

酸化ストレス性疾患への応用を目的とした
親水性 $C_{60}(OH)_{10}$ /シクロデキストリンナノ粒子製剤の構築

梅 崎 至 高

Preparation of Hydrophilic $C_{60}(OH)_{10}$ /Cyclodextrin
Nanoparticles and Their Application to Treatment of
Diseases Induced by Oxidative Stresses

Yoshitaka Umezaki

March, 2016

Preparation of Hydrophilic C₆₀(OH)₁₀/Cyclodextrin Nanoparticles and Their Application to Treatment of Diseases Induced by Oxidative Stresses

Yoshitaka Umezaki

Fullerenes, large spherical molecules composed of only carbon atoms, have been of great interest for practical applications that exploit their unique electronic properties and biological activities. The fullerene family, especially C₆₀, has appealing photo-, electro-chemical and physical properties, which have been exploited in various medical fields. For example, it can function as a radical scavenger, an antioxidant and as a gene carrier or in drug delivery. Polyhydroxylated fullerenes (C₆₀(OH)_n), some of the simplest C₆₀ derivatives, show antioxidant effect and are regarded as potential candidates for use in scavenging reactive oxygen species (ROS), which arise due to neuroprotective and cytoprotective effects by reducing oxidative stress. Although C₆₀(OH)_n are more soluble than unmodified C₆₀, further enhancement in their solubility is necessary for a precise evaluation of their biological activities and for extensive biomedical applications. The objective of this study is to prepare stable hydrophilic C₆₀(OH)₁₀ nanoparticles using 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HP-β-CyD) and to evaluate its biological activities of ROS scavenging ability. Furthermore, a protective effect against acetaminophen (APAP) overdose induced liver injury that is related to oxidative stress was examined.

The results are summarized as follows.

- 1) C₆₀(OH)₁₀ nanoparticles were produced by cogrinding α-CyD, β-CyD, γ-CyD and HP-β-CyD at 4 °C under reduced pressure. Among various CyDs, HP-β-CyD and γ-CyD formed hydrophilic nanoparticles with C₆₀(OH)₁₀ in high yields. The solubility of C₆₀(OH)₁₀ increased to about 720 μM and 690 μM in the HP-β-CyD and γ-CyD nanoparticles, respectively. Particle sizes of hydrophilic C₆₀(OH)₁₀ nanoparticles decreased with cogrinding time and increasing the CyD/C₆₀(OH)₁₀ molar ratio (C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD : 46.7 ± 10.9 nm, C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD : 81.3 ± 10.3 nm, (C₆₀(OH)₁₀ : CyDs = 1:3)). The resulting C₆₀(OH)₁₀/CyDs nanoparticles were stable in water and showed no aggregation for over 1 month.

- 2) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles rapidly reacted with DPPH and ABTS radicals and scavenged $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ in a concentration dependent manner, when compared with $C_{60}(OH)_{10}$ alone and $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ nanoparticles. The scavenging ability of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles was higher than that of $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ nanoparticles, which may be due to the difference in surface areas between the $HP-\beta-CyD$ nanoparticles (46.7 nm) and the $\gamma-CyD$ nanoparticles (81.3 nm), i.e. the surface area involved in the scavenging is larger in the former particles than in the latter particles.
- 3) When $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles were intraperitoneally or intravenously administered to mice with a liver injury induced by an overdose of APAP, the ALT and AST levels were markedly reduced to almost the same level as that of normal mice. To reveal the mechanism responsible for liver protection by $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles, GSH level, CYP2E1 expression and peroxynitrite formation in the liver were assessed. $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles had no effect on CYP2E1 expression and GSH depletion, but suppressed the generation of peroxynitrite in the liver. The findings indicated that the protective effect of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles was due to the suppression of oxidative stress in mitochondria, as the result of scavenging ROS such as $O_2^{\cdot-}$, NO and peroxynitrite, which act as critical mediators in the liver injuries.

Stable hydrophilic $C_{60}(OH)_{10}$ nanoparticles were prepared by grinding with $HP-\beta-CyD$. $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles were found to scavenge not only free radicals (DPPH and ABTS radicals) but also ROS ($O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$). By modifying the particles to acquire hydrophilic characteristics, they became more water soluble. In addition, the $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles were found to show a protective effect against APAP induced liver injury and the hepatoprotective effect of the nanoparticles was due to their ability to scavenge ROS such as $O_2^{\cdot-}$, NO and peroxynitrite. The developed $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ nanoparticles have the potential to serve as a new type of antioxidant and could be applied to other oxidative stress-related diseases.

本論文は学術雑誌に掲載された次の論文を基礎とするものである。

Y. Umezaki, D. Iohara, M. Anraku, Y. Ishitsuka, T. Irie, K. Uekama, F. Hirayama, Preparation of Hydrophilic C₆₀(OH)₁₀/2-Hydroxypropyl-β-cyclodextrin Nanoparticles for the Treatment of a Liver Injury Induced by an Overdose of Acetaminophen, *Biomaterials*, **45**, 115-123 (2015).

目次

緒言	-----1
第 1 章 親水性 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の調製と物性評価	-----6
第 1 節 序	-----6
第 2 節 CyDs との混合粉砕による C ₆₀ (OH) ₁₀ のナノ粒子化	-----7
第 3 節 親水性 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の物性評価	-----11
第 1 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の粒子径・ゼータ電位・形態観察	11
第 2 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の水中での分散安定性	-----16
第 4 節 考察	-----17
第 5 節 小括	-----18
第 2 章 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の抗酸化能評価	-----20
第 1 節 序	-----20
第 2 節 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子のラジカル消去能	-----21
第 1 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の DPPH ラジカル消去能	-----21
第 2 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の ABTS ラジカル消去能	-----23
第 3 節 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の抗酸化能	-----24
第 1 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /CyDs ナノ粒子の・OH 消去能	-----25

第 2 項	C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の O ₂ ^{·-} 消去能	-----27
第 3 項	C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の NO 消去能	-----28
第 4 節	C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の細胞における酸化ストレス抑制 効果	-----30
第 1 項	HeLa 細胞および A549 細胞に対する C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナ ノ粒子の細胞毒性	-----30
第 2 項	HepG2 細胞および HeLa 細胞に対する C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の酸化ストレス抑制効果	-----31
第 5 節	考察	-----34
第 6 節	小括	-----37
第 3 章	アセトアミノフェン (APAP) 誘発肝障害に対する C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β- CyD ナノ粒子の治療効果	-----38
第 1 節	序	-----38
第 2 節	APAP 肝障害モデルマウスにおける C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒 子の肝臓保護効果	-----39
第 1 項	C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子のトランスアミナーゼ値に及ぼす 影響	-----39
第 2 項	C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の肝障害マウス生存率に及ぼす影	

響	-----	41
第 3 項 APAP 投与後の肝臓の肉眼的観察	-----	42
第 3 節 C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の APAP 肝障害抑制機構	---	43
第 1 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の CYP2E1 発現および肝臓 GSH 濃度に及ぼす影響	-----	44
第 2 項 C ₆₀ (OH) ₁₀ /HP-β-CyD ナノ粒子の酸化ストレスに対する影響		45
第 4 節 考察	-----	47
第 5 節 小括	-----	50
総括	-----	52
謝辞	-----	56
実験の部	-----	57
参考文献	-----	67

緒 言

フラーレン (C_{60}) は炭素原子が、サッカーボールに類似したネットワークの各頂点に位置する構造をとる化合物である (Fig. 1)。構成炭素原子がそれぞれ 60 個、70 個、84 個からなる C_{60} 、 C_{70} 、 C_{84} などが存在し、中でも C_{60} は、フラーレンの中で最も知られており、1985 年に発見されて以来、ユニークな物理学的、生物学的特徴を持つことから金属材料やエネルギー輸送、化粧品など様々な分野に利用されている。¹⁻³⁾ 医薬品分野においては、 C_{60} は可視光照射下におけるラジカル生成作用⁴⁻⁵⁾、神経細胞保護作用⁶⁾、抗 HIV-1 プロテアーゼ作用⁷⁾を有することが報告されており、さらに C_{60} の疎水性、分子サイズを利用した遺伝子⁸⁾ あるいは薬物キャリア⁹⁾ などへの応用研究が行なわれている。¹⁰⁾ 一方、 C_{60} の特徴的な構造および上記特性を最大限に活かすべく、 C_{60} 誘導体の開発に関する研究も活発に行われている。例えば、 C_{60} 分子の持つ広い表面積に着目し、水素を C_{60} に付加させることで多くの水素原子の貯蔵を可能とした水素化 C_{60} ¹¹⁾ や、太陽電池としての利用を企図した [6,6]-Phenyl- C_{61} -butyric acid methyl ester ([60]PCBM)¹²⁾、あるいは MRI 造影剤への応用を目的として Fe_3O_4 を付加した C_{60} ¹³⁾ などが開発されている。これら C_{60} 誘導体の中でも水酸基を複数個付加した水酸化フラーレン ($C_{60}(OH)_n$, Fig. 1) は、高い抗酸化能を有することから、近年、医薬分野において注目を集めている化合物である。¹⁴⁻
¹⁷⁾ 例えば、Chen らは $C_{60}(OH)_{7\pm 2}$ が過酸化水素による酸化ストレスを抑制することで、細胞保護効果を示すことを明らかにした。¹⁸⁾ また、Cong らは、 $C_{60}(OH)_{24}$ が線虫の細胞内においてスーパーオキシドジスムターゼやヒートショックプロテインの発現を増加することで老化を遅延させることを報告した。

19) また、薬物の副作用に対する $C_{60}(OH)_n$ の抑制効果も多く報告されており、例えば、Liu らは $C_{60}(OH)_{24}$ が細胞内で発生する活性酸素種 (ROS) を消去することでステロイドの副作用である脂質生成異常や骨形成異常などを軽減することを明らかにした。²⁰⁾ 同様に Injac らは、ラットに $C_{60}(OH)_{24}$ を腹腔内投与することで、抗ガン剤ドキソルビシンの副作用である心毒性および肝毒性が改善されることを報告した。²¹⁾ しかしながら、 C_{60} は炭素原子のみで構成されるため、水への溶解性が著しく低く²²⁻²³⁾、水酸基が付加した $C_{60}(OH)_n$ もアルカリ性溶媒には溶解するものの、水への溶解性は十分ではない。このため、上記の $C_{60}(OH)_n$ を用いた検討は、有機溶媒中あるいは水中に分散させた状態に限られている。従って、 $C_{60}(OH)_n$ の医薬分野への応用を考える場合、水への溶解性を改善する工夫が必要となる。

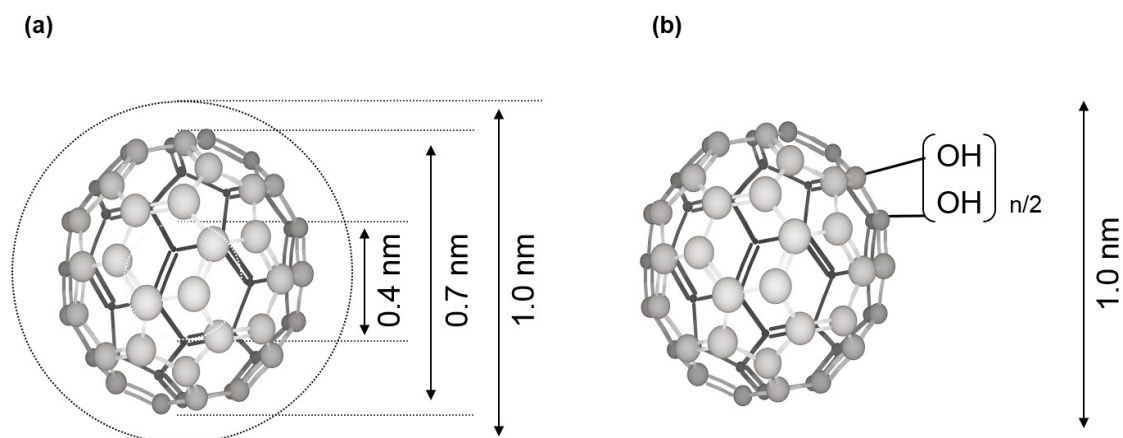
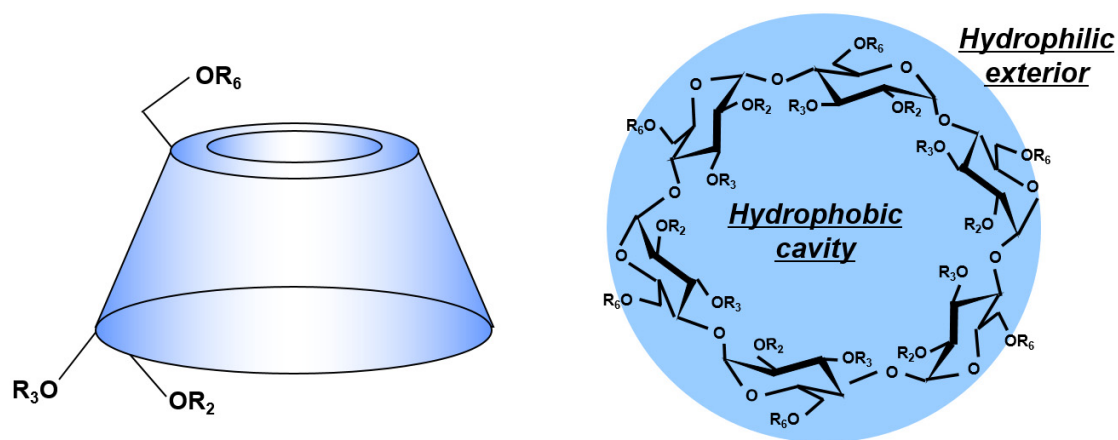


Fig. 1. Chemical Structure of C_{60} (a) and $C_{60}(OH)_n$ (b)



Compound	Glucose number	R	D.S. ^{a)}
α -CyD	6	H	—
β -CyD	7	H	—
HP- β -CyD ^{b)}	7	H or $CH_2CH(OH)CH_3$	5.0
γ -CyD	8	H	—

a) Degree of substitution, b) 2-Hydroxypropyl- β -CyD.

Fig. 2. Chemical Structure of CyDs Used in This Study

環状マルトオリゴ糖である シクロデキストリン (CyD, Fig. 2) は、分子内に疎水性の空洞を有し、空洞径に応じて種々のゲスト分子を取り込んで包接複合体を形成し、ゲスト分子の物理化学的性質を変化させることが知られており、医薬分野では薬物の安定化、溶解性の改善、油脂物質の粉体化などに広く応用されている。²⁴⁾ 特に、CyD 誘導体の中で 2-ヒドロキシプロピル- β -CyD (HP- β -CyD) は薬物の溶解性やバイオアベイラビリティの改善に汎用されており、経口や注射剤の添加剤として国内外で使用されている。²⁵⁾

当研究室では、これまでに C_{60} の医薬への応用を目的として、HP- β -CyD を用いて、 C_{60} を親水性ナノ粒子として高濃度に調製可能なことを明らかにした

(Fig. 3)。²⁶⁾ この C₆₀/HP-β-CyD ナノ粒子は水中において優れた凝集安定性を示し、可視光照射下において一重項酸素 (¹O₂) やスーパーオキシドアニオンラジカル (O₂^{•-}) などの活性酸素種を生成し、抗腫瘍効果を示すことを報告した。
 27) これらの結果は、HP-β-CyD を用いて C₆₀ の生物活性を損なうことなく、C₆₀ の水への溶解性を改善可能なことを示す。

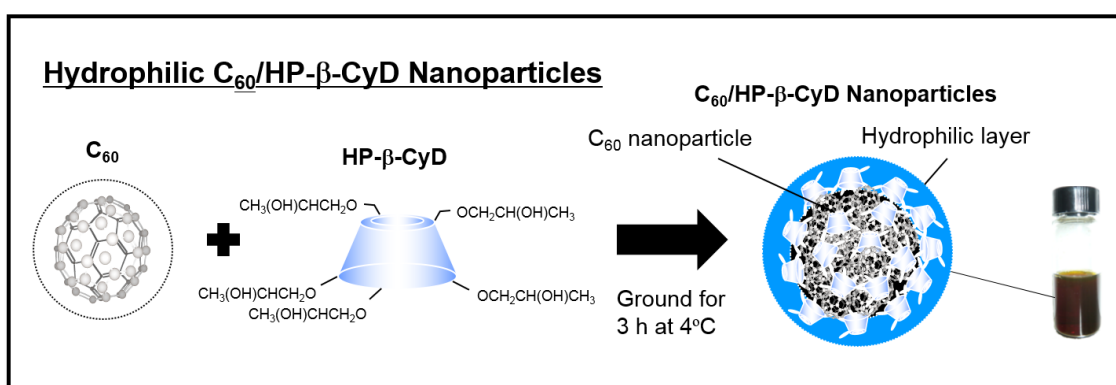


Fig. 3. Proposed Structure of C₆₀/HP-β-CyD Nanoparticles

このような背景のもと、本研究では C₆₀(OH)_n の抗酸化剤としての医薬への応用を目的とし、可溶化剤として医薬品での使用実績があり、親水性で生体適合性に優れる HP-β-CyD を用いて、C₆₀ に水酸基が約 10 個付加した C₆₀(OH)₁₀ をナノ粒子化し、その物理化学的特性や生物活性を明らかにした。

すなわち、第 1 章では C₆₀(OH)₁₀ と各種 CyDs を混合粉砕することで C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子を調製し、このナノ粒子は優れた水への溶解性・分散安定性を有することを見いだした。第 2 章では C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の抗酸化能を *in vitro* で検討し、HP-β-CyD を用いて調製した C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は高い抗酸化能を有することを明らかにした。第 3 章では抗酸

化能に優れる $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を用いて、酸化ストレス性疾患の一つであるアセトアミノフェン誘発肝障害（APAP 肝障害）に対する抑制効果を検討した。さらに $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の APAP 肝障害抑制メカニズムについても検討し、酸化ストレス性疾患の治療に効果的な新規抗酸化剤としての有用性を明らかにした。

以下に得られた知見を詳述する。

第 1 章 親水性 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の調製と物性評価

第 1 節 序

C₆₀(OH)_n は 水酸基の導入数が少ないもので約 10 個、多いものでは約 40 個導入されたものが知られており、一般に、水酸基の導入数が 12 個以下のものは水へ溶解せず、水酸基数が 20 個以上になると溶解性が改善されることが報告されている。²⁸⁾ しかしながら、水酸基の導入数が 20 個以上になると細胞毒性を示すことから、²⁹⁻³¹⁾ 医薬への応用に際し、水酸基の導入数の少ない C₆₀(OH)_n を用いることが望ましい。そこで、本章では水酸基が 約 10 個付加した C₆₀(OH)₁₀ をフロンティアカーボン社より購入し、以下の検討に用いた。

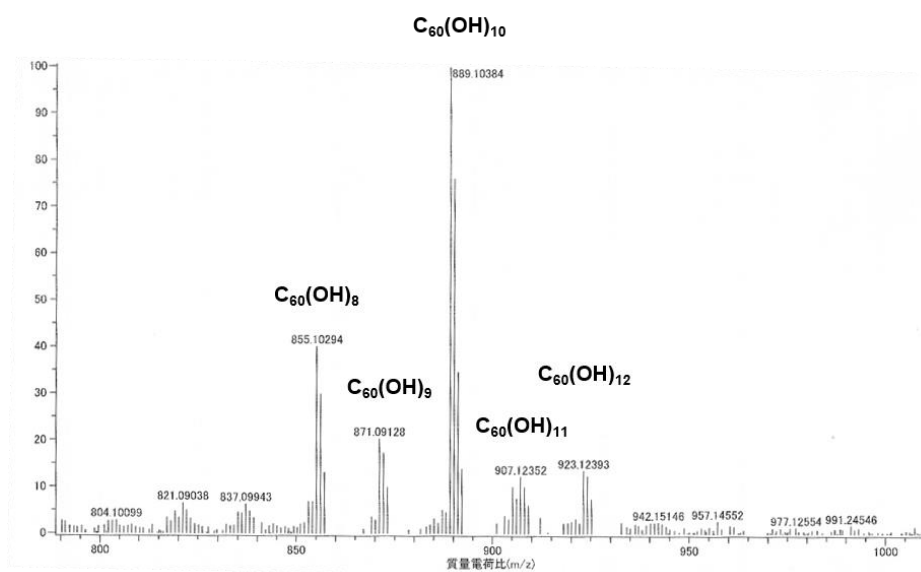


Fig. 4. Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) Mass Spectrum of C₆₀(OH)₁₀ Used in This Study

Fig. 4 は購入した C₆₀(OH)₁₀ の水酸基数を確認するため、マスペクトルを測定した結果を示す。本研究で用いた水酸化フラーレンは、水酸基が 10 個付

加した分子量 890 の $C_{60}(OH)_{10}$ が主成分 (50% 以上、ピーク面積から推定) であり、水酸基数が 8 から 12 個付加した $C_{60}(OH)_{10\pm 2}$ が混在する多置換体あるいは多数の位置置換体の混合物である。以下の検討では、この $C_{60}(OH)_{10}$ を用いて各種 CyDs との親水性ナノ粒子化ならびに $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子の物性 (粒子径・ゼータ電位・形態・分散安定性) を評価した。

第 2 節 CyDs との混合粉碎による $C_{60}(OH)_{10}$ のナノ粒子化

親水性 $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は、Fig. 5 に示す真空ボックス付き自動マグネットメノウ乳鉢粉碎機を用いて $C_{60}(OH)_{10}$ と各種 CyDs を減圧下、4 °C で 3 時間混合粉碎後 (モル比 1 : 3 ($C_{60}(OH)_{10}$: CyD))、超音波により水へ分散し、0.2 μm フィルターでろ過することで調製した。



Fig. 5. Automatic Magnetic Agitating Mortar (MNV-01, ASONE)

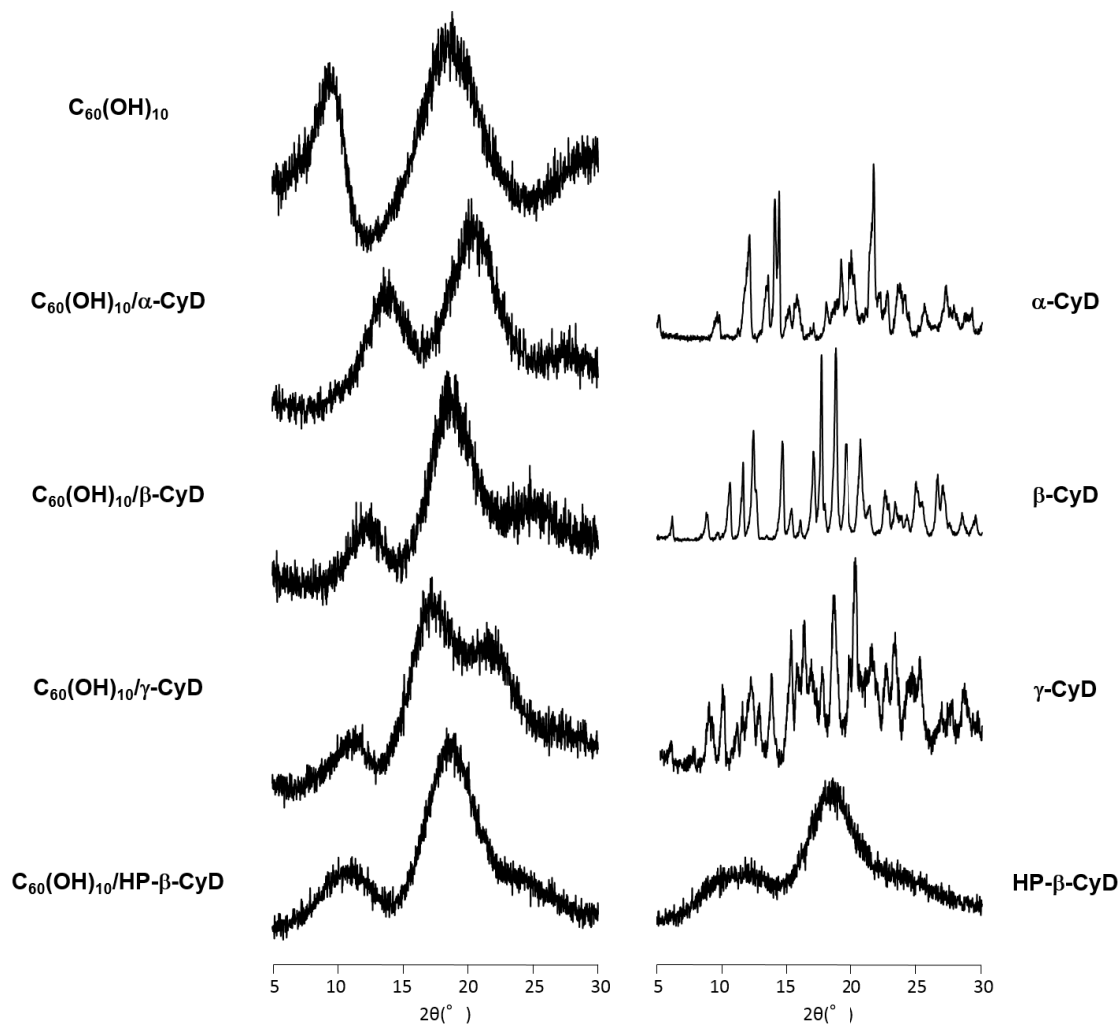


Fig. 6. Powder X-Ray Diffraction Patterns of $C_{60}(OH)_{10}$, CyDs and $C_{60}(OH)_{10}$ /CyDs Powders Ground for 3h at 4°C under Reduced Pressure

Fig. 6 は $C_{60}(OH)_{10}$ と各種 CyDs を混合粉砕した粉末の粉末 X 線回折測定結果を示す。 $C_{60}(OH)_{10}$ は C_{60} 分子表面に水酸基が約 10 個ランダムに付加した多数の構造類似体の混合物であるため、回折図はハローパターンを示し、非晶質状態であった。結晶性 CyDs である α -CyD、 β -CyD および γ -CyD は、かご型構造に由来するシャープな回折ピークを与えた。一方、 β -CyD の 2, 3, 6 位

水酸基に 2-ヒドロキシプロピル基をランダムに導入した HP- β -CyD（置換度 5.0）はハローパターンを示し、非晶質状態であった。各種 CyDs と $C_{60}(OH)_{10}$ を混合粉砕すると、HP- β -CyD 粉砕物は、HP- β -CyD 単独の回折パターンに類似したハローを示した。HP- β -CyD は質量比として $C_{60}(OH)_{10}$ の 5 倍量添加されているため $C_{60}(OH)_{10}$ と HP- β -CyD のハローパターンが重複したものと推察される。一方、結晶性 CyDs との混合粉砕物では CyDs に特徴的な回折ピークが消失し、CyDs の非晶質化がみられた。これは、混合粉砕により CyDs と $C_{60}(OH)_{10}$ が相互作用することを示唆する。






	$C_{60}(OH)_{10}$ alone	$C_{60}(OH)_{10}$ / α -CyD	$C_{60}(OH)_{10}$ / β -CyD	$C_{60}(OH)_{10}$ / γ -CyD	$C_{60}(OH)_{10}$ /HP- β -CyD (D.S. 5.0)
Appearance					

Fig. 7. Appearances of $C_{60}(OH)_{10}$ and $C_{60}(OH)_{10}$ /CyDs Colloidal Solutions after Filtration through 0.2 μ m Filter

Fig. 7 は、 $C_{60}(OH)_{10}$ と各種 CyDs をモル比 1 : 3 で 3 時間混合粉砕して得た粉末を $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度が 1 mM となるように水へ分散後、0.2 μ m フィルターでろ過した溶液の外観を示す。 $C_{60}(OH)_{10}$ のみを混合粉砕して得られたろ液は透明であり、溶液中 $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度は UV 検出限界以下であった。これは $C_{60}(OH)_{10}$ は水への溶解性が低く、かつ凝集しているため、大部分が 0.2 μ m フ

フィルター上にトラップされたためと考えられる。一方、HP- β -CyD および γ -CyD と混合粉碎した粉末では濃い赤褐色溶液が得られた。これは、大部分の $C_{60}(OH)_{10}$ がフィルターを通過し、水中に均一に分散していることを示す。また、 α -CyD および β -CyD 系では、 $C_{60}(OH)_{10}$ の一部がフィルター上にトラップされたため、ろ液の色は薄くなった。

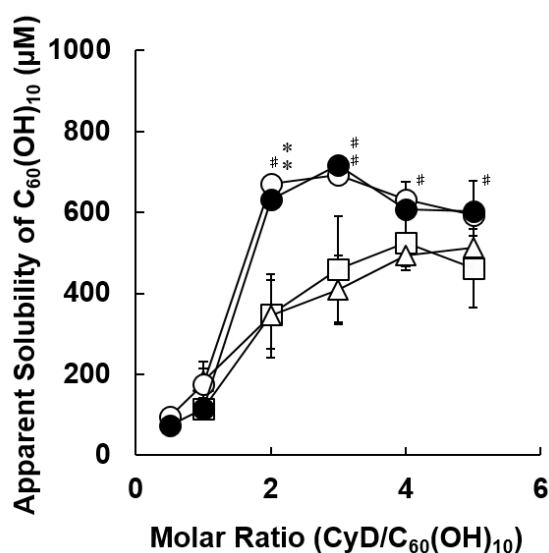


Fig. 8. Apparent Solubilities of $C_{60}(OH)_{10}$ Ground at Various Molar Ratios of $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared with the α -CyD, # $p < 0.05$ compared with the β -CyD.

□ : $C_{60}(OH)_{10}/\alpha$ -CyD △ : $C_{60}(OH)_{10}/\beta$ -CyD ○ : $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ● : $C_{60}(OH)_{10}/HP$ - β -CyD

ろ液中の $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度を 350 nm の吸光度を用いて測定した結果を Fig. 8 に示す。ろ液中 $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度は、CyD のモル比の増加にしたがって増大し、その効果は α - および β -CyD に比べて HP- β -CyD および γ -CyD の方が大きかった。例えば、モル比 1 : 3 HP- β -CyD および γ -CyD 系では $C_{60}(OH)_{10}$ 濃

度は約 700 μM に達した。前述したように、溶液調製時において、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ 濃度が 1 mM になるように $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ 混合粉砕物を水に懸濁後、0.2 μm フィルターでろ過した。したがって、これらの結果は、初期仕込み $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ 量 (1 mM) の約 70% が可溶化されたことを示す。一方、 $\alpha\text{-CyD}$ あるいは $\beta\text{-CyD}$ との混合粉砕物ではモル比 1 : 4 ($\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$: CyD) 以上で約 500 μM の濃度が得られたが、バラつきが大きく均一な一定濃度の溶液を調製するのは困難であった。以上の結果より、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ の溶解性は $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ あるいは $\gamma\text{-CyD}$ と混合粉砕することで著しく改善されることが明らかとなった。

第 3 節 親水性 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{CyDs}$ ナノ粒子の物性評価

第 1 項 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{CyDs}$ ナノ粒子の粒子径・ゼータ電位・形態観察

$\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ に対して高い可溶化能を示した $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ および $\gamma\text{-CyD}$ を用いて調製した $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{CyDs}$ 溶液について、溶存粒子の粒子径、ゼータ電位の測定ならびに形態観察を行なった。Fig. 9 は種々の CyD モル比 (1 : 0.5~5) で混合粉砕した $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{CyDs}$ 粉末の回折ピークを示す。 $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ 系の場合、いずれのモル比においても $\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ に類似したハローパターンを示した。一方、 $\gamma\text{-CyD}$ 系では、 CyD の混合比が増加するにつれて $2\theta = 11^\circ$ 、 17° および 22° 付近に $\gamma\text{-CyD}$ に由来するブロードなピークが出現した。これは、 $\gamma\text{-CyD}$ のモル比が多い場合、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ と十分に相互作用できない過剰量の $\gamma\text{-CyD}$ が含まれることを示唆する。

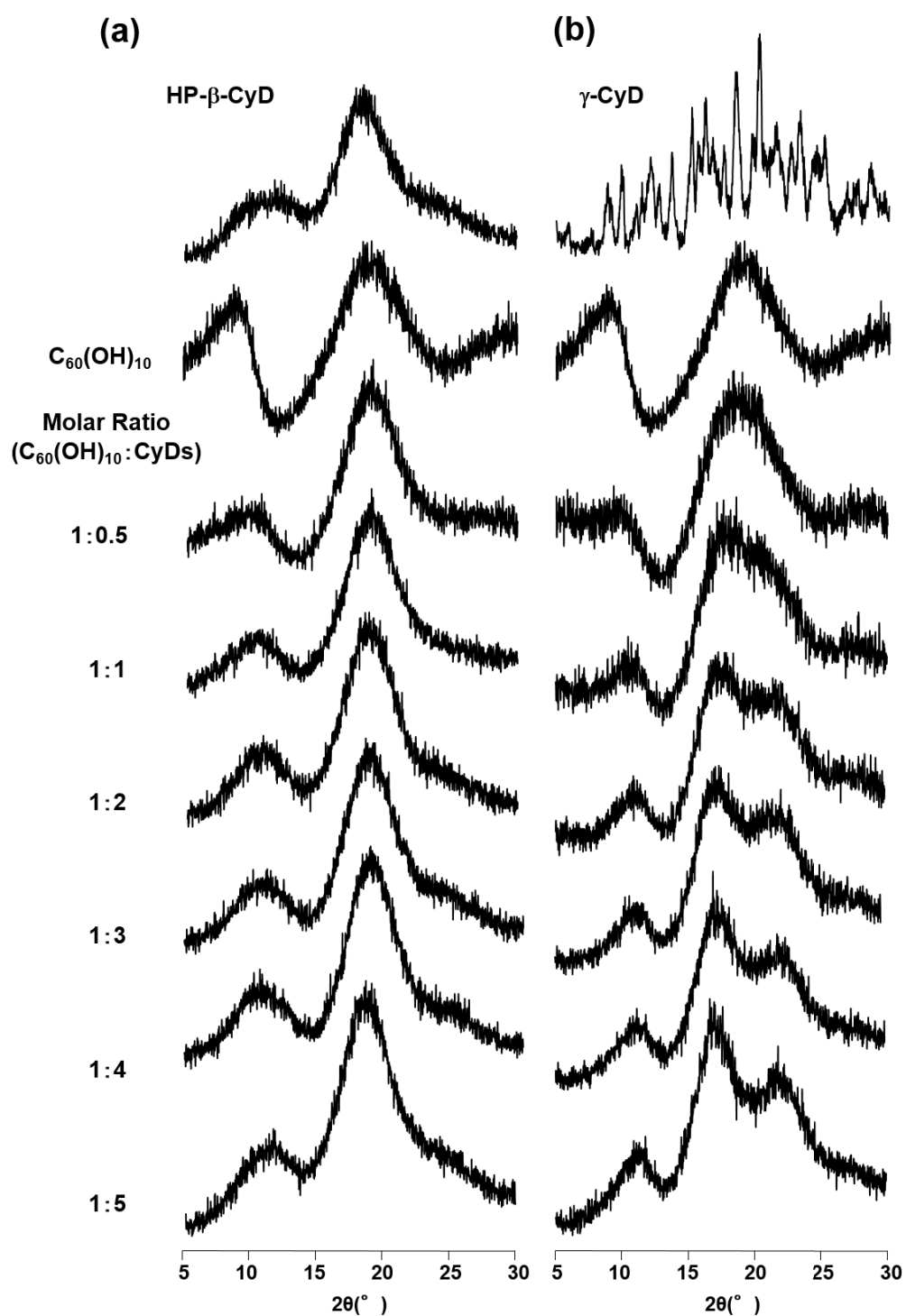


Fig. 9. Powder X-Ray Diffraction Patterns of $C_{60}(OH)_{10}$ /HP-β-CyD (a) and $C_{60}(OH)_{10}$ /γ-CyD (b) Powders Prepared at Various Molar Ratios of $C_{60}(OH)_{10}$: CyDs

Fig. 10 は、各種混合モル比で調製した粉末を水へ分散、フィルターろ過した $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ 溶液の粒子径を動的光散乱光度計 (Dynamic Light Scattering Spectrometer, DLS) を用いて測定した結果を示す。溶存粒子の粒子径は粉碎時に添加する CyDs 量の増大とともに減少し、HP- β -CyD ではモル比 1:3 で約 50 nm、 γ -CyD では約 80 nm まで減少した。しかし、混合モル比が 1:5 に上昇すると HP- β -CyD および γ -CyD とともに粒子径が僅かに増大する傾向を示し、CyDs 量が多すぎると粉碎効率が低下するものと考えられる。コロイド溶液の安定性の指標であるゼータ電位をゼータサイザーにより測定したところ、 $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$ 溶液中の粒子は、ともにモル比 1:1 で約 -41 mV であり、大きな負の値を有した (Fig. 10 (b))。

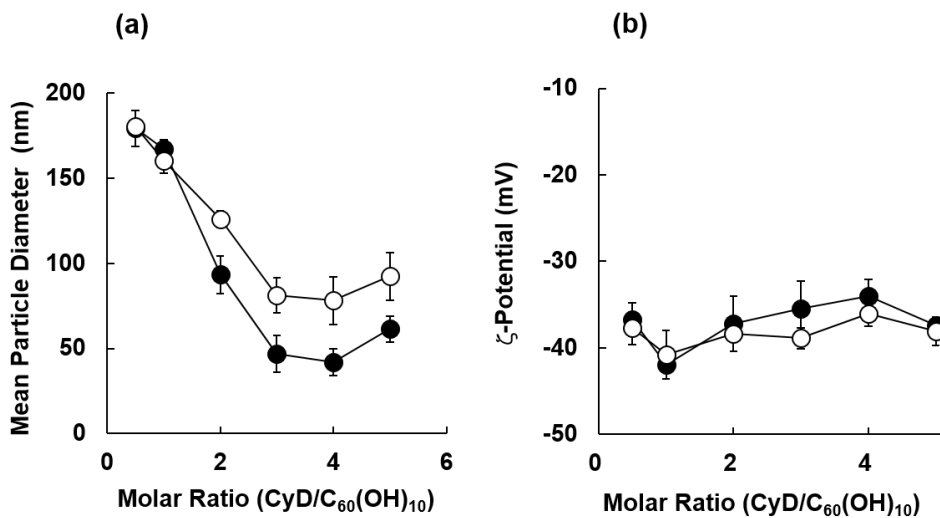


Fig. 10. Effects of $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ Molar Ratios on Particle Size (a) and Zeta Potential (b)

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

● : $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ ○ : $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$

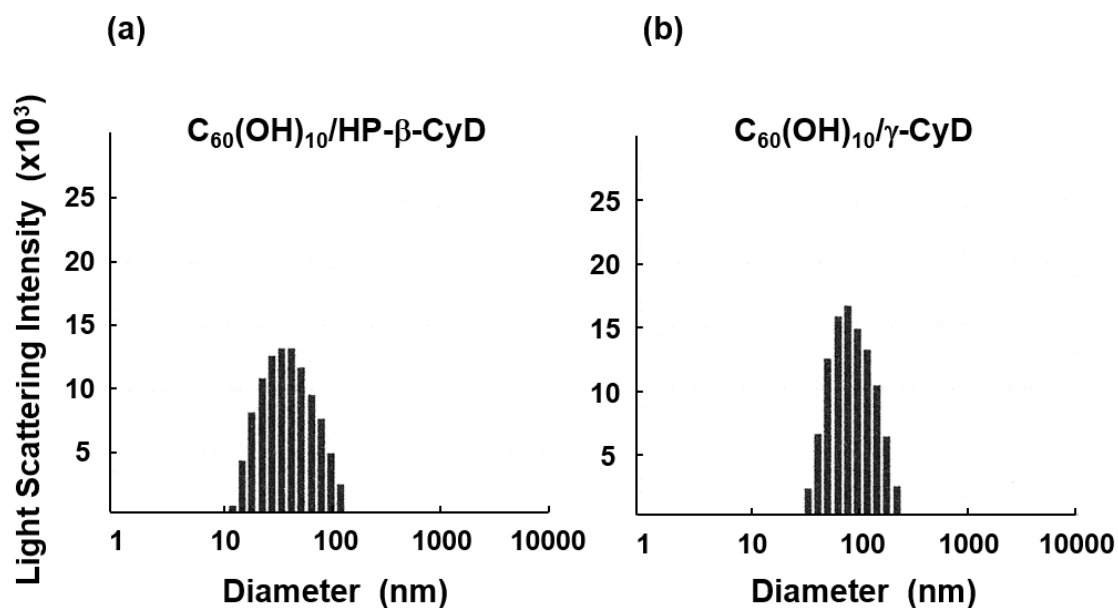


Fig. 11. Particle Size Distribution of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles (a) and $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ Nanoparticles (b)

Fig. 11 にモル比 1 : 3 で調製した $C_{60}(OH)_{10}$ 粒子の粒度分布を示す。CyDs との混合粉碎により得られた粒子の粒度分布は均一であった。

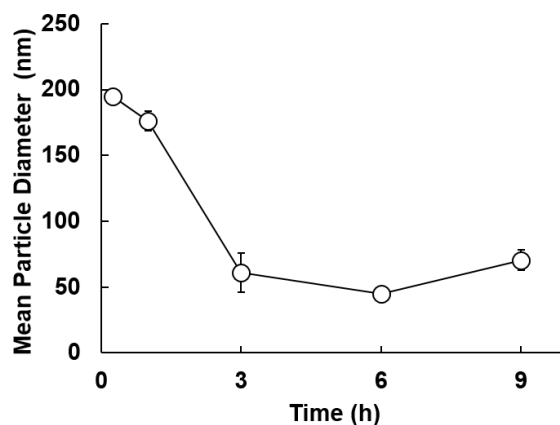


Fig.12. Effects of Grinding Time on Particle Size of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

次に、 $C_{60}(OH)_{10}$ の粒子径におよぼす HP- β -CyD との混合粉碎時間の影響を検討した。Fig. 12 に示すように、混合粉碎時間の増加につれて平均粒子径は減少し、3 時間粉碎により約 50 nm まで減少した。しかし、粉碎時間を 3 時間以上に延長してもそれ以上の粒子径の減少はみられなかった。また、得られた $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD 粒子の形態を透過型電子顕微鏡により観察すると (Fig. 13)、 $C_{60}(OH)_{10}$ は粒子径約 50 nm の均一な球形粒子として存在することが示された。

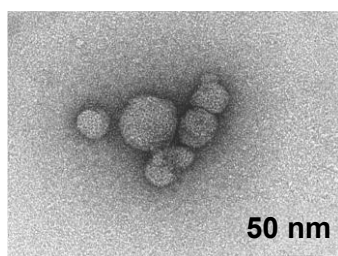


Fig. 13. TEM Image of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD Nanoparticles

以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}$ を HP- β -CyD や γ -CyD と混合粉碎することで 100 nm 以下の水溶性ナノ粒子として調製可能なことが明らかとなった。特に、CyD との混合モル比 1:3 で調製した $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子は、溶解度が最も高く、粒子径が小さく、さらにゼータ電位も大きな負の値を有することが明らかとなった。そこで、モル比 1:3、混合粉碎時間 3 時間の条件で調製した $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子を用いて以下の実験を行った。

第 2 項 $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子の水中での分散安定性

HP- β -CyD および γ -CyD ナノ粒子 ($C_{60}(OH)_{10} = 400 \mu M$) を遮光下に保存し、経時的に DLS 測定することにより分散安定性を評価した。Fig. 14 に示すように、各ナノ粒子は保存開始 28 日後においても、調製直後の粒子径 ($C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$: 約 50 nm、 $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$: 約 80 nm) を維持し、粒子の凝集はみられなかった。Fig. 10 (b) に示したように、HP- β -CyD および γ -CyD ナノ粒子は大きな負のゼータ電位を持つことから、水溶液中で粒子同士が反発し、安定な分散状態が維持されたものと推察される。

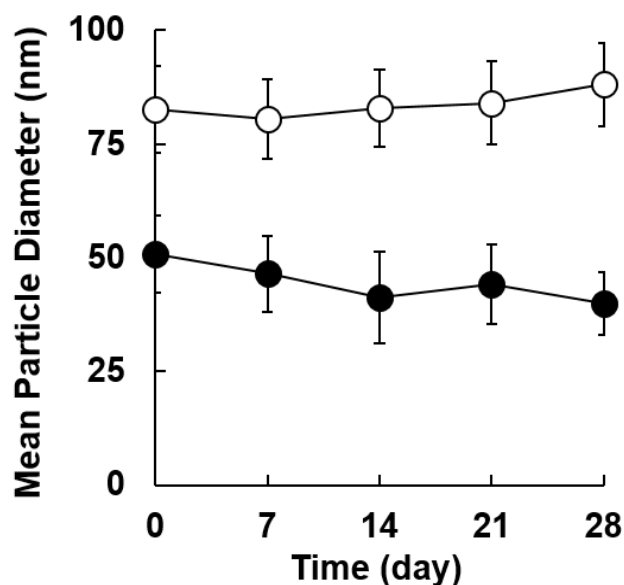


Fig. 14. Changes in Particle Size of $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ Nanoparticles and $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$ Nanoparticles during Storage at 25°C

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments.

● : $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ ○ : $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$

第 4 節 考察

$C_{60}(OH)_{10}$ を HP- β -CyD および γ -CyD と混合粉碎することで親水性 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子を高濃度に調製可能であった。一方、 α -CyD および β -CyD では $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子を効率的に調製することは困難であった。調製した $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$ ナノ粒子は、水中でそれぞれ約 50 nm と約 80 nm の粒子径を 1 ヶ月間維持し、粒子の凝集はみられなかった。空洞径が C_{60} の分子サイズ (約 1.0 nm) にフィットする γ -CyD は、 C_{60} とモル比 2 : 1 (γ -CyD : C_{60}) の包接複合体を形成することが知られている。³²⁻³³⁾ 一方、空洞径が小さい α -CyD および β -CyD は、 C_{60} と複合体を形成することは困難であると考えられる。Iohara らは以前、HP- β -CyD および γ -CyD を用いて親水性 C_{60} ナノ粒子を高収率で調製し、HP- β -CyD は C_{60} ナノ粒子の表面を覆うことにより親水性層を形成し、 C_{60} の凝集を抑制することを明らかにした。²⁶⁾ $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子においても HP- β -CyD および γ -CyD が粒子表面を覆い、安定なナノ粒子を形成しているものと考えられる。 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子表面を CyD が覆っていることはゼータ電位測定の結果からも支持される。例えば、 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子のゼータ電位は、モル比 1 : 1 ($C_{60}(OH)_{10}$: CyD) で最大値 -41 mV を示したが、CyD モル比が増加するにつれてわずかに正方向へシフトした (Fig. 10 (b))。これは、CyDs 被覆により $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子の負のゼータ電位が遮蔽され、正方向にシフトしたことを示す。このように、親水性 CyDs 層による $C_{60}(OH)_{10}$ 粒子表面の被覆に加え、大きな負のゼータ電位により粒子の凝集が抑制され、安定な親水性 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子が形成されたものと考えられる。

第 5 節 小括

本章では各種 CyDs を用いて、 $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子を調製し、その物性（粒子径・ゼータ電位・形態・分散安定性）を評価した。

以下に得られた知見を要約する。

- 1) $C_{60}(OH)_{10}$ と HP- β -CyD および γ -CyD を減圧下、4 °C で混合粉砕することにより、親水性 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子を高濃度（ $C_{60}(OH)_{10} = 700 \mu M$ ）に調製可能であった。一方、 α -CyD あるいは β -CyD と混合粉砕した場合、濃度のバラつきが大きく、均一なコロイド溶液を調製するのは困難であった。
- 2) $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子の粒子径は HP- β -CyD および γ -CyD との混合粉砕時間の延長および添加する CyDs 量の増加に伴い小さくなり、混合モル比 1 : 3（ $C_{60}(OH)_{10} : CyDs$ ）、3 時間以上の粉砕で平均粒子径が各々約 50 nm および約 80 nm の $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子が得られた。ナノ粒子化の程度は、 γ -CyD に比べて HP- β -CyD のほうが大きかった。
- 3) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子のゼータ電位は約 -40 mV であり、両粒子とも大きな負電荷を有した。また、透過型電子顕微鏡観察より、 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子は均一な球形粒子であった。
- 4) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma$ -CyD ナノ粒子の水中での長期分散安定性を検討したところ、両粒子とも保存時の凝集・沈殿はみられず、28 日後においても小さな粒子径（ $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD : 約 50 nm、

C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD : 約 80 nm) を維持した。

以上の知見より、C₆₀(OH)₁₀ は、HP-β-CyD および γ-CyD と混合粉碎することにより、分散性に優れる親水性ナノ粒子を形成することが明らかとなった。また、HP-β-CyD を用いることで γ-CyD よりも小さな粒子径を有する C₆₀(OH)₁₀ ナノ粒子を調製可能であった。

第 2 章 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の抗酸化能評価

第 1 節 序

C₆₀(OH)_n は、ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) や一酸化窒素 (NO) などの活性酸素種 (ROS) を消去することが報告されている。²⁰⁻²¹⁾ しかし、大部分が炭素原子で構成される C₆₀(OH)_n は、C₆₀ と同様に水に対する溶解度が極めて低いため、上記の抗酸化能評価の実験は、ジメチルスルホキシド (DMSO) などの有機溶媒に溶解させた状態あるいは粗大凝集体として水に分散させた状態で行われている。したがって、C₆₀(OH)_n の医薬への応用を企図する場合、C₆₀(OH)₁₀ の抗酸化能を水に均一に溶解あるいは分散した状態で正確に評価する必要がある。

これまでの検討で、C₆₀(OH)₁₀ を生体適合性に優れる HP- β -CyD あるいは γ -CyD と減圧下、4 °C で 3 時間混合粉碎後、超音波処理により水中へ分散させることで、凝集安定性に優れる C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/ γ -CyD ナノ粒子を高収率に調製可能なことを明らかにした。そこで本章では、C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/ γ -CyD ナノ粒子の *in vitro* におけるラジカル消去能を人工ラジカルである 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazine radical (DPPH ラジカル) および [2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)] (ABTS) ラジカルを用いて評価した。また、各種 ROS ($\cdot\text{OH}$ 、O₂ \cdot^- 、NO) に対する消去能を測定し、C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の抗酸化能を評価した。さらに、各種細胞 (HeLa 細胞、HepG2 細胞) を用いて、C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の酸化ストレス抑制効果を明らかにした。

第 2 節 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子のラジカル消去能

第 1 項 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の DPPH ラジカル消去能

Fig. 13 は本検討で用いた DPPH ラジカルを示す。安定な人工ラジカルである DPPH ラジカルは抗酸化物質により還元されると、540 nm 付近の吸収強度が減少する。³⁴⁾ この吸収強度の減少から C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子のラジカル消去能を評価した。比較対象として、1 時間超音波照射して水に分散させた C₆₀(OH)₁₀ 単分散体を用いて同様に検討した。

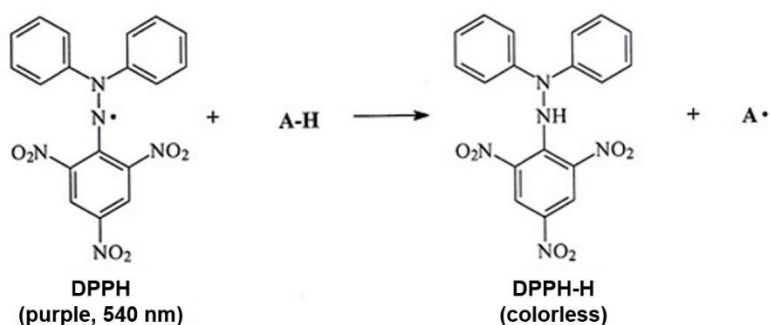


Fig. 13. Reduction of DPPH Radical by Antioxidants

Fig. 14 に示すように、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子は濃度依存的に 540 nm の吸収を減少させ、DPPH ラジカル消去能を示した。一方、ナノ粒子化していない C₆₀(OH)₁₀ 分散体の DPPH ラジカル消去能は低く、本濃度条件下の消去率は C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子よりも顕著に低かった。また、HP-β-CyD ナノ粒子の方が γ-CyD ナノ粒子に比べて、高い DPPH ラジカル消去率を示す傾向がみられた。例えば、C₆₀(OH)₁₀ 濃度 250 μM におけるラジカル消去率は HP-β-CyD ナノ粒子では 38%、γ-CyD ナノ粒子では 33% であった。

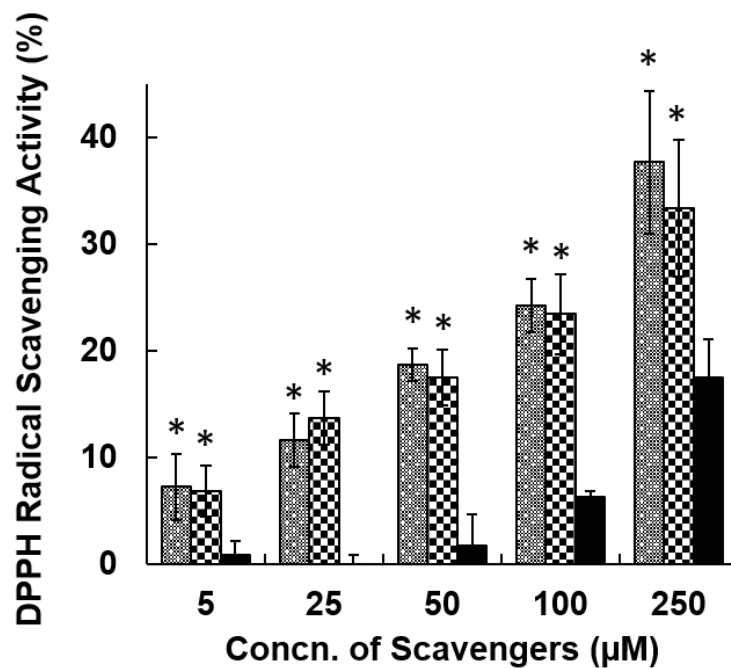


Fig. 14. DPPH Radical Scavenging Activities of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles, C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD Nanoparticles and C₆₀(OH)₁₀ Dispersion

Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments. *, $p < 0.05$ versus C₆₀(OH)₁₀ dispersion

■ : C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ▨ : C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ■ : C₆₀(OH)₁₀ dispersion

第 2 項 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の ABTS ラジカル消去能

Fig. 15 は本検討で用いた ABTS ラジカルを示す。ABTS ラジカルは DPPH ラジカルと同様に安定な人工ラジカルであり、還元されると ABTS ラジカルの 734 nm 付近の吸収強度が減少する。³⁵⁾ C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子添加による ABTS ラジカルの吸光度変化を測定し、そのラジカル消去能を評価した。

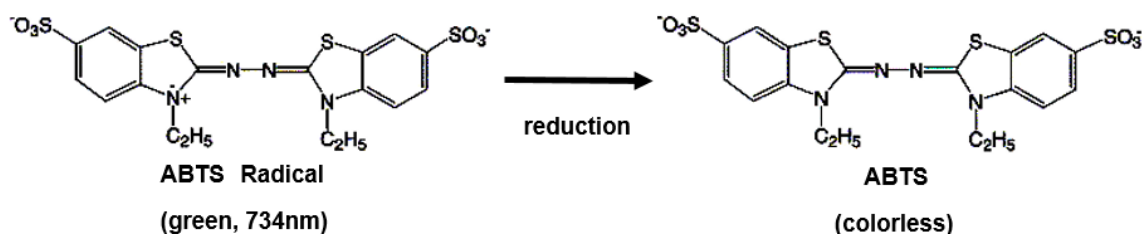


Fig. 15. Reduction of ABTS Radical

Fig. 16 に示すように、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子および C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子は、濃度依存的かつ時間経過毎に ABTS ラジカルを消去した。例えば、C₆₀(OH)₁₀ 濃度 200 μM、15 分における消去率は、HP-β-CyD ナノ粒子で 73%、γ-CyD ナノ粒子で 60% であり、HP-β-CyD ナノ粒子の方が γ-CyD ナノ粒子よりも有意に高いラジカル消去能を示した。一方、C₆₀(OH)₁₀ 分散体の ABTS ラジカル消去能は低く、同条件下での消去率は 25% 程度であった。HP-β-CyD 単独あるいは γ-CyD 単独では、DPPH ラジカルおよび ABTS ラジカルに対する消去能は示さなかった (data not shown)。以上の結果より、C₆₀(OH)₁₀ は人工ラジカルに対する消去能を有し、ナノ粒子化することで消去能が増大することが明らかとなった。また HP-β-CyD ナノ粒子の方が γ-CyD ナノ粒子よりも高いラジカル消去能を有した。

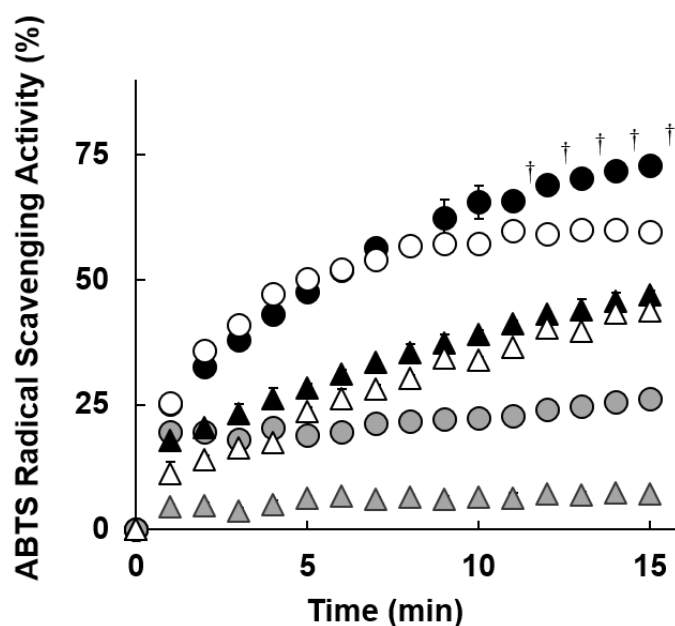


Fig. 16. ABTS Radical Scavenging Activities of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles, C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD Nanoparticles and C₆₀(OH)₁₀ Dispersion

Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments. †, *p* < 0.05 versus C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD nanoparticles.

● : C₆₀(OH)₁₀ dispersion (200 μM) ● : C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (200 μM) ○ : C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD (200 μM)
 ▲ : C₆₀(OH)₁₀ dispersion (100 μM) ▲ : C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (100 μM) △ : C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD (100 μM)

第 3 節 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の抗酸化能

前節で検討した DPPH ラジカルや ABTS ラジカルは生体に存在しない人工ラジカルであることから、本節では、C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の抗酸化能を生体内で発生し強い酸化力を有する・OH および O₂・⁻、NO に対する消去能により評価した。

第 1 項 C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の $\cdot\text{OH}$ 消去能

$\cdot\text{OH}$ 消去能は、Fenton 反応 ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Fe}^{2+} \rightarrow \cdot\text{OH}$) により発生させた $\cdot\text{OH}$ を ESR スピントラップ法を用いて評価した。³⁶⁾ ESR スピントラップ法は、寿命が短く直接検出することが困難な ROS を種々のスピントラッププローブと反応させ、長寿命で検出しやすい化学種に変換して ESR スペクトルを測定する方法である。Fig. 17 に示すように、ESR スピントラップ試薬である 5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) は Fenton 反応により発生した $\cdot\text{OH}$ と DMPO-OH スピンアダクトを生成する。この DMPO-OH アダクトの ESR シグナル強度の減少率から C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の $\cdot\text{OH}$ 消去率を算出した。

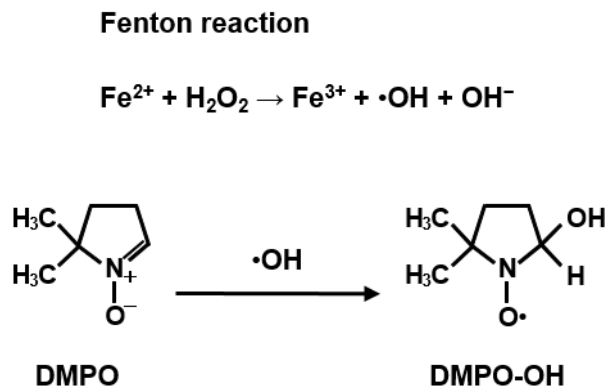


Fig. 17. Fenton Reaction and Detection of $\cdot\text{OH}$ by ESR Spin-trapping

Fig. 18 (a) に示すように、DMPO-OH アダクトの ESR シグナルは、 $A^N=1.49$ mT、 $A^H=1.49$ mT の超微細結合定数（分裂の大きさを磁場単位で示した値）を有した。この ESR シグナル強度は、C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子存在下で著しく減少した。これは、C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の添加により $\cdot\text{OH}$ が消去さ

れ、DMPO-OH 生成が抑制されたことを示す。Fig.18 (b) は外部標準である Mn^{2+} シグナルに対する DMPO-OH シグナルの相対強度変化から算出した $\cdot OH$ 消去率を示す。 $C_{60}(OH)_{10}$ 添加濃度に依存して $\cdot OH$ 消去率は増大し、 $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度 $25 \mu M$ における消去率は、HP- β -CyD ナノ粒子で 84%、 γ -CyD ナノ粒子で 67%、 $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体で 21% であった。 $\cdot OH$ に対しても HP- β -CyD ナノ粒子は γ -CyD ナノ粒子や $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体よりも有意に高い消去能を有した。

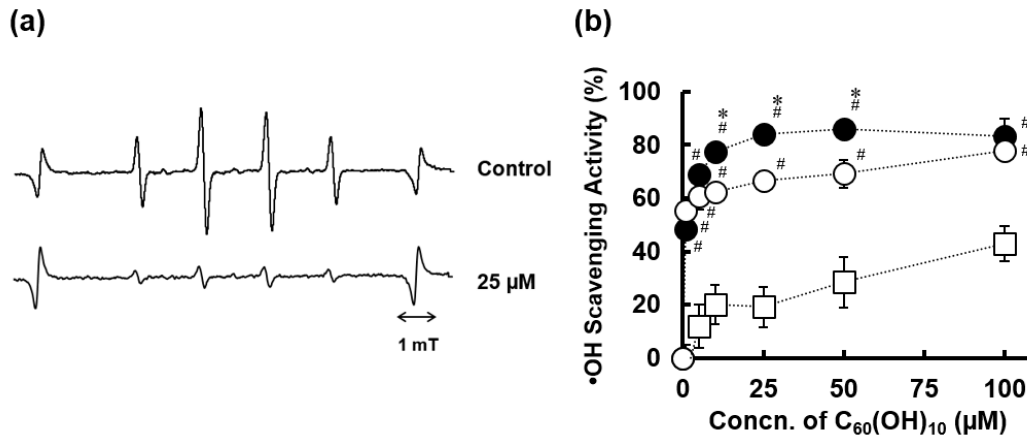


Fig. 18. ESR Spectra (a) of DMPO-OH Adduct in the Presence and Absence of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles and $\cdot OH$ Scavenging Activities (b) of $C_{60}(OH)_{10}$ Dispersion, $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles and $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ Nanoparticles

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared with the $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ nanoparticles. # $p < 0.05$ compared with the $C_{60}(OH)_{10}$

□ : $C_{60}(OH)_{10}$ dispersion ● : $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ○ : $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$

第 2 項 C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の O₂^{•-} 消去能

O₂^{•-} 消去能は、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼの反応により発生した O₂^{•-} を ESR スピントラップ法により測定して評価した。•OH の場合と同様に ESR スピントラップ試薬として DMPO を用い、O₂^{•-} との反応で生じた DMPO-OOH スピンアダクトの ESR スペクトルを測定した (Fig. 19)。

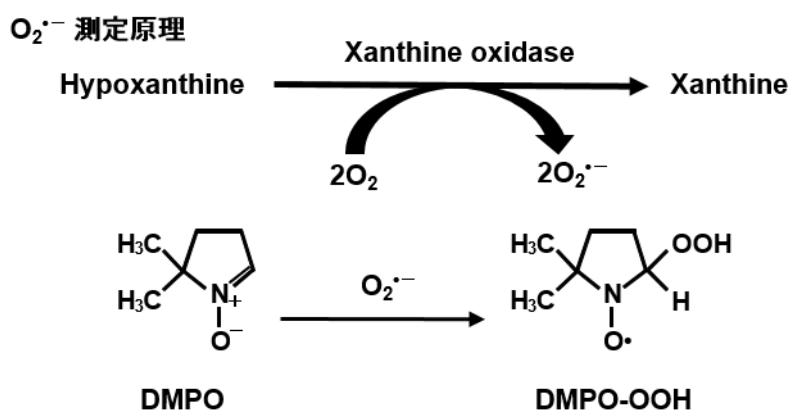


Fig. 19. Detection of O₂^{•-} by ESR Spin-trapping

Fig. 20 (a) に示すように、DMPO-OOH アダクトの ESR シグナルは超微細結合定数 $A^N=1.43$ mT、 $A^{H\beta}=1.17$ mT、 $A^{H\gamma}=0.125$ mT を示した。このシグナル強度は、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の添加により著しく減少した。Fig. 20 (b) は、Mn²⁺ シグナルに対する DMPO-OOH シグナルの相対強度変化より算出した O₂^{•-} 消去率を示す。O₂^{•-} 消去率は C₆₀(OH)₁₀/CyDs 添加濃度に依存して増大し、100 μM における消去率は、HP-β-CyD ナノ粒子で 47%、γ-CyD ナノ粒子で 38%、C₆₀(OH)₁₀ 分散体で 25%であった。HP-β-CyD ナノ粒子は γ-CyD ナノ粒子や C₆₀(OH)₁₀ 分散体よりも高い O₂^{•-} 消去率を示した。以上の

結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は人工ラジカルだけでなく、各種 ROS に対しても高い消去能を有することが明らかとなった。

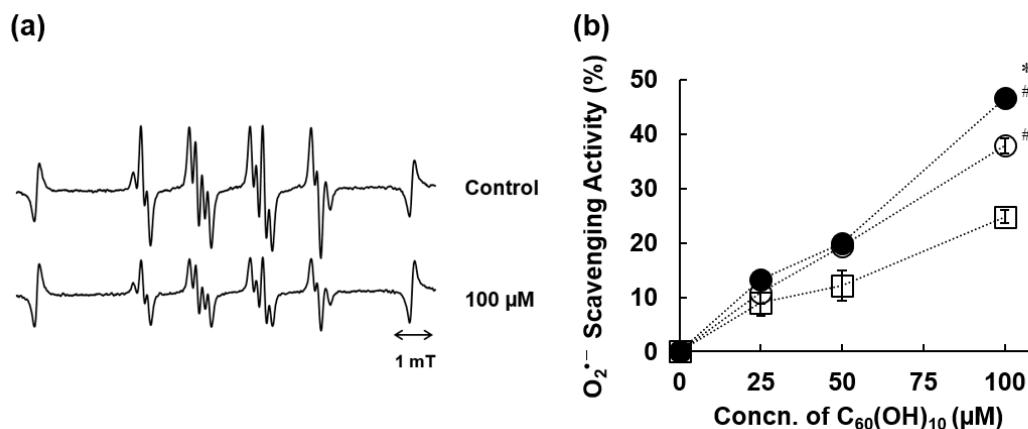


Fig. 20. ESR Spectra (a) of DMPO-OOH Adduct in the Presence and Absence of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles and $O_2^{\cdot-}$ Scavenging Activities (b) of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles, $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ Nanoparticles and $C_{60}(OH)_{10}$

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. * $p < 0.05$ compared with the $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$. # $p < 0.05$ compared with the $C_{60}(OH)_{10}$

□ : $C_{60}(OH)_{10}$ dispersion ● : $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ○ : $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$

第 3 項 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の NO 消去能

Snezana らは、 $C_{60}(OH)_{24}$ が *in vitro* および *in vivo* において、NO ドナーであるニトロプルシドナトリウム (SNP) より発生した NO を直接消去することを報告した。¹⁷⁾ そこで、高い抗酸化能を示した $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の NO 消去能を代表的な抗酸化剤であるアスコルビン酸、ビタミン E 誘導体であるトロロックス、抗酸化剤として医療用医薬品に使用されているエダラ

ボン（商品名ラジカット®）と比較検討した。NO は、SNP に可視光（Xenon light, 35 mW/cm², 5 min）を照射して発生させ、発生した NO 量は Griess 法により測定した。Fig. 21 に示すように、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は濃度依存的に NO 消去能を示し、100 μM における消去率は 67% であった。一方、アスコルビン酸、トロロックス、エダラボンは濃度依存的な NO 消去率を示したが、その値は C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子よりも低く、100 μM における消去率はそれぞれ 16%、13%、31%であった。以上の結果より、C₆₀(OH)₁₀/CyD ナノ粒子は各種人工ラジカルおよび ROS に対して消去能を有することが明らかとなった。また、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の抗酸化能は、C₆₀(OH)₁₀/γ-CyD ナノ粒子や他の抗酸化剤よりも優れることが明らかとなった。

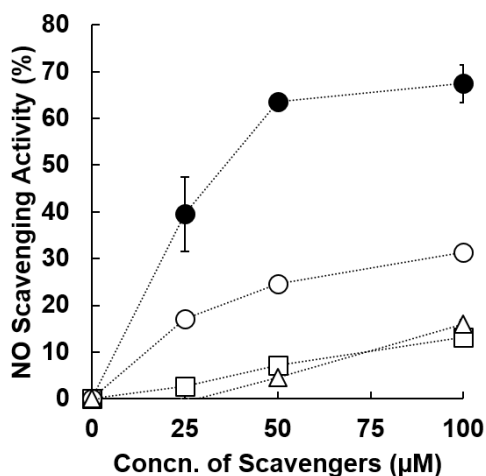


Fig. 21. NO Scavenging Activities of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles, Ascorbic Acid, Trolox and Edaravone

Each point represents the mean ± S.E. of 3-4 experiments.

● : C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD △ : Ascorbic acid □ : Trolox ○ : Edaravone

第 4 節 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の細胞における酸化ストレス抑制効果

前節までの検討で、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は高い抗酸化能を有することを明らかにした。そこで本節では、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の各種細胞に対する酸化ストレス抑制効果を検討した。

第 1 項 HeLa 細胞および A549 細胞に対する $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の細胞毒性

一般に、同一成分の物質がナノメートルサイズになると生体への影響（体内動態、細胞毒性、免疫応答等）が変化する可能性が懸念されている。そこでまず、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の各種細胞に対する細胞毒性を検討した。細胞毒性は、ヒト子宮頸がん由来 HeLa 細胞およびヒト肺がん由来 A549 細胞に種々濃度の $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を添加し、細胞生存率の変化より評価した。Fig. 22 に示すように、ナノ粒子化していない $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体および HP- β -CyD 単独は HeLa 細胞および A549 細胞の生存率に影響を与えず、今回検討した濃度範囲では細胞毒性は示さなかった。 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を添加した場合、 $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体や HP- β -CyD 単独添加群と比べ、濃度依存的に細胞生存率が増加する傾向がみられた。しかし、この濃度以上では $C_{60}(OH)_{10}$ が溶解しないため詳細な検討は困難であった。以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}$ はナノ粒子化しても毒性を示さず、高い安全性を有することが示唆された。

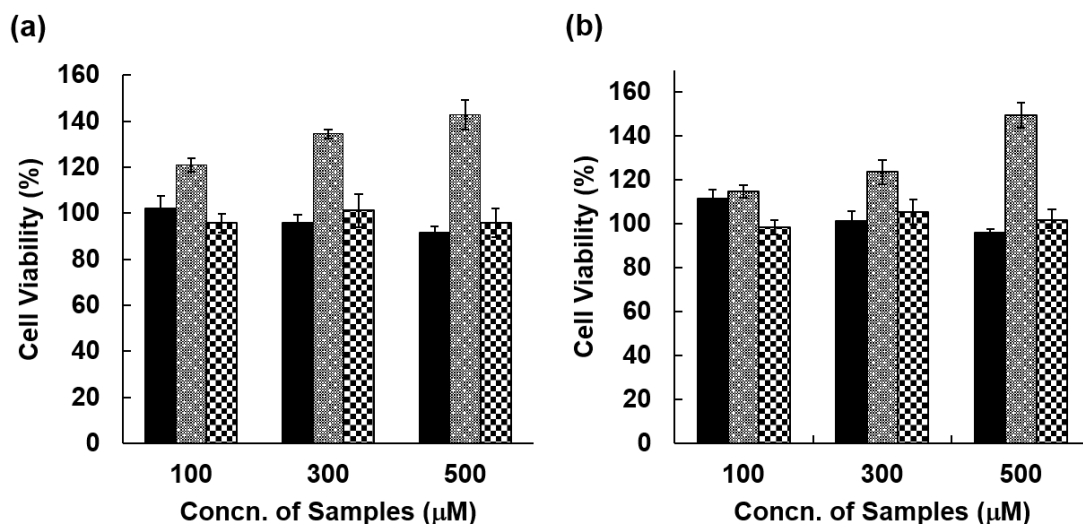


Fig. 22. Cell Cytotoxicity of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD on HeLa Cells (a) and A549 Cells (b)

Each point represents the mean ± S.E. of 4 experiments.

■ : C₆₀(OH)₁₀ dispersion ▨ : C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ▩ : HP-β-CyD

第 2 項 HepG2 細胞および HeLa 細胞に対する C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の酸化ストレス抑制効果

ヒト肝がん由来 HepG2 細胞および HeLa 細胞を用いて、H₂O₂ 添加による酸化ストレスに対する C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の抑制効果を検討した。Fig. 23 は、H₂O₂ 添加により細胞内で発生する酸化ストレスを ROS 検出試薬 CellROX® Green を用いてフローサイトメトリーにより検討した結果を示す。CellROX® Green は、細胞内 ROS により酸化されて蛍光を発する ROS 検出プローブである。HepG2 細胞および HeLa 細胞に H₂O₂ を添加すると、蛍光強度が増大し、細胞内の酸化ストレスの増大が示唆された。一方、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子を各細胞に取り込ませた系では、H₂O₂ 添加により増大した蛍

光強度が濃度依存的に減少し、 H_2O_2 を添加していない Control 群とほぼ同じ蛍光強度を与えた。これらの結果は、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は H_2O_2 により細胞内で発生した酸化ストレスを濃度依存的に抑制することを示唆する。

Fig. 24 は H_2O_2 添加による各種細胞の生存率への影響を示す。 H_2O_2 を添加すると、HepG2 細胞および HeLa 細胞の細胞生存率は約 50% まで低下した。

$C_{60}(OH)_{10}$ 分散体や $HP-\beta-CyD$ を添加しても、 H_2O_2 により低下した細胞生存率は回復せず、低いままであった。一方、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を各細胞に取り込ませた系では、細胞生存率の減少が $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度依存的に抑制され、 H_2O_2 による酸化ストレスに対して細胞保護効果を示した。

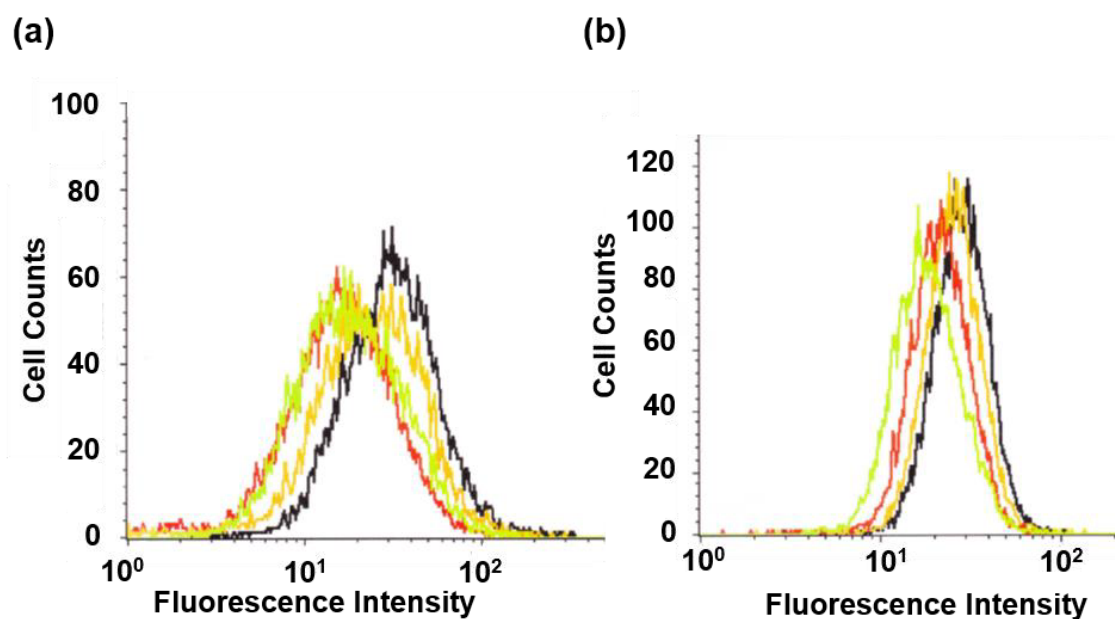


Fig. 23. Antioxidant Effects of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles on HepG2 Cells (a) and HeLa Cells (b) against Oxidative Stress Induced by H_2O_2

■ : Control
 ■ : H_2O_2
 ■ : $H_2O_2 + C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ 25 μ M
■ : $H_2O_2 + C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ 100 μ M

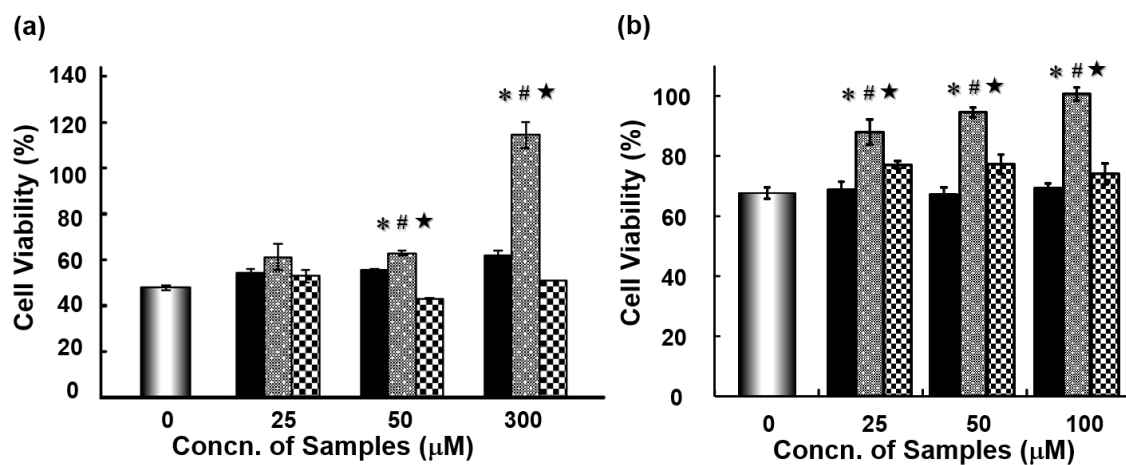


Fig. 24. Protective Effects of $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$ on HepG2 Cells (a) and HeLa Cells (b) against Oxidative Stress Induced by H_2O_2

Each point represents the mean \pm S.E. of 3 experiments. \star $p < 0.05$ compared with the H_2O_2 . $\#$ $p < 0.05$ compared with the $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ dispersion. \ast $p < 0.05$ compared with the $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HP-}\beta\text{-CyD}$.

: H_2O_2
 : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ dispersion
 : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{C}_{60}(\text{OH})_{10}/\text{HP-}\beta\text{-CyD}$
 : $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{HP-}\beta\text{-CyD}$

第 5 節 考察

$C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は、人工ラジカル (DPPH ラジカル、ABTS ラジカル) および ROS ($\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 、 NO) に対して高い消去能を示した (Figs. 14、16、18、20)。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子はいずれのラジカルに対しても、 $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ ナノ粒子やナノ粒子化していない $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体より高い消去能を示した。第 1 章の検討で、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の粒子径 (50 nm) は $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ ナノ粒子の粒子径 (80 nm) よりも小さいことを明らかにした。 $C_{60}(OH)_{10}$ をナノ粒子化すると、粒子表面積が増大し、各種ラジカルとの接触面積が増えることが推察される。このため、 $C_{60}(OH)_{10}/CyD$ ナノ粒子は、 $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体よりも著しく高い抗酸化能を有し、最も粒子径の小さい $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子が優れた抗酸化能を示したものと考えられる。

$C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は NO に対して、一般的な抗酸化物質として知られる アスコルビン酸、エダラボン、トロロックスよりも高い抗酸化能を有した (Fig. 21)。一般に、上記フェノール性抗酸化物質は、Fig. 25 に示すような水素原子移動反応を起こすことで抗酸化作用を示すといわれている³⁷⁾。水素移動反応には、水素原子が直接フリーラジカルに移動する 1 段階機構 (Fig. 25 (a)) あるいは電子移動反応が起こり、抗酸化物質のラジカルカチオン ($ArOH^{\cdot +}$) が生成した後、プロトン移動反応が起こる 2 段階機構がある (Fig. 25 (b))。前者の反応では O-H 結合の解離エネルギーが小さいほど、後者では 1 電子酸化還元電位が小さいほど反応は速やかに進行する。Kato らは $C_{60}(OH)_{32}$ が Fenton 反応により生じたヒドロキシルラジカルを消去する際、同時に $C_{60}(OH)_{32}$ が酸化されてラジカルとなった $C_{60}\cdot O$ が生成することを ESR ス

ペクトルで確認した。³⁸⁾ また、Husebo らは $\text{Na}^+_n[\text{C}_{60}\text{O}_x(\text{OH})_{12-15}]$ が低温状態 (1.5–5.0 K) において、水素が脱離した安定なラジカルアニオンとして存在可能なことを報告した。³⁹⁾ これらの報告は、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ の抗酸化作用がフェノール性抗酸化物質と同様に、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ 分子からの水素移動反応に起因することを強く示唆する。 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ はポリフェノール類と同様に、高電子密度の C_{60} 骨格に水酸基が付加しているため、水酸基の水素原子が遊離しやすく、それにより抗酸化作用を示すものと考えられる。 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ がポリフェノール類と類似のメカニズムで抗酸化作用を示すことは pKa 値からも支持される。Table 1 に示すように、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ の水への溶解性は pH に依存し、pH 11 以上になると急激に上昇する。これは、 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ の pKa は 11 前後であり、ポリフェノール類の pKa 9.95 と近似することを示唆する。 $\text{C}_{60}(\text{OH})_{10}$ の場合、水素移動反応を起こす水酸基の数が多いため、他のフェノール性抗酸化物質よりも高い抗酸化能を示したものと推察される。

(a) 水素原子移動反応








(b) 一電子移動反応



Fig. 25. Radical Scavenging Mechanism of Phenolic Antioxidants

Table. 1. Solubilities of C₆₀(OH)₁₀ in Various pH Solutions

pH	7	9	10	11	12
Appearance					
Solubility (μM)	5.8	5.8	14	94	538

C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は細胞においても H₂O₂ 由来の酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示した (Figs. 23、24)。C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子を添加後、細胞を洗浄し、H₂O₂ を添加したことから、細胞内に取り込まれた C₆₀(OH)₁₀ が H₂O₂ により発生した細胞内での酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示したものと考えられる。また、Fig. 22 に示すように、C₆₀(OH)₁₀ に細胞毒性はみられず、安全性に優れたナノマテリアルであることが示唆された。さらに、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子においてのみ細胞生存率が control 群よりも上昇したことから、C₆₀(OH)₁₀ ナノ粒子は細胞増殖促進効果を有することが推察される。この C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子による細胞への影響に関しては今後詳細に検討する必要がある。

第 6 節 小括

本章では $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ ナノ粒子を用いて *in vitro* における各種抗酸化能を評価した。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の細胞に対する毒性、抗酸化能および細胞保護効果を検討した。以下に得られた知見を要約する。

1) $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は人工ラジカル (DPPH ラジカル、ABTS ラジカル) に対して消去能を示し、その効果はナノ粒子化していない $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体よりも高かった。また 小さな粒子径を有する $HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は $\gamma-CyD$ ナノ粒子よりも高いラジカル消去能を有した。

2) $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は各種 ROS ($\cdot OH$ 、 $O_2^{\cdot -}$ 、NO) を消去し、特に $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子はアスコルビン酸、エダラボン、トロロックスよりも高い抗酸化能を有した。

3) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は HeLa 細胞および A549 細胞に対して細胞毒性を示さなかった。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は HepG2 細胞および HeLa 細胞に対して H_2O_2 により誘発される酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示した。

以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は安全性に優れ、かつ高い抗酸化能を有することが明らかとなった。また、ナノ粒子化することで $C_{60}(OH)_{10}$ の抗酸化能は増強した。

第 3 章 アセトアミノフェン誘発肝障害に対する $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の治療効果

第 1 節 序

アセトアミノフェン (APAP) は小児から高齢者、妊婦にまで広く安全に使用される解熱鎮痛薬であるが、自殺企図や誤飲などで過量に服用すると、酸化ストレスに起因する重篤な肝障害が発生する。⁴⁰⁻⁴⁵⁾ 欧米では急性肝障害患者の約半数が APAP に関連した肝障害であると報告されている。⁴⁶⁻⁴⁹⁾ 現在 APAP 肝障害の治療薬として、*N*-アセチルシステイン (NAC) の一種類のみが使用されているが、十分な治療効果が得られておらず、APAP 肝障害に対する新規治療薬の開発が望まれている。

これまでの検討で、 $C_{60}(OH)_{10}$ は $HP-\beta-CyD$ とともに混合粉砕すると粒子径 100 nm 以下の親水性ナノ粒子として高濃度に調製可能であり、*in vitro* において高い抗酸化能を有することを明らかにした。また、放射性同位体でラベル化した $C_{60}(OH)_n$ をマウスに静脈内投与すると高い肝移行性を示すことが報告されていることから、⁵⁰⁾ $C_{60}(OH)_{10}$ もまた肝臓をターゲットとした抗酸化剤として医薬分野への応用が期待される。

そこで本章では、APAP 肝障害に対する $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の治療効果およびその抑制機構について検討し、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の *in vivo* における抗酸化剤としての有用性を明らかにした。

第 2 節 APAP 肝障害モデルマウスにおける $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の肝臓保護効果

第 1 項 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子のトランスアミナーゼ値に及ぼす影響

APAP 肝障害モデルマウスは APAP 400 mg/kg をマウス (C57BL/6NSeaWT) に腹腔内投与することで作製した。⁵¹⁾ APAP 投与 30 分後に $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を腹腔内または静脈内投与した。APAP 投与 24 時間後に血漿を採取し、肝障害の指標であるトランスアミナーゼ (ALT、AST) 値を測定した (Fig. 26)。比較対象として、 $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体および既存の治療薬である NAC を用いて同様に検討した。

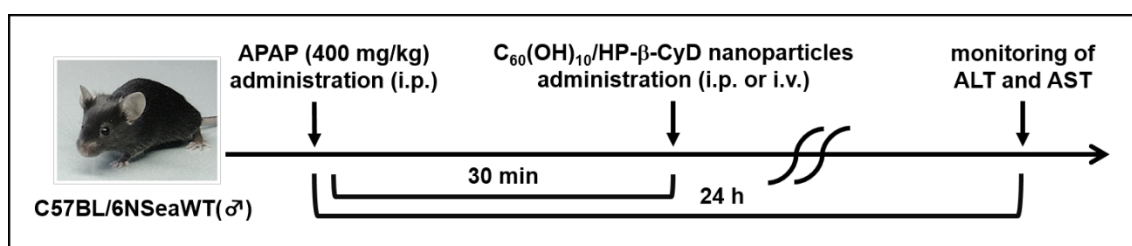


Fig. 26. Protocol for Treatment of APAP Induced Liver Injury

Fig. 27 は、APAP および $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子をマウス腹腔内投与した際の ALT、AST 値の変化を示す。APAP 400 mg/kg を腹腔内投与すると ALT 値および AST 値はそれぞれ約 13000 IU/L、約 7000 IU/L まで上昇し、肝障害が誘発された。このマウスに $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を 100 mg/kg または 200 mg/kg 腹腔内投与すると、それらの値はほぼ正常値まで回復した。また、その改善効果は NAC を 200 mg/kg 腹腔内投与した場合と同等

であった。一方、ナノ粒子化していない $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体は、200 mg/kg 腹腔内投与しても ALT、AST 値の改善はみられず、APAP のみを投与した場合と同様に高い値を示した。HP- β -CyD のみを腹腔内投与した場合も肝障害改善効果は観察されなかった (data not shown)。

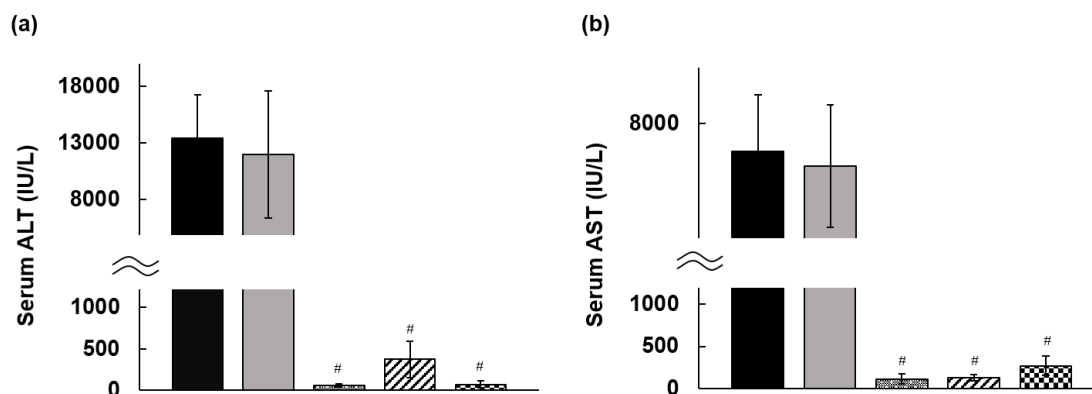


Fig. 27. Effects of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD Nanoparticles on ALT (a) and AST (b) Levels in APAP Induced Liver Injury

※ $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD Nanoparticles were administered intraperitoneally.

Each point represents the mean \pm S.E. of 3-10 experiments.

$p < 0.05$ compared with the APAP alone.

■ : APAP □ : APAP + $C_{60}(OH)_{10}$ dispersion (200 mg/kg) ▣ : APAP + NAC (200 mg/kg)
 ▤ : APAP + $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD (100 mg/kg) ▥ : APAP + $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD (200 mg/kg)

Fig. 28 は、APAP 投与後、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子を静脈内投与した際の ALT 値、AST 値の変化を示す。APAP 400 mg/kg 腹腔内投与して上昇した ALT および AST 値は、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子を 50 mg/kg または 1.5 mg/kg 静脈内投与することで、ほぼ正常値まで回復した。NAC を同量静脈内投与した場合も同様に ALT 値、AST 値は正常値まで回復した。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta$ -CyD ナノ粒子を静脈内投与した方が、腹腔内投与した場合に比べて、低用量で顕著な抑制効果を示した。

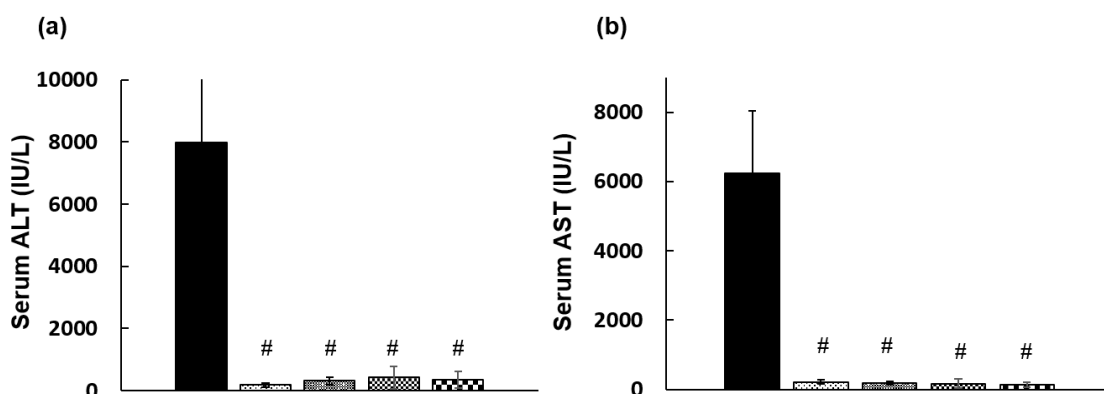


Fig. 28. Effects of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles on ALT (a) and AST (b) Levels in APAP Induced Liver Injury

※C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles were administered intravenously.

Each point represents the mean ±S.E. of 7-11 experiments.

p < 0.05 compared with the APAP alone.

■ : APAP ▨ : APAP + NAC (1.5 mg/kg) ▩ : APAP + NAC (50 mg/kg)
 ▤ : APAP + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (1.5 mg/kg) ▦ : APAP + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (50 mg/kg)

第2項 C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の肝障害マウス生存率に及ぼす影響

Fig. 29 は、APAP 300 mg/kg をマウス腹腔内に投与し、その 30 分後に C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子または NAC を静脈内あるいは腹腔内投与した際の生存率を示す。APAP 単独投与群では 48 時間以内にほぼ全数が死亡するのに対し、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子投与群および NAC 投与群は 72 時間以降も 75% 以上の高い生存率を維持した。特に、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子を 50 mg/kg 静脈内投与した場合の生存率は 100% であった。また、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子を静脈内投与した方が腹腔内投与した場合よりも高い生存率を維持した。

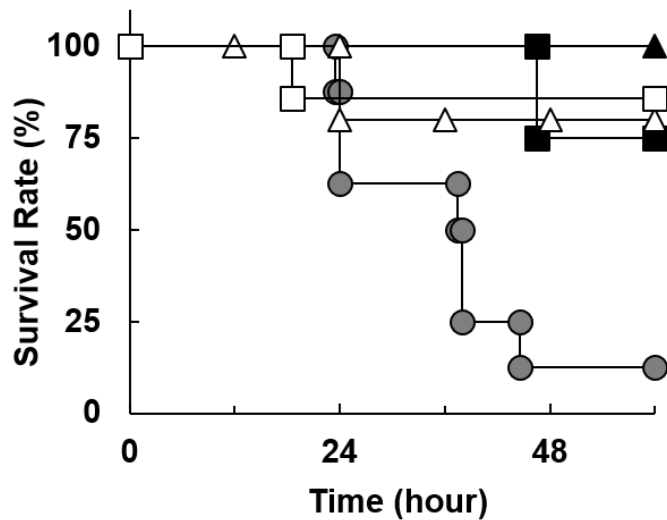


Fig. 29. Effects of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles on Survival Rate in APAP Induced Liver Injury

● : APAP △ : APAP + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (200 mg/kg i.p.) □ : APAP + NAC (200 mg/kg i.p.)
 ▲ : APAP + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (50 mg/kg i.v.) ■ : APAP + NAC (50 mg/kg i.v.)

第3項 APAP 投与後の肝臓の肉眼的観察

APAP 400 mg/kg をマウス腹腔内に投与し、その 30 分後に C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子 200 mg/kg または NAC 200 mg/kg を腹腔内投与した。Fig. 30 は、APAP 投与 24 時間後におけるマウス肝臓の写真を示す。APAP を腹腔内投与すると、出血や壊死に伴う著しい変色がみられた。一方、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子投与群や NAC 投与群では、肝臓の出血はほとんど観察されず、壊死に伴う変色も顕著に抑制された。以上のトランスアミナーゼ値、生存率および臓器観察の結果より、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は APAP 過量投与により誘発される肝障害を抑制することが明らかとなった。

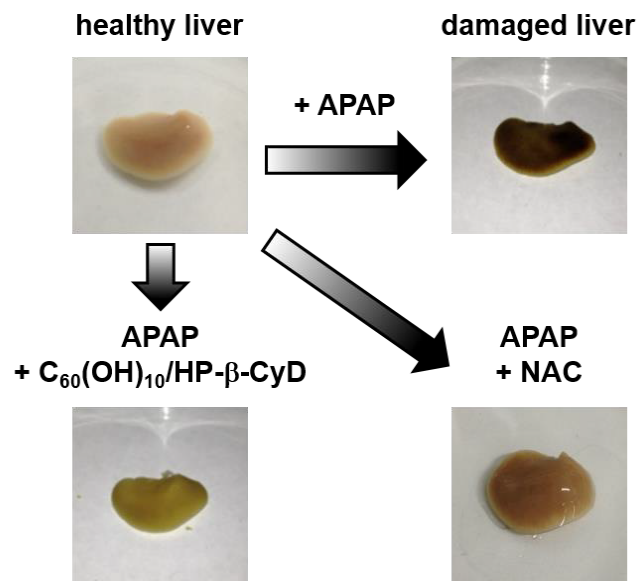


Fig. 30. Effects of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles (200 mg/kg) or NAC (200 mg/kg) on Appearance of Liver Injury Induced by Over Dose of APAP (400 mg/kg)

第 3 節 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の APAP 肝障害抑制機構

Fig. 31 は APAP 肝障害発生機構を示す。体内に入った APAP は、主に CYP2E1 により、酸化ストレスを誘発する *N*-アセチル-*p*-ベンゾキノニンイミン (NAPQI) に代謝される。NAPQI は、APAP の通常投与量では少量しか産生されないため、グルタチオン (GSH) 経路により速やかに無毒化される。しかし、自殺企図や誤飲などで APAP を過量に摂取すると、APAP を解毒する GSH が枯渇し、NAPQI が蓄積する。蓄積した NAPQI は肝ミトコンドリアに付加して膜透過性遷移を引き起こし、ATP の産生が不良となり、酸化ストレスが誘発され、APAP 肝障害が発生する。^{52,53)} 既存の治療薬である NAC は、GSH の補充を行なうことで NAPQI の解毒過程を促進する。^{54,55)} そこで、本節では、APAP 肝障害発生に関与する代表的な以下の 3 つの経路 ① CYP2E1 代謝に

よる NAPQI 産生過程、② GSH による NAPQI 解毒過程および ③ 肝ミトコンドリアにおける酸化ストレス誘発過程に対する $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の影響を検討した。

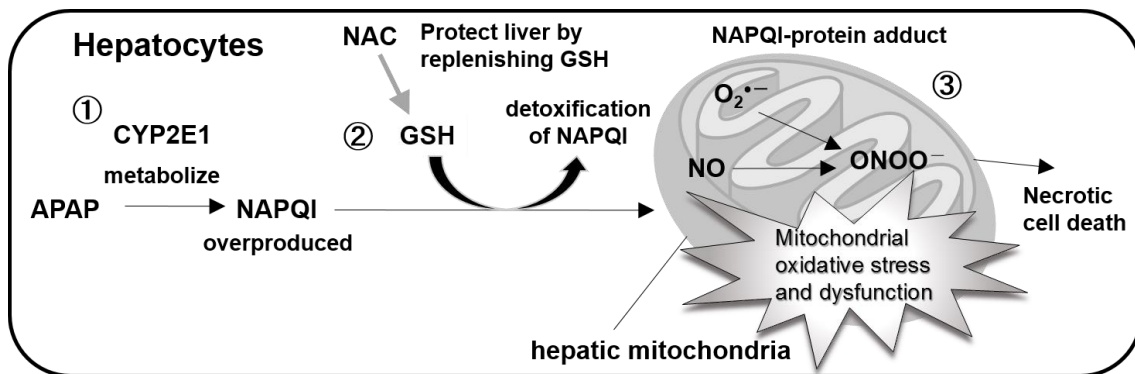


Fig. 31. Pathogenesis of APAP Induced Liver Injury

第 1 項 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の CYP2E1 発現および肝臓 GSH 濃度に及ぼす影響

Fig. 32 は、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子による APAP 肝障害モデルマウス肝臓の CYP2E1 発現の変動をウエスタンブロッティングにより検討した結果を示す。APAP 単独投与群と比べて、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子投与による CYP2E1 発現の変動は認められなかった。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子による肝臓 GSH 濃度の変化に及ぼす影響を検討した結果 (Fig. 33)、APAP 単独投与時に観察された GSH 濃度の低下は、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子投与によって、回復させることはできなかった。以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の APAP 肝障害抑制に対して、CYP2E1 による NAPQI 産生抑制 (Fig. 31 の経路 ①) や GSH による NAPQI 解毒促進 (Fig. 31 の経路 ②) の寄与は小さいことが示唆された。⁵⁶⁾

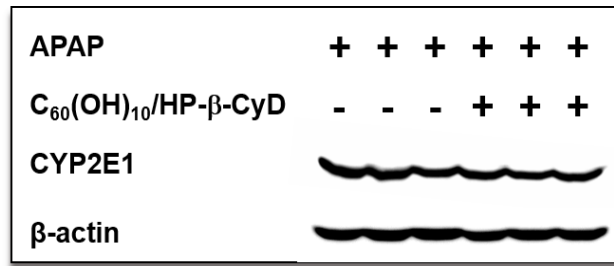


Fig. 32. Effects of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles (200 mg/kg) on CYP2E1 Level Induced by APAP Over Dose (400 mg/kg)

Each point represents the mean ±S.E. of 3-4 experiments.

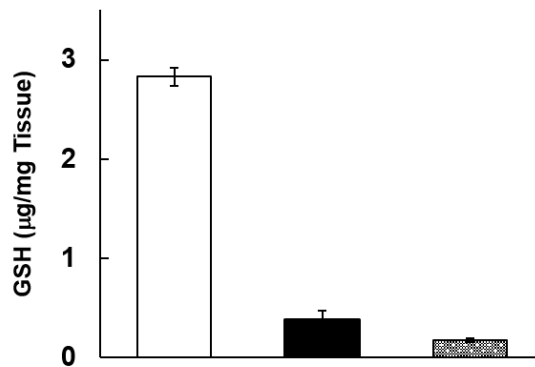


Fig. 33. Effects of C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles (200 mg/kg) on Hepatic GSH Depletion Induced by APAP Over Dose (400 mg/kg)

Each point represents the mean ±S.E. of 3-4 experiments.

□ : Control (no injection of APAP) ■ : APAP ▨ : APAP + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD

第 2 項 C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の酸化ストレスに対する影響

APAP 肝障害発症に関わる酸化ストレスとして、強力な酸化力および毒性を有するペルオキシナイトライト (ONOO⁻) の関与が報告されている。^{57,58)} そこ

で、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の $ONOO^-$ 消去能を *in vitro* で検討した。 $ONOO^-$ 消去能は、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子添加および非添加時において、 $ONOO^-$ により酸化されるジヒドロローダミン 123 の蛍光スペクトル変化をモニターすることで評価した。Fig. 34 に示すように、 $ONOO^-$ 量は $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度依存的に減少し、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は $ONOO^-$ に対しても消去能を有することが示された。そこで次に、前節で示した APAP 肝障害モデルマウスの肝臓組織切片を用いて、 $ONOO^-$ に関連した酸化ストレスマーカーである抗ニトロチロシン免疫染色を行った。Fig. 35 に示すように、肝臓組織断面積におけるニトロチロシン陽性部分（黄色部分）の割合は、APAP 単独投与群では 17% であったのに対し、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子投与群では約 3% まで低下し、その値は NAC 投与群（2%）とほぼ同等であった。これらの結果は、肝臓組織において発生した $ONOO^-$ を $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子が抑制することを示す。以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は、 $ONOO^-$ 由来の酸化ストレスを消去することで APAP 肝障害を抑制する可能性が示唆された。

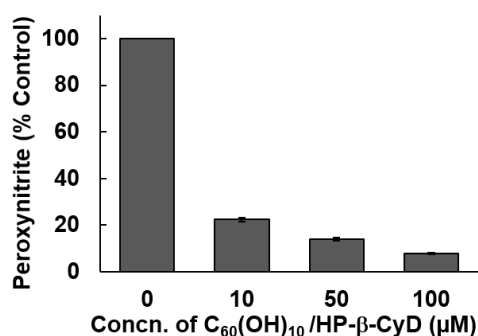


Fig. 34. Peroxynitrite Scavenging Activity of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles

Each point represents the mean \pm S.E. of 4 experiments.

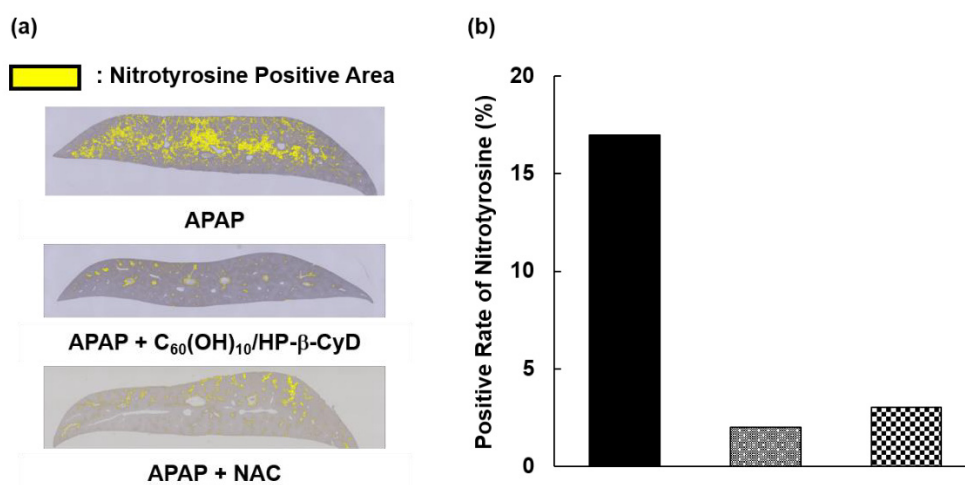


Fig. 35. Immunohistochemical Staining of Liver Sections for Nitrotyrosine Protein Adducts after Treated with APAP alone, APAP+ C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD Nanoparticles or APAP+NAC (a) and Nitrotyrosine Positive Rate in liver Sections (b)

■ : APAP (400 mg/kg) ▨ : APAP (400 mg/kg) + C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD (200 mg/kg)
 ▩ : APAP(400mg/kg) + NAC(200 mg/kg)

第4節 考察

APAP 肝障害モデルマウスに対する C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の腹腔内あるいは静脈内投与は、顕著に増加していた ALT 値および AST 値をほぼ正常値まで回復させた (Figs. 27、28)。一方、C₆₀(OH)₁₀ 分散体ではそのような改善効果はみられなかった。前章の *in vitro* における抗酸化能評価より、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は抗酸化作用を顕著に増加させたことから、本章における *in vivo* の検討においても抗酸化能に関連した優れた肝臓保護効果を発揮したものと推察される。実際、APAP 肝障害抑制機構の代表的経路である肝ミトコンドリア内の酸化ストレス誘発過程において、ONOO⁻ 産生は

C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子投与により顕著に抑制された (Fig. 35)。ONOO⁻ は APAP 肝障害における重要なメディエーターであり、主に肝臓ミトコンドリアで NO と O₂·⁻ の反応により産生されることが報告されていることから、⁵⁷⁾ 肝ミトコンドリアにおける酸化ストレス誘発過程を C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子が抑制している可能性が強く示唆された。また *in vitro* における ONOO⁻ 消去能の検討 (Fig. 34) においても、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は ONOO⁻ を低濃度 (10 μM) で消去することが明らかとなった。さらに、第 2 章の検討より、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は NO と O₂·⁻ に対しても優れた消去能を有した (Figs. 20, 21)。これらの結果からも、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は肝細胞で生じる酸化ストレスを抑制し、肝臓保護効果を発揮する可能性が強く示唆された。

また、静脈内投与の方が腹腔内投与よりも低用量でトランスアミナーゼ値の顕著な改善効果および生存率の延長を示した。これは、C₆₀ 誘導体において経口投与及び静脈内投与ともに肝臓への高い集積性が報告されており、^{50,59)} 今回の C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の静脈内投与が、腹腔内投与よりも効率的にナノ粒子を肝臓へ移行させたためであると推察される。一方、APAP 肝障害の治療薬 NAC の作用機序である① CYP2E1 代謝による NAPQI 産生過程、② GSH による NAPQI 解毒過程に対する C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の作用は少ないことが推定された。したがって、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は、APAP 肝障害に対して ONOO⁻ 由来の酸化ストレスを抑制する独自の経路により肝臓保護効果を発揮した可能性が強く示唆された。また、その作用機序は NAC と異なることから、新規抗酸化剤として APAP 肝障害への今後の応用が期待される。

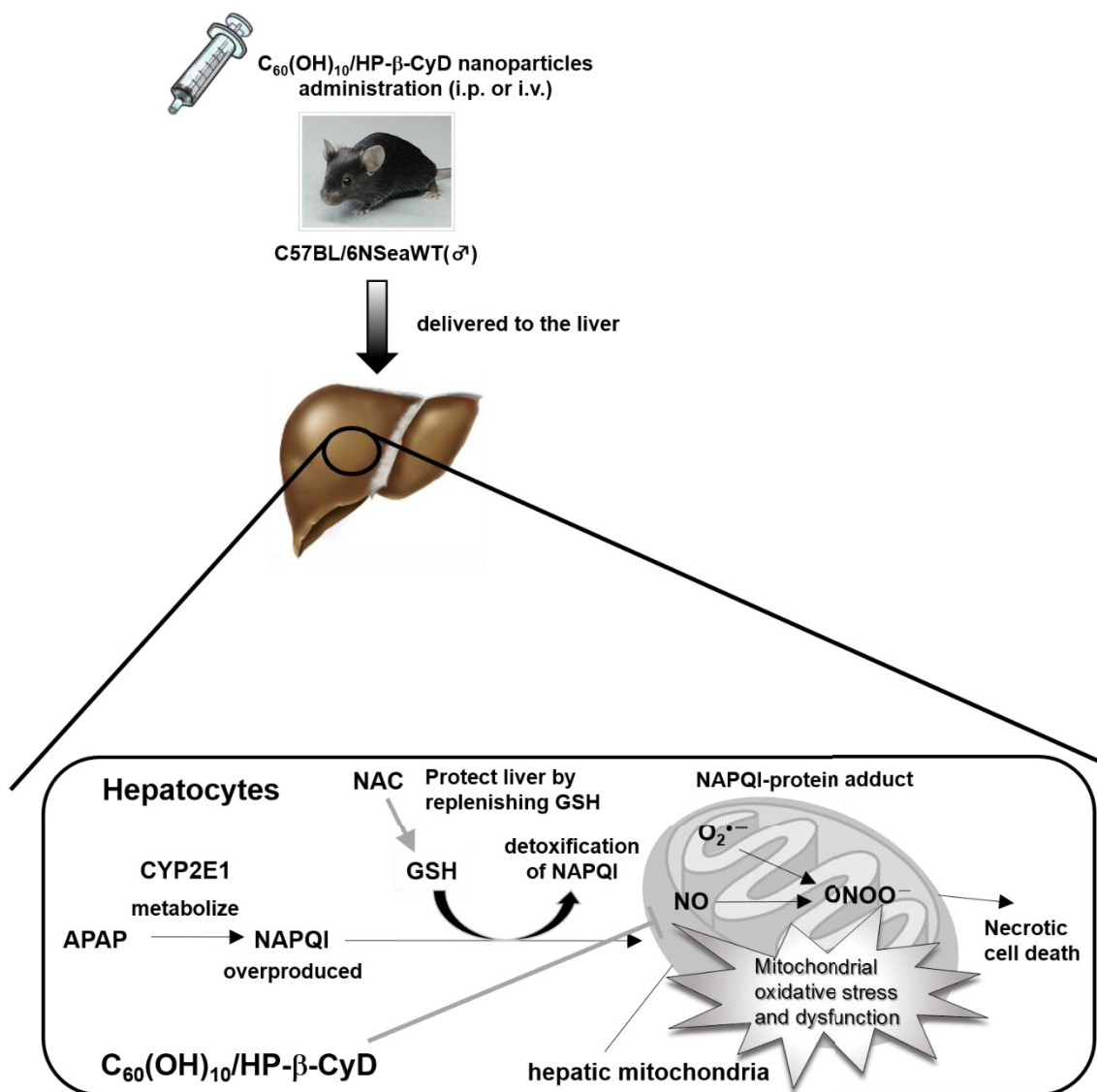


Fig. 36. Proposed Mechanism for Protective Effect of $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ Nanoparticles against APAP Induced Hepatotoxicity

第 5 節 小括

本章では APAP 肝障害に対する C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の抑制効果、さらに、その肝障害抑制メカニズムを検討した。

以下に得られた知見を要約する。

1) APAP 肝障害モデルマウスに C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子を腹腔内および静脈内投与すると、ALT 値および AST 値はほぼ正常値まで回復した。また、肝障害マウス肝臓の炎症・壊死は顕著に抑制され、生存率は増加した。C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は APAP 肝障害に対して優れた肝臓保護効果を有することが明らかとなった。

2) 肝障害発症のイニシエーターである NAPQI 産生に関与する CYP2E1 発現量や NAPQI 無毒化に関与する肝 GSH 量の変化を検討した結果、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子投与による CYP2E1 発現の変動や GSH 濃度の変化はみられなかった。これらの結果は、APAP 肝障害抑制において、CYP2E1 による NAPQI の産生過程や GSH による NAPQI の解毒過程への C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子の関与は小さいことを示唆した。

3) *In vitro* 実験において、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は ONOO⁻ 消去能を示した。APAP 肝障害モデルマウスの肝臓組織切片に対して抗ニトロチロシン免疫染色を行った結果、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子投与群の染色率は APAP 投与群と比較して顕著に抑制された。これらの結果より、C₆₀(OH)₁₀/HP-β-CyD ナノ粒子は、肝細胞で発生する ONOO⁻ などの酸化ストレスを抑制す

ることで、APAP 肝障害を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果より、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は APAP 肝障害に対し、肝臓で発生する酸化ストレスを抑制することで肝臓保護効果を発揮することが明らかとなった。

総 括

$C_{60}(OH)_{10}$ は $\cdot OH$ や NO などの ROS を消去することから、抗酸化剤として医薬分野への応用が期待される。しかしながら、水への溶解性が十分ではなく、環境変化(溶媒の極性、溶質濃度等)により不溶性凝集体・沈殿を容易に生じる。そのため、 $C_{60}(OH)_n$ を用いたこれまでの検討は、有機溶媒中あるいは水中に分散させた状態に限られている。そこで、本研究では $C_{60}(OH)_n$ の抗酸化剤としての医薬への応用を目的とし、可溶化剤として医薬品への使用実績があり、親水性で生体適合性に優れる HP- β -CyD を用いて、 C_{60} に水酸基が約 10 個付加した $C_{60}(OH)_{10}$ をナノ粒子化し、その物理化学的特性や生物活性を明らかにした。

以下に本研究で得られた知見を総括する。

- 1) $C_{60}(OH)_{10}$ と HP- β -CyD および γ -CyD を減圧下、4 °C で混合粉碎すると、混合粉碎時間の延長および添加 CyDs 量の増加に伴い粒子径は減少し、混合モル比 1 : 3 ($C_{60}(OH)_{10}$: CyDs)、3 時間以上の粉碎で平均粒子径が各々約 50 nm および約 80 nm の $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子を高収率に調製することができた。
- 2) $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$ ナノ粒子のゼータ電位は約 -40 mV であり、両粒子とも大きな負電荷を有した。また、透過型電子顕微鏡観察の結果、 $C_{60}(OH)_{10}$ ナノ粒子は均一な球形粒子であった。
- 3) $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子の水中における凝集挙動(25 °C、遮光条件下)を検討した結果、 $C_{60}(OH)_{10}/HP\text{-}\beta\text{-CyD}$ ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma\text{-CyD}$ ナノ粒

子は保存時の凝集・沈殿がみられず、28 日後においてもそれぞれ約 50 nm、約 80 nm の粒子径を維持した。

4) $C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ ナノ粒子は人工ラジカル (DPPH ラジカル、ABTS ラジカル) に対して消去能を示し、その効果はナノ粒子化していない $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体よりも高かった。また 小さな粒子径を有する $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ ナノ粒子よりも高い消去能を有した。

5) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子および $C_{60}(OH)_{10}/\gamma-CyD$ ナノ粒子は各種 ROS ($\cdot OH$ 、 $O_2\cdot^-$ 、NO) を消去した。また、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の消去能はアスコルビン酸、エダラボン、トロロックスよりも高かった。

6) $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は HeLa 細胞および A549 細胞に対して細胞毒性を示さず、さらに $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は HepG2 細胞および HeLa 細胞に対して H_2O_2 により誘発される酸化ストレスを抑制し、細胞保護効果を示した。

7) APAP 肝障害モデルマウスに $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子を腹腔内および静脈内投与すると、ALT 値および AST 値はほぼ正常値まで回復した。また、肝障害マウス肝臓の炎症・壊死は顕著に抑制され、生存率は増加した。このことから $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は APAP 肝障害に対して優れた肝臓保護効果を有することが明らかとなった。

8) 肝障害発症のイニシエーターである NAPQI 産生に関与する CYP2E1 発現

量や NAPQI 無毒化に関与する肝 GSH 量の変化を検討した結果、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子投与により CYP2E1 発現の変動や GSH 濃度の変化はみられず、APAP 肝障害抑制において、CYP2E1 による NAPQI の産生過程や GSH による NAPQI の解毒過程への $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の関与は小さいことが示唆された。

9) *In vitro* 実験において、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は $ONOO^-$ 消去能を有していた。また、APAP 肝障害モデルマウスの肝臓組織切片に対して抗ニトロチロシン免疫染色を行った結果、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子投与群の染色率は APAP 投与群と比較して顕著に抑制された。このことから、 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は、肝細胞で発生する $ONOO^-$ などの酸化ストレスを消去することで、APAP 肝障害を抑制するものと推定された。

これまでに $C_{60}(OH)_n$ を用いた研究は数多く報告されているが、DMSO や DMF などの有機溶媒中あるいは水中に分散させた状態での検討に限られている。水酸基の導入数が増えると $C_{60}(OH)_n$ の溶解性は改善されるが、20 個以上導入したものは細胞毒性を示す可能性があることから、医薬分野への応用を企図する場合、生体に安全で簡便な方法による可溶化が望まれる。本研究で用いた $HP-\beta-CyD$ は、イトラコナゾールなどの難溶性薬物の可溶化剤として実際製剤に使用されており、安全性は保証されている。

本研究では、 $C_{60}(OH)_{10}$ を $HP-\beta-CyD$ と混合粉碎することにより、溶解性や凝集安定性に優れたナノ粒子を調製した。得られたナノ粒子の粒子径は 100 nm 以下であり、混合粉碎時の $CyDs$ 濃度を調節することで粒子サイズの調整が可能であった。 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は、各種ラジカルや ROS に対して優

れた消去能を有し、その効果はアスコルビン酸、エダラボン、トロロックスよりも高かった。 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は細胞毒性が低く、マウスの APAP 肝障害に対して優れた肝臓保護効果を示し、その治療効果は現在臨床使用されている NAC と同等であった。この $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子の肝臓保護効果は、肝細胞で発生する $ONOO^-$ などの酸化ストレスを消去することに起因することが明らかとなった。 $C_{60}(OH)_{10}/HP-\beta-CyD$ ナノ粒子は NAC とは異なる作用機序により治療効果を発揮することから、APAP 肝障害のみならず他の酸化ストレス性疾患に対しても、安全で有効性の高い抗酸化剤として有力な候補物質になるものと推定された。

謝 辞

本研究を行なうに際して終始御懇篤なる御指導と御鞭撻を賜りました崇城大学大学院薬学研究科 製剤学研究室 平山 文俊 教授に深甚なる感謝の意を表します。

本研究を行なうに際して終始御懇篤なる御指導と御助言を賜りました崇城大学大学院薬学研究科 製剤学研究室 元教授上釜 兼人 先生、安楽 誠 准教授、庵原 大輔 助教に深甚なる感謝の意を表します。

APAP 肝障害動物実験において御懇篤なる御指導と御協力を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部 薬剤情報分析学分野 入江 徹美 教授、石塚 洋一 講師、近藤 悠希 助教に深く感謝の意を表します。

本論文作成にあたり有益なる御助言と御校閲を賜りました崇城大学大学院薬学研究科 小田切 優樹 教授、原武 衛 教授に深く感謝の意を表します。

本研究に御協力頂きました 福澤 美夕 学士、福留 沙織 学士ならびに当研究室の諸氏に深く感謝いたします。

最後に私の研究活動を温かく見守って頂いた両親、友人にこの場を借りて感謝いたします。

平成 28 年 3 月

実験の部

1. 試薬・溶媒

C ₆₀ (OH) ₁₀	フロンティアカーボン
α-CyD	日本食品化工
β-CyD	日本食品化工
γ-CyD	日本食品化工
NaOH	ナカライテスク
DPPH	和光純薬工業
ペルオキシ二硫酸カリウム	和光純薬工業
ABTS 二アンモニウム塩	和光純薬工業
DMPO	同仁化学研究所
H ₂ O ₂	和光純薬工業
FeSO ₄	和光純薬工業
トリプシン	GIBCO
ストレプトマイシン	GIBCO
ペニシリンカリウム	GIBCO
ヒポキサンチン	SIGMA-ALDRICH
キサンチンオキシダーゼ	Roche
SNP	SIGMA-ALDRICH
アスコルビン酸	ナカライテスク
トロロックス	和光純薬工業

エダラボン	東京化成工業（株）
PrestoBlue	invitrogen
CellROX Green	invitrogen
APAP	ナカライテスク
NAC	和光純薬工業
ジヒドロローダミン 123	Cayman Chemical
ペルオキシナイトライト	同仁化学研究所

上記以外の試薬類は市販特級品を用いた。実験用の溶媒としての水はミリ Q 水（ミリ Q 超純水製造装置（ミリポア）により製造した比抵抗値 18.2 MΩ・cm 以上の純水）を使用した。また、phosphate-buffered saline (PBS) は pH 7.4 のものを使用した。

2. 使用機器

機器名	メーカー	型式
電子天秤	AND	GR-200
真空ボックス付乳鉢粉碎機	アズワン	MNV-01
超音波洗浄機	シャープ	UT-105HS
分光光度計	日立	U-2800
ウォーターバス	EYELA	SB-350
遠心機	クボタ	KA-1000
動的光散乱光度計	大塚電子（株）	DLS-8000HL

ゼータサイザー	Sysmex	Nano zs
透過型電子顕微鏡	Philips	TECNAI F20S-TWIN
粉末 X 線回折装置	リガク	RINT Ultima+
X-Band 電子スピン共鳴装置	日本電子	JES-FA100
クリーンベンチ	日立	CCV-1300E
CO ₂ インキュベーター	ASTECC	APC-30D
顕微鏡	オリンパス	CKX31
遠心機	日立	himac CT4D
マイクロプレートリーダー	CORONA	MTP-800

3. C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子の調製

C₆₀(OH)₁₀ と CyDs (モル比 1 : 3 (C₆₀(OH)₁₀ : CyD)) をマグネット付きメノウ乳鉢に入れ、真空ボックス付乳鉢粉碎機を用いて、減圧下、4 °C で 3 時間混合粉碎した。混合した粉末を水 5.0 mL 中へ C₆₀(OH)₁₀ 濃度 1 mM となるように添加後、5 分間超音波処理により均一に分散させた。その後、孔径 0.2 μm のフィルターでろ過することで C₆₀(OH)₁₀/CyDs ナノ粒子を調製した。

4. 粒子径測定

大塚電子 (株) 製 DLS-8000HL を用いて、サンプル溶液 2.0 mL を測定セルに入れ、下記の装置条件で測定した。平均粒子径は自己相関係数を cumulant 法により解析し算出した。

Source : He-Ne laser (632.8nm)、Scattering angle : 90.0°、Accumulation : 200、Repetition : 1、Temperature : 25 °C

5. 水中の $C_{60}(OH)_{10}$ の定量

$C_{60}(OH)_{10}/CyDs$ コロイド溶液を 1% (w/v) NaOH 水溶液で 10 倍希釈後、ボルテックスし、 $C_{60}(OH)_{10}$ を溶解させた。 $C_{60}(OH)_{10}$ 濃度は 350 nm における吸光度から算出した。

6. 透過型電子顕微鏡撮影

TEM 観察は JEOL 社製 JEM-1400Plus を用いて、加速電圧 100 kV で観察した。測定サンプルは酢酸ウラニル含有 $C_{60}(OH)_{10}$ コロイド溶液 ($C_{60}(OH)_{10}=0.05 \mu M$) をプラスチックシートに滴下後、TEM 用グリッド (応研商事社製エラスチックカーボン支持膜 STEM100Cu) を液滴上に乗せることでグリッドにサンプルを付着させ、乾燥後測定に用いた。

7. 粉末 X 線回折測定

粉末 X 線回折はリガク (株) 製 RINT Ultima+ 型自動 X 線回折装置を使用し、試料をガラスセルに固定し、以下の条件で測定した。X 線源 Cu-K α 線 (1.542 Å)、管電圧 : 40 kV、管電流 : 40 mA、走査速度 : 5° /min、回折各角 : 5~30°、スリット : 1° -1° -0.15 mm。

8. $C_{60}(OH)_{10}$ 分散体の調製

$C_{60}(OH)_{10}$ 5.0 mg を超純水 5.0 mL 中に添加し、1 時間超音波処理により分散させることで調製した。

9. DPPH ラジカル消去能の測定

DPPH 4.9 mg を 50 mL エタノールに溶解させた後、超純水と 2:1 (DPPH:

超純水) の割合で混合した。調製した DPPH 溶液とサンプル溶液を 4 : 1 の割合で混合し、20 分間好氣的条件でボルテックス後、吸光度測定 (540 nm) を行った。DPPH ラジカル消去能は下記の計算式より算出した。

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = 100 - (\text{Absorbance with Samples} / \text{Absorbance without Samples}) \times 100$$

10. ABTS ラジカル消去能の測定

ペルオキシ二硫酸カリウム 9.94 mg を超純水 15 mL に溶かし (2.45 mM)、その溶液に ABTS ニアンモニウム塩を 16.44 mg 添加し、ラジカル安定化のため一晩放置した。ABTS ラジカル溶液を PBS (pH=7.4) で希釈後 (7.5 : 92.5 = ABTS 溶液 : PBS)、サンプル溶液と 9 : 1 の割合で混合し、吸光度を測定 (734 nm) した。ABTS ラジカル消去能は下記の計算式より算出した。

$$\text{Radical Scavenging Activity (\%)} = 100 - (\text{Absorbance with Samples} / \text{Absorbance without Samples}) \times 100$$

11. ESR 測定

日本電子 (株) 製 X-Band 電子スピン共鳴装置 JES-FA100 ESR spectrometer を用いて、ESR スピントラップ法により以下の装置条件で測定した。

Microwave frequency : 9416.9 MHz、Microwave power : 8.0 mW、Field modulation : 0.1 mT at 100 kHz、Sweep time : 2 min。

11-1. ヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) 消去能の測定 (ESR スピントラップ法)

5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) をスピントラップ試薬として用

いた。サンプル溶液 100 μL に H_2O_2 (4.4 mM) 40 μL 、DMPO 20 μL 、 FeSO_4 溶液 (2 μM) 40 μL を添加後、好氣的条件で混和し、フェントン反応により $\cdot\text{OH}$ を発生させた。 FeSO_4 添加後 2 分後に ESR 測定を行った。 $\cdot\text{OH}$ 消去能は下記の式により算出した。

ROS Scavenging Activity (%) = $100 - (\text{Relative Intensity with Samples} / \text{Relative Intensity without Samples}) \times 100$

11-2. スーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) 消去能の測定 (ESR スピントラップ法)

5,5-Dimethyl-1-pyrroline-*N*-oxide (DMPO) をスピントラップ試薬として用いた。サンプル溶液 100 μL にヒポキサンチン溶液 (0.67 mM) 60 μL 、DMPO 20 μL 、キサンチンオキシダーゼ (0.8 Unit/mL) 20 μL を添加後、好氣的条件で混和した。キサンチンオキシダーゼ添加後 1 分後に ESR 測定を行った。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 消去能は上記式より算出した。

12. NO 消去能の測定

SNP (1 mM) を超純水で調製し、SNP 溶液 40 μL にサンプル溶液 40 μL を添加し、可視光 (Xenon light, 35 mW/cm², 5 min) を照射することで NO を発生させた。発生した NO は同仁化学研究所 (株) 製 Griess Reagent Kit を用いて検出した。NO 消去能はサンプル非添加群を 100% とした時の割合により算出した。

13. HeLa 細胞の培養

ヒト子宮頸がん細胞由来の株化細胞である HeLa 細胞 8×10^5 個を 10% (v/v)

FCS 含有 MEM 培地 (ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1g/L) 10 mL 中に懸濁し、プラスチックシャーレ (100 mm) に播種して、37 °C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、700 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FCS 含有 MEM 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

14. A549 細胞の培養

ヒト肺上皮がん由来の株化細胞である A549 細胞 8×10^5 個を 10% (v/v) FCS 含有 DMEM 培地 (ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL 中に懸濁し、プラスチックシャーレ (100 mm) に播種して、37 °C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、700 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FCS 含有 MEM 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

15. HepG2 細胞の培養

ヒト肝がん由来の株化細胞である HepG2 細胞 8×10^5 個を 10% (v/v) FCS 含有 RPMI 培地 (ペニシリン 1×10^5 U/L、ストレプトマイシン 0.1 g/L) 10 mL 中に懸濁し、プラスチックシャーレ (100 mm) に播種して、37 °C、5% CO₂ 濃度下で培養した。セミコンフルエントに達した細胞をトリプシン-EDTA 法によりディッシュから剥離し、700 rpm で 5 分間遠心分離後、上清を取り除き、得られたペレットを 10% (v/v) FCS 含有 RPMI 培地に 1×10^5 個/mL の密度で分散した。

16. 細胞毒性試験

A549 細胞または HeLa 細胞を 96-well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FCS 含有培地 (100 μ L) で 24 時間培養した。各種濃度のサンプル溶液 (20 μ L) を添加し、24 時間培養後、PBS で細胞を 2 回洗浄し、PrestoBlue 試薬 10 μ L を細胞に添加し、15~20 分間インキュベート後、蛍光測定 (Excitation:535 nm、Emission:615 nm) した。細胞生存率はサンプル非添加群を 100% とした時の蛍光強度変化より算出した。

17. 細胞内酸化ストレスの測定

HeLa 細胞または HepG2 細胞を 6-well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FCS 含有培地 (2.0 mL) で約 70% コンフルエントになるまで培養した、サンプル溶液を 200 μ L 添加し 24 時間培養後、PBS で細胞を 1 回洗浄し、蛍光試薬 (CellROX Green、5 μ M) 入り培地 2 mL を添加し、約 30 分間インキュベートした。PBS で細胞を 3 回洗浄し、培地 2 mL、 H_2O_2 0.4 mL を添加し、3 時間インキュベートした。PBS で細胞を 1 回洗浄後、トリプシン処理し、細胞をウェルから剥がした。遠心処理後、上清を取り除き、PBS 3 mL で再懸濁させ、フローサイトメトリーにより酸化ストレスを評価した。

18. 酸化ストレス条件下での細胞生存率の測定

HeLa 細胞または HepG2 細胞を 96-well culture plate に 2×10^4 個/well になるように播種し、10% (v/v) FCS 含有培地 (100 μ L) で 24 時間培養した。サンプル溶液 (20 μ L) を添加し、24 時間培養後、PBS で細胞を 2 回洗浄し、培地 100 μ L 添加後、 H_2O_2 を 750 μ M (20 μ L) となるよう添加し、1

時間培養した。細胞を PBS で 1 回洗浄し、培地 100 μ L 添加し、24 時間培養後、PrestoBlue 試薬を細胞に 10 μ L 添加し、蛍光測定 (Excitation:535 nm、Emission:615 nm) し、細胞生存率を算出した。

19. APAP 肝障害モデルマウスの作製および治療プロトコール

APAP 肝障害モデルマウスは APAP 400 mg/kg をマウス (C57BL/6NSeaWT) に腹腔内に投与することで作製した。APAP 投与から 30 分後に C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子を腹腔内または静脈内投与した。APAP 投与 24 時間後に採血と肝臓の摘出を行い、トランスアミナーゼ (AST、ALT) 検査値ならびに肝臓からの出血の有無により肝障害の進行度を評価した。

20. APAP 肝障害モデルマウスの生存率測定

マウス (C57BL/6NSeaWT) を 24 時間絶食させた後、APAP 300 mg/kg をマウス腹腔内に投与し、その 30 分後に C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子または NAC を静脈内投与あるいは腹腔内投与し、生存率を確認した。

21. CYP2E1 発現

肝臓の CYP2E1 発現は Western blot 分析により評価した。サンプルは 10% ポリアクリルアミドゲル上で SDS-PAGE を行なった。タンパクは PVDF 膜に転写した。5% のスキムミルクを用いてブロッキングをした後、膜を 3 回洗浄し、一次抗体 (Anti-CYP2E1 antibodies) で処理した。一次抗体は 5% のスキムミルクを用いて希釈し、一晚 4 $^{\circ}$ C で作用させた。膜を 3 回 Tween-20 含有 TBS で洗浄し、二次抗体 (HRP-conjugated secondary

antibodies) と作用させた。ECL Western blotting analysis system (Amersham) を用いてそれぞれのバンドを検出した。

22. GSH 濃度測定

肝臓組織サンプルの重量を測り 5% メタリン酸を用いてホモジネートし、4 °C、1000 g で 10 分間遠心処理した。上清を除き GSH 濃度を BIOXYTECH GSH/GSSG-412 (OXISHealth Products, Inc, Portland, OR, USA) キットのプロトコールにしたがって測定した。

23. 肝臓組織学的観察

マイクローム切片を 4 °C でニトロチロシン抗体と一晩インキュベートし、Histofine® Simple Stain MAX PO (Nichirei Biosciences, Tokyo, Japan) を用いて染色した。肝臓切片を洗浄した後、3,3-diaminobenzidine を切片に用い、Mayer's hematoxylin とインキュベートした。肝臓の組織学的変化は microscope system (BIOREVO BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて視覚化した。

24. ペルオキシナイトライト消去能の測定

ジヒドロローダミン 123 溶液 (0.1 mM) 50 μ L と C₆₀(OH)₁₀/HP- β -CyD ナノ粒子 50 μ L を 96-well plate 中で混合し、5 分間インキュベートした。ペルオキシナイトライト溶液 (0.28 mM) 50 μ L を上記溶液に添加した。5 分後、蛍光測定 (Excitation:485 nm、Emission:535 nm) した。

参考文献

1. C.N. McEwen, R.G. McKay, B.S. Larsen, C₆₀ as a Radical Sponge, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4412-4414 (1992).
2. Z. Markovic, V. Trajkovic, Biomedical Potential of The Reactive Oxygen Species Generation and Quenching by Fullerenes (C₆₀), *Biomaterials*, **29**, 3561-3573 (2008).
3. A.W. Jensen, S.R. Wilson, D.I. Schuster, Biological Applications of Fullerenes, *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 767-779 (1996).
4. J.W. Arbogast, A.P. Darmany, C.S. Foote, F.N. Diederich, R.L. Whetten, Y. Rubin, M.M. Alvarez, S.J. Anz, Photophysical Properties of Sixty Atom Carbon Molecule (C₆₀), *J. Phys. Chem.*, **95**, 11-12 (1991).
5. T. Nagano, K. Arakane, A. Ryu, T. Masunaga, K. Shinmoto, S. Mashiko, M. Hirobe, Comparison of Singlet Oxygen Production Efficiency of C₆₀ with Other Photosensitizers Based on 1268 nm Emission, *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2291-2294 (1994).
6. L.L. Dugan, E. Lovett, S. Cuddihy, C.R. Almlı, T.S. Lin, D.W. Choi, Carboxyfullerenes as Neuroprotective Antioxidants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**, 9434-9439 (1997).
7. S.H. Friedman, D.L. DeCamp, R.P. Sijbesma, G. Srdanov, F. Wudl, G.L. Kenyon, Inhibition of the HIV-1 Protease by Fullerene Derivatives: Model Building Studies and Experimental Verification, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6506-6509 (1993).
8. R. Maeda-Mamiya, E. Noiri, H. Isobe, W. Nakanishi, K. Okamoto, K.

- Doi, T. Sugaya, T. Izumi, T. Homma, E. Nakamura, In Vivo Gene Delivery by Cationic Tetraamino Fullerene, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 5339-5344, (2010).
9. T.Y. Zakharian, A. Seryshev, B. Sitharaman, B.E. Gilbert, V. Knight, L.J. Wilson, A Fullerene-paclitaxel Chemotherapeutic: Synthesis, Characterization and Study of Biological Activity in Tissue Culture, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 12508-12509 (2005).
 10. R. Bakry, R.M. Vallant, M. Najam-ul-Haq, M. Rainer, Z. Szabo, C.W. Huck, G.K. Bonn, Medicinal Applications of Fullerenes, *Int. J. Nanomed.*, **2**, 639-649 (2007).
 11. M.I. AttaUa, A.M. Vassallo, B.N. Tattam, J.V. Hnnna, Preparation of Hydrofullerenes by Hydrogen Radical Induced Hydrogenation, *J. Phys. Chem.*, **97**, 6329-6331 (1993).
 12. G. Yu, J. Gao, J.C. Hummelen, F. Wudl, A.J. Heeger, Polymer Photovoltaic Cells: Enhanced Efficiencies via a Network of Internal Donor-Acceptor Heterojunctions, *Science*, **270**, 1789-1791 (1995).
 13. B. Du, S. Han, H. Li, F. Zhao, X. Su, X. Cao, Z. Zhang, Multi-functional Liposomes Showing Radiofrequency-triggered Release and Magnetic Resonance Imaging for Tumor Multi-mechanism Therapy, *Nanoscale*, **7**, 5411-5426 (2015).
 14. M.Y. Eropkin, E.Y. Melenevskaya, K.V. Nasonova, T.S. Bryazzhikova, E.M. Eropkina, D.M. Danilenko, O.I. Kiselev, Synthesis and Biological Activity of Fullerenols with Various Contents of Hydroxyl Groups, *Pharm. Chem. J.*, **47**, 87-91 (2013).

15. E.E. Fileti, R. Rivelino, F. de Brito Mota, T. Malaspina, Effects of Hydroxyl Group Distribution on The Reactivity, Stability and Optical Properties of Fullerenols, *Nanotechnology*, **19**, 509801 (2008).
16. H. Jin, W.Q. Chen, X.W. Tang, L.Y. Chiang, C.Y. Yang, J.V. Schloss, J.Y. Wu, Polyhydroxylated C₆₀, Fullerenols, as Glutamate Receptor Antagonists and Neuroprotective Agents, *J. Neurosci. Res.*, **62**, 600-607 (2000).
17. S.M. Mirkov, A.N. Djordjevic, N.L. Andric, S.A. Andric, T.S. Kostic, G.M. Bogdanovic, M.B. Vojinovic-Miloradov, R.Z. Kovacevic, Nitric Oxide-Scavenging Activity of Polyhydroxylated Fullereneol, C₆₀(OH)₂₄, *Nitric Oxide*, **11**, 201-207 (2004).
18. Y. Chen, K.C. Hwang, C. Yen, Y. Lai, Fullerene Derivatives Protect against Oxidative Stress in RAW 264.7 Cells and Ischemia-Reperfused Lungs, *J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**, R21-R26 (2004).
19. W. Cong, P. Wang, Y. Qu, J. Tang, R. Bai, Y. Zhao, C. Chen, X. Bi, Evaluation of The Influence of Fullereneol on Aging and Stress Resistance Using *Caenorhabditis Elegans*, *Biomaterials*, **42**, 78-86 (2015).
20. H. Liu, X. Yang, Y. Zhang, A. Dighe, X. Li, Q. Cui, Fullerol Antagonizes Dexamethasone-Induced Oxidative Stress and Adipogenesis while Enhancing Osteogenesis in a Cloned Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell, *J. Orthop. Res.*, **42**, 1051-1057 (2012).
21. R. Injac, M. Perse, M. Cerne, N. Potocnik, N. Radic, B. Govedarica, A. Djordjevic, A. Cerar, B. Strukelj, Protective Effects of Fullereneol

- $C_{60}(OH)_{24}$ against Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity and Hepatotoxicity in Rats with Colorectal Cancer, *Biomaterials*, **30**, 1184-1196 (2009).
22. D. Heymann, Solubility of Fullerenes C_{60} and C_{70} in Seven Normal Alcohols and Their Deduced Solubility in Water, *Fullerene Sci. Technol.*, **4**, 509-515 (1996).
 23. R.S. Ruoff, D.S. Tse, R. Malhotra, D.C. Lorents, Solubility of Fullerene (C_{60}) in a Variety of Solvents, *J. Phys. Chem.*, **97**, 3379-3383 (1993).
 24. K. Uekama, F. Hirayama, T. Irie, Cyclodextrin Drug Carrier Systems, *Chem. Rev.*, **98**, 2045-2076 (1998).
 25. J.L. Neumeyer, "The Practice of Medicinal Chemistry, *Third Edition*", Elsevier, New York, 2008.
 26. D. Iohara, F. Hirayama, K. Higashi, K. Yamamoto, K. Uekama, Formation of Stable Hydrophilic C_{60} Nanoparticles by 2-Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, *Mol. Pharm.*, **8**, 1276-1284 (2011).
 27. D. Iohara, M. Hiratsuka, F. Hirayama, K. Takeshita, K. Motoyama, H. Arima, K. Uekama, Evaluation of Photodynamic Activity of $C_{60}/2$ -Hydroxypropyl- β -cyclodextrin Nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, **101**, 3390-3397 (2012).
 28. K. Kokubo, K. Matsubayashi, H. Tategaki, H. Takada, T. Oshima, Facile Synthesis of Highly Water-Soluble Fullerenes More Than Half-Covered by Hydroxyl Groups, *ACS Nano*, **2**, 327-333 (2008).
 29. Y. Nakagawa, T. Suzuki, H. Ishii, D. Nakae, A. Ogata, Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes on Isolated Rat Hepatocytes via

- Mitochondrial Dysfunction, *Arch. Toxicol.*, **85**, 1429-1440 (2011).
30. Y. Nakagawa, T. Suzuki, K. Nakajima, A. Inomata, A. Ogata, D. Nakae, Effects of *N*-acetyl-L-Cysteine on Target Sites of Hydroxylated Fullerene-induced Cytotoxicity in Isolated Rat Hepatocytes, *Arch. Toxicol.*, **88**, 115-126 (2014).
 31. J.G. Saathoff, A.O. Inman, X.R. Xia, J.E. Riviere, N.A. Monteiro-Riviere, *In vitro* Toxicity Assessment of Three Hydroxylated Fullerenes in Human Skin Cells, *Toxicol. in Vitro*, **25**, 2105-2112 (2011).
 32. T. Andersson, K. Nilsson, M. Sundahl, G. Westman, O. Wennerstroem, C₆₀ Embedded in γ -cyclodextrin: a Water-soluble Fullerene, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 604-606 (1992).
 33. Z. Yoshida, H. Takekuma, S. Takekuma, Y. Matsubara, Molecular Recognition of C₆₀ with γ -Cyclodextrin, *Angew. Chem. Int. Engl.*, **33**, 1597-1599 (1994).
 34. K. Kogure, S. Goto, K. Abe, C. Ohiwa, M. Akasu, H. Terada, Potent Antiperoxidation Activity of The Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Cepharanthine: The Amine Moiety Is Responsible for Its pH-Dependent Radical Scavenge Activity, *Gen. Subj. Biochim. Biophys. Acta.*, **1426**, 133-142 (1999).
 35. N. Leelarungrayub, V. Rattanapanone, N. Chanarat, J.M. Gebicki, Quantitative Evaluation of Antioxidant Properties of Garlic and Shallot Preparations, *Nutrition*, **22**, 266-274 (2006).
 36. E.R. Stadtman, B.S. Berlett, Fenton Chemistry. Amino Acid Oxidation, *J. Biol. Chem.*, **266**, 17201-17211 (1991).

37. S. Quideau, D. Deffieux, C. Douat-Casassus, L. Pouysgu, Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 586-621 (2011).
38. S. Kato, H. Aoshima, Y. Saitoh, N. Miwa, Highly Hydroxylated or γ -cyclodextrin-Bicapped Water-Soluble Derivative of Fullerene: The Antioxidant Ability Assessed by Electron Spin Resonance Method and β -Carotene Bleaching Assay, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **19**, 5293-5296 (2009).
39. L.O. Husebo, B. Sitharaman, K. Furukawa, T. Kato, L.J. Wilson, Fullerenols Revisited as Stable Radical Anions, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 12055-12064 (2004).
40. H. Jaeschke, C.D. Williams, M.R. McGill, Y.Xie, Anup Ramachandran, Models of Drug-Induced Liver Injury for Evaluation of Phytotherapeutics and Other Natural Products, *Food Chem. Toxicol.*, **55**, 279-289 (2013).
41. N. Hanawa, M. Shinohara, B. Saberi, W.A. Gaarde, D. Han, N. Kaplowitz, Role of JNK Translocation to Mitochondria Leading to Inhibition of Mitochondria Bioenergetics in Acetaminophen-Induced Liver Injury, *J. Biol. Chem.*, **283**, 13565-13577 (2008).
42. J.A. Hinson, S.L. Pike, N.R. Pumford, P.R. Mayeux, Nitrotyrosine-Protein Adducts in Hepatic Centrilobular Areas Following Toxic Doses of Acetaminophen in Mice, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 604-607 (1998).
43. A. LoGuidice, U.A. Boelsterli, Acetaminophen Overdose-Induced Liver Injury in Mice Is Mediated by Peroxynitrite Independently of The

- Cyclophilin D-Regulated Permeability Transition, *Hepatology*, **54**, 969-78 (2011).
44. Y. Masubuchi, S. Sugiyama, T. Horie, Th1/Th2 Cytokine Balance as a Determinant of Acetaminophen-Induced Liver Injury, *Chem. Biol. Interact.*, **179**, 273-279 (2009).
 45. T.E. North, I.R. Babu, L.M. Vedder, A.M. Lord, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum, L.I. Zon, W. Goessling, PGE2-Regulated Wnt Signaling and *N*-Acetylcysteine Are Synergistically Hepatoprotective in Zebrafish Acetaminophen Injury, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **107**, 17315-17320 S/1-S/9 (2010).
 46. P. Nourjah, S.R. Ahmad, C. Karwoski, M. Willy, Estimates of Acetaminophen (Paracetamol)-Associated Overdoses in The United States, *Pharmacoepidemiol. and Drug Saf.*, **15**, 398-405 (2006).
 47. C. Li, B.C. Martin, Trends in Emergency Department Visits Attributable to Acetaminophen Overdoses in The United States: 1993-2007. *Pharmacoepidemiol. Drug. Saf.*, **20**, 810-818 (2007).
 48. D.G.N Craig, C.M. Bates, J.S. Davidson, K.G. Martin, P.C. Hayes, K.J. Simpson, Overdose Pattern and Outcome in Paracetamol-Induced Acute Severe Hepatotoxicity, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **71**, 273-282 (2011).
 49. Y. Tomishima, Y. Ishitsuka, N. Matsunaga, M. Nagatome, H. Furusho, M. Irikura, S. Ohdo, T. Irie, Ozagrel Hydrochloride, a Selective Thromboxane A2 Synthase Inhibitor, Alleviates Liver Injury Induced by Acetaminophen Overdose in Mice, *BMC. Gastroenterol.*, 13-21

(2013).

50. L. Qingnuan, X. Y. Z. Xiaodong, L. Ruili, D. Qieqie, S. Xiaoguang, C. Shaoliang, L. Wenxin, Preparation of $^{99m}\text{Tc-C}_{60}(\text{OH})_x$ and Its Biodistribution Studies, *Nuclear Medicine and Biology*, **29**, 707-710 (2002).
51. D. Shimizu, Y. Ishitsuka, K. Miyata, Y. Tomishima, Y. Kondo, M. Irikura, T. Iwawaki, Y. Oike, T. Irie, Protection Afforded by Pre- or Post-Treatment with 4-Phenylbutyrate against Liver Injury Induced by Acetaminophen Overdose in Mice, *Pharmacol. Res.*, **87**, 26-41 (2014).
52. C. Cover, A. Mansouri, T.R. Knight, M.L. Bajt, J.J. Lemasters, D. Pessayre, H. Jaeschke, Peroxynitrite-Induced Mitochondrial and Endonuclease-Mediated Nuclear DNA Damage in Acetaminophen Hepatotoxicity, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **315**, 879-887 (2005).
53. T.R. Knight, A. Kurtz, M.L. Bajt, J.A. Hinson, H. Jaeschke, Vascular and Hepatocellular Peroxynitrite Formation during Acetaminophen Toxicity: Role of Mitochondrial Oxidant Stress, *Toxicol. Sci.*, **62**, 212-220 (2001).
54. B.H. Lauterburg, G.B. Corcoran, J.R. Mitchell, Mechanism of Action of *N*-Acetylcysteine in The Protection against The Hepatotoxicity of Acetaminophen in Rats *in vivo*, *J. Clin. Invest.*, **71**, 980-991 (1983).
55. G.B. Corcoran, B.K. Wong, Role of Glutathione in Prevention of Acetaminophen Induced Hepatotoxicity by *N*-Acetyl-L-cysteine *in vivo*: Studies with *N*-Acetyl-D-cysteine in Mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **238**, 54-61 (1986).

56. J.R. Mitchell, D.J. Jollow, W.Z. Potter, D.C. Davis, J.R. Gillette, B.B. Brodie, Acetaminophen-Induced Hepatic Necrosis. I. Role of Drug Metabolism, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **187**, 185-194 (1973).
57. L.P. James, P.R. Mayeux, J.A. Hinson, Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity, *Drug Metab. Dispos.*, **31**, 1499-1506 (2003).
58. H. Jaeschke, C.D. Williams, A. Ramachandran, M.L. Bajt, Acetaminophen Hepatotoxicity and Repair: The Role of Sterile Inflammation and Innate Immunity, *Liver Int.*, **32**, 8-20 (2012).
59. Z.Q. Ji, H. Sun, H. Wang, Q. Xie, Y. Liu, Z. Wang, Biodistribution and Tumor Uptake of C₆₀(OH)_x in Mice, *J. Nanopart. Res.*, **8**, 53-63 (2006).