

平成21年5月12日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18710059  
 研究課題名（和文） 生体試料中フラーレン類の高感度測定法の開発と健康影響評価  
 研究課題名（英文） Development of a sensitive method for determination of fullerenes in biological samples and health risk assessment  
 研究代表者  
 久保田 領志（KUBOTA REIJI）  
 国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学部・主任研究官  
 研究者番号：80392299

研究成果の概要：生体試料中フラーレン類の前処理法および LC-MS/MS を用いた高感度測定法を開発した。in vivo 系での複数の投与経路によるフラーレンの体内動態を調査し、経口投与による吸収は低く、尾静脈投与によって肝臓、肺、脾臓、腎臓に貯留すること、また経時的に蓄積量が減少することを明らかにした。また、尾静脈投与によるフラーレンの胎盤経由の母子間移行は少ない可能性があることを示した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,600,000円	0円	1,600,000円
2007年度	1,000,000円	0円	1,000,000円
2008年度	900,000円	0円	900,000円
年度			
年度			
総計	35,00,000円	0円	35,00,000円

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：微量化学物質汚染評価・ナノマテリアル・フラーレン・健康影響評価

## 1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジー素材であるナノマテリアルは、新材料、ライフサイエンス等、様々な分野において次世代を担う新技術として注目、期待されている。一方でそれらナノマテリアルの人への健康影響や環境への放出、生態系への影響については多くの点で未解明のままであり、それらによるヒト健康影響に対する有害性評価への関心が高まっている。カーボンナノマテリアルであるフラーレ

ンは第三の炭素同位体であり、独特な構造と特性のため、フラーレンとその誘導体は様々な生理活性を示し、大きな注目を集めている。フラーレンとその誘導体の急速な商業化により、ヒトがこれらに職業や環境から経口、経皮、経気道暴露するリスクが増加している。しかし、それらの暴露によるヒト健康への潜在的な影響はほとんど明らかにされておらず、有害影響評価や体内動態に関する包括的な研究が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下に示す項目である。

(1) 生体試料（臓器組織）を対象試料としたLC-MS/MS等を用いた高感度測定法および、in vivo系での投与試験を想定した生体試料からのフラーレン類の抽出等の前処理法の検討

(2) in vivo系での投与を想定した投与溶液の調整およびマウスを用いた腹腔内投与によるフラーレンの体内分布の評価

(3) in vivo系でのラットを用いた経口投与によるフラーレンの体内分布の評価

(4) in vivo系でのラットを用いた尾静脈投与によるフラーレンの体内分布、蓄積部位における蓄積量の経時変動の評価

(5) in vivo系でのラットを用いた尾静脈投与によるフラーレンの母子間移行の評価

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では対象試料が生体試料であり、検出感度や選択性を向上させるため、検出機器には液体クロマトグラフィーータンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いることとした。液体クロマトグラフの条件としては、移動相、分離カラムを、タンデム質量分析計の条件としては、イオン化プローブおよびモニターイオン（プレカーサ、プロダクトイオン）の選択、コーン電圧等その他の条件について最適条件を検討した。

in vivo系での投与試験を想定した生体試料（臓器組織）からのフラーレン類の抽出法については下記のように行った。組織（50～200mg）をホモジナイズ管に分取し、0.01Mのドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を0.5ml加えホモジナイズした。その後ホモジネートを遠沈管に移し、トルエン5mL、酢酸0.5mLで洗いこみし、遮光して室温で5時間振とうした。振とう処理の後3500 rpmで遠心分離し、トルエン層を1 ml分取し分析に供試した。また、組織からのフラーレン類の抽出効率を評価するために、C<sub>60</sub>をホモジナイズ時に添加し、その後上記操作をするという添加回収試

験を行った。さらに、C<sub>70</sub>についてもC<sub>60</sub>と同時に添加し、抽出効率の確認およびサロゲート物質として用いることの有効性を評価した。

(2) 腹腔内投与に用いる溶液の調整については、C<sub>60</sub>の溶解度、実験動物におけるLD<sub>50</sub>値を考慮し、1-メチル-2-ピロリドン、1-オクタノール、ヘキサンについて検討した。その結果、C<sub>60</sub>の溶解度については1-メチル-2-ピロリドンが最も高濃度であり、その濃度は約800mg/Lであった。また、1-メチル-2-ピロリドンについて動物への影響を調査した結果、マウスを用いた腹腔内投与の場合1.92μl/g body wt、ラットを用いた経口投与の場合3.40μl/g body wtで影響は認められなかった。

投与に用いた実験動物は、日本エスエルシーから購入し、24時間の馴化期間を経たC57BL/6CrSlc雄8週齢のマウスを用い、C<sub>60</sub>の1-メチル-2-ピロリドン溶液を1.92μl/g body wt単回腹腔内投与した。投与後1日、3日目に、投与群各5個体および対象群3検体の脳、肺、肝臓、腎臓、脾臓、および血液（心臓採血）を採取した。採取した臓器は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

(3) 経口投与に用いる溶液の調整については、コーンオイル、スクアランの油類、C<sub>60</sub>水溶化剤として、γ-CDおよび、ポリビニルピロリドンを用いた水溶液、リポソーム、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリンのリン脂質を用いた。

投与に用いた実験動物は、日本エスエルシーから購入し、24時間の馴化期間を経たWistarラット雄6週齢を各群4匹用い、各C<sub>60</sub>溶液を10 ml/kg body wtで単回強制経口投与した。投与1日後、7日後に、投与群それぞれ2匹から、肝臓、腎臓、脾臓、腸管リンパ節、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

(4) 尾静脈投与に用いる溶液の調整につ

いては、8種のLipidを任意の濃度となるようにクロロホルムで希釈し、1~0.5ml/tubeをガラスチューブに移した。1mg/mlのC<sub>60</sub>トルエン溶液を任意量加え、ボルテックスで十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかに揮発させ、Lipid firmを作成した。クロロホルム容量と等量の1×PBS(-)を加えボルテックスしてリポソーム懸濁液とした。これを分取し、100nmでろ過したもの、ろ過していないものをそれぞれ投与溶液とした。

投与に用いた実験動物は、日本エスエルシーから購入し、3日間の馴化期間を経たWistarラット雄6週齢を各群3匹用い、各C<sub>60</sub>溶液を5ml/kg body wtで単回尾静脈投与した。投与3日後に投与群それぞれ3匹から、肝臓、腎臓、脾臓、肺、腸管リンパ節、脳、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

反復投与試験についても単回投与試験に用いた投与溶液と同様にC<sub>60</sub>の投与溶液を調整し、日本エスエルシーから購入し、3日間の馴化期間を経たWistarラット雄6週齢を各群5匹用い、C<sub>60</sub>/リポソーム溶液を5ml/kg body wtで1日1回の計4回反復尾静脈投与した。投与1日後および4日後に投与群それぞれ5匹から、肝臓、腎臓、脾臓、肺、腸管リンパ節、脳、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

蓄積部位における蓄積量の経時変動の評価については、C<sub>60</sub>の投与溶液の調整は、単回投与試験に用いた投与溶液と同様にC<sub>60</sub>の投与溶液を調整し、日本エスエルシーから購入し、3日間の馴化期間を経たWistarラット雄6週齢を各群3匹もしくは5匹用い、C<sub>60</sub>/リポソーム溶液を5ml/kg body wtで1日1回の計4回反復尾静脈投与した。投与1日後、11日後および18日後に投与群それぞれ5匹から、肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液

は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

(5) in vivo系でのラットを用いた尾静脈投与によるフラーレンの母子間移行の評価については、C<sub>60</sub>の投与溶液の調整は、8種のLipidを任意の濃度となるようにクロロホルムで希釈し、1~0.5ml/tubeをガラスチューブに移した。1mg/mlのC<sub>60</sub>トルエン溶液を任意量加え、ボルテックスで十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかに揮発させ、Lipid firmを作成した。クロロホルム容量と等量の1×PBS(-)を加えボルテックスしてリポソーム懸濁液とし、これを投与溶液とした。

投与に用いた実験動物は、日本エスエルシーから購入し、3日間の馴化期間を経たWistarラット雌13週齢妊娠9日目5匹用い、3日間の馴化の後、C<sub>60</sub>/リポソーム溶液を5ml/kg body wtで1日1回の計4回反復尾静脈投与した。投与1日後に投与群5匹から、肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳、胎仔(n=2)、胎盤、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液は、分析まで-80℃で保存した。試料からのC<sub>60</sub>の抽出法については前述の方法を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) LC-MS/MSのMSDの条件について最適条件を検討した。その結果、イオン化プローブについては大気圧化学イオン化(APCI)を用いネガティブイオンモードで、モニターするプレカーサイオン、プロダクトイオンはともにC<sub>60</sub>ではm/z=720、C<sub>70</sub>ではm/z=840であった。また、コーン電圧はC<sub>60</sub>、C<sub>70</sub>ともに120V、コリジョンエネルギーはC<sub>60</sub>、C<sub>70</sub>ともに60eVとした。本研究で用いた条件によるC<sub>60</sub>の定量下限値は10μg/Lであった。

HPLCの分離カラムについては検討の結果C30系逆相カラムのDeveosil RPFULLERENEを用いることとし、移動相にはトルエン：アセトニトリル=70%：30%のアイソクラティック法を採用した。

実験動物の臓器組織を用いたフラーレンの添加回収試験を行った。検討には日本SLC

(株) から購入した Slc:Wistar(SPF)ラット雄 6 週齢から得た臓器組織 (肝臓、腎臓、脾臓、肺、脳、および血液) を用いた。その結果、血液および測定対象とした全ての臓器において C<sub>60</sub> の回収率は 100%前後 (平均値±標準偏差: 102.7±3.9%) と良好な結果が得られた。また、MRM クロマトグラムにおいても、全ての臓器組織において良好なピーク形状であり、また、妨害ピークや干渉等は認められなかった。C<sub>70</sub> の回収率についても C<sub>60</sub> と同様に 100%前後と良好な結果 (平均値±標準偏差: 98.6±4.5%) が得られたことから、C<sub>70</sub> をサロゲートとして用いることを想定し、C<sub>60</sub> の回収率補正を行った。その結果、補正前 (102.7±3.9%) と補正後 (104.4±6.6%) で C<sub>60</sub> の回収率はほぼ同程度であり、C<sub>70</sub> で回収率補正することが可能であるといえる。

(2) C<sub>60</sub> のマウスへの *in vivo* 系投与を想定した投与条件の検討、および検討した投与条件でのマウスへの腹腔内投与試験を実施し、C<sub>60</sub> の体内分布を調査した。C<sub>60</sub> の投与溶液に採用した 1-メチル-2-ピロリドン溶液をマウスに腹腔内投与した結果、投与群の脾臓、肝臓、腎臓から C<sub>60</sub> が検出され、投与 1 日目のグループについては 5 検体中 4 検体の肝臓、脾臓から、投与 3 日目のグループについては 5 検体中 3 検体の肝臓、腎臓から、また、その中の 1 検体からは腎臓からも検出され、検出濃度については脾臓中濃度が高濃度であった。臓器重量と臓器中 C<sub>60</sub> 濃度の積から各臓器中の C<sub>60</sub> 量を算出し、測定対象の臓器における C<sub>60</sub> の負荷量分布を調査した。その結果、臓器重量が重く (57.7%)、C<sub>60</sub> が検出されている肝臓における C<sub>60</sub> の負荷量が 59.9~85.6%と高値であったのに対し、臓器重量の割合が 2.5%と軽いものの組織中 C<sub>60</sub> 濃度が高濃度であった脾臓の負荷量は 13.8%~36.2%と比較的高値を示した。脾臓中の C<sub>60</sub> 濃度が高く、C<sub>60</sub> の負荷量が多いことから、体内に取り込まれた C<sub>60</sub> が脾臓のマクロファージによって貪食されていることが考えられたが、腹腔内投与した C<sub>60</sub> が、脾臓の膜表面に吸着している可能性も考えられた。

(3) 7 種の投与溶液を用いたラットへの経口投与によるフラーレンの体内分布を評価した。C<sub>60</sub> は投与群 28 匹のうち 2 匹から検出され、検出された臓器は、リポソーム投与群の投与 1 日後の 1 検体で腎臓、腸管リンパから、コーンオイル投与群の投与 1 日後の 1 検体で腸管リンパから検出された。肝臓、脾臓からは全てで未検出であった。検出濃度はコーンオイル投与群 1 検体の腸管リンパで 1.5 μg/g wet wt、リポソーム投与群 1 検体の腸管リンパで 0.67 μg/g wet wt、腎臓で 0.13 μg/g wet wt と比較的高濃度で検出された。検出された臓器組織の検出数が少なく、同じ投与群の他の検体では検出されていないなど、検出の有無について、固体差やその他の要因も考えられるが、腸管リンパで検出されていることが正しければ、経口投与された C<sub>60</sub> が腸管から吸収され、それが腸管リンパに輸送されたことが推測される。今後は投与回数や投与方法をさらに検討し、実験動物における、C<sub>60</sub> の吸収、体内挙動についてさらに調査する必要がある。

(4) *in vivo* 系でのラットを用いた尾静脈投与によるフラーレンの体内分布、蓄積部位における蓄積量の経時変動を評価した。*in vivo* 系で C<sub>60</sub> のラットを用いた単回尾静脈投与試験を実施した結果、未ろ過の C<sub>60</sub>/リポソーム溶液投与群においてのみ C<sub>60</sub> は検出され、一検体の肝臓、肺からそれぞれ検出された。C<sub>60</sub> が肺、肝臓から検出されたことで、尾静脈から投与された C<sub>60</sub> が肺でトラップされ、通り抜けたものが肝臓に達した可能性が考えられる。しかしながら、検出されたのはそれぞれ 1 検体のみであり、さらなる調査が必要であると考えられる。ろ過 100nm でろ過した C<sub>60</sub>/リポソーム溶液投与群では懸濁状態の C<sub>60</sub> が除去され、投与溶液中の C<sub>60</sub> 濃度が減少したことが考えられた。C<sub>60</sub>/リポソーム溶液投与による死亡等の毒性影響は認められなかった。

*In vivo* 系で C<sub>60</sub> のラットを用いた反復尾静脈投与試験を実施し結果、C<sub>60</sub>/リポソーム溶液 (未ろ過) 投与群の肝臓、腎臓、脾臓、肺から 2 群すべてにおいて C<sub>60</sub> が検出された。

検出された4臓器において、最高濃度は、投与1日後に解剖した投与群の肺で64.5µg/g wet wt.であったが、投与1日後に解剖した投与群におけるC<sub>60</sub>の肺中濃度は32.8±24.7µg/g wet wt. (平均値±SD) (濃度範囲: 7.89~64.5µg/g wet wt.) でばらつきは大きかった。肝臓、脾臓についても肺と同程度の濃度であった。一方、腎臓においては、両投与群ともに0.464±0.295µg/g wet wt. (平均値±SD、投与1日後)、0.178±0.06µg/g wet wt. (平均値±SD、投与4日後) と他の3臓器に比べ極めて低濃度であった。さらに、肝臓、脾臓、肺については投与群間での差異は認められなかったが、腎臓においては、投与1日後に解剖した投与群に比べ、投与4日後に解剖した投与群で有意に低濃度であった (Mann-whitney's U-test, p=0.016) (Fig. 1)。以上の結果から、反復尾静脈投与により、C<sub>60</sub>は肺、肝臓、脾臓に主に分布し、他の3臓器に比べて微量ではあるが腎臓中で検出されたC<sub>60</sub>は経時的に尿を通して排泄される可能性が示唆された。

In vivo系でC<sub>60</sub>のラットを用いた反復尾静脈投与試験を実施した。その結果、C<sub>60</sub>/リポソーム溶液 (未ろ過) 投与群の投与11、18日後に解剖した群では肝臓、脾臓、肺から2群すべてにおいて、投与1日後に解剖した群からは腎臓においてもC<sub>60</sub>が検出された。投与1日後、11日後、および18日後に解剖した投与群それぞれにおける蓄積部位中C<sub>60</sub>濃度の変化、体内分布の経時変化を評価した。腎臓においては、投与1日後に解剖では他の臓器に比べて低濃度ではあるが検出されているが、投与11日後、18日後ではそれぞれ定量下限値未満であり、腎臓において、他の臓器に比べ低濃度ではあるが、蓄積したC<sub>60</sub>は数日で定量下限値未満まで減少し、尿等を経由して排泄されていることが推察された。他の臓器については、肺では明確な減少傾向は確認されなかったが、肝臓、脾臓においては経時敵な減少傾向が認められ、肝臓では投与1日後>投与11日後>投与18日後と明確な減少傾向が観察された。また、脾臓においては投与1日後≒投与11日後ではあるが投

与11日後>投与18日後と、肝臓に比べ緩やかな減少傾向を示した。肝臓および脾臓におけるC<sub>60</sub>の減少の要因は明らかではないが、血液を介して肝臓、腎臓に蓄積 (捕捉) されたC<sub>60</sub>が酸化や抱合等の代謝をうけ、他の組織に分布、もしくは排泄されたことが考えられた。今後はC<sub>60</sub>の代謝物等の探索、代謝排泄経路についても調査する必要がある。

(5) in vivo系でのラットを用いた尾静脈投与によるフラーレンの母子間移行の評価を行った。分析には各雌から胎仔2匹を用い、それぞれの胎盤についても分取、分析に用いた。その結果、胎仔、胎盤共にすべての試料においてC<sub>60</sub>は定量下限値未満であった。尾静脈経由で投与されたC<sub>60</sub>が肺、肝臓、脾臓等でトラップされ、胎盤に到達した段階ではすでに定量下限値未満になっていることも考えられるため、今後投与条件等を検討し、母子間移行について再度検討する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計0件)

[学会発表] (計5件)

- ① 久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、杉本直樹、西村哲治: LC-MS/MSによるC<sub>60</sub> フラーレンのラットへの経口、尾静脈投与による体内分布、日本薬学会第129年会、2009年3月、京都
- ② Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Hirose A., Shimizu, K., Oku, N., and Nishimura, T.: Tissue distribution of fullerene C<sub>60</sub> in rat after oral and tail-vein administration by LC-MS/MS, The 45<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, October, 2008, Rhodes, Greece
- ③ Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H., Hirose A., Ema, M., and

Nishimura, T. : Quantitative determination of C60 fullerene by LC-MS/MS and its tissue distribution following oral administration, 47<sup>th</sup> of the Society of Toxicology Annual Meeting, March, 2008, Seattle, USA

- ④ Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Tokunaga, H., Hirose A., and Nishimura, T. : Tissue distribution of C60 fullerene in mice after intraperitoneal administration by liquid chromatography – tandem mass spectrometry. 27<sup>th</sup> Annual Meeting of American College of Toxicology, November, 2006, Indian Wells, USA

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

久保田 領志 (KUBOTA REIJI)

国立医薬品食品衛生研究所・環境衛生化学  
部・主任研究官

研究者番号：80392299

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：