

光励起フラーレンの生物作用^{#1}山越葉子^{#2}・末吉祥子・宮田直樹Biological Activity of Photoexcited Fullerene^{#1}Yoko Yamakoshi^{#2}, Shoko Sueyoshi and Naoki Miyata

Fullerene (C_{60} , C_{70} , etc.) is a third carbon allotrope discovered in 1985, and a great deal of attention has been focused on its physical and chemical properties in recent years. We are very interested in its biological properties for use fullerene as a pharmacophore. We first developed a method of solubilizing fullerene itself in water to perform *in vitro* biological screening. The concentrations of aqueous C_{60} and C_{70} solution with 5 % poly(vinylpyrrolidone) (PVP) are 400 and 200 $\mu\text{g/mL}$, respectively. By using aqueous fullerene solutions prepared in this manner, we have clarified a series of biological activities of fullerene, consisting of DNA-cleavage, hemolysis, cancer-initiation, and cell-toxicity under photoirradiation, and chondrogenesis and inhibition of glutathione *S*-transferase activity without photoirradiation. The biological activity of photo-excited fullerene was found to be promising, because fullerene is a highly efficient photo-sensitizer. We synthesized a C_{60} derivative with an acridine moiety as a DNA-chelating function and assessed its effective DNA-cleaving activity. What kind of active species is involved in the biological action of photo-excited fullerene is our next concerns. Two pathways have been reported for the photo-excitation of fullerene. The so-called *Type II* energy transfer pathway generates singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), while the *Type I* electron transfer pathway gives a fullerene radical anion ($C_{60}^{\cdot-}$, $C_{70}^{\cdot-}$). In order to clarify the effective oxygen species actually responsible for the biological action of photo-excited fullerene, we performed DNA-cleaving tests and EPR spectroscopic analyses under several conditions. The results showed that the photo-induced biological activity of fullerene is not caused by $^1\text{O}_2$, but by reduced oxygen species ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$) generated by the electron transfer reaction of $C_{60}^{\cdot-}$, with molecular oxygen. Its specificity is thought to be mainly attributed to the high-reducible property of fullerene. Since the reductive activation of molecular oxygen by photo-excited fullerene was observed at physiological concentrations of NADH as the reductant, fullerene can be classified as an oxyl-radical-generating photo-sensitizer. Pharmaceutical application of fullerene to cancer photo-dynamic therapy appears promising.

Keywords: fullerene, superoxide, hydroxylradical, DNA-cleavage, photosensitization

1. はじめに

1985年に存在が確認されたフラーレン (C_{60}) は¹⁾, ダイヤモンドおよびグラファイト以来 200年ぶりに発見された炭素第三の同素体として脚光を浴び、物理学・化学・材料工学・電気化学などの分野で精力的な研究が展開されている。フラーレン発見の功績は高く評価され、1996年に発見者である英国 Sussex 大学の H.K.Kroto 教授, 米国 Rice 大学の R.E.Smalley 教授, および E.F.Curl 教授にノーベル

化学賞が贈られた。近年、フラーレン研究の中でも特に生体への影響が注目され、創薬を志向した研究がアメリカ・日本・フランスを中心に盛んに行われている。本総説では、フラーレンの構造的・物理化学的性質、その性質に基づく光増感性、および、光照射下における生物作用発現に重要な役割を果たしている活性酸素種について、著者らの研究を中心に紹介する。

2. フラーレンの構造特性

C_{60} (バックミンスターフラーレン: 最も代表的なフラーレンで、サッカーボールの表面模様と同じ分子構造を有する) と C_{70} の構造を Fig. 1 に示す。特に C_{60} (Fig. 1a) は、12 個の五員環と 20 個の六員環を有する球状カゴ型の化合物であり、完全対称体と呼ばれる非常に対称性の高い構造をしている。すなわち、六員環と六員環の縮合部位の中心

^{#1} 本総説は、山越葉子の学位論文「光励起フラーレン類の生物活性に関する研究」(東京大学大学院薬学系研究科博士号, 1999.5) の内容の一部を要約したものである。

^{#2} To whom correspondance should be addressed: Yoko Yamakoshi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.224, E-mail: yamakosh@nihs.go.jp

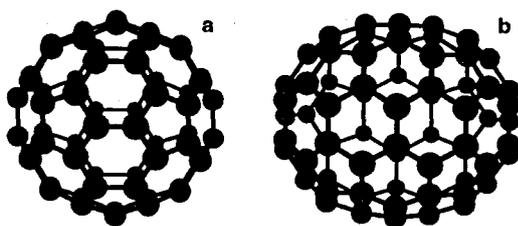


Fig. 1. Chemical structures of C₆₀ (a) and C₇₀ (b)

を通る 15 本の二回回転軸 (C₂ 軸) と、六員環の中心を通る 10 本の三回回転軸 (C₃ 軸)、および、五員環の中心を通る 10 本の五回回転軸 (C₅ 軸)、さらには多数の対称面を有する。この構造を点群で表すと、正二十面体の属する I_h 点群という。

このように非常に高い対称性を有する C₆₀ の 60 個の炭素原子は、すべて等価である。また、結合は、二種、すなわち、六員環と六員環の縮合部位である 6,6-junction と、六員環と五員環の縮合部位である 5,6-junction が存在する。30 本の二重結合はすべて共役しており、12,500 種類ものケクレ構造式を書くことができる。この分子の高い対称性に起因して、多くの分子軌道が縮退している。特に特徴的なのは HOMO が五重に、LUMO が三重に縮退し、HOMO-LUMO ギャップが小さいこと、また、球形構造に起因して、C₆₀ の π 電子雲は球の外側に偏った形で局在化していることであり、C₆₀ の還元特性、化学反応性、光増感性は、これらの構造特性に起因している。

3. C₆₀ の化学反応性^{2,3)}

C₆₀ は、特異なカゴ型縮合芳香族化合物である。以下、C₆₀ の構造特性に基づく物理化学的特質について述べる。ここでは特に、生物活性発現に大きく関与すると考えられる還元性、化学反応性及び光増感性について説明する。

(1) C₆₀ の還元性

C₆₀ は、前に述べたように、三重に縮退した LUMO と、五重に縮退した HOMO とのエネルギー差が小さい。また、LUMO のエネルギーレベルが低い。この低い LUMO とその縮退に起因して、C₆₀ は芳香族炭化水素としては高い還元電位 (E₁ = -1.42 V vs SCE in ベンゾニトリル) を有し、非プロトン性溶媒中 -10℃ では可逆的に六電子まで還元されることが報告されている⁴⁾。

(2) C₆₀ の化学反応性

1990 年に Kraetschmer らにより、アーク放電法による C₆₀ の大量合成法⁵⁾が報告されて以来、C₆₀ の化学反応性の解析が可能になり、種々の反応性が明らかになるとともに、多

くの C₆₀ 誘導体が合成された⁶⁻⁹⁾。以下に C₆₀ の化学反応性を挙げる。

1) 求核付加反応¹⁰⁻¹²⁾

電子欠損性の高い C₆₀ の二重結合に対する反応としてまず挙げられるのは求核剤との反応である。求核剤としてアミンを用いた場合、アミンが C₆₀ の一つの炭素を攻撃し付加すると、6,6-junction でつながった隣の炭素の電子密度が他の炭素の電子密度に比べて高くなり、そこに H⁺ が付加し付加体が生成する¹⁰⁾。このほか、求核剤としては、グリニャール試薬、アルキルリチウムを用いた例などが報告されている。

2) 環化付加反応¹³⁻¹⁸⁾

環化付加反応も、求核付加と同様 C₆₀ の二重結合の電子欠損性に基づく反応である。これまでに、[4+2] 付加 (Diels-Alder 反応)、[3+2] 付加 (1,3-双極子付加反応)、[2+2] 付加、および、[2+1] 付加が報告されている。C₆₀ の二重結合には、前記のように 5,6-junction と 6,6-junction の二種類が存在する。C₆₀ 分子内の π 電子は全て共役しているが、5,6-junction (1.45 Å) と 6,6-junction (1.38 Å) とでは、6,6-junction の方が結合距離が短く二重結合性が高い。そのために、ジエン分子は 6,6-junction を攻撃し付加体が生成する。

[3+2] 環化付加反応の例としてジアソアルカンとの反応がある¹⁴⁾。環化付加により生じるピラゾリン環は、脱窒素を起しシクロプロパン環となる。生成した 6,6-closed 付加体は、熱的に安定な 5,6-open 付加体へと転移する。この反応で生じたアルキルフラレーンは一般にメタノフラレーンと呼ばれ、本反応は C₆₀ 誘導体の合成に多用されている。アジドアルカンの場合も同様の反応が起き、脱窒素後転移反応し、5,6-open 型のピペリジン様付加体が生じる。

また、アゾメチンイリドとも、[3+2] 環化付加反応が起きフレロピロリジンと呼ばれる C₆₀ 誘導体が合成できる¹⁵⁾。このフレロピロリジンは、収率よく合成できるうえ、二級アミンを持つために、ここに別の官能基を結合させることができ、種々の C₆₀ 誘導体を合成するのに非常に有用である¹⁶⁾。

その他、[2+2] 付加反応としては、ベンザイン、エノンなどとの反応、C₆₀ が光にて二量化する反応などが¹⁷⁾、また、[2+1] 反応としては、カルベン、ナイトレン、シリレンなどとの反応¹⁸⁾が報告されている。

3) 水素化^{19,20)}

C₆₀ に関して最初に報告された有機反応は Birch 還元による C₆₀H₃₆ の合成である¹⁹⁾。これは DDQ で酸化され、元の C₆₀ に戻ることが知られている。また、オリゴヒドロフラレーンと呼ばれる水素が少数個付加した誘導体の合成も報告されている²⁰⁾。

4) 酸化・ハロゲン化²¹⁻³¹⁾

C_{60} は高い還元電位を有し、還元的な反応を受けやすいことを前述したが、一方ではアノディックに酸化を受け C_{60}^{2+} などを生じることも報告されている²¹⁾。また、酸素存在下光照射によるエポキシドの合成²²⁾や、ジオキシランによる酸化反応²³⁾も知られている。このエポキシドは、薬物代謝酵素の一つであるチトクロームP450のモデル化合物を用いた酸化反応においても生成することから、 C_{60} が生体内で代謝されて生ずる代謝産物の可能性がある²⁴⁾。

C_{60} のハロゲン化反応²⁵⁻³¹⁾も C_{60} に対する求電子的な反応である。これまで、フッ素化、クロル化、ブロム化が報告されている。この反応では、多数のハロゲンが付加した生成体を得るので付加位置の決定が困難である。

5) ラジカル付加³²⁾

C_{60} へのラジカル付加反応も容易に起き、これを用いたEPR実験に関する研究が報告されている³²⁾。また、ヒドロキシルラジカルなどのラジカル活性種との反応も知られている³³⁻³⁸⁾。

6) ホスト-ゲスト複合体の形成³⁹⁻⁴⁴⁾

C_{60} は結晶内で高速に回転している。そのため、単結晶を作成しても通常のX線結晶解析法では構造解析が困難であった。そこで、考えられた方法がピンセット型の分子で C_{60} をはさみ、分子回転をとめる方法である。この方法により C_{60} のX線結晶構造解析が可能となり、初めて C_{60} の分子構造が確定された³⁹⁾。また、この報告が、 C_{60} と他分子との分子間相互作用の初めての報告である。また、最近では、 C_{60} はシクロデキストリン⁴¹⁾やカリクスアレ⁴²⁾といった包接化合物と相互作用を起し、ホスト-ゲスト複合体を形成して取り込まれる、という報告もある。その機序としては、 C_{60} の高い電子親和性に起因して、包接分子側の電子密度の高い原子たとえば酸素などと、電荷移動相互作用していることによると考えられている。包接化合物による C_{60} の取り込みは、分子認識の化学としても非常に興味を持たれている。

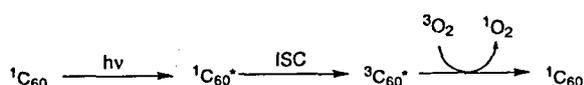
(3) 光増感性⁴⁵⁻⁴⁶⁾

1) C_{60} および C_{70} の光励起

C_{60} は光照射により基底一重項状態($^1C_{60}$)から励起一重項状態($^1C_{60}^*$)に励起され、項間交差反応(intersystem crossing: ISC)により励起三重項状態($^3C_{60}^*$)へと変わる⁴⁵⁾。 C_{70} も同様の反応を起こすことが報告されている⁴⁶⁾。

2) Type II 光増感エネルギー移動反応

1991年 Foote らは、酸素存在下において光励起された C_{60}



Scheme 1. Mechanism of singlet oxygen generation by photoexcited C_{60} (Type II energy transfer pathway)

から活性酸素種の一つ一重項酸素(1O_2)が生成することを報告した(Scheme 1)⁴⁵⁻⁴⁷⁾。

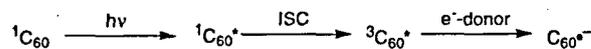
すなわち、光励起により生じた $^3C_{60}^*$ が基底状態の三重項の酸素分子(3O_2)にエネルギーを渡すことで、 1O_2 が生成する⁴⁸⁻⁵²⁾。ベンゼン溶液中での量子収率($\Phi(^1O_2)$)は約100%と非常に高いことが特徴的であり、これは、 $^1C_{60}^*$ から $^3C_{60}^*$ へのISCの効率が非常に高いことに起因している。実際 C_{60} に光を当てて励起させると、 $^3C_{60}^*$ が減衰して生じるりん光は観測されるが、 $^1C_{60}^*$ から生じる蛍光は殆ど観測されないことが報告されている。同様の反応は C_{70} においても観察されている⁴⁶⁾。

C_{60} の 1O_2 生成能に関する化学的研究は多数報告されている⁵³⁻⁶⁰⁾。特に、1994年、Nagano, Arakane, Hirobe らは、近赤外発光法を用いて C_{60} 溶液中の一重項酸素発生量を調べ、ベンゼンまたはベンゼン-メタノール混合溶媒中、 C_{60} による一重項酸素の発生における量子収率が、メチレンブルー、ローズベンガル、エオシンといった他の光増感剤と比較し、非常に高いことを示した⁵³⁾。

3) Type I 光増感電子移動反応

他方、酸素非存在下における光励起 C_{60} による電子移動反応に関する研究も多数報告されている⁶¹⁻⁷⁸⁾。1991年、Krusic らは、電子供与性の分子(ジ-*t*-ブチルパーオキシド)の存在下 C_{60} に光を照射すると、photolysisが起き、 C_{60} ラジカルアニオン($C_{60}^{\cdot-}$)が生じることをEPR法で直接検出する方法で確認した⁶¹⁾。次いで、1993年 Foote らは、光照射により生じた $^3C_{60}^*$ はアミンなどの電子供与性の化合物と反応して一電子還元され、 $C_{60}^{\cdot-}$ を生じること(Scheme 2)、さらに、酸化電位の異なる種々の還元剤を用いて実験した結果から、 $^1C_{60}$ の還元電位($E_1 = -0.42$ V vs SCE in ベンゾニトリル)に比較して、 $^3C_{60}^*$ の還元電位($E_1 = +1.41$ V vs SCE in ベンゾニトリル, *calcd.*)が非常に高いと報告している⁴⁶⁾。その他にも Stasko らが、トリエチルアミンなどの還元剤の存在下光励起 C_{60} から $C_{60}^{\cdot-}$ の生成に関して、EPR法を用いた一連の研究を報告している⁶²⁻⁶⁴⁾。

更に、 $^3C_{60}^*$ への電子移動反応を利用した、光励起 C_{60} による化学反応に関する報告も多数ある。1993年 Foote らは、*N,N*-ジエチルプロピニルアミンと C_{60} との光環化反応を報告した⁷⁴⁾。この反応は光非照射の条件下では80℃に加熱しても8%以下の収率でしか進行しないが、反応系に >530 nmの光を20分間照射することで、室温下で50%以上の収率で付加体を与えた。光による反応の加速は、光照射により、励起した C_{60} ($^3C_{60}^*$)の二重結合の電子欠損性が増し、[2+2]環化付加反応が進みやすくなったためと考えら



Scheme 2. Electron transfer to triplet C_{60} (Type I electron transfer pathway)

れる。

また、1995-1998年にFukuzumiらは、ケテンシリラセタールのC₆₀への光付加反応⁷⁵⁾、10-メチル-9,10-ジヒドロアクリジンとC₆₀との光反応⁷⁶⁾、NADHアナログ化合物とC₆₀との光反応⁷⁷⁾など、光電子移動反応に関する研究を報告している。また、ごく最近にもAkasakaらが光励起C₆₀に対するシラリ化に関する報告をしている⁷⁸⁾。

4. フラレーンの光生物作用

フラレーン(C₆₀, C₇₀)の物理化学的性質に関しては多くの研究が報告されてきたにも関わらず、生物作用に関する研究は他の分野に比較して大きく立ち後れていた。その理由の一つは、疎水性の高いフラレーンを極性溶媒に溶かすことができず、生物試験が困難であったことである。しかし近年、界面活性剤を用いた可溶化法や、水溶性誘導体が合成されるようになり、フラレーンの生物試験が可能となった。最近では、フラレーンの生物活性に関する研究は、フラレーン研究の一つの柱として非常に注目を集めている^{79,80)}。フラレーンの生物作用は、その作用機構に基づいて大きく三種類に分類できる。一つは、光増感性に基づくもので、ガンの光力学療法への利用などが注目されている。次は、ラジカルとの反応性に基づくものであり、ヒドロキシルラジカル(・OH)や一酸化窒素(NO)の消去剤として抗炎症剤への応用が期待されている。最後は、フラレーンの骨格構造に基づくものであり、電子欠損のπ電子系球形構造と電子供与性官能基との相互作用を利用した生体分子との相互作用、たとえば、酵素活性阻害作用である。以下、著者らの研究を中心に、フラレーンの水溶化および光生物作用に関する研究を概説する。

(1) フラレーンの水溶化⁸¹⁾

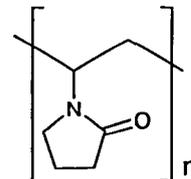
フラレーンの生物作用に関する最初の報告⁸²⁾では、マウスの表皮にC₆₀のベンゼン溶液を塗り、表皮におけるDNA生成や、オルニチンデカルボキシラーゼ活性を調べることにより、急性毒性の有無を検討するという方法がとられた。この実験では、C₆₀には急性毒性は無いという結果が報告されている。しかし、フラレーンの生体影響を詳細かつ簡便に調べるためには、*in vitro*の系でスクリーニング実験を行うことが簡便であり、そのためには、フラレーンを水溶化する必要がある。

C₆₀は二硫化炭素あるいはトルエンやベンゼン等の低極性の芳香族溶媒には比較的よく溶解するものの、ヘキサン等の脂肪族の低極性の溶媒には溶けにくく、さらに水や、アルコール類等の水と混和する極性溶媒には殆ど溶解しない。著者らは比較的高濃度(0.89 mg/mL)でC₆₀を溶解する溶媒であるN-メチルピロリドンに着目し、このN-メチルピロリドン構造を有したポリマーであるポリビニルピロ

リドン(PVP, Fig. 2)を用いてフラレーンを可溶化することを検討した。PVPは日本薬局方収載品⁸³⁾として医薬品や化粧品に広く使用されており、毒性が低く安全性が確立されている化合物である。また、PVPは、幾つかの水に難溶性な化合物を水溶化しその生物活性を調べるのにも用いられている⁸⁴⁻⁸⁶⁾。フラレーンの水溶化はFig. 3に示す方法で行った。

Fig. 4に示すように、最終濃度で5%のPVPを用い、C₆₀, C₇₀の添加量を増加させていった時、C₆₀の溶解度曲線は400 μg/mL, C₇₀は200 μg/mLまで直線性を示した。C₆₀, C₇₀の添加量をさらに増加させると、吸光度はそれ以上上昇せず、溶液中には沈殿が生じた。この結果より、5% PVP水溶液に対するC₆₀, C₇₀の溶解度を各々400 μg/mL, および、200 μg/mLと決定した。

調製したC₆₀, C₇₀/PVP水溶液のUV-VISスペクトルを測定したところ、5% PVP水溶液中においては、C₆₀, C₇₀ともに、*n*-ヘキサン溶液と比較し長波長側にシフトしたスペクトルが得られた(C₆₀: λ_{max} 258, 328 (in *n*-hexane) → 262, 340 (in 5% PVP-Aq.)). これは、PVP水溶液中でC₆₀, C₇₀がPVPと分子間相互作用(電荷移動複合体形成)を起こしているためと考えられる。一般に、電子の非局在化が進むと物質の吸収スペクトルは長波長側にシフトする。C₆₀, C₇₀の電子欠損性の二重結合が、PVPのアミド官能基と配



poly(vinylpyrrolidone) K30 (n = abt. 360)
MW = abt. 40,000
LD₅₀ > 100 g / kg (mouse, rat)

Fig. 2. Structure of poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

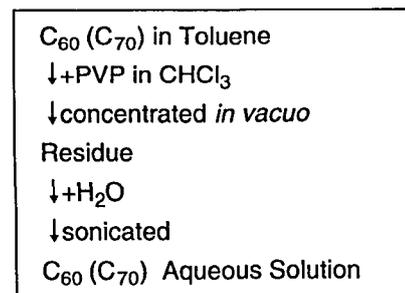


Fig. 3. Solubilization of C₆₀ and C₇₀ by poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

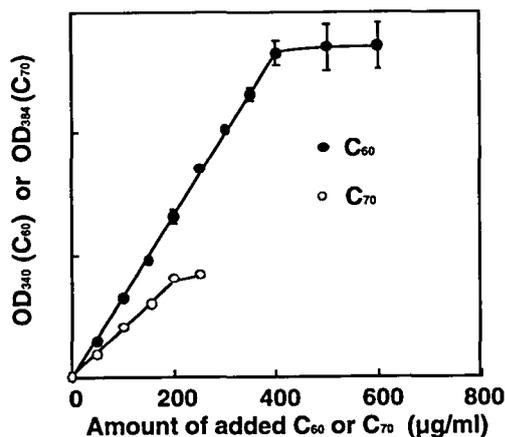


Fig. 4. Solubility curves of C_{60} and C_{70} in water with 5% of poly(vinylpyrrolidone) (PVP)

ODs were measured after dilution with water by one tenth.

The approximate equation and correlation coefficients of the portions of straight lines are as follows.

$$C_{60} (y = 6.80 \times 10^{-3}x - 0.00281, R^2 = 0.998)$$

$$C_{70} (y = 4.08 \times 10^{-3}x - 0.00390, R^2 = 0.999)$$

位して、電子の非局在化が進み、 C_{60} 、 C_{70} のスペクトルが長波長側にシフトしたと推定した。

PVP を用いて水溶化した C_{60} 、 C_{70} は、周囲を PVP に囲まれていると考えられる。 C_{60} 、 C_{70} が PVP と共有結合を形成していないことを確認するため、LSI-MS による質量分析および塩析回収を行った。LSI-MS による質量分析の結果、 C_{60} (m/z 720) のピークが検出され、PVP 水溶液中で、 C_{60} が未反応のまま存在していることが示唆された。また、塩化カリウムを用いた塩析後、トルエンで抽出したところ、 C_{60} が定量的に回収された。以上の結果から、 C_{60} と PVP が水溶液中で共有化学結合していないと判断した。

Fig. 5 に種々の溶媒に対する C_{60} の溶解度と、5% PVP 水溶液に対する C_{60} の溶解度を比較したグラフを示す。界面活性剤 PVP を用いることにより、 C_{60} はメチレンクロライドやヘキサンといった有機溶媒に対する溶解度よりも高い溶解度で C_{60} を水中に溶かすことができる。また本法を用いることにより、著者らの報告と相前後して報告された、レシチン等の両親媒性の界面活性剤を用いる水溶化法⁸⁷⁾や、シクロデキストリンを用いる水溶化法⁸⁸⁾よりも、高い濃度で C_{60} を溶かすことが可能である。

以上、PVP を可溶化剤として用いて生物試験を行うために十分な高濃度の C_{60} を溶解することができた。また本法では、化学的に未修飾のフラレーンを水溶化することができるので、 C_{60} そのものの生物作用の検討を行うことができる。

著者らは、この水溶液を種々の生物活性試験に適用し、すでに、以下に示すような C_{60} の生物作用を明らかにした。それらは、光照射下では、DNA 切断活性^{89,90)}、溶血活性⁹¹⁾、発ガンイニシエーション作用^{92,93)}、抗菌作用⁹⁴⁾、また、光

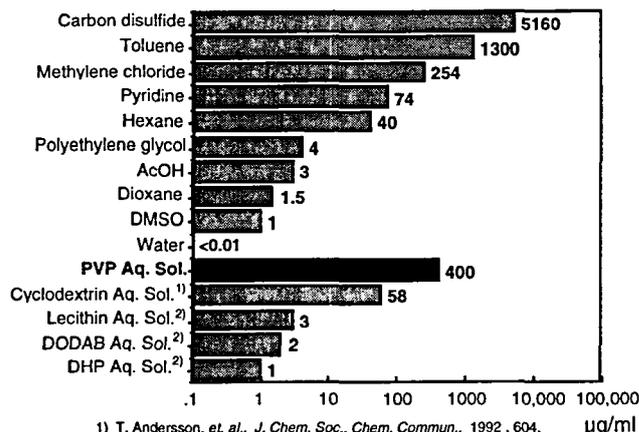


Fig. 5. Solubilities of C_{60} in various solution

非照射下では、軟骨等の分化促進に対する作用⁹⁵⁻⁹⁷⁾、グルタチオン S-トランスフェラーゼ阻害活性⁹⁸⁾などである。このうち光照射下における DNA 切断活性について、活性種の解析を含め詳細な検討を行ったので以下報告する。

(2) 光 DNA 切断活性

C_{60} 、 C_{70} の水溶化に成功したので、これを用いて C_{60} の生物作用を調べる実験を行った。まず最初にフラレーンの光増感性に着目し、ターゲットとする生体分子として DNA を選び、光照射下における DNA 切断活性について検討した。

光照射下フラレーンの DNA 切断活性については Nakamura らにより水溶性 C_{60} 誘導体を用いた結果が報告されている⁹⁹⁻¹⁰¹⁾。著者らは、化学的に未修飾の C_{60} 、 C_{70} を用い、 C_{60} 、 C_{70} そのものの DNA 切断活性を明らかにする目的で光 DNA 切断実験を行った⁸⁹⁾。

可視光の照射下においてスーパーコイル型のプラスミド DNA と PVP で水溶化した C_{60} あるいは C_{70} を共存させ、DNA 切断活性を調べた。切断活性の検討法としては、アガロースゲル電気泳動を行い、Form I (スーパーコイル型) と Form II (ニック型) の量を比較する方法をとった。結果を Fig. 6 に示す。その結果、フラレーン非存在下 (Lane 1) や、可視光非照射下 (Lane 4 および 7) の結果に比較して、 C_{60} 、 C_{70} ともに光照射下 (Lane 3 および 6) で有意に DNA 切断活性を示した。活性の強さは、 C_{60} 、 C_{70} の間で差はなかった。しかし、ここで注目すべきことには、 C_{60} 、 C_{70} いずれの場合も NADH 非存在下 (Lane 2 および 5) では、切断活性が見られなかったことである。この結果から、 C_{60} 、 C_{70} の光 DNA 切断においては光励起電子移動反応によって生じる還元型活性種が寄与している可能性を考えた。その他の活性酸素種阻害剤を添加した実験結果については、後述する。

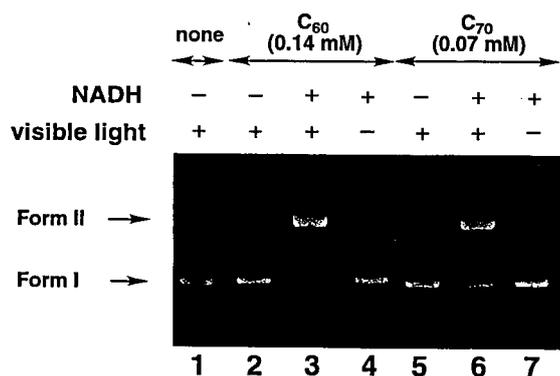


Fig. 6. Photoinduced DNA cleavage by C₆₀ and C₇₀

The pBR322 supercoiled plasmid was incubated with each chemical in TDC buffer for 4 h at 37°C under irradiation with a 300-W reflector lamp. Lanes 1 - 3 and 5 - 6, incubation under visible light irradiation: lane 1, pBR322 DNA with 1.25 % of PVP; lane 2, with 0.14 mM C₆₀; lane 3, with 0.14 mM C₆₀ and 10 mM NADH; lane 5, with 0.07 mM C₇₀; lane 6, with 0.07 mM C₇₀ and 10 mM NADH. Lanes 4 and 7, in the dark: lane 4, pBR322 DNA with 0.14 mM C₆₀ and 10 mM NADH; lane 7 with 0.07 mM C₇₀ and 10 mM NADH.

(3) 光 DNA 切断活性を増強した分子

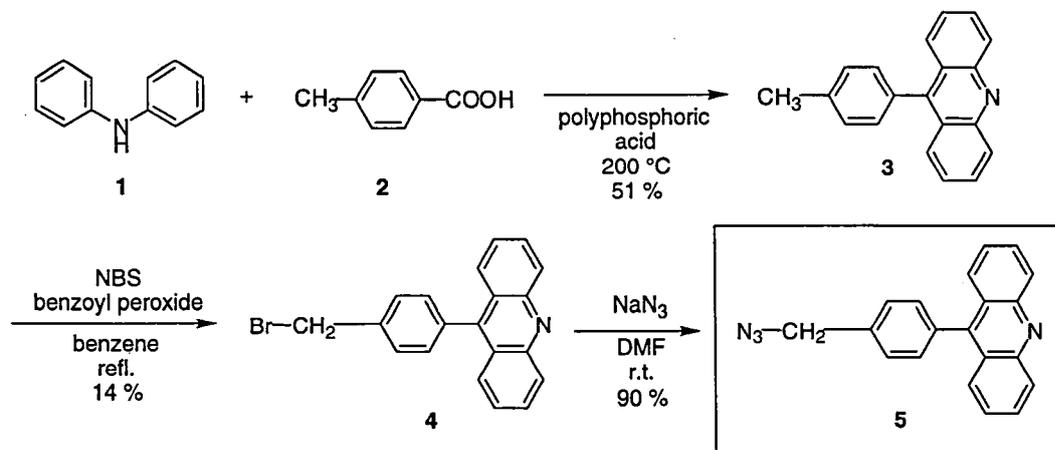
未修飾の C₆₀ および C₇₀ の DNA 切断活性について述べたが、種々の誘導体を用いた DNA 切断活性に関する研究も行われている。Nakamura らは、水溶性 C₆₀ 誘導体が光照射下 DNA 切断反応を示すことを報告した⁹⁹⁾。この化合物は C₆₀ に極性の官能基を導入し、両親媒性を持たせることで、水溶性を向上させた化合物である。また、彼らは、特定の DNA 鎖に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを結合させた DNA 切断分子を合成し、これらが一重鎖・二重鎖・ヘアピン型の DNA に作用することも報告している。

また、Foote, Rubin らは、デオキシヌクレオチド型 C₆₀ 誘導体を用いた光 DNA 切断活性を報告している¹⁰²⁾。彼らは、エオシン（電子欠損型ではない光増感剤）に同じデオキシ

ヌクレオチドを結合させた化合物を対照化合物として合成し、活性発現の挙動を比較し、活性種の検討を行っている。

著者らは、未修飾のフラーレンの光 DNA 切断活性を明らかにしたが、さらに、その切断活性を増強する目的で DNA に親和性のあるインターカレート基を C₆₀ に導入した誘導体を合成し、その活性について検討した⁸⁹⁾。合成スキームを Scheme 3, 4 に示す。一般的に C₆₀ へのアジド基の付加の形式としては Fig. 7 に示す四種が考えられる。その付加の形式によって、C₆₀ 誘導体の面对称性および付加部分の炭素の sp 混成が異なるため、どの形式で付加しているかを ¹³C-NMR のスペクトルを解析することにより明らかにすることができる¹⁰³⁻¹⁰⁵⁾。付加体 (7) の ¹³C-NMR のスペクトルで、C₆₀ 骨格部分について sp³ 炭素が無いこと、また、sp² 炭素が 32 種類確認できたことから、付加体 (7) の構造は Fig. 7 に示す四種のうち、[5,6]-ring junction に付加した、[5,6]-open の形式であることが分かった。この付加体が生成するメカニズムを Scheme 5 に示す。すなわち、C₆₀ の電子欠損性の二重結合 ([6,6]-ring junction) に、求核性の高いアジド基が 1,3-双極子環化反応により求核付加し、生じたトリアゾール体は熱により脱窒素を受けさらに転移反応を起こし、[5,6]-open のジアジリン付加体へと変化する。

次に、C₆₀ と付加体 (7) の DNA 切断活性を比較した。アクリジン基自身の DNA 切断活性を調べる目的で、同時に化合物 (3) の DNA 切断活性も調べた。付加体 (7) と化合物 (3) は溶解性を向上させるため、塩酸塩にして用いた。化合物は全て、最終濃度 5 % の PVP を用いて水溶化した。結果を Fig. 8 に示す。付加体 (7) は C₆₀ や化合物 (3) に比較し、有意に強い DNA 切断活性を示した。一般に、C₆₀ 誘導体の光増感性は、分子の対称性の低下や共役系の変化によりモノ付加体で C₆₀ の 70-80 % 程に低下するという報告がある。付加体 (7) が C₆₀ よりも高い DNA 切断活性を示したことは、付加体 (7) のアクリジン部分と DNA が



Scheme 3. Synthesis of 9-(4-azidomethylphenyl)acridine (5)

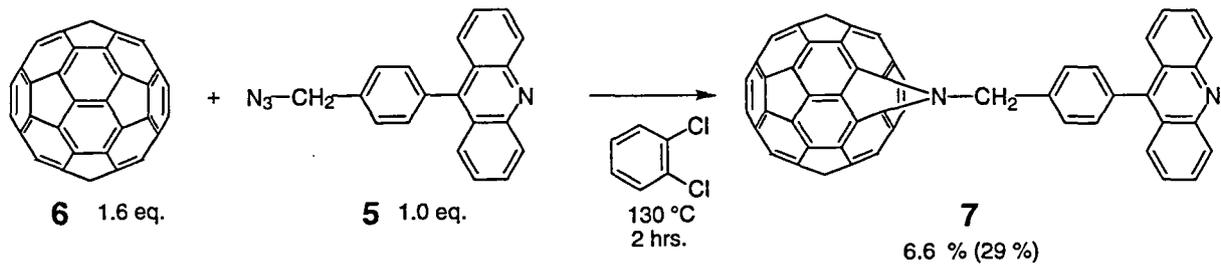
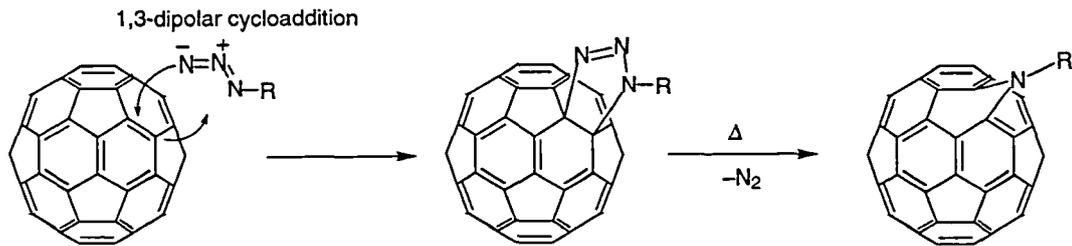
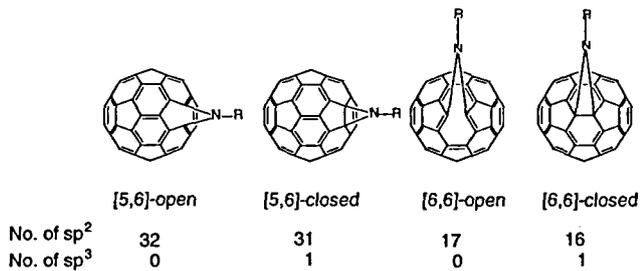
Scheme 4. Reaction of C_{60} and 9-(4-azidomethylphenyl)acridine (5).Scheme 5. Possible mechanism in the reaction of C_{60} and benzylazide derivative.

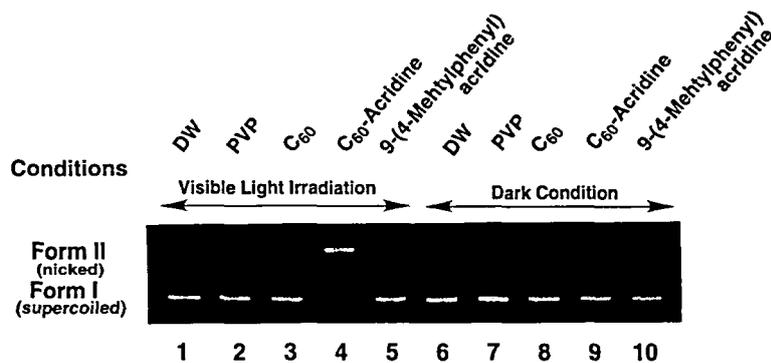
Fig. 7. Four possible isomeric iminofullerenes

相互作用 (インタカレート) し, DNA と C_{60} 分子が近接したことによって活性が増強されたと考えている. この結果は, 化学反応性に富み, 化学修飾が容易である C_{60} を母核として用いることにより, 一層強い生物活性を有する化合物を合成することが可能であることを示す.

(4) 光 DNA 切断活性に関わる活性種の解析

Nakamura らは, 水溶性 C_{60} 誘導体の DNA 切断活性の活性種の解析実験を行っている. すなわち, 1O_2 の寿命を延長させる効果のある重水中における活性, および, 切断部位の塩基特異性を検討し, 重水中で活性の増強が見られたこと, また, 切断活性はグアニンに特異的であったことから, この実験系における光 DNA 切断活性種を 1O_2 と推定している^{99,101}.

光励起 C_{60} の生物作用の活性種を考える場合, この Nakamura らによる光 DNA 切断実験の解析結果に代表されるように, 従来 1O_2 がその活性種と考えられてきた. しかし, 生体内では溶存酸素に加えて NADH などの還元剤や求核性を有する生体成分が存在することから, このような条件下で実際に光励起 C_{60} からどのような活性種が生成するのかを実証する必要がある. 特に, 光励起 C_{60} の高い還元電位を考えると, 溶存酸素存在下でも光増感作用の項で述

Fig. 8. DNA-cleaving activities of C_{60} (6), C_{60} -acridine adduct (7) and 9-(4-methylphenyl) acridine (3)

べた *Type I* の反応が進行する可能性は高いと考えられる。実際、前に述べた光 DNA 切断作用の解析実験において、還元剤の存在下でのみ切断活性が見られた結果はこの推定を支持し、活性種が *Type II* のエネルギー伝達反応で生成する $^1\text{O}_2$ ではなく、*Type I* の電子移動反応が関与している可能性を示唆する。

また、Foote, Rubin らは、デオキシヌクレオチド型 C_{60} 誘導体を合成し、その光 DNA 切断活性の発現メカニズムについて検討している。その結果、切断活性はグアニン選択的に見られたが、既知の $^1\text{O}_2$ 生成剤であるエオシン（電子欠損型ではない光増感剤）に同じデオキシヌクレオチドを結合させた化合物を対照化合物として比較検討すると、それぞれの化合物が活性発現において異なる挙動を示したと報告した¹⁰²⁾。すなわち、エオシン付加体では重水中での実験や $^1\text{O}_2$ 消去剤であるアジ化ナトリウム、DABCO を添加する系での実験の結果、切断活性に $^1\text{O}_2$ の関与が確認されたのに対し、 C_{60} 付加体では $^1\text{O}_2$ の関与が全くみられなかった。彼らは、この結果に加えて、光励起 C_{60} の還元電位を併せ考え、デオキシヌクレオチド型 C_{60} 誘導体の光 DNA 切断は $^1\text{O}_2$ による酸化によって起きているのではなく、電子密度の高いグアニン塩基が電子供与体となって $^3\text{C}_{60}^*$ へ電子移動反応すること、すなわち、 $^3\text{C}_{60}^*$ による核酸塩基の酸化反応によって起きていると推定している。

1) DNA 切断実験による活性種の解析

著者らは、PVP で水溶化した未修飾の C_{60} を用いて活性種を解析した⁹⁰⁾。まず、DNA 切断活性への $^1\text{O}_2$ の関与を、 $^1\text{O}_2$ 消去剤を実験系に添加してその影響を調べる方法で検討した。 $^1\text{O}_2$ 消去剤としては、アジ化ナトリウム、L-ヒスチジン、2,5-ジメチルフランの 3 種類を用いた。この三種の消去剤は、電荷移動型 (charge transfer type) の消去剤であり電子欠損性の $^1\text{O}_2$ と反応しやすい性質を持つ。求核性のあるアジ化ナトリウムは、電子欠損性の $^1\text{O}_2$ と反応し、電荷移動錯体を形成し、 $^1\text{O}_2$ を $^3\text{O}_2$ に変化させる¹⁰⁶⁾。また、L-ヒスチジンおよび 2,5-ジメチルフランは、電子欠損性の $^1\text{O}_2$ とエン反応を起こすことで、 $^1\text{O}_2$ を捕捉すると考えられている¹⁰⁷⁾。

以上三種の $^1\text{O}_2$ 消去剤を用いた C_{60} 、 C_{70} による DNA 切

断実験結果を Fig. 9 に示す。結果として、いずれの消去剤も、 C_{60} 、 C_{70} の DNA 切断活性を抑制することがなかった。この結果は、DNA 切断活性の発現に $^1\text{O}_2$ が関与している可能性が低いことを示す。

そこで、この反応系における活性種として、還元型活性酸素種であるスーパーオキシド ($\text{O}_2^{\cdot-}$) やヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の関与を推定し、それを証明するため、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ を消去するスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を反応系に添加しその影響を調べた。SOD による $\text{O}_2^{\cdot-}$ の消去のメカニズムとしては、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の不均化反応を SOD が触媒することで、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の拡散よりも $\text{O}_2^{\cdot-}$ の不均化が優先し、その結果、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ と H_2O_2 との反応が抑制され、 $\cdot\text{OH}$ が生成しなくなり DNA 切断が抑制されると考えられている。この SOD を用いれば、DNA 切断の活性発現のメカニズムに $\text{O}_2^{\cdot-}$ が関与しているかどうかを調べることができる。実験結果を Fig. 10 に示す。SOD を添加しない Lane 1, 3 では Form II が生成するのに対し、添加した Lane 2, 4 では Form II の生成が殆ど見られなかった。すなわち、SOD の添加により C_{60} 、 C_{70} による DNA 切断活性が完全に抑制された。この結果から、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ の生成が DNA 切断活性の発現において重要である事が示された。

以上、光励起フラレーンの DNA 切断において、活性発現には還元剤が必要である、 $^1\text{O}_2$ 消去剤の影響は見られない、SOD の添加により活性が弱められる、という結果を得た。これらの結果は、還元型の活性酸素種が活性発現における活性種となっていることを示唆する。

2) EPR 法によるスーパーオキシドラジカルアニオン ($\text{O}_2^{\cdot-}$) の検出

次にこの仮説を証明するため、分光学的手法等を用いて光励起フラレーンより生じる活性種を解明する実験を行った⁹⁰⁾。まず第一にスピントラップ剤を用いた EPR 法により $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出を試みた。 $\text{O}_2^{\cdot-}$ はそれ自身がラジカルであるので EPR 検出可能であるが、この直接検出法ではサンプルを凍結し分子運動を停止させた状態で測定する必要がある。それに対して本法は、スピントラップ剤で $\text{O}_2^{\cdot-}$ を捕捉することで簡便に $\text{O}_2^{\cdot-}$ の検出が行える。スピントラップ剤としては 5,5-ジメチル-1-ピロリン N-オキシド^{108,109)} (DMPO)

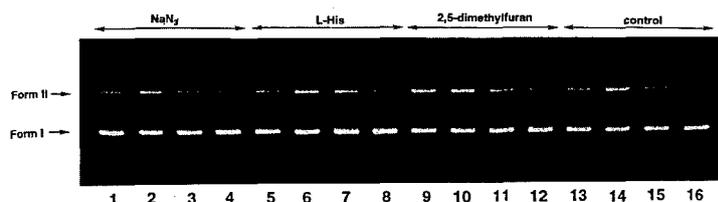


Fig. 9. Effects of $^1\text{O}_2$ scavengers on the photoinduced DNA-cleaving activities of C_{60} and C_{70}

The pBR322 was incubated with each chemical for 4 hours at 5°C under irradiation by 300-W photoreflexor lamp (at 15 cm distance). Lanes 1-4, with 10mM NaN_3 ; lanes 5-8, with 10mM L-histidine; lanes 9-12, with 10mM 2,5-dimethylfuran; lanes 13-16, control. Lanes 1, 5, 9 and 13, with 0.07 mM C_{60} ; lanes 2, 6, 10 and 14, with 0.14 mM C_{60} ; lanes 3, 7, 11 and 15, with 0.07 mM C_{70} ; lanes 4, 8, 12 and 16, with 1.25 % PVP only.

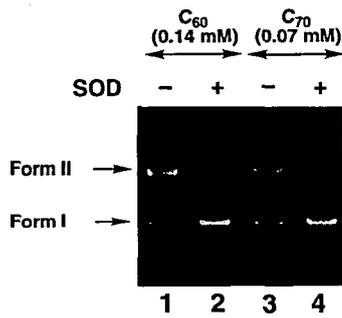


Fig. 10. Effects of SOD on the photoinduced DNA cleavage by C_{60} and C_{70}

The pBR322 supercoiled plasmid was incubated with each chemical in TDC buffer for 2 h at 37°C under irradiation with a 300-W reflector lamp. Lanes 1 - 4, incubation under visible light irradiation: lane 1, pBR322 DNA with 0.14 mM C_{60} and 10 mM NADH; lane 2, with 0.14 mM C_{60} , 10 mM NADH and 0.04 units/mL of SOD; lane 3, with 0.07 mM C_{70} and 10 mM NADH; lane 4, with 0.07 mM C_{70} , 10 mM NADH and 0.04 units/mL of SOD.

を用いた。DMPOは、 $O_2^{\cdot-}$ のスピンラップ剤として最も一般的に用いられている試薬であるが、 $\cdot OH$ とも反応するため、 $\cdot OH$ を消去するためにジメチルスルフォキシド (DMSO) を添加した実験も行った。

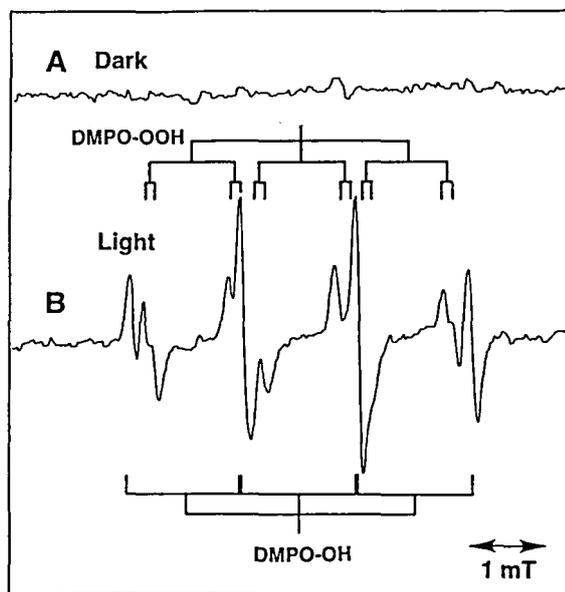


Fig. 11. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $O_2^{\cdot-}$ and $\cdot OH$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp.

C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM, DMPO 0.72 M, DETAPAC 1 mM, in 50 mM phosphate buffer. Irradiation time: (A) 0 sec., (B) 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

電子供与性の還元剤としては生体内還元剤の一つである NADH を用い、照射光としては 300 W の可視光ランプを用いた。まず、Fig. 11 に還元剤存在下 C_{60} / PVP 水溶液に光照射し生じた酸素ラジカルを DMPO にてトラップした実験結果を示す。10 秒間の光照射により DMPO と $O_2^{\cdot-}$ の付加体 (DMPO-OOH) および DMPO と $\cdot OH$ の付加体 (DMPO-OH) のピークが見られた。この結果は、還元剤存在下 C_{60} / PVP 水溶液に可視光を照射すると、還元型の酸素ラジカル種である $O_2^{\cdot-}$ と $\cdot OH$ の両方が生じることを示す。

次に、 $O_2^{\cdot-}$ を選択的に検出するため、反応系に DMSO を添加し生成する $\cdot OH$ を消去し同様の測定を行った。結果を Fig. 12 に示す。Fig. 12 の a (Light) に示すように光照射下、還元剤存在下でのみ C_{60} / PVP 水溶液中において DMPO-OOH のピークが見られた。一方、DMSO 添加により DMPO-OH のピークが消失し、かわりに DMPO-CH₃ のピークが検出された。これは、DMSO の S に $\cdot OH$ が付加した後

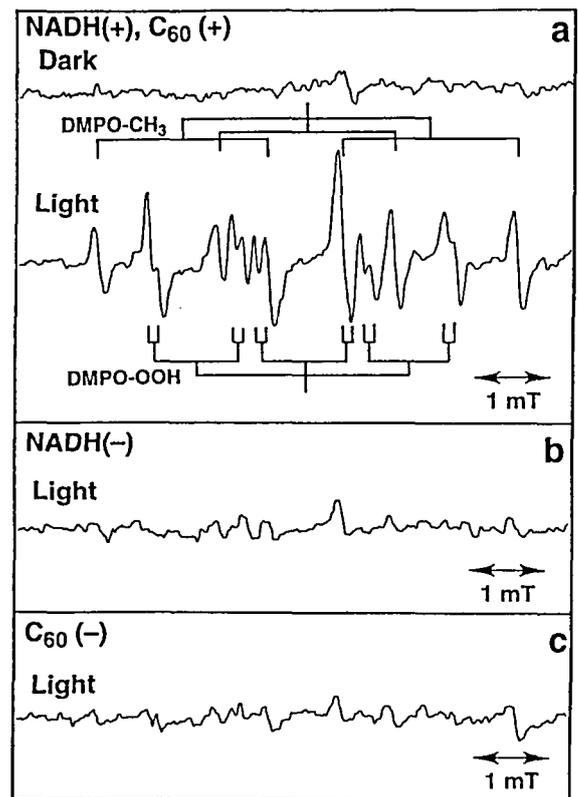


Fig. 12. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $O_2^{\cdot-}$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp

DMPO 0.72 M, DETAPAC 1 mM, DMSO 3.1 M, in 50 mM phosphate buffer, (a) C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM, (b) C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, (c) PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time: Dark 0 sec., Light 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

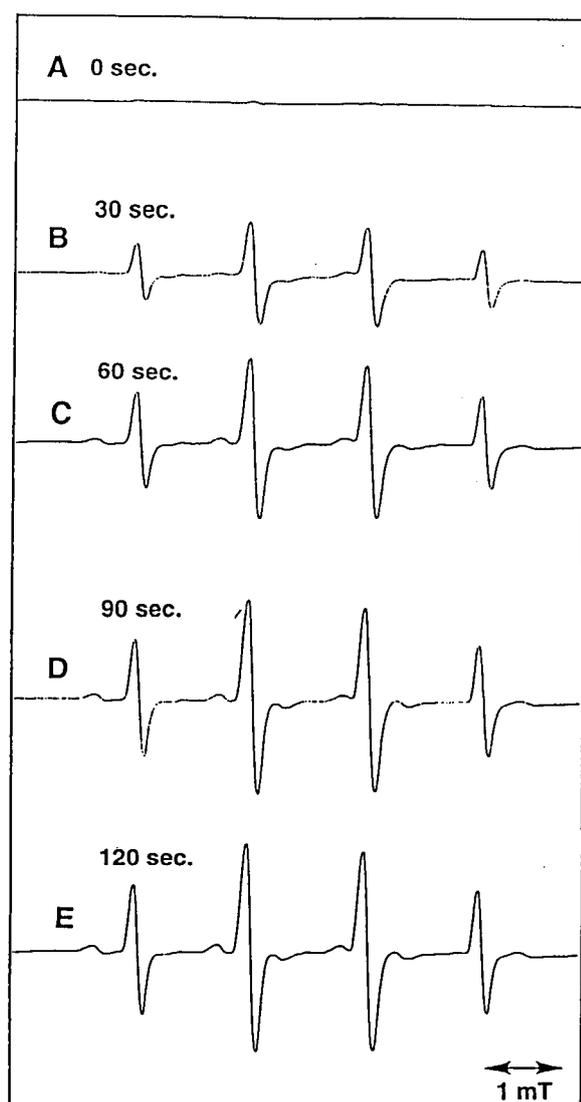


Fig. 13. X-band EPR spectra of DMPO adduct with $\cdot\text{OH}$ generated in C_{60} / PVP aqueous solution under irradiation with 300-W reflector lamp
DMPO 0.72 M, Fe(II)-DETAPAC 0.2 mM, in 50 mM phosphate buffer, C_{60} 0.2 mM, PVP 2%, NADH 10 mM. Irradiation time: Dark 0 sec., Light 10sec. Experimental conditions: temperature 296 K, microwave frequency 9.394 GHz, microwave power 16 mW, field modulation 0.1 mT at 100 kHz, scan time 2min.

メチル基が一つラジカル的に脱離し生じたメチルラジカルと DMPO が反応したために生じるピークである。ハイパーファインスプリッティングは、DMPO-OOH は $a_{\text{N}} = 1.37$ mT, $a_{\text{H}}^{\beta} = 1.09$ mT, $a_{\text{H}}^{\alpha} = 0.10$ mT, DMPO-CH₃ は $a_{\text{N}} = 1.57$ mT, $a_{\text{H}}^{\beta} = 2.23$ mT であり、文献値とよく一致した。光非照射下 (Fig. 12 の a (Dark)), 還元剤非存在下 (Fig. 12 の b), あるいは、 C_{60} 非存在下 (Fig. 12 の c) では、ピークは見られなかった。また、ピークの高さは、 C_{60} 濃度や添加した NADH 量に依存し、また、DMPO-OOH のピークは SOD の添加 (20 units / mL) により完全に消失した。

以上、EPR 法を用いて還元剤 NADH 存在下、光励起 C_{60} から $\text{O}_2\cdot^-$ が生成することを確認した。同様の実験を C_{70} / PVP を用いて行ったところ、スピントラップ剤との付加体が照射時間、還元剤濃度、 C_{70} 濃度に依存して生じ、その生成量は C_{60} を用いた場合とほとんど変わらなかった。 C_{60} と C_{70} の光増感性を比較すると、この $\text{O}_2\cdot^-$ 生成系に大きく関わると考えられる三重項エネルギーや、三重項フラレーン生成における量子収率、三重項フラレーンの寿命がほとんど同じであるため、光励起電子移動で生成する $\text{O}_2\cdot^-$ 生成量が同じであったと考えた。

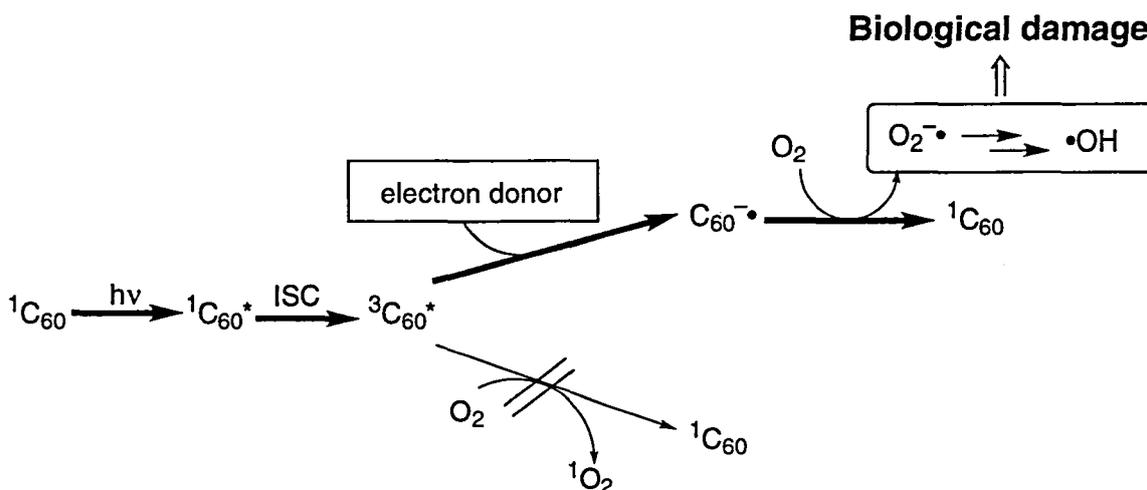
3) EPR 法によるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の検出

次に、より活性の強い還元型活性酸素種であるヒドロキシルラジカル ($\cdot\text{OH}$) の生成を EPR 法を用いて検討した⁸⁹⁾。なお、 $\cdot\text{OH}$ は、 $\text{O}_2\cdot^-$ が非酵素的に不均化して生成する過酸化水素のフェントン反応により生成すると考えられている。スピントラップ剤である DMPO は前述の $\text{O}_2\cdot^-$ の捕捉にも用いられる試薬であるが、 $\cdot\text{OH}$ との反応性の方が高い。また、 $\cdot\text{OH}$ との反応で生成する付加体は、 $\text{O}_2\cdot^-$ との反応で生成する付加体より安定であり、本法で $\cdot\text{OH}$ を高感度で検出することが出来る。結果を Fig. 13 に示す。NADH の存在下 C_{60} に光を照射すると、光照射時間 (0-120 秒) に依存して、安定な $\cdot\text{OH}$ と DMPO との付加体のピークが認められ、 $\cdot\text{OH}$ がこの実験系において生成していることを確認した。また、 C_{60} の非存在下や、NADH の非存在下においては $\cdot\text{OH}$ の生成量が低く抑えられた。以上、水溶液中、酸素および還元剤存在下で光励起フラレーンから強力な酸化剤であり実際の生体分子損傷に働くと考えられる $\cdot\text{OH}$ が生成していることを実証した。

これらの結果は、還元剤および溶存酸素存在下におけるフラレーンの DNA 切断作用の活性種が、従来考えられていた 1O_2 ではなく、 $\cdot\text{OH}$ や $\text{O}_2\cdot^-$ のような還元型の活性酸素種である可能性を強く示唆する (Scheme 6)。

5. おわりに

C_{60} , C_{70} などのフラレーンは、星間物質の構造予測研究で、カーボングラファイトにレーザー光を照射したりアーク放電したりすることにより偶然見いだされた人工化合物である。しかし、その後の研究で、炭素含量の多い岩石や墨などにも少量ではあるが存在することも明らかになっている。フラレーンは、表面をゆがんだ sp^2 炭素で覆われた球状構造をしており、その特徴的な構造に起因して、既存の有機化合物とは異なる物理化学的性質を有する。このような特異な性質を有するフラレーンは、機能性素材として多方面から注目を集めている。著者らは、これまで殆ど研究されていなかったフラレーンの生物作用を探索し、生物活性物質としての利用を検討することは、今までに無い新しいタイプの医薬品素材の開発という点で非常に有意義で



Scheme 6. Proposed pathway for the generation of superoxide radical anion by photoexcited fullerene in the presence of reductant.

あると考え研究を開始した。

まず最初に、生物試験を行うためにフラーレン (C_{60} , C_{70}) の水溶化を検討し、界面活性剤ポリビニルピロリドンを用いた可溶化法を見出した。本法により高濃度のフラーレン水溶液を調製する事が可能であり、多くの *in vitro* 生物試験が可能になった。次に、可溶化したフラーレン水溶液を用いて可視光照射下 DNA 切断活性を検討し、 C_{60} および C_{70} は、光照射条件下還元剤と酸素存在下効率良く DNA を切断することを見出した。また、DNA とインタカレートすることが知られているアクリジン基を導入した C_{60} 誘導体を合成し、この化合物がより強力な光 DNA 切断活性を有することを明らかにした。最後に、光励起フラーレンから生成する DNA 切断活性種の解析実験を行い、活性種は、従来考えられていた 1O_2 ではなく、還元型のオキシラジカル類 ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) であることを明らかにした。この特性はフラーレンの電子欠損性に起因する。すなわち、フラーレンは長波長の可視光により効率良く光励起され還元されやすい励起三重項状態になることから、分子状酸素との光増感電子移動反応によりこのような還元型の活性酸素種が生成したと考えられる。

光増感剤の医薬品への応用としては、まず第一にガン治療の一つである光線力学療法にもちいる薬剤があげられる。これは、腫瘍親和性光感受性物質に特定波長のレーザー光を照射し、これによって起きる光増感反応によりガン細胞を変性・壊死させる療法である。この目的に合う化合物の条件としては、一般的に (1) 化学的に純粋である、(2) 組織透過性が高く生体損傷活性が低い長波長 (600 - 800 nm) の光で励起される、(3) 光非照射下においては毒性が無い、(4) 組織特異性がある といったことが挙げられる。フラーレンは、(1) - (3) の条件に非常によく合致している。ガンの光線力学療法に関しては、Ikada らの C_{60} とポリエチレングリコールとの付加体を用いた研究があり、ガン細胞

特異性が增强したとの報告がある^{110,111)}。フラーレンは、他の光増感剤で活性種とされる 1O_2 よりも酸化活性の強いオキシラジカル類 ($O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) が生じることから高い殺細胞性が期待され、非常に有効なリード化合物である。

文 献

- 1) Kroto, H. M., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., Smalley, R. E.: *Nature*, **318**, 162-163 (1985).
- 2) 「化学」編集部編: C_{60} ・フラーレンの化学, 化学同人, (1993).
- 3) 篠原久典, 齊藤弥八: フラーレンの化学と物理, 名古屋大学出版会, (1997).
- 4) Ohsawa, Y., Saji, T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 781-782.
- 5) Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos, K., Huffman, D. R.: *Nature*, **347**, 354-358 (1990).
- 6) Taylor, R., Walton, D. R. M.: *Nature*, **363**, 685-693 (1993).
- 7) Hirsch, A.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 1138-1141 (1993).
- 8) Hirsch, A.: "The Chemistry of the Fullerenes", George Thieme Verlag: Stuttgart (1994).
- 9) Diederich, F., Thilgen, C.: *Science*, **271**, 317-323 (1993).
- 10) Hirsch, A., Li, Q., Wudl, F.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **30**, 1309-1310 (1991).
- 11) Fagan, P. J., Krusic, P. J., Evans, D. H., Lerke, S. A., Johnston, E.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9694-9699 (1992).
- 12) Hirsch, A., Soi, A., Karfunkel, R.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 766-768 (1992).
- 13) Tsuda, M., Ishida, T., Nogami, T., Kurono, S., Ohashi, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 781-782.
- 14) Suzuki, T., Li, Q., Khemani, K. C., Wudl, F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 7301 (1991).
- 15) Maggini, M., Scorrano, G.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 9798-9799 (1993).
- 16) Wilson, S. R., Wang, Y., Cao, J., Tan, X.: *Tetrahedron Lett.*, **37**, 775-778 (1996).
- 17) Hoke II, S. H., Molstad, J., Dilettato, D., Jay, M. J., Carlspon,

- D., Kahr, B., Cooks, R. G.: *J. Org. Chem.*, **57**, 5069-5071 (1992).
- 18) Vassela, A., Uhlmann, P., Waldruff, C. A. A., Diederich, F., Thilgen, C.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 1388 (1992).
- 19) Haufler, R. E., Conceicao, J., Chibante, L. P. F., Chai, Y., Byrne, N. E., Flanagan, S., Haley, M., O'Brien, S. C., Pan, C., Xiao, Z., Billups, W. E., Ciufolini, M. A., Hauge, R. H., Magrave, J. L., Wilson, L. J., Curl, R. F., Smalley, R. E.: *J. Phys. Chem.*, **94**, 8634-8636 (1990).
- 20) Hendsen, C. C., Cahill, P. A.: *Science*, **259**, 1885-1887 (1993).
- 21) Wood, J. M., Kahr, B., Hoke II, S. H., Dejarne, L., Cooks, R. G., Ben-Amotz, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5907-5908 (1991).
- 22) Creegan, K. M., Robbins, J. L., Robbins, W. K., Millar, J. M., Sherwood, R. D., Tindall, P. J., Cox, D. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1103-1105 (1992).
- 23) Elemes, Y., Silverman, S. K., Sheu, C., Kao, M., Foote, C. S., Alvarez, M. M., Whetten, R. L.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **31**, 351-353 (1992).
- 24) Hamano, T., Mashino, T., Hirobe, M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1537-1538.
- 25) Foeler, P. W., Kroto, H. W., Taylor, R., Walton, D. R. M.: *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **87**, 2685-2686 (1991).
- 26) Tuinman, A. A., Mukherjee, P., Adcock, J. L., Hettich, R. L., Compton, R. N.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 7584-7589 (1992).
- 27) Selig, H., Lifshitz, C., Peres, T., Fischer, J. E., McGhie, A. R., Romanow, W. J., McCauley Jr., J. P., Smith III, A. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 5475-5476 (1991).
- 28) Holloway, J. H., Hope, E. G., Taylor, R., Langley, G. J., Avent, A. G., Dennis, T. J., Hare, J. P., Kroto, H. W., Walton, R. M.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1991**, 966-969.
- 29) Olah, G. A., Bucsi, I., Lambert, C., Aniszfeld, R., Trivedi, N. J., Sensharma, D. K., Prakash, G. K. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 9385-9387 (1991).
- 30) Birkett, P. R., Hitchcock, P. B., Kroto, H. W., Taylor, R., Walton, R. M.: *Nature*, **357**, 479-481 (1992).
- 31) Tebbe, F. N., Harlow, R. L., Chase, D. B., Thorn, D. L., Campbell Jr., G. C., Calabrese, J. C., Herron, N., Young Jr., R. J., Wasserman, E.: *Science*, **256**, 822-825 (1992).
- 32) Morton, J. R., Preston, K. F., Kursic, P. J., Hill, S. A., Wasserman, E.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 3576-3578 (1992).
- 33) Chiang, L. Y., Lu, F.-J., Lin, J.-T.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 1283-1284.
- 34) Okuda, K., Mashino, T., Hirobe, M.: *Biorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 539-542 (1996).
- 35) Tsai, M. -C., Chen, Y. H., Chiang, L. Y.: *J. Pharm. pharmacol.*, **49**, 438-445 (1997).
- 36) Lai, Y.-L., Chiang, L. Y.: *J. Atomic Pharmacol.*, **17**, 229-235 (1997).
- 38) Dugan, L. L., Turetsky, D. M., Du, C., Lobner, D., Wheeler, M., Almili, C. R., Shen, C. K.-F., Luh, T.-Y., Choi, D. W., Lin, T.-S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9434-9439 (1997).
- 39) Izuoka, A., Tachikawa, T., Sugawara, T., Saito, Y., Shinohara, H.: *Chem. Lett.*, **1992**, 1049-1052.
- 40) Andersson, T., Nilsson, K., Sundahl, M., Westman, G., Wennerström, O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 604-606.
- 41) Yoshida, Z., Takekuma, H., Takekuma, S., Matsubara, Y.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 1597-1599 (1994).
- 42) Atwood, J. L., Koustantonis, G. A., Raston, C. L.: *Nature*, **368**, 229-231 (1994).
- 43) Suzuki, T., Nakashima, K., Shinkai, S.: *Tetrahedron Lett.*, **36**, 249-252 (1995).
- 44) Araki, K., Akao, K., Ikeda, A., Suzuki, T., Shinkai, S.: *Tetrahedron Lett.*, **1996**, 37, 73-76.
- 45) Arbogast, J. W., Darmanyan, A. P., Foote, C. S., Rubin, Y., Diederich F. N., Alvarez, M. M., Anz, S. J., Whetten, R. L.: *J. Phys. Chem.*, **95**, 11-12 (1991).
- 46) Arbogast, J. W., Foote, C. S., Kao, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 2277-2279 (1992).
- 47) Foote, S.: *Top. Curr. Chem.*, **169**, 347-363 (1994).
- 48) Wasielewski, M. R., O'Neil, M. P., Lykke, K. R., Pellin, M. J., Gruen, D. M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 2774-2776 (1991).
- 49) Kim, D., Lee, M., Suh, Y. D., Kim, S. K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 4429-4430 (1992).
- 50) Dmitrijevic, N. M., Kamat, P. V.: *J. Phys. Chem.*, **96**, 4811-4814 (1992).
- 51) Sun, Y.-P., Wang, P., Hamilton, N. B.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 6378-6381 (1993).
- 52) Bensasson, R. V., Hill, T. J., Land, E. J., Leach, S., McGarvey, D. J., Truscott, T. G., Ebenhoch, J., Gerst, M., Rüchardt, C.: *Chem. Phys.*, **215**, 111-123 (1997).
- 53) Nagano, T., Arakane, K., Ryu, A., Masunaga, T., Shinmoto, K., Mashioko, S., Hirobe, M.: *Chem. Pharm. Bull.*, **42**, 2291-2294 (1994).
- 54) Hamano, T., Okuda, K., Mashino, T., Hirobe, M., Arakane, K., Ryu, A., Mashiko, S., Nagano, T.: *Chem. Commun.*, **1997**, 21-22.
- 55) Hung, R. R., Grabowski, J. J.: *J. Phys. Chem.*, **95**, 6073-6075 (1991).
- 56) Hung, R. R., Grabowski, J. J.: *Chem. Phys. Lett.*, **192**, 249-248 (1992).
- 57) Anderson, J. L., An, Y.-Z., Rubin, Y., Foote, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **116**, 9763-9764 (1994).
- 58) Williams, R. M., Verhoeven, J. W.: *Spectrochem. Acta*, **50A**, 251-254 (1994).
- 59) An, Y.-Z., Viado, A. L., Arce, M.-J., Rubin, Y.: *J. Org. Chem.*, **50**, 8330-8331 (1995).
- 60) Bensasson, R. V., Bienvenue, E., Janot, J. M., Leach, S., Seta, P., Schuster, D. I., Wilson, S. R., Zhao, H.: *Chem. Phys. Lett.*, **254**, 566-570 (1995).
- 61) Krusic, P. J., Wasserman, E., Parkinson, B. A., Malone, B., Holler, Jr., E. R., Keizer, P. N., Morton, J. R., Preston, K. F.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 6274-6275 (1991).
- 62) Brezov*, V., Stasko, A., Rapta, P., Domschke, G., Bartl, A., Dunsch, L.: *J. Phys. Chem.*, **99**, 16234-16241 (1995).
- 63) Brezová, V., Gügel, A., Rapta, P., Stasko, A.: *J. Phys. Chem.*, **100**, 16232-16237 (1996).
- 64) Stasko, A., Brezová, V., Rapta, P., Biskupic, S., Guegel, A.: *Res. Chem. Intermed.*, **23**, 453-478 (1997).
- 65) Ruebsam, M., Dinse, K.-P., Plueschau, M., Fink, J., Krätschmer, W., Fostiropoulos, K., Taliani, C.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10059-10061 (1992).
- 66) Hwang, K. C., Mauzerall, D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9705-9706 (1992).

- 67) Hwang, K. C., Mauzerall, D.: *Nature*, **361**, 138-141 (1993).
- 68) Osaki, T., Tai, Y., Tazawa, M., Yanemura, S., Inukai, K., Ishiguro, K., Sawaki, Y., Saito, Y., Shinohara, H., Nagashima, H.: *Chem. Lett.*, **1993**, 789-792.
- 69) Imahori, H., Cardoso, S., Tatman, D., Kin, S., Noss, L., Seely, G. R., Sereno, L., Silber, J. C., Moore, T. A., Moore, A. L., Gust, D.: *Photochem. Photobiol.*, **62**, 1009-1014 (1995).
- 70) Williams, R. M., Zwier, J. M., Verhoeven, J. W.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 4093-4099 (1995).
- 71) Imahori, H., Hagiwara, K., Aoki, M., Akiyama, T., Taniguchi, S., Okada, T., Shirakawa, M., Sakata, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 11771-11782 (1996).
- 72) Kuciauskas, D., Kin, S., Seely, G. R., Moore, A. L., Moore, T. A., Gust, D., Drovestskaya, T., Reed, C. A., Boyd, P. D. W.: *J. Phys. Chem.*, **100**, 15926-15932 (1996).
- 73) Guldi, D. M., Asmus, K.-D.: *J. Phys. Chem.*, **101**, 1472-1481 (1997).
- 74) Zhang, X., Romeo, A., Foote, C. S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 11024-11025 (1993).
- 75) Mikami, K., Matsumoto, S., Ishida, A., Takamura, S., Suenobu, T., Fukuzumi, S.: *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 11134-11141 (1995).
- 76) Fukuzumi, S., Suenobu, T., Kawamura, S., Ishida, A., Mikami, K.: *Chem. Commun.*, **1997**, 291-292.
- 77) Fukuzumi, S., Suenobu, T., Patz, M., Hirasaka, T., Itoh, S., Fujitsuka, M., Ito, O.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 8060-8068 (1998).
- 78) Akasaka, T., Suzuki, T., Maeda, Y., Ara, M., Wakahara, T., Kobayashi, K., Nagase, S., Kako, M., Nakadaira, Y., Fujitsuka, M., Ito, O.: *J. Org. Chem.*, **64**, 566-569 (1999).
- 79) Jensen, A.W., Wilson, S.R., Schuster, D.I.: *Bioorg. Med. Chem.*, **4**, 767-779 (1996).
- 80) Ros, T.D., Prato, M.: *Chem. Commun.*, **1999**, 663.
- 81) Yamakoshi, Y., Yagami, T., Fukuhara, K., Sueyoshi, S., Miyata, N.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1994**, 517-517.
- 82) Nelson, M. A., Domann, F. E., Bowden, G. T., Hooser, S. B., Fernando, Q., Carter, D. E.: *Toxic. Ind. Health*, **9**, 623-630 (1993).
- 83) 第十三改正日本薬局方, 厚生省編, 914-915 (1996).
- 84) Chun, Y.-T., Sankawa, U.: *Shoyakugaku Zasshi*, **43**, 314-323 (1989).
- 85) Inamura, I., Isshiki, M., Araki, T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 1671-1673 (1989).
- 86) Inamura, I., Isshiki, M., Araki, T.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **62**, 2413-2415 (1989).
- 87) Hungerbühler, H., Guldi, D. M., Asmus, K.-D.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 3386-3387 (1993).
- 88) Andersson, Y., Nilsson, K., Sundahl, M., Westman, G., Wennerström, O.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 517-518.
- 89) Yamakoshi, Y., Yagami, T., Sueyoshi, T., Miyata, N.: *J. Org. Chem.*, **61**, 7236-7237 (1996).
- 90) Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Fukuhara, K., Miyata, N., Masumizu, T., Kohno, M.: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 12363-12364 (1998).
- 91) Yamakoshi, Y., Ymakazaki, E., Sueyoshi, S., Miyata, N.: "Fullerenes, Recent Advances in the Chemistry and Physic of Fullerenes and Related Materials, vol.5"; eds. Ruoff, R. S., Kadish, K. S., The Electrochem. Soc., Inc, Pennington, NJ, pp. 238-243 (1997).
- 92) Sakai, A., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **3**, 377-388 (1995).
- 93) Sakai, A., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **7**, 743-756 (1999).
- 94) Kai, Y., Yamakoshi, Y., Sueyoshi, S., Miyata, N.: Presented at the General Fullerene Symposium, Jan 1997, Okazaki; Abstract p 88.
- 95) Tsuchiya, T., Yamakoshi, Y. N., Miyata, N.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **206**, 885-894 (1995).
- 96) Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y. N., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **4**, 989-999 (1996).
- 97) Tsuchiya, T., Oguri, I., Yamakoshi, Y., Miyata, N.: *FEBS Lett.* **393**, 139-145 (1996).
- 98) Iwata, N., Mukai, T., Yamakoshi, Y., Hara, S., Yanase, T., Shoji, M., Endo, T., Miyata, N.: *Fullerene Sci. Technol.*, **6**, 213-226 (1998).
- 99) Tokuyama, H., Yamago, S., Nakamura, E., Shiraki, T., Sugiura, Y.: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7918-7919 (1993).
- 100) Bourtine, A. S., Tokuyama, H., Takasugi, M., Isobe, H., Nakamura, E., Hélène, C.: *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **33**, 2462-2465 (1994).
- 101) Nakamura, E., Tokuyama, H., Yamago, S., Shiraki, T., Sugiura, Y.: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 2143-2151 (1996).
- 102) An, Y.-Z., Chen, C.-H. B., Anderson, J. L., Sigman, D. S., Foote, C. S., Rubin, Y.: *Tetrahedron*, **52**, 5179-5189 (1996).
- 103) Schick, G., Grösser, T., Hirsch, A.: *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**, 2289-2290.
- 104) Isaacs, L., Wehrsig, A., Diederich, F.: *Helv. Chim. Acta*, **76**, 1230-1250 (1993).
- 105) Diederich F., Isaacs, L., Philp, D.: *Chem. Soc. Rev.*, **1994**, 243-254.
- 106) Foote, C. S.: "Singlet Oxygen", ed. Murray, W., Academic Press: New York, pp. 152-154 (1979).
- 107) Wasserman, H. H., Lipshulz, B. H.: "Singlet Oxygen", ed. Murray, W., Academic Press: New York, pp. 431-490 (1979).
- 108) Habour, J. R., Chow, V., Bolton, J. R.: *Can. J. Chem.*, **52**, 3549-3553 (1974).
- 109) Buettner, G., Mason, R. P.: "Methods in Enzymology", eds. Packer, L., Glazer A.N., Academic Press: San Diego, Vol.186, Part B, pp.127-133 (1990).
- 110) Tabata, Y., Murakami Y., Ikada, Y.: *Fullerene Sci. Technol.*, **5**, 989-1007 (1997).
- 111) Tabata, Y., Murakami Y., Ikada, Y.: *Jpn. J. Cancer Res.*, **88**, 1108-1116 (1997).