

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23710083

研究課題名(和文) フラーレンC60の生体内代謝排泄機構に関する研究

研究課題名(英文) A study on metabolic pathway of fullerene C60 in vivo.

研究代表者

久保田 領志(Kubota, Reiji)

国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・主任研究官

研究者番号：80392299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：C60の生体内代謝物として存在する可能性があるフルーレン誘導体(C600、C6002、C6003およびC60(OH)2)について、LC/MS/MSを用いた高感度分析法の検討及びin vitro系を想定した試料からのフルーレン誘導体の抽出等の前処理法を検討し、それぞれ確立した。in vitro系でのフルーレン誘導体の細胞毒性について評価した結果、C600で濃度依存的に細胞生存率が低下することや、C6002およびC6003はC60より低毒性であることを見出した。また、肝ミクロゾームを用いたC60の代謝試験の結果、本研究の条件ではフルーレン誘導体が生成しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：For the determination of fullerene derivative (C600, C6002, C6003, and C60(OH)2) with the possibility of existing as a metabolite of C60 in vivo, a sensitive analytical method using high performance liquid chromatography &#8211; tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) and extraction procedure from samples of in vitro studies was established in this study. We examined the cytotoxic effects of fullerene derivative with HepG2 cells. C600 induced cytotoxic effects in HepG2 cells and the tendency was enhanced in a concentration&#8211;dependent manner. On the other hand, C6002 and C6003 were less toxic than C60. We evaluated the metabolism of fullerene in vitro by using rat liver microsomes. No fullerene derivatives were observed in this metabolic testing system.

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：フルーレン 代謝物 LC/MS/MS in vitro 細胞毒性 肝ミクロゾーム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ナノテクノロジーは、情報・通信、医療、環境・エネルギー等の広範囲の分野において、21世紀の科学技術を担うキーテクノロジーとして、その重要性が増している。ナノテクノロジー素材である人工ナノ粒子 (Engineered nanoparticles, ENPs) は、特定の用途に合う物理化学的特性を持つように意図的に設計され、ヒトが直接摂取する分野では、製薬、食品、化粧品等に应用されている。しかしながら、それらを摂取した場合のヒト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る。また、人工ナノ粒子は粒子径によって吸収、排泄等生体内での挙動が変化する可能性があることから、人工ナノ粒子の物理化学的特性を考慮した有害影響評価を行うことが緊急課題となっている。

研究代表者は、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性影響評価および体内動態評価に関する基礎研究 (厚生労働科学研究費補助金、研究協力者) 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 (科学研究補助金 (平成18~20年)、研究代表者) として、人工ナノ粒子で、これまでの炭素体とは異なる新規機能を有するナノサイズの炭素物質 (ナノカーボン) であるフラーレンについて研究を行ってきた。フラーレンはグラファイト、ダイヤモンドに次ぐ第三の炭素同位体で、金属やさまざまな元素を中空の骨格に内包させた内包フラーレンや、フラーレンの球状表面に様々な官能基をつけた化学修飾フラーレン (水酸基を導入したフラレノール等) さらにはフラーレンの分子間で共有結合を持つ結晶であるフラーレンポリマー等、さまざまな誘導体が報告されている。これらのフラーレン誘導体それぞれが持つ物理化学的特性から様々な分野に応用され、医薬品分野では抗がん剤、抗エイズ剤、骨粗しょう症、筋萎縮性側索硬化症等に有効な新しいタイプの治療薬として応用されつつあり、近年ではフラーレン誘導体を含む化粧品が数多く市販されている。研究代表者は前述の研究テーマにおいて、フラーレン誘導体に共通の基本骨格である無修飾フラーレン ( $C_{60}$ 、 $C_{70}$ ) を対象に、生体試料 (臓器組織)、培養細胞を対象試料とした高速液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) を用いた高感度測定法の開発や、in vivo、in vitro 系での投与試験を想定した投与溶液の調整法の確立、試料からのフラーレンの抽出法の

確立、マウスおよびラットにフラーレンを投与し、その体内動態を調査し、血液脳関門通過や胎盤移行の有無、投与経路の違いによる体内分布の差異、体内分布の経時変動の有無について明らかにしてきた。しかしながら、フラーレン誘導体に関する毒性影響については、水溶性のフラーレンにおいて、細胞毒性、酵素活性阻害、ラットの腎臓におけるネフローゼ等が報告されているが情報は限定的かつ散発的であり、包括的なフラーレン誘導体の物理化学的特性を考慮した有害影響評価を行う必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下に示す項目である。

(1) フラーレン誘導体 ( $C_{60}(\text{OH})_2$  の高純度試薬の合成・精製および、 $C_{60}$  および  $C_{70}$  との一斉分析法の検討

(2) フラーレン誘導体 ( $C_{60}\text{O}$ 、 $C_{60}\text{O}_2$  および  $C_{60}\text{O}_3$ ) の高純度試薬の合成・精製および、 $C_{60}$  および  $C_{70}$  との一斉分析法の検討

(3) in vitro 系での投与試験を想定した生体試料からのフラーレン誘導体の抽出等の前処理法の検討

(4) in vitro 系でのヒト肝がん由来細胞を用いた毒性影響評価

(5) in vitro 系でのラット肝ミクロゾームを用いたCYPによる代謝試験

## 3. 研究の方法

(1)  $C_{60}$  の生体内代謝物として存在する可能性がある水酸化フラーレン ( $C_{60}(\text{OH})_2$ ) について、 $C_{60}$ 、 $C_{70}$  を含めた一斉分析法を LC-MS/MS を用いて検討した。水酸化フラーレン ( $C_{60}(\text{OH})_2$ ) の合成および精製法の検討については FLOX (株) において実施した。

$C_{60}$ 、 $C_{70}$ 、 $C_{60}(\text{OH})_2$  の定性定量については、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用い、電子イオン化法 (ESI) のネガティブイオンモードで測定を行った。対象物質の HPLC での分離は、Develosil RPFULLERENE、Sunfire C18、Sunfire C8 および Discovery HS F5 を用いて検討した。また、移動相については、トルエン、メタノール、アセトニトリルを用いて検討した。

(2)  $C_{60}$  の生体内代謝物として存在する可能性がある酸化フラーレン ( $C_{60}\text{O}$ 、 $C_{60}\text{O}_2$  および  $C_{60}\text{O}_3$ ) について、 $C_{60}$ 、 $C_{70}$  を含めた一斉分析法を LC-MS/MS を用いて検討した。酸化フラーレンの合成および精製法の検討については FLOX (株) において実施した。

$C_{60}$ 、 $C_{70}$ 、 $C_{60}\text{O}$ 、 $C_{60}\text{O}_2$  および  $C_{60}\text{O}_3$  の定性

定量については、液体クロマトグラフィー - タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用い、電子イオン化法 (ESI) のネガティブイオンモードで測定を行った。対象物質の HPLC での分離は、Develosil RPFULLERENE および Discovery HS F5 を用いて検討した。また、移動相の条件については、(2) の検討結果をもとに検討した。

(3) *in vivo*系での投与試験を想定した生体試料 (臓器組織) からのフラレン誘導体の抽出等の前処理法の検討については下記のように行った。培地 (5 mL) をガラス製遠沈管に分取し、0.005M のドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 0.5 mL 加え混和した。その後酢酸 0.5 mL を遠沈管に加え、同様に混和した後、トルエン 5 mL を添加し、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、 $C_{70}$  についても  $C_{60}$  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。

(4) *in vitro*系でのヒト肝がん由来細胞を用いた毒性影響評価については、 $C_{60}$ 、 $C_{60}O$ 、 $C_{60}O_2$ 、 $C_{60}O_3$  および  $C_{60}(OH)_2$  について、ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を用いて、LDH Assay および Cell Viability Assay で毒性影響を評価した。投与溶液については DMSO で調製し、0.03、0.1、0.3、1、3、10 mg/mL の濃度範囲で各 3 連で行い、各ウェルにおける細胞濃度は  $1 \times 10^5$  cells/mL、曝露期間は 3 日間とした。

(5) *in vivo*系でのラット肝ミクロゾームを用いた CYP による代謝試験については、ラット肝ミクロゾームは、雄ラット (SD) でタンパク濃度は 20 mg/mL のものを用いた。 $C_{60}$  の投与溶液は DMSO で調製し、濃度は 5 mM とした。具体的な操作については、ガラス製の遠沈管に精製水、0.5 M リン酸バッファー (pH 7.4)、NADPH リジェネレーションシステムソリューション A および B、基質 ( $C_{60}$  DMSO 溶液 (濃度: 5 mM) を加えて 37 °C の湯浴で保持したのち、肝ミクロゾームを混合液に添加し、37 °C 湯浴中で 1~2 時間反応させた。その後、肝ミクロゾーム代謝反応液 5 mL に 0.005 M の SDS 水溶液を 0.5 mL および酢酸 0.5 mL を添加して混和し、トルエン 5 mL を加えて 5 時間振とう抽出し、その後遠心処理してトルエン層 1 mL 分取し測定溶液とした。

#### 4. 研究成果

(1)  $C_{60}$  の生体内代謝物として存在する可能性がある水酸化フラレン ( $C_{60}(OH)_2$ ) について、 $C_{60}$  および  $C_{70}$  を含めた一斉分析法

を LC-MS/MS を用いて検討した。我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS 法によるフラレン類の分析法を用いて  $C_{60}(OH)_2$  の定量分析が可能か検討したところ、ピーク等は観察されず、同じ条件での一斉分析は困難であった。そのため、新たに LC-MS/MS のプローブに ESI を用い、 $C_{60}$ 、 $C_{70}$  および  $C_{60}(OH)_2$  の分離については、C30 系カラム、C18 系カラム、C8 系カラムおよび F5C6 系カラムを分離カラムに、トルエン、メタノールおよびアセトニトリルを移動相に用いて検討した。MS/MS 条件については、各化合物のトルエン/メタノール溶液を調製し、インフュージョン法で試料を MS に導入した結果、化合物由来のフラグメントがメインピークとして観察され、このメインピークの強度をモニターし、最適化したキャピラリ - 電圧、コロン電圧、コリジョンエネルギーを用い、カラムの分離状況を検討した。C30 系カラム、C18 系カラムおよび C8 系カラムについて、トルエン、メタノールおよびアセトニトリルのアイソクラティック法、もしくはトルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離状況を検討した結果、これら 3 種類ではいずれも良好な分離状況もしくは感度が得られなかった。一方、F5C6 系カラムでは、トルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離状況を検討した結果、良好なピーク形状・分離状況および感度が得られた。検討の結果採用した条件を用い、定量下限値を求めた結果、 $C_{60}$  が 0.1  $\mu$ g/L、 $C_{70}$  が 0.2  $\mu$ g/L、 $C_{60}(OH)_2$  が 1  $\mu$ g/L であった。 $C_{60}$  および  $C_{70}$  については、我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS の定量下限値に比べ、それぞれ 100 倍、50 倍も高感度であり、 $C_{60}(OH)_2$  についても十分低濃度域まで測定可能であることが明らかとなった。本研究によって、 $C_{60}$  および  $C_{70}$  のさらなる高感度分析と、フラレン誘導体との多成分一斉分析が可能となった。

(2)  $C_{60}$  の生体内代謝物として存在する可能性がある酸化フラレン ( $C_{60}O$ 、 $C_{60}O_2$  および  $C_{60}O_3$ ) について、 $C_{60}$  および  $C_{70}$  を含めた一斉分析法を LC-MS/MS を用いて検討した。 $C_{60}(OH)_2$  と同様に我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS 法によるフラレン類の分析法を用いて定量分析が可能か検討した結果、水酸化フラレンと同様にピーク等は観察されなかったことから、水酸化フラレンと同様に LC/MS/MS のプローブに ESI を用い、 $C_{60}$ 、 $C_{70}$ 、 $C_{60}O$ 、 $C_{60}O_2$  および  $C_{60}O_3$  の分離については、C30 系カラムおよび F5C6 系カラムを分離カラムに、トルエンおよびメタノール

ルを移動相に用いて検討した。MS/MS 条件については、各化合物のトルエン/メタノール溶液を調製し、インフュージョン法で試料をMS に導入した結果、化合物由来のフラグメントがメインピークとして観察され、このメインピークの強度をモニターし、最適化したキャピラリー - 電圧、コーン電圧、コリジョンエネルギーを用い、カラムの分離状況を検討した。C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> において良好な結果が得られていた F5C6 系カラムでは、トルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離状況を検討した結果、複数のピークが観察されることや、ピーク形状も良好ではなかった。そこで、C30 系カラムを用い、トルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離状況を検討した結果、酸化フラレン類 3 種ともに各化合物 1 本のピークが観察され、また、ピーク形状や分離状況も良好な結果が得られた。また、注入量や測定溶液組成についても検討した結果、注入量は 20 µL 上限に、測定溶液はトルエン 100% 溶液でも問題なかった。検討の結果採用した条件を用い、0.2、0.5、1、2 及び 5 µg/L の濃度範囲において検量線を作成し直線性を確認した結果、 $r=0.998 \sim 0.999$  の検量線が得られ、また、定量下限値付近の検量線試料を 5 回測定した 10 にて試験溶液中の定量下限値を求めた結果、C<sub>60</sub>O、C<sub>60</sub>O<sub>2</sub> および C<sub>60</sub>O<sub>3</sub> は 0.5 µg/L となり、高感度分析が可能であることが示された。

(3) in vitro 系での投与試験を想定した生体試料からのフラレン誘導体の抽出等の前処理法の検討については、培地からの抽出を想定して検討を行った。添加回収試験には培地 (10% FCS Minimum essential Medium eagle) 5 mL を用い、各酸化フラレン濃度は 50 µg/L とし、各 3 連で行った。MRM モードでクロマトグラムを評価した結果、各酸化フラレンについて、ピーク形状は良好であった。各化合物の回収率については 81.5 ~ 91.2% と良好な回収率が得られた。さらにサロゲート物質として C<sub>70</sub> で回収率補正した場合でも 99.4 ~ 104% とそれぞれ良好な結果が得られたことから、C<sub>70</sub> で回収率補正することが可能であるといえる。以上の結果から、in vitro 系からの酸化フラレンの抽出法を確立できたと判断した。

(4) in vitro 系でのヒト肝がん由来細胞を用いた毒性影響評価については、C<sub>60</sub>O、C<sub>60</sub>O<sub>2</sub>、C<sub>60</sub>O<sub>3</sub> 及び C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> について、ヒト肝がん由来細胞 HepG2 を用いて、LDH Assay 及び Cell Viability Assay で毒性影響を評価した。LDH Assay では酸化フラレン 3 種および水酸化フ

ラレンにおいて毒性影響に有意差は無く、C<sub>60</sub> が酸化もしくは水酸化されることによる毒性影響が変化するような傾向は観察されなかった。一方で、Cell Viability Assay においては、C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> については LDH Assay と同様に C<sub>60</sub> との差異は認められなかったが、C<sub>60</sub>O において濃度依存的に細胞生存率 (%) が低下し、投与溶液濃度 10 mg/mL では C<sub>60</sub> に比べ有意に毒性が強いことが明らかとなった ( $p=0.0495$ , Mann-Whitney U test)。また、有意な傾向ではなかったが、C<sub>60</sub>O<sub>2</sub> および C<sub>60</sub>O<sub>3</sub> で C<sub>60</sub> より毒性影響は小さくなる傾向が観察された。以上より、C<sub>60</sub> が酸化されることでその毒性影響が増減する可能性が示唆された。今後はこれらのメカニズムについて更なる調査が必要と考えられた。

(5) in vitro 系でのラット肝ミクロゾームを用いた CYP による代謝試験については、雄ラット (SD) のものを用い、C<sub>60</sub> の投与溶液は 5 mM の DMSO 懸濁液とし、反応時間については、本研究で用いた評価系において最大の 2 時間と 1 時間でそれぞれ行った。比較のために肝ミクロゾームの代わりに精製水を添加した試料 (コントロール試料) との比較で、フラレン誘導体の生成を評価した結果、LC/MS/MS 分析における MRM クロマトグラムの保持時間から C<sub>60</sub>O のピークが観察されたが、コントロール試料と比べて有意な差はなく、本研究で用いた評価系において酸化フラレン類等の代謝物の生成は確認できなかった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura T. (2011): Time-dependent variation in the biodistribution of C60 in rats determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, Toxicology Letters, 206, 172-177.
2. Takahashi, M., Kato, H., Doi, Y., Hagiwara, A., Hirata-Koizumi, M., Ono, A., Kubota, R., Nishimura, T., Hirose, A. (2012): Sub-acute oral toxicity study with fullerene C60 in rats, The Journal of Toxicological

Sciences, 37, 2 April, 353-361.

〔学会発表〕(計 5件)

1. Nishimura, T., Kubota, R., Shimizu, K., Tahara, M., Obama, T., Sugimoto, N., Kanno, J., Hirose, A. (2010) : Tissue distribution of fullerene after injected into rat tail vein to mimic the absorption from the digestive tract, XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain, July, abstracts.P303-024.
2. Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A., Ikarashi, Y. (2010) : Bio-distribution of fullerenes intravenous administration, 2010 Annual Meeting of the Korea Society of Environmental Health and Toxicology, Suwon, Korea, November, abstracts.
3. Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Obama, T., Sugimoto, N., Hirose, A. (2011) : Bio-distribution of fullerenes intravenous administration in rat, 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting & ToxExpo, SOT, Washington, D.C., USA, March, abstracts.
4. Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Kobayashi, N., Sugimoto, N., Hirose, A., Nishimura T. (2011) : Time-dependent biodistribution of C60 in rat after tail-vein administration, 47<sup>th</sup> Congress of the European Societies of Toxicology, Paris, France, August, abstracts. 2342.
5. Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Obama, T., Hirose, A., Sugimoto, N. (2011) : Bio-distribution of C<sub>60</sub> fullerene injected into the rat tail vein, 5th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOEH), Boston, USA, August, abstracts.

〔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・生活衛生化学  
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：