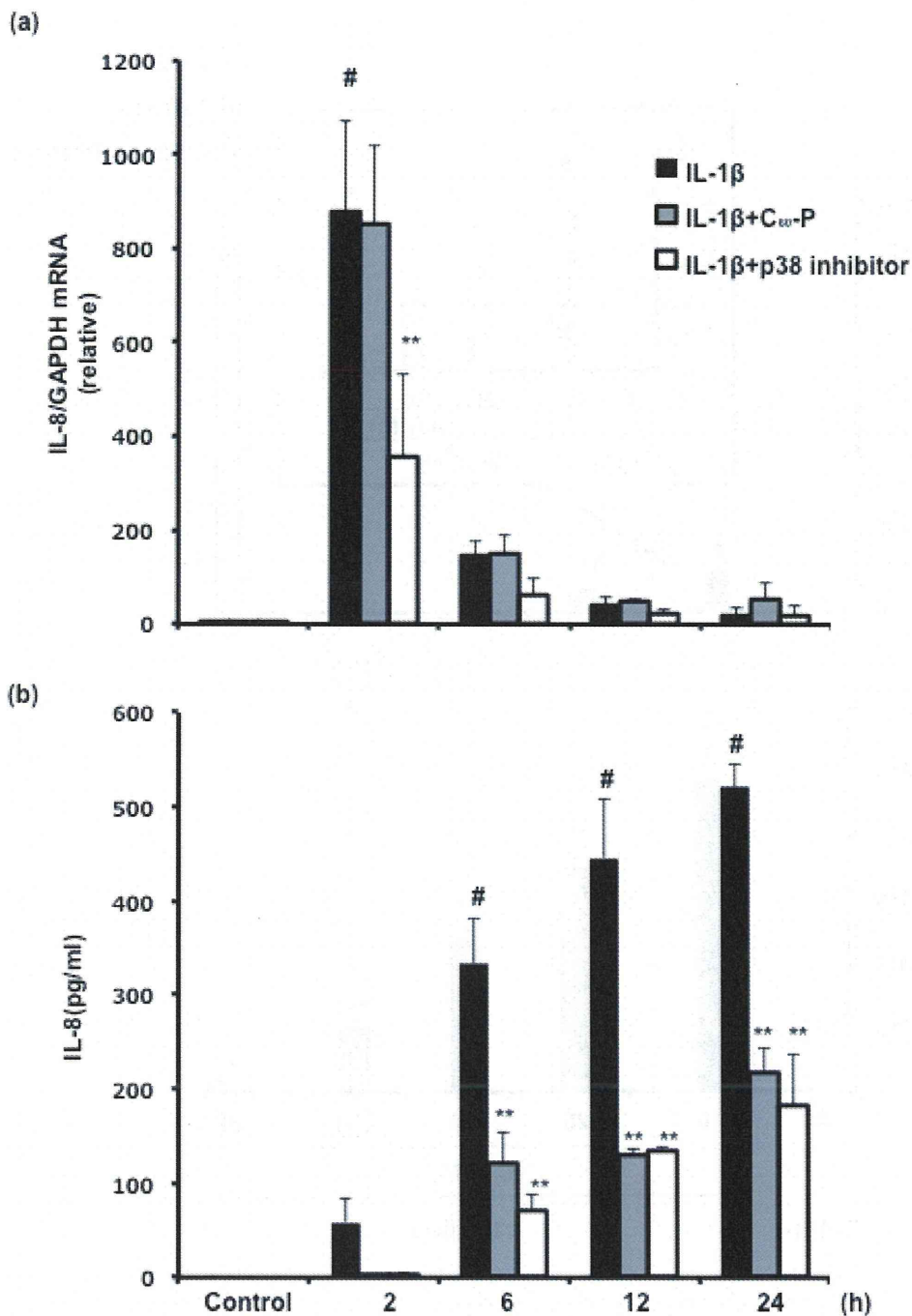
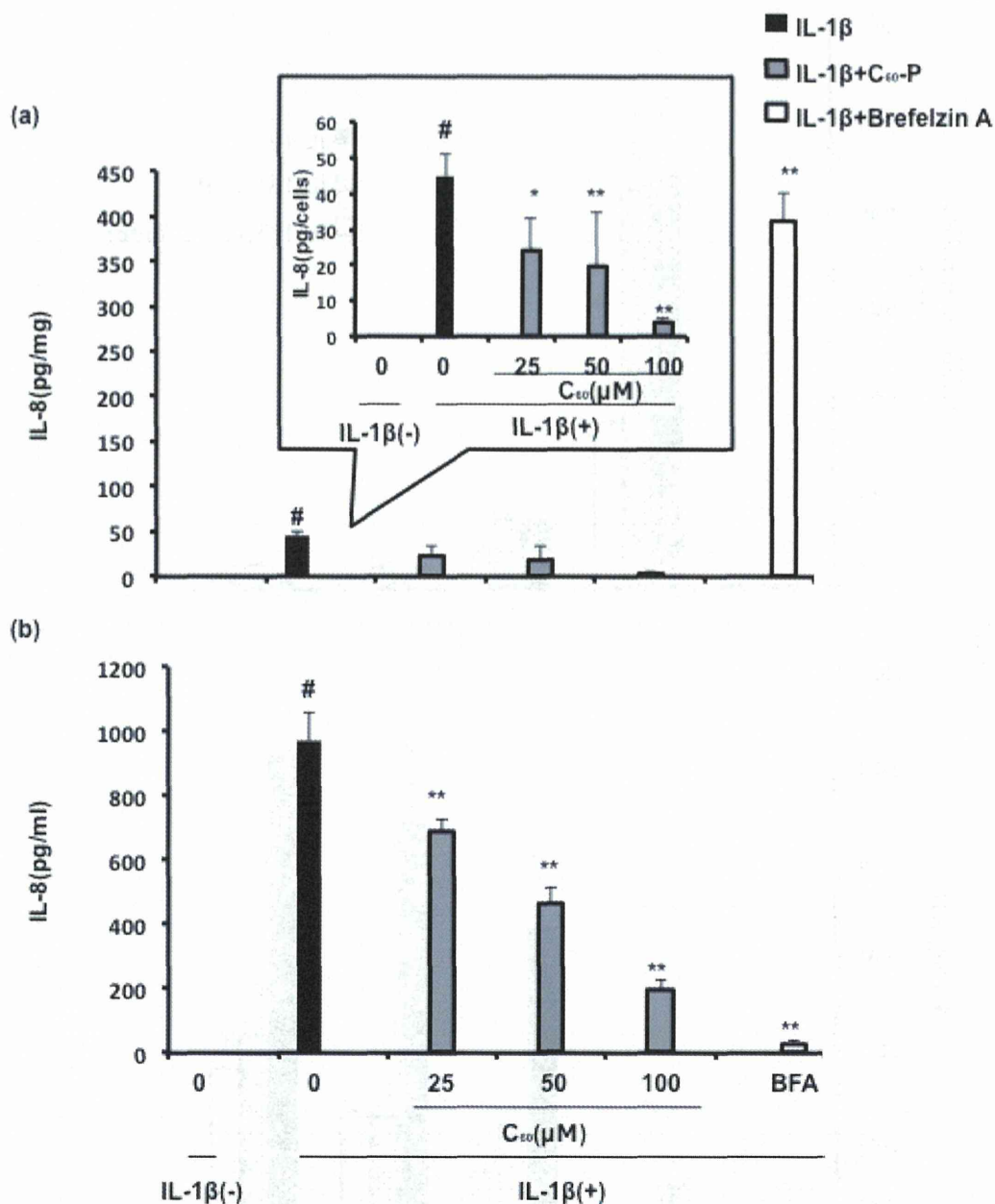


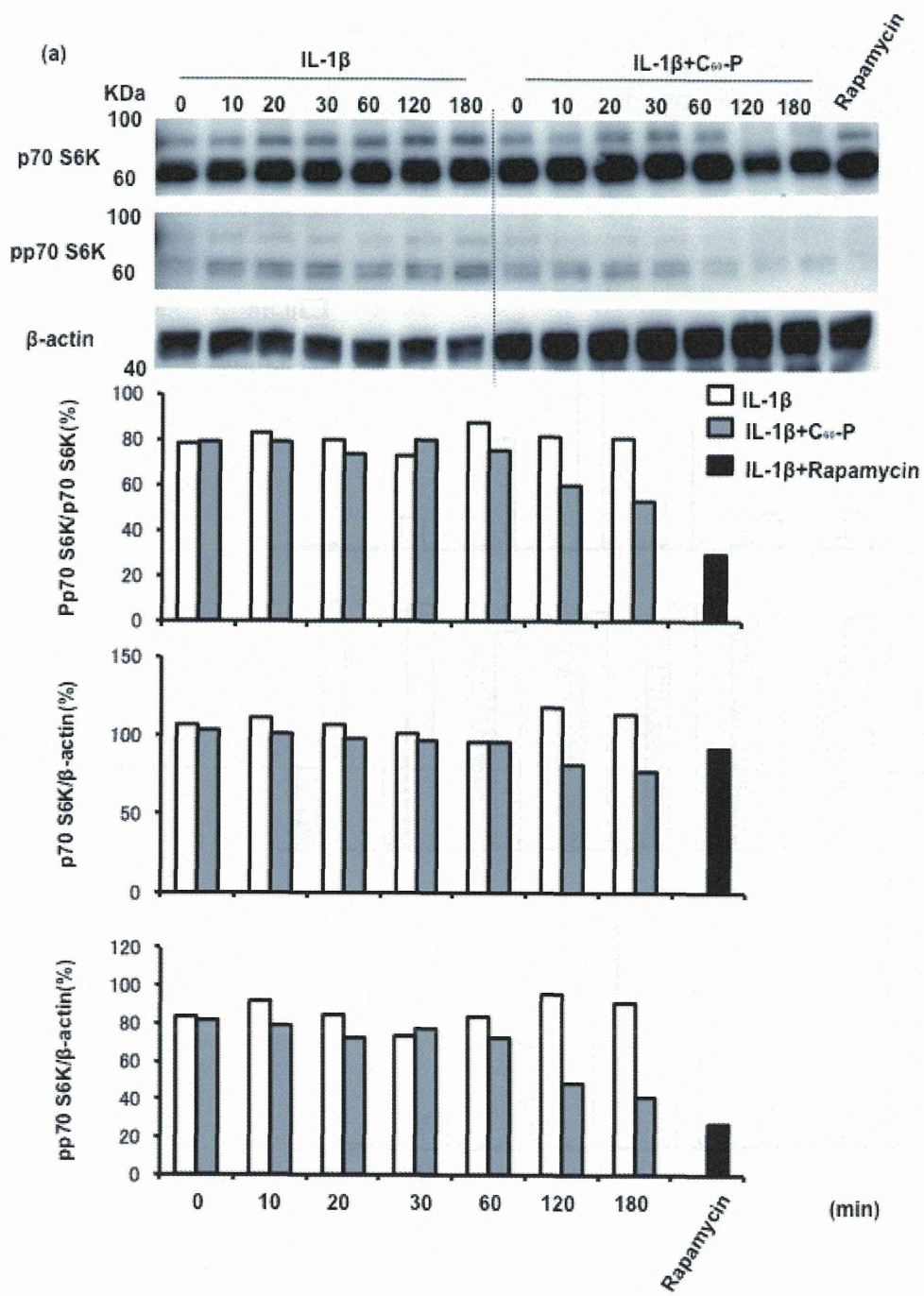
**Fig 70** The effects of C60 fullerene derivatives on JNK, p38 and ERK phosphorylation and I $\kappa$ B degradation in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C60 fullerene derivatives (100  $\mu$ M) for 30 min and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for indicated time. The cell lysates were subjected to Western blotting, using antibodies for the phosphorylated form and total protein of JNK (a), p38 (b), ERK (c) and I $\kappa$ B (d). Amounts of JNK, p38, ERK, phosphorylated JNK, p38, ERK and  $\beta$ -actin in each time was determined by western blotting. Band intensity was quantified from western blotting images using ImageJ. JNK, p38, ERK phosphorylation was corrected by JNK, p38, ERK.  $\beta$ -actin was used as an endogenous control.

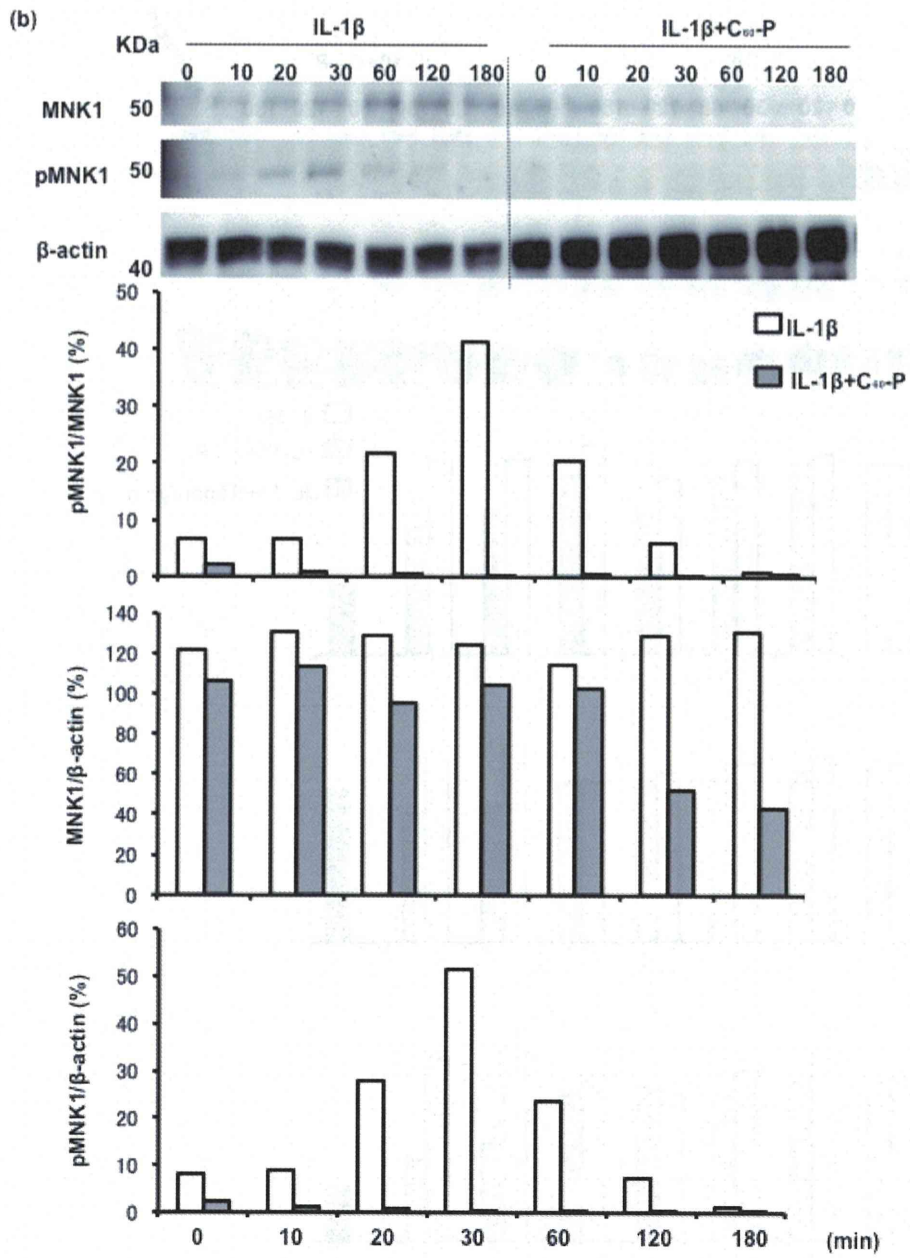


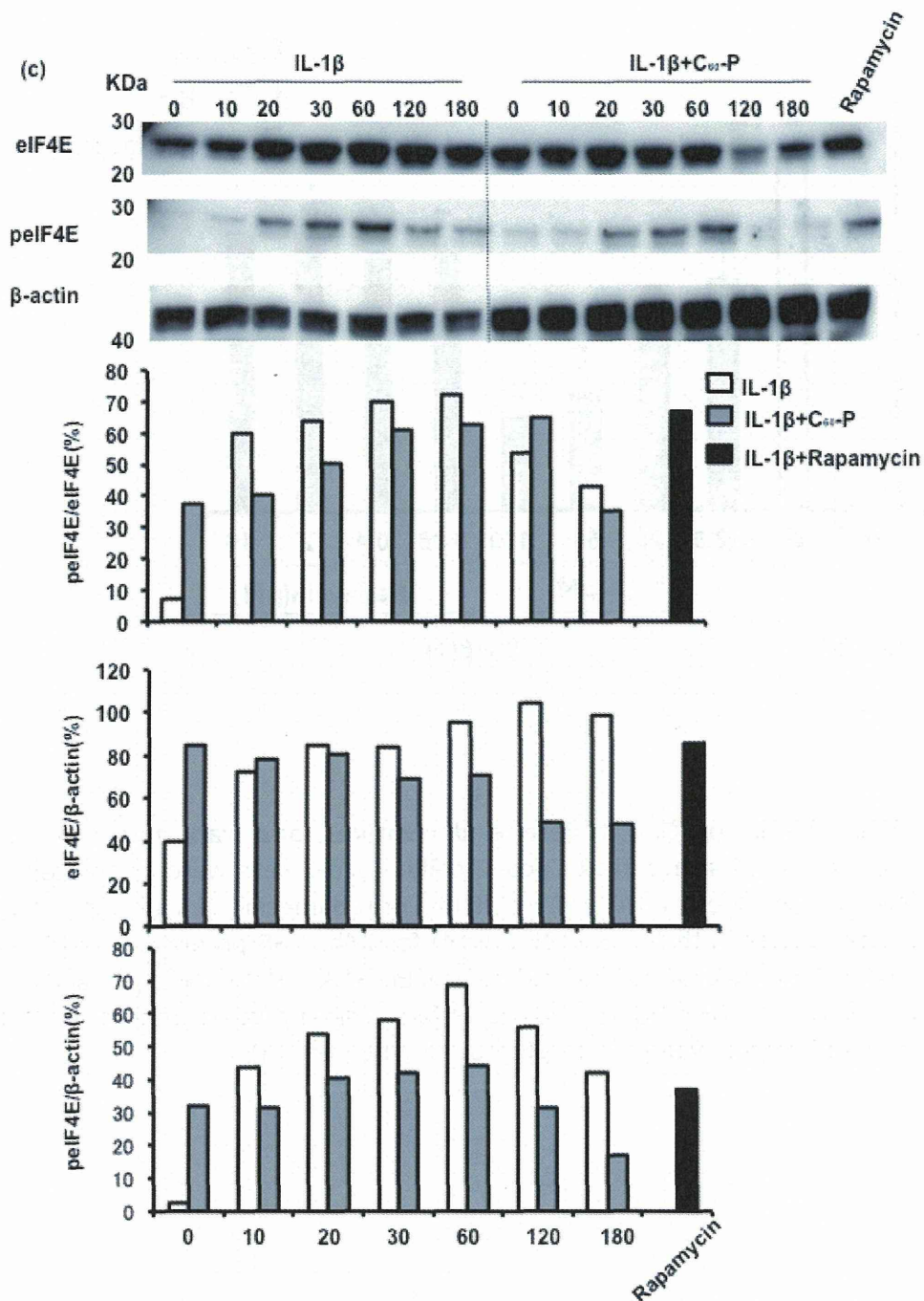
**Fig 71** The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on IL-8 mRNA expression and IL-8 production in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> derivatives (100  $\mu$ M) or SB203580 (20  $\mu$ M) for 30 min, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for indicated time. Relative levels of IL-8 mRNA was measured by realtime PCR. IL-8 production level in the culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3; <sup>#</sup>*P* < 0.01 versus value for control group by Bonferroni; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01, <sup>\*</sup>*P* < 0.05 versus value for IL-1 $\beta$  group by Bonferroni)



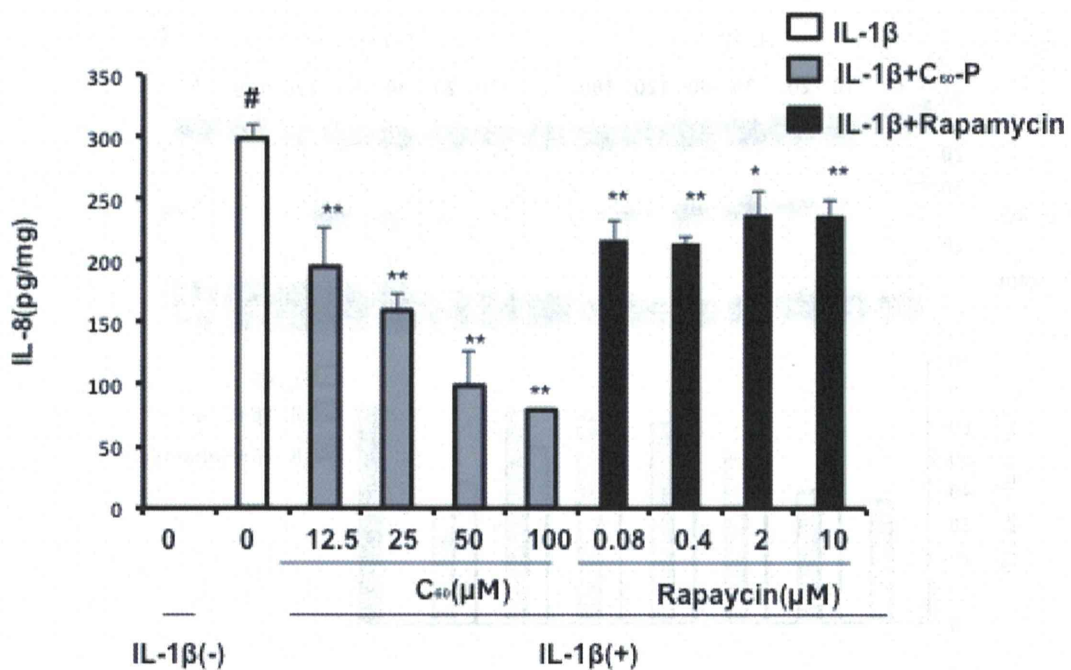
**图 72 The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on intracellular and extracellular IL-8 production in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> derivatives (100  $\mu$ M) and brefelzin A (1  $\mu$ g/ml) for 30 min, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for 24h. IL-8 production level in the (a) cell lysate and (b) culture supernatant was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 4; #*P* < 0.01 versus value for control group by Bonferroni; \*\**P* < 0.01, \**P* < 0.05 versus value for IL-1 $\beta$  group by Bonferroni)



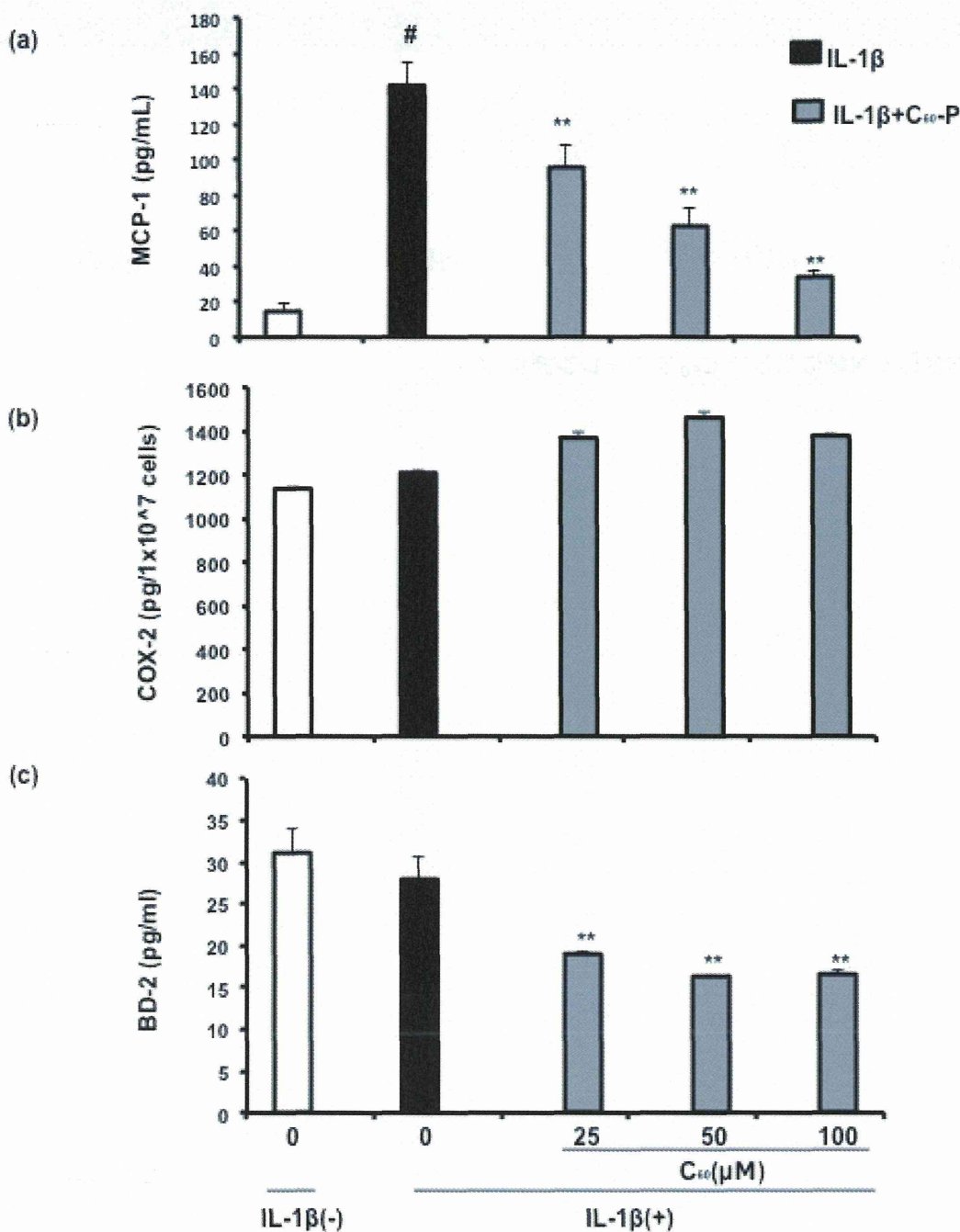




**图 73** The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on eIF4E, p70 S6K, MNK1 phosphorylation and expression in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells. Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> fullerene derivatives (100  $\mu$ M) for 30 min or rapamycin (10  $\mu$ M) for 1 hours, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for indicated time. The cell lysates were subjected to Western blotting, using antibodies for the phosphorylated form and total protein of p70 S6K (a), MNK1 (b), eIF4E (c). Amounts of eIF4E, p70 S6K, MNK1, phosphorylated eIF4E, p70 S6K, MNK1 and  $\beta$ -actin in each time was determined by western blotting. Band intensity was quantified from western blotting images using ImageJ. eIF4E, p70 S6K, MNK1 phosphorylation was corrected by eIF4E, p70 S6K, MNK1.  $\beta$ -actin was used as an endogenous control.



**图 74 The effects of C60 fullerene derivatives and rapamycin on IL-8 production in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C60 fullerene derivatives (100  $\mu$ M) for 30 min or rapamycin (10  $\mu$ M) for 1 hours, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for 24h. IL-8 production level in the culture supernatant and was measured by IL-8 ELISA kit. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3; #P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni; \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 versus value for IL-1 $\beta$  group by Bonferroni)



**Fig 75 The effects of C<sub>60</sub> fullerene derivatives on production of MCP-1, COX-2, BD-2 in IL-1 $\beta$ -stimulated Caco-2 cells.** Caco-2 cells were pretreated with C<sub>60</sub> derivatives for 30 min, and then, stimulated with IL-1 $\beta$  (125 ng/ml) for 24 h. MCP-1 and BD-2 production level in the culture supernatant was measured by MCP-1 (a) and BD-2 (b) ELISA kit. COX-2 production level in the cell lysate was measured by COX-2 ELISA kit. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.D. (n = 3; #P < 0.01 versus value for control group by Bonferroni; \*\*P < 0.01, \*P < 0.05 versus value for IL-1 $\beta$  group by Bonferroni)



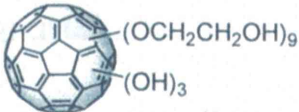
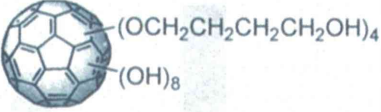
名称	ヒドロキシエチル エーテル化フラーレン	ヒドロキシシルブチル エーテル化フラーレン	エチルエーテル化 フラーレン
構造式	 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>9</sub> (OH) <sub>3</sub>	 (OCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>4</sub> (OH) <sub>8</sub>	
表記	HEE	HBE	ETO

図 76 本検討で実験に供した C<sub>60</sub> フラーレン誘導体

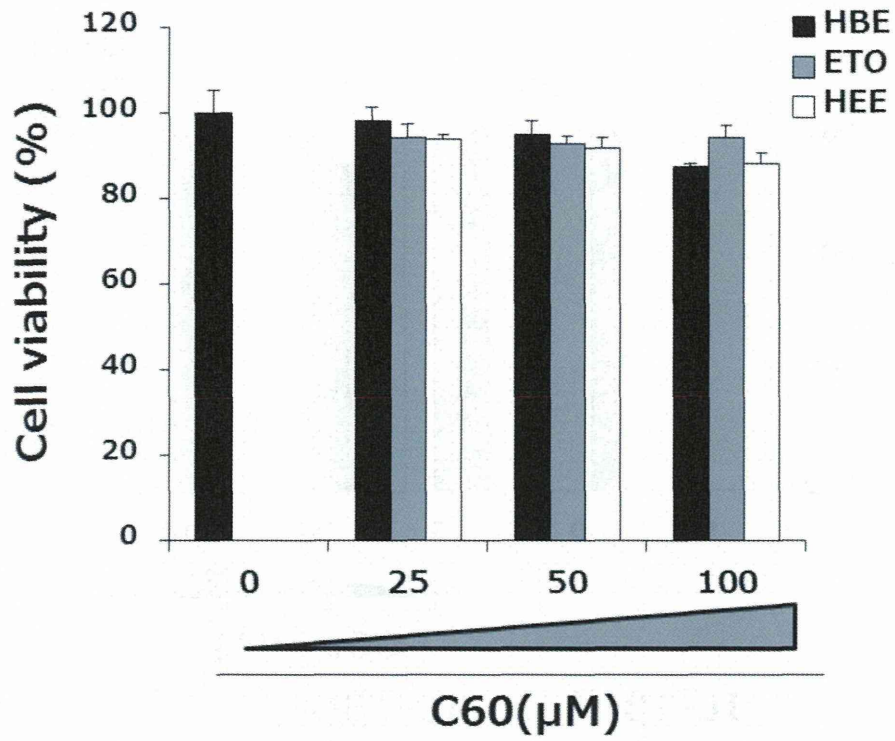


図 77 各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の細胞傷害性

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を Caco-2 細胞に 24 時間作用させ、WST-8 アッセイにより細胞傷害性を評価した。

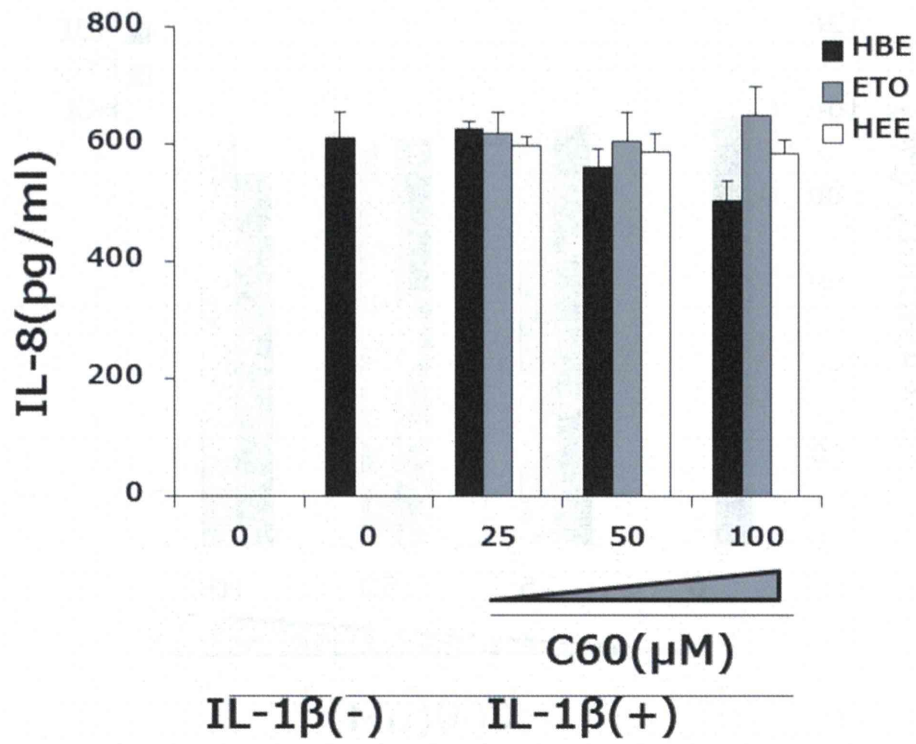


図 78 各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体および IL-1beta を Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-8 量を ELISA により評価した。

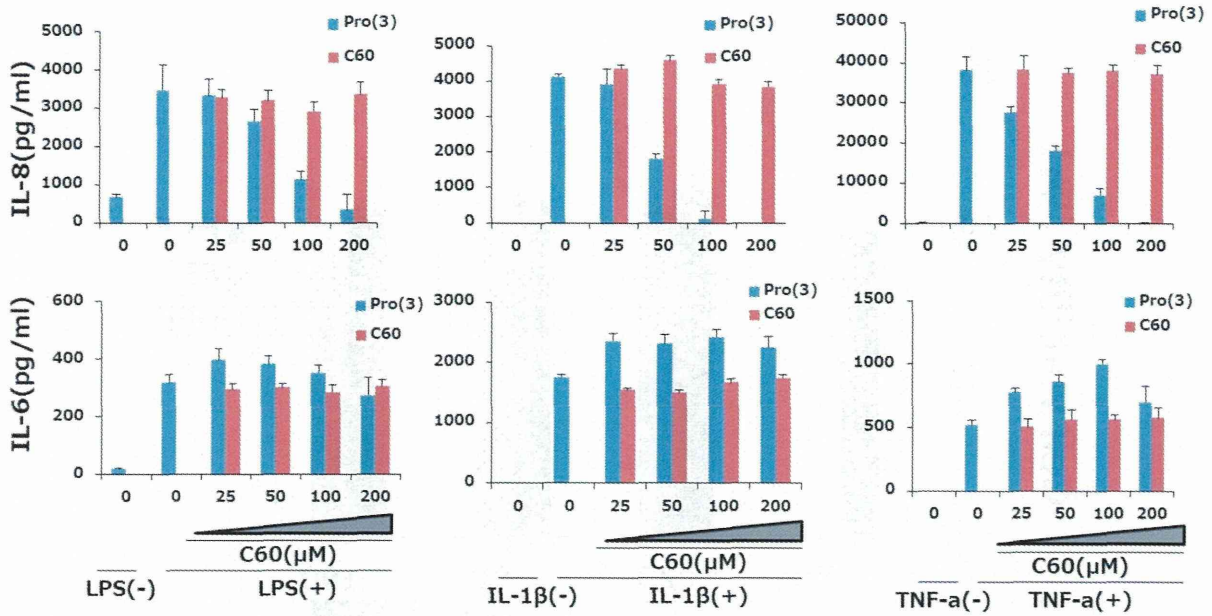


図 79 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体 (C<sub>60</sub>pro) の抗炎症作用

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体および未修飾 C<sub>60</sub> フラーレンを、LPS、IL-1beta もしくは TNF-alpha 存在下で Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

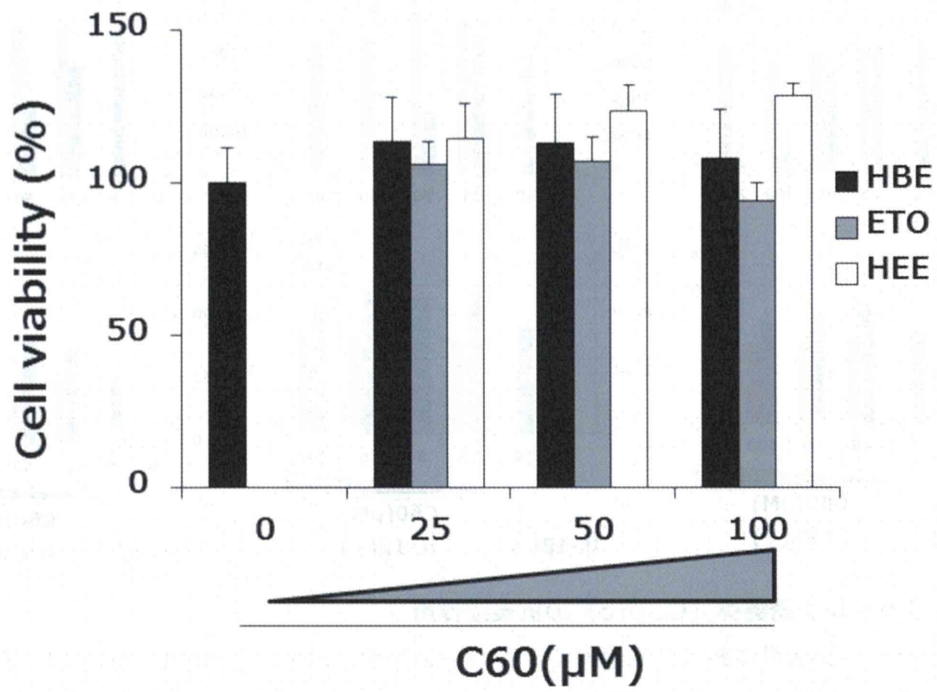


図 80 各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の細胞傷害性

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を A549 細胞に 24 時間作用させ、WST-8 アッセイにより細胞傷害性を評価した。

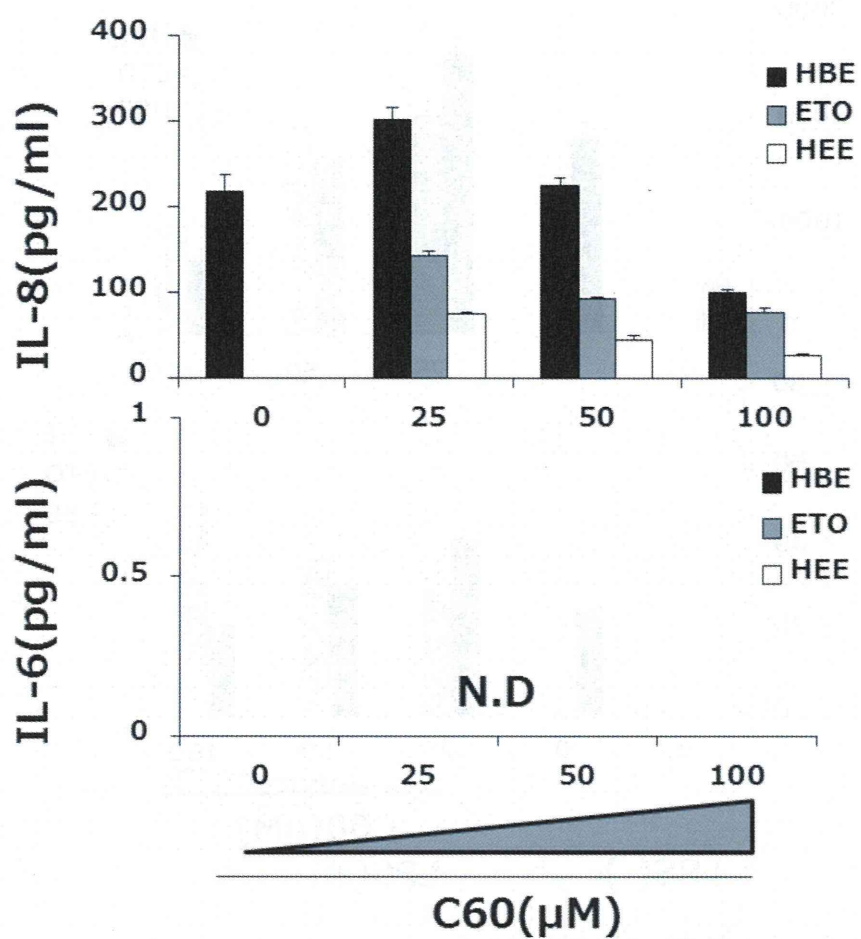


図 81 各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を A549 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

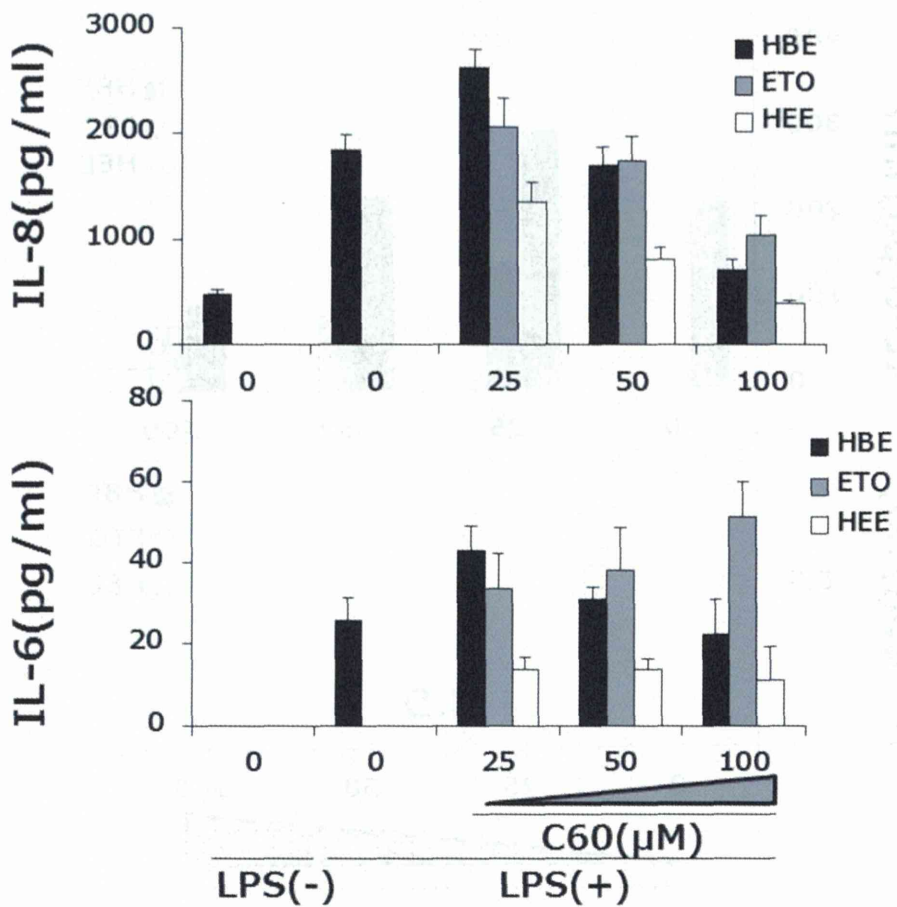


図 82 各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種 C<sub>60</sub> フラーレン誘導体を、LPS 存在下で Caco-2 細胞に 24 時間作用させた後、培養上清中の IL-6、IL-8 量を ELISA により評価した。

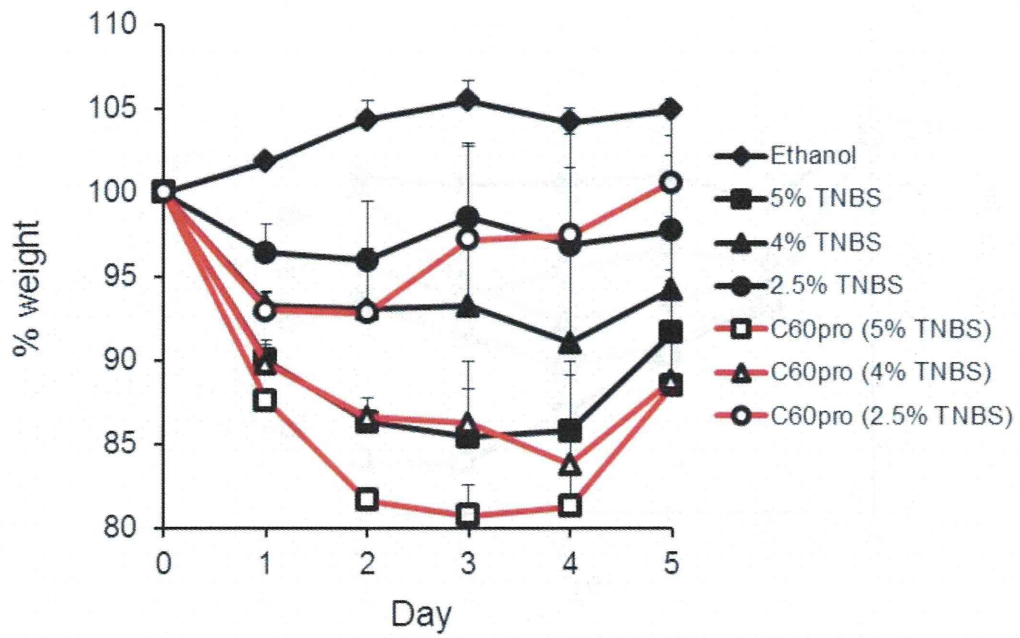


図 83 C<sub>60</sub>pro の TNBS 誘発性腸疾患モデルへの適用. TNBS をマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C<sub>60</sub>pro を経口投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。



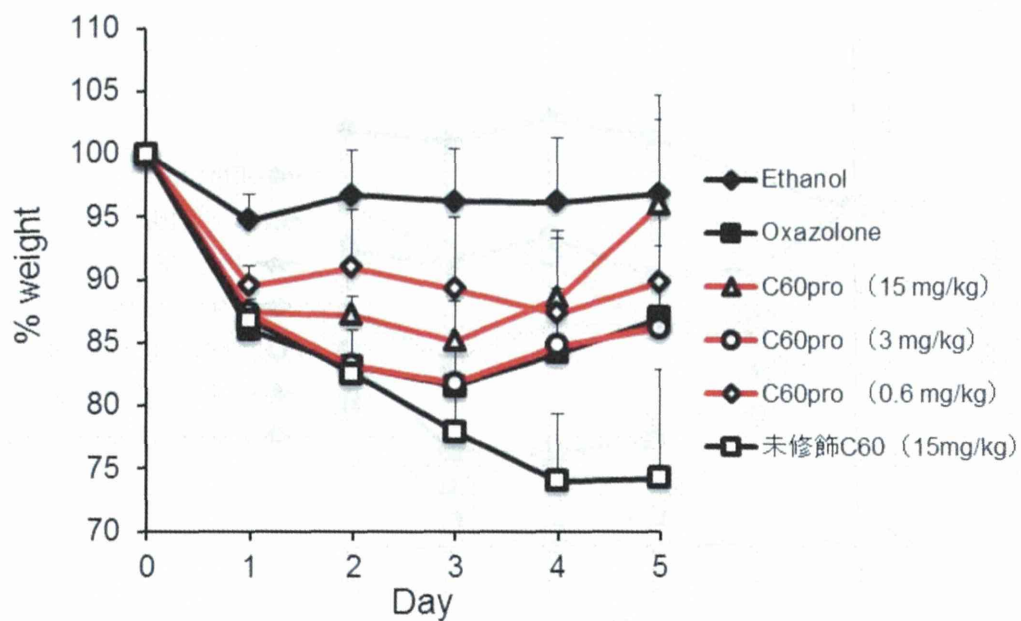


図 84 C<sub>60</sub>pro のオキサゾロン誘発性腸疾患モデルへの適用（経口投与）．オキサゾロンをマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C<sub>60</sub>pro を経口投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。

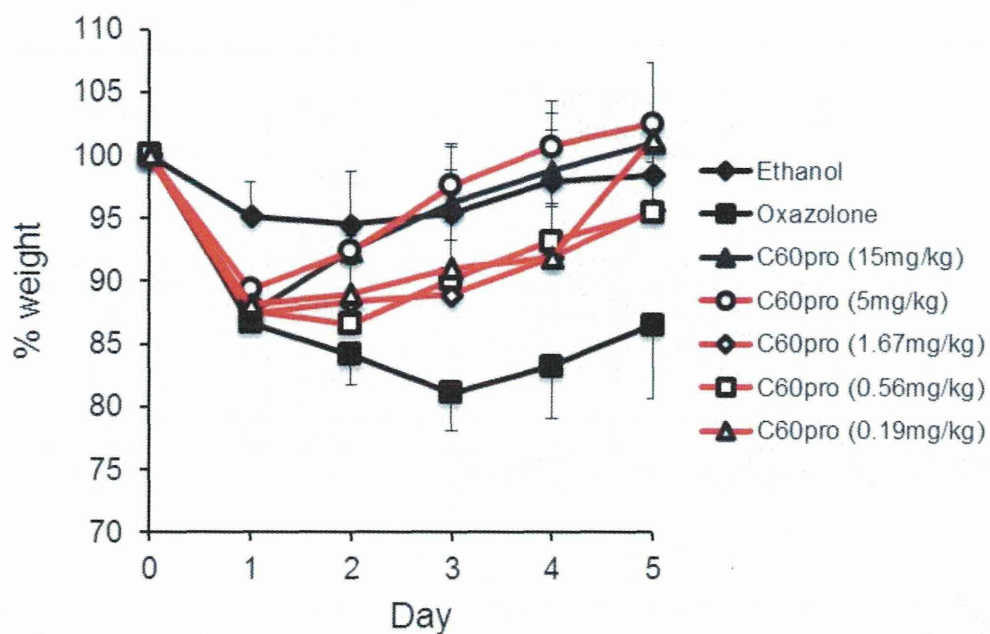
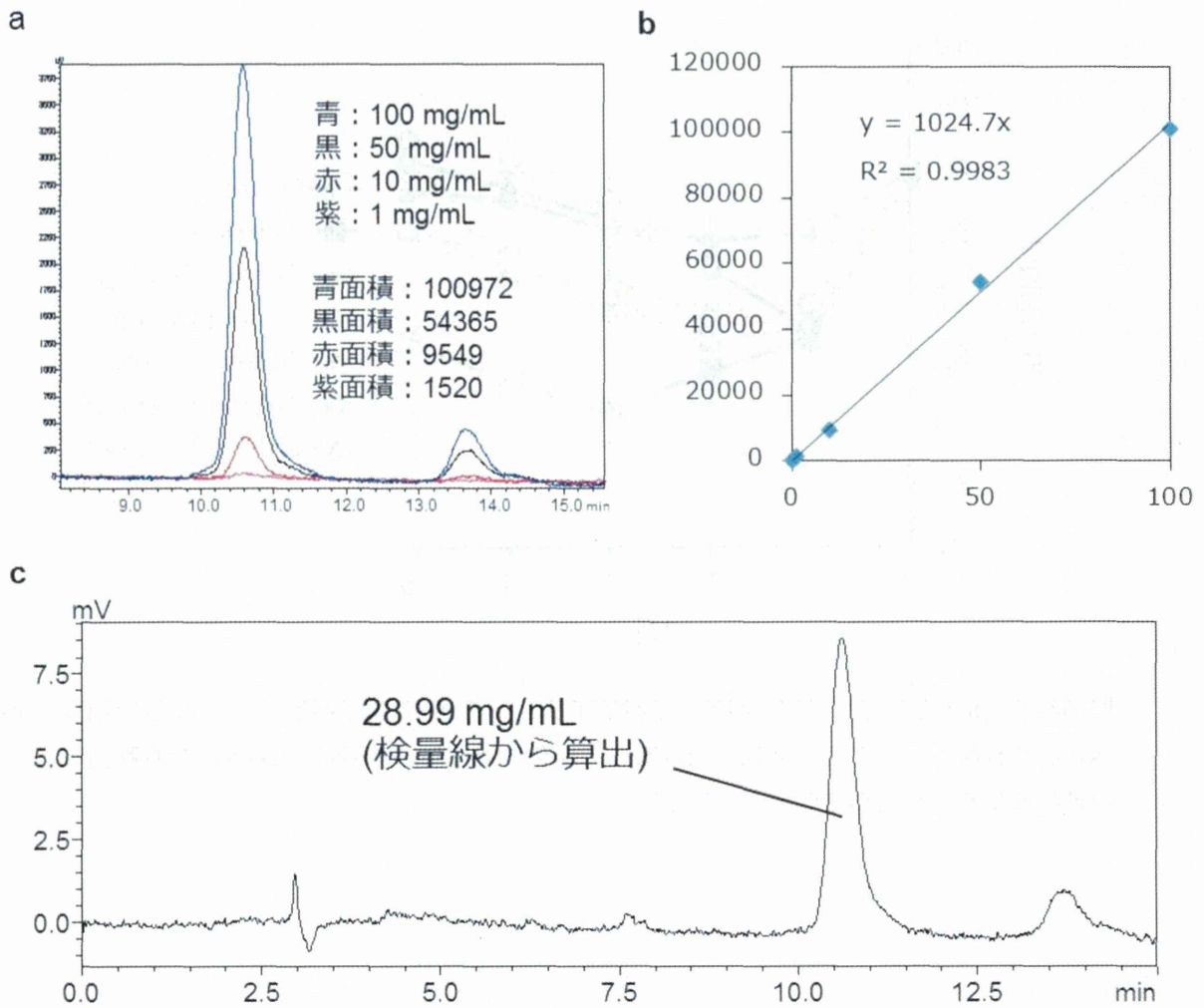


図 85 C<sub>60</sub>pro のオキサゾロン誘発性腸疾患モデルへの適用（腹腔投与）．オキサゾロンをマウスに直腸投与することで、炎症性腸疾患モデルを作製した。その際、C<sub>60</sub>pro を腹腔投与し、体重推移を指標として治療効果を検討した。



**図 86** プロリン型フラーレンの HPLC を用いた定量解析. プロリン型フラーレンを DMSO、水、クロロホルムにて 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 10 ng/mL となるまで 10 倍ずつ段階希釈した. 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. 検出したプロリン型フラーレンのピーク面積を求め、これを用いて検量線を作製した (A, B). また、クロロホルム中のプロリン型フラーレンは最高濃度のサンプル中の上清のみを測定した (C). なお、プロリン型フラーレンは水には溶解しなかったため測定していない.

表4 血液中THF溶解画分の分析への干渉の確認

面積	μg/mL	予定 μg/mL	回収率%
123647	16.8	16.6	101.4

表5 血液中からのプロリン型フラールの抽出

面積	μg/mL	予定μg/mL	回収率%
8079	1.1	20	6.6
10285	1.4	20	8.4

表6 THF・飽和食塩水での抽出条件の検討

	area	μg/mL	回収率%
MeOH	52769.38	6.039829	30.2
CH3CN	77519.86	8.872696	44.4
無し	38000	4.349369	43.5