

反応を開始し、記憶細胞や、抗原排除に適した働きを示す特定のヘルパーT細胞へ分化していく。一方、同じ病原体上のエピトープを認識するB細胞は、自身の認識可能な抗原を取り込んで、DCと同様に提示し、それを認識する同系のヘルパーT細胞に出会うと、活性化・増殖して抗体を産生するようになる。従って、T細胞、B細胞、DCのいずれが阻害されても、獲得免疫応答は抑制されると言える。そこで、獲得免疫機構を構成する各細胞群に着目し、C60 フラーレン誘導体が獲得免疫誘導におよぼす抑制作用に関して検討した。

MLRにおけるC60 フラーレン誘導体の効果

まず、混合リンパ球反応 (Mixed Lymphocytes Reaction; MLR) により、C60 フラーレン誘導体の獲得免疫抑制作用を評価した。MLRは、系統の異なる2種類のマウス由来のリンパ球を混合培養した時に惹起されるリンパ球活性化反応であり、移植片拒絶反応を *in vitro* で簡便に再現することができる。応答細胞は、主要組織適合遺伝子複合体 (Major Histocompatibility Complex; MHC) を認識し、MHCの異なる刺激細胞を非自己として識別する。その結果、NK細胞、キラーT細胞、マクロファージなどの免疫担当細胞が活性化・増殖し、刺激細胞を排除すべく攻撃する。獲得免疫系を抑制する免疫抑制剤の多くが本実験系にて顕著な抑制作用を示すことから、MLRは免疫抑制剤のスクリーニングとして広く用いられている。なお本検討では、刺激細胞にマイトマイシンCによる増殖停止処理を行い、応答細胞の増殖反応のみを評価するMLR (一方向MLR) を行った。本実験系では、CD8陽性T細胞が非自己の細胞を直接認識する経路と、DCによる非自己抗原の取り込みおよび抗原提示を介してCD4陽性T細胞が活性化される経路がはたらくと考えられる。T細胞やDCは活性化に伴ってIL-2を産生するため、本検討では、IL-2産生を指標に、T細胞およびDCの活性化を評価した。刺激細胞非存在下では、IL-2はほとんど産生されないが、刺激

細胞を添加することによってIL-2の産生が有意に上昇する。C60-P添加群では、C60-Pの濃度依存的にIL-2産生が抑制されることが確認された。一方で、C₆₀添加群では、高濃度作用群においても、IL-2の抑制は認められなかった (図92a)。しかし、強力なT細胞抑制剤として知られるCyclosporine A (CsA) では100 nMで、ステロイド系抗炎症薬であるDexamethasone (Dex) では10 nMでそれぞれIL-2の産生を完全に抑制することが確認された (図92b)。これは、IL-2抑制が認められたC60-Pの作用濃度と比べると、物質質量計算で、CsAはおおよそ1000倍、Dexはおおよそ10000倍の効果を示したこととなる。以上のように、C60-Pを作用させることで、MLRにおけるIL-2産生抑制作用、即ちT細胞あるいはDCの活性化抑制作用を示したことは事実であるが、本実験系においては、一般的に臨床で用いられている免疫抑制剤よりも作用は弱いことが示された。

抗原特異的T細胞増殖反応におけるC60 フラーレン誘導体の効果

次に、抗原特異的T細胞増殖反応におけるC60 フラーレン誘導体の効果を解析した。抗原特異的なT細胞が、自身が認識する抗原をDCから提示された際には、激しい増殖を繰り返す、抗原に特異的なT細胞集団を形成する。これが、獲得免疫応答の礎となる反応である。本検討では、あらかじめOVAを免疫したマウスの脾臓細胞を、*in vitro* においてOVAで再刺激し、その際のサイトカイン産生を指標として特異的T細胞の増殖反応を評価した。なお、本実験系においては、T細胞への影響と共に、DCが実際に抗原を捕食し、T細胞へ提示する過程も重要な要素を占める。

抗原特異的T細胞の増殖反応において、Th1細胞の増殖に際してはIFN- γ の産生が、Th2細胞の増殖に際してはIL-4、IL-5などのサイトカインが主に産生される。そこで本検討では、Th1細胞の増殖の指標としてIFN- γ の産生を、Th2細胞の

増殖の指標として IL-4 の産生を指標として C60-P の作用を解析した。抗原再刺激によって産生された IFN- γ は、C60-P 100 μ M を添加することによって有意に産生が抑制された。一方で、C60 では C60-P のような抑制効果は観察されなかった (図 93a)。次に、IL-4 産生を評価した。抗原再刺激によって産生上昇した IL-4 は、C60-P を添加することで、C60-P の濃度依存的に産生が抑制された。一方で、C60 では濃度を高めても IL-4 の産生抑制効果は見られなかった (図 93b)。以上の結果より、C60-P が IFN- γ および IL-4 の産生抑制作用を発揮することが明らかとなった。本結果は、C60-P が *in vivo* で示した獲得免疫応答の抑制効果が、*in vitro* においても発揮されたことを示唆している。また、免疫抑制剤のコントロールとして用いた CsA および Dex は、濃度依存的に IFN- γ と IL-4 の両方を抑制し、C60-P と比較しておよそ 100~10000 分の 1 の濃度でその効果を示していた。

CD4 陽性 T 細胞におよぼす C60 フラーレン誘導体の効果

次に、C60-P が T 細胞そのものに与える抑制効果をより詳細に検討するため、精製した T 細胞集団を用いた検討を試みた。本検討では、獲得免疫の司令塔ともいえる役割を果たす CD4 陽性 T 細胞に、C60-P がおよぼす抑制効果を評価した。

本実験系は、anti-CD3 によって T 細胞受容体 (TCR; T cell receptor) を介した抗原提示刺激と、anti-CD28 によって共刺激分子を介した刺激を模倣することで、T 細胞が、活性化した DC から特異的な抗原提示を受けた状態を再現する系である。まず、目的とする CD4 陽性 T 細胞画分が精製できているかを確認した。その結果、CD3 陽性-CD4 陽性細胞がおよそ 90% にまで精製・濃縮されたことを確認した (図 94a)。次に、T 細胞の活性化を、T 細胞増殖時に産生される IL-2 を指標として評価した (図 94b)。精製した CD4 陽性 T 細胞に、anti-CD3 および anti-CD28 両方

の刺激を与えた群では、IL-2 の産生が有意に上昇した。ここに、C60-P を添加することで、C60-P の濃度依存的な IL-2 産生の抑制が観察された。一方で、C₆₀ 添加群では、いずれの濃度においても IL-2 抑制は認められなかった。なお、CsA および Dex は、IL-2 を強力に抑制し、その効果を示した濃度は C60-P と比べて 1000~10000 分の 1 であった。以上の結果より、C60-P は、CsA や Dex といった免疫抑制剤よりも作用が弱いものの、CD4 陽性 T 細胞が抗原提示を受けた際の活性化応答を抑制する作用があることが明らかとなった。また、C60 には、CD4 陽性 T 細胞の活性化抑制作用は認められなかった。即ち、C60-P は *in vitro* において、T 細胞、少なくとも CD4 陽性 T 細胞への抑制作用があることが示された。

B 細胞に C60 フラーレン誘導体がおよぼす影響

先ほどまでの検討では、T 細胞や DC を含む経路における C60-P の抑制効果を評価してきたが、これらに着目した検討では、*in vivo* で C60-P が示した顕著な抗体産生抑制作用を十分に説明するには至らなかった。

そこで次に、B 細胞からの抗体産生に C60-P が与える抑制効果に関して評価を試みた。まず、目的とする B 細胞画分が精製できているか確認した。その結果、B 細胞がおよそ 90% にまで精製・濃縮されたことを確認した (図 95a)。精製した B 細胞を播種し、C60 フラーレン誘導体を添加したのち、抗 CD40 抗体および IL-4 によって刺激を与えた。抗 CD40 抗体は B 細胞上の CD40 に結合し、T 細胞の CD40L を介したシグナルを模倣することで B 細胞の分化増殖を誘導する。また、IL-4 は B 細胞に作用して、IgE へのクラススイッチを誘導する。これら 2 者が共存した状態で B 細胞を培養した。本実験では、C60 フラーレン誘導体が抗体産生におよぼす抑制効果について、培養上清中の IgE 産生を指標に評価した。その結果、抗 CD40 抗体と IL-4 を添加することによって、多量の IgE が誘導されることが確認され、C60-P

添加群では 4、20、100 μM で有意に IgE の産生抑制が認められた。一方で、未修飾の C60 では、高濃度で IgE の抑制傾向が観察されたものの、有意な抑制効果は認められなかった。なお免疫抑制剤である CsA は、1 μM を添加することで IgE の有意な産生抑制が認められた (図 95b)。なお、CsA は主に T 細胞を阻害する選択的阻害剤だが、高濃度では、B 細胞に対する抑制作用も発揮することが知られている。先の検討で、T 細胞応答を抑制した濃度の方がより低濃度であり、CsA は B 細胞に比べて T 細胞への抑制作用が強いことが、本検討からも確認された。以上の結果より、C60-P は、T 細胞活性化に対して抑制効果を示した濃度よりも低い濃度で、B 細胞からの抗体産生に対する抑制効果を発揮することが示された。従って、C60-P による抑制作用は、T 細胞よりも B 細胞に対する方が強い可能性が示された。

TI 抗原による抗体産生に C60 フラーレン誘導体がおよぼす効果

以上の *in vitro* の実験では、免疫応答抑制のコントロールとして用いた CsA や Dex のサイトカイン抑制作用と比較して、C60-P の作用は弱いことが示されてきた。一方で、一節の *in vivo* の検討において、CsA を OVA 抗原と共にマウス腹腔に投与すると、CsA が C60-P よりも物質重量計算で高用量であったにも関わらず、抗体産生抑制効果を示さなかったことを確認している (図 89f, g)。また、前検討までの結果から、C60-P による作用は、T 細胞よりも B 細胞に強い可能性が示されている。そこで次に、C60-P が B 細胞への直接作用を介して *in vivo* において抗体産生抑制効果を発揮した可能性を検証した。一節の検討で用いた OVA は、特異的抗体の産生誘導に OVA 特異的 T 細胞による補助シグナルが必須であり、胸腺依存性 (Thymus-Dependent; TD) 抗原と呼ばれる。即ち、TD 抗原に対する抗体産生応答には、B 細胞の活性化のみならず、DC による抗原の捕捉と抗原提示、および抗原特異的 T 細胞の誘導が必須

である。従って、C60-P が OVA に対する抗体産生を抑制したことは前述した通りであるが、C60-P の *in vivo* における主な作用点が、DC、T 細胞、B 細胞いずれの細胞群に作用した結果であるのかは明らかでない。本検討では、B 細胞の活性化のみで抗体が誘導される、胸腺非依存性 (Thymus-Independent; TI) 抗原を用いた検討を実施した。TI 抗原は大きく 2 種類に分類することができ、それぞれ TI-1 抗原、TI-2 抗原と呼ばれる。TI-1 抗原の例としては、LPS や細菌 DNA が挙げられ、Toll 様受容体など、細胞表面受容体に結合して B 細胞を活性化し、B 細胞増殖および形質細胞への分化を誘導する。TI-2 抗原は、同じタンパク質もしくは糖鎖エピトープを連続して多数有する抗原であり、B 細胞受容体を架橋することで強力にシグナルを伝え、形質細胞への分化を誘導できる。なお、通常のクラススイッチに必要な T 細胞由来のサイトカインが供給されないため、産生される抗体は自然抗体である IgM および IgG3 である。

まず、TI-1 抗原として LPS を用いて実験を行った。その結果、LPS 接種により、LPS 特異的 IgM および IgG3 の産生が見られた。しかし、C60-P 投与によって、これら産生量が有意に変動することはなかった。一方で、興味深いことに、T 細胞選択的抑制剤であり、B 細胞への抑制作用は弱い CsA 投与群で、IgM や IgG を亢進する結果が得られた (図 96a, b, c)。次に、TI-2 抗原として NP-Ficoll を用いて同様の評価を行った。その結果、NP-Ficoll 接種により、NP 特異的 IgM および IgG3 の産生が認められたが、こちらも C60-P 投与による有意な変動は認められなかった。また、CsA 投与群では、IgG3 抗体の産生が促進する結果が得られた (図 96d, e, f)。このことから、先の検討において OVA 特異的抗体産生を抑制した濃度帯では、C60-P は、T 細胞の関わらない経路における B 細胞からの抗体産生を抑制しないことが示された。なお CsA の結果に関して、B 細胞にも作用点をもつことは先述のとおりだが、自然

抗体の産生促進がみられた例は未だ報告がなく、CsA は自然抗体の産生に関わる B 細胞 (B-1 細胞等) に対して、未知の効果を有する可能性がある。

以上の結果より、C60-P の抗体産生抑制効果は、T 細胞や DC も関わる経路において発揮された可能性がある。つまり、単に B 細胞のみに着目した実験系では評価しきれなかったような作用によって誘発された可能性が考えられた。ここまで、主に T 細胞、B 細胞に着目した系において実験を行ってきた。なお MLR や抗原特異的 T 細胞増殖反応においては、DC を介した T 細胞の応答を評価したが、現在、DC そのものに着目し、C60-P が抗原プロセッシングの過程や抗原提示過程に与える抑制効果について検討中である。

in vitro における各種実験系において、C60-P は、幅広い免疫抑制作用を示している一方で、既存の免疫抑制剤に匹敵する作用を示す点は発見できなかった。一方で、C60-P は、CsA のような T 細胞応答抑制効果をもつと共に、CsA では認められなかった TD 抗原に対する強い抗体抑制能を有すると考えられる。本検討で用いた実験系はいずれも、臨床応用が進む免疫抑制剤で顕著な薬効を確認できることから、免疫抑制剤のスクリーニング系として重要な実験系であった。本観点から考えると、C60-P が、本検討で実施した実験系において、他の免疫抑制剤と比較して非常に弱い作用しか示さなかった一方で、*in vivo* において強い効果を示したことから、C60-P は既存の免疫抑制剤とは異なる、未知の獲得免疫抑制機構を有している可能性が考えられる。

グルコース修飾フラレーンに関する検討

分担研究者の吉岡の報告書において記載している通り、平成 25 年度には、C60-P の炎症性腸疾患モデルマウスにおける治療効果をも検討した。その結果、腹腔投与において、顕著な治療効果を発揮可能であるものの、経口投与においては、治療効果が減弱することが明らかとなった。現在、C60-P の体内動態解析を実施しつつあるものの、

詳細は不明である一方で、経口投与においては、腸管吸収性の乏しさにより、C60-P が体内に移行することができず、経口投与における治療効果が減弱した可能性も考えられる。医薬品の腸管吸収性を向上させる一つの戦略として、グルコース修飾に期待が寄せられている。腸管上皮細胞にはグルコーストランスポーターが強く発現しており、グルコースを吸収している。そのため、薬物をグルコース修飾することで、腸管吸収性を高める試みが試みられている。そこで、C60-P の腸管吸収性向上を目的に、グルコース修飾 C60 フラレーンの創製を試みた。グルコース修飾 C60-P の創製を最終目標としているが、本検討では、合成法の確立を第一目標に、水酸化 C60 フラレーンを用いた検討した。分担研究者の小久保の報告書に記載している通り、グルコース修飾水酸化 C60 フラレーンの合成に成功したことから、次に、抗炎症活性を評価した。まず初めに、Caco-2 細胞を用いてグルコース修飾 C60 フラレーンおよび、鑄型として用いた $C_{60}(OH)_{12}$ を加え、細胞毒性を LDH アッセイにより評価した (図 97)。

その結果、グルコース修飾 C60 フラレーンは 100 μ M では細胞傷害性を示さない一方で、 $C_{60}(OH)_{12}$ は 100 μ M で有意に細胞生存率が減少することが明らかとなった。

次に、Caco-2 細胞を用いてグルコース修飾 C60 フラレーンの *in vitro* における炎症性サイトカインの産生抑制能を、炎症性サイトカインである IL-8 の産生量を指標として評価した (図 98)。Caco-2 細胞にグルコース修飾 C60 フラレーン及び $C_{60}(OH)_{12}$ を作用させた後に、IL-1 β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した。その結果、IL-1 β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加し、 $C_{60}(OH)_{12}$ は IL-8 の産生をさらに亢進することが示された。一方で、グルコース修飾 C60 フラレーンを作用させた群において、100 μ M において IL-8 の産生が抑制されることが判明した。以上の結果から、グルコース修飾することで、細胞毒性を低減しつつ、抗炎症活性を向上可能であ

ることが示された。このメカニズムとして、Caco-2 細胞に発現するグルコーストランスポーターを介して、グルコース修飾 C60 フラーレンが効率良く取り込まれた可能性を考えており、現在、細胞内取り込み量を検討しているところである。

また、大腸上皮細胞には、アミノ酸トランスポーターである ATB(0,+)¹が発現しており、特に、アルギニンに高い特異性を示すことが知られている。さらに大腸炎の大腸では、ATB(0,+)¹が発現増強することが知られている。そのため、大腸炎治療において、薬物をアルギニン修飾することで、薬物を大腸組織からより多く吸収可能であることが判明している。そこで現在、C60 フラーレンをアルギニン修飾することで、大腸を標的とした DDS が可能になると考え、アルギニン修飾 C60 フラーレンの創製も進めているところである。

C60-P の構造活性相関に関する検討

現在、C60-P が、炎症性腸疾患に対する優れた C60 フラーレン誘導体であると考え、検討を進めている。一方で、より有効かつ安全性に優れた C60 フラーレン誘導体の探索を随時進めることが、第二世代の C60-P の創製に必要不可欠と考えられる。そこで、C60-P を鋳型として、6 種類の官能基修飾誘導体を新規合成し（図 99 および分担研究者の大江の報告書を参照）、抗炎症活性を評価した。本結果については、まだ再現性の必要があると考えているものの、現段階のデータについて、報告させていただく。Caco-2 細胞に各種 C60 フラーレン(A)~(F)及び C60-P を作用させた後に、IL-1 β で刺激し、24 時間後に培養上清中の IL-8 量を測定した（図 100）。その結果、IL-1 β 刺激によって IL-8 産生が有意に増加したものの、C60 フラーレン(A)~(F)を作用させた群において、濃度依存的に IL-8 の産生が抑制された。特に、C60 フラーレン(D)および(E)においては、C60-P と比較しても、より強い抗炎症活性を発揮し得ることが明らかとなった。

E. 結論

自己免疫疾患の一つである炎症性腸疾患（クローン病、潰瘍性大腸炎：共に厚労省指定の難病）は、特に若年者が多く罹患し、頻繁に再燃・寛解を繰り返すと共に、大腸癌のリスクファクターでもある。またステロイドの常用（ムーンフェイス・避妊など）、腹痛・軟便・血便・食欲不振など、社会生活における QOL が著しく障害され、大きな社会問題となっている。本邦でも既に約十万人が罹患しており、今後も爆発的に罹患者が増大することが推定され、欧米では日本よりも 10 倍以上も高い罹患率を示すことから、全世界的に早急な予防・治療法の確立が待望されている。炎症性腸疾患の発症・悪化は、遺伝子要因と共に、生活習慣・医薬品や食品といった環境因子による腸管の酸化的ストレスにも大きく起因しており、これが慢性化し、自己免疫系が破綻し、発症・悪化に至るものと推定されている。しかし未だ有効な治療法は無く、ステロイド療法などが対処療法として、やむなく利用されている。当該申請研究で開発・実用化・事業化を目指す「炎症性腸疾患等に対する経口投与型ナノ DDS」は、独自の基盤技術・特許を発展・融合させ、炎症性腸疾患に対する新たなコンセプト・作用機序に基づく医薬品開発を目指すものであり、社会的ニーズは非常に広範であり、国民の健康と福祉の向上に大きく貢献可能である。また、我が国発の非侵襲性ナノ DDS を事業化することは、ナノ産業・製薬産業に圧倒的な開発競争力を提供するなど、経済界への波及効果も期待でき、我が国の国益にも叶うものである。また昨今、当該領域での抗体医薬の開発が進展しているが、高額かつ侵襲的であり、安全性にも一部懸念を残していることを考えると、安価かつ安全で有効な経口投与型ナノ DDS 化 C60 フラーレンの併用療法あるいは予防投与は、医療経済的にも波及効果に優れている。さらに、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。従って本申請課題は、非侵襲性経口投与型ナノ DDS 化 C60 フラーレンを用いた難治性腸疾患に対する画期的ナノ医薬の早期上市に向けた道筋、ビジョンが明確であり、C60 フラーレンの医薬品化を具体的に目指した唯一の取組と言える。また、今後の C60 フラーレンの「動態や薬効メカニズム」がブレークスルーの一つとなるが、ナノマテリアルが主役（主薬・主剤）であるナノメディシンは、「この C60 フラーレンが国内外を問わず、最初」であることを鑑みると、「品質保証や体内挙動、ベネフィット・リスクバランスをどう考えるか」といった個々のガイドラインと、これらを取り纏めたガイダンスの発信など、レギュラトリーサイエンスの進展にも当該事業は寄与するものである。以上、過去の研究実績や特許保有の観点からも、我々のグループのみが唯一、当該研究を実施可能であり、その波及効果は大きい。また我が国の知財を活用し、治療法のない難治性腸疾患に対して、我が国発の非侵襲性ナノ DDS を最初に事業化することは、安全・安心の提供のみならず、産業的にも、我が国の国益に叶うものと考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamashita K, Yoshioka Y, Pan H, Taira M, Ogura T, Nagano T, Aoyama M, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda SI, Aoshima H, Nabeshi H, Yoshikawa T, Tsutsumi Y. Biochemical and hematologic effects of polyvinylpyrrolidone-wrapped fullerene C60 after oral administration. *Pharmazie*. 68(1): 54-7, 2013.
2. Ueno H, Kokubo K, Kwon E, Nakamura Y, Ikuma N, Oshima T. Synthesis of a New Class of Fullerene Derivative $\text{Li}^+\text{@C}_{60}\text{O}^-(\text{OH})_7$ as a "Cation-Encapsulated Anion Nanoparticle". *Nanoscale*. 5, 2317-21, 2013.
3. Ueno H, Kokubo K, Nakamura Y, Ohkubo K, Ikuma N, Moriyama H, Fukuzumi S, Oshima T. Ionic conductivity of $[\text{Li}^+\text{@C}_{60}](\text{PF}_6^-)$ in organic solvents and its electrochemical reduction to $\text{Li}^+\text{@C}_{60}^{\bullet-}$, *Chem. Commun.* 49: 7376-78, 2013.
4. Ueno H, Kawakami H, Nakagawa K, Okada H, Ikuma N, Aoyagi S, Kokubo K, Matsuo Y, Oshima T. Kinetic study of the Diels-Alder reaction of $\text{Li}^+\text{@C}_{60}$ with cyclohexadiene: Greatly increased reaction rate by encapsulated Li^+ . *J. Am. Chem. Soc.* 136: 11162-7, 2014.
5. Ueno H, Yamakura S, Arastoo R. S, Oshima T, Kokubo K. Systematic evaluation and mechanistic investigation of antioxidant activity of fullerenols using β -carotene bleaching assay, *J. Nanomater.* 2014(802596): 1-8, 2014.
6. 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.
7. Ikuma N, Yamamoto H, Kokubo K, Oshima T. Synthesis of pyrrolidinofullerenes via single electron transfer reaction of aryldienamines with C₆₀. *Heterocycles*. 90: 1168-78, 2015.
 8. Watanabe T, Nakamura S, Ono T, Ui S, Yagi S, Kagawa H, Watanabe H, Ohe T, Mashino T, Fujimuro M: Pyrrolidinium fullerene induces apoptosis by activation of procaspase-9 via suppression of Akt in primary effusion lymphoma, *Biochem Biophys Res Commun*, 451:93-100, 2014.
 5. 小久保研：水酸化フラーレンの合成と応用、フラーレンの内包技術、シーエムシー出版 第4章5節: 198-210, 2014.
 6. 上野 裕, 小久保研：リチウム内包フラーレン電解還元、フラーレンの内包技術、シーエムシー出版 第3章4節: 117-25, 2014.
 7. 小久保研：アセタール化フラーレンの設計と合成、フラーレンの内包技術、シーエムシー出版 第2章3節: 50-59, 2014.
 8. 上野 裕, 伊熊直彦, 小久保研：球面反応場に着目したフラーレンケージ内外の制御による新規機能分子の創製と応用、*有機合成化学協会誌* 72: 1348-59, 2014.
 9. 小林慶太, 上野 裕, 小久保研, 湯田坂雅子, 保田英洋：官能基の極性に依存した C₆₀ 誘導体の中空状ナノ炭素物質内部空間への内包の傾向、*New Diamond* 31: 28-30, 2015.
 10. 大江知之, 増野匡彦：フラーレン誘導体のライフサイエンス分野における応用、フラーレン誘導体・内包技術の最前線: 237-247, 2014.

【総説・その他】

1. Kokubo K.: Water-Soluble Single-Nano Carbon Particle: Fullerenols and its Derivatives, In "The Delivery of Nanoparticles", Ed., Hashim A. A., Intech; chap. 15, pp. 317-332, ISBN 978-953-51-0615-9, 2012.
2. Ueno H., Nakamura Y., Ikuma N., Kokubo K., Oshima T.: Synthesis of a New Class of Molecule Li⁺@C₆₀O⁻(OH)₇ as a "Cation- Encapsulated Anion Nanoparticle" by Multihydroxyaltion of Li-Encapsulated Fullerene, *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.*, 1529, DOI: 10.1557/opl.2013.49, 2012.
3. 東阪和馬, 堤 康央：安全・安心な最先端医薬としての DDS 開発とレギュラトリーサイエンス-ナノ DDS の安全性評価・確保の現状と今後., 応用が広がる DDS 人体環境から農業・家電まで, NTS 出版, pp. 140-5, 2013.
4. 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
【シンポジウム等：合計 13 件】
1. 堤 康央：薬学への誘い ～安全と安心について～., 三丘カレッジ., 堺 (大阪), 2012 年 6 月.
2. 堤 康央：創薬は何故難しいか., 大阪大学トランスプロフェッショナル・リテラシー科研:第 3 回拡大ワークショップ., 吹田(大阪), 2012 年 7 月.
3. 堤 康央：ナノマテリアルの開発動向と安全性評価., 『ナノバイオテクノロジーの開発と標準化』, 東京 (東京), 2013 年 2 月.
4. 堤 康央：Conclusion ～Sustainable Nanotechnology に向けて～., 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川), 2013 年 3 月.
5. 吉岡靖雄, 堤 康央：ナノ粒子の安全使用に向けた検討：免疫毒性学の観点から., 第 40

- 回日本毒性学会., 千葉(千葉), 2013年6月.
6. 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの物性-動態-生体影響の連関評価., 第40回日本毒性学会., 千葉(千葉), 2013年6月.
 7. Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : The importance of systemic nanotoxicological and toxicokinetic analysis for ensuring the safety of nanomaterials., The XIII International Congress of Toxicology, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
 8. 堤 康央: ナノとバイオを融合した創薬基盤技術~安全かつ有用な最先端医薬の開発を目指して~, シオノギ講演会., 大阪., 2013年7月.
 9. 堤 康央: ナノマテリアルのADMET研究の現状と創薬への展開., 創薬動態フォーラム2013., 金沢(石川), 2013年7月.
 10. 堤 康央: 薬学への招待., 大阪府立三国丘高等学校., 大阪., 2013年8月.
 11. 堤 康央: 医薬品・化粧品・食品素材の毒性・安全性評価~ナノマテリアルを一例に~, 株式会社林原., 2013年9月.
 12. Yoshioka Y., Hirose A. : Recent developments in risk assessment of nanomaterials and nano safety science., 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Interlaken (Switzerland), 1-4 September, 2013.
 13. 堤 康央: 薬学への招待状~創薬の最前線と阪大薬学の挑戦~, 三丘セミナー., 大阪., 2013年12月.
- 生体影響評価., 第39回日本毒性学会学術年会., 仙台(宮城), 2012年7月.
2. 平 茉由, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 1~in vitroにおける抗炎症作用の評価~, 第28回日本DDS学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月.
 3. 青山道彦, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 2~炎症性腸疾患に対する治療効果の検討~, 第28回日本DDS学会学術集会., 札幌(北海道), 2012年7月.
 4. 山下浩平, 吉岡靖雄, 角田慎一, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 堤 康央: 経口投与型サブナノ医薬の開発に向けた水酸化フラーレンの安全性及び有効性評価., 第11回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム., 博多(福岡), 2012年9月.
 5. 平 茉由, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 小椋健正, 青山道彦, 加藤美保, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 1~in vitroにおける細胞毒性及び抗炎症作用の検討~, 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西宮(兵庫), 2012年10月.
 6. 青山道彦, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 山下浩平, 小椋健正, 平 茉由, 加藤美保, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンのナノ安全科学評価と経口サブナノ医薬への展開 2~炎症性腸疾患モデルマウスに対する治療効果の検討~, 第62回日本薬学会近畿支部総会・大会., 西

【国内学会発表：合計18件】

1. 山下浩平, 吉岡靖雄, 潘 慧燕, 小椋健正, 平 茉由, 青山道彦, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤 康央: 水酸化フラーレンの安全性確保に向けた経口投与時の

- 宮 (兵庫) , 2012 年 10 月.
7. 永野貴士, 吉岡靖雄, 山下浩平, 平 菜由, 青山道彦, 吉田徳幸, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 鍋師裕美, 吉川友章, 東阪和馬, 堤 康央: 炎症性腸疾患に対する新規ナノ医薬の開発に向けて~水酸化フラーレンの構造-活性相関に関する基礎情報の収集~, 日本薬学会第 133 年会., 横浜 (神奈川) , 2013 年 3 月.
 8. 吉岡靖雄, 平 菜由, 山下浩平, 青島央江, 角田慎一, 中山博之, 藤尾 慈, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規経口ナノ DDS 医薬の開発に向けた C60 フラーレン誘導体の Nano-Safety Design., 第 29 回日本 DDS 学会学術集会., 京都 (京都) , 2013 年 7 月.
 9. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 佐上公一, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: 新規ナノ医薬の開発に向けた C60 フラーレンの T 細胞への影響評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本) , 2014 年 3 月.
 10. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 佐上公一, 角田慎一, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: エンドトキシンショックモデルマウスにおける水酸化 C60 フラーレンの抗炎症効果., 日本薬学会第 134 年会., 熊本(熊本), 2014 年 3 月.
 11. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 高橋秀樹, 宇高麻子, 植村瑛一郎, 角田慎一, 青島央江, 中村友治, 小久保 研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: グルコース修飾 C60 フラーレンの in vitro における抗炎症作用の解析., 日本薬学会第 134 年会., 熊本 (熊本) , 2014 年 3 月.
 12. 平井敏郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価~in vitro における評価~, 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 13. 高橋秀樹, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 青島央江, 上野 裕, 小久保 研, 大島 巧, 大江知之, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の体内動態解析に向けた基礎的検討., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 14. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 宇高麻子, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の免疫抑制剤としての有効性評価~in vivo における評価~, 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 15. 佐上公一, 吉岡靖雄, 平井敏郎, 大江知之, 青島央江, 小久保 研, 大島 巧, 増野匡彦, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の抗炎症メカニズムに関する基礎的検討., 第 30 回日本 DDS 学会., 東京, 2014 年 7 月.
 16. 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 植村瑛一郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討~in vivo における獲得免疫抑制作用の検討~, 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
 17. 植村瑛一郎, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎, 高橋秀樹, 佐上公一, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: C60 フラーレン誘導体の炎症性腸疾患に対する医薬品応用に向けた検討~in vitro における抗体産生抑制能のメカニズム解明~, 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.
 18. 佐上公一, 吉岡靖雄, 宇高麻子, 平井敏郎,

高橋秀樹, 植村瑛一郎, 角田慎一, 大江知之, 増野匡彦, 青島央江, 小久保研, 大島 巧, 東阪和馬, 堤 康央: MAPK に注目した C60 フラーレン誘導体による抗炎症作用メカニズムの検討., 第 87 回日本生化学会大会., 京都, 2014 年 10 月.

【国際学会発表 : 合計 11 件】

1. Yamashita K., Yoshioka Y., Pan H., Ogura T., Taira M., Aoyama M., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Aishima H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : The basic safety assessment of fullerene C60 after oral administration., SETAC Europe 22st Annual Meeting, Berlin, (Germany), 20-24 May, 2012.
2. Taira M., Yoshioka Y., Pan H., Yamashita K., Ogura T., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Safety science of fullereneol C₆₀ for developing nanomedicine 1 - anti-inflammatory effect of fullereneol C₆₀ in vitro-, The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
3. Aoyama M., Yoshioka Y., Pan H., Yamashita K., Ogura T., Taira M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Safety science of fullereneol C60 for developing nanomedicine 2 -safety and efficacy assessment of fullereneol C60 in oral exposure-, The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
4. Yamashita K., Yoshioka Y., Pan H., Ogura T., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : The basic safety assessment of fullereneol C60 after oral exposure, SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto (Japan), 24-27 September, 2012.
5. Udaka A., Yoshioka Y., Hirai T., Tsunoda S., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The effect of fullerene C60 derivatives on acquired immune system., The XIII International Congress of Toxicology 2013, Seoul (Korea), 30 June-4 July, 2013.
6. Nagano T., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullereneol C60 for developing nanomedicine Part 2 -Assessment of therapeutic effect of fullereneol C60 for inflammatory bowel disease-, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
7. Aoyama M., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Nagano T., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullereneol C60 for developing nanomedicine Part. 1 -Assessment of anti-inflammatory effect of fullereneol C60 -, 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release

- Society, Honolulu, Hawaii (USA), 21-24 July, 2013.
8. Higashisaka K., Nagano T., Taira M., Yamashita K., Tsunoda S., Nakayama H., Fujio Y., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Fullerenol C60 as a new therapeutic nanomedicine for inflammatory bowel disease., International Conference and Exhibition on Personalized Medicine and Molecular Diagnostics, Chicago (USA), 5-7 August, 2013.
 9. Yoshioka Y., Udaka A., Hirai T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Ohe T., Mashino T., Tsunoda S., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Fullerene C60 derivatives suppress the acquired immune responses., Immunology 2014., Pittsburgh (USA), 2-6 May, 2014.
 10. Uemura E., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Sagami K., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Improvement of dispersibility of fullerene C60 derivative by Pluronic F-127 and the potential to enhance anti-inflammatory effect of C60 derivative., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah (Malaysia), 9-12 October, 2014.
 11. Sagami K., Yoshioka Y., Hirai T., Takahashi H., Uemura E., Tsunoda S., Ohe T., Mashino T., Aoshima H., Kokubo K., Oshima T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Anti-inflammatory mechanism of C60 pyrrolidine tris-acid (C60-P) on Caco-2 cells., Federation of Asian Pharmaceutical Associations Congress 2014, Sabah (Malaysia), 9-12 October, 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
国際特許出願番号：PCT/JP2014/053950
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
発明者：堤 康央、吉岡 靖雄、東阪 和馬、増野匡彦、大江 知之、山名 修一、青島 央江
出願年月日：2014 年 2 月 19 日
- ② **実用新案登録**
該当無し
- その他**
該当無し
- 研究協力者**
大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員 5 名・大学院生/学生 37 名）：東阪和馬助教、三浦直樹研究員、橋野修代、長橋里佐子、村山香理、山下浩平、吉田徳幸、畑 勝友、平井敏郎、森下裕貴、今井峻司、宇治美由紀、小椋健正、佐藤宏祐、平 茉

由、高橋秀樹、永野貴士、前田祐香、三里一貴、青山道彦、市橋宏一、宇高麻子、加藤美保、國枝章義、野尻奈央、森 宣瑛、岩原有希、植村瑛一郎、佐上公一、瀧村優也、田中康太、田中智大、西嶋伸郎、山口真奈美、石本里緒、難波佑貴、西川雄樹、半田貴之、和泉夏実、清水雄貴、真木彩花

独立行政法人医薬基盤研究所（職員 8 名・大学院生 2 名）：角田慎一プロジェクトリーダー、鎌田春彦サブプロジェクトリーダー、長野一也研究員、井上雅己研究員、山下琢矢研究員、國丸亜記、細野恵里佳、ソムブントム プラニー、瀧慎太郎、安藤大介

独立行政法人医薬基盤研究所抗体スクリーニングプロジェクト（職員 1 名）：向 洋平サブリーダー

理化学研究所/FLOX株式会社（職員1名）：田島右副ユニットリーダー

日立ハイテクノロジーズ（職員 1 名）：
柿林博司主管技師、中澤英子統括主管技師

<オブザーバー>

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

<産官学アドバイザーボード（外部評価）>

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

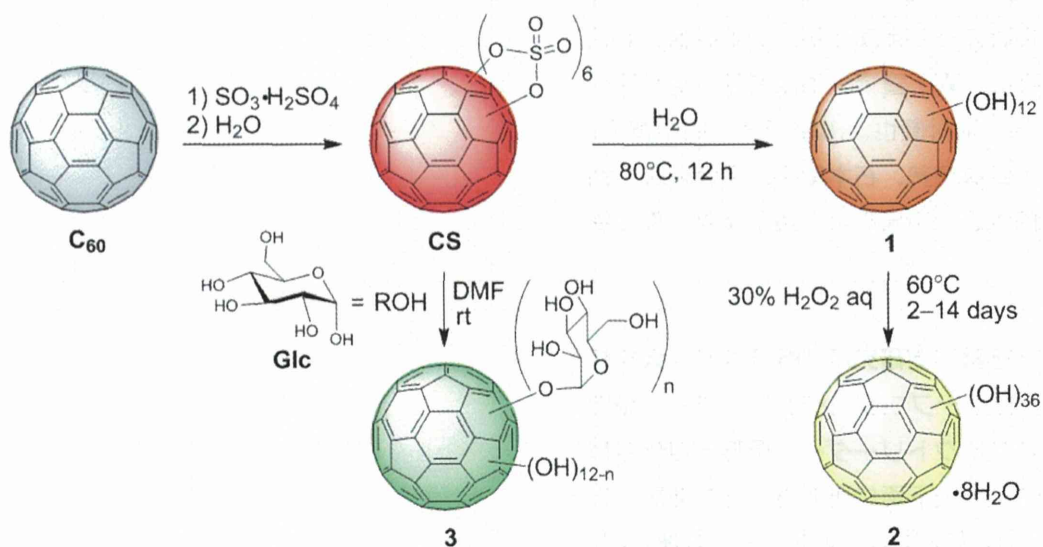


図1. グルコース修飾水酸化フラーレンの合成経路. 水酸化フラーレンOH12 (1) およびOH36 (2) の合成中間体であるシクロ硫酸化エステルフラーレン (CS) に α -D-グルコース (Glc) を作用させることで部分グルコース化水酸化フラーレン (3) を得た。

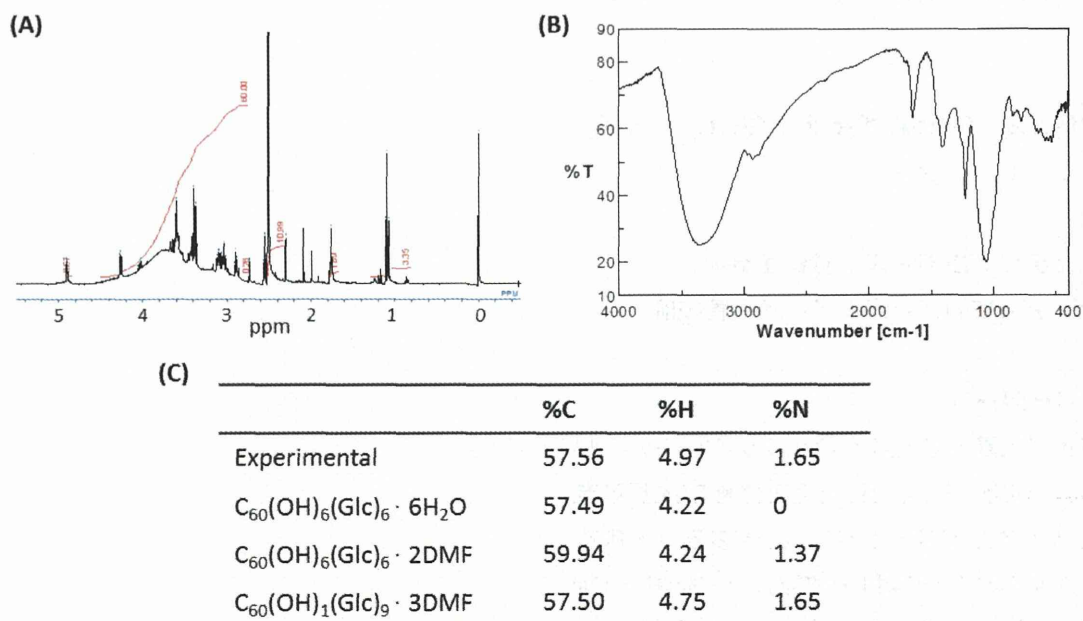


図2. グルコース修飾水酸化フラーレンの同定. (A) 1H NMR: グルコース由来のピークを確認した。また、1位のプロトンが消失していることから、1位にて結合したことが示唆された。(B) IR: 水酸化フラーレンに特徴的な4つのピークを確認した。さらに、それ以外のピークが存在することも確認された。(C) 元素分析: 組成比から、グルコース部位導入されたことが確認され、平均6~9個と見積もられた。しかし、溶媒DMFの残留が幾分見られた。

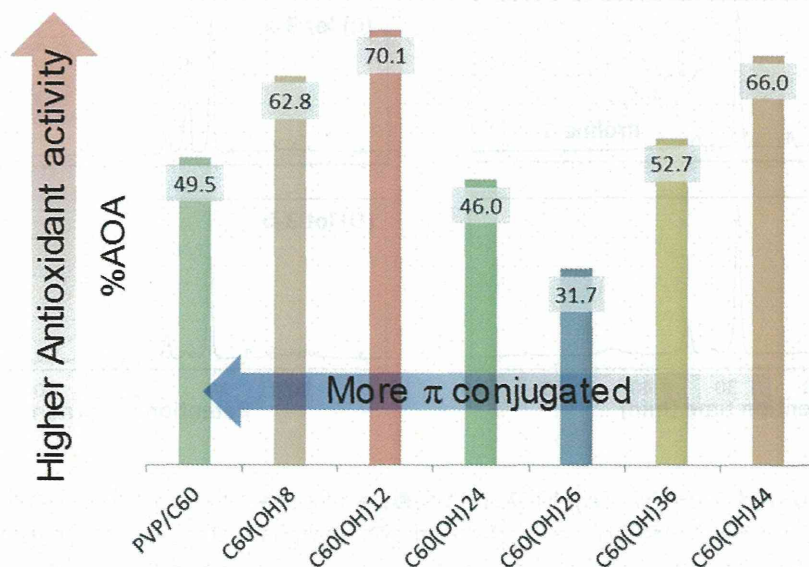


図3. β-カロテン退色法による水酸化フラレンの抗酸化能評価。フラレンC₆₀ (PVPにより包摂して水溶化したもの) に比べて、水酸化フラレンC₆₀(OH)₁₂やC₆₀(OH)₄₄ではより高い抗酸化能 (%AOA) を示した。水酸基数の増加に伴い、C₆₀(OH)₂₆までは一旦抗酸化能は減少し、さらなる増加で再び向上した。このように二か所で極大値を示したことから、抗酸化能(ラジカル捕捉能)メカニズムは、水酸基数が少ないものと多いもので異なる可能性があることが示唆された。

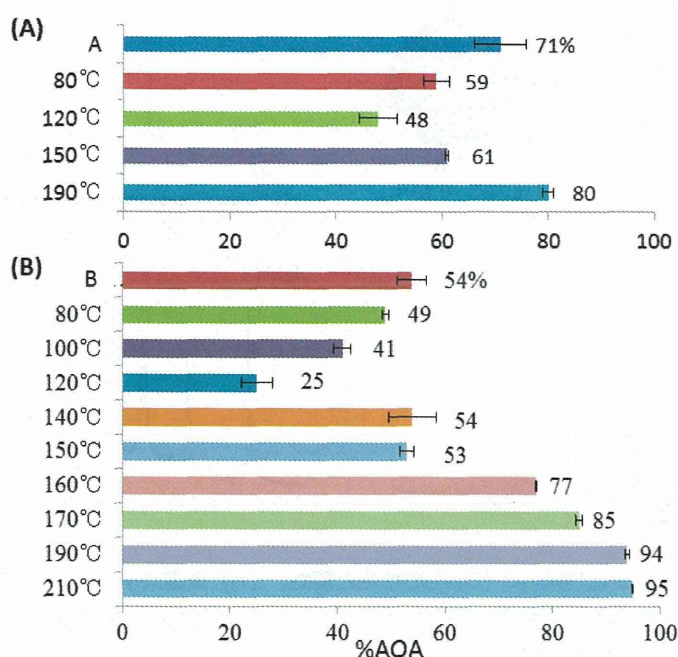


図4. 水酸化フラレンC₆₀(OH)₃₆の加熱による抗酸化能の変化。(A) lot Aの水酸化フラレンを各温度にて2.5時間加熱後に抗酸化能を測定した(%AOA at 20 μM)。(B) lot Bの水酸化フラレンも同様に加熱後に抗酸化能を測定した(%AOA at 100 μM)。いずれのlotにおいても、120°Cの加熱までは抗酸化能が減少し、それ以上の温度での加熱により徐々に向上した。また、190°C以上の高温加熱では、未加熱時の抗酸化能を上回った。

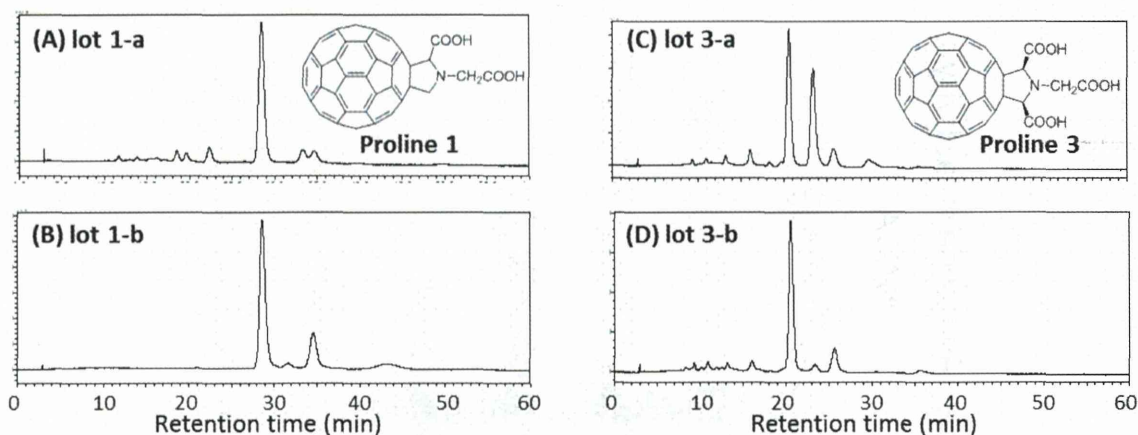


図5. プロリン誘導体のHPLCチャート。(A)(B) プロリン誘導体1 : lot 1-aおよび1-bについてHPLC分析を行った。いずれのlotにおいてもよくピーク分離されており、主生成物の保持時間はほぼ同じであった。(C)(D) プロリン誘導体3 : lot 3-aおよび3-bについてHPLC分析を行った。lot 3-aについては、主生成物の後ろに異性体と考えられるピークが大きく観察されたことから、エステル誘導体の加水分解処理時に異性化が起こったと考えられる(カラム: Buckyrep-M (4.6 φ - 250 mm); 移動相: 0.1%TFA-DMF/Methanol=1/1; 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

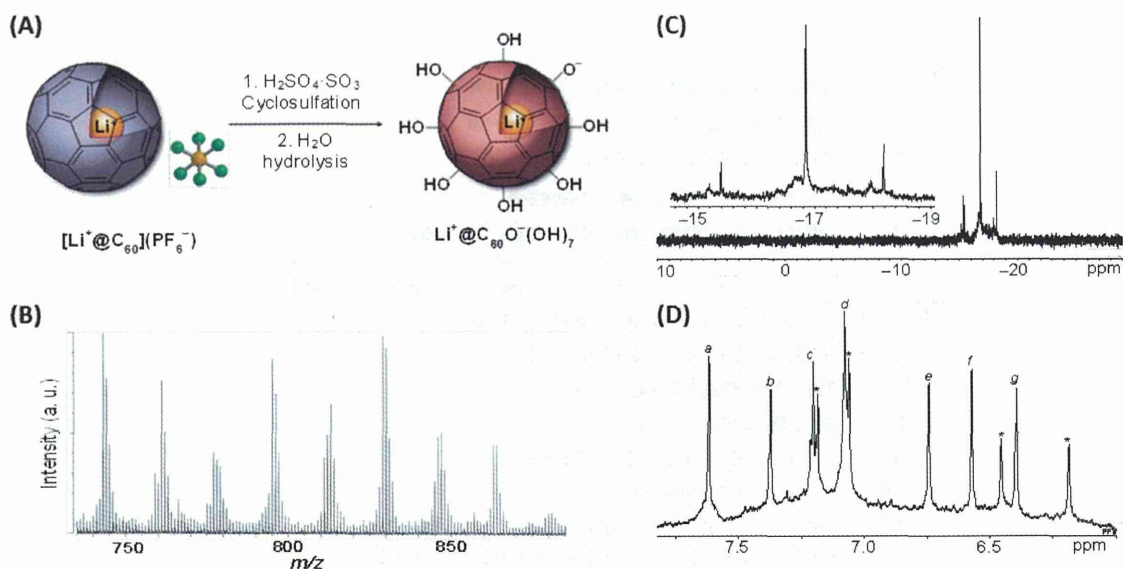


図6. リチウム内包水酸化フラーレン $\text{Li}^+\text{@C}_{60}\text{O}^-(\text{OH})_7$ の合成と同定。(A) 合成スキーム : 発煙硫酸法により合成を行った。(B) MALDI-TOF-MS: (C) ^7Li NMR : 内包リチウムのシグナルを低磁場側に観測した。(D) ^1H NMR : シャープなピークを高磁場側に7本(a~g)観測した。

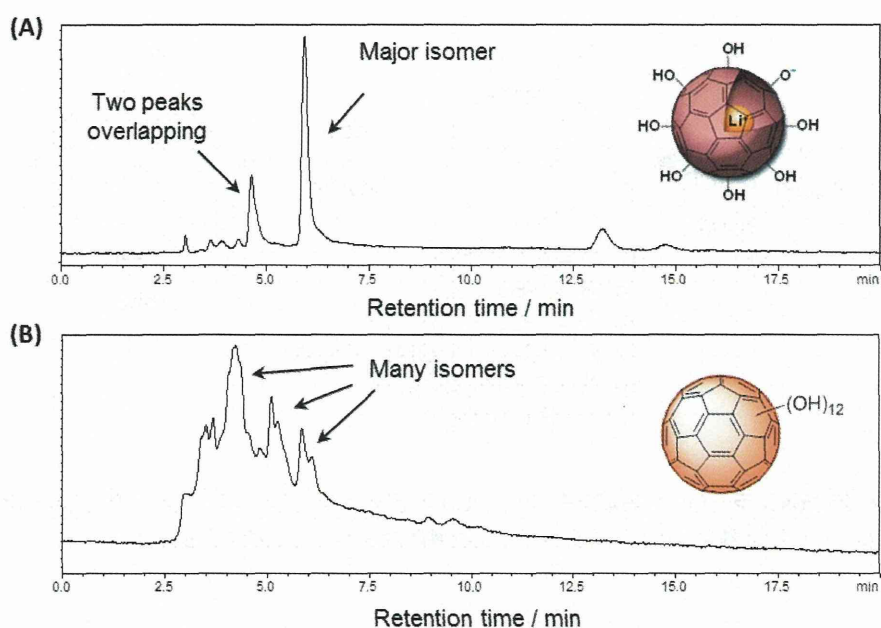


図7. リチウム内包ならびに非内包水酸化フラーレンのHPLCチャート. (A) $\text{Li}^+\text{@C}_{60}\text{O}(\text{OH})_7$: 水酸基の付加位置選択性が比較的高い. (B) $\text{C}_{60}(\text{OH})_{12}$: 水酸基の付加位置選択性が非常に低い. これらの結果は、水酸化の反応機構が異なることを示唆する.

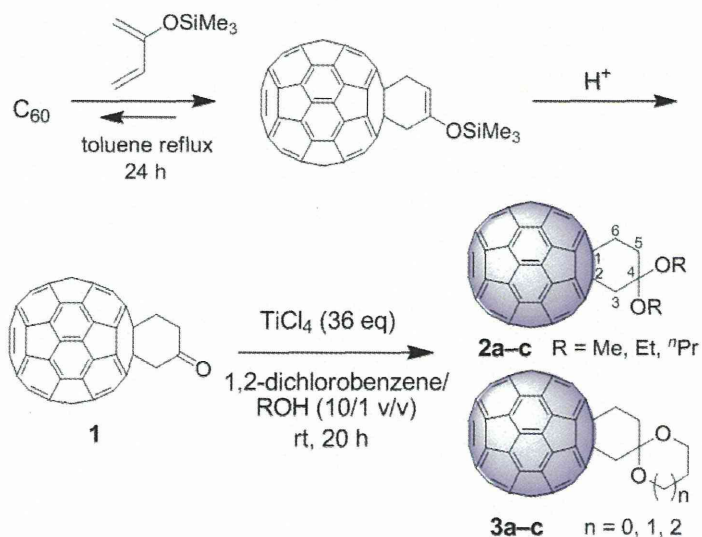


図8. 新規アセタール化58 π 系フラーレンの合成スキーム. Diels-Alder反応によりシクロヘキサノン誘導体 1 を合成中間体として合成し、さらに四塩化チタンを用いて非環状ならびに環状アセタール誘導体を合成した.

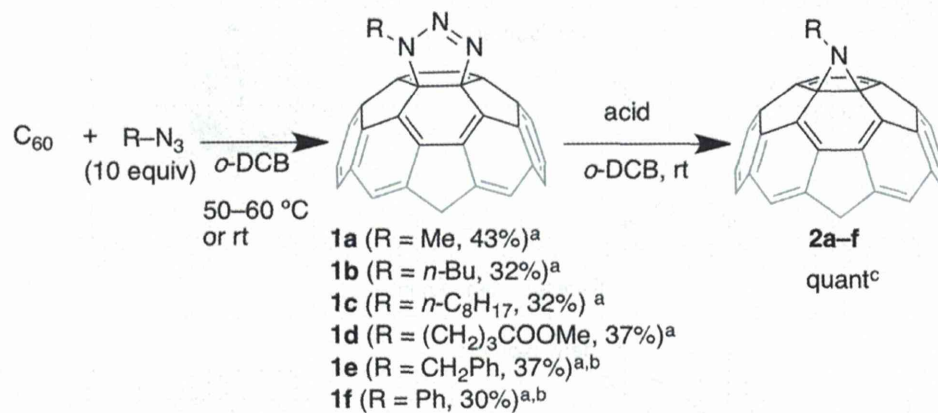


図9. 新規アジリジノ化58π系フラーレンの合成スキーム. 1,3-双極子付加反応によりトリアゾリノ誘導体**1a-f**を合成中間体として合成し、さらに酸触媒を用いてアジリジノ化誘導体**2a-f**へと定量的に変換した。

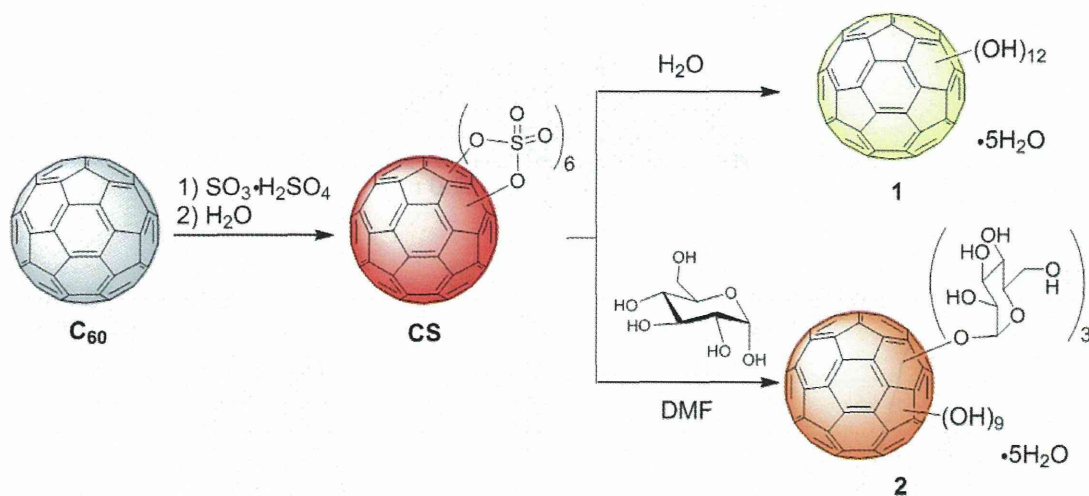


図10. グルコース化水酸化フラーレンの合成. 水酸化フラーレンC₆₀(OH)₁₂ · 5H₂O (1) の合成中間体であるシクロ硫酸化フラーレン (CS) にα-D-グルコースをDMF中で作用させ、グルコース化水酸化フラーレンC₆₀(OH)₉(Glc)₃ · 5H₂O (2) を得た。

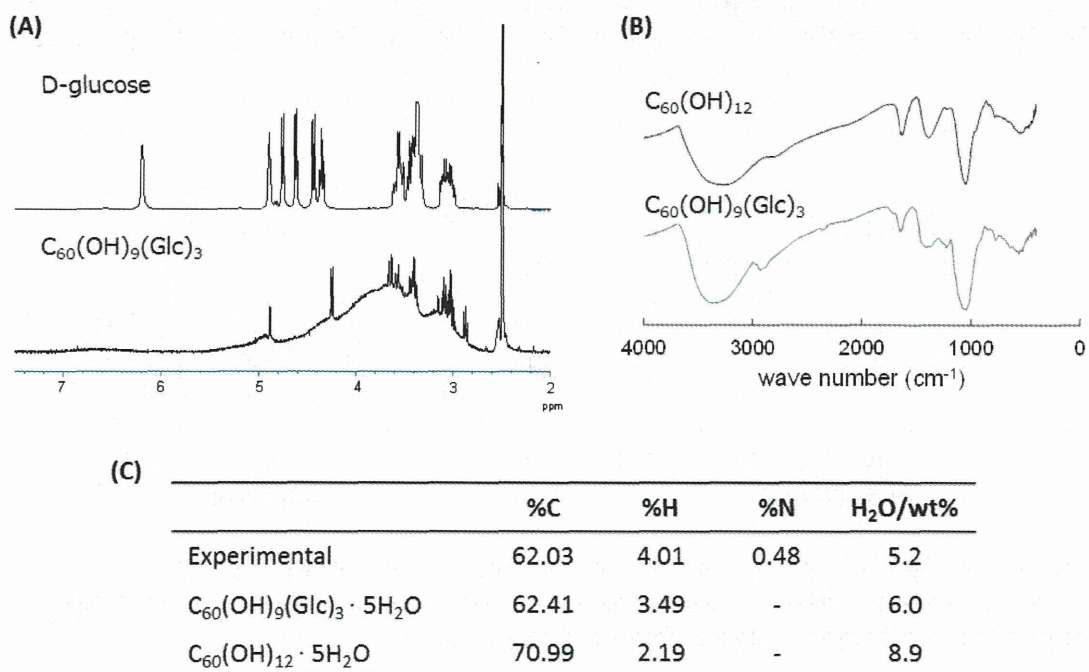


図11. グルコース化水酸化フラーレンの同定. (A) ¹H NMR: グルコース由来ピークの存在を確認し、6 ppm付近の1位のプロトンが消失したことから、1位で結合していると推定された。(B) IR: 水酸化フラーレンに特徴的な4つのピークを確認し、それ以外のグルコース由来ピークも存在することが確認された。(C) 元素分析: 組成比から、グルコース部位が平均3つ導入されたことが示唆され、水分測定の結果と合わせ、推定平均構造をC₆₀(OH)₉(Glc)₃ · 5H₂Oと決定した。

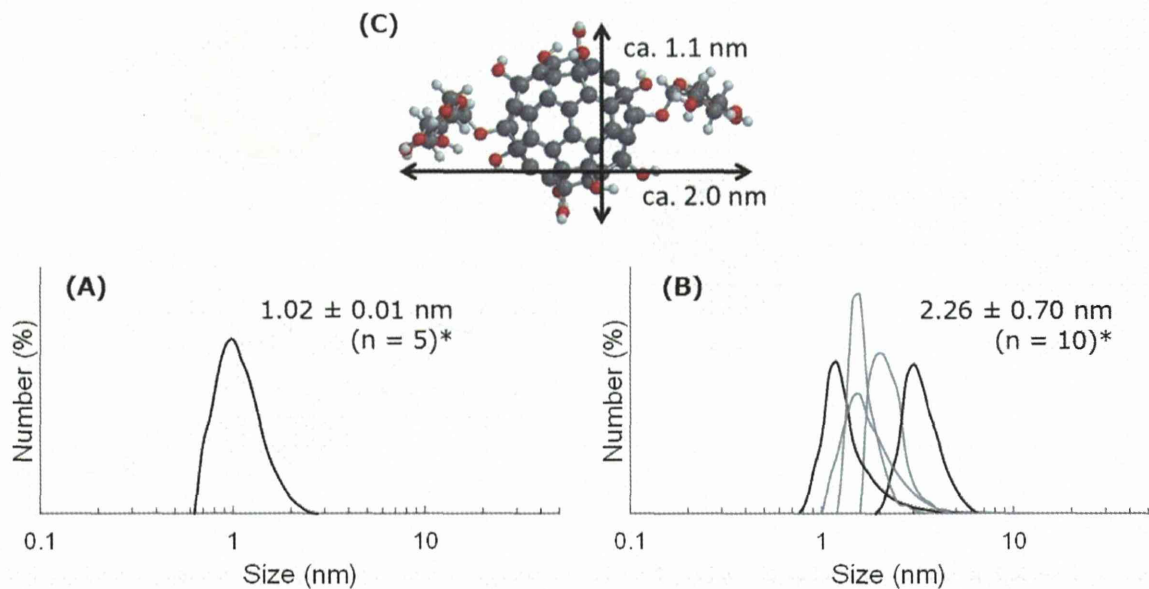


図12. IG法による粒径分布測定. (A)水酸化フラーレン：DMSO溶液（1 mg/mL）を用いて測定した。平均粒径、標準偏差、測定回数（重ね合わせ）を図中に示す。(B)グルコース化水酸化フラーレン：DMSO溶液（20 mg/mL）を用いて測定した。(B)グルコース化水酸化フラーレンの分子モデル：水酸化部位（縦方向）ならびにグルコース化部位（横方向）の直径はそれぞれ約1.1および2.0 nmと計算され、粒径分布測定の結果とよく一致した。

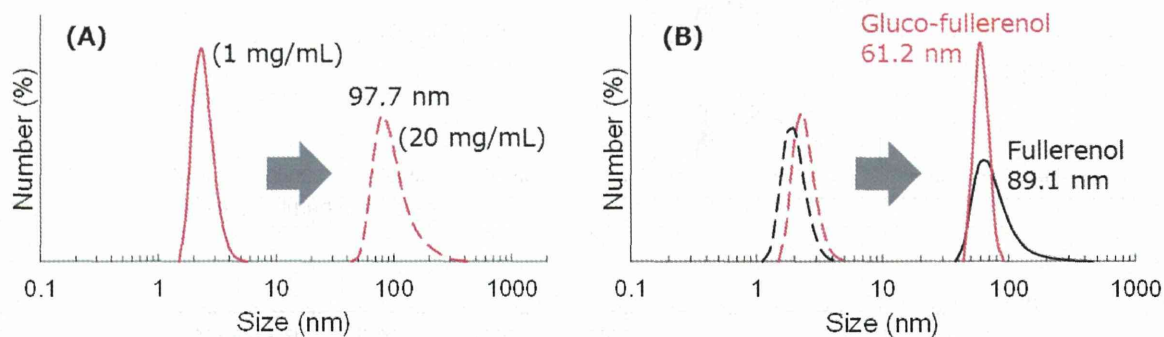
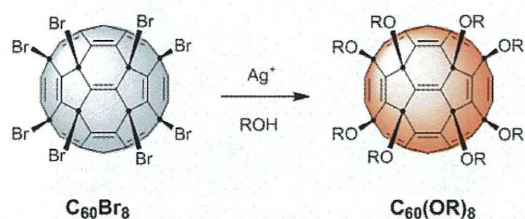


図13. グルコース化水酸化フラーレンのDLS法による粒径分布測定. (A)DMSO溶液：高濃度溶液（20 mg/mL）においては約100 nm程度まで凝集している様子が観察された。(B)DMSO/H₂O=1/9溶液：DMSO溶液に水を加えて90%水溶液とした場合も約60 nm程度まで凝集する様子が観察された。

(A)



(B)

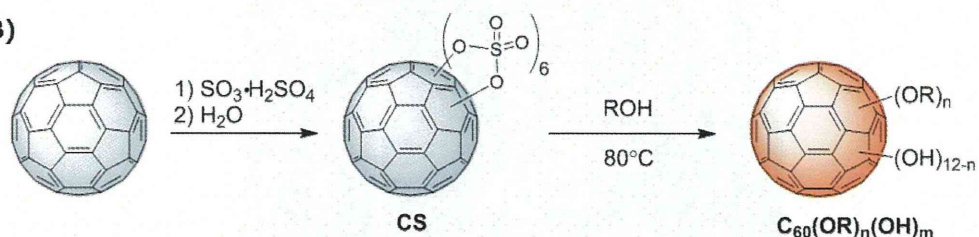
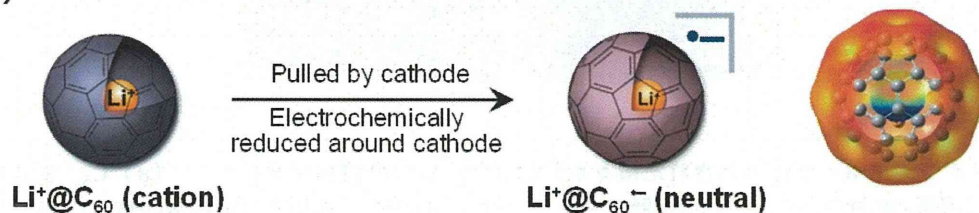


図14. アルコキシ化フラーレンの合成スキーム. (A)臭素化フラーレン($C_{60}Br_8$)の求核置換反応: S_N1 メカニズムにより位置選択的に進行する. (B)シクロ硫酸エステル化フラーレン(CS)の求核置換反応: S_N2' メカニズムにより位置ランダム的に進行する ($R = -CH_2CH_2OH$).

(A)



(B)

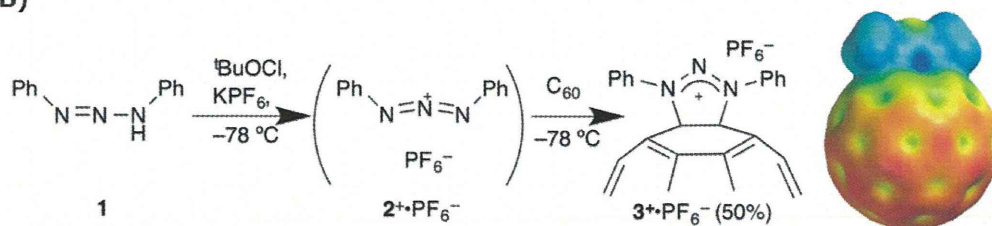


図15. 新規フラーレン誘導体の合成スキームおよび静電ポテンシャルマップ. (A) リチウムイオン内包フラーレンラジカルアニオン: 電解還元法により合成した. 静電ポテンシャルマップの赤色部は負の、青色部は正の部分電荷を有する. (B) ペリ共役トリアゾリウムフラーレン: 1,3-ジアザ-2-アゼニアアレンとの[3+2]環化付加により合成した.