG、15 分間の遠心分離後、血漿を回収した。得られた血漿は -80℃ で凍結して保存し、各実験に供した。

脾細胞培養上清サイトカイン測定

IL-2 ELISA Ready-Set-Go![®] キット (affimetrix) を使い、キットの使用方法に準じて測定を行った。

Flow cytometry (FCM) による細胞精製度確認

anti-mouse CD16/32 (クローン : 93)、APC (Allophycocyanin) -conjugated anti-mouse CD3 ε (Clone: 145-2C11)、PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4 (Clone: RM4.5)、PE-conjugated anti-mouse B220 (CD45) (Clone: RA3-6B2) はすべて affimetrix から購入した。前述の MACS 法により精製した CD4 陽性 T 細胞画分または B 細胞画分 ($1-2 \times 10^7$ cells/mL) 100 µL に、1 µg の anti-mouse CD16/32 を加え、4℃、5 分間インキュベートした。400xG、5 分間遠心分離し、上清を除去したのちに 1 mL の FACS buffer (2 % FBS、0.02 % NaN₃ in PBS) を加えた。同条件で遠心分離し、上清を除去したのちに、各細胞を

FACS buffer 100 µL に懸濁した。CD4 陽性 T 細胞の染色には、APC-conjugated anti-mouse CD3 ε 抗体および PerCP-Cy5.5-conjugated anti-mouse CD4 抗体を用いた。B 細胞の染色には、PE-conjugated anti-mouse B220 (CD45) 抗体を用いた。各細胞サンプルに、抗体を 1 µg ずつ添加し 4℃、1 時間インキュベートして細胞を染色したのち、FACS buffer 1 mL を加えた。同条件で遠心分離し、上清を除去したのちに FACS buffer 1 mL を加えた。本洗浄操作を 3 回行った後、各サンプルを FACS Canto フローサイトメーター (BD Bioscience) を用いて解析した。なお、CD4 陽性 T 細胞画分または B 細胞画分の精製度を評価するため、各々の精製操作を行う前の脾臓細胞も上記と同様に染色し、解析を行った。

抗 TI 抗原抗体測定

25 µg/mL LPS (in PBS) または 5 µg/mL NP⁽³⁰⁾-BSA (in PBS) を 96 well immune plate (Maxisorp) に添加し、4℃で一晩静置し固相化した。LPS を固相化したプレートは 0.5 % BSA、を加えた PBS で、NP⁽³⁰⁾-BSA を固相化したプレートは 1 % BSA を加えた PBS で 37℃、1 時間インキュベートすることでブロッキングし、その後、各濃度に調製したサンプルを加えて室温にて 2 時間、または 4℃で一晩反応させた。これらのプレートを 0.05 % Tween 含有 PBS で洗浄後、各濃度に調整した HRP 標識抗マウス抗体を加え、室温にて 1 時間反応させた。再度、洗浄操作を行った後、前述の方法で発色させ吸光度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大

学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) が通達]、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

C60 フラーレンを主薬 (主剤) とした、本邦初・発のナノ・サブナノ医薬開発に向けては、乗り越えなければならない課題が大きく 3 つ存在する。C60 フラーレンの医薬品化に向けた第一の課題は、ナノ・サブナノ医薬の品質管理である。医薬品には、極めて厳密な品質管理が要求される。ICH (日米 EU 医薬品規制会議) で合意された不純物ガイドラインによると、投与量 2 g/day 以下の原薬中 0.05%以上の不純物は報告を要し、0.10%以上で構造決定、0.15%以上の場合はその安全性の確認が必要である。先述したように、未修飾 C60 フラーレン (C60) は凝集性が高いことから、生体内への適用に向けては、親水性の置換基による分散性の向上が必要不可欠である。一方で、骨格に多数の二重結合が存在する C60 フラーレンは、多くの付加位置が存在するため、付加する置換基の位置制御が困難であり、しばしば構造異性体の生成を伴う。我々が先行的に研究を行なっ

ている水酸化 C60 フラーレンに関しても、水酸基数や位置異性体の制御が困難であり、医薬品化に耐え得る品質を保証するのは容易ではない。また、C60 フラーレンは、その凝集状態により薬効や体内動態が変化する可能性が考えられ、安定した品質のナノ・サブナノ医薬の供給に向けては、異性体の少ない合成方法や異性体の分離・分析技術、さらには分散性の向上や安定した分散技術が必要不可欠である。

第二の課題は、ナノ・サブナノ医薬の ADME (吸収・分布・代謝・排泄) と Toxicity (毒性) の関連情報の収集、即ち ADMET の精査である。近年、これら 5 種類のパラメータの把握は薬理活性と並んで医薬品開発において極めて重要な位置付けとなっている。ナノ素材に関しては、我々のグループも少しずつ情報を収集しているものの、体内吸収性や体内動態などの ADME に関する情報は未だ乏しい。例えば、C60 フラーレンは、静脈内投与により、肺や脾臓に多く集積することが報告されている一方で、放射性同位元素で標識した C60 フラーレンが肝臓や脾臓に多く集積するといった報告があるなど、未だ体系的な情報は得られておらず、詳細な検討が望まれている。さらに、有効性を向上させた C60 フラーレン誘導体に関しては、動態情報は一切存在しない。また、C60 フラーレンの安全性情報に関しても多くの議論が飛び交っているのが現状である。経口・腹腔・静脈内投与により、C60 の安全性を示唆する報告が多数存在する一方で、遺伝毒性や神経毒性といった安全性を懸念する報告も存在するのも事実である。即ち、早期に C60 フラーレンの ADMET を精査することが、医薬品化に向けた近道であることに異論はない。

最後の課題は、C60 フラーレンの薬効メカニズムの解明に向けた検討である。C60 フラーレンは、歪んだ骨格と π 電子共役系を持つ特徴的な構造から、ラジカルスカベンジャーとして働き、強力な抗酸化作用を示すことから、化粧品など、既に多

く分野で実用化されている。我々のこれまでの検討においても、水酸化 C60 フラーレンが、強力な抗酸化作用を示すことを明らかとしている一方で、抗酸化剤である NAC と比較して、顕著に炎症性サイトカインの産生を抑制するという興味深い知見も得ている。本知見は、抗酸化作用に起因しない C60 フラーレンの抗炎症メカニズムを予期させる大変興味深いものであるが、これら薬効の発現メカニズムは全く分かっていないのが現状である。また、リスクとベネフィットのバランスの上に成り立つ医薬品開発においては、薬効メカニズムの解明は副作用予測にも繋がる。主剤がナノ・サブナノ素材である新規医薬品の副作用を事前に予測し、さらに安全性が担保された医薬品の開発に向けても、薬効メカニズムの解明に向けた検討は急務であると言える。

本観点から我々は、安全かつ有用なナノ・サブナノ医薬品の開発に向けて、様々な官能基が付加された C60 フラーレンの中から、医薬品化に最適な C60 フラーレン誘導体を探索する、Nano-Efficacy/Safety design (ナノ最適デザイン) を推進している。これまでに我々は、C60 フラーレンの強力な抗酸化作用を利用した、炎症性腸疾患に対する新規ナノ・サブナノ医薬品の開発に向け、水酸基を導入し、分散性を向上させた水酸化 C60 フラーレンを用い、分散性とその抗酸化・抗炎症活性に関して検討を進めてきた。その結果、水酸化 C60 フラーレンは、*in vitro* において分散性や安全性に優れ、かつ強力な抗酸化作用や抗炎症作用を示すこと、*in vivo* において、炎症性疾患の一つである炎症性腸疾患に対する安全かつ有効な治療薬となり得ることを明らかとしており、平成 23 年度に特許出願している (堤ら、特願 2011-231446)。

以上の結果は、C60 フラーレンの表面修飾を最適化することで、安全性や有効性に優れた C60 フラーレンを創製可能であることを意味している。従って、C60 フラーレンの医薬品化に向けては、表面修飾と薬効や毒性との構造活性相関を明

らかにし、粒子表面を適切に制御する Nano-Efficacy/Safety design の推進が何よりも重要であると考えられる。さらに上記 3 つの課題を克服可能な C60 フラーレン誘導体を探索することで、有効かつ安全なナノ医薬品の開発に向けた Nano-Efficacy/Safety Design に資する情報の収集に繋がると確信している。

水酸化フラーレンの DDS 化

水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{12}$ (1) にグルコース部位を導入するため、その前駆体である $C_{60}(OSO_3)_6$ (CS) に α -D-グルコース(Glc)を様々な条件下で反応させた (図 1)。溶媒を検討した結果、DMF 中、室温で攪拌することにより、1 時間で CS、Glc とともに溶解した。さらに 7 日間反応を継続させ、水を用いた洗浄により残留 Glc を除去し、粗生成物を得た。

1H NMR スペクトルにおいてピラノース環のプロトンが見られたことから、Glc の導入が確認できた (図 2A)。また、1 位の水酸基のピークが消失していたことから、Glc の 5 つの水酸基のなかで最も酸性度の高い 1 位のものが CS 部位に求核攻撃したと予想される。

また、IR スペクトルは水酸化フラーレンの特徴をよく表しており、さらに異なるピークも出現していることから、分子内に水酸基とグルコース部位の両方を有するフラーレン誘導体が合成されたという結果を支持した (図 2B)。元素分析の結果は、若干の窒素分が検出されたことより、溶媒として用いた DMF が幾分残っていることが示唆された (図 2C)。その結果、 $C_{60}(OH)_6(OGlc)_6$ もしくは $C_{60}(OH)_1(OGlc)_9$ と同定される新規グルコース修飾水酸化フラーレン誘導体を得ることができた。今後、さらなる精製検討の必要がある。

β -カロテン退色法による抗酸化能評価

種々水酸基数の異なる水酸化フラーレンについて、抗酸化能 (%AOA) を評価した (図 3)。その結果、水酸基数が 12 と 44 の二か所におい

て、抗酸化能の極大値が見られた。一般的に、フラレーンの抗酸化能（ラジカル捕捉能）は、フラレーンの高度なパイ共役に由来すると考えられている。すなわち、二重結合が多数残っている、水酸基数の少ない誘導体のほうが、高い抗酸化能を示すはずである。しかしながら、水酸基数が30以上付加した誘導体において抗酸化能がさらに増加したことは、1) 水溶性の増加に伴い分散性が向上したため、2) フェノール性水酸基と同様に若干酸性度のあるフラレーン性水酸基もラジカル捕捉に関与するため、3) 置換基数が増加することによってフラレーン骨格の歪みが大きくなり、残留する二重結合も平面性から大きく歪み、反応性が増大したため、などの理由が考えられる。結論としては、抗酸化能（ラジカル捕捉能）メカニズムは、水酸基数が少ない水酸化フラレーンと多いもので異なる可能性があるといえる。

続いて、水酸化フラレーンの合成 lot 間でのばらつきや劣化について調べるため、加速試験として加熱処理した水酸化フラレーンについても抗酸化能を評価した（図 4）。予想どおり、用いた $C_{60}(OH)_{36}$ は、lot によって抗酸化能が変動した。そこで、2つの lot A,B それぞれについて、80℃～210℃までの温度にて、各 2.5 時間加熱処理を施したサンプルの抗酸化能を測定した。興味深いことに、いずれの lot においても、120℃の加熱までは抗酸化能が減少し、それ以上の温度での加熱により徐々に向上した。また、190℃以上の高温加熱では、未加熱時の抗酸化能を上回った。

これらの実験結果を踏まえ、水酸化フラレーンの抗酸化挙動を以下のように考察した。まず、これまでの我々の研究において、 β -カロテン退色法による評価で高い抗酸化能を示すフラレーン誘導体は、より低い LUMO（反結合性分子軌道）を有していることがわかっている。一般に、LUMO は、共役が拡張するか電子求引基が付加することにより低下する。水酸基数が増えることにより共役は切断されるが、導入される酸素原子の電子求引効果により、水酸化フラレーンの LUMO はも

との C_{60} と比べて同程度であると考えられる。また、一般に電子供与基のついたフェノール性的水酸基はその $\sigma O-H$ 分子軌道が高く、水素供与メカニズムによりラジカル捕捉能が高い。水酸化フラレーンの水酸基もフェノールと同程度の酸性度を示すことから、同様に水酸化フラレーンの水酸基もラジカル捕捉能を幾分有していると考えられる。そのため、加熱により徐々に脱水反応が進行することで、120℃程度までは有用な水酸基の脱離により抗酸化能が低下する。しかし、140℃以上の加熱では酸化反応が進行し、電子求引性のカルボニル基が導入されることで LUMO が大きく低下し、 β -カロテン退色法においてより高い抗酸化能を示したと考えられる。実際、カルボニル基の導入は加熱後サンプルの IR 測定によって確認されており、分子モデル計算を行って求めた LUMO の変化もこの仮説を支持している。

プロリン誘導体の HPLC 分析

フラレーン専用 HPLC カラムとして開発された Buckyrep（ナカライテスク社製）もしくは Buckyrep-M カラムを用い、移動相に極性の高いフラレーン誘導体が可溶性な DMF/DMSO を流すことで、プロリン誘導体を分析することが可能な HPLC 条件を確立することができた（図 5）。カルボキシル基を2つ有するプロリン **1** では、主生成物のピークと異性体や不純物のピークをきれいに分離することができた。また、異なる lot で分析を行ったところ、再現性よく分析が行えることも確認した。カルボキシル基が3つあるプロリン **3** でも、ほぼ同様の分析結果を得ることができた。この化合物については、lot によって異性体の混合比率が大きく異なり、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の増加が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いう知見を得た。

このような分離分析条件を見出したことにより、これらの誘導体の体内動態を追跡することが可能に近づいた。さらに検出感度を向上させるこ

と、ならびにより決定的な LC-MS 分析まで可能にすることが今後の課題と考えられる。

リチウム内包フラーレンの合成

フラーレン炭素ケージ内にリチウムカチオンを閉じ込めたリチウム内包[60]フラーレンを出発とし、発煙硫酸を用いて炭素ケージの外側を水酸化することに成功した(図 6A)。得られた化合物は IR、NMR、元素分析、UV、TGA、MALDI-TOF-MS などによって同定され、平均構造 $\text{Li}^+\text{@C}_{60}(\text{O}^-)(\text{OH})_7$ であると同定された(図 6B)。また、リチウムが炭素ケージ内に内包されていることは、 ^7Li NMR で内包 Li のピークが -17 ppm 付近とかなり低磁場に観測されたことから確認された(図 6C)。このスペクトルからは、1つの主生成物ピークの他に、異性体の存在を示唆する2つの小さなピークの存在が観測された。同様に ^1H NMR を測定したところ、通常の水酸化フラーレンではブロードにしか現れないプロトンのシグナルが、シャープに7本観測された(図 6D)。このことは、水酸基数が7つの水酸化フラーレンが、 C_1 対称ながら位置選択的に生成していることを示唆する。さらに、小さい4本のシグナルも観測され、これらは異性体に対応すると考えられた。すなわち、リチウムを内包させたことにより、薬に望まれる単一異性体の水酸化フラーレンを合成できる可能性を示した。また、IG法を用いて粒径分布を調べたところ、極性有機溶媒 DMSO 中において、分子サイズにほぼ等しい約 1 nm 程度にまで分散していることもわかった。

続いて、プロリン誘導体の分析と同じ条件下で HPLC 分析を行った(図 7)。 ^7Li NMR の結果を支持するように、1つの主生成物と2つの副生成物のピークが観測された。一方で、比較として同条件下でリチウムを内包していない $\text{C}_{60}(\text{OH})_{12}$ の HPLC 分析も行ったところ、Li が内包されたものとは大きく異なり、多数の異性体から構成されると思われる、ブロードに多数のピークが重なったチャートが得られた。現段階では、発煙硫酸との反応段階において生じるフラーレンカチオン中

間体の価数が、リチウムカチオンの電気求引性のためにリチウム内包と空の C_{60} とで異なることがこの位置選択性に影響を及ぼしており、内包フラーレンの場合は1価のカチオンから反応が起こることによって比較的 position selective に生成物を与えたものと考察される。

新規 58π 系フラーレンの合成

これまでに開発されている 58π 系フラーレン誘導体の多くは、Bingel 反応や Prato 反応と呼ばれる反応を利用したものがほとんどであり、前者では三員環を形成し、後者では窒素を含む五員環を形成して、フラーレンケージ上に置換基が導入される。一般にフラーレンへの付加反応では、一付加目よりも二付加目のほうが反応は速く進行するため、一付加体で反応が止まらずに多付加体生成物を与えることが多い。しかし、これら2つの反応については一付加選択性が高いため、様々な誘導体合成に汎用されている。

本研究では、これら以外の反応を利用して、目的となる、1) 水溶性もしくは高い分散性、2) 共役を残した構造 (58π 系)、3) 熱的・化学的に安定な構造、を目指した結果、シリルエノールエーテルと C_{60} との 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と種々のアルコールを用いて非環状ならびに環状アセタール誘導体を計6種類合成することに成功した(図 8)。

構造は、 ^1H および ^{13}C NMR、HRMS によって同定された。さらに、TGA により5員環の環状アセタール 3a では 350°C までの熱安定性を有することも確認できた。今回用いた単純脂肪族アルコール/ジオールを、エチレンオキシ鎖を伸ばしたアルコールや末端を四級アンモニウム塩に変換可能なジアミンに置き換えることで、今後、水溶性の獲得を目指す。

もう一つ別の手法として、反応性の高い種々アジドと C_{60} との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。(図 9)。本反応では、現時点では水溶性の置換基の導入には成功していないが、もし合成できればプロリン誘導体と比較し、窒素原子を含む五員環または三員環の構造の違いによる抗炎症能の違いを検討することが可能となる。さらに、アジリジノ誘導体の前駆体であるトリアゾリノ誘導体との比較も期待される。

グルコース化水酸化フラーレンの凝集挙動

水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{12}$ (1) にグルコース部位を導入するため、その前駆体である $C_{60}(OSO_3)_6$ (CS) に α -D-グルコース(Glc)を様々な条件下で反応させた(図 10)。構造同定は 1H NMR、IR、TGA ならびに元素分析により行った(図 11)。その結果、 $C_{60}(OH)_9(Glc)_3$ (Glc = $C_6H_6O_6$) と同定される新規グルコース修飾水酸化フラーレンを 5 水和物として得ることができた。

得られたグルコース化フラーレンの溶解度を調べたところ、水には溶解しないものの DMSO には良好に溶解したため、DLS ならびに IG 法を用いて粒径分布測定を行った。シングルナノ領域 (1-10 nm) において測定精度が高い IG 法を用いた場合、水酸化フラーレンの平均粒径が 1.02 nm であったのに対し、グルコース化水酸化フラーレンでは 2.26 nm とわずかに増大していた(図 12)。この値は、分子モデル計算により予想された分子長とよく一致していた。次に、ナノ~マイクロ領域まで幅広い測定が可能な DLS 法を用いて測定を行ったところ、高濃度 (20 mg/mL) の DMSO 溶液中ではグルコース化水酸化フラーレンは約 100 nm 程度まで凝集することがわかった(図 13A)。さらに、この DMSO 溶液に水を加えて DMSO/H₂O = 1/9 溶液とした場合も水酸化フラーレンと同様な挙動が観察され、約 60nm 程度まで凝集していた(図 13B)。

プロリン誘導体の体内動態分析

プロリン誘導体を用い、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を行った。プロリン誘導体の溶解度から、THF を抽出溶媒として用いることが最も適することがわかった。しかしながら、肝臓組織から抽出する場合は肝臓に含まれる脂質成分も多量に抽出されてしまい、そのままでは HPLC 分析に適さないサンプルであった。

そこで、次に血液中からのプロリン誘導体の抽出方法について検討した。この場合は分析に影響する不要成分はさほど混入されなかったが、検量線作成により求めたプロリン誘導体の抽出効率は予想以上に低い結果となった。これは血液内の蛋白質の塩基性部位とプロリン誘導体が非常に強固に結合したためと考えられ、蛋白質構造を破壊して抽出する必要があると思われた。そこで有機溶媒を用いて蛋白質を変性させたり、強酸性条件下での抽出を試みたりしたが、抽出効率は半分程度にとどまった。今後、類似化合物の抽出例を参考に、さらなる改良が望まれる。また、より低濃度のプロリン誘導体でも高感度に分析ができる HPLC を探す必要があると思われる。

位置選択的水酸化フラーレン合成

最近、森山らは塩素化フラーレンや臭素化フラーレンを用いた位置選択的求核置換反応 (S_N1) により、単一異性体の水酸化フラーレンやアルコキシ化フラーレンが合成できることを報告している。しかし、これらに用いられるハロゲン化フラーレンは、置換基数が 6 個または 8 個であるため、すべて水酸化したとしてもその水溶性は著しく乏しく、実用的には好ましくない。そこで、求核剤として PEG アルコールのようなオキシエチレン鎖を有する誘導体の合成を試みた(図 14)。まずはエチレングリコールを用いて $C_{60}Br_8$ との反応を検討したが、単純アルコールとの反応と同じ条件では反応が進行しなかった。おそらくアルコール中での臭素化フラーレンの溶解度が重要であるため、今後さらに反応条件を模索する必要がある。一方、グルコース化水酸化フラーレンの

合成に用いた出発原料の CS 誘導体とエチレングリコールを反応させても、同様な求核置換反応による生成物を得ることができると考えた(図 14)。予備的な検討において、置換位置はランダムではあるが、ヒドロキシエトキシ基が導入されたと考えられる生成物が得られ、エタノールおよび水に溶解することを確認した。今後、さらなる構造同定ならびに生理活性の評価を行う。

新規水溶性ナノ物質創成検討

フラーレンの生理活性は、その特殊な球状パイ共役電子構造に由来すると考えられる。この電子構造を変化させることで、その向上や新たな性質の発現も期待される。そこで、まったく新しい電子構造を有するフラーレン誘導体の創成についても様々な検討を行った。まずは昨年度に水酸化に成功したリチウムイオン内包フラーレンを用い、フラーレン表面に負電荷ならびにスピンを分散させたリチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオンの合成を検討した(図 15A)。出発原料のリチウムイオン内包フラーレン PF₆ 塩もしくは NTf₂ 塩自身が有機溶媒中で高いイオン伝導率を示したことから、そのもの自身を電解質として電解還元を試みたところ、目的の物質を得ることに成功した。NIR、ESR ならびにラマン分光分析により、構造の確認を行った。この物質は現時点では水溶性は示さないが、フラーレン骨格に電子が一つ多く入っているため還元力が高く、親水性の化合物で包摂するなどすれば、還元力とラジカル捕捉能に優れた誘導体へと発展させることが期待される。

また、新規 58n系フラーレンを合成する一貫として、昨年度合成したトリアゾリノ誘導体の窒素原子上にさらに置換基を導入した誘導体を設計することで、新奇な電子構造を有するペリ共役トリアゾリウムフラーレンの合成にも成功した(図 15B)。この物質は、窒素原子上のパイ共役構造に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ペリ共役

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 15 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 16)。極性の低い C₆₀ や C₆₀(OH)₁₀ ではカーボンナノホーンとの親和性が高く、たくさんの内包が観察されたが、親水性の高い C₆₀(OH)₃₆ や C₆₀(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。

ヒドロキシアルキルエーテル化フラーレンの合成と溶解度測定

水酸化フラーレン C₆₀(OH)₁₂ (1) にアルキル基を導入するため、その前駆体である C₆₀(OSO₃)₆ (CS) に様々なアルコール(ROH)を反応させた。その結果、エチレングリコールとの反応ではヒドロキシルエチルエーテル化フラーレン(HEE) 2a が、ブチレングリコールとの反応ではヒドロキシルブチルエーテル化フラーレン(HBE) 2b が、エタノールとの反応ではエトキシ化フラーレン(ETO) 2c が、それぞれ得られた(図 17)。

これらの構造同定は、¹H NMR、IR、TGA なら

びに元素分析により行い、それぞれの平均構造は 2a: $C_{60}(OCH_2CH_2OH)_9(OH)_3 \cdot 2H_2O$ 、2b: $C_{60}(OC_4H_8OH)_4(OH)_8 \cdot 10H_2O$ 、2c: $C_{60}(OEt)_5(OH)_7$ と同定された (図 18A)。

得られたフラーレン誘導体の水、エタノール、DMSO 中での溶解度を調べたところ、HEE が最も水に溶解し、ETO が最も水には溶けにくいですがエタノールには良く溶解することを見いだした (図 18B)。また、HEE と HBE については、DMSO に非常によく溶解することを確認した。

これらの誘導体を薬学研究科にて細胞障害性ならびに抗炎症効果の評価を行ったところ、HEE はこれまでに評価したフラーレン誘導体と同程度の抗炎症効果ならびに低い細胞障害性を有することが確認された。

リチウムイオン内包フラーレンの反応性定量評価と水溶化の検討

リチウムイオン内包フラーレン PF_6 塩と大過剰のシクロヘキサジエンとの Diels-Alder 反応を、ジクロロメタン中、 $-20 \sim 0^\circ C$ の温度範囲で行った (図 19)。反応は HPLC にて追跡し、原料消費量の時間変化から、二次反応速度定数 k_2 を求めた。303K における k_2 を空の C_{60} のものと比較したところ、リチウムの内包により、約 2,400 倍反応が加速されていることを見いだした。これは、分子内に内包されたリチウムカチオンによってフラーレンの LUMO が低下したためであることが計算化学からも支持され、世界で初めて「分子内封入触媒効果」を定量的に立証した。

続いて、この高い反応性を有するリチウムイオン内包フラーレンを水溶化させることを目的に、水溶性高分子 PVP による包接化を検討した。その結果、調製条件を最適化することで、クリアな水溶液を調製することができた (図 20)。その UV-vis スペクトルから、フラーレン骨格に由来する紫外領域の吸収が確認されたが、330 nm 付近のピークがブロードに変化していたことから、 $Li@C_{60}$ -PVP では C_{60} -PVP に比べてリチウムイ

オン内包フラーレンがより強く PVP と電荷移動錯体を形成していることが示唆された。

金および白金ナノコロイド-水酸化フラーレン複合体の創製

水酸化フラーレン $C_{60}(OH)_{36}$ 存在下、塩化金酸 $H AuCl_4$ を水溶液中、 $NaBH_4$ により還元したところ、金原子と水酸化フラーレンのモル比が 1 : 1 ~ 1 : 2 のときに、安定な金ナノ粒子 (Au^0)_n の生成が確認された (図 21A)。この試料を透過型電子顕微鏡にて観察したところ、金ナノ粒子の金属コア部が黒点として観測され、ヒストグラム解析により平均直径が 3.72 ± 0.71 nm であると求められた (図 21B)。また、この水溶液の UV-vis スペクトルを測定したところ、金の表面プラズモン共鳴 (SPR) に由来する吸収が 526 nm に観測されたことから、数 nm 程度のナノ粒子の形成が電子的性質の発現として確認された (図 21C)。

さらに、同様の手法により、水酸化フラーレン保護白金ナノ粒子、水酸化フラーレン保護銀ナノ粒子の調製にも成功した。

その他：新規フラーレン誘導体の探索

高い抗炎症能を有するプロリン型フラーレンは、1,3-双極子であるアゾメチンイリドとフラーレンの環化付加反応によって合成される。この方法は効率が高く簡便であるが、さらに多様な置換パターンを目指した反応開発は重要である。

そこで、出発原料にモルホリノジエナミン 1a を用いてフラーレン C_{60} との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置換パターンで、含窒素 5 員環を有するプロリン型フラーレン類似体であるピロリジノフラーレン 2a が生成することを見いだした (図 22A)。計算化学を用いて中間体について考察したところ、熱的な電子移動を経由して生じたラジカルカチオン中間体の環化付加により、生成物を与える反応機構が支持された。

一方、同様な含窒素環状誘導体であるベンジル基

が置換したアザフレロイド **1b,c** を出発化合物とし、過剰のトリフルオロメタンスルホン酸と作用させたところ分子内骨格転位反応が進行し、含窒素6員環を有する新規プロリン型フラレン類似体であるテトラヒドロキノリノフラレン **3b**、**3c** の生成を見いだした (図 22 B)。

プロリン型誘導体 7 の合成 (図 23)

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	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] ⁺

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	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] ⁺

プロリン型誘導体 8 の合成 (図 24)

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	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] ⁺

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	δ (ppm)	3.21 (<i>s</i> , 2H, -CH ₂ -COOH)
MS	<i>m/z</i>	Calcd. for C ₆₆ H ₆ NO ₆ : 908.0195, found: 908.0176

プロリン型誘導体 9 の合成 (図 25)

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	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] ⁺

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	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] ⁺

プロリン型誘導体 10 の合成 (図 26)

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, 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> , $J=16.5$ Hz, 1H, N-CH ₂), 4.26 (<i>d</i> , $J=16.5$ 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>	Calcd. for C ₇₄ H ₂₄ O ₆ N : 1022.1604, found: 1022.1536

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	δ (ppm)	1.19 (<i>t</i> , $J=7.3$ Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 1.21 (<i>t</i> , $J=7.3$ 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> , $J=16.5$ Hz, 1H, N-CH ₂), 4.26 (<i>d</i> , $J=16.5$ Hz, 1H, N-CH ₂), 4.86 (<i>d</i> , $J=17.1$ 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>	Calcd. for C ₇₀ H ₁₆ O ₆ N : 966.0978, found: 966.1007

プロリン型誘導体 11 の合成 (図 27)

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	δ (ppm)	1.25 (<i>t</i> , $J=7.0$ 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> , $J=17.1$ Hz, 1H,
--------------------	---------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		N-CH ₂), 4.21 (<i>d</i> , $J=16.5$ Hz, 1H, N-CH ₂), 4.2-4.39 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃), 4.26 (<i>d</i> , $J=16.5$ 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

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	δ (ppm)	1.19 (<i>t</i> , $J=7.3$ Hz, 3H, CH ₂ CH ₃), 4.3-4.49 (<i>m</i> , 2H, CH ₂ CH ₃), 4.46 (<i>d</i> , $J=16.5$ Hz, 1H, N-CH ₂), 5.04 (<i>d</i> , $J=17.1$ 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>	Calcd. for C ₆₈ H ₁₂ O ₆ N : 938.0665, found: 938.0677

プロリン型誘導体 12 の合成 (図 28)

12a の合成

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

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.34 (<i>t</i> , 6H, $J= 7.2$ Hz, -CH ₂ CH ₃), 2.87 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 8.5$ Hz, -CH ₂ COOEt), 3.06 (<i>dd</i> , 2H, $J=18.5, 9.0$ Hz, -CH ₂ COOEt), 4.26-4.30 (<i>m</i> , 5H, -O-CH ₂ -CH ₃ , -N-CH-),
--------------------	---------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

		4.53 (s, 4H, C ₆₀ -CH ₂)
MS	<i>m/z</i>	949 [M] ⁺

12 の合成

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

¹ H-NMR	δ (ppm)	2.74 (<i>dd</i> , 2H, <i>J</i> =18.5, 9.0 Hz, -CH ₂ COOH), 3.01 (<i>dd</i> , 2H, <i>J</i> =18.5, 9.0 Hz, -CH ₂ COOH), 4.13 (<i>m</i> , 1H, -N-CH-), 4.56 (<i>s</i> , 4H, C ₆₀ -CH ₂)
MS	<i>m/z</i>	Calcd. for C ₆₇ H ₁₀ NO ₄ : 892.0698, found: 892.0626

プロリン型誘導体 13 の合成 (図 29)

13a の合成

茶褐色固体 (170 mg, 収率 37%) を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、文献値との比較から **13a** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.32 (<i>t</i> , <i>J</i> =7.2 Hz, 6H, CH ₂ CH ₃), 4.26~4.39 (<i>m</i> , 4H, CH ₂ CH ₃), 12.21 (<i>s</i> , 1H, NH)
MS	<i>m/z</i>	937 ([M-H] ⁺)

13 の合成

茶褐色固体 (90.0 mg, 収率 87%) を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し **13** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	6.51 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH), 12.28 (<i>s</i> , 1H, NH)
MS	<i>m/z</i>	836 ([M-H] ⁺) 792 ([M-COOH] ⁺)

プロリン型誘導体 14 の合成 (図 30)

14a の合成

ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、**14a** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.44 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 6.28 (<i>s</i> , CH), 12.05 (<i>s</i> , NH)
MS	<i>m/z</i>	892 ([M-H] ⁺)

14b の合成

茶褐色固体 (19 mg, 収率 64%)を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、**14b** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.59 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 5.63 (<i>s</i> , CH), 9.89 (<i>s</i> , NH)
MS	<i>m/z</i>	876 ([M-H] ⁺)

14 の合成

茶褐色固体 (16 mg, 収率 90%)を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、**14** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	5.73 (<i>s</i> , CH), 9.72 (<i>s</i> , NH)
MS	<i>m/z</i>	820 ([M-H] ⁺)

プロリン型誘導体 15 の合成 (図 31)

15b の合成

茶褐色固体 (27.1 mg, 収率 84%)を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、**15b** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.49 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 1.57 (<i>s</i> , 9H, <i>t</i> -Bu), 4.30 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 16.2 Hz, S-CH), 4.43 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 16.2 Hz, S-CH), 6.42 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i>	1007 ([M] ⁺)

15 の合成

茶褐色固体 (24 mg, 収率 97%)を得た。
 ESI-TOF-MS と ¹H-NMR を測定し、**15** と同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	4.40 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> = 16.3 Hz, S-CH), 4.44 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =
--------------------	---------	-----------------------------------------------------------------------------------

		16.3 Hz, S-CH), 6.68 (<i>s</i> , 1H, C ₆₀ -CH)
MS	<i>m/z</i>	894 ([M-H] ⁻)

高純度プロリン型誘導体 3-*trans* の合成 (図 32)

tert-Butyl glyoxylate の合成

無色オイル 237 mg を得た。¹H-NMR を測定し、グリオキシル酸 *tert*-ブチルと同定した。

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.52 (<i>s</i> , 9H, -C(CH ₃) ₃), 9.30 (<i>s</i> , 1H, -CHO)
--------------------	---------	----------------------------------------------------------------------------------------

3a の合成

1 回目のシリカゲルカラムクロマトグラフィーで *trans* 体 414 mg と *trans* 体と *cis* 体の混合物 77.3 mg を得た。*Trans* 体と *cis* 体の混合物については、再度シリカゲルカラムクロマトグラフィーを行い、*trans* 体 16.9 mg、*cis* 体 44.2 mg を得た。それぞれについて ¹H-NMR を測定し、3a-*trans* および 3a-*cis* と同定した。

3a-*trans* 体

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.49 (<i>s</i> , 18H, -C(CH ₃) ₃), 1.61 (<i>s</i> , 9H, -C(CH ₃) ₃), 3.99 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =16.9 Hz, -CH ₂ -), 4.25 (<i>d</i> , 1H, <i>J</i> =16.9 Hz, -CH ₂ -), 6.03 (<i>s</i> , 2H, -CH-)
--------------------	---------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3a-*cis* 体

¹ H-NMR	δ (ppm)	1.47 (<i>s</i> , 18H, -C(CH ₃) ₃), 1.63 (<i>s</i> , 9H, -C(CH ₃) ₃), 4.34 (<i>s</i> , 2H, -CH ₂ -), 5.57 (<i>s</i> , 2H, -CH-)
--------------------	---------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3-*trans* の合成

茶褐色固体 (282.4 mg, 収率 78%) を得た。¹H-NMR を測定し、3-*trans* と同定した。

3-*trans* 体

¹ H-NMR	δ (ppm)	3.89 (<i>d</i> , <i>J</i> =17.1 Hz 1H, -CH ₂ -), 4.23 (<i>d</i> , <i>J</i> =17.1 Hz, 1H, -CH ₂ -), 5.98 (<i>s</i> , 2H, -CH-)
--------------------	---------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

3-*trans* の純度確認

3-*trans* の HPLC クロマトグラムを図 33 に示す。従来のエチルエステルを経由する方法で合成したロットに比べて、不純物のピークの数が少なくなっており、純度が高いことが示された。

[¹⁴C]プロリン型誘導体 3-*trans* の合成 (図 34)

[¹⁴C] 3a-*trans* の合成

放射活性測定値から算出した回収率および収率は [¹⁴C]C₆₀ 1.9%、[¹⁴C]3a-*trans* 26%、[¹⁴C]3a-*cis* 2.7% であった。

[¹⁴C]3-*trans* の合成

同定は逆相 TLC (メタノール:DMF=2:3 [TFA 0.1%]) を用い標品との R_f 値比較により行った。

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 (図 35)

Complete サンプルの UV および SIM クロマトグラムを図 36 に示す。SIM の 924 (*m/z*) で、保持時間 12.8 分付近に見られたピークは complete の方が control サンプルよりも明らかに大きかったことからこのピークは P450 モデル系により生成したモノエポキシ体由来であることが示唆された。実際に、このピークを分取濃縮後 ESI-TOF-MS 測定を行った。その結果、推定される元素組成は 3-*trans* に酸素原子 1 個が付いたものであることから、12.8 分のピークは 3-*trans* のモノエポキシ体であることが確かめられた。機器データを以下に示す。

ESI-TOF-MS : Calcd. for C₆₆H₆N₁O₆ 924.01443, found 924.01368

同様の解析から、SIM の 940 (*m/z*) で保持時間 12.5 分に見られたピークは、モノエポキシ体がさらに酸化されたジエポキシ体であることが示唆された。

プロリン型誘導体 3-trans の肝マイクロソームによる反応

P450 化学モデル系で生成が確認されたモノエポキシ体およびジエポキシ体はラット、マウス及びヒト肝マイクロソームによる代謝反応系では検出されなかった。一方で、それとは別のピークが complete サンプルでのみ検出された。

C60-P および高純度 C60-P の合成・分析

C60-P の合成および分析

C60-P の情報を以下に記載した。

組成式： $C_{66}H_7NO_6$

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 C60-P (Lot. 130711-1, 130711-2) および市販品 (Aldrich 社製) の IR スペクトルを比較した結果、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 C60-P の LC チャートを比較した結果、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。

3 種類の C60-P の MS スペクトルを比較した結果、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。

$^1\text{H-NMR}$: 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。従来法を用いて C60-P を合成する場合、中間体としてエステル体を合成した後、C60-P を合成していた。従来法によって合成された C60-P の純度は、60～70%と低いことが問題点であった。

高純度 C60-P の合成および分析

1-1 における課題を解決するため、増野先生 G は、中間体としてブチル体を合成した後、C60-P を合成することにより、不純物の極めて少ない高純度な C60-P を合成できることを見出した。そこで当グループでは、合成の再現性確認およびスケールアップを検討した結果、高純度な C60-P を合成することができることを確認した (図 37)。合成した C60-P の FT-IR および $^1\text{H-NMR}$ スペクトルは、それぞれ図 38 および図 39 に示した。

フラレーン誘導体の抗酸化能評価

DPPH ラジカル消去作用

各測定サンプルにおける DPPH ラジカル消去作用をまとめて表 1 に示した。総体的に、プロリン型 1, 3 のラジカル消去力が高く、7 以降のラジカル消去力が低いという傾向は、平成 24, 25 年度に実施した ESR の測定結果と類似していた。水酸化フラレーンは、 $C_{60}(OH)_{12} \sim C_{60}(OH)_{44}$ まで、水酸基数の異なる誘導体を用いてアッセイを行ったが、 $C_{60}(OH)_{12}$ 以外は、DPPH・消去率に濃度依存性が認められず、 IC_{50} を算出することはできなかった。

各測定サンプルの IC_{50} とその構造を図 40 に示した。Pristine C60 は、水素供与能が無いため、DPPH ラジカルを消去することはできない。フラレーン誘導体において、DPPH ラジカル消去活性は認められたという結果は、DPPH ラジカル消去に対しては、官能基の寄与によるものと考えられる。プロリン型誘導体においては、DPPH ラジカル消去作用が認められたことから、カルボン酸の OH がフェノール性の OH の役割を果たし、DPPH ラジカルに水素を供与していると考えられる。プロリン型誘導体間で比較した結果、カルボン酸と DPPH ラジカル消去活性の間に相関性が認められないことから、カルボン酸の構造も影響を及ぼしている可能性がある。

$O_2^{\cdot-}$ ラジカル消去作用

各測定サンプルにおける $O_2^{\cdot-}$ ラジカル消去作用をまとめて表 1 に示した。 $O_2^{\cdot-}$ ラジカルに対する消去作用は、 $C_{60}(OH)_{24}$ およびアスコルビン酸が最も優れていた。総体的に、プロリン型誘導体よりも水酸化フラレーンのほうが、 $O_2^{\cdot-}$ ラジカルの消去作用が高い傾向が認められた。水酸基の数が少ないほうが、 $O_2^{\cdot-}$ ラジカル消去活性が高かった。プロリン型誘導体においては、高純度 C60-P の活性が最も高く、次いでプロリン型(1) > C60-P > (10), (9), (11) > (9), (8), (7)であり、

構造と活性の間に明確な相関性は認められなかった。

$O_2^{\cdot-}$ ラジカル消去作用の評価は、Xanthine /Xanthine oxidase 反応により生成される $O_2^{\cdot-}$ ラジカルと WST-1 が反応して生成する WST-1 Formazan (最大吸収 450nm) を測定することにより評価した。この反応系は、酵素反応であること、フラレーン誘導体を溶解するために使用している DMSO が妨害物質になること、またフラレーン誘導体は 450nm 付近にも吸収がある等の理由から、データの再現性に問題があると思われる。そのため、新たに合成した誘導体は、ESR を用いた評価も実施することとした。

ESR による OH ラジカル消去作用

平成 24 年度に実施した結果と合わせて、結果をまとめて表 2 に示した。高純度 C60-P の OH ラジカル消去作用は、従来法で合成した C60-P の活性に比べると、やや低い結果が得られた。この理由として、従来法で合成した化合物中に含まれる不純物も、OH ラジカル消去作用を有している可能性が考えられた。

ESR による LOO ラジカル消去作用

各種フラレー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 3 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、LOO・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、LOO・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、 $\cdot OH$ 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 社製の誘導体と本事業で合成した C60-P (Lot.130711-2) の IC₅₀ を比較した結果、本事業で合成した誘導体の IC₅₀ は 1/2 程度であり、優れた LOO・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 C60-P 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 C60-P を比較すると、C60-P の IC₅₀ は、(1)の 1/3 程度であった。この結果は、官能基のカルボン酸が LOO・消去に影響を及ぼす可能性を示唆している。

水酸化フラレーン：本研究で合成した C₆₀(OH)₂₄ の IC₅₀=304.3 uM であったのに対して、MTR 社製の C₆₀(OH)_{~24} は、全く消去作用を示さなかった。MTR 社製の水酸化フラレーンは、本研究で採用している合成法とは異なり、構造内に相当数の Na が含まれていると予想され、フラレーンの骨格構造が保持されていないのかもしれない。平成 24 年度、・OH 消去作用を測定した結果からは、水酸基数と・OH 消去作用に相関性は認められなかったが、LOO・においては、水酸基数が少ない方が低い IC₅₀ になる、即ち、水酸基数が少ないほど LOO・消去作用が高い傾向が認められた (図 41)。この結果から、LOO・の消去作用は、フラレーン骨格の共役結合が寄与すると考えられた。

・OH 消去作用 vs LOO・消去作用：各測定試料における・OH 消去作用および LOO・消去作用を表 4 に示した。総体的に、・OH 消去作用に比べると、LOO・に対する消去作用は低い傾向にあることが明らかになった。中でも、プロリン型誘導体(3)に関しては、他の誘導体と比べて、両ラジカルに対して良好な抗酸化作用を示した。

全合成法による [¹⁴C]C₆₀ 合成方法の検討

昨年度から引き続き全合成法による [¹⁴C]C₆₀ 合成方法の検討を行った結果、収率および収量ともに低いものの、全合成により、各中間体および

[¹⁴C]C₆₀ の合成に成功した (放射能から算出された収率：6.5×10⁻⁵%、収量：33ng)。収量が低かった原因としては、以下の理由が考えられた。

- ・ Truxene から化合物 2 を合成する過程において、反応が不十分なため、プロモナフタレンの付加数が少ないものが生成
- ・ 化合物 2 の五員環酸化
- ・ 副生成物の存在による C₆₀ 合成の阻害

以上のことから、各中間体を安定に収率を向上させるためには、反応条件を最適化し、各中間体の分離・精製方法を検討する必要がある。

様々な数の水酸基を有する水酸化 C60 フラレーンの有効性評価

本検討では、水酸基数の異なる 4 種の水酸化 C60 フラレーン (C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄) を用い、抗酸化活性・抗炎症活性を比較検討した。まず、各種水酸化 C60 フラレーンの物性に関する基礎的情報を収集した。C60 フラレーンの理論的な 1 次粒子径は 0.7 nm であるが、溶媒中では凝集し、数百 nm 程度の凝集塊を形成することが知られている。各水酸化 C60 フラレーンを水または培養液に懸濁すると、C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄ は、凝集塊が認められ、完全には分散していないことが明らかとなった。一方で、C₆₀(OH)₃₆、C₆₀(OH)₄₄ は、懸濁させても凝集塊は認められず、C₆₀(OH)₁₂、C₆₀(OH)₂₄ と比較して分散性が高いと考えられた。そこで、動的光散乱法により分散媒中の粒子径分布を評価したところ、C₆₀(OH)₁₂ (図 42a)、C₆₀(OH)₂₄ (図 42b) は数百 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察され、1 次粒子径はサブナノサイズであるものの、溶媒中ではサブミクロンサイズとして存在することが判明した。一方で、C₆₀(OH)₃₆ (図 42c)、C₆₀(OH)₄₄ (図 42d) は 1 nm 付近に 2 次粒子径のピークが観察され、水酸基数の増加に伴い、2 次粒子径が小さくなる傾向が認められた。

次に、ヒト腸管上皮細胞株 (Caco-2 細胞) を